

MALDI MS Imaging zur Untersuchung von synovialen Gewebe

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Mark Kriegsmann
geboren am 13.01.1987 in Jena

Angefertigt am Institut für Klinische Immunologie der
Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer
Prof. Dr. med. Ulrich Sack

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom

16.07.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG	II
REFERAT	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	5
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	5
1.2 Stellenwert von Biomarkern bei Rheumatoider Arthritis	5
1.3 Massenspektrometrie	6
1.3.1 Einführung in die Massenspektrometrie	6
1.3.2 MALDI MS Imaging	7
1.3.2.1 Vorteile von MALDI MS Imaging	8
1.3.2.2 Nachteile von MALDI MS Imaging	8
1.3.3 Massenspektrometrie in der Arthritisforschung	9
1.4 Histopathologie bei Rheumatoider Arthritis	9
1.5 Potentielle Biomarker bei Rheumatoider Arthritis	10
1.6 Fragestellung	11
2 PUBLIKATIONSMANUSKRIFT	12
3 ZUSAMMENFASSUNG	17
4 LITERATURVERZEICHNIS	20
5 ANHANG	27
5.1 Selbständigkeitserklärung	27
5.2 Lebenslauf.....	28
5.3 Danksagungen	30

Bibliographische Beschreibung

Kriegsmann, Mark

MALDI MS Imaging zur Untersuchung von synovialen Gewebe

Universität Leipzig, Dissertation

Promotionsarbeit 30 Seiten, 76 Literaturangaben

Publikationsmanuskript 5 Seiten, 21 Literaturangaben, 3 Abbildungen

Referat

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung von *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass spectrometry Imaging* (MALDI MS Imaging) zur Analyse von synovialen Gewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis oder Arthrose.

Hematoxylin-Eosin gefärbte Gefrierschnitte wurden zur morphologischen Korrelation massenspektrometrischer Daten herangezogen. Parallelschnitte von Synovialgewebe wurden massenspektrometrisch mittels MALDI MS untersucht. Dazu wurde eine spezifische Matrix appliziert, anschließend durch einen Laser Ionen generiert, diese nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) separiert und anschließend detektiert. MALDI MS wurde in zwei Modi (MALDI MS Imaging und MALDI MS Imaging im *Profiling Mode*) genutzt, um das Massenspektrum einzelner Areale unterschiedlicher synovialer Gewebekompartimente zu korrelieren. Die generierten Daten wurden mit Hilfe von Computerprogrammen zur Detektion potentieller Biomarker analysiert.

Zahlreiche m/z -Quotienten wurden generiert und konnten sowohl bereits bekannten potentiellen Biomarkern wie S100-Proteinen (S100A6, S100A8, S100A11) und Defensinen (alpha-1-beta, alpha-1, alpha-3), als auch neuen potentiellen Biomarkern wie Thymosinen (beta-10 -2AA, beta-4 -2AA) zugeordnet werden.

Die Ergebnisse belegen, dass *MALDI MS Imaging* zur Detektion von Molekülen in synovialen Gewebe geeignet ist und die Technik zur Analyse der Proteinverteilung genutzt werden kann. In Zukunft könnten massenspektrometrische Methoden zu einer Objektivierung histopathologischer Analysen beitragen.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
ACR	American College of Rheumatology
CRP	C-reaktives Protein
EULAR	European League against Rheumatism
FFPE	Formalin-fixed Paraffin-embedded
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
RA	Rheumatoide Arthritis

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Multisystemerkrankung, die durch eine polyartikuläre Synovitis der peripheren Gelenke charakterisiert ist. Es ist die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von etwa 1 % (1). Die Ätiologie und Pathogenese der RA sind bisher nicht vollständig geklärt (2). Das Krankheitsbild ist heterogen. Der klinische Verlauf der RA ist variabel und reicht von einer kurzen Erkrankungsdauer mit Beteiligung weniger Gelenke bis zur rasch progredienten Destruktion von Knorpel und Knochen mit erheblicher funktioneller Beeinträchtigung (1). Die Diagnose wird heute klinisch gestellt und basiert auf den Kriterien des *American College of Rheumatology* und der *European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR Kriterien) (3). Trotz Einführung moderner Medikamente, insbesondere von *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs* und Biologika, die zu signifikanten Fortschritten für Patienten mit RA geführt haben, ist die Erkrankung bisher nicht heilbar (4-7).

1.2 Stellenwert von Biomarkern bei Rheumatoider Arthritis

Die soziale und ökonomische Belastung durch die RA ist hoch und resultiert aus verminderter Lebensqualität, Produktionsausfall und steigenden Kosten der medikamentösen Therapie (8). In Anbetracht der demographischen Entwicklung mit steigender Lebenserwartung ist insgesamt ein Kostenanstieg zu erwarten. Diese Entwicklung unterstreicht die Notwendigkeit zur Suche nach Biomarkern, um Patientenpopulationen auszuwählen, die besonders von einer Behandlung mit neuen Medikamenten profitieren (8).

Die Einführung und Verwendung von Biomarkern im Management der RA ist von großer sozio-ökonomischer Relevanz und bezieht sich nicht nur auf diagnostische, sondern auch auf prognostische und auf die Krankheitsaktivität bezogene Aspekte. Die Suche nach neuen Biomarkern zur frühen Diagnosestellung ist essentiell, um eine irreversible Gelenkzerstörung zu verhindern und dadurch die Lebensqualität von Patienten mit RA zu verbessern (9). Die Sensitivität der bisher zur Diagnosestellung herangezogenen ACR/EULAR Kriterien lag in einer Studie bei 69 % (10). Bei einer geschätzten Prävalenz von 1 % und einer Bevölkerungszahl von etwa 82 Millionen Einwohnern im Jahr 2011 (11) werden allein in Deutschland rund 250 000 Patienten mit RA nicht identifiziert. Daneben ist die Suche nach prognostischen Biomarkern

wichtig, um Risikopatienten mit einem aggressiven Verlauf zu identifizieren, damit sie einer intensivierten Therapie zugeführt werden können. Darüber hinaus kann durch die Bestimmung der Krankheitsaktivität mit Hilfe von Biomarkern eine individuell angepasste Therapie erfolgen (9, 12). Analog zu neoplastischen Erkrankungen könnte in Zukunft eine molekulare Subtypisierung mit Hilfe von Markersystemen Patientenpopulationen selektieren, die auf ausgewählte Medikamente ansprechen (13, 14). Patienten könnten so vor einer Behandlung mit nicht wirksamen Präparaten und deren Nebenwirkungen geschützt und die begrenzten ökonomischen Ressourcen sinnvoll eingesetzt werden (8).

Bei der Identifikation von potentiellen Biomarkern liegt ein Forschungsschwerpunkt auf der Untersuchung von Proteinen. Diese unterliegen posttranslationalen Modifikationen und alternativem Splicing. Dadurch wird die größere Komplexität des Proteoms im Vergleich zum Genom bedingt (15). Bisher wurden bei der Analyse von Proteinen verschiedene einfache Verfahren angewandt (2D Elektrophorese sowie fluoreszenz- und affinitätsbasierte Verfahren). Im Zuge komplexer werdender molekularer Fragestellungen werden Techniken benötigt, die Einschränkungen bisher verwendeter Methoden überwinden können (16).

1.3 Massenspektrometrie

1.3.1 Einführung in die Massenspektrometrie

Die *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) *Mass Spectrometry* (MS) wurde in verschiedenen Bereichen in der Medizin und Biotechnologie eingesetzt. Peptide, Proteine, Lipide und Medikamente können detektiert und analysiert werden (17-19). Die Methode kann zur Analyse von Flüssigkeiten, isolierten oder mikrodisezierten Zellen, Geweben, Organen oder ganzen Tieren eingesetzt werden. Dafür stehen prinzipiell drei Methoden zur Verfügung. Neben der Erstellung eines Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) ohne morphologische Information, dem MALDI *Profiling*, gibt es zwei Techniken um molekulare Informationen mit morphologischen Strukturen zu korrelieren: MALDI MS Imaging und MALDI MS Imaging im *Profiling Mode* (18, 20-22).

1.3.2 MALDI MS Imaging

MALDI MS Imaging ist eine neue Methode zur Analyse von Geweben, Organen oder komplexen biologischen Strukturen. Mit dieser Technik können nicht nur massenspektrometrische Daten erzeugt, sondern diese auch mit morphologischen Strukturen korreliert werden (23). Grundsätzlich stehen zwei MALDI MS Imaging Techniken zur Verfügung: MALDI MS Imaging und MALDI MS Imaging im *Profiling Mode* (auch *histology-directed* MALDI Imaging) (20). Üblich ist die Verwendung von Gefrierewebe als Ausgangsmaterial für massenspektrometrische Analysen. Bis vor wenigen Jahren konnten Massenspektren nicht an Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe erstellt werden, da die Behandlung mit Formaldehyd zur Formation von Methylen-Brücken und anschließender Proteinquervernetzung führt (22). Diese nichtlösliche Verbindung erhält die morphologische Integrität der Gewebe, stört aber die Rekrutierung von Proteinen durch die Matrix (24, 25). Neue Methoden, insbesondere die Hitze-induzierte Antigendemaskierung, gekoppelt mit tryptischer *in-situ* Hydrolyse, erlauben nun auch die Applikation dieser Technik an FFPE Gewebe (22, 26).

Zunächst wird ein 5-10 µm dicker Gewebeschnitt erstellt und dieser auf einen leitenden Indiumzinnoxid-beschichteten Objektträger aufgebracht. Um eine Interferenz mit Salzen und ionensupprimierenden Lipiden zu verhindern, wird das Präparat anschließend mit einer Ethanollösung in absteigender Konzentration gewaschen. Danach wird Matrix appliziert. Hierbei stehen ultraschallgesteuerte Matrixroboter (27), Sublimation (28) und Nebulisation zur Verfügung. Anschließend werden in einem Massenspektrometer mit Hilfe eines Lasers Ionen erzeugt, diese separiert und detektiert. Jeder Koordinate auf dem Präparat wird ein Massenspektrum zugeordnet. Die morphologischen- und massenspektrometrischen Daten werden mittels biomathematischer Software miteinander korreliert. Es kann sowohl das gemittelte Spektrum, als auch jedes einzelne Massenspektrum analysiert werden (17, 18, 29).

MALDI Imaging im *Profiling Mode* stellt eine Erweiterung der Methode dar. Im Gegensatz zum MALDI MS Imaging wird nicht der gesamte Gewebeschnitt untersucht, sondern nur die von einem Pathologen selektierten Areale. Damit ist der *Profiling Mode* insbesondere zur schnellen Analyse zahlreicher Gewebeproben und somit zur Biomarkersuche von besonders interessanten Gewebekompartimenten geeignet (30).

1.3.2.1 Vorteile von MALDI MS Imaging

Bei der Anwendung in der Medizin und Biotechnologie ergeben sich zahlreiche Vorteile von MALDI MS Imaging gegenüber bisher verwendeten Techniken. Da die Integrität der Gewebe erhalten bleibt, ist die Untersuchung der Moleküle in Ihrer nativen Umgebung möglich. Dies erlaubt die Analyse biologischer Prozesse *in-situ* (16, 21). Im Gegensatz zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten oder einzelnen Zellen bleiben morphologische Informationen erhalten und können mit molekularen Informationen korreliert werden. Ein Vorteil gegenüber fluoreszenz- oder affinitätsbasierten Methoden ist die Detektion unbekannter Zielmoleküle. Somit ist auch die aufwändige Herstellung proteinspezifischer Antikörper nicht notwendig. Darüber hinaus ermöglicht MALDI MS Imaging eine automatisierte und gleichzeitige Analyse mehrerer Substrate und dadurch eine schnelle Untersuchung der Proben. Mit modernen Geräten können Massenspektren von *Tissue-Microarrays* mit bis zu 300 FFPE Gewebeproben innerhalb von 6 Stunden generiert werden (22). In der mikrobiologischen Diagnostik ist die Analyse mittels MS derzeit die schnellste Methode zur Identifikation von Mikroorganismen (31). Insbesondere für die Anwendung im medizinischen Bereich stellt die Gewinnung objektiver und reproduzierbarer Ergebnisse eine neue Qualität der Diagnostik dar (17, 21, 22). Da neue Präparationstechniken auch den Einsatz von FFPE Gewebe als Ausgangsmaterial für MS erlauben (22, 26), kann zukünftig auf große Gewebedatenbanken zugegriffen werden. Damit sind auch über 100 Jahre alte Präparate der Analyse durch MALDI MS Imaging zugänglich (22).

1.3.2.2 Nachteile von MALDI MS Imaging

MALDI MS Imaging unterliegt dem technischen und methodischen Fortschritt. So konnte die räumliche Auflösung in den letzten Jahren kontinuierlich verbessert werden. Sie liegt heute bei 10-100 μm (bei FFPE Gewebe zwischen 150-200 μm) (17, 18). Abhängig von der verwendeten Matrix steht ein eingeschränkter Analysebereich mit höchster Effektivität zwischen 2000 und 80000 Da zur Verfügung. Allerdings sind durch spezielle Aufarbeitung auch andere Messbereiche von unter 2000 Da und über 100 000 Da zugänglich (18). Bisher ist die Sensitivität geringer als bei fluoreszenz- oder affinitätsbasierten Methoden (17, 18, 21, 22). Durch hohe Anschaffungskosten und den Mangel an

Expertise ist die Methode zum heutigen Zeitpunkt nur eingeschränkt verfügbar. Aus diesem Grund liegen bisher nur wenige Referenzstudien vor.

1.3.3 Massenspektrometrie in der Arthritisforschung

Massenspektrometrische Methoden wurden bei Patienten mit Arthritis zur Analyse von Blut, Serum (12, 32-41), Synovialflüssigkeit (12, 35, 36, 40-43) und Synovialgewebe (36, 39, 44) eingesetzt. Blut und Serum sind durch einfache Venenpunktion zugänglich, allerdings aufgrund großer unspezifischer Proteinbeimengungen mit analytischen Problemen behaftet. Dies zeigt sich in einer hohen Expression von Hintergrundproteinen, in stark fluktuierenden Proteinexpressionsmustern und in einer nur geringen Menge synovialer Proteine (45). In der vorliegenden Arbeit wurde Synovialgewebe analysiert, da es minimalinvasiv zugänglich ist (46) und die Untersuchung am primären Ort der Entzündung erlaubt (44), der in der Ätiopathogenese der RA das größte Interesse auf sich zieht. Die histologische Untersuchung sichert die Qualität der Gewebeproben und ist damit Garant für eine höchstmögliche Ergebnisqualität (47).

Problematisch ist die Gewinnung naiver Gewebeproben (ohne vorangegangene Therapie), da in dieser Krankheitsphase eine chirurgische oder minimal-invasive Diagnostik oder Therapie in den aktuellen Leitlinien nicht enthalten ist.

1.4 Histopathologie bei Rheumatoider Arthritis

Die histologische Untersuchung von Synovialgewebe bei Patienten mit RA erlaubt eine Objektivierung synovialer Veränderungen und eine Einschätzung der Krankheitsaktivität (47). Darüber hinaus leistet sie einen wichtigen Beitrag zur differenzialdiagnostischen Abklärung von Gelenkentzündungen (48). Histomorphologisch steht bei der RA eine Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht, eine erhöhte Zellularität des subsynovialen Stromas und eine variabel ausgeprägte Entzündungszellinfiltration im Vordergrund. Mit Hilfe des Synovialitis-Score kann eine semiquantitative Evaluierung der drei Gewebekompartimente erfolgen (0=nicht nachweisbar bis 3=stark nachweisbar) (47). Ein kumulierter Synovialitis Score von >4 zeigt eine rheumatoide Gelenkerkrankung mit einer Sensitivität von 73% und einer Spezifität von 86% an (47). Pathognomonische Rheumagranulome mit einer typischen zentralen fibrinoiden Nekrose finden sich bei 25 % der Patienten (49).

Eine prognostische Einschätzung erlaubt die 1997 entwickelte Stiehl-Klassifikation, bei der drei histologische Subtypen der RA differenziert werden (50): Typ 1 beschreibt eine B-Zell dominante Synovialitis, die mit einer günstigen Prognose vergesellschaftet ist. Typ 2 stellt eine T-Zell dominante Synovialitis dar, die mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Typ 3 repräsentiert einen Mischtyp mit B- und T-Zell Infiltraten.

In Zusammenhang mit massenspektrometrischen Studien leistet die Histologie einen wichtigen Beitrag zur Selektion geeigneter Gewebeproben. Insbesondere bei der Anwendung im Profiling Modus ist die mikroskopische Untersuchung essentiell, um bestimmte pathologisch veränderte Kompartimente für die Analyse zu selektieren.

1.5 Potentielle Biomarker bei Rheumatoider Arthritis

Neue Biomarker, die im Zusammenhang mit der RA beschrieben wurden, sind unter anderem S100 Proteine, insbesondere Calprotectin (S100A8/A9) welches in neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen detektiert werden kann. Synonyme sind MRP-8/MRP-14, Calgranulin A/B, L1 und zystisches Fibrose Antigen (51). Erhöhte Werte von Calprotectin konnten bei Patienten mit Arthritis in Blut, Serum (12, 35-38, 52-59), Synovialflüssigkeit (12, 36, 40-42, 53, 57, 60) und in Synovialgewebe (44, 57, 61, 62) nachgewiesen werden. Dabei korrelierte die Höhe dieses inflammatorischen Markers mit der Krankheitsaktivität und dem Ausmaß der Gelenkdestruktion (40, 41, 51, 54). Eine erhöhte Expression von Calprotectin konnte nicht nur bei Patienten mit RA demonstriert werden, sondern zeigte sich auch bei anderen schweren entzündlichen Erkrankungen wie bei juveniler RA (53, 63, 64), Psoriasisarthritis (36), akuter Urtarthritis (65) und systemischen Lupus erythematodes (66). Calprotectin war ein Prädiktor für den Behandlungserfolg (59, 67-69) und war nach antiinflammatorischer Therapie vermindert (67, 69).

Eine weitere Gruppe von Biomarkern die bei Patienten mit Arthritis beschrieben wurden, sind Defensine, die in neutrophilen Granulozyten, B-Zellen, T-Zellen und NK-Lymphozyten enthalten sind (70). Erhöhte Werte ergaben sich in Blut und Serum (55), in der Synovialflüssigkeit (41, 71) und im Synovialgewebe (72).

Neben S100 Proteinen und Defensinen stehen eine Reihe weiterer Proteine als potentielle Biomarker bei RA zur Diskussion.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll eine neue massenspektrometrische Technik auf Synovialgewebe von Patienten mit RA und Arthrose angewendet werden. Zum einen ergibt sich die Frage, ob bekannte Biomarker mit Hilfe von MALDI MS Imaging zuverlässig nachweisbar sind, zum anderen, inwieweit neue potentielle Biomarker zur Differenzierung beider Entitäten beitragen. MALDI MS Imaging erlaubt eine Korrelation von molekularen Daten und morphologischen Strukturen. Gleichzeitig ist neben der qualitativen Expression in verschiedenen Kompartimenten zumindest eine semiquantitative Analyse der potentiellen Biomarker möglich.

2 Publikationsmanuskript

MALDI MS imaging as a powerful tool for investigating synovial tissue

M Kriegsmann¹, EH Seeley², A Schwarting³, J Kriegsmann⁴, M Otto⁴, H Thabe⁵, B Dierkes⁵, C Biehl⁵, U Sack^{1,6}, A Wellmann⁷, GJ Kahaly⁸, K Schwamborn², RM Caprioli²

¹Department of Clinical Immunology, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany, ²Mass Spectrometry Research Center and Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA, ³Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, ⁴Institute of Molecular Pathology, Trier, ⁵Department of Orthopaedics, Diakonie-Hospital, Bad Kreuznach, ⁶Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM), University of Leipzig, ⁷Institute of Pathology, Celle, and ⁸Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

Objective: To identify and image protein biomarker candidates in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis (RA) and patients with osteoarthritis (OA).

Methods: A novel matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS) technique was applied to the analysis of synovial tissue. Patients were classified according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria for RA. Frozen sections were stained to obtain morphological data. Serial sections were desiccated, and spotted with matrix for MALDI analysis. Ions generated by laser irradiation of the tissue were separated in time, based on their m/z ratio, and were subsequently detected. IMS was used in a 'profiling' mode to detect discrete spots for rapid evaluation of proteomic patterns in various tissue compartments. Photomicrographs of the stained tissue images were reviewed by a pathologist. Areas of interest (10 discrete areas/compartments) were marked digitally and the histology-annotated images were merged to form a photomicrograph of the section taken before the MALDI measurement. Pixel coordinates of these areas were transferred to a robotic spotter, the matrix was spotted, and the coordinates of the spots were transferred to a mass spectrometer for spectral acquisition. The data generated were then subjected to bio-computation analysis to reveal the biomarker candidates.

Results: Several peaks (m/z) consistent in mass with calgranulins, defensins, and thymosins were detected and their distribution in various synovial compartments (synovial lining and sublining layer) was demonstrated.

Conclusion: MALDI IMS is a powerful tool for the rapid detection of numerous proteins (in situ proteomics) and was applied here for the analysis of the distribution of proteins in synovial tissue sections.

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease with a heterogeneous clinical presentation and disease course, ranging from mild disease to severe pathology with bone and cartilage destruction and marked variability in synovial inflammation (1). Although current therapies with biological agents yield significant improvement in the patients, the disease is not yet curable. To provide personalized therapy, preventing irreversible joint damage, a detailed knowledge of synovial tissue subtypes and access to stratification biomarkers is crucial (1). Besides blood and synovial fluid, synovial tissue, which can be obtained easily by closed-needle or arthroscopic biopsy, can assist in the diagnosis of joint disorders.

The currently available biological tests are not sufficiently accurate, leading to delayed diagnosis of the

disease. The discovery of new biomarkers is therefore of particular interest for early diagnosis (2). However, as studies progress and become more complex, new enabling approaches are needed that transcend the limitations of current technologies (3).

Imaging mass spectrometry (IMS) is an emerging technology that permits the direct high-throughput analysis and determination of the distribution of molecules (proteins, peptides, lipids, xenobiotics, and metabolites) in tissue sections. Using IMS, biological molecules can be analysed with molecular specificity not readily achievable through other means, and analyses can even be performed on formalin-fixed tissues (3). Because this technology analyses intact tissue, avoiding homogenization and separation steps, the spatial distribution of the molecules within the tissue is preserved (3). To our knowledge, this is the first report combining the application of high-throughput MS with imaging of various molecules in synovial tissue of patients with RA and osteoarthritis (OA).

Materials and methods

Patients

Synovial tissue was acquired from patients with RA and OA undergoing open joint surgery. Tissues were immediately snap frozen in liquid nitrogen. Corresponding tissues were fixed in 4% buffered formalin, embedded in paraffin and investigated by a pathologist. All RA patients fulfilled the criteria of the American College of Rheumatology (ACR) for the diagnosis of RA, had received prior treatment, and had a high synovialitis score (> 6 of 9) (4). Patients with OA were classified according to Altman et al (5) and were not having therapy with anti-rheumatic drugs. Tissue samples were taken according to the Declaration of Helsinki, from individuals treated at Diakonie Hospital, Department of Orthopaedics and the Rheumatology Centre of Rhineland-Palatinate, Bad Kreuznach. Informed consent was given by each patient, and the study design was approved by the local ethics committee.

Histology-directed matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) MS and proteomic data analysis

MALDI MS profiling and imaging was performed as described previously (3, 6). For MALDI MS profiling, serial sections from each frozen tissue sample were stained with haematoxylin and eosin (H&E) or thaw-mounted and fixed onto a MALDI plate. Photomicrographs of H&E-stained sections of synovial membranes of RA and OA patients were marked digitally (synovial lining layer and sublining/200 μm , minimum of 10 spots of interest) by a pathologist (JK) for MALDI image correlation. All adipose tissue, potential contamination (e.g. blood), and edges of the tissue were avoided. Histology-annotated optical images were merged to form a photomicrograph of the MALDI section, and pixel coordinates of the annotated areas were obtained

for robotic spotting. An acoustic robotic spotter (LabCyte Inc.; Sunnyvale, CA, USA) placed crystalline matrix (20 mg/mL sinapinic acid in 1:1 acetonitrile/0.2% trifluoroacetic acid) spots (180–220 μm in diameter) on each printing coordinate of each tissue. Tissue profile spectra were acquired using an Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) MALDI mass spectrometer and run using an automated linear mode acquisition method optimized for mass range 2 to 40 kDa, as described previously (5). MALDI MS spectra were baseline corrected, normalized, and aligned using ProTS-Marker (Biodesix Inc., Boulder, CO, USA). Multiple spectra were averaged from the same subject from different experiments for synovial lining layer and sublining.

MALDI MS imaging experiments were performed by spotting the tissue surface with a matrix solution in a defined microspotted array. Spectra were acquired at each position on the sample at a spatial resolution of 250 μm , and spectral files were reconstructed into ion density images for viewing.

Results

MALDI MS image analysis was applied to synovial tissue of patients with RA and OA. Histological analysis of synovial tissues (H&E) from patients with RA showed a thickened synovial lining layer and heavy chronic inflammation with lymph follicles in the sublining layer, whereas OA synovial tissue was characterized by a mild increase in the thickness of the synovial lining layer and mild lymphocytic infiltration and mild fibrosis (Figure 1A). Parallel sections were desiccated and a matrix was spotted over the surface of the tissue section by specialized sample procedures. Subsequently, molecules present on the spots were ionized by using laser energy and separated in time, based on their m/z ratio (Figure 1B).

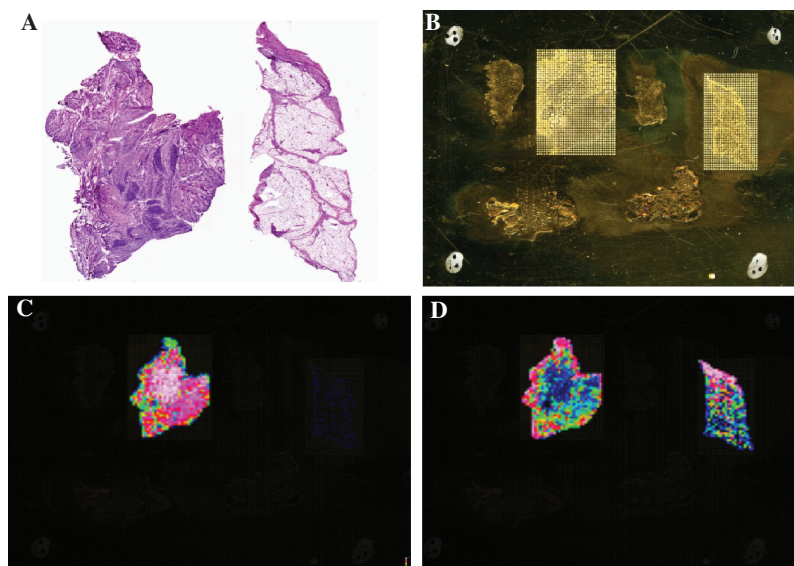


Figure 1. (A) H&E section of synovial tissue (left, RA; right, OA). (B) Numerous matrix spots throughout the synovial tissue (left, RA; right, OA). (C) MALDI MS images at m/z 4747 (thymosin beta-4 truncated with strong expression in the sublining area in RA but not in OA synovial tissue). (D) MALDI MS images at m/z 4964 (thymosin beta-4 with strong expression in the lining area in RA and OA synovial tissue).

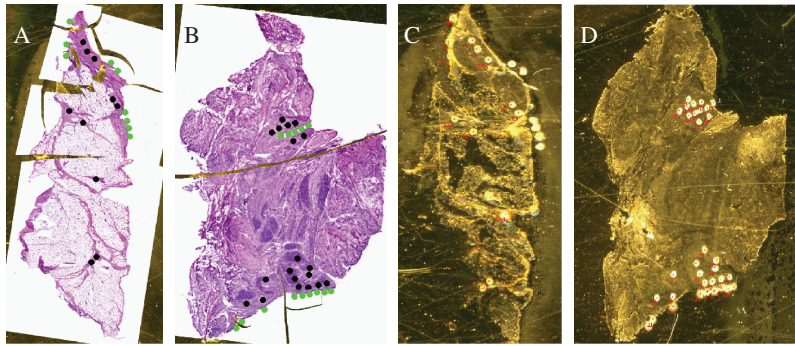


Figure 2. (A) OA and (B) RA synovial tissue with histology-annotated images were merged to form a photomicrograph of the section on the MALDI target. (C) OA and (D) RA synovial tissue with a spotted matrix on the previously marked areas of interest. Only spots with red numbers were evaluated.

Preliminary data when comparing RA and OA synovial tissue showed strong differences in the intensity of known molecules, such as m/z 4737 (probably thymosin beta-10 truncated) (7) and m/z 4747 (probably thymosin beta-4 truncated) (7) (Figure 1C). By contrast, the molecular species at m/z 4964 (probably thymosin beta-4) (Figure 1D) showed an increased intensity in the synovial lining layer of patients with RA and OA, and to a much lower extent in the synovial sublining layer. Molecules at m/z 5358 with moderate expression in the OA sublining area and RA lining were also detected. MALDI image analysis also revealed molecules at m/z 6226 with moderate expression in areas with lymph follicles in RA synovial tissue but lower expression in other areas or in OA synovial tissue.

IMS was used in a ‘profiling’ mode to detect discrete spots of interest for rapid evaluation of proteomic patterns in various tissue compartments. Photomicrographs of H&E-stained tissue images were reviewed by a pathologist, areas of interest (about 10 discrete areas/ compartments) were marked digitally, and the histology-annotated images were merged to form a photomicrograph of the section on the MALDI target (Figures 2A and 2B). Serial H&E sections were used to guide the placement of the matrix and provided the capability of focusing on areas having a high content of a cell type of interest (synovial lining, synovial sublining). Later, tissues with the spotted matrix were re-evaluated and the spots of interest were marked by red numbers to ensure that only tissue areas with the best preservation and morphology were included in the study (Figure 2). The coordinates of the spots were transferred to the mass spectrometer for spectral acquisition.

We could demonstrate the presence of molecules consistent with masses of peaks identified in previous studies at m/z 3367 (defensin alpha-1-beta) (2), 3439 (defensin alpha-1) (2), 3485 (defensin alpha-3) (2), 10 096 (S100A6, calyculin) (7, 8), 10 840 (S100A8) (2), 11 656 (S100 A11, calgizzarin) (7, 8), several histones [7005 (histone H2A2 doubly charged), 11 313, 11 354 (histone H4 with one acetylation), 11 396 (histone H4 with two acetylations), 13 781 (histone H2B)] (7), and molecules that had not previously been identified at m/z of 2749, 5357, 5418, 5654, 5675, 9624, 9752, 9768, 11 518, 11 612, 12 352, 12 696, and 13 160.

Most remarkably, MALDI imaging data were obtained from the different regions with peaks at m/z 4737

(thymosin beta-10 truncated) (7) and m/z 4747 (thymosin beta-4 truncated) (7) in the synovial sublining and lining layer with strong expression in RA but not in OA tissues, with higher intensity in the sublining layer (Figures 3A and 3B). Additionally, signals at m/z 10840 (probably S100A8) (2) were found in the synovial sublining and lining layer with strong expression in RA but not in OA tissues, with higher intensity in the sublining layer. Peaks at m/z 3367 (defensin alpha-1-beta) (2), 3439 (defensin alpha-1) (2), and 3485 (defensin alpha-3) (2) were located in the synovial sublining and lining layer with strong expression in RA but not in OA tissues (Figures 3C and 3D).

Discussion

Early diagnosis of RA is essential to provide appropriate therapy to patients with RA. Exact classification of the disease activity by biomarkers is required (1, 2). Recent work has provided proof of principle that biomarkers may be identified to predictive of the response to targeted therapy (9).

Histology, histochemistry, immunohistochemistry, and molecular pathological techniques have been applied to synovial tissue (10). As studies progress, detailed questions are being asked at the molecular level to transcend the limitations of current technologies (3).

Previous studies have identified biomarkers for various arthritides through MS analysis applied to serum, synovial fluid, and synovial tissue (2, 11–14). The consistency of protein patterns in various joints suggests that the biomarker profile truly represents a disease subtype (14) or status of the disease.

To combine morphology with MS, image analysis was applied to synovial tissue of patients with RA and OA. Synovial tissue consists of two major compartments: a lining layer with macrophage-like (type A) and fibroblast-like (type B) synoviocytes and the sublining layer (15). For the first time, applying IMS, we could illustrate various mass spectra generated from proteins expressed in RA and OA synovial tissue (Figures 1C and 1D). Mass spectra were collected predominantly from the synovial lining layer and the subsynovial tissue.

Continued evaluation of the MS images showed interesting preliminary data on comparing RA and OA

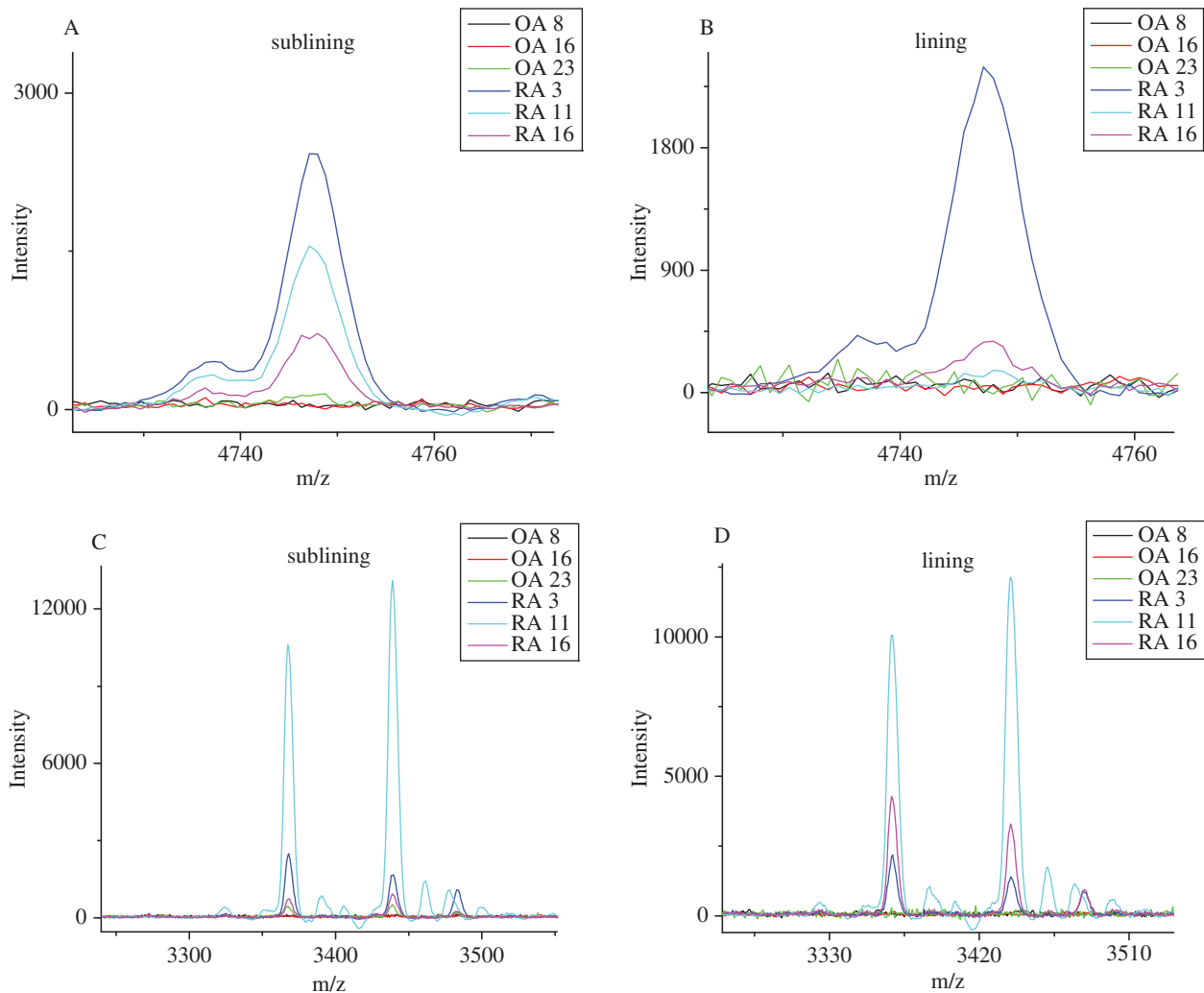


Figure 3. MALDI MS profile with peaks at m/z 4737 (thymosin beta-10 truncated) and m/z 4747 (thymosin beta-4 truncated) in the synovial sublining (A) and lining (B) layer with strong expression in RA but not in OA tissues, with a higher intensity in the sublining layer. MALDI MS profile with the peaks at m/z 3367 (defensin alpha-1-beta), 3439 (defensin alpha-1), and 3485 (defensin alpha-3) in the synovial sublining (C) and lining (D) layer with strong expression in RA but not in OA tissues.

synovial tissue, with strong differences in intensity of known molecules, for example, at m/z 4737 (thymosin beta-10 truncated) (6) and m/z 4747 (thymosin beta-4 truncated) (7) (Figure 1C). These data are of particular interest because thymosins have been described in plasma of patients with RA (16).

Thymosin beta-4 is the most prominent member of the beta-thymosin family, responsible for T-lymphocyte maturation and actin sequestration. Associated with its role in actin polymerization, thymosin beta-4 has a variety of functions in tumour metastasis; it promotes angiogenesis, and has anti-apoptotic activity (17, 18). Most remarkably, using MALDI MS imaging in a 'profiling' mode, peaks at m/z 4737 (thymosin beta-10 truncated) (7) and m/z 4747 (thymosin beta-4 truncated) (7) were found in the synovial sublining and lining layer with strong expression in RA but not in OA tissues (Figures 3A and 3B).

We could detect discrete spots of interest for rapid evaluation (a few minutes) of proteomic patterns with

peaks consistent with masses of molecules identified in previous studies. Further experiments are necessary to confirm the identity of these proteins. Preliminary identification of the signals are: m/z 3367 (defensin alpha-1-beta) (2), 3439 (defensin alpha-1) (2), 3485 (defensin alpha-3) (2), 10 096 (calyculin) (7), 10 840 (S100A8) (2), 11 656 (calgizzarin) (7), and 7005 (histone doubly charged), 11 313, 11 354 (histone with one acetylation), 11 396 (histone with two acetylations), 13781 (histone H2B) (7). Among these proteins, defensins [α -1 (HNP-1), α -1 beta (HNP-2), and α -3 (HNP-3)] are of particular interest because they are potential biomarkers for RA (2). These molecules have two major functions in host defence: direct inhibition of pathogens and modulation of other innate and adaptive immune responses (19). Defensins have been found in neutrophils but also in a variety of leucocytes, including natural killer (NK) cells, T cells, B cells, and monocytes (20). By using IMS in the profiling mode, we could show defensin alpha-

1-beta, defensin alpha-1, and defensin alpha-3 in the synovial sublining and lining layer with strong expression in RA but not in OA tissues (Figures 3B and 3C).

Among the potential biomarkers in our profiles, members of the S100 protein family such as S100A8 (myeloid-related protein 8, calgranulin A), S100A9 (myeloid-related protein 14, calgranulin B), and S100A12 (calgranulin C) have prompted particular interest because these biomarker candidates could differentiate patients with arthritides from controls with inflammatory bowel disease (13). Our results are in agreement with findings from previous studies where proteomic analyses identified S100A8, S100A9, and S100A12 in patients with arthritis (11–14), in serum (13), synovial fluid (11), or tissue (12), and have been correlated with many variables associated with disease activity in arthritides, including the number of swollen joints, the Ritchie index (21), the Disease Activity Score using 28 counts (DAS28) (13), C-reactive protein (CRP) concentration (13), erythrocyte sedimentation rate (21), and anti-cyclic citrullinated peptide (13). In accordance with these data, a peak at m/z 10840 (S100A8) has been shown in the synovial sublining and lining layer with strong expression in RA but not in OA tissue.

Further studies are required to apply this technique to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and to introduce this method in routine clinical practice. Problems include development of fixatives or demasking procedures to ensure adequate flight characteristics of ions to obtain suitable mass spectra. Biopsy of synovial tissue during arthroscopy is a reliable, safe, and cost-effective technique that is a prerequisite for individual stratification of the disease process and subsequent personalized therapy (9).

In summary, IMS has been successfully applied to synovial tissue of patients with RA and OA, demonstrating the spatial distribution of known biomarker candidates such as defensins and S100 proteins, and the expression of potential biomarkers such as thymosins and other species that could potentially discriminate various disease subtypes, stages of the disease, or alterations in the course of therapy.

Acknowledgements

We thank J Allen for excellent technical assistance. This work received funding from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, PtJ-Bio, 0313909), the National Institutes of Health (NIH/NIGMS 5R01 GM58008), and a Vanderbilt Ingram Cancer Centre Core Support Grant (P30 CA68485).

References

- van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Timmer TC, van der Pouw Kraan TC, Tak PP, Verweij CL. Synovial tissue heterogeneity in rheumatoid arthritis in relationship to disease activity and biomarkers in peripheral blood. *Arthritis Rheum* 2010;62: 1602–7.
- Baillet A, Trocme C, Berthier S, Arlotto M, Grange L, Chenau J, et al. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49:671–82.
- Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:18126–31.
- Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Häupl T. Synovialitis score: histological grading system for chronic rheumatic and non-rheumatic synovialitis. *Z Rheumatol* 2005;64:334–42.
- Altman RD. The classification of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 1995;43:42–3.
- Cornett DS, Mobley JA, Dias EC, Andersson M, Arteaga CL, Sanders ME, et al. A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5:1975–83.
- Hardesty WM, Kelley MC, Mi D, Low RL, Caprioli RM. Protein signatures for survival and recurrence in metastatic melanoma. *J Proteomics* 2011;74:1002–14.
- Caldwell RL, Gonzalez A, Oppenheimer SR, Schwartz HS, Caprioli RM. Molecular assessment of the tumor protein microenvironment using imaging mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics* 2006;3:279–88.
- Gerlag DM, Tak PP. How to perform and analyse synovial biopsies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23:221–32.
- Kriegsmann J, Berndt A, Hansen T, Borsi L, Zardi L, Bräuer R, et al. Expression of fibronectin splice variants and oncofetal glycosylated fibronectin in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2004;24:25–33.
- Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, Ringel B, Drynda S, Kekow J, et al. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002;23:3445–56.
- Tilleman K, Van Beneden K, Dhondt A, Hoffman I, De Keyser F, Veys E, et al. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2005;5:2247–57.
- de Seny D, Fillet M, Ribbens C, Maree R, Meuwis MA, Lutteri L, et al. Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem* 2008;54:1066–75.
- Gibson DS, Finnegan S, Jordan G, Scaife C, Brockbank S, Curry J, et al. Stratification and monitoring of juvenile idiopathic arthritis patients by synovial proteome analysis. *J Proteome Res* 2009;8:5601–9.
- Wernicke D, Seyfert C, Gromnica-Ihle E, Stiehl P. The expression of collagenase 3 (MMP-13) mRNA in the synovial tissue is associated with histopathologic type II synovitis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 2006;39:307–13.
- Zheng X, Wu SL, Hincapie M, Hancock WS. Study of the human plasma proteome of rheumatoid arthritis. *J Chromatogr A* 2009; 1216:3538–45.
- Paulussen M, Landuyt B, Schoofs L, Luyten W, Arckens L. Thymosin beta 4 mRNA and peptide expression in phagocytic cells of different mouse tissues. *Peptides* 2009;30: 1822–32.
- Nowak D, Popow-Wozniak A, Rznikiewicz L, Malicka-Blaszkiwicz M. [Actin in the wound healing process], in Polish. *Postepy Biochem* 2009;55:138–44.
- Doss M, White MR, Teclé T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol* 2010;87:79–92.
- Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086–93.
- Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1676–85.

3 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

MALDI MS Imaging zur Untersuchung von synovialen Gewebe

eingereicht von:

Mark Kriegsmann

angefertigt am:

Institut für Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. Ulrich Sack

September 2012

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung des Menschen (1). Das Krankheitsbild ist durch die ACR/EULAR Kriterien definiert (3). Da diese Definition eine unzureichende Sensitivität und Spezifität aufweist, ist die Suche nach additiven Biomarkern erforderlich (10). Die Integration neuer diagnostischer, prognostischer und Krankheitsaktivität-anzeigender Biomarker kann zur Verringerung der Morbidität und Mortalität beitragen (73, 74). Bisherige Bemühungen waren meist auf die Untersuchung einzelner Moleküle oder Verbindungen fokussiert. Massenspektrometrische Methoden eignen sich zur Detektion komplexer Biomarker, da mit Hilfe von *Tissue-Microarrays* zahlreiche Moleküle in verschiedenen Geweben innerhalb kurzer Zeit mit einer hohen Sensitivität und Spezifität analysiert werden können (17, 21). Gleichzeitig ermöglicht *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging* (MALDI MS Imaging) als massenspektrometrische Technik eine morphologische Zuordnung derartiger Masse-Ladungs-Verhältnisse (m/z), die Peptiden, Proteinen oder anderen Verbindungen entsprechen. MALDI MS Imaging ergänzt somit die Analyse verschiedener synovialer Kompartimente. Von besonderer Bedeutung ist die

Tatsache, dass nicht nur morphologische und molekulare Informationen korreliert werden können, sondern, dass bei dieser Methode die Identifizierung zahlreicher unbekannter Zielmoleküle möglich ist (18).

Bisher wurden bei Patienten mit RA und Arthrose Blut, Serum (12, 32-41), Synovialflüssigkeit (12, 35, 36, 40-43) und Synovialgewebe (36, 39, 44) mit massenspektrometrischen Verfahren untersucht. Bei der Analyse von Blut, Serum und Synovialflüssigkeit können interessante Massenspektren durch Hintergrundproteine maskiert sein. Dieser Nachteil kann durch die Untersuchung synovialen Gewebes, dem primären Ort der Entzündung bei RA, überwunden werden (45). Die Biopsie der Synovialmembran ist während einer Arthroskopie zuverlässig, sicher und kosteneffektiv durchführbar und erscheint damit für eine individuelle Bewertung der Krankheitsaktivität mit folgender personalisierter Therapie geeignet (46).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal Synovialgewebe von Patienten mit RA und Arthrose durch MALDI MS Imaging und MALDI MS Imaging im *Profiling Mode* (auch *histology-directed* MALDI Imaging) analysiert. Mittels MALDI MS Imaging wurden morphologische Zuordnungen von Masse-Ladungs-Verhältnissen vorgenommen, die zusätzlich auch eine semiquantitative Aussage zur Menge der exprimierten Proteine zulässt. Im *Profiling Mode* wurden besonders interessante Areale von einem Pathologen selektiert und anschließend analysiert. Die letztgenannte Methode eignet sich besonders zur zielgerichteten, schnellen Untersuchung verschiedener Kompartimente (17).

In dieser Arbeit konnten zahlreiche bereits bekannte und neue potentielle Biomarker in der Synovialmembran nachgewiesen werden. Zu den bereits in früheren Studien identifizierten Biomarkern gehören Moleküle mit folgendem m/z -Quotienten: 3367 (Defensin alpha-1-beta) (41), 3439 (Defensin alpha-1) (41), 3485 (Defensin alpha-3) (41), 10096 (S100A6, Calcyclin) (75, 76), 10840 (S100A8) (41), 11656 (S100A11, Calgizzarin) (75, 76), 7005 (Histon H2A2 mit zweifacher Ladung) (76), 11313, 11354 (Histon H4 mit einer Acetylierung) (76), 11396 (Histon H4 mit zwei Acetylierungen) (76), 13781 (Histon H2B) (76). Verschiedene m/z -Quotienten von Molekülen, die zur Diskriminierung RA und Arthrose beitragen

könnten und die bisher nicht identifiziert wurden, sind unter anderem: 2749, 5357, 5418, 5654, 5675, 9624, 9752, 9768, 11518, 11612, 12352, 12696, 13160.

Die aussichtsreichsten potentiellen Biomarker in dieser Hinsicht haben die *m/z*-Quotienten 4737 und 4747 und wurden in früheren Studien als Thymosin beta-10 -2AA und Thymosin beta-4 -2AA identifiziert (76).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MALDI MS Imaging zur Untersuchung von synovialen Gewebe und einer umfassenden Identifizierung und Charakterisierung von Biomarkern einschließlich deren morphologischer Zuordnung geeignet ist. Die Implementierung in die klinische Routine erfordert allerdings eine Validierung an großen Patientenkohorten, auch im Rahmen prospektiver Studien.

Vor dem Hintergrund technischer und methodischer Fortschritte, ergeben sich zahlreiche Perspektiven für MALDI MS Imaging in der Arthritisforschung. Neue Präparationstechniken erlauben die Anwendung nicht nur an Gefriergewebe, sondern auch an Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe. Zukünftig muss geprüft werden, ob MALDI MS Imaging an FFPE Synovialgewebe durchführbar ist und ob die Ergebnisse mit den Resultaten an Gefriergewebe übereinstimmen. Die Anwendung an FFPE Gewebe könnte zu einer Objektivierung histopathologischer Analysen beitragen.

4 Literaturverzeichnis

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376(9746):1094-108.
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365(23):2205-19.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: An american college of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010;69(9):1580-8.
4. Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, et al. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(4):894-8.
5. Nell VP, Machold KP, Eberl G, et al. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(7):906-14.
6. Grigor C, Capell H, Stirling A, et al. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): A single-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364(9430):263-9.
7. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2008;58(2 Suppl):S126-35.
8. Kirchhoff T, Ruof J, Mittendorf T, et al. Cost of illness in rheumatoid arthritis in germany in 1997-98 and 2002: Cost drivers and cost savings. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50(4):756-61.
9. Ali M, Manolios N. Proteomics in rheumatology: A new direction for old diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(2):67-76.
10. Alves C, Luime JJ, van Zeben D, et al. Diagnostic performance of the ACR/EULAR 2010 criteria for rheumatoid arthritis and two diagnostic algorithms in an early arthritis clinic (REACH). *Ann Rheum Dis* 2011;70(9):1645-7.
11. Einwohnerzahl in deutschland 2011 [homepage on the Internet]. . Available from: http://www.statistik-portal.de/Statistik-Portal/de_zs01_bund.asp.
12. Drynda S, Ringel B, Kekow M, et al. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory

- joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200(2):165-71.
13. Rauser S, Marquardt C, Balluff B, et al. Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. *J Proteome Res* 2010;9(4):1854-63.
 14. Bauer JA, Chakravarthy AB, Rosenbluth JM, et al. Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin Cancer Res* 2010;16(2):681-90.
 15. Gupta N, Benhamida J, Bhargava V, et al. Comparative proteogenomics: Combining mass spectrometry and comparative genomics to analyze multiple genomes. *Genome Res* 2008;18(7):1133-42.
 16. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, et al. Proteomics: New perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000;356(9243):1749-56.
 17. Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(47):18126-31.
 18. Hardesty WM, Caprioli RM. In situ molecular imaging of proteins in tissues using mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391(3):899-903.
 19. Schwamborn K, Caprioli RM. Molecular imaging by mass spectrometry--looking beyond classical histology. *Nat Rev Cancer* 2010;10(9):639-46.
 20. Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(47):18126-31.
 21. Schwamborn K, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry--painting molecular pictures. *Mol Oncol* 2010;4(6):529-38.
 22. Casadonte R, Caprioli RM. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc* 2011;6(11):1695-709.
 23. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997;69(23):4751-60.
 24. Werner M, Chott A, Fabiano A, et al. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000;24(7):1016-9.

25. Rahimi F, Shepherd CE, Halliday GM, et al. Antigen-epitope retrieval to facilitate proteomic analysis of formalin-fixed archival brain tissue. *Anal Chem* 2006;78(20):7216-21.
26. Groseclose MR, Massion PP, Chaurand P, et al. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics* 2008;8(18):3715-24.
27. Aerni HR, Cornett DS, Caprioli RM. Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Anal Chem* 2006;78(3):827-34.
28. Hankin JA, Barkley RM, Murphy RC. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007;18(9):1646-52.
29. McDonnell LA, Heeren RM. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2007;26(4):606-43.
30. Cornett DS, Mobley JA, Dias EC, et al. A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2006;5(10):1975-83.
31. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011;44(1):104-9.
32. Long L, Li R, Li Y, et al. Pattern-based diagnosis and screening of differentially expressed serum proteins for rheumatoid arthritis by proteomic fingerprinting. *Rheumatol Int* 2011;31(8):1069-74.
33. Niu Q, Huang Z, Shi Y, et al. Specific serum protein biomarkers of rheumatoid arthritis detected by MALDI-TOF-MS combined with magnetic beads. *Int Immunol* 2010.
34. Zhang X, Yuan Z, Shen B, et al. Discovery of serum protein biomarkers in rheumatoid arthritis using MALDI-TOF-MS combined with magnetic beads. *Clin Exp Med* 2011.
35. Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, et al. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002;23(19):3445-56.

36. Kane D, Roth J, Frosch M, et al. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(6):1676-85.
37. de Seny D, Fillet M, Meuwis MA, et al. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005;52(12):3801-12.
38. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, et al. Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem* 2008;54(6):1066-75.
39. Chen YS, Yan W, Geczy CL, et al. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11(2):R39.
40. Liao H, Wu J, Kuhn E, et al. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(12):3792-803.
41. Baillet A, Trocme C, Berthier S, et al. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(4):671-82.
42. Uchida T, Fukawa A, Uchida M, et al. Application of a novel protein biochip technology for detection and identification of rheumatoid arthritis biomarkers in synovial fluid. *J Proteome Res* 2002;1(6):495-9.
43. Mateos J, Lourido L, Fernandez-Puente P, et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteomics* 2012.
44. Tilleman K, Van Beneden K, Dhondt A, et al. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2005;5(8):2247-57.
45. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(11):845-67.
46. Gerlag DM, Tak PP. How to perform and analyse synovial biopsies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009;23(2):221-32.

47. Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, et al. Synovialitis score: Histopathological grading system for chronic rheumatic and non-rheumatic synovialitis. *Z Rheumatol* 2005;64(5):334-42.
48. Knoss P, Knoss M, Otto M, et al. Diagnostic spectrum of synovitis. *Z Rheumatol* 2008;67(1):8, 10,4, 16.
49. Ziff M. The rheumatoid nodule. *Arthritis Rheum* 1990;33(6):761-7.
50. Stiehl P. Histologie der rheumatoid Arthritis. Beitrag zur diagnostischen und pathogenetischen Heterogenität, zur Aktivitätsdiagnose und Prognose. In: Sack U, editor. Arthritiden. Lengerich: Pabst Science Publ., 1997. p. 188-200.
51. Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1093-7.
52. Chen T, Rimpilainen M, Luukkainen R, et al. Bacterial components in the synovial tissue of patients with advanced rheumatoid arthritis or osteoarthritis: Analysis with gas chromatography-mass spectrometry and pan-bacterial polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2003;49(3):328-34.
53. Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, et al. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1991;20(2):74-82.
54. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1994;21(4):733-8.
55. Bovin LF, Rieneck K, Workman C, et al. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol Lett* 2004;93(2-3):217-26.
56. Frosch M, Strey A, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(3):628-37.
57. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8(3):R69.

58. Hammer HB, Odegard S, Syversen SW, et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(1):150-4.
59. Andres Cerezo L, Mann H, Pecha O, et al. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13(4):R122.
60. Katano M, Okamoto K, Suematsu N, et al. Increased expression of S100 calcium binding protein A8 in GM-CSF-stimulated neutrophils leads to the increased expressions of IL-8 and IL-16. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29(5):768-75.
61. Kane D, Roth J, Frosch M, et al. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(6):1676-85.
62. Youssef P, Roth J, Frosch M, et al. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 1999;26(12):2523-8.
63. Frosch M, Vogl T, Seeliger S, et al. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2622-6.
64. Wulffraat NM, Haas PJ, Frosch M, et al. Myeloid related protein 8 and 14 secretion reflects phagocyte activation and correlates with disease activity in juvenile idiopathic arthritis treated with autologous stem cell transplantation. *Ann Rheum Dis* 2003;62(3):236-41.
65. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, et al. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(8):2310-20.
66. Soyfoo MS, Roth J, Vogl T, et al. Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2009;36(10):2190-4.
67. Drynda S, Ringel B, Kekow M, et al. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200(2):165-71.


68. Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, et al. Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum* 2004;50(4):1286-95.
69. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, et al. S100 proteins expressed in phagocytes: A novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):28-37.
70. Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96(9):3086-93.
71. Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. Intraarticular release and accumulation of defensins and bactericidal/permeability-increasing protein in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(8):1719-24.
72. Paulsen F, Pufe T, Conradi L, et al. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *J Pathol* 2002;198(3):369-77.
73. Pincus T, Callahan LF. The 'side effects' of rheumatoid arthritis: Joint destruction, disability and early mortality. *Br J Rheumatol* 1993;32 Suppl 1:28-37.
74. van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Timmer TC, et al. Synovial tissue heterogeneity in rheumatoid arthritis in relationship to disease activity and biomarkers in peripheral blood. *Arthritis Rheum* 2010.
75. Caldwell RL, Gonzalez A, Oppenheimer SR, Schwartz HS, Caprioli RM. Molecular assessment of the tumor protein microenvironment using imaging mass spectrometry. *Cancer Genomics & Proteomics* 2006;3:279-88.
76. Hardesty WM, Kelley MC, Mi D, et al. Protein signatures for survival and recurrence in metastatic melanoma. *J Proteomics* 2011;74(7):1002-14.

5 Anhang

5.1 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, 01. Juni 2012


Mark Kriegsman

5.2 Lebenslauf

geboren: am 13.01.1987 in Jena

Schule

2006 Deutsches Abitur und Französisches Baccalauréat

Studium

Seit 2008 Medizinstudium, TU Dresden

2006 - 2008 Medizinstudium, Universität Leipzig

2006 Medizinstudium, Universität Luxembourg

Famulatur

2011 Dermatopathologie, Western General Hospital, Edinburgh

2010 Rheumatologie, Unispital, Zürich

2009 Orthopädie, ARCUS Sportklinik, Pforzheim

2009 Kardiologie und Nephrologie, Klinik im Park, Zürich

Praktisches Jahr

2012 Urologie und Pathologie, Uniklinikum Dresden, Dresden

2012 Chirurgie, Brigham and Women's Hospital und Massachusetts General Hospital, Boston

2011 Nephrologie und Gastroenterologie, Duke University Hospital, Durham

2011 Kardiologie und Gastroenterologie, Hôpital de Sacré Coeur, Montréal

Promotion

Thema: MALDI MS Imaging zur Untersuchung von Synovialen Gewebe
Kooperation mit Vanderbilt University, Nashville

Publikationen

Kriegsmann M, Seeley E, Schwarting A, Kriegsmann J, Otto M, Thabe H, Dierkes B, Biehl C, Sack U, Wellmann A, Kahaly G, Schwamborn K, Caprioli R. MALDI MS Imaging as a powerful tool for investigating synovial tissue, *Scan J Rheumatol*. 2012 May 29. [Epub ahead of print]

Kriegsmann M, Scott-Lang V, Holme SA, Biswas A. Suppurative and granulomatous dermatitis with pseudocysts: a useful tissue reaction pattern, *Diagn Histopathol*. 2012;18:139-188.

Kriegsmann M, Doherty VR, Biswas A. Multiple papulonodular lesions on the dorsum of the hand: challenge. Multinucleate cell angiohistiocytoma (MCAH). *Am J Dermatopathol*. 2012;34:176.

Kriegsmann J, Hopf T, Jacobs D, Arens N, Krenn V, Schmitt-Wiedhoff R, Kriegsmann M, Heisel C, Biehl C, Thabe H, Schmitz RP, Lehmann M, Otto M. Applications of molecular pathology in the diagnosis of joint infections, *Orthopade* 2009;38:531-8.

Vorträge

Kriegsmann M, Seeley E, Schwarting A, Kriegsmann J, Otto M, Thabe H, Dierkes B, Biehl C, Sack U, Wellmann A, Kahaly G, Schwamborn K, Caprioli R. MALDI MS Imaging zur Analyse von Synovialgewebe. 95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Leipzig 2011, *Pathologe*, 2011;32:348-350.

Kriegsmann M. MALDI-TOF und MALDI Imaging – neue Methoden zur Analyse von Gewebeproben. 7. Wittenberger Konferenz Evangelischer Krankenhäuser Deutschlands, Wittenberg, 2012

5.3 Danksagungen

Herzlich möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Sack danken, der mich auf dem Weg der hier vorgestellten Arbeit stets begleitet und mir seine wohlwollende Unterstützung gewährt hat.

Von den Orthopäden und Rheumatologen, die uns die Gewebe zur Verfügung gestellt haben, möchte ich Prof. h.c. Dr. Heiner Thabe, Prof. Dr. Andreas Schwarting, Dr. Christoph Biehl, Dr. Birgit Dierkes hier namentlich erwähnen.

Daneben gilt mein Dank den Pathologen Prof. Dr. Dr. Jörg Kriegsmann, Dr. Otto und Prof. Dr. Axel Wellmann, von denen ich viel über die Histologie der rheumatoiden Synovialmembran lernen durfte.

Von den Wissenschaftlern die mich in Nashville bei den Experimenten geduldig betreut haben, möchte ich Prof. Dr. Richard Caprioli, Prof. Erin Seeley und Dr. Dr. Kristina Schwamborn meinen besonderen Dank aussprechen. Für die hervorragende Assistenz danke ich außerdem Jamie Allen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich durch alle Zeiten begleiten und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.