

**Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik  
Ärztlicher Leiter: Professor Dr. med. Wülker**

**Gibt es vermehrt terminal differenzierte Fibroblasten in  
der Synovialmembran von Rheumapatienten ?**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt  
von  
Markus Andreas Schmid  
aus Stuttgart  
2003



Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Aicher

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.P. Rodemann



Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>13</b>
1.1	Rheumatoide Arthritis .....	13
1.2	Fragestellung.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Geräte und Verbrauchsgüter.....	19
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	21
2.1.3	Humanes Untersuchungsmaterial .....	23
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.2.1	Zellkultur .....	24
2.2.2	Färbung der SA-β-Galaktosidase.....	27
2.2.3	RT-PCR .....	29
2.2.4	2-D Gelelektrophorese von zellulären S <sup>35</sup> -Methionin-Polypeptiden .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Färbung der SA-β Galaktosidase.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>RT-PCR .....</b>	<b>50</b>
3.2.1	P16ink4a .....	50
3.2.2	P21cip .....	51
<b>3.3</b>	<b>2D-Gelelektrophorese mit S<sup>35</sup>-Methionin .....</b>	<b>52</b>

<b>4 Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Färbung der SA-β Galaktosidase in synovialen Fibroblasten.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2 RT-PCR .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 2D-Gelelektrophorese von zellulären S<sup>35</sup>-Methionin-Polypeptiden ...</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Conclusio.....</b>	<b>58</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6 Literaturliste .....</b>	<b>63</b>
<b>7 Curriculum Vitae .....</b>	<b>69</b>

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle3-1: Daten der einzelnen Patienten, einschließlich Standardabweichung (RA= Rheumatoide Arthritis, OA= Osteoarthritis). .....	47
Tabelle 3-2: Werte der einzelnen Patientengruppen, einschließlich Standardabweichung und Durchschnittsalter.....	48
Tabelle 3-3: Werte der einzelnen Patientengruppen nach Rückrechnung der SinArc^ Funktion, einschließlich unterer und oberer 95% Perzentile. .....	49



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion.....	30
Abbildung 2-2: Bild der 2D- Gelelektrophorese nach fünf Tagen Exposition. ...	44
Abbildung 3-1: $\beta$ -galpositive Fibroblasten nach der Färbung.....	45
Abbildung 3-2: Färbung der SA- $\beta$ -Galaktosidase; Ergebnisse der einzelnen Patienten.....	46
Abbildung 3-3: Färbung der SA- $\beta$ -Galaktosidase; Ergebnisse der drei Vergleichsgruppen.....	47
Abbildung 3-4: Graphische Darstellung der Werte der einzelnen Patientengruppe mit oberer und unterer 95% Perzentile, nach Rückrechnung der ArcSin <sup>^</sup> Funktion.....	48
Abbildung 3-5: p16ink4a-PCR (oben) 329 bp, GAPDH-PCR (unten) 983 bp, AB = Aqua Bidest. ....	51
Abbildung 3-6: p21cip-PCR (oben) 896 bp und GAPDH-PCR (unten) 983 bp, AB = Aqua Bidest.....	52
Abbildung 3-7: Expression des Proteins PIVa (Pfeil) bei drei Rheumapatienten (1, 2, 3) und einem gesunden Probanden (4). 1, BXM ; 2, JIB; 3, LBE; 4, KCJ. Als Referenz diente $\beta$ -Actin (Kreis). ....	53
Abbildung 3-8: Expression der Proteine Tropomyosin 1 und Tropomyosin 2 (TM1 und TM2) bei drei Rheumapatienten (1, 2, 3) und einem gesunden Probanden (4). 1, BXM; 2, JIB; 3, LBE; 4, KCJ. Als Referenz diente $\beta$ -Actin (Kreis).....	54

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
AB	Aqua Bidestilata
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
cpm	Counts per Minute
DMEM	Dulbecco´s Modifikation Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
Dnase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
FCS	Fötales Kälberserum
gr.	Gramm
HLA	Human Leucocyte Antigene
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL-	Interleukin
kD	Kilodalton
l	Liter
m	RNA Massenger RNA
MG	Molekulargewicht
min.	Minuten
mM	Millimolar
OA	Osteoarthrose
PBS	Phoshat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PPO	Diphenyloxazol
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonucleinacid

RNase

rpm

RT-PCR

SDS

Taq

Temed

TNF-

Ribonuklease

Umdrehungen/Minute

Reverse Transkriptase PCR

Sodium Dodecyl Sulfat

Termophilus Aquaticus

Tetramethylethyldiamin

Tumornekrose Faktor



# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritits genannt, ist eine in Schüben verlaufende, chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung, mit autoimmuner Prägung, deren Genese noch nicht vollständig geklärt ist.

Ihr charakteristisches Bild zeigt sich in der peripheren symmetrisch verlaufenden, persistierenden Synovitis mit Destruktion und Deformation der betroffenen, vorwiegend der kleinen, selten der großen Gelenke. Hierfür sind viele verschiedene Faktoren verantwortlich, zum einen sind es Zytokine und matrixabbauende Metalloproteinasen, zum anderen die unkontrollierte Proliferation der Synovia, die sogenannte Pannusbildung, die zur Zerstörung der Gelenke beitragen. Die Erkrankung kann als Oligo- oder Polyarthritits auftreten und in fortgeschrittenem Stadium oder in schweren Fällen zu Mitbeteiligung von inneren Organen führen. Dabei kann es zu Entzündungen am Herzen im Sinne einer Valvulitis oder Serositis mit folgender Fibrose kommen [9]. Hepatische Veränderungen mit Erhöhung der Leberenzyme, sowie pulmonale Beteiligung mit parenchymatöser Knotenbildung in der Pleura sind keine Seltenheit [17,67].

Typisch für die RA ist auch das Auftreten von Rheumaknoten und Rheumafaktoren. Rheumaknoten sind derbe, verschiebliche Knoten, die sich subkutan, wahrscheinlich durch vaskulitische Prozesse, an druckbelasteten Sehnen bilden können [24]. Meistens treten sie an den Strecksehnen der Fingergelenke, Ellenbogengelenke und an der Achillessehne auf [37]. Ihr Auftreten ist bei Männern gehäuft und spezifisch für die RA, besonders nach Therapie mit Methotrexat.

Bei den Rheumafaktoren handelt es sich um Autoantikörper, die gegen das FC-Fragment von Immunglobulin G gerichtet sind, und von B-Lymphozyten produziert werden [65]. Da diese Rheumafaktoren einer Erstmanifestation von Gelenkbeschwerden um Jahre voraus gehen können, sind sie von

diagnostischem Wert [1,28,29,54]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei etwa 75% der Rheumatiker aber auch bei 5% der gesunden Bevölkerung, dieser Faktor zu finden ist [29,30].

Die Prävalenz der RA beträgt weltweit etwa 1%, wobei Frauen dreimal häufiger betroffen sind [35]. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr. Jenseits des 60. Lebensjahres kommt es bei den Männern zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz der RA, womit das Geschlechterverhältnis in diesem Alter nahezu ausgeglichen ist [24].

Die Diagnose der RA ist bis heute ausschließlich eine klinische. Sie wird nach einem Schema des American College of Rheumatology (ACR) gestellt, in dem sieben Kriterien der RA zusammengestellt sind [8].

1. Morgensteifigkeit für mindestens sechs Wochen und eine Stunde andauernd
2. Schwellung in mindestens drei Gelenkregionen, für wenigstens sechs Wochen gleichzeitig feststellbar.
3. Schwellungen von Hand- oder Fingergelenken für mehr als sechs Wochen.
4. Symmetrische Schwellung der unter 2. befallenen Gelenke, für sechs oder mehr Wochen.
5. Subkutane Knoten (Rheumaknoten)
6. Rheumafaktor positiv
7. Gelenkveränderungen im Röntgenbild.

Die Diagnose „Chronische Polyarthritits“ (=rheumatoide Arthritis) gilt bei Vorliegen von mindestens vier der sieben Kriterien als gesichert.

Die Ätiologie der RA ist hingegen noch in keinster Weise als gesichert anzusehen. Bei der Suche nach der Ursache dieser Erkrankung wurden viele Hypothesen aufgestellt, die aber jede für sich nur einen Teilaspekt der RA aufdecken konnte. Diese Tatsache führte dazu, dass man die Ätiologie der RA als multifaktoriell einstufte [68]. Nach heutiger Meinung ist die chronische Polyarthritits wohl durch zwei große Faktoren bestimmt, die Genetik und die Immunologie.

In Zwillingsstudien konnte belegt werden, dass Zwillinge im Vergleich zur Normalbevölkerung, ein bis zu 15fach erhöhtes Risiko haben auch an RA zu erkranken. Dabei hatten Unverwandte ein Risiko von 1%, zweieiige Zwillinge ein Risiko von 4% und eineiige Zwillinge ein Risiko von 12-15%, RA zu bekommen [1,53].

Eine weitere genetische Komponente in der Pathogenese der chronischen Polyarthrits ist die Tatsache, dass bei der Untersuchung von MHC Klasse II Molekülen antigenrepräsentierender Zellen, die Allele HLA-DR4 und HLA-DR1 mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit einhergehen. Während das HLA-DR4 Allel nur bei 28% der Gesunden zu finden ist, kann bei 93% der RA-Patienten das Allel HLA-DR4 oder HLA-DR1 nachgewiesen werden [56,50]. Die Schwere des Verlaufs ist zudem noch mit bestimmten Allelen des MHC Klasse II Rezeptors (Dqw7 bzw. DRB1) assoziiert.

HLA ist das auf Chromosom 6 lokalisierte humane Lymphozyten-Antigen [56,60], welches ein Rezeptormolekül an Zelloberflächen darstellt, Antigene bindet und präsentiert. Diese und weitere kostimulierenden Rezeptoren ermöglichen dann die Aktivierung von T-Lymphozyten, die durch Bindung an das präsentierte Antigen erfolgt. HLA Klasse I Moleküle aktivieren zytotoxische und HLA Klasse II Moleküle aktivieren Helfer-Zellen.

Diese Daten zeigen, dass es eine klare genetische Prädisposition bei der RA gibt, aber auch, dass eine erbliche Vorbelastung nicht alleinig als Krankheitsauslöser verantwortlich gemacht werden kann.

Der zweite große Bereich der Erforschung der Ätiologie der RA ist die Immunologie, bei der es vor allem das molekulare Mimikry ist, welches als krankheitsauslösender Faktor angesehen wird. Molekulares Mimikry ist die Bezeichnung für die Immunantwort auf körpereigene Substanzen, die Ähnlichkeit mit körperfremden Antigenen besitzen. Das ist der Grund, warum man bei der RA von einer Autoimmunkrankheit redet.

Es kommen hierbei zwei Mechanismen in Frage, zum einen ein exogener Faktor und zum anderen ein endogener Faktor, welcher zum molekularen Mimikry führt. Als endogener Faktor kommt z.B. eine Spontanmutation mit

Veränderung der Oberflächenantigene oder der Antikörper in Frage. Dies führt zu einer Immunantwort auf körpereigene Zellen und somit zu einer Entzündung.

Humanpathogene Viren werden schon lange als exogener Faktor bei der RA diskutiert. Diese können bei akuten Infektionen passagere Arthritiden verursachen und auch noch nach Jahren zu Rezidiven führen. Bis heute ist aber unklar, ob sie für die chronischen Polyarthritiden der RA verantwortlich gemacht werden können [49].

Schon Ende der siebziger Jahre fand man Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des EBV-Virus an der Pathogenese der chronischen Polyarthrititis [6,47,55,69]. Hierbei wurden z.B. Antikörper aus dem Serum von RA-Patienten isoliert, welche auch mit einem nukleären Lymphozytenantigen reagieren, das während einer akuten Mononukleose exprimiert wird. Erhöhte Antikörpertiter gegen diverse EBV-kodierende Antigene, sowie höhere EBV-infektionsraten peripherer B-Lymphozyten legen eine abnorme Immunantwort nahe [14,41,63,1].

Antikörper gegen Zytokeratin und Vimentin, wie sie bei der RA zu finden sind, wurden auch bei Patienten mit einer EBV-Infektion isoliert [31]. Bei weiteren Untersuchungen fand man Homologien zwischen EBV-kodierten und körpereigenen Proteinen, wie z.B. das EBV-Glycoprotein 110, welches mit dem HLA-DR1-Molekül und dem HLA-DR4-Molekül eine identische Peptidsequenz besitzt [19, 48].

Diese Übereinstimmungen können zu einem molekularen Mimikry führen und damit zur Produktion von kreuzreagierenden Antikörpern [62,64].

Bei der daraus resultierenden Entzündung spielen Zytokine und Metalloproteinasen eine wichtige Rolle [11,16,33]. Zytokine sind Glykoproteine oder Polypeptide, die zum humoralen Immunsystem gehören und die Kommunikation zwischen den Leukozyten ermöglichen. Diese proinflammatorischen Botenstoffe wirken nicht systemisch, sondern eher lokal, d.h. parakrin/autokrin auf das Krankheitsgeschehen ein. Sie besitzen eine gewisse Funktionsspezifität, wirken jedoch meistens auf verschiedene Zellarten gleichzeitig ein (Pleiotropismus). Die Zytokine umfassen z.B. Chemokine,



Lymphokine, Monokine, Interferone und Interleukine. Sie werden nach ihrer Hauptwirkung eingeteilt. Hierbei gelten IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  als proinflammatorische Zytokine, die vor allem von Makrophagen und Fibroblasten produziert werden [15,27,61]. IL-2, IL-4 und IL-5 haben dagegen eine chemotaktische Wirkung auf B- und T-Lymphozyten, IL-16 spezifisch nur auf T-Lymphozyten [13,18,22,40,66,71]. TGF- $\beta$  ist in sofern Interessant, da es in Abhängigkeit von anderen Zytokinen, sowohl eine Gewebsproliferation antreiben, wie auch hemmen kann.

Die Metalloproteinasen gehören zur Familie der Enzyme und sind unter anderem für den Abbau der Knochen- und Knorpelmatrix verantwortlich. Ihre Produktion in synovialen Fibroblasten wird durch die oben erwähnten Zytokine, wie z.B. IL-1 und TNF- $\alpha$  begünstigt und gefördert. Bevor sie ihre Wirkung entfalten können, müssen sie zuerst durch Proteolyse in eine aktive Form überführt werden [33]. Wichtige Vertreter dieser Enzyme sind interstitielle Collagenase (MMP1), Stromelysin (MMP3) und Gelatinase1 (MMP2), welche vermehrt an der Knorpel-Knochengrenze nachweisbar sind und zum destruierenden Geschehen der RA beitragen [25, 39].

## 1.2 Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit setzt sich aus zwei unterschiedlichen Beobachtungen zusammen, die nachfolgend erörtert werden sollen.

Werden Hautfibroblasten über längere Zeit passagiert, also in den Zustand höherer Differenzierung gebracht, kann man ein spontanes Auftreten von IL-16 feststellen, welches in frühen Passagen der Kulturen nicht nachweisbar ist [52].

In einer anderen Arbeit wurden Knochenzellen verschiedener Differenzierungsgrade isoliert und durch den Stressfaktor Serumentzug in einen Differenzierungsprozess überführt. Bei dieser Differenzierung wurde festgestellt, dass die Knochenzellen verschiedene Zytokine und MMP-3 produzieren. In der Kontrollgruppe konnte kein Anstieg von MMP-3 und den Zytokinen festgestellt werden [3]. Dieses Muster ist ähnlich dem, welches bei der Differenzierung von Fibroblasten durch Bestrahlung entsteht.

Bei Untersuchungen der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde herausgefunden, dass die synovialen Fibroblasten spontan IL-16 und MMP-3 produzieren [21, 34].

Aus diesen Feststellungen heraus ergab sich die Frage, ob es in der Synovialmembran von Rheumapatienten vermehrt terminal differenzierte Fibroblasten gibt, welche das spontane Auftreten von IL-16 und MMP-3 erklären könnten.

Diese Frage soll in der folgenden Arbeit geklärt werden. Hierzu werden synoviale Fibroblasten mit Hilfe einer Enzymfärbung ( $\beta$ -Galaktosidase), der Polymerase Kettenreaktion (Expression der Gene p16<sup>ink4a</sup> und p21<sup>cip</sup>) und der Markierung mit radioaktiv markiertem Methionin ( $S^{35}$ ) auf ihre Differenzierung untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsgüter

6-Well-Makroplatten	(Fa. Greiner, Nürtingen, BRD)
12-Well-Makroplatten	(Fa. Nunc, Wiesbaden, BRD)
96-Well-Mikroplatten	(Fa. Greiner, Nürtingen, BRD)
Absaugpumpe	(Suc-O-Mat; Fa. Bachofer, Reutlingen, BRD)
Brutschrank	(CO <sub>2</sub> Auto-Zero; Fa. Heraeus, Hanau, BRD)
Einmalskalpelle	(Cutifix; Braun Medical AG, Melsungen, CH)
Eppendorf-cups	(0,5ml, 1,8ml; Eppendorf, Hamburg, BRD)
Farbdiafilm	(Kodak Ektachrome 100 HC; Kodak, Stuttgart)
Feinwaage	(Sartorius handy H51; Fa. Sartorius, Göttingen, BRD)
Gelkammer	(Fa. Apligene, Heidelberg, BRD)
Insulinspritzen	(1ml; Fa. Braun Medical AG, Melsungen, CH)
Kanülen	(Sterican 0,9x70 mm; Braun Medical AG, Melsungen, CH)
Kulturflaschen	(50ml / 250ml; Fa. Costar, Cambridge, GB)
Lichtmikroskop	(Fluovert FS Mikroskop; Fa. Leitz, BRD)
PCR-Block	(Typ UNO II; Fa. Biometra, Göttingen, BRD)
Perfusorspritzen	(25ml / 50ml; Fa. Braun Medical AG, Melsungen)
Petrischalen	(Cellstar, 94/16 mm, steril; Fa. Greiner, Nürtingen, BRD)

---

Photometer	(SpectrophotometerV-530;Fa.Jasco,Groß Umstadt, BRD)
Pinzetten	(Fa. Aesculap, Tuttlingen, BRD)
Pipetten	(Fa. Eppendorf, Falcon, Greiner, )
Pipettierhilfen	(Fa. Eppendorf, Hamburg, BRD)
Scheren	(Fa. Aesculap, Tuttlingen, BRD)
Schüttler	(Ika MTS4; Fa. Bachofer, Reutlingen, BRD)
Software	(AnalySIS; Soft-Imaging Software, Münster)
Sterilbank	(Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl)
Sterilfilter	(Millex GV 0,22; Fa. Millipore, Molsheim, FRA)
Sterilfilter	(Milisart 0,45 µm; Sartorius, Göttingen, BRD)
Stickstofftank	(Taylor Wharton Cryogenetics; Fa. Bachofer, Reutlingen, BRD)
Vario-Orthomat	(Fa. Leitz)
Wasserbad	(DT Hetotherm; Fa. Bachofer, Reutlingen)
Zentrifugen	(Avanti 30/ GPR; Fa. Beckmann, München)
Elektrophoresekammer	(Gelelectrophoresis Aparatus GE 214 LS; Pharmacia Fine Chemicals, Erlangen, BRD)

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

5-Br-4-Cl-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid	(Fa. Peqlab, Erlangen, BRD)
Acrylamid	(Fa. Serena)
Agarose	(Fa. Seakem)
Agarose	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Amoniumpersulfat	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Ampholine	(pH 5-10; Fa. Pharmacia Biotech, Erlangen)
Antimycotikum Fungizone	(Amphotrizin B, Fa. Gibco, Karlsruhe, BRD)
Basenpaarmarker	(100 bp DNA Ladder; Gibco, Rockville, USA)
Beta.Mercaptoethanol	(Fa. Biorad, München, BRD)
Bis-Acrylamid	(Fa. Serena)
Collagenase	(Typ11; Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Desinfektionslösung Antifect	(Fa. Schülke&M., Nordstedt, BRD)
Desinfektionslösung Barrycidal	(Fa. Schröder, Stuttgart, BRD)
Dimethylformamid	(Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Dimethylsulfoxid	(Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Dispase	Grad II; Fa. Roche, Mannheim, BRD)
DNA-Eichmarker	(100 bp DNA Ladder; Gibco, Rockville, USA)
DNA-Snthese-Kit	(Adv. RT-for-PCR Kit; Fa. Clontech, Palo Alto, USA)
DNA-Verdau	(Rnase-free DnaseSet; Quiagen, Hilden, BRD)
Ethidiumbromid	(10mg/ml; Fa. Amersham, Braunschweig, BRD)
Ferricyanid	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Ferrocyanid	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Filterpapier	(3mm; Fa. Whatman, Kent, UK)

---

Formaldehyd	(Fa. Fischer, Zürich, CH)
Fötales Kälberserum	(Myoclon Super Plus FCS; Fa. Gibco, Rockville, USA)
Glutaraldehyd	(Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Glycerin	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
H <sub>3</sub> P <sub>0</sub> <sub>4</sub>	(Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Harnstoff	(60,06 gr/mol; Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Hydroph. Scintillations Lsg.	(Ultima Gold; Fa. Packard, Meriden, USA )
Insulin-Transferrin-Selen-G (ITS)	(Fa. Gibco, Rockville, USA)
Magnesiumchlorid	(Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Mercaptoethanol	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Nährmedium	(DMEM/F12(1:1) Medium flüssig; Fa. Gibco, Rockville, USA )
NaOH	(Fa. Merck , Darmstadt, BRD)
Natriumchlorid	(Fa. Merck , Darmstadt, BRD)
PBS-Puffer	(Dulbecco´s PBS W/O Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ; Fa. Gibco, Rockville, USA)
PCR-Kit	(AmpliTaq® DNA Polymerase, Fa. Perkin Elmer, Rodgun-Ingelheim, BRD)
Penicillin/Streptomycin-Lsg.	(10000E/10000µg/ml; Gibco, Rockville, USA)
Pepton	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Primerpaar human p16ink4a	(Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, BRD)
Primerpaar human p21cip	(Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, BRD)
Rinderserumalbumin BSA	(Albumin Bovine; Fa. Sigma, St. Louis, USA)
RNA-Extraktion	(Rneasy Mini Kit; Fa. Quiagen, Hilden, BRD)
TEMED	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)

---

Tris-Base	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Trypanblau 0,4%	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Trypsin EDTA 1x	(Fa. Gibco, Rockville, USA)
Vitamine	(Vitamins MEM Solution 100x; Fa. Gibco, Rockville, USA)
Zitronensäure	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)

### **2.1.3 Humanes Untersuchungsmaterial**

Für die Anzucht der humanen Zelllinien wurde synoviales Gewebe aus Operationen der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen verwendet. Es handelte sich dabei um Eingriffe am Knie, bei denen aus medizinischer Indikation Synovia entnommen wurde, und diese zur Isolation von Fibroblasten diente. Es handelte sich um insgesamt acht Patienten im Alter zwischen 30 und 68 Jahren, welche an chronischer Polyarthrit, primärer Osteoarthrose und Knorpelschäden im Knie litten.

Dabei wurde bei den vier Rheumapatienten und den zwei Osteoarthrosepatienten eine Nex-Gen-Knietotalprothese (KTP) eingesetzt. Bei den zwei Patienten mit Knorpelschäden wurde eine Mosaikplastik mit autologer Knorpelzelltransplantation vorgenommen. Die Rheumatiker waren im Durchschnitt 61,2 Jahre alt und alle weiblich. Die Kontrollgruppen, welche aus Osteoarthrose- und Knorpelpatienten bestanden, waren im Durchschnitt 67,5 und 31 Jahre alt, und bestanden jeweils aus einer männlichen und einer weiblichen Person.

Aus Datenschutzgründen sind die Patientennamen in einem Dreibuchstabencode verschlüsselt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Allgemeines

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der synovialen Fibroblasten erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.1.2 Anlage humaner Fibroblastenkulturen

Das in der Operation entfernte synoviale Gewebe wurde auf der Stelle in ein steriles Gefäß mit PBS-Puffer gegeben, um eine Kontamination und ein frühes Austrocknen zu verhindern.

Daraufhin wurde das Material im Labor von Fettgewebe befreit und in einer Petrischale, unter Zugabe von PBS-Puffer, mit Hilfe zweier Skalpelle in circa 1mm<sup>3</sup> Stücke zerkleinert. Dies diente der Oberflächenvergrößerung um der Kollagenase und Dispase eine größere Angriffsfläche zum Verdau zu liefern. Die Suspension wurde dann in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mehrmals mit PBS-Puffer bei 1000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Nach jedem Durchlauf wurde dabei der Überstand aus Fettgewebe und Blutzellen abgesaugt, solange, bis er klar war.

Im nächsten Schritt wurde das Gewebegemisch mit 7500 Units pro ml Kollagenase und 6 Units pro ml Dispase für 30 min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurde zweimal mit etwas Vollmedium gewaschen und zentrifugiert und die Probe mit 500 Units pro ml Kollagenase über Nacht verdaut. Das im Medium enthaltene FCS inhibiert die Kollagenase und somit die irreversible Schädigung der Zellen.

Am nächsten Tag wird erneut zweimal mit Vollmedium gewaschen und zentrifugiert, und das Zellpellet mit etwa 3ml oder 12 ml Vollmedium resuspendiert und in 6-Wellplatten oder 250ml-Kulturflaschen zur Anzucht überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Inkubiert.



### 2.2.1.3 Herstellung des Vollmediums

Zur Herstellung des 20% FCS/DMEM Vollmediums wurde zu 400 ml Dulbecco's MEM Nutrient Mix F12 Grundmedium je 100 ml FCS, 12 ml Penicillin-Streptomycin (Gibco), 10 ml MEM Vitaminlösung (Gibco), 6 ml Amphotericin-B (Fungizone, Gibco) und 500 µl ITS zugegeben.

Für das Medium wurde für die gesamten Versuche die gleiche FCS-Charge verwendet (Myoclone; 30 G 8360 A), um konstante Kulturbedingungen zu gewährleisten. Das fötale Kälberserum wurde vor Gebrauch über Nacht im Kühlschrank aufgetaut, auf 25°C erwärmt und anschließend 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert. Danach gab man 1gr. Aktivkohle hinzu und ließ die Mischung 1 Stunde lang auf dem Schüttler sanft schütteln. Anschließend wurde diese Lösung sterilfiltriert (Porengröße 0,45µm) und in 50ml-Portionen bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.4 Mediumwechsel und Zellpflege

Der Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt um gleichbleibende Kulturbedingungen und die Stabilität der Bestandteile des Mediums zu gewährleisten. Das Vollmedium wurde aus diesem Grund höchstens 2-3 Wochen benutzt und bei 4°C gelagert.

Dem Medium ist ein PH-Indikator zugesetzt, welcher bei saurem pH (Mediumwechsel notwendig) in gelb, und bei Zunahme des pHs, z.B. bei Abnahme des CO<sub>2</sub>-Gehalts, in Violett umschlägt.

Zum Wechsel des Mediums wurde mit sterilen Pasteurpipetten, desinfizierten Handschuhen und einer durch UV-Licht sterilisierten Sterilbank gearbeitet. In dieser Bank herrscht ein permanenter, partikelfreier Luftstrom, um eine Kontamination mit Keimen zu verhindern.

Das verbrauchte Medium wurde mit einer Pipette und einer Saugpumpe entfernt, ohne den Zellrasen zu beschädigen. Daraufhin wurde je nach Kulturgefäß 6-12 ml Vollmedium, welches auf 37°C erwärmt war, hinzugegeben.

### 2.2.1.5 Subkultivierung der Zellen

Nach einiger Zeit waren die Zellkulturen bis zur Konfluenz, also der dichtest möglichen Anordnung als Monolayer, gewachsen und mussten halbiert und umgesetzt werden. Wurde dies nicht gemacht kommt es zu einer Kontaktinhibierung und einem langsamen Absterben der Zellen.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 37°C warmem PBS-Puffer gewaschen. Als nächstes gab man 3-5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) hinzu, um die Zellen vom Boden zu lösen. Zur Kontrolle diente ein Lichtmikroskop, mit welchem man die Ablösung verfolgen konnte. Leichtes Schütteln und Klopfen auf die Unterseite des Kulturgefäßes verkürzte zusätzlich die Ablösedauer.

War die Mehrzahl der Zellen gelöst wurde die doppelte Menge an FCS-haltigem Medium zugegeben. Das Serum im Medium bewirkt eine sofortige Inhibierung der Protease Trypsin, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern.

Im nächsten Schritt wurde diese Suspension auf zwei neue Kulturflaschen oder 6-Wellplatten verteilt. Dabei wurde auf eine gute Durchmischung geachtet, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) benutzt. Die Zellen wurden dafür 1:1 mit Trypanblau gemischt, gut suspendiert, um Verfälschungen zu vermeiden, und an den Rand des Deckglases pipettiert. Das Deckglas wurde zuvor leicht befeuchtet und auf die Zählkammer aufgesetzt, so dass die so genannten Newton-Ringe zu sehen waren. Durch die Kapillarkräfte wurden die Zellen unter das Deckglas gezogen.

Für die Auswertung zählte man die vier großen Eckquadrate. Das Volumen dieser Felder betrug  $4 \times 10^{-4}$  ml, das heißt, in einem Milliliter dieser Suspension befinden sich bei  $n$  ausgezählten Zellen:  $n \times 2 / (4 \times 10^{-4} \text{ ml}) = n \times 5000$  Zellen/ml. Zellen die nicht mehr vital waren stellten sich unter dem Mikroskop

dunkelblau dar, da die Zellmembran zerstört war und das Trypanblau eindringen konnte.

#### 2.2.1.7 Kryokonservierung

Um Primärkulturen für längere Zeit und für spätere Versuche zu konservieren wurden diese in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und den Zellen Trypsin-EDTA zugegeben (siehe auch Kapitel 1.2.1.5). Nachdem sich die Zellen vollständig gelöst hatten wurde durch Beimischung von frischem Medium das Trypsin inhibiert und die Zellen im Anschluss gezählt. Für die Konservierung wurde dann die gleiche Menge Medium, welches mit 10% DMSO als Gefrierschutz versetzt war, hinzugegeben, und jeweils 1,5 ml dieser Lösung in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort in die Gasphase einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporkiste gegeben, und 30 minütig immer tiefer gehängt, bis sie nach zwei Stunden in die flüssige Phase des Stickstoffes eintauchten. Die kryogenierten Zellen wurden dann in den Stickstofftank zur Lagerung gegeben und die Daten im Computer festgehalten.

Für die Reaktivierung der Zellen wurde die Probe bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und mit etwas Medium versetzt, um das DMSO zu verdünnen. Nach der Zentrifugation mit 1000 rpm wurde das Pellet dann mit 6-12 ml Vollmedium resuspendiert und in 6-Wellplatten oder 250 ml-Flaschen umgefüllt. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und mit 5%  $\text{CO}_2$ .

### 2.2.2 Färbung der SA- $\beta$ -Galaktosidase

#### 2.2.2.1 Allgemeines

Die Färbung der SA- $\beta$ -Galaktosidase beruht auf der Beobachtung, dass Fibroblasten, die sich im Stadium der terminalen Differenzierung befinden, durch erhöhte SA- $\beta$ -Galaktosidase Expression oder Aktivität, bei pH 5,5 vermehrt Substrat umsetzen [23]. Diese Tatsache wurde für die Färbung verwendet, indem das Enzym mit Hilfe von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -Galaktosid bei pH 5,5 inkubiert wurde, und sich eine Blaufärbung der terminal differenzierten Zellen feststellen lässt.

Die Gründe für die veränderte SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität sind noch nicht geklärt. Es könnte sich um einen Anstieg dieses oder eines verwandten Enzyms handeln, welches durch die replikative Seneszenz induziert wird. Auch im Gespräch ist, dass einige lysosomale Aktivitäten so gesteigert sein könnten [2,3], dass die SA- $\beta$ -Galaktosidase bei pH 6 nachgewiesen werden kann.

#### 2.2.2.2 Färbung

Die Fibroblasten wurden in frühen Passagen abtrypsiniert und mit Hilfe der Neubauerzählkammer ausgezählt (siehe 2.2.1.5). Daraufhin wurden circa  $10^4$  Zellen in eine 6-Wellplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank zur Adhärenz gebracht. Diese Zellen wurden als nächstes mit PBS-Puffer gewaschen, mit 3% Formaldehyd für drei bis fünf Minuten fixiert und danach erneut mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, um noch vorhandenes Formaldehyd zu entfernen.

Für die Färbung wurde das 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid zu einer Stammlösung von 20 mg/ml mit N,N-Dimethylformamid in Lösung gebracht. Diese Stammlösung wurde 1:20 mit einem Puffer verdünnt, der pro Liter H<sub>2</sub>O bidest aus 7,68gr. Zitronensäure (MW 192.1), 2,112gr. Kalium-Ferrocyanid (MW 422.4), 1,64gr. Kalium-Ferricyanid (MW 329.2), 8,76gr. NaCl (MW 58.44) und 0,4gr. MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (203.3) bestand. Die Lösung wurde dann mit NaOH auf pH 5,5 titriert, durch einen Faltenfilter filtriert und für 16 Stunden auf die fixierten Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln und ohne CO<sub>2</sub>-Begasung.

Nach 16 Stunden wurde die Färbelösung abgesaugt und das Präparat mit PBS-Puffer gespült. Die noch feuchten Zellen wurden sofort unter dem Mikroskop ausgewertet, indem man zehn Blickfelder im Präparat auszählte und damit ungefähr 400 Zellen zur Analyse hatte. Diese Prozedur wurde von drei Mitarbeitern nacheinander durchgeführt, um mögliche Ungleichmäßigkeiten zu vermeiden. Ausgewertet wurde das Verhältnis SA- $\beta$ -Gal-positiver Zellen zu SA- $\beta$ -Gal-negativer Zellen.

### 2.2.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm JMP 4.05<sup>®</sup>, wobei eine Varianzanalyse auf die ArcSin<sup>^</sup> transformierten Werte zur Varianzstabilisierung durchgeführt wurde.

Es ergaben sich zwei nominale Einflußgrößen:

1. Die Gruppe
2. Der Patient

Die Einflußgröße Patient war unter Gruppe genested und mit einem Randeffect versehen (restricted maximum likelihood).

## 2.2.3 RT-PCR

### 2.2.3.1 Allgemeines

Beim arbeiten mit RNA und DNA ist es wichtig eine Kontamination mit fremder Erbsubstanz zu vermeiden. Deshalb wurde bei allen Schritten, von der RNA-Extraktion über die cDNA-Synthese bis zur RT-PCR darauf geachtet, dass spezielle Pipetten und Pipettenspitzen, sowie sterilisierte Eppendorfhütchen und nur für die PCR benutzte Chemikalien verwendet wurden. Um eine Verschmutzung mit eigener DNA zu verhindern und den Eigenschutz zu gewährleisten, wurde des weiteren nur mit Handschuhen gearbeitet.

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren, welches 1983 von Kerry Mullis entwickelt wurde und 1993 mit den Nobelpreis für Chemie geehrt wurde (Mullis et al.,1986). Es geht dabei um die Vervielfältigung bestimmter Genabschnitte, um sie mit herkömmlichen Methoden nachweisen zu können. Bereits vorhandener doppelsträngiger DNA werden Oligonukleotide und Primer zugefügt, welche sich nach der Aufspaltung in zwei Einzelstränge an diese anlagern. Mit Hilfe eines hitzebeständigen Enzyms des Bakteriums „Thermophilus Aquaticus“, der Taq-Polymerase, werden die Oligonukleotide komplementär an den DNA-Strang gebunden, und ein neuer Doppelstrang gebildet. Mit jedem Durchlauf wird die vorhandene DNA somit verdoppelt, und nach circa 33 Zyklen ist genug DNA vorhanden, um sie nachweisen zu können.

Diese Zyklen bestehen aus drei Schritten, die wie folgt beschrieben werden.

- Denaturierung: Der als Doppelstrang vorliegende Genabschnitt wird bei 94 °C in zwei Einzelstränge geschmolzen.
- Annealing: Bindung der beiden Primer an der spezifischen Gensequenz bei der primerspezifischen Temperatur.
- Extension: Von dem Primern aus werden mit Hilfe der Taq-Polymerase die Oligonukleotide komplementär an den Einzelstrang angelagert. Dies geschieht bei 42 °C.

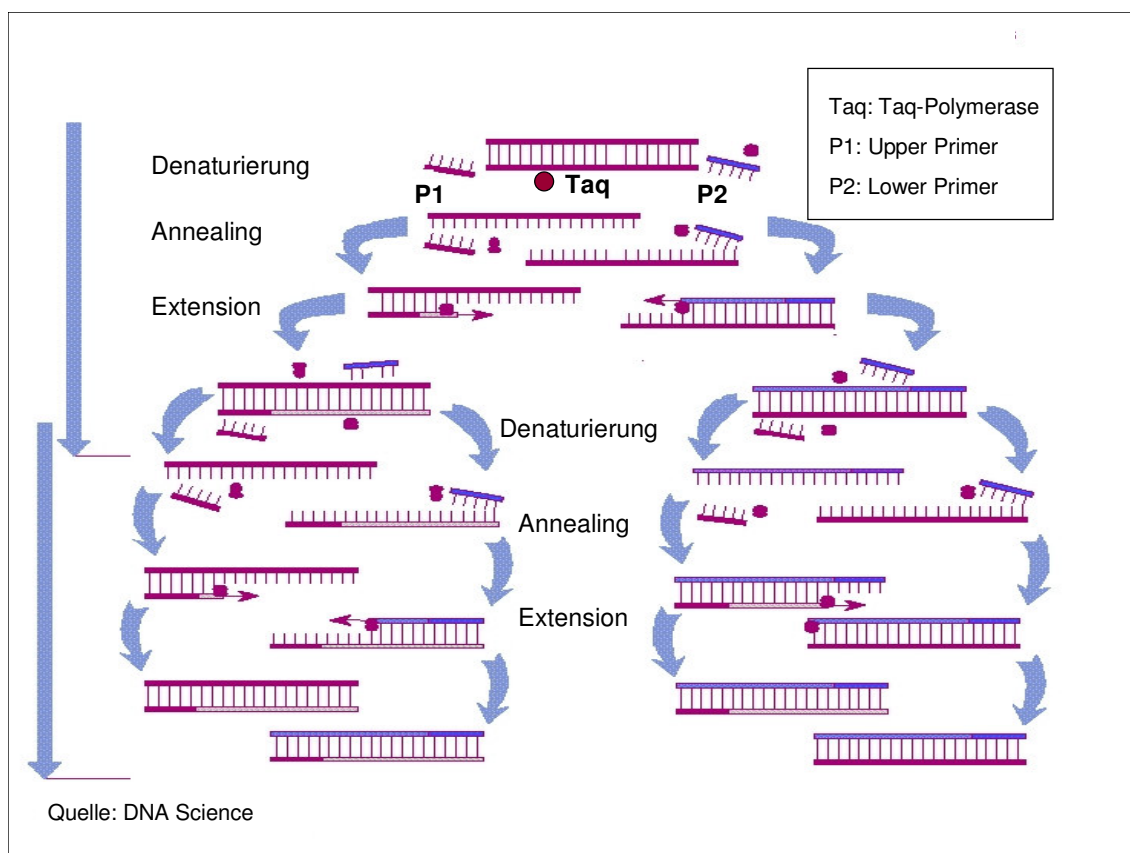


Abbildung 2-1: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion

### 2.2.3.2 RNA-Extraktion

Zur Isolation der in den Fibroblasten vorhandenen mRNA (Messenger-RNA) wurde ein Extraktions-Kitt der Firma Quiagen (RNeasy Mini Kit) verwendet, welches alle notwendigen Chemikalien und Hilfsmittel enthielt. Die mRNA wird in der Membran einer Säule (Spincolumn) gebunden und in mehreren Waschschritten mit sich ändernder Salzkonzentration auszentrifugiert.

Reagenzien:

- RLT-Puffer (mit 10µl/ml Mercaptoethanol versetzt, einen Monat haltbar)
- 70% Ethanol
- RPE-Puffer (in vier Volumen 100% Ethanol verdünnt)
- RW1-Puffer
- RNase-free Aqua bidest

Zellyse:

Alle Schritte wurden zügig bei Raumtemperatur durchgeführt. Die abtrypsinieren und gewaschenen Zellen (siehe 2.2.1.5) wurden dabei in 50µl PBS-Puffer aufgenommen und mit 350µl RLT-Puffer versetzt. Mit Hilfe einer Insulinspritze (Fa. Braun) sind die Zellen daraufhin solange homogenisiert worden, bis keine Zellklümpchen mehr zu sehen waren. Dieser Suspension wurde anschließend 350µl 70%ige Ethanollösung zugegeben, das gesamte Volumen auf die Säule aufgetragen und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Waschschritte:

Für das Waschen wurde 350µl RW1-Puffer in die Säule gegeben und diese wieder 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nun folgte in einem Zwischenschritt der DNA-Verdau, welcher mit einem anderen Kit der Fa. Quiagen (RNase-Free DNase Set) durchgeführt wurde. Dafür wurden 10µl DNase-Stocksolution mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und für 15 Minuten auf die Membran der Säule gegeben. Anschließend gab man 350µl RW1-Puffer hinzu, zentrifugierte wieder 15 Sekunden bei 10.000 rpm und verwarf das anfallende

Eluat. In zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 500µl RPE-Puffer (Zentrifugation erst 15 Sekunden bei 10.000 rpm, dann 2 Minuten bei 20.000 rpm) und abschließender Zentrifugation für 15 Sekunden bei 20.000 rpm war das Waschen beendet. Es durfte zum Schluss kein Tropfen Ethanol mehr in der Säule zurückbleiben.

Eluierung der RNA:

Die Säule wurde in ein Eppendorfhüttchen gestellt und die RNA mit 30-50µl RNase-free Aqua bidest bei einer Umdrehung von 10.000 rpm für eine Minute eluiert. Daraufhin wurde sie sofort in cDNA umgeschrieben, oder aber für kurze Zeit bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.2.3.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA (CopyDesoxyribonucleinsäure) wurde ein Kit der Fa. Clontech verwendet, das alle notwendigen Reagenzien und Hilfsmittel, sowie einen Primer für GAPDH enthält. GAPDH-mRNA kodiert für ein Enzym, dessen PCR-Produkt 983 Basenpaare lang ist und praktisch in jeder Zelle vorhanden ist.

Von der isolierten mRNA wurde nach photometrischer Messung 2µg Äquivalent und 2µl oligo dT 18-Primer in ein steriles 0,5ml Eppendorfhüttchen gegeben, und mit DEPC-Wasser auf 25µl aufgefüllt. Dann wurde diese Probe bei  $70^{\circ}\text{C}$  für zwei Minute im PCR-Block erhitzt und nach dieser Zeit sofort auf Eis gestellt. Das geschah, um eine Rückfaltung der RNA zu verhindern und ein festes Binden der Primer zu gewährleisten.

Dieser Ansatz bestand aus 8µl 5x Reaktionspuffer(250mM Tris-HCL pH 8,3, 375mM KCL, 15mM  $\text{MgCl}_2$ ), 1µl rekombinanter RNaseinhibitor (40 E/µl), 2µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2µl MMV Reverse Transkriptase (200 E/µl). Die reverse Transkription erfolgte eine Stunde bei  $42^{\circ}\text{C}$  im PCR-Block. Im Anschluss an die Umschreibung wurde die cDNA-Synthese durch fünfminütiges Erhitzen auf  $94^{\circ}\text{C}$  gestoppt. Die fertige cDNA verdünnte man dann mit 160µl DEPC-Wasser und lagerte die Probe bis zur PCR bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .



#### 2.2.3.4 RT-PCR

In ausführlichen Voruntersuchungen wurden die optimalen Synthesebedingungen etabliert. Für die benutzten Primer wurde per Internetrecherche in der EMBL-Genbank die passende DNA-Sequenz gesucht und mit Hilfe des Computerprogramms Oligo 4.0<sup>®</sup> die optimalen Primer designt. Zusätzlich zur PCR mit diesen Primern wurde zur Kontrolle der cDNA-Menge immer ein Probenansatz mit einem GAPDH-Primer vervielfältigt.

Zur Vervielfältigung der gewonnenen cDNA wurde der Taq Polymerase Kit der Fa. Boehringer (inklusive GAPDH-Amplimer), sowie die folgenden Primer für das P16ink4a-Gen und das p21cip-Gen verwendet.

Humaner p16ink4a-Primer (Produktlänge 329bp)

Upper GCA GGC CCG GAT GAC AGT

Lower CCG CAG GGG TGG AGG AGA

Humaner p21cip-Primer (Produktlänge 896bp)

Upper GGC ACC AGA GGC AGT AAC CAT

Lower CAA CAC AGT GAA AAG GCA GAA GC

Für die Versuchsdurchführung wurde die cDNA auf Eis aufgetaut und ein sogenannter Mastermix zubereitet, in den die cDNA pipetiert wurde. Dieser Mastermix bestand pro Probe aus 5µl 10x Puffer, 0,5µl dNTP`s, 1µl upper Primer, 1µl lower Primer und 37µl ddH<sub>2</sub>O.

Der Mix wurde in 0,5ml Eppendorfhütchen pipetiert, mit 5µl der cDNA gemischt und im Anschluss mit 0,5µl Taq-Polymerase versetzt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 50µl ergab. Zusätzlich zu den normalen Proben wurde noch eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der die Probe mit ddH<sub>2</sub>O, anstatt mit cDNA versetzt wurde, um eine Verunreinigung auszuschließen.

Nun gab man die Probe sofort in den auf 80°C vorgeheizten PCR-Block. Diese Hochtemperatur-Initiation beugt einer unspezifischen Anlagerung der Primer an die Matrize vor. Bei einer einminütigen Anfangsdenaturierung bei 94°C klappt die Replikationsgabel auf. Während der folgenden Annealingphase (eine Minute) binden die Primer an das 5`-Ende der entstandenen Einzelstränge. Die optimale Annealingtemperatur lag für den p16ink4a-Primer bei 55°C und für den

p21cip-Primer bei 60,7°C. Die nun freiliegenden 3'-Enden bilden den Startpunkt für die Polymerase, welche in der Extensionsphase bei 72°C (zwei Minuten) aus den beigefügten Nukleotiden einen komplementären Tochterstrang amplifiziert.

Um eine ausreichende Menge an cDNA zu erhalten wurden die Schritte, Denaturierung (eine Minute, 94°C), Annealing (eine Minute, 55°C/60,7°C) und Extension (zwei Minuten, 72°C), insgesamt 33 mal wiederholt. Eine Abschlußextension von zehn Minuten bei 72°C stellte sicher, dass alle Doppelstränge in voller Länge synthetisiert wurden. Das PCR-Produkt wurde zur Gelelektrophorese eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

#### 2.2.3.5 Gelelektrophorese der DNA

Zur Kontrolle des DNA-Produktes wurde das Amplifikat in einem 1,5%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

Für das Gel wurden verschiedene Reagenzien gebraucht, die anschließend aufgeführt sind:

- 40xTAE-Puffer, welcher aus 108,9gr. Natriumacetat, 15,2gr. EDTA-Natrium und 193,6gr. Trisaminomethan in einem Liter destilliertem Wasser bestand.
- DNA-Ladepuffer, der aus 250µl 40xTAE-Puffer, 5ml Glycerin, 1ml Xylene, 1ml Bromophenolblau und 2,75ml destilliertem Wasser gemischt wurde.
- 20xTBE-Puffer, aus 61,7gr. Borsäure, 7,44gr. EDTA-Natrium und 121gr. Trisaminomethan, in einem Liter destilliertem Wasser.

Das Agarosegel wurde aus 6gr. Agarose, 380 ml destilliertem Wasser, 20 ml 20xTBE-Puffer und 40µl Ethidiumbromid hergestellt. Dazu mischte man die Zutaten und erhitzte diese Lösung in der Mikrowelle, bis sich alle Komponenten gelöst hatten und keine Schlieren mehr zu sehen waren. Danach wurde die Agarose mit dem Magnetrührer auf ungefähr 60°C abgekühlt und in die Gelkammer gegossen. Dort hielten Kunststoffkämme durch ihre Zinken kleine Taschen offen, in die später die Proben gegeben wurden. Nach einer halben Stunde war das Gel milchig trüb, und wurde mit 1xTBE vollständig bedeckt.

In die erste Tasche wurde 10µl eines DNA-Größenmarkers (100bp Ladder) gegeben, welcher als Größenmaß gelten sollte. Er bildete im Abstand von 100bp eine Bande, anhand derer man die Länge des Produktes bestimmen kann. Die anderen Taschen wurden jeweils mit einer Mischung aus 3µl DNA-Ladepuffer und 10µl PCR-Produkt gefüllt. Die letzte Probe war jeweils die Negativkontrolle.

Bei 70 Volt und ca. 5 mA wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach 100 Minuten war die Lauffront so weit Richtung Anode gewandert, dass eine ausreichende Trennung bestand. Das Gel wurde daraufhin unter eine UV-Lampe gelegt und die sichtbaren Banden mit Hilfe einer Videokamera und dem Computerprogramm AnalySIS digitalisiert. Das p16ink4a-Produkt hat eine Länge von 329bp, das Produkt des p21cip-Primers eine Länge von 896bp und das GAPDH-Produkt hat eine Länge von 983bp.

## **2.2.4 2-D Gelelektrophorese von zellulären S<sup>35</sup>-Methionin-Polypeptiden**

### 2.2.4.1 Allgemeines

Die 2D-Gelelektrophorese mit radioaktiv markiertem Methionin (S<sup>35</sup>) ist eine Methode mit der die Proteinexpression von Zellen dargestellt und analysiert werden kann. Hierbei wird das markierte Methionin in der Proteinsynthese der zu untersuchenden Zellen eingebaut. Die so entstandenen Proteine werden anschließend mittels Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Proteinmuster wird dann durch Fluorografie dargestellt.

Ziel dieses Versuches ist es, eventuelle Unterschiede in der Expression der Proteine bei RA-Patienten vs. gesunden Kontrollen offenzulegen. Zu diesem Zweck wurde besonderes Augenmerk auf das Protein PIVa gerichtet. Dies ist ein Protein mit einem MW von 33 kDa und einem Pi von 5,0 welches von Rodemann et al. in Versuchen mit terminaler Differenzierung assoziiert werden konnte [46]. Es stellt möglicherweise ein Regulationsprotein für den Übergang von potentiell mitotischen Progenitorfibroblasten in irreversibel terminal

differenzierte Zellen dar. Abbildung 2-2 zeigt die einzelnen Proteine, welche nach der Fluorografie isoliert werden können.

Die Gelelektrophorese wurde jeweils mit Zellen des gesunden Probanden KCJ und den Zellen der RA-Probanden BXM, JIB und LBE durchgeführt.

#### 2.2.4.2 Markierung und Radioaktivitätsbestimmung

Die für die Markierung vorgesehenen Zellen wurden abtrypsiniert und gezählt. Daraufhin wurden sie in eine 24-Wellplatte überführt, und in jedes Well  $10^4$  Zellen gegeben, die dann über Nacht im Brutschrank zur Adhärenz gebracht wurden.

Am folgenden Tag wurde ein Well gewählt, deren Zellen vital und gleichmäßig adhären aussahen. Es wurde dem Well Markierungsmedium zugegeben und für 18 Stunden inkubiert. Das Markierungsmedium bestand aus methioninfreiem DMEM ohne Glukose und Bicarbonat, und dem  $S^{35}$ -markierten Methionin. Es wurden dabei pro Well 200 $\mu$ l DMEM und 200 $\mu$ Ci  $S^{35}$ -Methionin zu den Zellen gegeben.

Nach den 18 Stunden wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen 2-3 mal mit PBS-Puffer gewaschen. Es wurde dann 100 $\mu$ l Lysispuffer zugegeben und die Zellen mit der Pipettenspitze vom Boden gelöst. Die Suspension gab man in ein Eppendorfhütchen und lagerte sie bei  $-80^\circ\text{C}$ .

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden die Proben aufgetaut, gut durchmischt und mit BSA (Bovines Serum Albumin) verdünnt, (195 $\mu$ l BSA-Lösung (60 $\mu$ g/ml) zu je 5 $\mu$ l Probe). Von dieser Lösung wurden dann 20 $\mu$ l entnommen und ebenfalls in 500 $\mu$ l BSA-Lösung verdünnt. Dann wurde die Probe mit Essigsäure (20%) bei  $4^\circ\text{C}$  für 60 Minuten gefällt. Während dieser Zeit wurden Millipore-NC-Filter für 15 Minuten in einer Lösung aus 1% Pepton in 20% Essigsäure eingeweicht. Das Pepton verhindert die Bindung von freiem  $S^{35}$ -Methionin an Nitrocellulose. Nach Inkubation für 60 Minuten, wurden die Filter auf eine Filtervorrichtung aufgezogen und die gut gemischten Proben unter Sauglast zugegeben, damit nicht eingebautes  $S^{35}$ -Methionin abgesaugt werden konnte. Um alle markierten Proteine zu binden wurde 2 mal mit 20%iger Essigsäure nachgespült. Die im Trockenschrank getrockneten Filter wurden in

Szintillationsröhrchen gesteckt und mit 5ml hydrophober Szintillationslösung versehen. Zum Abklingen der Chemilumineszens lies man die Röhrchen dann 10 Minuten ruhen, um sie dann in den Szintillationszähler zu überführen, wo durch Auszählung der Cherenkow-Zerfälle, die radioaktive Inkorporation bestimmt wurde. Der Wert wurde mit zwei multipliziert und ergab so die Counts pro Minute in 1µl Zellprobe (Wert x 2 = cpm/µl Probe). Für die 1. Dimension wurden  $10^6$  cpm pro Probe aufgetragen.

#### DMEM (Methioninfrei) für 100ml

- Pulvermedium 0,943gr.
- Bicarbonat 370mg
- 1-Glutamin 5,4gr.
- 1-Methionin 0,1gr.
- Penicillin/Streptom. 500µl

#### Lysispuffer

- 10% NP-40 20ml
- Ampholine pH 7-9 2,5ml
- Harnstoff (9,8M) 29,43gr.
- DTT (100mM) 771,5mg
- ddH<sub>2</sub>O 50ml

#### 2.2.4.3 1. Dimension der 2D-Gelelektrophorese

Für die 1. Dimension wurden die Gelröhrchen mit einem Durchmesser von 2,7mm und einer Länge von 15cm zunächst mit heißem Wasser und Spülmittel für längere Zeit gesäubert. Danach wurden sie mit Pfeifenreinigern durchgeschrubbt und mit klarem Wasser nachgespült. Zum Schluss wurden die Röhrchen noch einige Zeit mit deionisiertem Wasser durchgespült, bevor sie im Trockenschrank getrocknet wurden. Für diesen Schritt war es wichtig, darauf zu achten, dass es keine Verunreinigung mit Proteasen (z.B. durch Blütenstaub) gab, um die zu analysierenden Proteine nicht zu zerstören.

Zur Herstellung des Gels wurden folgende Reagenzien gemischt:

- Harnstoff 5,5gr.
- Acrylamid-Lsg 1,3ml (siehe unten)
- ddH<sub>2</sub>O 1,5ml
- 10% NP-40 2,0ml
- Ampholine pH 5-7 0,4ml LKB und 0,4 ml Serva
- Ampholine pH 3-10 0,12ml LKB

Acrylamid-Lösung:

- Acrylamid 2,838gr.
- Bis-Acrylamid 0,162gr.
- ddH<sub>2</sub>O 10ml

Rühren, filtrieren und bei 4°C eine Woche aufbewahren.

Die Reagenzien wurden gut gemischt (37°C) und dabei sorgfältig entgast. Danach wurde dem Gemisch 7µl TEMED und 10µl APS hinzugefügt.

Die noch warmen Gelröhrchen wurden dann mit Parafilm an einer Seite dicht verschlossen, in die Gelkammer gesteckt und mit dem Gel auf 13cm Füllhöhe aufgefüllt. Anschließend wurden sie mit 10µl ddH<sub>2</sub>O überschichtet und zwei Stunden zur Polymerisation stehen gelassen.

Nach diesen zwei Stunden wurden die Gelröhrchen präfokussiert. Dazu wurde das Wasser mittels einer Spritze von der Oberfläche des Gels entfernt und diese nacheinander erst mit 10µl Lysis-Puffer, dann mit 10µl Overlay-Puffer und zum Schluss mit Kathoden-Puffer überschichtet. Die Gelkammer wurde mit Kathoden- und Anoden-Puffer gefüllt und die Gele erst bei 200 Volt für 15 Minuten, dann bei 300 Volt für 30 Minuten und schließlich bei 400 Volt für 60 Minuten präfokussiert.

Overlay-Puffer:

- 10% NP-40                    5ml
- Ampholine pH 7-9            250µl
- Harnstoff (8M)                4,8gr.
- DTT (10mM)                  15,42gr.
- ddH<sub>2</sub>O                        10ml

Lagerung bei –80 °C

Kathoden-Puffer (20mM NaOH)

- 20ml einer 1M NaOH-Lösung werden zu 980ml ddH<sub>2</sub>O gegeben, gut gemischt und anschließend entgast. Dies ergibt eine Endkonzentration von 20mM.

Anoden-Puffer (10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

- 10ml einer 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung werden zu 990ml ddH<sub>2</sub>O gegeben und gut gemischt. Dies ergibt eine Endkonzentration von 10mM/Liter.

Nach der Präfokussierung wurde der Puffer über den Gelen abgezogen und diese zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend gab man die Proben mit 10<sup>6</sup> cpm hinzu und überschichtete sie mit 10µl Overlay- und Kathoden-Puffer. Die Laufdauer der Elektrophorese betrug 19 Stunden bei 400 Volt, was eine Leistung von 7600Vh ergab.

Am Ende der 19 Stunden wurden die Gele vorsichtig mit Pressluft ausgeblasen und 10 Minuten mit Equilibrierungspuffer unter Schütteln equilibriert. Die Gele wurden dann nach abgießen des Puffers bei –80 °C gelagert.

Equilibrierungspuffer:

- SOL C 62,5ml (siehe 2.2.4.4)
- 10% SDS 50ml
- Mercaptoethanol 12,5ml (Endkonzentration 2,5%)
- Glycerin 25ml
- ddH<sub>2</sub>O 100ml

Ergibt eine Menge von 250ml.

#### 2.2.4.4 2. Dimension der 2D-Gelelektrophorese

Bei der 2. Dimension wurden die Proteine nun nach ihrer Beweglichkeit, welche in der Regel im SDS-Gel durch das Molekulargewicht bestimmt wird getrennt. Dies geschah indem das Gel der 1. Dimension auf ein SDS-Acrylamidgel aufgebracht wurde.

Zuvor wurden die Glasplatten für die Gele sehr gut mit Wasser, Spülmittel und ddH<sub>2</sub>O gewaschen und im Trockenschrank aufbewahrt. Die Gelplatten wurden daraufhin zusammengeklebt und für eine Stunde im Trockenschrank bei 60°C gelagert, damit das Klebeband noch etwas schrumpfen konnte, und die Platten wirklich dicht waren.

Nach dieser Zeit wurden die Platten in Haltevorrichtungen gespannt und auf den Boden das Sockelgel gegeben. Durch die Kapillarkräfte wurde das Gel zwischen die Glasplatten gezogen und polymerisierte nach circa 45 Minuten aus.

Der nächste Schritt war das Gießen des Trenngels, welches die Proteine auftrennen sollte. Dazu wurde vorsichtig das Gel von oben zwischen die Gelplatten gegossen, mit Isopropanol überschichtet, und für eine Stunde polymerisiert.

Das Sammelgel, das die Proteine vor Eintritt in das Trenngel fokussiert, goss man zum Schluss in die Gelplatten, überschichtete wieder mit Isopropanol, und ließ es diesmal 45 Minuten polymerisieren.



Sockelgel und Trenngel:

Für 8 Gel, d.h. 330ml mischte man,

- Sol A 165ml
- 10% SDS 3,3ml
- Sol B 82,5ml
- ddH<sub>2</sub>O 77,6ml

Die Lösung wurde gut entgast, man nahm 70ml für das Sockelgel, gab 42µl TEMED und 1050µl APS dazu, und 260ml für das Trenngel, wo man 52µl TEMED und 1300µl APS zugab.

Sammelgel:

- Sol D 25ml
- 10% SDS 0,5ml
- Sol C 25ml
- TEMED 30µl
- APS 600µl

Dies ergab 50 ml, für 8 Gele.

Nachdem die Gele polymerisiert waren wurden die Gele der 1. Dimension aufgetaut und auf das Sammelgel gelegt. Mit Hilfe eines Agarose-Puffers wurden sie mit dem Sammelgel verklebt, wobei man darauf achten musste, dass sich keine Luftblasen mit einschlossen. Das im Puffer enthaltene Bromphenolblau diente als Lauffront, und damit als Indikator für den Fortschritt der Elektrophorese.

Die Gelplatten wurden nun in die Gelkammer eingesetzt, und diese mit Laufpuffer gefüllt. Der Richtwert für die Laufzeit betrug dabei 17mA pro Gel über einen Zeitraum von 16 Stunden.

Lauf-Puffer (4 Liter):

- Glycin 115gr.
- Tris-Base 24,24gr.
- 10% SDS 40ml
- ddH<sub>2</sub>O 4000ml

Einstellung des Puffers auf pH 8,6.

Agarose-Puffer (25ml):

- SolC 6,25ml
- SDS 10% 250µl
- Mercaptoethanol 1,25ml
- Glycerin 2,5ml
- Agarose 0,25gr.
- ddH<sub>2</sub>O 14,5ml
- Spatelspitze Bromphenolblau

Sol A (500ml):

- Acrylamid 150gr.
- Bis-Acrylamid 0,75gr.
- ddH<sub>2</sub>O auffüllen bis 500ml

Rühren und filtrieren, maximal 2 Wochen bei 4 °C haltbar

Sol B (500ml):

- Tris-Base 1,5M 416,8gr.
- Tris-HCL 107,1gr.
- ddH<sub>2</sub>O 500ml

Auf pH 8,8 titrieren

Sol C (500ml):

- 80ml einer Tris-Base-Lösung werden auf pH 6,8 titriert und mit ddH<sub>2</sub>O auf 500ml aufgefüllt.

Sol D (100ml):

- Acrylamid                      10gr.
- Bis-Acrylamid                0,5gr.
- ddH<sub>2</sub>O                         100m

## 2.2.4.5 Flouographie und Entwicklung

Nachdem die Proteine für 16 Stunden im Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, löste man sie von den Glasplatten und gab sie für 15 Minuten in ein Fixierbad aus 45% Ethanol und 7,5% Essigsäure.

In drei weiteren Schritten wurden die Gele dann entwässert und mit PPO angereichert. Zuerst gab man sie dazu für 45 Minuten in eine DMSO-Lösung, dann für 45 Minuten in eine weitere DMSO-Lösung und zum Schluss 120 Minuten in eine DMSO-Lösung, welche mit 20% PPO versetzt war. Durch die verschiedenen Waschschrirte stellte man sicher, dass am Schluss so wenig Wasser wie möglich in den Gelen vorhanden war.

Nach dieser Phase wurden die Gele wieder für 15 Minuten gewässert und anschließend auf Whatman 3mm Filterpapier aufgezogen. Über die Gele wurde Klarsichtfolie gelegt und diese dann circa 8 Stunden so lange bei 80°C getrocknet, bis sie pergamentdünn waren. Daraufhin wurden die Gele auf einen Röntgenfilm gelegt und für fünf Tage bei -80°C belichtet. Nach diesen fünf Tagen Exposition wurde der Film entwickelt und man erhielt folgendes Bild (siehe Abb. 2-2).

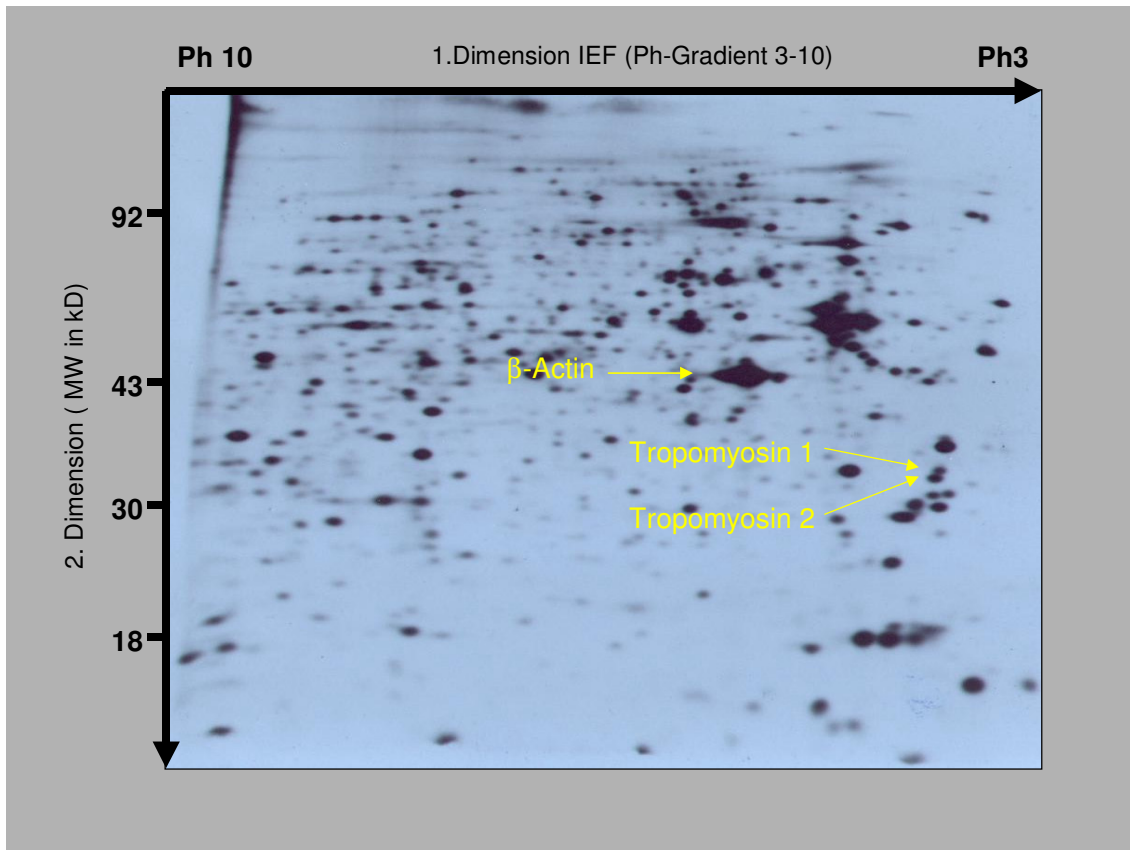


Abbildung 2-2: Bild der 2D- Gelelektrophorese nach fünf Tagen Exposition.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Färbung der SA- $\beta$ Galaktosidase

Die Auswertung der  $\beta$ -Galaktosidasefärbung erfolgte durch Zählung der  $\beta$ -galpositiven und  $\beta$ -galnegativen Zellen (siehe Abbildung 3-1) in je 10 Blickfeldern des Mikroskops, um pro Patient ca. 400 Zellen ausgezählt zu haben. Diese Prozedur wurde von drei Personen durchgeführt, die kurz nacheinander die Proben zur Zählung erhielten.

Die Zellen waren alle in frühen Passagen und nach der Aussaat alle die selbe Zeit inkubiert, um gleiche Untersuchungsbedingungen zu schaffen.

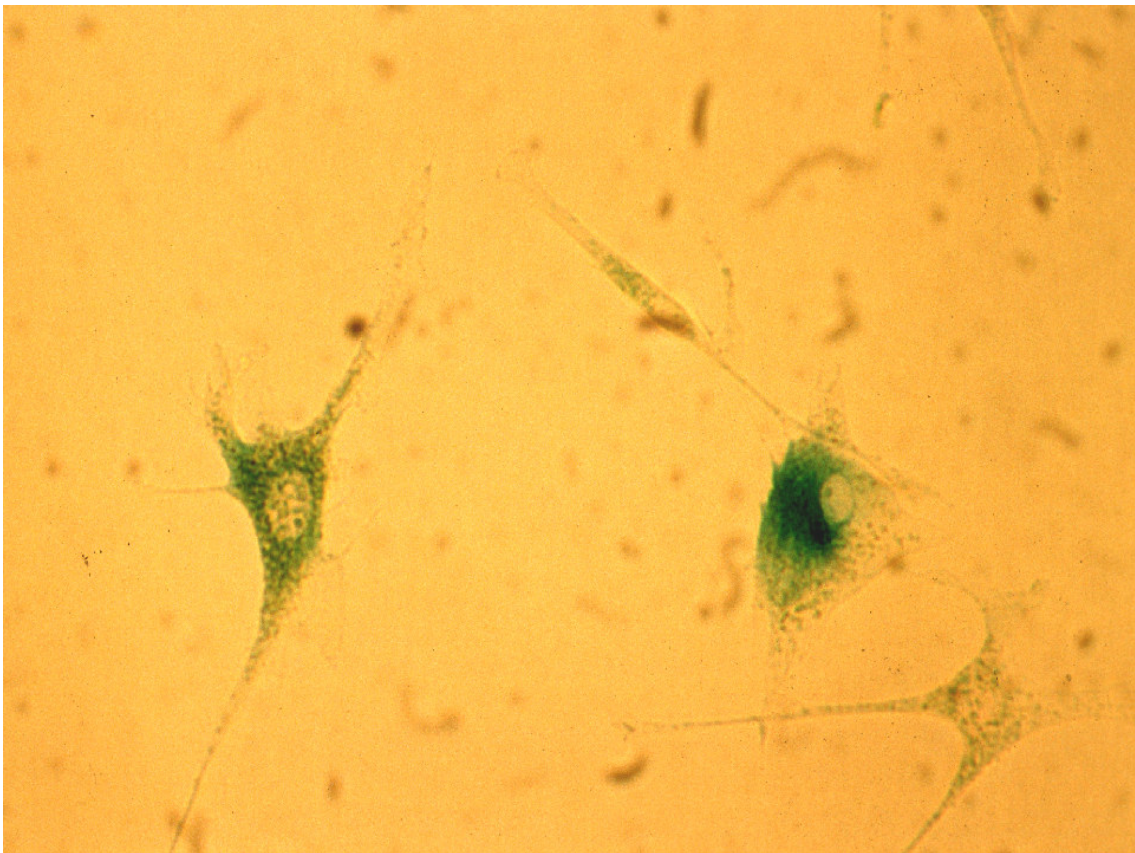


Abbildung 3-1:  $\beta$ -galpositive Fibroblasten nach der Färbung.

Es wurden vier Rheumapatienten, zwei Osteoarthritispatienten und zwei gesunde Kontrollen ausbezählt. Ihr Durchschnittsalter betrug 61,6 Jahre, 67,5 Jahre und 37,5 Jahre.

Nach der Auszählung wurde aus den Ergebnissen der Mittelwert mit der Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgenden Tabellen dargestellt.

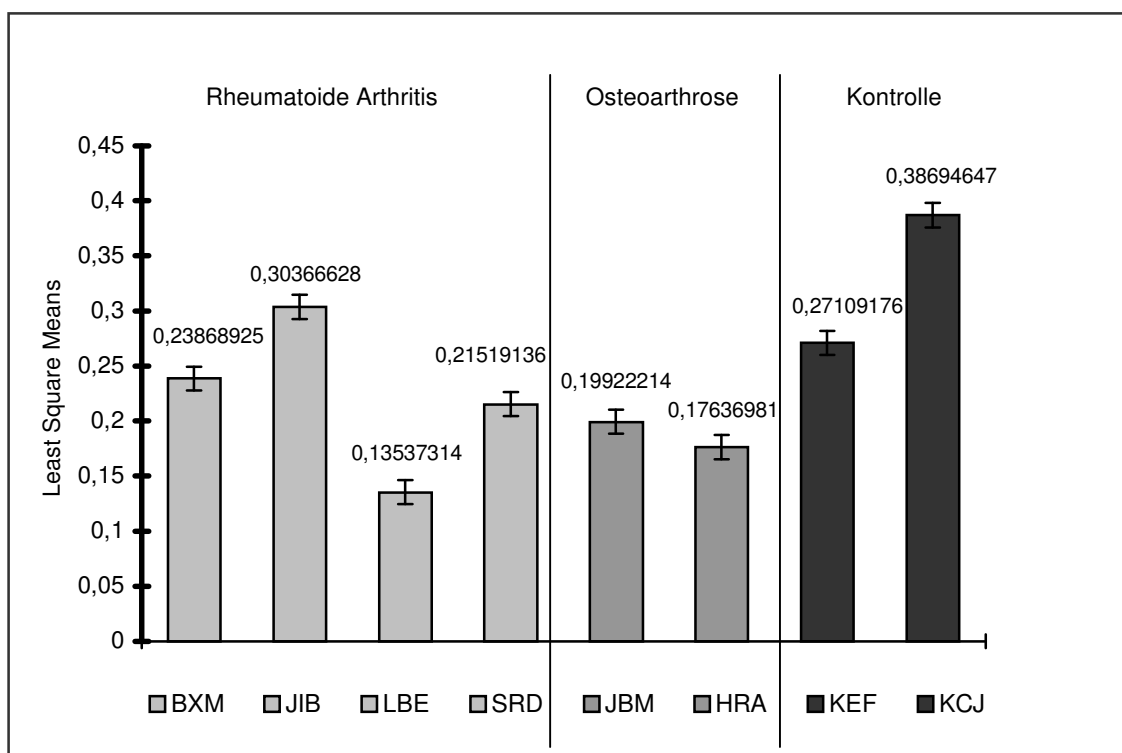


Abbildung 3-2: Färbung der SA-β-Galaktosidase; Ergebnisse der einzelnen Patienten.

Patient	Least sqr. Means	Stand.abw.	Diagn.	Alter	Geschl.
<b>BXM</b>	0.23868925	0.01104536	RA	61	W
<b>JIB</b>	0.30366628	0.01104536	RA	59	W
<b>LBE</b>	0.13537314	0.01104536	RA	66	W
<b>SRD</b>	0.21519136	0.01104536	RA	63	W
<b>JBM</b>	0.19922214	0.01108398	OA	69	W
<b>HRA</b>	0.17636981	0.01108398	OA	68	M
<b>KCJ</b>	0.27109176	0.01108398	Kontrolle	41	W
<b>KEF</b>	0.38694647	0.01108398	Kontrolle	38	M

Tabelle3-1: Daten der einzelnen Patienten, einschließlich Standardabweichung (RA= Rheumatoide Arthritis, OA= Osteoarthritis).

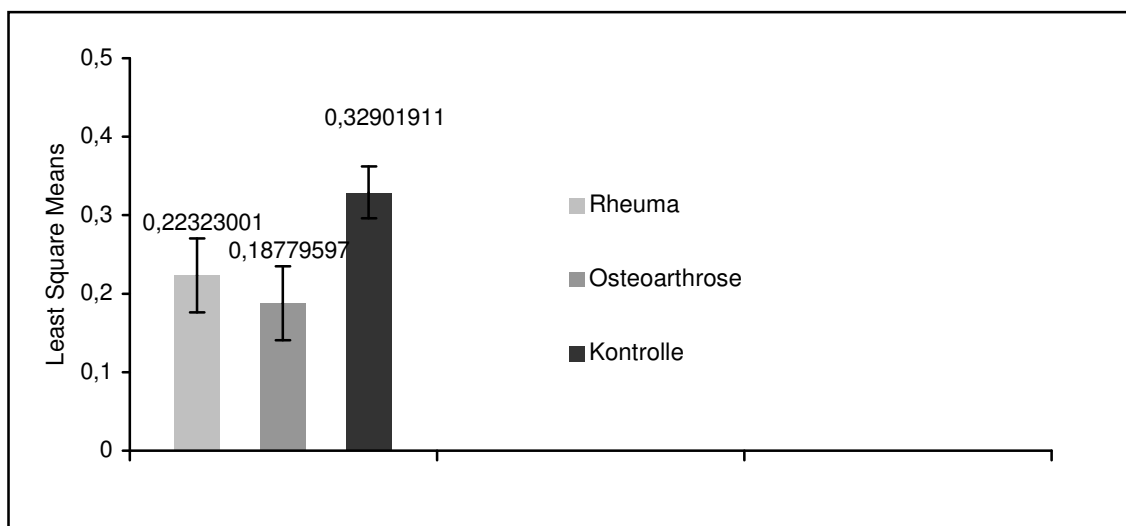


Abbildung 3-3: Färbung der SA- $\beta$ -Galaktosidase; Ergebnisse der drei Vergleichsgruppen.

Gruppe	Least sqr. Means	Stand.abw.	Lower95%	Upper95%	Ø Alter
Rheuma	0,22323	0,033685	0,136641	0,309819	62,25
Osteoarthrose	0,187796	0,047637	0,06534	0,310252	68,5
Kontrollen	0,329019	0,047637	0,206563	0,451475	39,5

Tabelle 3-2: Werte der einzelnen Patientengruppen, einschließlich Standardabweichung und Durchschnittsalter.

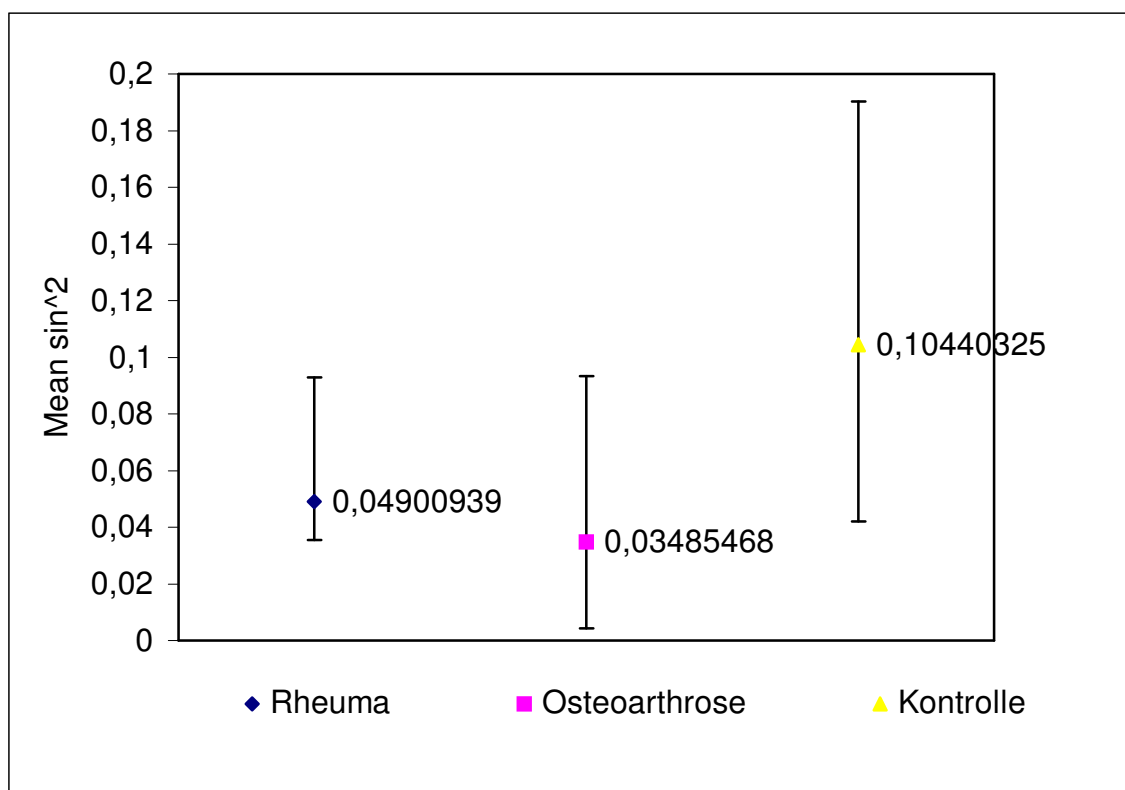


Abbildung 3-4: Graphische Darstellung der Werte der einzelnen Patientengruppe mit oberer und unterer 95% Perzentile, nach Rückrechnung der ArcSin<sup>2</sup> Funktion.



Gruppe	Sin <sup>2</sup> Lower	Sin <sup>2</sup> Upper	Sin <sup>2</sup> Mean
Rheuma	0,01855474	0,09295588	0,04900939
Osteoarthrose	0,00426325	0,09320718	0,03485468
Kontrolle	0,04206493	0,1903518	0,10440325

*Tabelle 3-3: Werte der einzelnen Patientengruppen nach Rückrechnung der SinArc<sup>^</sup> Funktion, einschließlich unterer und oberer 95% Perzentile.*

Es ergab sich in der Auszählung in allen Gruppen ein anteilmäßiges Auftreten von  $\beta$ -galpositiven Zellen unter 10%. Eine Ausnahme bildet der Kontrollpatient KEF, welcher mit 13,2% knapp über 10% lag.

Aus Abbildung 3-2 kann man entnehmen, dass die Verteilung der ArcSin<sup>^</sup> transformierten Werte für die Rheumatiker zwischen 0,24 und 0,3 lagen, bei den Osteoarthrosepatienten zwischen 0,19 und 0,17 und bei den Kontrollen zwischen 0,27 und 0,38.

In Abbildung 3-3 sind die einzelnen Gruppen dargestellt, wobei sich hier für die Rheumapatienten ein ArcSin<sup>^</sup> transformierter Wert von 0,22, bei den OA-Patienten von 0,17 und bei den Kontrollen von 0,32 ergab. Abbildung 3-4 zeigt die Werte nach Rückrechnung der ArcSin<sup>^</sup> Funktion, bei der sich Werte von 0,49 für Rheumapatienten, 0,35 für OA-Patienten und 1,0 für die Kontrollen ergaben.

Bei den zuletzt genannten Werten überschritten sich die 95% Perzentilen der Gruppen.

Es ist festzustellen, dass bei der jüngeren Kontrollgruppe der Anteil an terminal differenzierten Fibroblasten fast doppelt so hoch war wie bei der Gruppe der Rheumapatienten. Der Anteil der Osteoarthrosepatienten war mit 3,45 % am niedrigsten von den drei Gruppen.

Bei der Berechnung des P-Wertes ergab sich ein Wert von  $P > 0,1795$ .

## 3.2 RT-PCR

Die RT-PCR wurde für kodierende Transkripte der als Marker für replikative Seneszenz diskutierten Gene p16ink4a und p21cip durchgeführt. Die Länge der amplifizierten Transkripte für p16ink4a ist 329 bp und für p21cip 896 bp.

Die PCR wurde unter höchstmöglichen Reinheitskriterien durchgeführt, um Verunreinigungen zu vermeiden. In vorherigen PCR-durchläufen wurde die für die Primer günstigste Annealingtemperatur ermittelt.

Das Patientenkollektiv erstreckte sich wie bei der Färbung über vier Rheumapatienten, zwei Osteoarthrosepatienten und zwei gesunde Kontrollen.

### 3.2.1 P16ink4a

Das Bild der PCR ergab zwei stärkere Banden im Bereich der Patienten mit Osteoarthrose, und eine schwache Bande im Bereich des Rheumapatienten JIB. Die anderen Proben zeigten keine Amplifikation des gewünschten Transkriptes. Die als Kontrolle dienende GAPDH-PCR ergab in drei Fällen eine schwächere Bande, was auf eine geringere Menge an cDNA schließen lässt. Diese Tatsache ist bei der Beurteilung der p16ink4a-Transkripte zu beachten.

Als Ergebnis ist zu vermerken, dass es bei den Rheumapatienten zu keiner, oder zu nur sehr geringem Nachweis des gesuchten Amplifikates kam, und im Vergleich dazu die Proben der Osteoarthrosegruppe eine weit aus stärkere Bande in der PCR lieferten. Bei der gesunden Kontrollgruppe gab es keine Amplifikation des p16ink4a-Transkriptes, oder zumindest keine die für eine Darstellung ausreichend war.

Die Rheumagruppe zeigte keine stärkere Amplifikation des p16ink4a-Gens im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, und im Vergleich zum Osteoarthrosekollektiv sogar eine schwächere. Es ist demnach auszuschließen, dass dieses mit terminaler Differenzierung assoziierte Gen vermehrt bei der Gruppe der vier Rheumapatienten exprimiert wird.

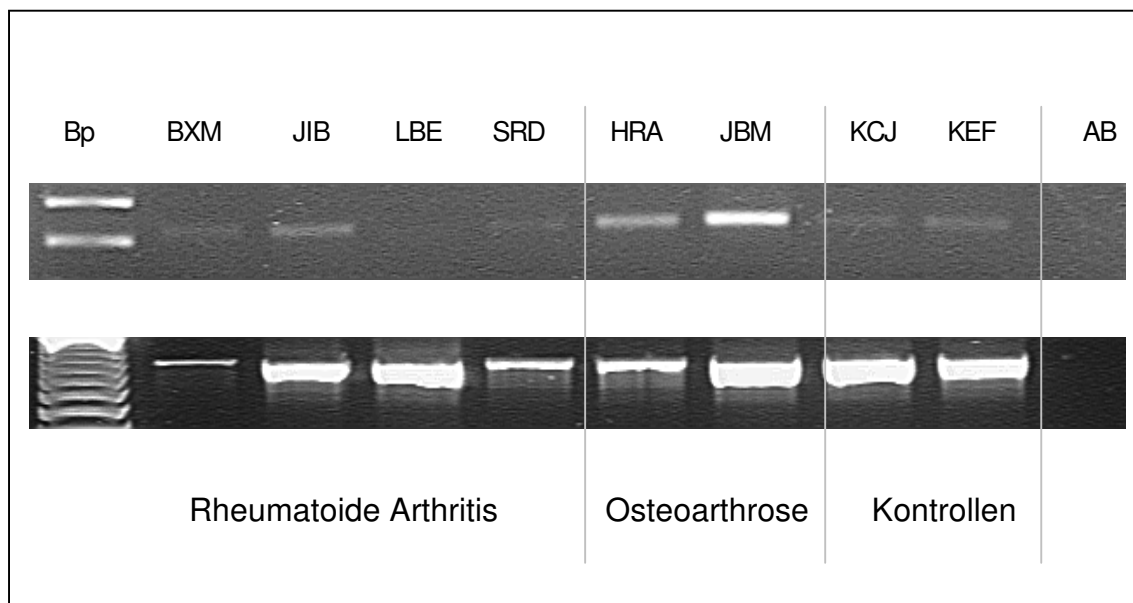


Abbildung 3-5: p16ink4a-PCR (oben) 329 bp, GAPDH-PCR (unten) 983 bp, AB = Aqua Bidest.

### 3.2.2 P21cip

Bei der Analyse konnte eine Bande im Bereich des gewünschten Genabschnitts (896bp) gefunden werden. Das Transkript wurde bei alle Proben amplifiziert, im Gegensatz zur Analyse des p16ink4a-Amplifikates konnte hier eine starke Bande dargestellt werden. Auch hier wurde in der gleichen PCR das Houskeeping-Gen GAPDH amplifiziert, um die einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können. Hierbei ergibt sich eine schwache Menge an GAPDH bei dem Patienten BXM, sowie ein geringere Menge bei den Patienten SRD und HRA. So ist die schwache Bande des Patienten BXM in der p21cip-PCR wohl eher auf die geringe Menge an cDNA zurückzuführen. Die beiden anderen Patienten SRD und HRA könnten demnach eine noch stärkere Bande zeigen, wenn die Menge ihrer cDNA der Menge der anderen Patienten entsprochen hätte.

Trotz alledem ist in allen Patientengruppen eine starke Amplifizierung des Genabschnittes festzustellen, sowohl die Rheumapatienten, als auch die gesunden Kontrollen zeigen eine fast gleichstarke Bandendarstellung. Ein vermehrtes Auftreten des p21cip-Genes ist bei Rheumapatienten nicht nachweisbar.

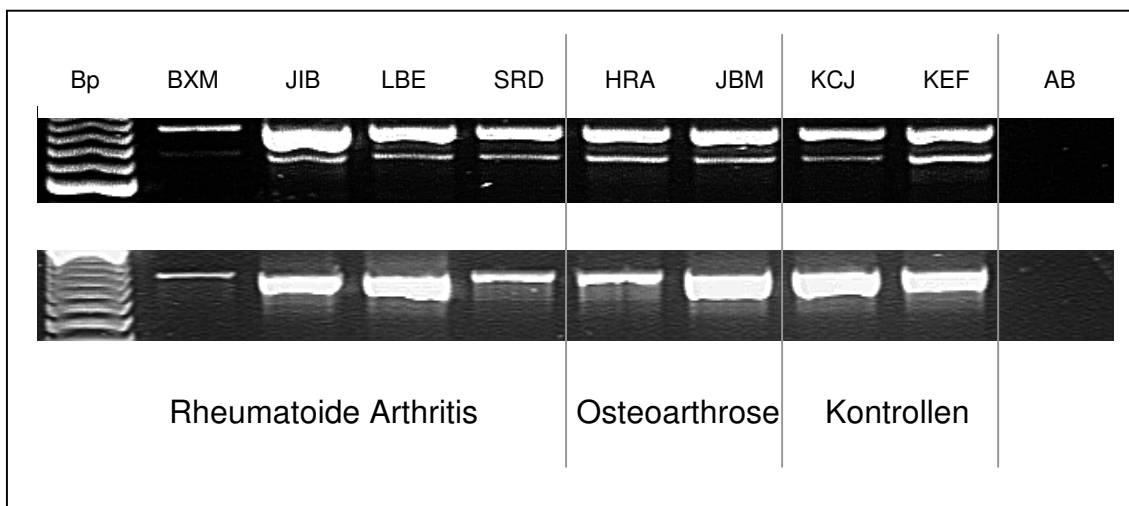


Abbildung 3-6: p21cip-PCR (oben) 896 bp und GAPDH-PCR (unten) 983 bp, AB = Aqua Bidest.

### 3.3 2D-Gelelektrophorese mit S<sup>35</sup>-Methionin

Die Gelelektrophorese wurde für die Zellen der Probanden KCJ, BXM, JIB und LBE durchgeführt. In ausführlichen Vorversuchen wurden insgesamt vier Gele pro Proband gefahren. Die Gele für die Auswertung der vier Patienten waren aber auch nach diesen Vorversuchen nicht optimal auszuwerten, da der zu untersuchende Bereich um das Protein PIVa sehr unscharf war und von anderen Protein überlagert wurde. Als Kontrolle für die Signalstärke diente das Actin, welches in jeder Zelle vorhanden ist und somit einen Vergleich der verschiedenen Proben zuließ.

Trotzdem konnte für diesen Bereich kein wesentlicher Unterschied in der Expression dieses Proteins festgestellt werden. Die Signalstärke war bei allen Proben etwa gleich stark, soweit es die Abgrenzung zu den anderen Proteinen zuließ. Abbildung 3-7 zeigt die Ergebnisse der Proteintrennung

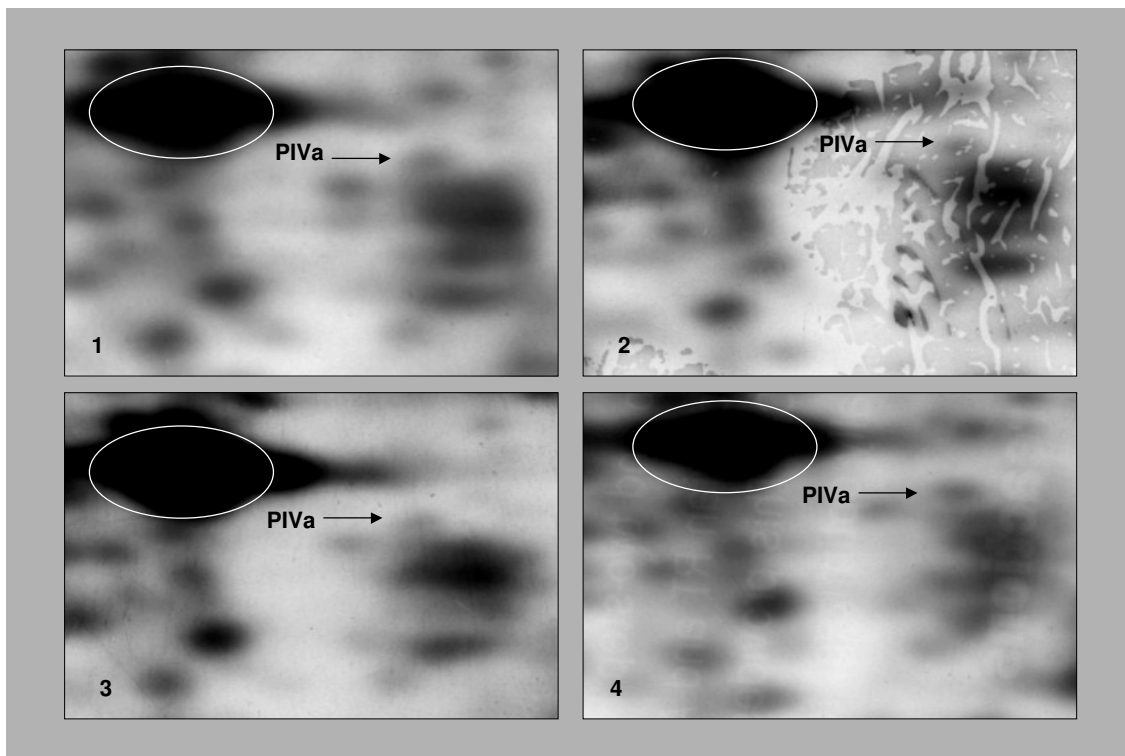


Abbildung 3-7: Expression des Proteins PIVa (Pfeil) bei drei Rheumapatienten (1, 2, 3) und einem gesunden Probanden (4). 1, BXM ; 2, JIB; 3, LBE; 4, KCJ. Als Referenz diente  $\beta$ -Actin (Kreis).

Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch im Bereich des Tropomyosins 1 und 2 festgestellt werden. Hier konnte ein sehr viel höhere Menge des Proteins in der Flourografie des Probanden KCJ (gesund) beobachtet werden. Im Vergleich mit den anderen Proben konnte hier zwar auch eine erhöhte Beladung des Actins festgestellt werden, jedoch war die Signalstärke des Tropomyosins bei KCJ noch im einiges höher (siehe Abb. 3-8).

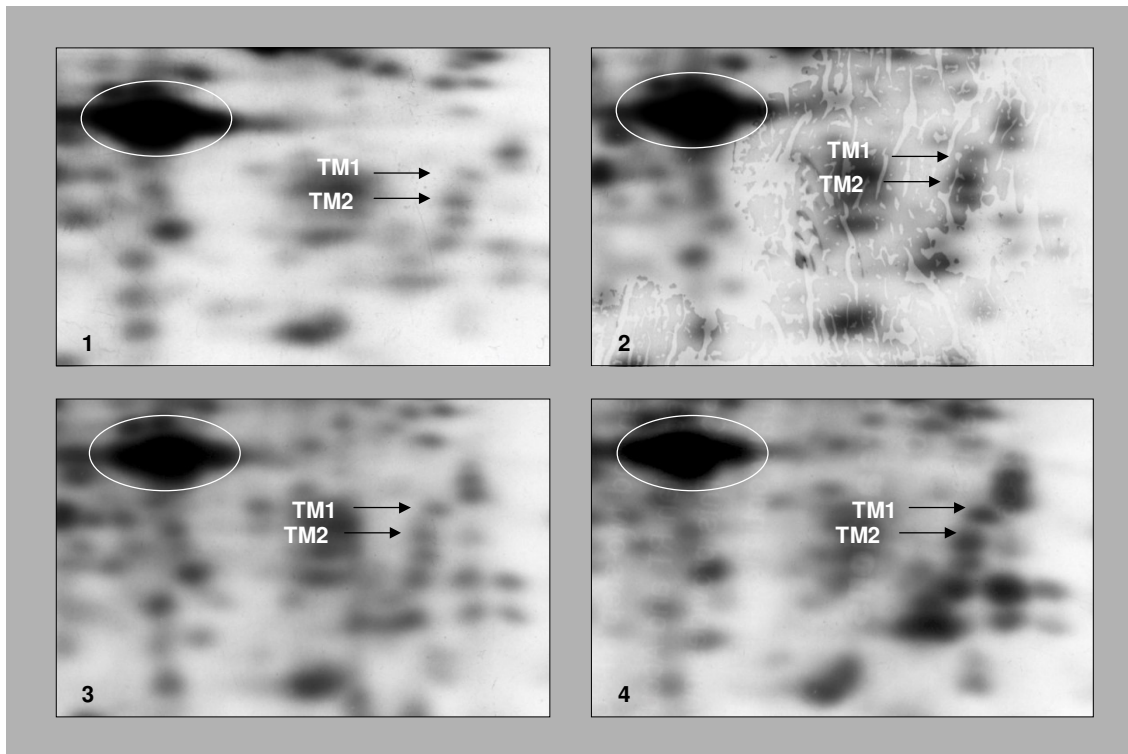


Abbildung 3-8: Expression der Proteine Tropomyosin 1 und Tropomyosin 2 (TM1 und TM2) bei drei Rheumapatienten (1, 2, 3) und einem gesunden Probanden (4). 1, BXM; 2, JIB; 3, LBE; 4, KCJ. Als Referenz diente  $\beta$ -Actin (Kreis).

## 4 Diskussion

### 4.1 Färbung der SA- $\beta$ Galaktosidase in synovialen Fibroblasten

Am Anfang dieser Arbeit stand die Frage, ob es in der Synovia von Rheumapatienten vermehrt terminal differenzierte Fibroblasten gibt. Ein P-Wert von  $P > 0,1795$  deutet darauf hin, dass es keinen Gruppenunterschied gibt, allerdings ist die Aussagekraft durch die Anzahl der Patienten eingeschränkt. Bei dem verwendeten Stichprobenumfang ist ein Gruppenunterschied nicht zu finden. Die Färbung der  $\beta$ -Galaktosidase an Primärkulturen synovialer Fibroblasten ergab, dass die Anzahl der  $\beta$ -gal-positiven Zellen, welche mit terminaler Differenzierung assoziiert werden, in allen drei Vergleichsgruppen unter 15% lagen. Bei den Rheumapatienten konnten im Vergleich zu den gesunden Probanden sogar weniger positivgefärbte Zellen gefunden werden. Schon angesichts des Altersunterschieds der beiden Gruppen von 30 Jahren, hätte man eher ein vermehrtes auftreten von terminal differenzierten Zellen bei den Rheumapatienten erwartet. Die Zellen der Osteoarthrosepatienten zeigten hier die geringste Anzahl an gefärbten Zellen.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Alter der Probanden sein, die Synovialzellen der jungen Probanden zeigte in der Kultivierung ein sehr schnelles Wachstum, das heißt auch einen schnellen Umsatz an Zellen. Nimmt man nun all diese Zellen, ist die Möglichkeit sehr hoch, dass in diesem Kollektiv ein nicht zu geringer Anteil den postmitotischen Zellen angehört.

Die Zellen der Rheumapatienten und Osteoarthrosepatienten hingegen waren in ihrem Wachstumsverhalten sehr langsam, das heißt nicht mehr so schnell teilungsfähig, wie die Zellen des gesunden Kollektivs. Dies könnte auf die Verkürzung der Telomeren zurückzuführen sein, wie sie bei Zellen vorkommt, die viele Teilungszyklen vollzogen haben [4]. Da in dieser Arbeit vergleichbare Anzahlen von Zellen untersucht wurden ist es wahrscheinlich, dass es im Kollektiv der RA- und OA-Patienten, welche ca. 15-20 Jahre älter waren, als die

gesunden Kontrollen, zu weniger Zellteilungen kam, als beim Kontrollkollektiv. Nun könnte man schließen, dass dadurch auch die relative Menge an postmitotischen Zellen geringer ist, als bei den vitaleren, teilungsfreudigeren Zellen der Gesunden.

## 4.2 RT-PCR

Es wurden zwei Gene, welche mit terminaler Differenzierung in Verbindung gebracht werden, untersucht. Dies waren die Gene der cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren P16<sup>ink4a</sup> und p21<sup>cip</sup> [26, 45]. Diese Gene wurden bei Chondrozyten, Osteoblasten, Keratinozyten und Fibroblasten als Zeichen der terminalen Differenzierung gefunden [36, 44, 32].

Der Nachweis dieser Marker für replikative Seneszenz wurde unter standardisierten Bedingungen erbracht, das heißt, es wurde immer die gleiche Menge an cDNA eingesetzt und als Kontrolle der Vergleich mit dem „Housekeeping“-Gen GAPDH durchgeführt.

Die PCR des P16<sup>ink4a</sup>-Gens ergab eine verstärkte Amplifizierung bei den Osteoarthrosepatienten. Hingegen zeigten die Rheumapatienten keine erhöhte Menge an Transkript im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Ein möglicher Grund für das vermehrte Auftreten dieses Gens bei Osteoarthrose könnte das im Schnitt 10 Jahre höhere Alter der Patienten darstellen. Yudoh et al. zeigten in ihren Versuchen, dass das Auftreten von seneszenten Osteoblasten stark mit dem Alter der Erkrankten korreliert [70]. Es könnte aber auch daran liegen, dass die sehr lange Kultivierungsdauer zu einer terminalen Differenzierung der Fibroblasten geführt hat. Die Zellen der Osteoarthrosepatienten waren nicht mehr sehr teilungsfreudig und könnten so vermehrt in die postmitotische Phase übergegangen sein. Kirsch et al. berichten über vermehrte terminale Differenzierung von Chondrozyten bei Osteoarthrose [32]. Vielleicht gibt es auch vermehrt terminal differenzierte Fibroblasten in der Synovia von Osteoarthrosepatienten.

Ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen bei Rheuma konnte jedoch in Hinblick auf P16<sup>ink4a</sup> nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den



Untersuchungen von Tamaguchi et al. überein, die P16ink4a erst nach der Wachstumshemmung der Fibroblasten nachweisen konnten [59]. Es konnte auch im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Gentherapie mit P16ink4a eine signifikante Besserung der Hyperproliferation der Synovia hervorruft. Dies zeigt die wichtige Rolle der cyklinabhängigen Kinasehemmer bei der Regulierung der Proliferation in synovialen Gewebe. Es ist wahrscheinlich, dass das Fehlen dieser proliferationsregulierenden Faktoren ein weiterer Grund für die Hyperproliferation der Synovia bei Rheuma sein könnte [59]. Dabei spielt die Hyperproliferation wohl eher eine geringere Rolle bei der Hyperplasie der Synovia. Diese ist eher durch eine verringerte Apoptose der Fibroblasten maßgeblich verursacht [4,20].

Die PCR des p21cip-Gens erbrachte hingegen ein anderes Bild. Hier war die Expression des Gens bei allen drei Vergleichsgruppen gleich. Dies lässt den Schluss zu, dass, zumindest in Bezug auf p21cip keine erhöhte Anzahl von terminal differenzierten Fibroblasten bei Rheumapatienten zu finden ist.

### **4.3 2D-Gelelektrophorese von zellulären S<sup>35</sup>-Methionin-Polypeptiden**

Die 2D-Gelelektrophorese der Proteine ergab keinen Unterschied bei RA-Patienten und Kontrollen in der Expression des mit terminaler Differenzierung assoziierten Proteins PIVa [46]. Zwar konnte keine exakte quantifizierte Aussage getroffen werden, aber die verglichenen Proteinmuster zeigten zumindest keinen signifikanten Unterschied in der Expressionsstärke des oben genannten Proteins.

Jedoch konnte eine signifikant höhere Expression des Tropomyosins 1 und 2 bei dem gesunden Probanden KCJ festgestellt werden. Trotz einer stärkeren Darstellung des als Markerprotein dienenden  $\beta$ -Actins, konnte hier eine fast fünfmal stärkere Expression festgestellt werden. Angesichts der kleinen Fallzahl von nur einem Gesunden und drei Rheumapatienten ist es schwierig eine Aussage zu machen, inwiefern dieser eine Proband repräsentativ für alle Gesunden ist. Fest steht, dass bei KCJ eine starke Expression des

Tropomyosins 1 und 2 gefunden werden kann. Dieses Strukturprotein wird in der Literatur mit Postmitose und Differenzierung in Verbindung gebracht. So beschreibt Olsen et al eine starke Erhöhung der Tropomyosinexpression bei seneszenten Keratinozyten [42]. Bei Rhabdomyosarkomzellen, die durch Actomycin D oder mit Hilfe von Elektroporation zur Differenzierung gebracht wurden, zeigten ein verstärktes Vorkommen von Tropomyosin [7,43,38]. Des Weiteren konnte bei entdifferenzierten menschlichen Tumorzellen ein erhöhtes Auftreten von Tropomyosin 1 und 2 gefunden werden, nachdem diese mittels all-trans Retinsäure zu einer Rückdifferenzierung in Richtung postmitotischer Zelle gebracht wurden [51].

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass das vermehrte Vorkommen von Tropomyosin 1 und 2 bei dem Probanden KCJ eventuell auf einen höheren Anteil von postmitotischen Fibroblasten zurückzuführen ist. Zumindest stützen die Ergebnisse der  $\beta$ -Gal-Färbung, bei der ein tendenziell höherer Anteil von postmitotischen Zellen bei den gesunden Probanden festgestellt werden konnte, diese Annahme.

#### **4.4 Conclusio**

Am Anfang dieser Arbeit stand die Frage, ob es vermehrt terminal differenzierte Fibroblasten in der Synovia von Rheumapatienten gibt. Hierfür gab es einige Hinweise, die in Kapitel 1.2 beschrieben sind. Nach umfassenden Untersuchungen mittels Substratfärbung, PCR und Radioisotopenmarkierung von synovialen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass es in der Synovia von Rheumatikern kein vermehrtes Vorkommen von postmitotischen Fibroblasten gibt. Mit Hilfe der Substratfärbung konnte gezeigt werden, dass es bei RA-Patienten eher weniger postmitotische Zellen als bei den gesunden Kontrollen gibt. Dies konnte auch durch die Radioisotopenmarkierung gezeigt werden, bei welcher eine sehr viel stärkere Expression des Tropomyosins 1 und 2 beobachtet werden konnte. Der Nachweis von Markergenen für terminale Differenzierung, wie z.B. p16<sup>ink4a</sup> und p21<sup>cip</sup> zeigte kein vermehrtes Vorkommen von terminal differenzierten Fibroblasten. Hieraus lässt sich

schließen, dass es in der Synovia von RA-Patienten nicht vermehrt terminal differenzierte Fibroblasten gibt.

Die Ergebnisse der Radioisotopenmarkierung können dabei nur als Anhaltspunkt gesehen werden, da das Kollektiv nur vier Probanden enthielt, und nur einer davon zur gesunden Kontrollgruppe gehörte. Dieser eine Proband hingegen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Expression des Tropomyosins 1 und 2. Eine allgemeingültige Aussage kann hier nur durch eine weiterführende Untersuchung mit größerem Kollektiv getroffen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass mit ziemlicher Sicherheit gezeigt wurde, dass es keine vermehrten terminal differenzierten Fibroblasten in der Synovia von RA-Patienten gibt. Eine entgültige Aussage lässt sich aber nur anhand weiterführender, umfangreicherer Studien treffen.



## 5 Zusammenfassung

Die Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis ist noch weitgehend ungelöst. Zwar gibt es viele Ansatzpunkte und Hypothesen, diese können die Pathogenese dieser Systemerkrankung mit autoimmuner Prägung aber nur teilweise erklären.

Einen großen Anteil an der Pathologie der RA hat die überschießende Proliferation des synovialen Gewebes in den Gelenken. Anlass für diese Arbeit war die Beobachtung, dass die Produktion des Zytokins IL-16 und der Metalloproteinase MMP3 in Geweben mit hoher Anzahl von postmitotischen Zellen stark ansteigt. Es ist bekannt, dass bei der Rheumatoiden Arthritis die Produktion sowohl von IL-16, als auch von MMP3 hochreguliert ist [21]. Dies legte die Vermutung nahe, dass es in der Synovia von Rheumapatienten ein verstärktes Auftreten von postmitotischen Fibroblasten gibt, die noch zusätzlich zur unkontrollierten Proliferation der Synovia beitragen.

Um diese Annahme zu untersuchen wurde synoviales Gewebe von vier Rheumapatienten, zwei Osteoarthrosepatienten und zwei gesunden Kontrollpatienten mit Hilfe von Substratfärbung, PCR und Radioisotopenmarkierung analysiert.

Die Färbung beruhte auf dem Nachweis der SA- $\beta$ -Galaktosidase bei pH 5,5, welche spezifisch für postmitotische Zellen ist. Mit Hilfe der PCR wurden die zwei, mit Seneszenz assoziierten zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren p16INK4a und p21cip, untersucht. Dabei wurden selbstdesignte Primer verwendet, um die so amplifizierten Transkripte der drei Gruppen zu vergleichen. Bei der dritten Methode wurden Muster von radioaktiv markierten ( $S^{35}$ -Methionin) und elektrophoretisch getrennten Proteinen untersucht. Hierbei wurden Unterschiede in der Expression des mit terminaler Differenzierung in Verbindung gebrachten Proteins PIVa gesucht.

Die Ergebnisse der drei Untersuchungen zeigten alle keinen Hinweis für ein vermehrtes Auftreten von terminal differenzierten Fibroblasten bei

Rheumapatienten. Die Färbung ergab, dass 5% der Zellen der Rheumapatienten, 10% der Zellen der Kontrollen und nur 3,45% der Zellen der Osteoarthrosepatienten  $\beta$ -gal-positiv waren. Ein P-Wert von  $P > 0,1795$  deutet darauf hin, dass es keinen Gruppenunterschied gibt, wobei die Aussagekraft durch die Fallzahl eingeschränkt ist. Auch bei der PCR konnte kein vermehrtes Vorkommen der Markergene für terminale Differenzierung p16ink4a und p21cip beobachtet werden. Die Auswertung der Radioisotopenmarkierung mit  $S^{35}$ -Methionin ergab keinen Unterschied in der Expression des mit replikativer Seneszenz in Verbindung gebrachten Proteins PIVa. Der einzige Unterschied bestand in der sehr viel stärkeren Expression des Tropomyosins 1 und 2 bei dem gesunden Probanden, welches vier bis fünfmal so stark exprimiert wurde. Das Tropomyosin wird in der Literatur mit Differenzierung und Postmitose in Verbindung gebracht, so beschreibt Olsen et al. eine vermehrte Expression von Tropomyosin bei postmitotischen Keratinozyten [66], von anderen Autoren wird eine Verbindung zwischen differenzierten Rhabdomyosarkomzellen und Tropomyosin gezeigt [7,38,43].

Es konnte gezeigt werden, dass es in der Synovia von Rheumapatienten nicht vermehrt terminal differenzierte Zellen gibt, im Gegenteil konnte gezeigt werden, dass tendenziell eher in der Synovia der gesunden Kontrollen ein vermehrtes Auftreten von terminal differenzierten Zellen zu finden ist. Dies könnte, unter der Voraussetzung, dass vergleichbare Anzahl von Zellteilungen in vitro, bzw. vergleichbare Kultivierungszeiten, bei RA, OA und Kontrollen vor dem Experiment vorlagen, an der höheren Proliferationsrate und dem größeren Zellumsatz liegen, der in vitalem, jungem Gewebe vorkommt. Jedoch steht der Beweis noch aus, da die Fallzahl der Untersuchung zu gering ist um eine endgültige Aussage treffen zu können. Hierfür bedarf es weiterführender Untersuchungen mit größeren Fallzahlen.

## 6 Literaturliste

Die Folgenden Referenzen wurden zur Erstellung dieser Arbeit verwendet:

1. **Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J** (1986): Occurance of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 13; 899-902.
2. **Aho K, Palosuo T, Raunio V, Puska P, Aromaa A, Salonen JT** (1985): When does rheumatoid arthritis start? *Arthritis Rheum* 28; 485-489.
3. **Aicher W et al** (2000): Analysis of Cytokine and Matrix Protease Expression in stress-activated differentiating Osteoblasts. *46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopedic Research Society March 12-15, 2000, Orlando, Florida.*
4. **Aicher WK, Heer AH, Trabandt A, Bridges SL Jr, Schroeder HW Jr, Stransky G, Gay RE, Eibel H, Peter HH, Siebenlist U, et al** (1994) : Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 153 (11) ; 5347.
5. **Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC** (1996): Involvement of the cycline-dependant kinase inhibitor p16 ink4a in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93 (24); 13742-13747.
6. **Alspaugh MA, Jensen FC, Rabin H, Tan EM** (1978): Epstein Barr virus transformed lymphocytes: induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 148; 1429-1434.
7. **Aranega A, Marchal JA, Melguizo C, Prados J, Aranega AE, Velvez C, Fernandez JE, Arena N, Alvarez L** (1996): Low sample volume causes differentiation in human rhabdomyosarcoma cell line RD subjected to electroporation ( published erratum appears in Cell Mol Biol (Noisy le grand) 1997 Dec; 43 (8): 1235). *Cell Mol Biol Noisy le grand* 42 (8); 1219-27.
8. **Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan, SR, Lian MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG** (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31; 315-324.
9. **Bely M, Apathy A, Beke-Martos E** (1969): Cardiac changes in RA. *Acta Morphol Hun* 40; 149-186.
10. **Bosman H.B., Guntheil R.J. & Case K.R.** (1976): *Nature (London)* 261; 499-501
11. **Cavallo MG, Pozzili P, Thorpe R** (1994): Cytokines and autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 96; 1-7.
12. **Cristofalo, V.J. & Kabakjian, J.** (1975): *Mech. Ageing Dev* 4; 19-28

13. **Cruikshank WW, Center DM** (1982): I. Modulation lymphocyte migratoin by human lymphokines. II. Purifucation of a lyphotactic factor (Lymphocyte chemoattractant factor). *J Immunol* 138; 3817-3825.
14. **Depper JM, Zvaifler NJ** (1981): Epstein Barr virus, its relationship to the Pathogenesis of Rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 24; 755-761.
15. **Dinarello CA** (1994): Interleukin-1, 31-56, In: Thomson A: The cytokine handbook, 2.Aufl. Academic press Harcourt & Brace Company, Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sidney , Tokyo, Toronto.
16. **Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Katsikis P, Londei E, Abney G, Buchan G, Barrett K, Corcoran A, Kissonerghis M, Zheng R, Grubeck Loebenstein, Barkleey D, Chu CQ, Field M, Maini RM** (1991): Cytokine assays: Role of the evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol Rev* 119; 105-123.
17. **Fernandes L, Sullivan S, McFarlane IG, Wojcicka BM, Warnes TW, Eddleston, Hamilton EB Williams R** (1979): Studies on the frequency and pathogenesis of liver involmnet in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 38; 501-506.
18. **Firestein GS, Xu WD, Townsend K, Broide D, Alvaro-Gracia J, Glasebrook A, Zvaifler NJ** (1998): Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I.Failure to detect T-cell lymphokines (IL-2 and IL-3) and presence of makrophge colony stimulating factor (CSF-1) and a novel Mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 168; 1573-1586.
19. **Fox RE, Luppi M, Pisa P, Kang HI** (1992): Potential role of Ebstein-Barr virus in Sjörngen´s syndrom and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32; 18-24.
20. **Franz J K, Pap T, Hummel K, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y, Müller-Ladner U, Gay R, Gay S** (2000): Expression of Sentrin, a novel antiapoptotic Molecule at Sites of synovial invasion in rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 43 (3); 599-607.
21. **Franz J, Kolb S, Hummel K, Laartz F, Neidhart M, Aicher W, Pap T, Gay R, Fontana A, Gay S** (1998): Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 28;2661-2671.
22. **Gay S, Gay RE, Koopmann WJ** (1993): Molecular and cellular mechanisms of joint destruction and rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explaining joint destruction ? *Ann Rheum Dis* 52; 339-47
23. **Goberdhan P. Dimiri** (1995): A Biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skins in vivo. *Cell Biology* 92; 9363-9367.
24. **Gräfenstein K (ed), Altus RE, Geidel H, Nagel WD:** Klinische Rheumatologie, 3.Auflage, ecomed, Landsberg, 1992.
25. **Gravallese EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH** (1991): In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 34(9); 1076-84.



26. **Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Steven S, Peters G** (1996): Regulation of p16 (CDKN2) expressions and its implications for cell immortalisation and senescence. *Molecular and Cellular Biology* 16 (3); 859-867.
27. **Hirano T** (1994): Interleukin-6, 145-168, In: Thomson A: The Cytokine handbook, 2.Aufl, Academic press Harcourt & Brace Company.
28. **Janssens X, Veys E, Verbruggen G, Declercq L** (1988): The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 15; 1346-1350.
29. **Johnson PM, Faulk WP** (1976): Rheumatoid Faktor: its nature, specificity and production in RA. *Clin. Immunopathol.* 6, 414-430.
30. **Jonsson T, Valdimarsson H** (1993): Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? *Ann Rheum Dis* 52; 161-164.
31. **Kataaha PK, Mortazavi-Milani SM, Russel G, Holborow EJ** (1985) : Anti-intermediate filament antibodies, antikeratinantibody, and antiperinuclear antibody in rheumatoid arthritis and infectious mononucleosis. *Ann Rheum Dis* 44 ; 446-449.
32. **Kirsch T, Swoboda B, Hah HD** (2000): Activation of Annexin II and V expression, terminal Differentiation, mineralisation and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Journal of Cell Biology* 139 (2); 541-552.
33. **Klippel John H., Dieppe Paul A.** (1998): Rheumatoid arthritis and other Synovial Disorders, Mosby-Wells Medical Communications.
34. **Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, Lopez-Otin C, Takagi M** (1999): Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in synovial membrane : different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Diss* 58; 691-697.
35. **Lipinsky PE** (1994): Rheumatoid arthritis, In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK: Harrison's Principles of internal medicine, 13. Aufl., McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogota, Caracas, Lisbon, London, Madrid, Mexico, Milano, Montreal, Paris, New Dehli, San Juan Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto.
36. **Loughran O, Malliri A, Owens D, Gallimore PH, Stanley MA, Ozanne B, Frame MC, Parkinson EK** (1996): Association of p16ink4a with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. *Oncogene* 13 (3); 561-568.
37. **Maiani RN, Zvaifler NJ**: Rheumatoid arthritis and other synovial disorders. In: Klippel JH Dieppe PA, eds.- Rheumatology. Mosby Int., London 1998
38. **Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Fernandez JE, Velez C, Alvarez L, Aranega A** (1997) : Actinomycin D treatment leads to differentiation and inhibits proliferation in rhabdomyosarcoma cells. *J Lab Clin Med* 130(1) ; 42-50.

39. **McCachren SS, Haynes BF, Niedel JE** (1990): Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J Clin Immunol* 10(1); 19-27.
40. **Miossec P, Naviliat, Dupuy D'Angeac A, Sany J, Banchereau J** (1990): Low levels of IL-4 and high levels of TGF- $\beta$  in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 33; 1180-1187.
41. **Newkirk MM, Watanabe Duffy KN, Paleckova A, Ivaskova E, Galianova A, Seeman J, Vojtechovsky K, Dostal C** (1995): Herpes viruses in multicase families with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 22; 2055-2061.
42. **Olsen E, Rasmussen HH, Celis JE** (1995): Identification of proteins that are abnormally regulated in differentiated cultured human keratinocytes. *Electrophoresis* 16 (12); 2241-8.
43. **Prados J, Melguizo C, Fernandez JE, Aranega AE, Alvarez L, Aranega A** (1992): Disruption of the coordinate expression of muscle genes in a transfected BC3H1 myoblast cell line producing a low level of the adenovirus E1A transforming protein. *Biochem Cell Biol* 70 (10-11); 1268-76.
44. **Reznikoff CA, Yeager TA, Belair CD, Savelieva E, Puthenveetil JA, Stadler WM** (1996): Elevated p16 and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human urothelial cells. *Cancer Research* 56 (13); 2886-2890.
45. **Robetorye RS, Nakanishi M, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR** (1996): Regulation of p21 (Sdi1/Cip1/Waf1/mda-6) and expression of other cyclin-dependant kinase inhibitors in senescent human cells. *Molecular and Cellular Differentiation* 4 (1); 113-126.
46. **Rodemann H.P., Bayrheuter K, Francz P, Dittmann K, Albiez M** (1989): Selective enrichment and biochemical characterisation of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exper. Cell Res.* 180; 84-93.
47. **Rosen AP, Gergley M, Jondal M, Klein G, Britton S** (1977): Polyclonal immunoglobulin production after EBV infection in human lymphocytes in vitro. *Nature* 267; 552-554.
48. **Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA** (1988): The Epstein Barr virus glycoprotein gp 110, a molecular link between HLA-DR4, HLA-DR1 and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27; 367-371.
49. **Saal JG** (1995): Virusassoziierte Arthritiden. *Z Rheumatol* 54; 391-404.
50. **Scherak O, Smolen JS, Mayr WR** (1980): Rheumatoid arthritis and B-lymphocyte alloantigen HLA-DRw4. *J Rheumatol* 7; 9-12.
51. **Schiller UH** (1996): Zellbiologische Untersuchungen zur radiosensitiverenden Wirkung von all-trans Retinsäure auf verschiedene in vitro kultivierte normale und Tumor-Zellpopulationen. *Inauguraldissertation Universität Tübingen*.
52. **Schuler M, Franz J, Pap T, Weis-Klemm M, Sell S, Fontana A, Gay S, Aicher W** (2000): Regulation of IL 16 Expression in Fibroblasts by Protein Kinase Signals. *In Vorbereitung*.

53. **Silman AJ, MacGregor AJ Thomson W, Holligan S Carthy D, Farhan A, Ollier WE** (1993): Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32; 903-907.
54. **Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G** (1993): The cytkeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so called antikeratin antibodies,autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 92; 1387-1393.
55. **Slaughter L, Carso DA, Jensen FC, Holbrook TL, Vaughan JH** (1978): In vitro effects of EBV on perepheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and other subjects. *J Exp Med* 148; 1429-1434.
56. **Stastny P** (1978): Association of the B.cell alloantigen Drw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Mesd* 298; 869-871.
57. **Stein GH, Dulic V** (1995): Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *Bioessays* 17 (6); 537-43.
58. **Tahara H, Sato E, Noda A, Die T** (1995): Increase in expression level of p21sdi1/cip1/waf1 with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Oncogene* 10 (5); 835-40.
59. **Taniguchi K, Kohsaka H, Inoue N, Terada Y, Ito H, Hirokawa K, Miyasaka N** ( 1999): Induction of the P16ink4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat-Med.* 5 (7); 760-7.
60. **Tiwari J, Terasaki P**: HLA and disease associations, Springer-Verlag, New York, 1985.
61. **Tracey KJ** (1994): Tumornecrosis factor  $\alpha$ : 289-304, In: Thomson A: The cytokine handbook, 2.Aufl., Academic press Harcourt & Brace company.
62. **Vaughan JH, Valbracht JR, Nguuyen MD, Handley HH, Smith RS, Patrick K, Rhodes GH** (1995): Epstein-Barr virus induced Immunresponse. II. Immunglobulin G Antibodies to protein mimicking and not mimicking epitopes in autoimmun diseases . *J Clin Invest* 95; 1316-1327.
63. **Venables P** (1988): Epstein Barr virus infection and autoimmunity in Rheumatoid arhritis. *Ann Rheum Dis* 47; 265-269.
64. **Venables PJW, Pawlowski T, Mumford PA, Brown C, Crawford DH, Maini RN** (1988): reaction to antibodies of rheumatoid arthritis nuclear antigen with a synthetic peptide corresponding to a part of Epstein Barr virus nuclear antigen. *Ann Rheum Dis* 47; 270-279.
65. **Waalder E** (1940): on the occurance of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscules. *Acta Pathol Microbiol Scand* 17; 172-188.
66. **Wagner S** (1995): Quantifizierung synovialer Zytkinmuster der rheumatoiden Arthritis mit Hilfe einer kompetitiven RT-PCR – Untersuchung an EBV-positiven und negativen Synovialmembranen. *Naturwissenschaftl. Dissertation*, Universität Tübingen.

67. **Walker WC, Wright V** (1968): Pulmonary lesions and RA. *Medicine* 47; 501-520.
68. **Weyand CM, Goronzy JJ** (1995): Inherited and noninherited risk factors in rheumatoid arthritis. *Curr opin Rheumtol* 53; 206-213.
69. **Yao QY, Rickinson AB, Gaston JSH, Epstein MA** (1986): Disturbance of the virus-host balance in rheumatoid arthritis patients: a quantitative study. *Clin Exp Immunol* 64; 302-310.
70. **Yudoh K, Matsuno H, Osada R, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T** (2000): Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticular bone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients. *Arthritis and Reumatism* 43 (10); 2178-2188.
71. **Zvaifler NJ, Firestein GS** (1994): Pannus and Pannocytes – Alternative Models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 37; 783-789.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn PD Dr. W. Aicher im osteologischen Labor der orthopädischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die engagierte und großartige Unterstützung und sein großes Interesse meiner Arbeit gegenüber, möchte ich mich besonders bei ihm bedanken.

Großen Dank schulde ich weiterhin

Herrn Prof. Dr. HP Rodemann, für das Interesse, dass er meiner Arbeit entgegengebracht hat, und die Benutzung seines Labors für die 2D-Gelelektrophorese.

Frau M. Weiss-Klemm, Frau G. Greipel und Frau D. Alexander für die große Unterstützung, die vielen Tipps, die viele Geduld und das tolle Verhältnis im Labor.

Frau H. Löffler für die freundliche Einweisung in die 2D-Gelelektrophorese und die Unterstützung, die sie mir zukommen lies.

Allen Mitarbeitern des strahlenbiologischen Labors, für ihre freundliche Aufnahme und Hilfe.

Herrn Dr. H-P. Dürr danke ich für die Unterstützung bei der biometrischen Auswertung meiner Daten.



## 7 Curriculum Vitae

Name:	Markus Schmid
Geburtsdatum:	4. September 1975
Geburtsort:	Singen/ HTW
1982 – 1986	Grundschule Liasweg, Stuttgart
1986 – 1995	Fanny-Leicht-Gymnasium, Stuttgart
1995	Abitur
1996	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
1998	Ärztliche Vorprüfung
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000-2002	Dissertation bei Herrn PD Dr. W.K. Aicher in der Orthopädischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung