

Aus dem Institut für Anatomie
(Geschäftsführender Vorstand: Professor Dr. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE BEDEUTUNG DER MATRIXMETALLOPROTEINASE-19
BEI DER ANTIGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS IM
MAUSMODELL**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
INGA VALK
aus Moers

Kiel
2009

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Pufe
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Seekamp
Tag der mündlichen Prüfung:	29. September 2009
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	29. September 2009

gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi
(Ausschussvorsitzender)

Meinen Eltern

Fritz-Volker und Ingeborg Valk

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1. Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2. Klinik und Diagnose	4
1.1.3. Therapie der rheumatoiden Arthritis	5
1.1.4. Experimentelle Arthritismodelle	7
1.1.4.1. Die Antigen-induzierte Arthritis	8
1.2. Matrixmetalloproteinasen	9
1.2.1. Matrixmetalloproteinase-19 (MMP-19)	10
1.3. Zielsetzung der Arbeit	11
<u>2. METHODEN</u>	<u>13</u>
2.1. Knockout-Mäuse	13
2.2. Antigen-induzierte Arthritis (AIA)	13
2.2.1. Tiere	13
2.2.2. Immunisierung, Arthritisinduktion und Monitoring	13
2.2.3. Tötung der Tiere und Probenentnahme	14
2.3. Mikro-Computertomographie	15
2.3.1. Allgemeine Informationen	15
2.3.2. Durchführung der Messung	16
2.3.3. Knochenstrukturanalyse	16
2.4. Histologie, Immunhistochemie	18
2.4.1. Entkalken in EDTA-Lösung	19
2.4.2. Einbettung in Paraffin und Anfertigung von Mikrotomschnitten	19
2.4.3. Histologische Färbungen	19
2.4.4. Auswertung der histologischen Schnitte	20

2.4.5. Immunhistochemie	22
2.4.5.1. Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen VEGF	22
2.5. Statistische Auswertung	23
3. ERGEBNISSE	24
3.1. Kniegelenksdurchmesser	24
3.2. Histologische Auswertung	25
3.2.1. Histologisches Scoring	25
3.2.2. Auswertung der Safranin O-Färbungen	32
3.2.3. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen gegen VEGF	32
3.3. Trabekelstrukturanalyse	33
4. DISKUSSION	37
4.1. Kniegelenksdurchmesser	38
4.2. Histologie	39
4.3. Micro-CT	43
5. ZUSAMMENFASSUNG	48
6. LITERATURVERZEICHNIS	50
7. ANHANG	57
Färbeprotokolle	57
Danksagung	59
Lebenslauf	60

Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikro-Computertomographie
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
ANA	antinukleäre Antikörper
Anti-CCP	Antikörper gegen zyklisches, citrullierendes Peptid
BS/BV	<i>engl.</i> Bone Surface/Bone Volume (<i>dt.</i> Knochenoberfläche/Knochenvolumen)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BV/TV	<i>engl.</i> Bone Volume/Tissue Volume (<i>dt.</i> Knochenvolumen/Gewebevolumen)
CD	Cluster of differentiation
CFA	komplettes Freud'sches Adjuvanz
COMP	<i>engl.</i> Cartilage Oligomeric Matrix Protein (<i>dt.</i> Knorpel oligomeres Matrixprotein)
CRP	C-reaktives Protein
DMARD	<i>engl.</i> Disease-modifying antirheumatic drugs (<i>dt.</i> Krankheits-beeinflussende antirheumatische Medikamente)
DS	Destruktionsscore
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZ	Entzündungsscore
EZM	Extrazellulärmatrix
FLS	Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL-17	Interleukin 17
k.o.	knockout
MA	Makrophagen
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
MHC	<i>engl.</i> Major Histocompatibility Complex (<i>dt.</i> Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTX	Methotrexat

NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
nT	naive T-Lymphozyten
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline (<i>dt.</i> Phosphat gepufferte Salzlösung)
RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>engl.</i> Receptor Activator of NF- κ B Ligand (<i>dt.</i> Rezeptor-Aktivator für den NF- κ B Liganden)
RF	Rheumafaktoren
TB	Toluidinblau
Tb.N.	<i>engl.</i> Trabecular Number (<i>dt.</i> Trabekelanzahl)
Tb.Sp.	<i>engl.</i> Trabecular Separation (<i>dt.</i> Trabekelabstand)
Tb.Th.	<i>engl.</i> Trabecular Thickness (<i>dt.</i> Trabekulardicke)
TIMP	<i>engl.</i> Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (<i>dt.</i> Gewebeinhibitoren für Matrixmetalloproteinasen)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor (<i>dt.</i> vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VOI	<i>engl.</i> Volume of Interest (<i>dt.</i> Messbereich)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

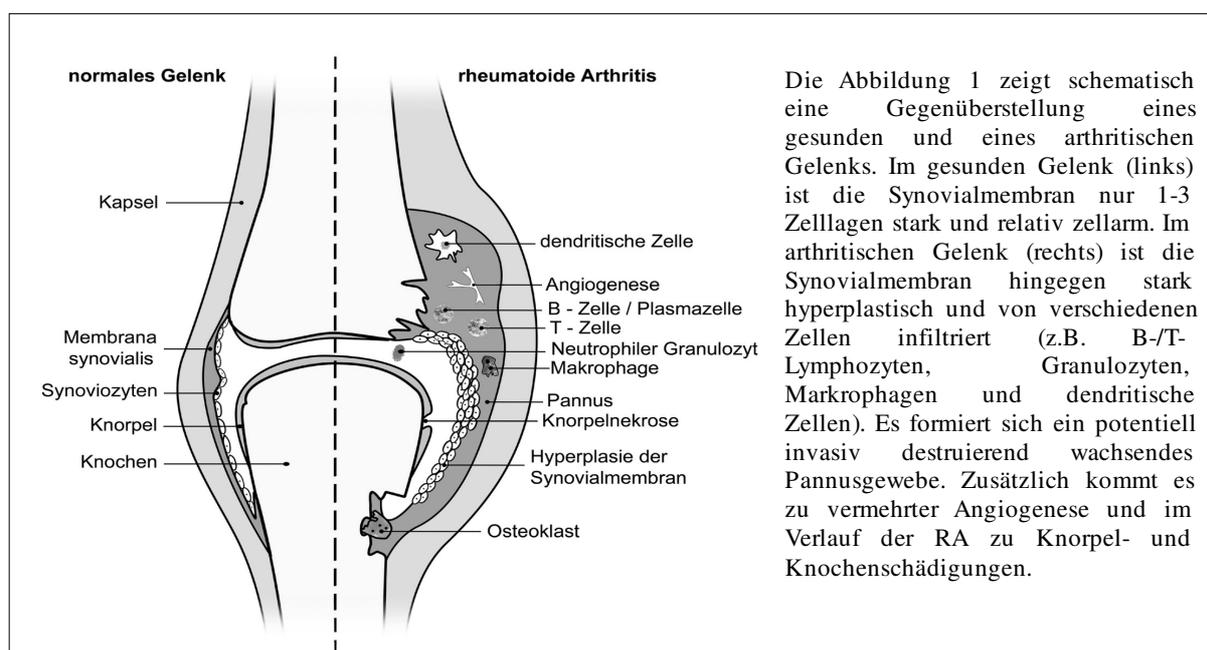
1.1. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) zählt neben den Spondylarthropathien (z.B. Morbus Bechterew) und den Immunvaskulitiden (u.a. Lupus erythematoses) zu den entzündlichen rheumatischen Autoimmunerkrankungen. Sie stellt mit einer Prävalenz von ca. 1% die häufigste Arthritisform der westlichen Welt dar. Das typische Manifestationsalter liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, wobei Frauen dreimal häufiger erkranken als Männer (Vogt, 2005). Für das Gesundheitssystem stellt die RA aufgrund ihres progredienten und häufig mit Funktionseinschränkungen einhergehenden Verlaufs eine nicht unerhebliche Belastung dar. Indirekte und direkte Kosten belaufen sich pro Patient und Jahr auf ca. 15.000 €, bei voller Ausprägung der Erkrankung mit mehr als 50% Invalidität sogar auf 35.000 € pro Jahr (Huscher et al., 2006).

Manifestiert sich die RA im Verlauf auch extraartikulär, können insbesondere Veränderungen des Herz- und Gefäßsystems mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert sein (Maradit-Kremers et al., 2005).

1.1.1. Ätiologie und Pathogenese

Die RA ist charakterisiert durch die Entwicklung einer progressiven, chronischen Polyarthritis in den synovialen Gelenken.



Die Rolle der Synoviozyten

Die Membrana synovialis ist eine Struktur, die nur 1-3 Zellschichten stark ist. Bei der RA kommt es zu Hyperplasie und Infiltration der Synovialmembran (Synovitis). Diese Hyperplasie wird durch vermehrte Proliferation oder gestörte Apoptose von Makrophagen-ähnlichen (Typ A) und Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Typ B) erklärt. Die Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten übernehmen dabei scheinbar die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen. Sie präsentieren Autoantigene und sind *in vitro* in der Lage T-Zellen zu stimulieren (Tran et al., 2007). So leisten sie einen Beitrag zur autoreaktiven Immunantwort. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Aktivierung von RANKL (engl. Receptor Activator of NF- κ B Ligand), einem Liganden, der nach Rezeptorbindung die Osteoklasten-abhängige Knochenresorption steigert (Kim et al., 2007). Zudem bilden die Typ-B Synoviozyten das sogenannte Pannusgewebe, welches tumorartig in das Gelenk hinein wuchert, den Knorpel überzieht und destruieren kann. Auch produziert die Synovialmembran sog. Defensine. Dies sind antimikrobielle Peptide, die zum einen die Wundheilung fördern, aber auch die Fibrinbildung und Zellproliferation anregen können (Paulsen et al., 2002).

Durch die Produktion von verschiedenen Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen gehören die Synoviozyten zu den Effektorzellen der RA. Warum diese Zellen aktiviert werden ist weitgehend unklar (Kramer et al., 2003).

Zu den die Synovialmembran infiltrierenden Zellen gehören B-Zellen, CD4+ T-Lymphozyten und Makrophagen. Welche Rolle den genannten Zellen zugeschrieben wird, soll im Folgenden erläutert werden.

Die Rolle der B-Zellen bei der rheumatoiden Arthritis

B-Lymphozyten gehören zu den Zellen des spezifischen Immunsystems. Ausdifferenziert werden sie als Plasmazellen bezeichnet und produzieren Antikörper (humorale Abwehr). Eine große Rolle in der Pathogenese der RA wurde den Rheumafaktoren (RF) zugeschrieben. Diese bereits 1939 von Waaler entdeckten selbstreaktiven Antikörper richten sich gegen die Fc-Region von Immunglobulinen. Diese Erkenntnis erbrachte erste Hinweise darauf, dass es sich bei der RA um eine autoimmune Erkrankung handeln könnte.

Das pathogenetische Potential der RF liegt in der Immunkomplexbildung (Zvaifler, 1973). Diese Immunkomplexe aktivieren Komplement und initiieren die Zytokinproduktion, so dass Entzündungszellen (z.B. neutrophile Granulozyten) in das Gelenk gelockt werden und dort zur lokalen Destruktion beitragen (Dorner et al., 2004). Diese RF lassen sich bei 80% der RA-Patienten isolieren, sind aber auch bei ca. 25% der Normalbevölkerung zwischen 60 und 89

Jahren nachweisbar (Böcker et al., 2004). Des Weiteren kommen RF auch bei anderen Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis vor, sind also nicht hochspezifisch. So wird klar, dass diese Autoantikörper alleine nicht die Pathogenese der RA aufklären und lediglich ein Baustein sind. Zudem wurden bei der RA weitere Autoantikörper detektiert. Dazu zählen unter anderem Antikörper gegen Kollagen Typ II, Fibronectin, MMP-19, Kernproteine und Citrulline wie Vimentin und Fibrin (Steiner, 2007). Besonders Letztgenanntes wird auch als anti-CCP bezeichnet und weist die mit 96% höchste Spezifität aller serologischen Marker auf (Steiner, 2007 und Strunk et al., 2005).

So spielen B-Zellen durch die Produktion der beschriebenen Antikörper eine große Rolle bei der RA. Sie erklären aber nicht alleine, weshalb das Immunsystem aus dem Gleichgewicht gerät.

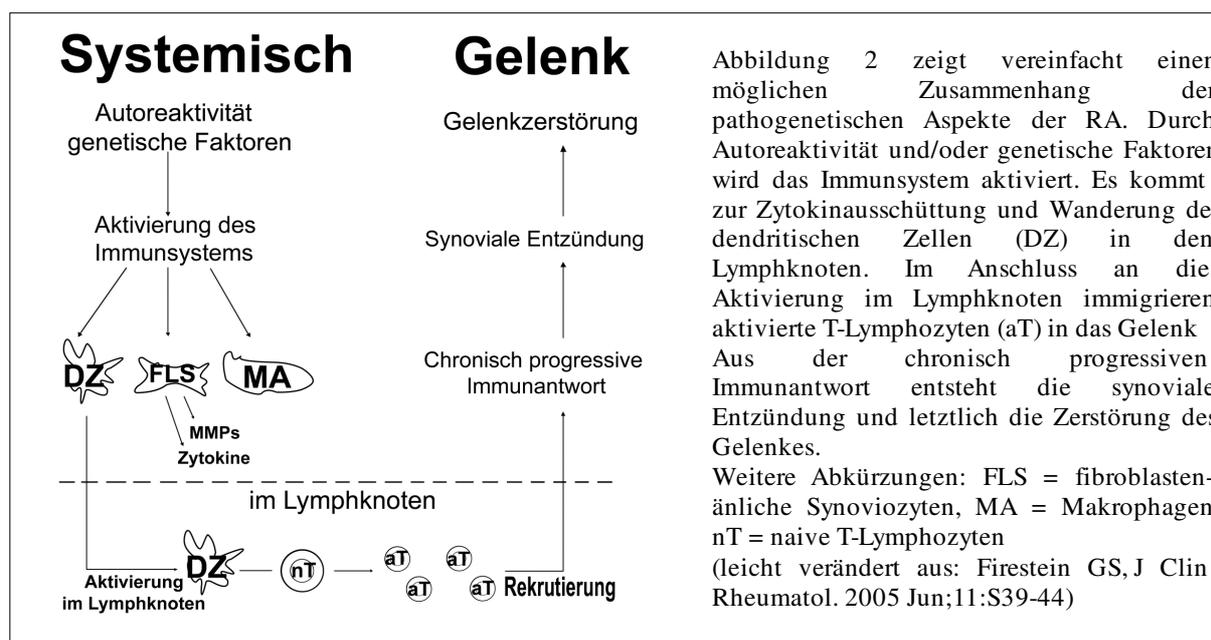
Die Rolle der T-Zellen bei der rheumatoiden Arthritis

Zu den Funktionen der T-Zellen gehört die Verstärkung der Immunantwort durch B-Zell Stimulation und die Stimulation der cytotoxischen T-Zell Reaktion. CD4+ T-Helferzellen („cluster of differentiation“) bedürfen zur Aktivierung der Antigen-Präsentation durch MHC (engl.: Major Histocompatibility Complex) Klasse II positive Zellen. Genetische Studien konnten zeigen, dass Menschen, die bestimmte MHC-II Allele exprimieren, prädisponiert sind für die Entwicklung einer RA. Bei RA Patienten finden sich gehäuft die Subtypen HLA-DR1 und HLA-DR4 (Roudier, 2004). Man stellt sich vor, dass diese Moleküle arthritogene Peptide binden, sie den T-Lymphozyten präsentieren und diese dann aktivieren. Aktivierte T-Zellen sind nicht nur wichtige Effektorzellen der RA, auch durch Interaktion mit anderen Immunzellen tragen sie zur Aufrechterhaltung der RA bei. Sie interagieren mit B-Zellen (Autoantikörperproduktion), stimulieren Synoviozyten und Chondrozyten, die in der Lage sind Effektormoleküle zu sezernieren und verstärken die Aktivität von Osteoklasten (Firestein, 2005). Aber auch die Produktion der Zytokine IFN- γ (Interferon-gamma) und IL-17 (Interleukin-17) durch synoviale T-Lymphozyten trägt zur weiteren Gelenkentzündung und -destruktion bei (Steiner et al., 1999 und Stamp et al., 2004). Allerdings zeigten neue Studien, dass IFN- γ in der akuten Phase von experimentell induzierter Arthritis durch eine Regulation der Chemokinsynthese auch antiinflammatorisch, chondroprotektiv und antiosteoklastogenetisch wirkt (Williams et al., 2007).

In der chronischen Phase regt IFN- γ bei Makrophagen die Produktion von inflammatorischen und Gewebe-zerstörenden Mediatoren an, wozu z.B. TNF- α (Tumornekrosefaktor) und Proteasen gehören (Firestein, 2005). Das IL-17 stimuliert die Einwanderung von

Entzündungszellen in das Gelenk und induziert die Produktion von Matrixmetalloproteinasen (Stamp et al., 2004).

So bleibt die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis äußerst komplex. Entscheidend ist das sowohl systemische wie lokale Prozesse ablaufen und Anteile der angeborenen und erworbenen Immunität eine Rolle spielen (Abb. 2). Diese Prozesse sind vom Körper nicht mehr kontrollierbar und führen zu einer massiven Destruktion des Gelenks.



1.1.2. Klinik und Diagnostik

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch, destruierend verlaufende Gelenkentzündung, die vor allem kleine Gelenke betrifft. Die spezifische Diagnostik gestaltet sich schwierig, da noch keine pathognomischen Tests existieren. Die Diagnose wird anhand von laborchemischen, radiologischen und klinischen Erhebungen gestellt.

Zu den wichtigsten laborchemischen Parametern gehören als Entzündungswerte die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive akute Phase Protein (CRP) (Lindqvist et al., 2005). Zu den spezifischen immunologischen Befunden zählen die Rheumafaktoren, antinukleäre Antikörper (ANA) und der Antikörper gegen das zyklische citrullierende Peptid (anti-CCP), wobei Letzterer eine im Vergleich höhere Spezifität aufweist (Shovman et al., 2005).

Wichtigstes Bildgebendes Verfahren ist das konventionelle Röntgenbild des Gelenkes. Die im Verlauf der RA auftretende Zerstörung des Knorpels und des angrenzenden Knochens zeigt

sich durch Gelenkspaltverschmälerung, Erosionen und subchondrale Zysten (Strunk et al., 2005).

Die frühen Anzeichen der RA wie Weichteilschwellung, Ergussbildung und synoviale Proliferation lassen sich teilweise durch die Magnetresonanztomographie darstellen.

Klinisch ist der symmetrische Befall der Handgelenke und der proximalen Finger- und Zehengelenke typisch. Im Anfangsstadium äußert sich die RA häufig durch Schwellung der Gelenkkapsel, Druckschmerzhaftigkeit und anhaltende Morgensteifigkeit. Durch eine aktive Beweglichkeitsprüfung (z.B. Handgelenk Volarbeugeschmerz) und Ausübung von Druck auf die Gelenke (Gaenslen-Zeichen bei den Fingergrundgelenken) lassen sich diese Angaben noch objektivieren. Bei ca. 40% der Patienten gehen der eigentlichen Erkrankung unspezifische Prodromi wie Arthralgien, Kraftlosigkeit, Fieber und eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes voraus (Strunk et al., 2005).

Um die Diagnostik der RA zu erleichtern hat das American College of Rheumatology Klassifikationskriterien (siehe Tabelle) für die RA herausgegeben. Denn eine frühe Diagnose und somit ein früher Therapiebeginn entscheiden maßgebend über den Verlauf und die Prognose der RA (Symmons et al., 1998).

Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis des „American College of Rheumatology“:

- Morgensteifigkeit vom mindestens 1 h Dauer
- Arthritis von 3 oder mehr Gelenken
- Arthritis von Hand- und Fingergelenken
- symmetrische Schwellung/Arthritis
- Rheumaknoten
- Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
- typische radiologische Veränderungen: Erosionen und gelenknahe Osteoporose

Die Kriterien 1- 4 müssen mindestens 6 Wochen bestehen. Bei Vorhandensein von vier Kriterien kommt es zur Diagnosestellung der RA (Arnett et al. 1988).

1.1.3. Therapie der rheumatoiden Arthritis

Aufgrund der unklaren Pathogenese der RA existiert noch kein kausaler Therapieansatz, vielmehr richtet sich die Therapie gegen die drei Hauptcharakteristika Schmerz, Entzündung und Funktionseinschränkung. Bei diesem Konzept gilt es medikamentöse und nicht medikamentöse Therapiekonzepte zu vereinen. Im Wesentlichen stehen drei Medikamentengruppen zur Verfügung. Diese sind nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR),

Glukokortikoide und die so genannten „Disease-modifying antirheumatic drugs“ (DMARD) zu denen sowohl die Basistherapeutika und sog. Biologicals gezählt werden.

NSARs wirken durch Hemmung der Prostaglandinsynthese analgetisch und auch antiphlogistisch, sind jedoch nicht in der Lage die Progression der Erkrankung aufzuhalten (O'Dell et al., 2004). Je nach Risikoprofil des behandelten Patienten können diese Medikamente erhebliche Nebenwirkungen im Magen-Darm Trakt bis hin zu Blutungen hervorrufen. Bei den selektiven Cyclooxygenase-2 Inhibitoren scheint dieses Risiko etwas reduziert.

Glukokortikoide gehören zu den immunsupprimierenden Medikamenten und wirken so gegen die entzündliche Komponente. Diese Wirkung tritt schnell und verlässlich ein, so dass gerade deswegen die Steroide in der Anfangsphase der Therapie einen hohen Stellenwert haben. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Steroide einen Krankheits-modifizierenden Einfluss haben. Sie verlangsamen die destruirenden Prozesse am Gelenk (van Everdingen et al., 2002; Mitchell et al., 2007). Allerdings haben sie ein weites Dosis abhängiges Nebenwirkungsprofil, wozu z.B. Diabetes mellitus und Osteoporose gehören. Die NSARs und Glukokortikoide werden meist zur initialen Therapie eingesetzt, da der Wirkeintritt der Basistherapeutika einige Wochen betragen kann.

Zu den konventionellen Basistherapeutika zählen Methotrexat (MTX), Leflunomid und Sulfasalazin. Sie wirken über einen Eingriff in die Proteinbiosynthese immunmodulatorisch. Insbesondere das MTX hat sich in der Langzeittherapie als besonders wirksam hervorgetan. So reduziert es nicht nur die radiologische Progression der RA, sondern senkt bei relativ geringen Kosten und akzeptabler Toxizität auch die Mortalität (Ortendahl et al., 2002; Choi et al., 2002).

Zytokinantagonisten (Biologicals) gehören zu den modernen Basistherapeutika. Sie sollen durch einen Eingriff in das Zytokinnetzwerk das entstandene Ungleichgewicht korrigieren. Zu ihnen gehören monoklonale Antikörper gegen TNF- α (z.B. Infliximab) oder Rezeptorantagonisten gegen Interleukin-1. Diese Biologicals sollen gemäß einer Empfehlung der deutschen Gesellschaft für Rheumatologie frühestens nach sechs Monaten erfolgloser Therapie mit den konventionellen Basistherapeutika eingesetzt werden.

Die nicht-medikamentöse Therapie besteht in erster Linie aus physio- und ergotherapeutischen Maßnahmen, aber auch aus chirurgischen Eingriffen, wie z.B. Tenosynovialektomien, Arthrodesen und Arthroplastiken.

1.1.4. Experimentelle Arthritismodelle

Experimentelle Arthritismodelle spielen in der Rheumaforschung immer noch eine große Rolle. Durch sie lassen sich Erkenntnisse über die initialen Schritte der Pathogenese gewinnen und durch genetische Modifikation der Versuchstiere lässt sich die Funktion einzelner Proteine herausfiltern. Die Problematik von human gewonnenem Gewebematerial (z.B. Synovialmembran) liegt darin, dass das Gewebe meist im Zuge von operativen Eingriffen (z.B. Synovektomie oder Gelenkersatz) gewonnen wird, die erst in sehr späten Stadien der RA durchgeführt werden. Zumeist sind diese Patienten auch mit antirheumatischen Medikamenten vorbehandelt.

Obwohl Erkenntnisse aus tierexperimentellen Modellen sich nur begrenzt auf den Menschen übertragen lassen, kann es doch gelingen Teilaspekte der humanen Erkrankung besser zu verstehen.

Zu den induzierbaren Modellen gehören neben der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) auch die Kollagen- und die Proteoglykan- induzierte Arthritis. Bei beiden Modellen wird zum Auslösen einer Autoimmunreaktion ein gelenk-spezifisches Antigen verwendet; Kollagen Typ II oder Proteoglykan. Diese Modelle weisen den Nachteil auf, dass die Krankheitsinzidenz und der Beginn variabel sowie abhängig vom verwendeten Mausstamm sind (Glant et al., 2001). Somit erweisen sie sich für Studien, in der die Vergleichbarkeit und Synchronität des Krankheitsverlaufs wichtig sind, als unbrauchbar. Des Weiteren gehören zu den induzierbaren Modellen die Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis (Koga et al., 1985), sowie Arthritiden, die durch die Injektion von Pristan und Zymosan induziert werden (Wooley et al., 1989; Keystone et al., 1977).

Die genetischen Modelle beruhen auf spontan auftretenden Arthritiden in transgenen oder Knockout-Mäusen. Bei K/BxN Mäusen tritt eine chronisch, progressive Arthritis ohne vorherige Gabe eines Antigens auf (Kyburz et al., 2003). Ein genetisch veränderter T-Zell Rezeptor reagiert mit einem ubiquitär vorkommenden Protein (Glukose-6-Phosphat-Isomerase) (Matsumoto et al., 2002). Mäuse, die humanes TNF- α überexprimieren (Keffer et al., 1991), sowie Knockout-Mäuse für Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (Horai et al., 2000) entwickeln ebenfalls eine Spontanarthritis.

1.1.4.1 Die Antigen-induzierte Arthritis

Die AIA gehört zu den immunologisch induzierten Arthritismodellen. Sie wurde bereits 1962 von Dumonde und Glynn als Kaninchenmodell eingeführt und 1977 durch Brackertz als Mausmodell etabliert (Dumonde et al., 1962; Brackertz et al., 1977).

Die primäre Immunisierung erfolgt durch eine subkutane Injektion bestehend aus dem Gemisch eines Proteinantigens und einem immunstimulierendem Zusatz (z.B. Freudsches Adjuvanz). Erst später erfolgt, durch intraartikuläre Injektion desselben Proteinantigens, die Induktion der Arthritis. Als Antigene kommen verschiedenen Proteine in Frage u.a. Fibrin und Albumin. Dieses Modell zeigt, dass kein Gelenk-spezifisches Antigen nötig ist, um eine Arthritis zu induzieren. Um ein Verbleiben des Antigens im Gelenk zu erreichen, werden die Antigene mit einer positiven Ladung versehen, damit sie an die negativ geladene Knorpelmatrix binden (van den Berg et al., 1984). So wird heute hauptsächlich methyliertes bovines Serumalbumin als Antigen verwendet. Die längere Verweilzeit des Antigens im Gelenk ist für eine Chronifizierung der AIA notwendig

Durch die intraartikuläre Injektion wird die sog. Arthusreaktion eingeleitet. Diese auch als Typ-III bezeichnete Immunantwort beschreibt die Immunkomplexbildung aus injiziertem Antigen und zirkulierendem Antikörper. Die Immunkomplexe leiten u.a. durch Komplementaktivierung die Entzündungskaskade ein. Diese besteht aus der Aktivierung von Mastzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die durch Ausschüttung einer Vielzahl von Zytokinen zum Vollbild der akuten Arthritis führen. In der ersten Woche dominiert histologisch ein Exsudat aus Fibrin und neutrophilen Granulozyten im Gelenkspalt. Im weiteren Verlauf wandelt sich das histologische Bild. In der frühen chronischen Phase geht das entzündliche Infiltrat zurück, eine Hyperplasie der Synovialmembran durch vermehrte Proliferation der Synoviozyten wird deutlich. Dieses proliferationsaktive Gewebe kann sich als erosive Formation organisieren und destruktiv in das Gelenk vorwachsen, dies wird dann als Pannus bezeichnet (Steinberg et al., 1973). In der chronischen Phase kommt es durch eine Chondrozytendysfunktion mit verminderter Proteoglykansynthese und einzelnen Nekrosen zu Knorpelerosionen. Diese können bis in die subchondralen knöchernen Strukturen vordringen.

So ähnelt die AIA mit ihrer histologischen Trias aus Entzündung, synovialer Hyperplasie und Gelenkdestruktion der RA. Die experimentellen Vorteile liegen nicht nur in der Ähnlichkeit zur RA, sondern auch darin dass sie einen relativ uniformen Zeitverlauf aufweist, ein gleichzeitiger Beginn bei allen Versuchstieren möglich ist.

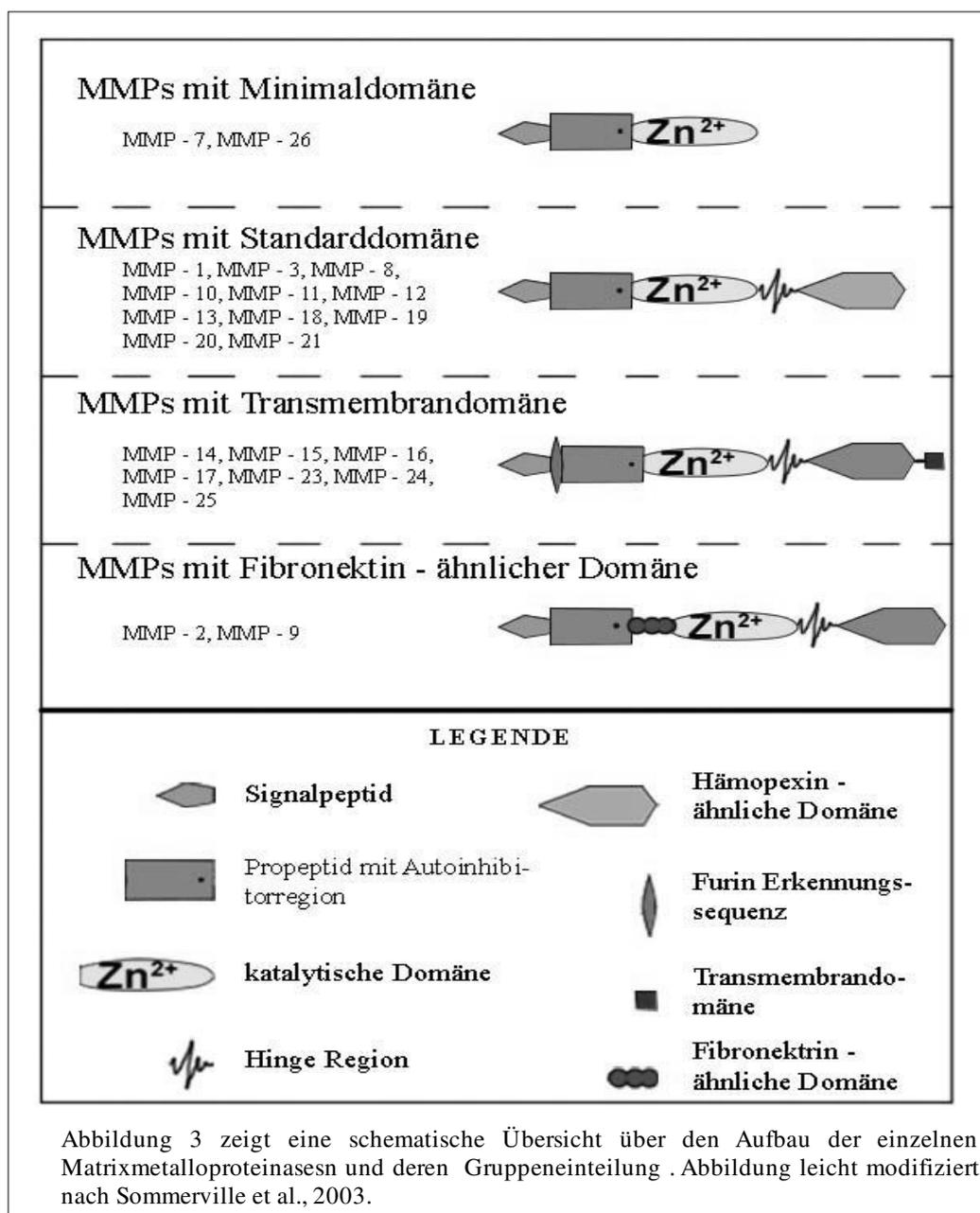
1.2. Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs, Matrixine) sind zinkabhängige Endopeptidasen, die am Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix (EZM) beteiligt sind (Nagase et al., 1999). Die EZM besteht aus zwei Molekülklassen, Glykosaminoglykanen (Proteoglykane) und Faserproteine wie Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin (Scott, 1995).

Die MMPs spielen eine Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, Reproduktion und Wundheilung (Nagase et al., 1999). Die Regulation kann auf Ebene der Genexpression, der Proenzymaktivierung und durch Inhibition der bereits aktivierten MMPs durch TIMPs (engl. „Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“; dt: „Gewebeinhibitor der Metalloproteinasen“) erfolgen (Brinckerhoff et al., 2002). Gerät die Regulation der Matrixine außer Kontrolle, kann die Homöostase aus Auf- und Abbau von Gewebe empfindlich gestört werden (Visse et al., 2003). Dies geschieht auch bei der RA, wo inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α und IL-1) die Expression von MMPs steigern (Mengshol et al., 2002). Dort tragen sie zur Zerstörung der Matrixkomponenten von Knochen, Knorpel und Sehnen bei. Aber auch bei anderen Erkrankungen, wie malignen Tumoren, Atherosklerose, Ulzerationen und Fibrosen ist das MMP Ungleichgewicht von Bedeutung (Nagase et al., 2006).

Allen MMPs sind bestimmte Struktureigenschaften gemein. Dazu zählen das Propetid, die katalytische Domäne und eine Hämapexin-ähnliche Domäne, die über eine flexible Gelenkregion (engl. hinge region) angeschlossen ist. Durch Abspaltung des Propeptids kommt es zur Aktivierung der Matrixine. Die katalytische Region enthält ein Zinkatom und steuert die enzymatische Aktivität. Die Hämapexin-ähnliche Region spielt eine wichtige Rolle bei der Inhibitorbindung und der Substratspezifität (Nagase et al., 1999).

Zunächst wurden die MMPs nach ihrer Substratspezifität eingeteilt, so gibt es Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranständige MMPs (Chandler et al., 1997). Weitergehende Forschung deckte jedoch auf, dass Matrixine stark überlappende Substratspezifitäten aufweisen. Zudem gibt es wohl häufig eine große Diskrepanz der in vitro und im vivo gespaltenen Produkte. In Folge dessen wurde begonnen die MMPs systematisch zu nummerieren (MMP-1, MMP-2, usw.) und anhand ihrer Struktur und ihres Domänenaufbaus in Gruppen einzuteilen (siehe Abb. 3). Bisher wurden 23 humane MMPs beschrieben (Parks et al., 2004).



1.2.1. Matrixmetalloproteinase-19 (MMP-19)

Im Gegensatz zu den bisher identifizierten MMPs weist MMP-19 eine sehr geringe Gewebespezifität auf und lässt sich in einer Vielzahl von Geweben nachweisen. Dazu gehören Plazenta, Lunge, Ovarien, Milz und Darm. Dies ist ungewöhnlich, da MMPs in erwachsenen Zellen unter normalen, ruhenden Bedingungen nur selten nachweisbar sind (Pendas, 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass MMP-19 einen gewissen Stellenwert bei der RA haben könnte. 1998 isolierten Sedlacek et al. Autoantikörper gegen MMP-19 aus dem Synovium von Patienten mit RA. Des Weiteren ist bekannt, dass MMP-19 konstitutiv im Synovium bei RA exprimiert wird (Kontinen et al., 1999). Auch wird MMP-19 von glatten Muskelzellen der Tunica media der synovialen Gefäße exprimiert. In Endothelzellen von Kapillaren lässt sich

MMP-19 an akut entzündetem, aber nicht in chronisch entzündetem Synovium nachweisen (Kolb et al., 1999). Dieses Expressionsmuster gibt Hinweise darauf, dass MMP-19 auch bei der Neoangiogenese eine Rolle spielt.

MMP-19 weist mit einigen Ausnahmen die typische Struktur aller löslichen MMPs auf. Die katalytische Domäne ist *in vitro* in der Lage eine Vielzahl von Proteinen zu degradieren. Dazu zählen Anteile der Basalmembran (Laminin, Kollagen Typ IV, Nidogen), des Bindegewebes (Fibronektin) und des Knorpels (Aggrecan und oligomeres Knorpel Matrix Protein) (Stracke et al., 2000). Aggrecan ist das Hauptproteoglykan der Knorpelmatrix und verantwortlich für die krafttragenden und elastischen Eigenschaften des Knorpels. Der Verlust von Aggrecan gehört zu den am frühesten nachweisbaren Knorpelveränderungen im Rahmen der RA. Es ist bekannt, dass bei der RA Aggrecan vermehrt abgebaut wird. Hinzu kommt, dass MMP-19 keiner Aktivierung bedarf, sondern autoaktivierend ist. Das oligomere Knorpel Matrix Protein (COMP) spielt eine Rolle beim Aufbau des Gelenkknorpels und der Stabilisierung der kollagenen Matrix. Es ist wichtig zu Erhaltung der Integrität des Knorpels. COMP-Fragmente können in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA und Osteoarthritis nachgewiesen werden und dienen auch als Marker für den Verlauf der Erkrankung (Stracke et al., 2000). Somit könnte MMP-19 den Verlauf der RA in drei wesentlichen Punkten beeinflussen. Zum einen in der akuten Phase durch eine Verstärkung der Neoangiogenese zur Aufrechterhaltung der Entzündung und zum anderen in der chronischen Phase durch die Degradation von EZM innerhalb des Gelenks. Aber auch seine Rolle als Autoantigen und somit als Störfaktor der Balance des Immunsystems könnte den Verlauf der RA negativ beeinflussen.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Knockout-Mäuse bieten interessante Möglichkeiten die Bedeutung z.B. einzelner Enzyme in Krankheitsmodellen zu studieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mittels MMP-19^{-/-} - Mäusen mit dem Stellenwert von MMP-19 für die Ausprägung einer unilateral induzierten Antigen-induzierten Arthritis. Die Knockout-Mäuse werden dabei mit genotypisch unveränderten Wildtypen verglichen. Es gibt Hinweise darauf, dass MMP-19 über drei verschiedene Ansatzpunkte im humanen Arthritismodell den Verlauf negativ beeinflussen könnte:

- als Autoantigen
- als Neoangiogenesefaktor
- als EZM degradierendes Enzym

Am Mausmodell soll die Auswirkung des Knockouts auf die akute und chronische Arthritisphase sowie auf den Knochenstoffwechsel untersucht werden. Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

- Die histologische Untersuchung soll klären, inwiefern sich die Ausprägung der Arthritis zwischen Knockout- und Wildtypmaus unterscheidet.
- Die quantitative Analyse von immunhistochemischen Befunden soll Aufschluss über eine veränderte Neoangiogenese geben.
- mittels μ CT Analyse soll die Veränderung der tibialen gelenknahen Trabekelstruktur im Rahmen der AIA untersucht werden.

Im Mittelpunkt steht der Vergleich von Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Da es sich aber um ein unilaterales Arthritismodell handelt, sollen zur Überprüfung der Modellvalidität auch die Gruppen interindividuell verglichen werden.

2. Methoden

2.1. Knockout-Mäuse

Knockout-Mäuse sind Mäuse bei denen durch genetische Manipulation an Stammzellen bestimmte Gene deaktiviert wurden. Da das Genom der Maus als vollständig sequenziert gilt, ist es dieser Art von Manipulation leicht zugänglich. So wird es z.B. möglich die Bedeutung einzelner Enzyme unter Lebensbedingungen und nicht nur auf zellulärer Ebene zu erforschen.

2.2. Antigen-induzierte Arthritis (AIA)

Die Aufzucht der homozygoten Knockout-Mäuse und die Durchführung der Arthritisinduktion erfolgte im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität, Kiel unter der Leitung von Herrn Dr. Radislav Sedlacek. Zur Unterbringung der Tiere stand der Tierstall der Vorklinischen Institute der Medizinischen Fakultät unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reetz zur Verfügung. Aus derselben Anlage entstammen auch die Wildtypmäuse der Vergleichsgruppe.

2.2.1. Tiere

Die für das Arthritismodell verwendeten Mäuse gehörten dem Hintergrund C57BL/6 (Black 6) an. Es waren ausschließlich Weibchen im Alter zwischen 7 und 11 Wochen. Davon waren 9 Tiere Wildtypen und 8 Tiere homozygote MMP-19 Knockout-Mäuse. Im Verlauf der Studie verstarben 3 Wildtypen und 3 Knockout-Mäuse. Eine unbehandelte Vergleichsgruppe bestand aus 9 Tieren. Bei den Knockout-Mäusen handelte es sich um Tiere, die in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Ivan Horak (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie der Freien Universität Berlin) hergestellt worden sind.

Die Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten und hatten stets unbegrenzten Zugang zu Nahrung und Wasser. Der Versuch wurde im Vorfeld durch einen Antrag an das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein in Kiel genehmigt.

2.2.2. Immunisierung, Arthritisinduktion und Monitoring

Als erster Schritt erfolgte die primäre Immunisierung der Mäuse an Tag -21 mittels einer subkutanen Injektion von 100µg methyliertem bovines Serumalbumin (mBSA; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gelöst in 50µl PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) und 50µl komplettes Freund'sches Adjuvanz (CFA; Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Zusätzlich erfolgte eine intraperitoneale Injektion von hitzeinaktiviertem *Bordetella pertussis* Toxin

(Sigma, Deisenhofen, Deutschland) $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in $200\mu\text{l}$ PBS. Diese Prozedur wurde an Tag -14 wiederholt (Hückel et al., 2005). Das mBSA dient in diesem Fall als Fremdeiweiß. Um die Immunreaktion darauf zu verstärken werden Pertussistoxin und CFA verabreicht. Das CFA gehört zu den klassischen unspezifischen Immunaktivatoren. Es kann die Produktion von Antikörpern steigern und wirkt entzündungsfördernd. Es enthält neben Mineralöl und einem Emulgator, hitzeinaktiviertes *Mykobakterium tuberculosis*. Der systemischen Immunisierung folgt 14 Tage später (Tag 0), die eigentliche Arthritisinduktion durch lokale intraartikuläre Gabe von höher konzentriertem mBSA ($10\mu\text{g}$ in $10\mu\text{l}$ PBS). Es werden $9\mu\text{l}$ mBSA in das rechte Kniegelenk und $9\mu\text{l}$ PBS in das linke Kniegelenk injiziert (siehe Abb. 4).

Um die Ausprägung der Arthritis in vivo zu verfolgen wurde der mediolaterale Gelenkdurchmesser jeweils an Tag -1, 3, 7, 10, 14, 17, 22 und 24 mit einer Schubleere gemessen und in mm angegeben. Die Differenz aus dem aktuellen und dem Gelenkdurchmesser an Tag 0 ergab die Gelenkschwellung. Diese wurde zur klinischen Beurteilung der Entzündungsreaktion herangezogen.

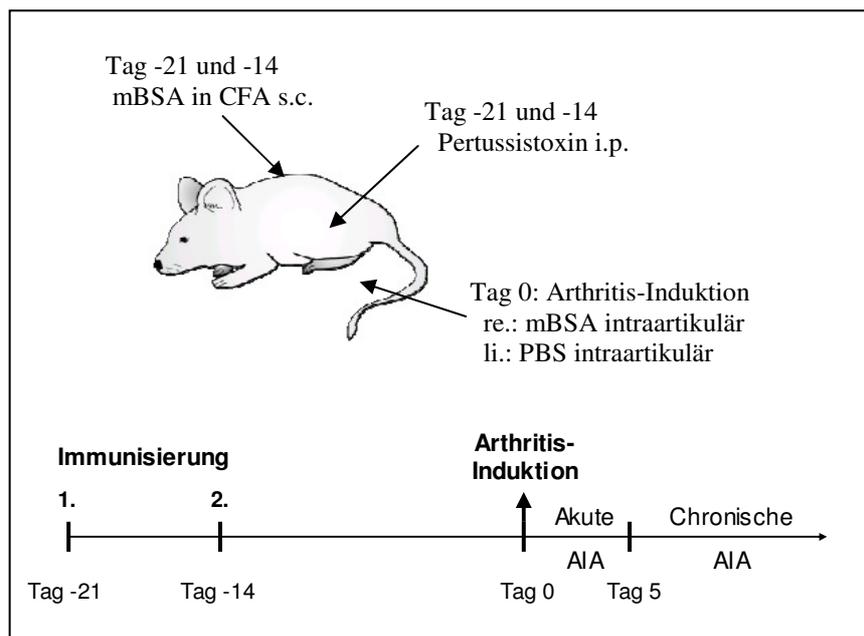


Abbildung 4 zeigt schematisch den Versuchsablauf der Induktion einer Antigen-induzierten Arthritis (mBSA=methyliertes bovines Serumalbumin, CFA=komplettes Freund'sches Adjuvanz, i.p.=intraperitoneal, s.c.=subcutan, AIA=Antigen-induzierte Arthritis)

2.2.3. Tötung der Tiere und Probenentnahme

Nach Ablauf der Versuchsdauer (25 Tage) wurden die Mäuse mit einer letalen Dosis an Halothan zunächst betäubt und dann getötet. Daraufhin erfolgte die Knieentnahme in toto und deren Konservierung in 70% Alkohol.

2.3. Mikro-Computertomographie (μ CT)

2.3.1. Allgemeine Informationen

Die Computertomographie zählt zu den schnittbildgebenden Röntgenverfahren der Medizin. Es ist möglich rechnergestützt aus den gewonnenen Datensätzen Schnittbilder oder 3-dimensionale Ansichten in beliebigen Ebenen zu berechnen. Dies stellt einen großen Vorteil im Vergleich zum konventionellen Röntgen dar. So ist die CT zu einem sehr flexiblen und je nach Fragestellung variablen Verfahren geworden. Bei den für den Menschen gebräuchlichen CT-Geräten rotieren Röntgenröhre und Detektoren um den Patienten.

Bei dem für die Knochenstrukturanalyse verwendeten Micro-Computertomogramm (μ -CT) „Fan Beam μ Scope“ der Firma Stratec (siehe Abbildung 5) sind Röntgenquelle und Detektor fixiert. Das Präparat (hier Mäuseknie) wird in eine Vorrichtung gebracht, in der es vertikal und horizontal bewegt, sowie rotiert werden kann. Nach einer voreingestellten Zeit, die zur Datenerfassung benötigt wird (z.B. 200ms), rotiert die Probe um weniger als 1° weiter und eine neue Datenerfassung beginnt, bis die gesamte Ebene erfasst ist. Danach wird die Probe um eine Länge von $25\mu\text{m}$ nach oben bewegt und eine neue Serie von Daten wird erhoben. Diese Prozedur wird wiederholt, bis der gesamte voreingestellte Messbereich (hier: 300 CT-Schnitte à $25\mu\text{m}$ entspricht 7,5mm) abgetastet ist.

Das μ CT ist speziell für die Erstellung der Histomorphometrie kleiner Knochenproben mit einer Auflösung von bis zu $15\mu\text{m}$ entwickelt worden. Da die Knochenprobe beweglich ist, kann ein besonders geringer Abstand der Röntgenquelle zur Probe erreicht werden, was es möglich macht einzelne Trabekelbälkchen dazustellen. Probengröße und Auflösung hängen über den Faktor 1000 zusammen, das heißt bei einer Probengröße von 2,5cm beträgt die höchst mögliche Auflösung $25\mu\text{m}$.

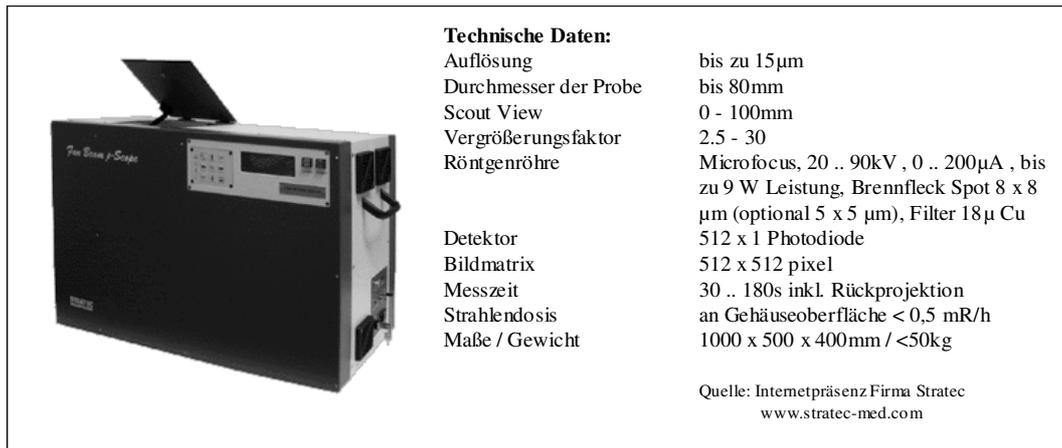


Abbildung 5 zeigt das zur Trabekelstrukturanalyse verwendete Micro-Computertomogramm

2.3.2. Durchführung der Messung

Nach der Entnahme der Kniegelenke wurden diese in 70% Alkohol konserviert. Um die Proben während des Röntgenvorgangs vor dem Austrocknen zu schützen, wurden sie in alkoholgetränktes Papier gewickelt, in den Probenhalter eingebracht und dieser luftdicht verschlossen. Bevor der eigentliche CT-Scan beginnt, bietet das Gerät einen Übersichtsscan des Präparats an, aus dem es möglich ist, den Messbereich festzulegen. Der Messbereich betrug jeweils 300 Schichten mit einer Auflösung von 25µm, das heißt einer Gesamtlänge von 7,5mm. So wurde das gesamte Kniegelenk inklusive der Anteile von Femur und Tibia/Fibula abgedeckt. Der Messvorgang dauerte ca. 6h pro Kniegelenk. Die entstandene Datenmenge wurde nach einer ersten Sichtung mit „CT View“ auf Vollständigkeit und das Vorhandensein von Artefakten überprüft, dann auf ein externes Speichermedium verbracht und so archiviert.

Folgende Messparameter wurden verwendet:

- Auflösung 25µm
- Halterungsdurchmesser 10mm
- Halterungslänge 95mm
- Röntgenfilter 18µ Cu
- Röntgenröhre Spannung: 40kV

Strom 199 µA

2.3.3. Knochenstrukturanalyse

Im Anschluss an die eigentliche Messung wurde die Knochenstrukturanalyse durchgeführt mit Hilfe des Programms „Insight“, welches freundlicherweise von Herrn Dipl. Ing. C. Graeff

der Abteilung medizinische Physik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Leiter Prof. Dr. C.C. Glüer) zur Verfügung gestellt wurde (siehe Abb. 6).

Zur Trabekelstrukturanalyse der Tibia wurde die primäre Spongiosa von der Analyse ausgenommen. Die in der sekundären Spongiosa stattfindenden Knochenumbauprozesse ähneln denen von erwachsenen Tieren, so dass für die Messung nur dieser Knochenanteil berücksichtigt wurde. Der proximale Punkt der sekundären Spongiosa wurde 0,5mm (25 Schnitte) unterhalb dem Ende der Wachstumsplatte festgelegt. Von dort wurde über eine Länge von 2mm das „Volume of Interest“ (VOI) bestimmt und die Strukturanalyse durchgeführt. Für alle Analysen wurde ein Schwellenwert von 160 festgelegt, um eine korrekte Trennung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe zu ermöglichen.

Die Bestimmung des VOI erfolgte, indem in den Querschnitt der Tibia über die gesamte Länge des Messbereiches, Polygone eingepasst wurden. Diese Polygone müssen möglichst den gesamten Innenraum ohne die Kortikalis abdecken und ergeben so eine virtuelle Röhre, in der die Berechnung der Parameter stattfindet.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

§ BV/TV [%] („Bone Volume to Tissue Volume“ auch „Bone Volume Fraction“)

Der relative Knochenvolumenanteil ergibt sich aus dem Verhältnis von Volumen des trabekulären Knochens zum Gesamtvolumen innerhalb des VOI (Goulet et al., 1994). Die Angabe erfolgt in %.

§ BS/BV [mm⁻¹] („Bone Surface to Bone Volume“)

Dieser Parameter gibt die Relation der Oberfläche des trabekulären Knochens (BS) zum Volumen des trabekulären Knochens (BV) an (Goulet et al., 1994). Der Parameter steigt bei porösem Knochen (z.B. Osteoporose) an. Die Angabe erfolgt in mm⁻¹.

§ Tb.N. [mm⁻¹] („Mean Trabecular Number“)

Tb.N. gibt an, wie viele Trabekel sich innerhalb des untersuchten Volumens im Durchschnitt befinden. Die Einheit ist mm⁻¹ (Goulet et al., 1994)

§ Tb.Th. [µm] („Mean Trabecular Thickness“)

Tb.Th bezeichnet die durchschnittliche Dicke der Trabekel, die innerhalb des VOI dem Knochen zugeordnet werden können. Die Angabe erfolgt in µm.

§ Tb.Sp. [mm] („Mean Trabecular Separation“)

Dieser Parameter bezeichnet den durchschnittlichen Abstand der Trabekel zueinander innerhalb der Probe. Er korreliert mit der Größe der Markräume (Hildebrand et al., 1999).

Um Messabweichungen möglichst gering zu halten, wurde jede Trabekelstrukturanalyse dreimal vorgenommen und aus den gewonnenen Werten ein Mittelwert gebildet.

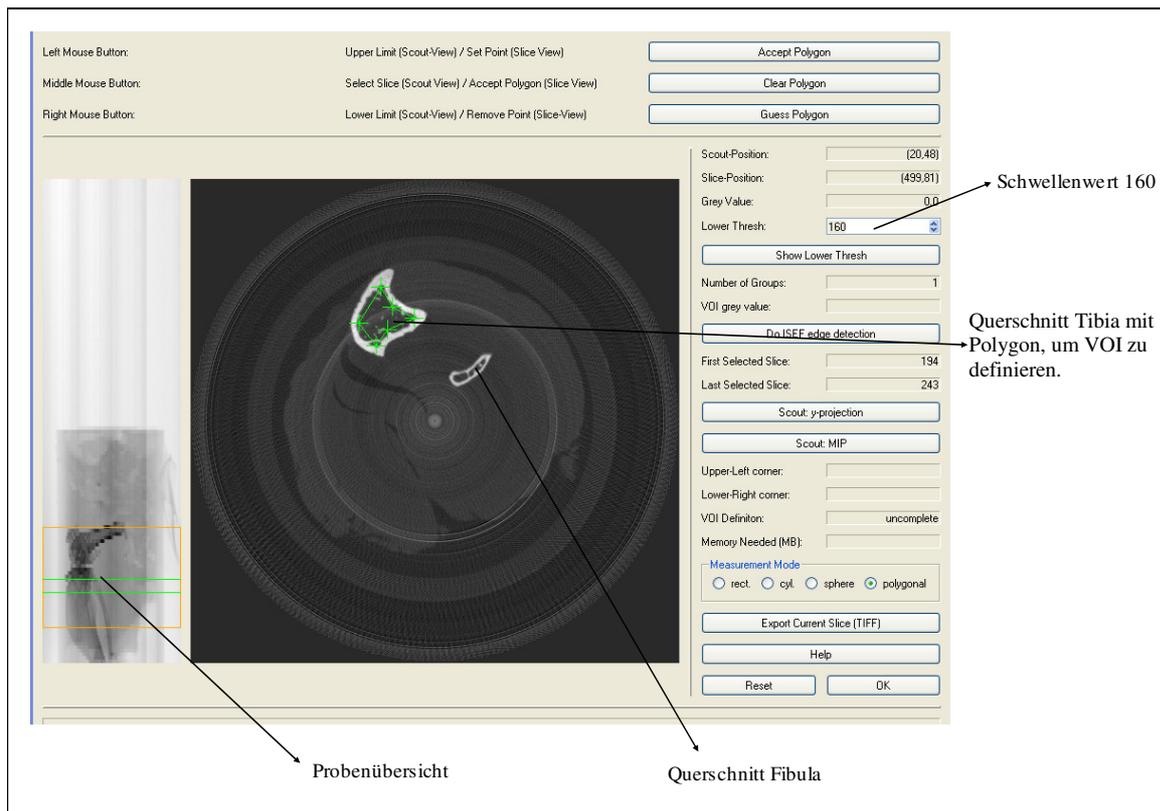


Abbildung 6 zeigt einen Screenshot aus dem Programm „Insight“, welches zur Trabekelstrukturanalyse verwendet wurde. (VOI=Volume of Interest)

2.4. Histologie, Immunhistochemie

Die Histologie als Methode zur Aufarbeitung von bis zu 6 μm dünnen Gewebeschnitten ist in den naturwissenschaftlichen Fächern und in der Medizin weit verbreitet. Durch verschiedene Färbemethoden ist es möglich je nach Interesse unterschiedliche Zellen, Zellformationen oder Zellanteile charakteristisch anzufärben und sie unter mikroskopischer Vergrößerung zu evaluieren.

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine wichtige unterstützende Methode in der histopathologischen Diagnostik und in der zellbiologischen Forschung. Das Prinzip der IHC beruht auf der gezielten Bindung von spezifischen Antikörpern mit zellständigen Antigenen.

Im nachfolgenden Arbeitsgang soll der gebundene Antikörper detektiert und sichtbar gemacht werden, um so Rückschlüsse auf das Vorhandensein des gesuchten Epitops ziehen zu können. Der gebundene Antikörper wird über einen Brückenantikörper an einen Enzymkomplex angekoppelt. Nach Zugabe eines Chromogens kommt es durch eine enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag.

2.4.1. Entkalken in EDTA-Lösung

Nach Fixierung der Präparate in 4% Paraformaldehyd über 24h wurden die Kniegelenke zur Entkalkung in eine 20% EDTA-Lösung (Ethyldiamintetraessigsäure) mit pH 7,2-7,4 überführt. Dies war für die weitere histologische Aufarbeitung, insbesondere das Schneiden notwendig.

Die Entkalkung mit EDTA gilt insbesondere bei immunhistochemischer Fragestellung als antigen- und gewebeschonend. Sie beruht auf einer wasserlöslichen Komplexbildung des Calciums mit EDTA. Die Präparate wurden im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt und die Lösung alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Entkalkung dauerte zwischen 3 und 4 Wochen und wurde durch eine Röntgenkontrolle überprüft.

2.4.2. Einbettung in Paraffin und Anfertigung von Mikrotomschnitten

Nach Abschluss der Entkalkung wurden die Präparate über Nacht fließend gewässert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin (Paraplast) eingebettet. Am Grundschlittenmikrotom (Leitz) wurden dann 7 µm starke Schnitte angefertigt, auf Objektträger gebracht und über Nacht zur Austrocknung im Trockenschrank bei 37°C aufbewahrt.

2.4.3. Histologische Färbungen

Zur Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert. Die jeweils genaue Färbeanleitung findet sich im Anhang.

- Toluidinblau (TB)

Zur Übersicht wurde jeder zehnte Objektträger mit Toluidinblau (1% Toluidinblau in 1% Borax; di-Natriumtetraborat-10-hydrat) gefärbt. Toluidinblau ist ein azidophiler Farbstoff, welcher Gewebe kontrastreich blau darstellt und gut in den Knorpel diffundiert.

Danach war die Bestimmung idealer Schnittebenen möglich und es wurden weitere histologische Färbungen angewendet.

- Hämatoxylin-Eosin (HE)

Hämatoxylin-Eosin ist eine Sukzedanfärbung, das heißt beide Bestandteile werden nacheinander gefärbt. Das aus Hämatoxylin gewonnene positiv geladene Hämaun bindet an die sauren Bestandteile z.B. der Desoxyribonukleinsäuren (DNS) und dient so der Kernfärbung, das negativ geladene Eosin bindet an Proteine und dient der Plasmafärbung. Diese Färbung ist eine weitere Standardübersichtsfärbung, welche Kalk, saure Verbindungen und Zellkerne blau sowie alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rottönen färbt.

- Safranin O

Diese Färbung wird zur Qualitätsbeurteilung des hyalinen Gelenkknorpels eingesetzt, wobei sich der Knorpel orange bis rot färbt. Die Intensität der Knorpelfärbung ist dabei direkt proportional zum Proteoglykangehalt (Camplejohn et al., 1988). So ist es möglich einen Überblick über möglicherweise vorhandene Knorpelschäden zu erlangen.

2.4.4. Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung erfolgte unter lichtmikroskopischer Betrachtung der HE gefärbten Schnitte durch mindestens zwei Betrachter ohne Kenntnis der Versuchsgruppenzugehörigkeit des Präparats. Zur Evaluierung des Schweregrades der AIA wurden vier Kriterien bestimmt, die nach einem semiquantitativen Score von 0 bis 3 eingeteilt wurden (siehe Tab. 1). Dabei bezeichnet 0 die Abwesenheit des Kriteriums und 3 dessen stärkst mögliche Ausprägung. So kann eine maximale Punktzahl von 15 erreicht werden, die dann mit einer maximal beobachtbaren Ausprägung der AIA korreliert.

Die Ausprägung der Entzündung wurde zum einen anhand der Veränderungen der Membrana synovialis in Form von Mehrschichtigkeit und Synoviozytentransformation, sowie anhand des Entzündungszellinfiltrats und dessen Ausdehnung bestimmt. Chronische Veränderungen wie die Gelenkdestruktion wurden durch die Beurteilung der Knorpelschädigung und der Pannusbildung in die drei Ausprägungsgrade eingeteilt (Hückel et al., 2006).

Als weiterer Parameter zum Zustand des Gelenkknorpels wurden die mit Safranin O gefärbten Schnitte ebenfalls begutachtet (Varisco et al., 2000).

Die gegen VEGF immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden zur weiteren Beurteilung des Entzündungsinfiltrats und des Pannusgewebes herangezogen, da davon auszugehen ist, dass eine vermehrte Angiogenese eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung und Ausprägung des AIA einnimmt.

Bewertung	Synovialmembranveränderung
0,5	kubische Transformationen, ein-/ zweisechichtig, herdförmig monofokal
1	kubische Transformationen, ein-/ zweisechichtig, herdförmig, multifokal
1,5	kubische Transformationen, ein-/ zweisechichtig, Großteil der Membrana synovialis umfassend
2	Kubische Transformationen, mehrschichtig, herdförmig, einzelne Bereiche der Membrana synovialis umfassend
2,5	kubische Transformationen, mehrschichtig, mehrere Bereiche der Membrana synovialis umfassend
3	kubische Transformationen, mehrschichtig, Großteil der Membrana synovialis umfassend
Bewertung	Zellinfiltration
0,5	herdförmige Infiltrate von Lymphozyten/Plasmazellen, nur vereinzelt
1	Herdförmige Infiltrate, an mehreren Stellen, beschränkt auf eine 1-2 Gelenkregionen
1,5	Diffuse Infiltrate, beschränkt auf eine 1-2 Gelenkregionen
2	Herdförmige Infiltrate, ausgedehnt auf >2 Gelenkregionen
2,5	Diffuse Infiltrate, ausgedehnt auf >2 Gelenkregionen
3	Ausgeprägte, diffuse Aggregation der Entzündungszellen im gesamten Gelenk
Bewertung	Knorpelveränderung
0,5	vereinzelt veränderte Zellen (tote Zellen, hypertrophe Zellen, Clusterbildung) normale Schichtung (Superfizialzone vorhanden), oberflächliche Fibrillierung der Superfizialzone
1	vermehrt veränderte Zellen, tieferegehende Fibrillierung, erste Störung der Architektur
1,5	wie bei 1 zusätzlich Einrisse des Knorpels in der oberflächlichen Zone
2	Wie bei 1,5 zusätzlich Verlust von Knorpelsubstanz: Desquamation der Superfizialzone, Knorpeldefekte bis in die mittlere Zone
2,5	Deutliche Destruktion des Knorpels in mehr als 2 Gelenken bzw. Gelenkbereichen (Zellen/Matrix)
3	Extensiver Verlust des Knorpels, freiliegende Knochenoberfläche, Mikrofrakturen, Deformierung der Oberfläche
Bewertung	Pannusbildung
0,5	Angedeutete Entwicklung von Pannusgewebe an ein bis zwei Stellen, mit EZ-Zellen gering infiltriert
1	Deutliche Entwicklung von Pannusgewebe an ein bis zwei Stellen, mit EZ-Zellen deutlich infiltriert
1,5	Ausgeprägte Entwicklung von Pannusgewebe mit Anlagerung auf die Knorpeloberfläche mit EZ-Zellen deutlich infiltriert
2	Oberflächliche Infiltration des Knorpels oder flaches Überwachsen einer Gelenkfläche durch Pannusgewebe
2,5	Tiefe Infiltration des Knorpels oder zungenförmiges Überwachsen mehrerer Gelenkflächen durch Pannusgewebe
3	Ausgeprägte Destruktion des Gelenks durch Pannusgewebe

Tabelle 1 zeigt den verwendete Score zur Schweregradeinteilung der AIA (modifiziert nach Hückel et al., 2006)

2.4.5. Immunhistochemie

Die geeigneten Schnitte wurden mit Xylol und ein einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zur vollständigen Trocknung wurden die Präparate 2-3 Tage im Trockenschrank bei 37°C aufbewahrt. Die Negativkontrolle wurde gekennzeichnet.

Als Puffer zum Spülen der Schnitte wurde eine Lösung aus Trishydroxymethylaminomethan (TRIS, pH 7,6) und Natriumchlorid (NaCl, 0,85%, pH 7,6) im Verhältnis 1:9 verwendet.

2.4.5.1. Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF).

Die Schnitte wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidase in 3% Wasserstoffperoxid-Pufferlösung gespült. Anschließend wurden die Schnitte zunächst in Aqua destillata und dann dreimalig in der Pufferlösung gespült. Die Schnitte wurden dann abgeklopft, waagrecht in eine feuchte Kammer gegeben und 15 min mit Trypsin 0,1% im Wärmeschrank inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Spülen in Pufferlösung wurde das Normalserum (Goat, Dako Cytomation, Dänemark) verdünnt im Verhältnis 1:5 mit Puffer auf die Schnitte pipettiert und bei Raumtemperatur für 20 min. inkubiert. Das Normalserum soll durch Absättigung eine unspezifische Bindung des Erstantikörpers verhindern. Nach wieder dreimaligem Spülen mit Puffer wurde der Primärantikörper aufgebracht (VEGF Rabbit anti-mouse, Polyklonal, AB1876, Chemicon, 1:200). Die Negativkontrolle wurde in diesem Fall nur mit Puffer beträufelt. Die Schnitte wurden in der feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte nach Abklopfen des Primärantikörpers dreimal in Pufferlösung gespült. Dann erfolgte die Beschichtung mit dem Sekundärantikörper (polyklonal goat anti-rabbit, biotinyliert, E0432, Dako Cytomation, Dänemark; 1:200) und eine 40- minütige Inkubation in der feuchten Kammer. Nach einem weiteren Spülvorgang in Pufferlösung wurden die Schnitte mit einem Peroxidase-gelabelten Streptavidin-Biotin Komplex (DAKO A/S) für 30min. versetzt. Dieser Arbeitsschritt ist Teil der Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode. Das enzymmarkierte Streptavidin bindet mit hoher Affinität an den Biotinanteil des Sekundärantikörpers. Im folgenden Arbeitsschritt werden die Schnitte mit AEC Substrat betropft, welches durch das enzymmarkierte Streptavidin eine Farbänderung erfährt und so die Orte sichtbar macht, an denen der Sekundär- und indirekt auch der Primärantikörper gebunden ist.

Nach Auftreten einer sichtbaren Färbung wurden die Schnitte dreimal in Aqua destillata gespült. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit zuvor filtriertem Hämalun. Nach einem

letzten Spülvorgang mit Aqua destillata wurden die Schnitte mit Aquatex (Boehringer) eingedeckt und so versiegelt.

2.5. Statistische Auswertung

Die Prüfung der Messergebnisse auf statistisch relevante Gruppenunterschiede erfolgt mit dem Wilcoxon-Rangsummentest für nicht-parametrische Daten. Für die Berechnung wurde das Programm „R“ in der Version 2.5.1. verwendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der unterschiedlichen Ausprägung einer Antigen-induzierten Arthritis an Mäusen bei zwei Versuchsgruppen:

- Wildtyp C57BL/6 (WT)
- MMP-19 Knockout C57BL/6 (MMP-19^{-/-})

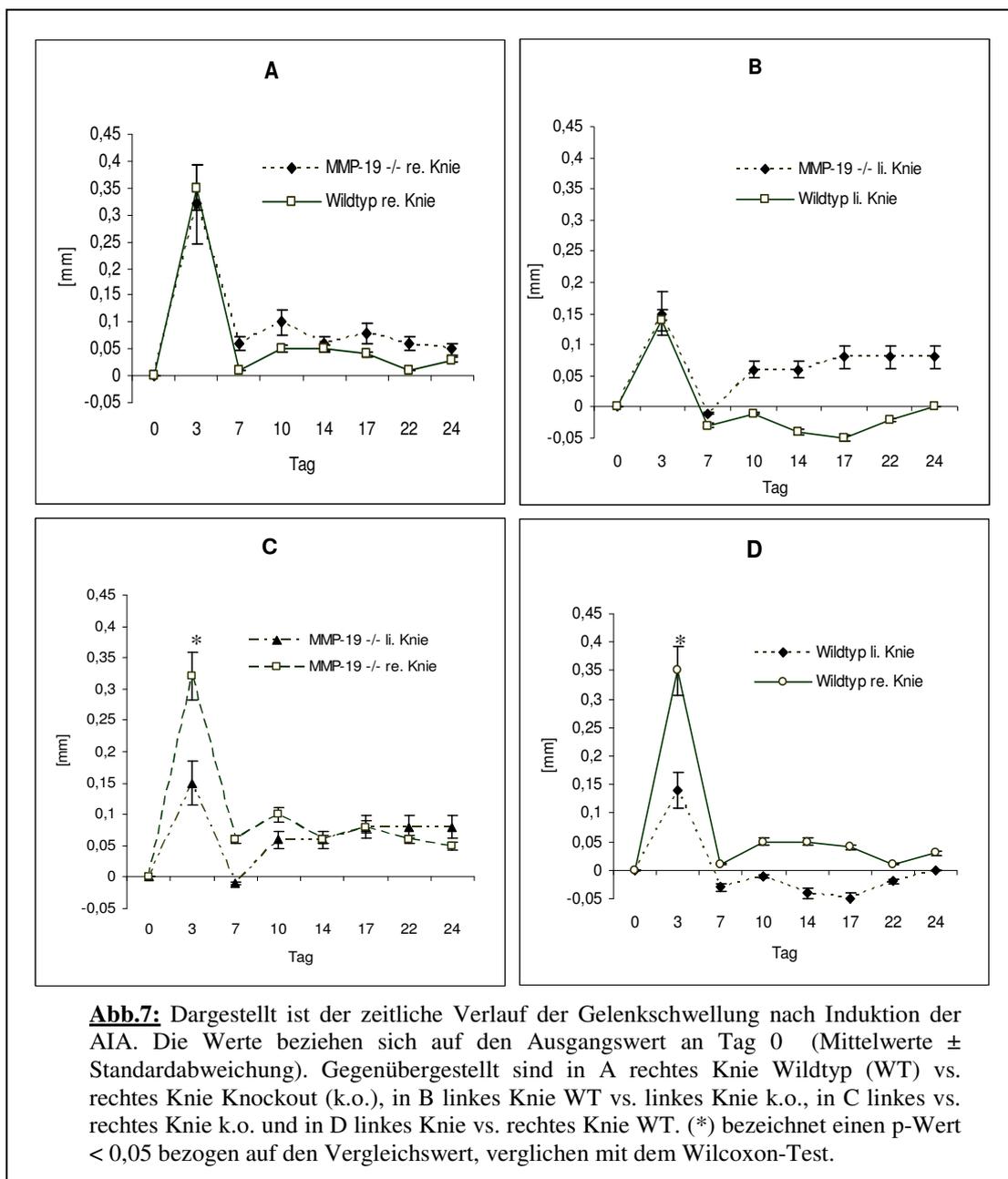
Die Induktion der AIA an Tag 0 erfolgt bei den Versuchsgruppen synchron und nach einheitlichem Protokoll.

Als klinischer in vivo Parameter wurde der Gelenkdurchmesser an verschiedenen Tagen der Studie gemessen. Nach Beendigung der Studie erfolgt eine μ -CT Untersuchung der Tibia und eine histologische Analyse der Kniegelenke.

Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.1. Kniegelenksdurchmesser

An Tag 3 nach Arthritisinduktion zeigte sich sowohl in der WT- Gruppe (+0,34mm \pm 3,4%) wie auch in der MMP-19^{-/-}- Gruppe (+0,29mm \pm 5,7%) eine deutliche Zunahme des Gelenkdurchmessers des rechten Knies. Das mit PBS behandelte linke Knie beider Gruppen zeigte ebenfalls an Tag 3 eine leichte Zunahme des Gelenkdurchmessers (Wildtyp +0,14mm \pm 3,5%; Knockout +0,15mm \pm 5,7%). Dieser Anstieg fiel aber im Vergleich zu den rechten Knien von WT und MMP-19^{-/-} geringer aus. Innerhalb der Versuchsgruppen ließ sich in beiden Fällen (re. WT vs. re. MMP-19^{-/-} und li. WT vs. li. MMP-19^{-/-}) kein signifikanter Unterschied feststellen ($p > 0,05$). Der beschriebene Anstieg des Gelenkdurchmessers an Tag 3 fiel in allen Fällen nach dem 7. Tag wieder ab und pendelte sich auf das Niveau des Ausgangswerts and Tag 0 ein.



3.2. Histologische Auswertung

3.2.1 Histologisches Scoring

Die histologische Auswertung erfolgte an den HE gefärbten Schnitten. Es wurden die vier Primärparameter Synovialmembranveränderungen (S.), Zellinfiltration (I.), Knorpelveränderung (K.) und Pannusbildung (P.) erfasst. Die ersten beiden Primärparameter werden zum Entzündungsscore (EZ) zusammengefasst, die letzten beiden zum

Destruktionsscore (DS). Die Summe aus den Sekundärparametern wiederum ergibt den Gesamtarthritisscore (Arth.).

Synovialmembranveränderungen

Die Veränderungen der Synovialmembran sind in den rechten arthritischen Knien von WT ($1,42 \pm 0,3$) und MMP-19^{-/-} ($1,3 \pm 0,2$) nicht signifikant ($p > 0,05$) unterschiedlich, aber unterscheiden sich zu den korrespondierenden linken Knien (WT: $0,42 \pm 0,04$; MMP-19^{-/-} $0,4 \pm 0,04$) signifikant ($p < 0,05$).

Zellinfiltration

Im Vergleich der rechten Knie des WT ($1,5 \pm 0,3$) und der rechten Knie des MMP-19^{-/-} ($1,7 \pm 0,2$) ergibt sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Zellinfiltration ($p > 0,05$). Gleiches gilt für die Gegenüberstellung von linkem Knie WT ($0,58 \pm 0,03$) und linkem Knie MMP-19^{-/-} ($0,4 \pm 0,04$). Die Zellinfiltration ist bei den rechten Knien von Wildtyp und MMP-19^{-/-} signifikant stärker ausgeprägt als bei den linken Knien ($p < 0,05$).

Knorpelveränderungen

Die Veränderungen des Knorpels zeigen beim Vergleich rechtes Knie WT ($1,25 \pm 0,2$) mit rechtem Knie MMP-19^{-/-} ($0,6 \pm 0,06$) einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), wobei die Knorpelveränderungen beim WT doppelt so stark (+108%) ausgeprägt sind wie beim Knockout. Beim Vergleich von linkem Knie WT ($0,08$) mit linkem Knie MMP-19^{-/-} (0) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Bei der Gegenüberstellung der rechten mit den linken Knien von Wildtyp und MMP-19^{-/-} zeigt sich ein signifikanter Unterschied, wobei die Knorpelveränderungen in den rechten Knien jeweils stärker ausgeprägt sind. In den linken Knien finden sich kaum Knorpelveränderungen.

Pannusbildung

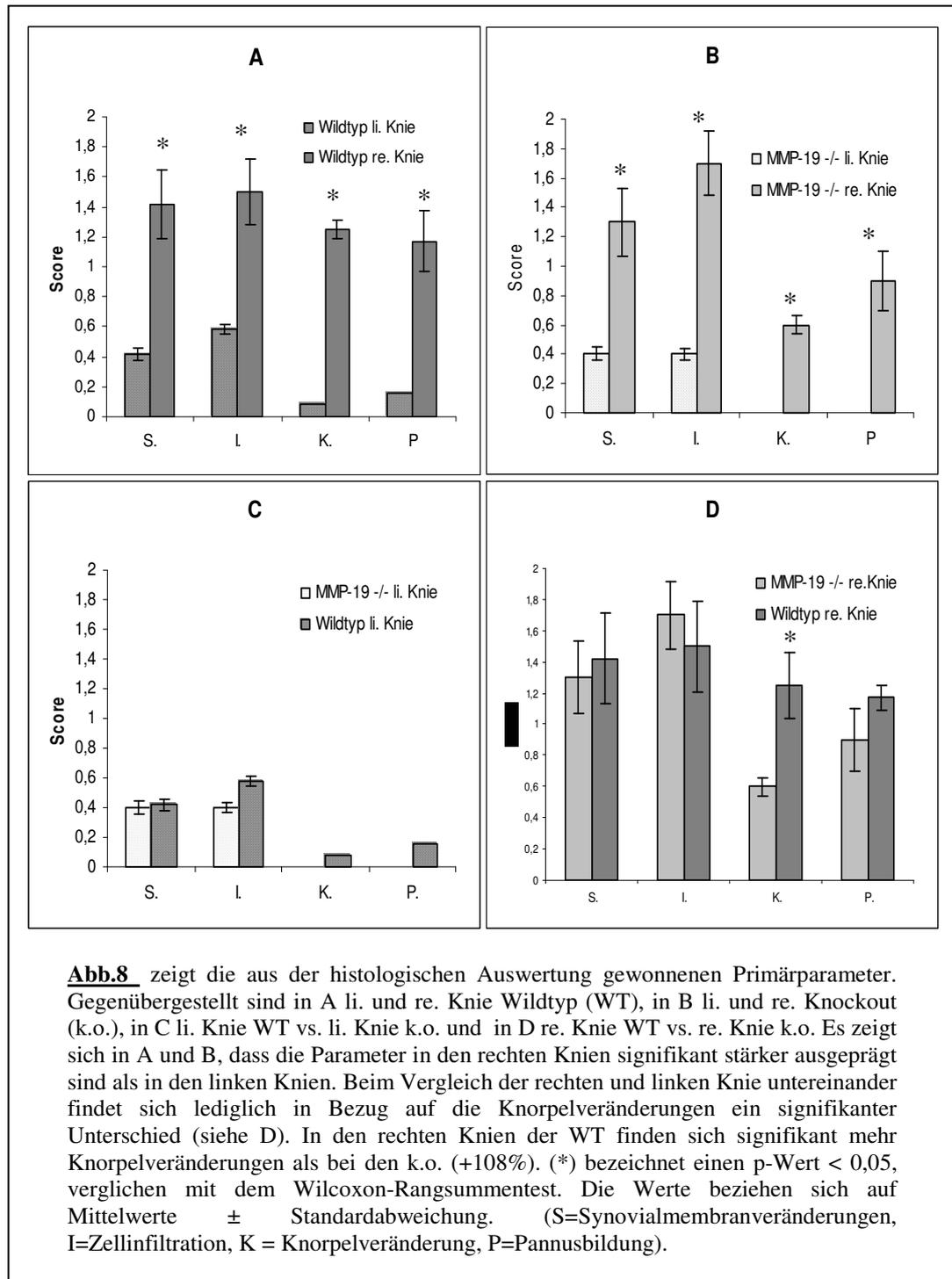
Die Ausprägung der Pannusbildung zeigt sich in den rechten Knien von WT ($1,17 \pm 0,08$) und MMP-19^{-/-} ($0,9$) signifikant höher als in den korrespondierenden linken Knien von WT ($0,16$) und MMP-19^{-/-} (0). Beim Vergleich der rechten Knie WT vs. rechte Knie Knockout lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen, obwohl die Pannusbildung beim Wildtyp um 30% stärker ausgeprägt ist als beim Knockout. Die Gegenüberstellung linkes Knie Wildtyp vs. linkes Knie ergibt keine signifikanten Unterschiede, da es kaum zu einer Pannusbildung gekommen ist.

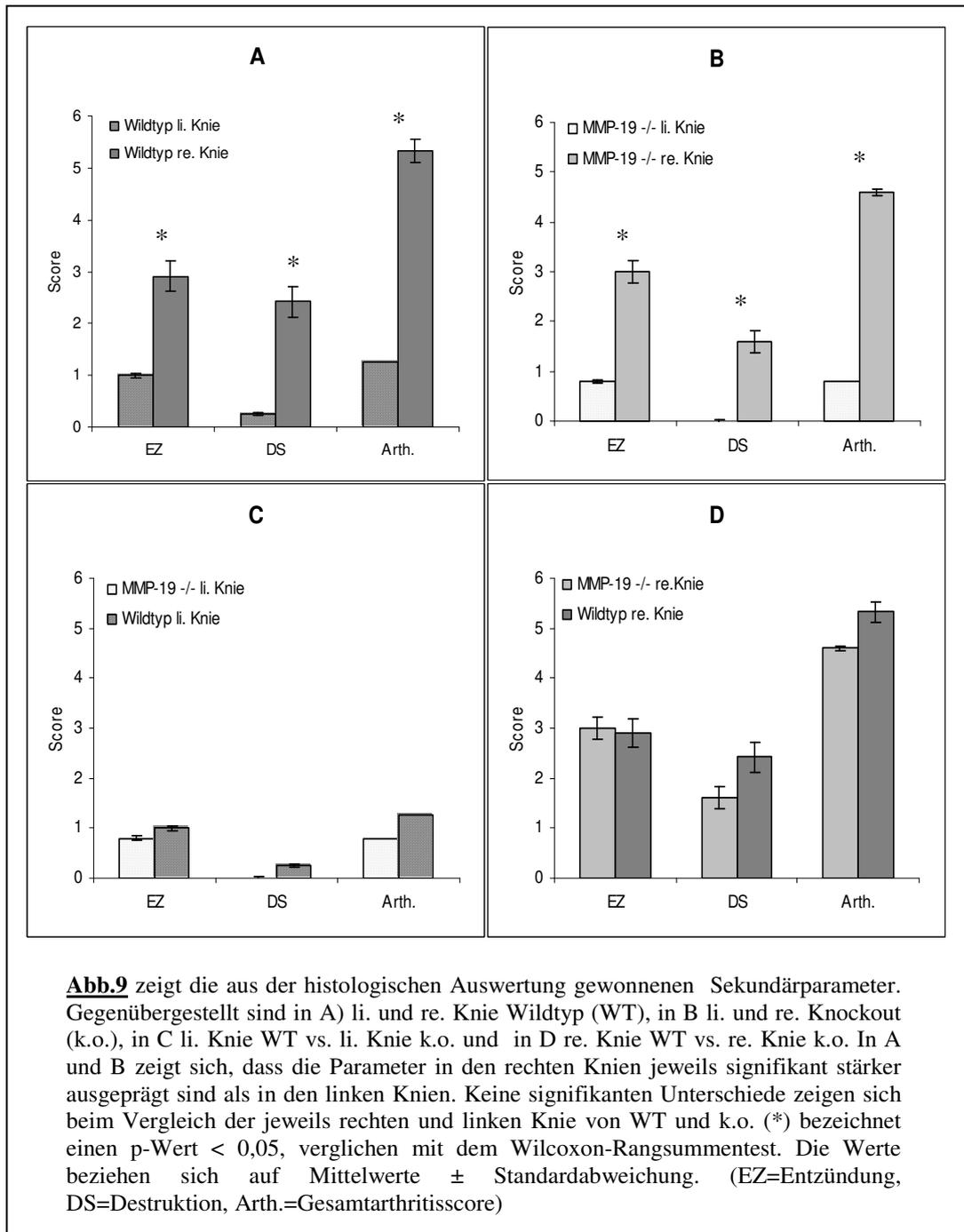
Zusammenfassung

In allen rechten Knien von Wildtypen und MMP-19^{-/-} lassen sich Zeichen einer arthritischen Veränderungen nachweisen. Es lässt sich nur für die Knorpelveränderungen eine signifikant schwächere Ausprägung im rechten Knie der Knockout-Mäuse im Vergleich zu den rechten Knien der Wildtypen feststellen. Für die anderen Primärparameter lässt sich nicht feststellen, dass die MMP-19^{-/-} eine mildere oder stärkere Verlaufsform der Arthritis im Vergleich zu den Wildtypen aufweisen. Der Gesamtarthritisscore weist für die rechten WT- Knie im Vergleich zu den rechten MMP-19^{-/-} -Knien keinen signifikanten Unterschied auf. Aus den Sekundärparametern geht hervor, dass in arthritischen Knien die Entzündung ($3 \pm 0,03$) stärker ausgeprägt ist als die Destruktion ($1,3 \pm 0,2$). Obwohl die Destruktion in den rechten Knien der Wildtypen um 50% stärker ausgeprägt ist als in den rechten Knien der Knockout-Mäuse ist dieser Unterschied nach Testung mit dem Wilcoxon-Test als nicht signifikant einzustufen.

Die linken Knie weisen im Allgemeinen nur sehr geringe entzündliche Veränderung auf (0,9) und kaum messbare destruktive Anzeichen (0,1).

Es kann daraus geschlossen werden, dass sich in dieser Studie eine rechts unilaterale Arthritis mit einer Inzidenz von 100% entwickelt hat.





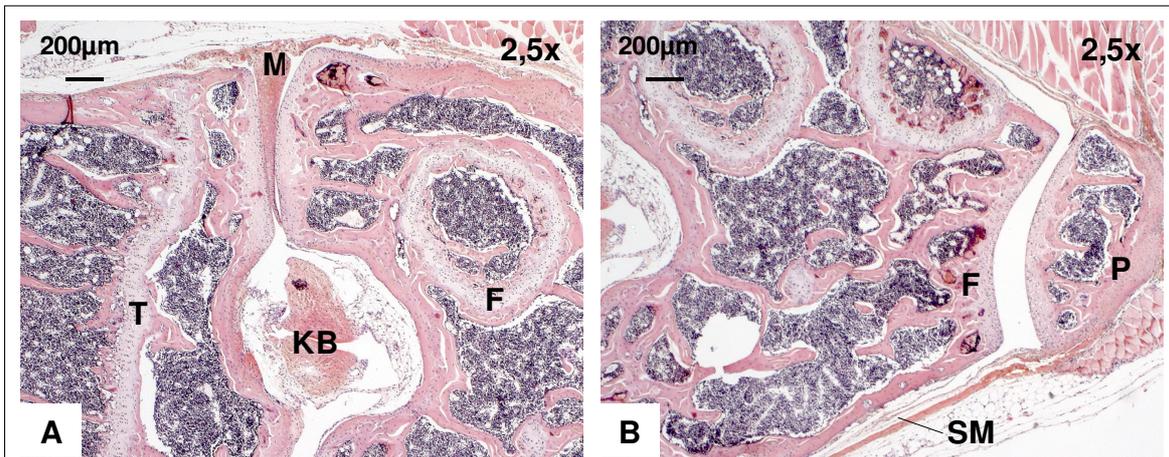


Abb. 10: HE gefärbter Ausschnitt eines linken nicht-arthritischen Kniegelenks einer Wildtyp-Maus. A zeigt den femuro-tibialen, B den femuro-patellaren Gelenkanteil. (F=Femur, KB=Kreuzbänder. M=Meniskus. P=Patella. SM=Synovialmembran)

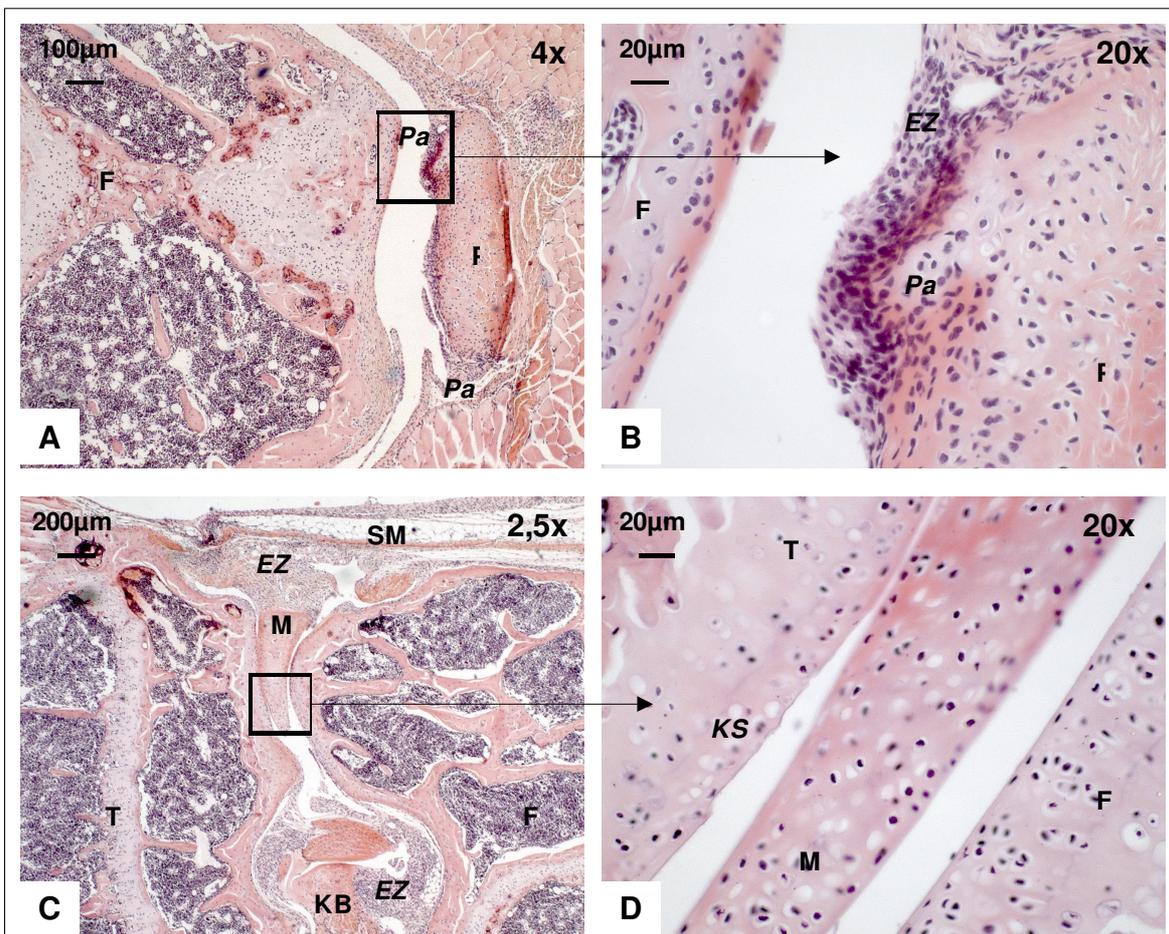


Abb. 11: Rechtes HE gefärbtes arthritische Kniegelenk einer Wildtyp-Maus. A zeigt den femuro-patellaren Gelenkanteil, B eine Vergrößerung des destruiert wachsenden Pannusgewebes (*Pa*). C zeigt den femuro-tibialen Gelenkanteil mit reichlich Entzündungszellinfiltrat (*EZ*), D eine Ausschnittsvergrößerung einer Knorpelauffaserung (*KS*). (F=Femur, KB=Kreuzbänder, M=Meniskus, P=Patella, T=Tibia; *EZ*=Entzündungszellinfiltrat, *KS*=Knorpelschaden, *Pa*=Pannus)

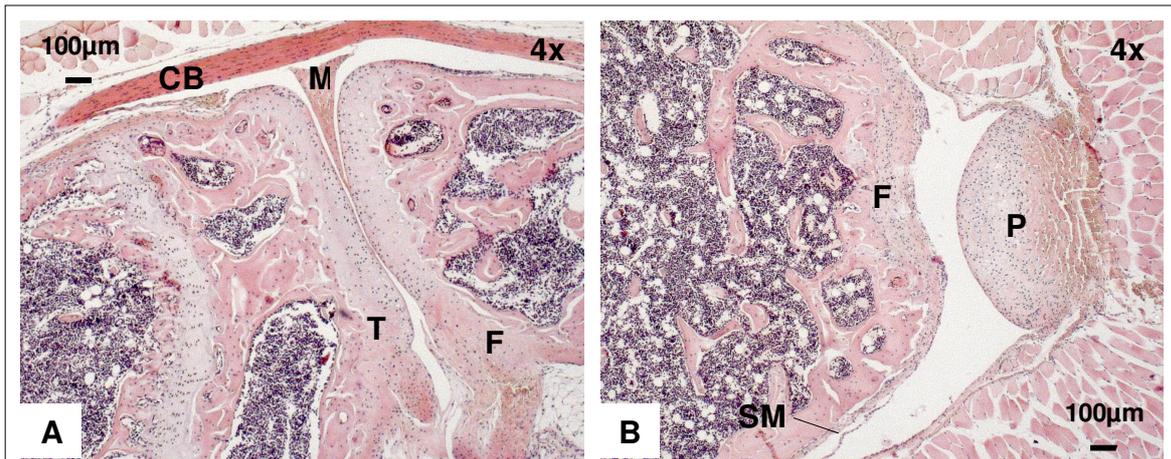


Abb. 12: HE gefärbter Ausschnitt eines linken nicht-arthritischen Kniegelenks einer Knockout-Maus. A zeigt den femuro-tibialen, B den femuro-patellaren Gelenkanteil. (CB=Kollateralband, F=Femur, KB=Kreuzbänder. M=Meniskus. P=Patella. SM=Synovialmembran)

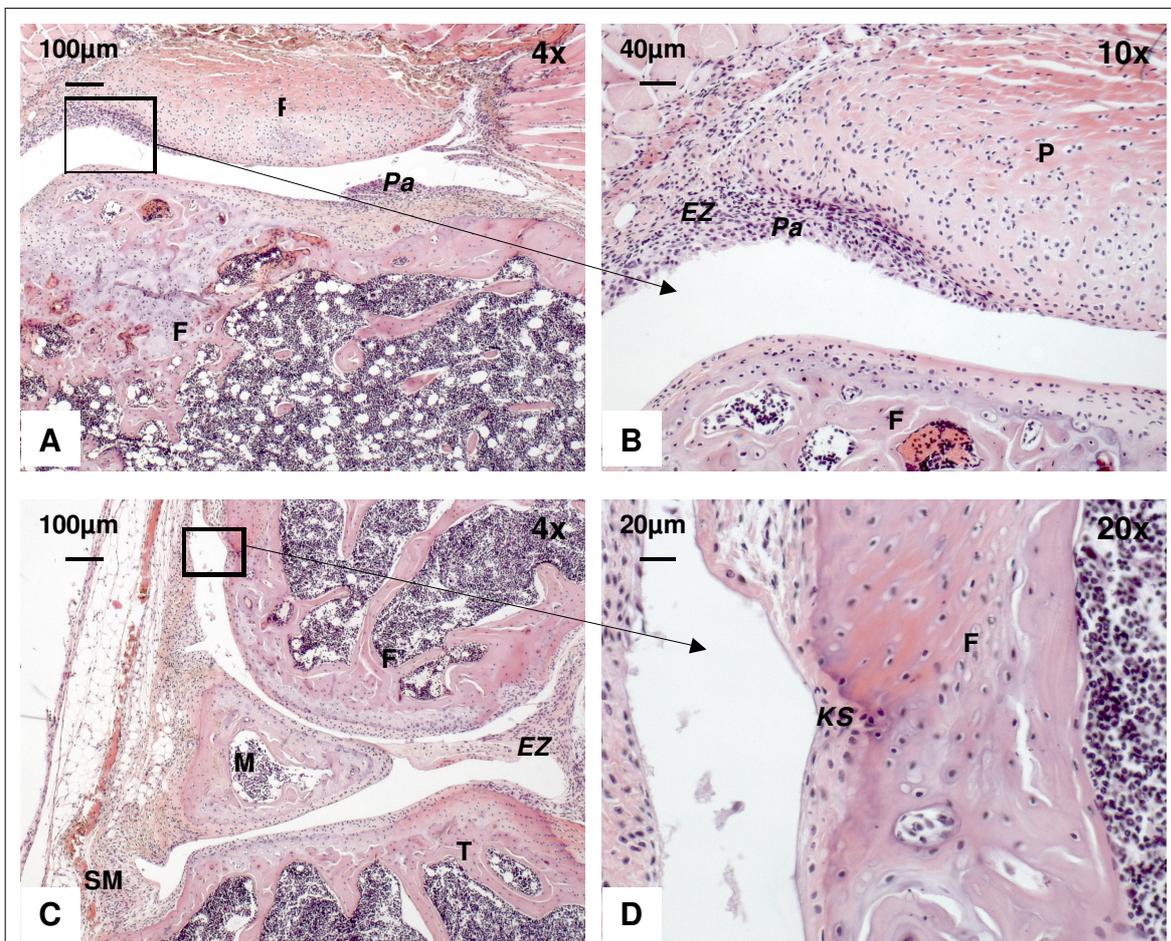


Abb. 13: Rechtes HE gefärbtes arthritische Kniegelenk einer Knockout-Maus. A zeigt den femuro-patellaren Gelenkanteil, B eine Vergrößerung des destruiert wachsenden Pannusgewebes (*Pa*). C zeigt den femuro-tibialen Gelenkanteil mit reichlich Entzündungszellinfiltrat (*EZ*), D die Ausschnittsvergrößerung zeigt eine Knorpeldestruktion (*KS*). (F=Femur, M=Meniskus, P=Patella, SM=Synovialmembran, T=Tibia; *EZ*=Entzündungszellinfiltrat, *KS*=Knorpelschaden, *Pa*=Pannus)

3.2.2 Auswertung der Safranin O-Färbung

Mittels der Safranin O gefärbten Präparate ist es möglich den Proteoglykangehalt des Knorpels zu evaluieren. Dabei zeigt sich, dass die rechten Knie von Wildtyp und Knockout im Vergleich zu den linken Knien stets eine geringere Färbeintensität und somit einen geringeren Proteoglykangehalt des Knorpels aufweisen.

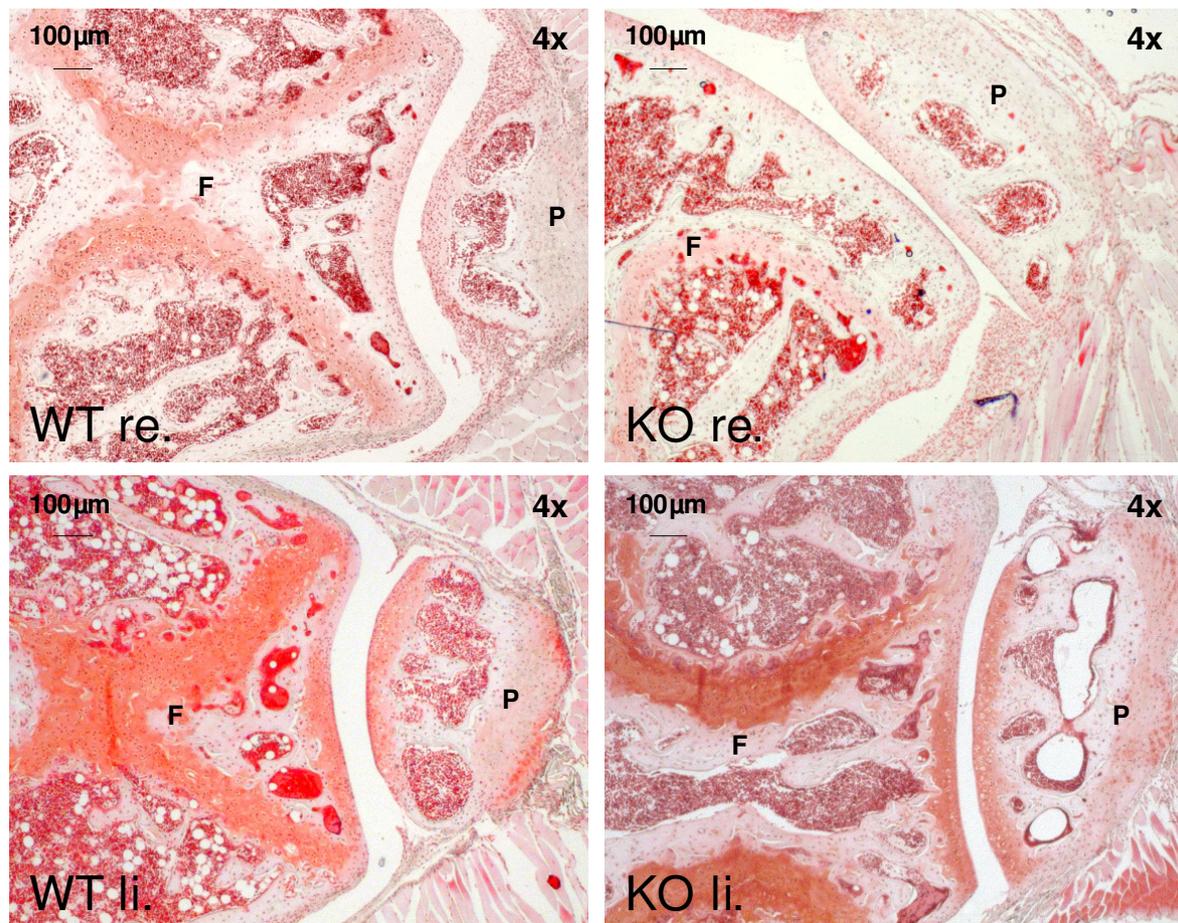
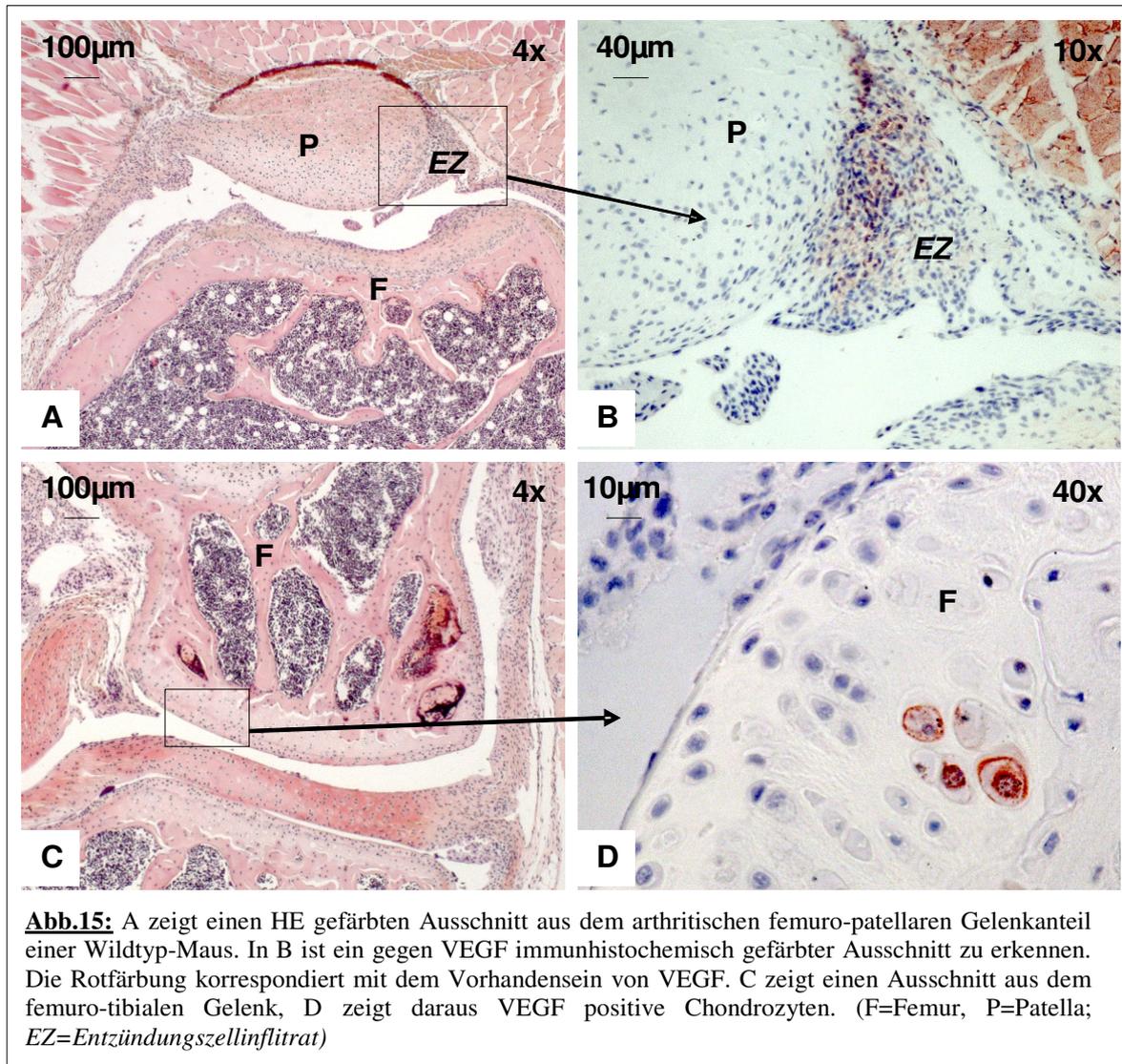


Abb.14 zeigt Safranin-O gefärbte Ausschnitte aus dem femuro-patellaren Gelenk. Zu erkennen ist die stärkere Entfärbung des Knorpels im rechten Knie von WT und k.o. gegenüber den linken Knien. (F=Femur, P=Patella)

3.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen VEGF

VEGF ist ein wichtiger Faktor der Neoangiogenese. Die Auswertung der Färbung ergab, dass in den arthritischen Knien von WT und k.o. die immunhistochemische Färbung gegen VEGF intensiver war, als in den nicht-arthritischen Knien. Es ließ sich kein Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp herausarbeiten. Auffällig ist, dass sich VEGF zum einen vermehrt im Pannusgewebe und im Entzündungszellinfiltrat anfärben ließ, zum anderen aber auch in den

Chondrozyten der tiefergelegenen Knorpelschichten nachweisbar war. Exemplarisch ist dies in Abbildung X verdeutlicht.



3.3. Trabekelstrukturanalyse

Die Analyse der mikrostrukturellen Parameter wurde für alle Proben in der periartikulären Tibia innerhalb eines identischen VOI mit Hilfe des Programms „Insight“ ermittelt (siehe Methoden). Folgende Parameter wurden untersucht: BV/TV [%], BS/TV [mm^{-1}], Tb.N. [mm^{-1}], Tb.Th. [μm] und Tb.Sp. [mm].

Dabei wurden die Vergleichswerte (Standardwerte) durch Messungen an unbeteiligten gesunden Wildtyp-Mäusen erhoben. Diese Gruppe wird im Folgenden als Vergleichsgruppe bezeichnet.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt nach Parametern getrennt.

BV/TV (Knochenvolumenanteil) [%]

Der Anteil des trabekulären Knochenvolumens (BV) am Gesamtgewebevolumen (TV) bezeichnet den Knochenvolumenanteil (BV/TV). Der relative Knochenvolumenanteil beträgt bei den gesunden Vergleichstieren im Mittel $15\% \pm 3$. Sowohl bei den Wildtypmäusen wie auch bei den MMP-19^{-/-}-Mäusen findet sich auf der arthritischen rechten Seite sowie auf der nicht-arthritischen linken Seite eine signifikante Erniedrigung des Knochenvolumenanteils ($p < 0,05$). Der Knochenvolumenanteil sank dabei bei den Wildtypen links auf $3\% \pm 1$ und rechts auf $5\% \pm 1$. Bei den MMP-19^{-/-} sank BV/TV links auf $6\% \pm 1$ und rechts auf $5\% \pm 2$. Beim Vergleich der Wildtypen und Knockout-Tiere ergaben sich weder interindividuell noch gruppenübergreifend signifikante Unterschiede.

BS/BV [mm^{-1}]

Um die spezifische Trabekeldichte (BS/BV) zu erhalten, wird die Trabekeloberfläche (BS) in Relation zum Trabekelvolumen (BV) betrachtet.

Der Wert für die gesunde Vergleichsgruppe liegt bei $55,54 \text{ mm}^{-1} \pm 7,4$. Auf der arthritischen rechten Seite von WT ($62,33 \text{ mm}^{-1} \pm 5,1$) und MMP-19^{-/-} ($64,24 \text{ mm}^{-1} \pm 5,4$) zeigt sich mit einer Steigerung von 14% (WT) bzw. 15% (MMP-19^{-/-}) ein signifikanter Anstieg der spezifischen Trabekeloberfläche ($p < 0,05$). Dies ist ebenfalls für die linke Seite der Wildtypen mit einem Anstieg von 21% ($67,51 \text{ mm}^{-1} \pm 5,9$) zutreffend.

Auf der linken Seite der Knockout-Mäuse stieg BS/BV zwar um 7% ($59,44 \text{ mm}^{-1} \pm 7,4$), jedoch ist dieser Anstieg nicht als signifikant zu werten ($p > 0,05$). Allerdings ist BS/BV auf der linken Seite der Knockout-Mäuse signifikant niedriger als bei den Wildtypen ($p < 0,05$).

Tb.N. [mm^{-1}]

Die Trabekelanzahl (Tb.N.) gibt an, wie viele Trabekel innerhalb des untersuchten Volumens nachzuweisen sind. Der Durchschnittswert für die gesunde Vergleichsgruppe liegt bei $4,1 \text{ mm}^{-1} \pm 1$.

Bei allen Versuchstieren lässt sich beidseits periartikulär eine sehr starke Verminderung der Trabekelanzahl feststellen. Bei den Wildtypen beträgt sie links -72% ($1,13 \text{ mm}^{-1} \pm 0,33$) und rechts -64% ($1,47 \text{ mm}^{-1} \pm 0,35$) in Bezug auf den Wert der Vergleichsgruppe.

Bei den MMP-19^{-/-}-Mäusen war die Trabekelanzahl links um 60% ($1,6 \text{ mm}^{-1} \pm 0,37$) und rechts um 68% ($1,3 \text{ mm}^{-1} \pm 0,58$) signifikant reduziert.

Kein signifikanter Unterschied kann beim Vergleich von Wildtyp und Knockout interindividuell bzw. miteinander herausgearbeitet werden.

Tb.Th [μm]

Tb.Th („Trabecular Thickness“) bezeichnet die durchschnittliche Trabekeldicke innerhalb des Messbereiches. Der Mittelwert für die gesunde Vergleichsgruppe beträgt $37\mu\text{m} \pm 5$.

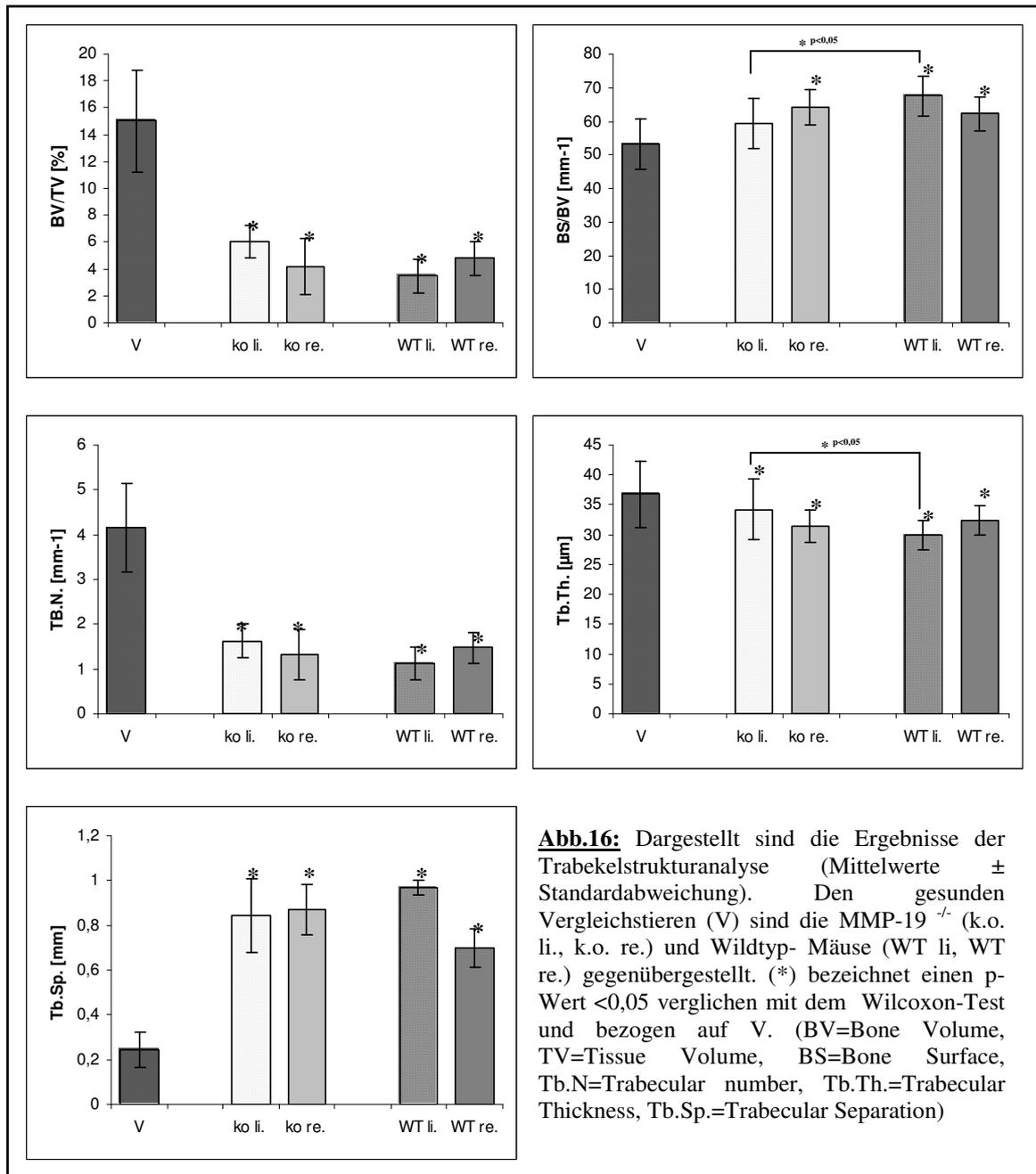
Auf der arthritischen Seite von Wildtypen und Knockouts sowie auf der linken Seite des Wildtyps ließ sich eine signifikante Verminderung der Trabekeldicke feststellen.

Ausgehend vom Mittelwert der Vergleichsgruppe beträgt die Reduktion für die linke Seite des Wildtyps -19% ($30\mu\text{m} \pm 2$), für die rechte Seite des Wildtyps -14% ($32\mu\text{m} \pm 2$) und für die rechte Seite des Knockouts -17% ($31\mu\text{m} \pm 2$). Die linke nicht-arthritische Seite des Knockouts zeigt zwar einen Abfall der Trabekeldicke, dieser ist jedoch mit -8% ($34\mu\text{m} \pm 5$) nicht signifikant. Zudem lässt sich im Vergleich mit der rechten Seite des Knockouts feststellen, dass die Trabekeldicke links signifikant weniger reduziert ist als rechts ($p < 0,05$).

Tb.Sp [mm]

Tb.Sp. („Trabecular Separation“) beschreibt den durchschnittlichen Abstand der Trabekel zueinander. Für die gesunde Vergleichsgruppe liegt Tb.Sp. bei $0,25\text{mm} \pm 0,08$.

Für alle MMP-19^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse lässt sich eine sehr starke Vergrößerung des Trabekelabstandes festhalten. Für die Wildtypen liegt dies links bei +304% ($0,97\text{mm} \pm 0,03$) und rechts bei +192% ($0,70 \pm 0,08$). Bei den MMP-19^{-/-}-Mäusen vergrößert sich Tb.Sp. im Vergleich mit den gesunden Mäusen links zu 250% ($0,84 \pm 0,16$) und rechts zu 263% ($0,87 \pm 0,11$). Innerhalb der Gruppen sowie beim interindividuellen Vergleich ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.



4. Diskussion

Knockout-Studien haben in der Forschung einen besonderen Stellenwert. Zum einen eignen sie sich in der Grundlagenforschung dazu, die Bedeutung einzelner Proteine z.B. für die Ausprägung einer Erkrankung herauszufiltern. Zum anderen können Knockout-Studien auch neue therapeutische Ansätze liefern. Denn zeigt sich in einer Studie ein herausragender Vorteil der Knockout-Spezies, kann dies ein Anreiz sein, zielgerichtete Proteininhibitoren zu entwickeln. Für die RA gilt, dass ihre Pathogenese weitgehend ungeklärt ist. Bekannt ist aber, dass insbesondere bei der Gelenkzerstörung ein Ungleichgewicht von Matrixmetalloproteinasen untereinander und ihren natürlichen Inhibitoren eine Rolle spielt. Ebenso setzen die verfügbaren Therapien vielmehr dabei an, Schmerz und Entzündung zu reduzieren, als die eigentlichen Ursachen der Gelenkzerstörung zu beseitigen. Es gibt Medikamente wie Immunmodulatoren und Kortikosteroide, die die Gelenkdestruktion verlangsamen können. Allerdings wirken diese weder adäquat noch spezifisch genug, um die Gelenkzerstörung zu verhindern. Nicht zuletzt deswegen stehen MMP-Knockout Studien und experimentelle Versuche mit MMP-Inhibitoren immer mehr im Mittelpunkt der Arthritisforschung. Seit 1970 wurden ca. 30 Arthritispezifische MMP-Inhibitoren entwickelt, von denen es allerdings keiner bis zur Zulassung geschafft hat (Peterson, 2006). Häufiges Problem ist das Auftreten von schwerwiegenden Nebenwirkungen wie dem muskuloskeletalen Syndrom (MSS), welches sich mit Gelenkschmerzen und -steifheit, Ödemen und einer Einschränkung der Mobilität präsentiert. Alle Nebenwirkungen, die bei Patienten mit einer arthritischen Grunderkrankung nicht tolerierbar sind.

Auch bei bisher durchgeführten MMP-Knockout-Studien zeigten sich teils unerwartete Ergebnisse. Manche Knockout-Tiere entwickelten einen eigenen gravierenden Phänotyp wie bei MMP-14 (Membrantyp 1-MMP) Knockout-Mäusen (Holmbeck et al., 1999) mit Zwergwuchs, Osteopenie und Dysmorphien. In einer Studie von Itoh et al. mit MMP-2 und MMP-9 Knockout-Mäusen zeigte sich ein scheinbar widersprüchliches Ergebnis. Bei den MMP-9 Knockouts verlief wie erwartet die Arthritis milder als bei den Wildtypen, bei den MMP-2 Knockouts hingegen zeigte sich eine stärkere Ausprägung der Arthritis. Es wurde diskutiert, dass MMP-2 eine Arthritis dadurch abmildere, dass sie auch nicht-matrix Substrate wie z.B. inflammatorische Zytokine spaltet. Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig jede weitere Erkenntnis über die Struktur, Regulation und Funktion einzelner MMPs ist, um neue Strategien gegen die chronische Gelenkdestruktion der Arthritis zu entwickeln.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor diesem Hintergrund diskutiert werden, um herauszustellen, welche Bedeutung MMP-19 für die einzelnen Komponenten der AIA hat.

4.1 Kniegelenksdurchmesser

Die rechten arthritischen Knie der MMP-19^{-/-} und Wildtyp-Mäuse wiesen an Tag 3 einen signifikanten Anstieg des Gelenkdurchmessers auf. Diese Schwellung repräsentiert die akut exsudativ-proliferative Phase der AIA. Das intraartikulär injizierte mBSA bildet Immunkomplexe mit den vorher gebildeten spezifischen mBSA-Antikörpern (Cooke et al., 1983). Über eine Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu einer erhöhten Zytokinausschüttung (Dorner et al., 2004). Insbesondere die Typ-A Synoviozyten sezernieren große Mengen an Interleukin-1 und TNF- α (Renz-Polster et al., 2004). Die genannten Zytokine und weitere Mediatoren wie Histamin und Leukotriene führen zur Vasodilatation und zur Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Das hat den Austritt von seröser Flüssigkeit und somit den Gelenkerguss zur Folge. Aber auch die ausgeprägte Infiltration des Gelenks mit Entzündungszellen wie Leukozyten und Granulozyten wird durch die erhöhte Permeabilität getriggert (Böcker et al., 2004)

Die dezentere Schwellung der linken Knie von MMP-19^{-/-} und Wildtyp-Mäusen kann zum einen mit einer lokalen Reaktion auf die TBS-Injektion erklärt werden. Zum anderen könnte aber auch eine systemische Wirkung der mBSA-Reaktion ursächlich sein. Letzteres scheint unter Berücksichtigung der geringeren histologischen Arthritisausprägung in diesen Knien aber unwahrscheinlicher.

Die Rückbildung der Schwellung bis zum Tag 7 lässt sich durch den Rückgang der akuten Entzündung und den Übergang zu sekundär chronischen Prozessen (Lymphozyteneinwanderung, Pannusbildung) erklären.

Die Gelenkschwellung eignet sich für das Monitoring der akuten Entzündung. Der uniforme Verlauf der Gelenkschwellung der arthritischen Knie von MMP-19^{-/-} und Wildtyp-Mäusen deutet darauf hin, dass in der akuten Phase der AIA die Bedeutung von MMP-19 als eher gering einzustufen ist. Es ist anzunehmen, dass destruktiven Faktoren, wie z.B. MMP-19 erst in einer späteren Phase der RA Bedeutung zukommt. Die vermutete Funktion von MMP-19 als Autoantigen in der humanen rheumatoiden Arthritis wird in diesem murinen Modell durch den Einsatz von mBSA als Fremdanigen abgelöst. Daher fällt es schwer seine Bedeutung zu beurteilen. Der Nachweis von MMP-19 als Angiogenesefaktor in akut entzündetem

Synovium (Kolb et al., 1999), scheint im verwendeten murinen Modell keinen Einfluss auf die initiale Ausprägung der Gelenkschwellung zu haben.

4.2. Histologie

Die histologische Betrachtung der Kniegelenke umfasst neben der Auswertung von Entzündungs- und Destruktionsparametern auch die Evaluation von Safranin-O Färbungen und immunhistochemisch aufgearbeiteten Schnitten.

Vorweg lässt sich sagen, dass die nicht immunisierten linken Knie der Versuchstiere kaum Destruktionszeichen und nur leichte entzündliche Veränderungen zeigen. Diese könnten zum einen durch eine lokale Reaktion auf die intraartikuläre Injektion des TBS Puffers entstanden sein. Oder im Sinne einer bilateralen Wirkung des mBSA zu erklären sein. Selbst bei einseitiger lokaler Injektion des mBSA als Fremdanigen in das rechte Kniegelenk ist nicht auszuschließen, dass es über den Blutkreislauf auch auf die Gegenseite wirkt. Allerdings sind die Entzündungszeichen mit dezenter Zellinfiltration auch nur bei wenigen Tieren nachweisbar, so dass es nicht gerechtfertigt scheint von einer bilateralen Arthritis auszugehen. So bleibt es schwierig die beobachteten Veränderungen einzuordnen, da es unwahrscheinlich scheint, dass sich eine Reaktion auf einen lokalen Reiz über den ganzen Studienzeitraum von 3 Wochen aufrechterhält.

Das Ausmaß der Zellinfiltration in das Gelenk und die synoviale Hyperplasie wurden als Entzündungsscore zusammengefasst. In dieser Arbeit zeigt sich beim Vergleich der arthritischen rechten Knie kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Knockout-Tieren. Die Entzündung kam in den arthritischen rechten Knien jeweils gleich stark zur Ausprägung unabhängig davon, ob es sich um ein Knockout-Tier handelt oder nicht. Die Transformation der Synovialmembran ließ sich besonders häufig im retropatellären Bereich und im Bereich der Menisken nachweisen. Besonders deutlich zeigte sich die massive Zellinfiltration der sonst zellarmen Membrana synovialis.

Die synoviale Hyperplasie als Ausdruck der akuten Synovitis ist durch vermehrte Proliferation und eine gestörte Apoptose der Synoviozyten bedingt. Vermittelt wird dieser Prozess wie auch die Einwanderung von Zellen in das Gelenk durch verschiedene Zytokine. Zu diesen Zytokinen gehören TNF- α , IL-1 und IL-17. Eine Studie von Zwerina et al. 2004 mit IL-1 und TNF- α Antagonisten bei Mäusen mit einer Arthritis unterstützt deren Bedeutung für die synoviale Entzündungsreaktion. So kann durch die Kombination eines TNF- α

Inhibitors mit einem IL-1-Rezeptorantagonisten die Entwicklung der synovialen Entzündung um 91% reduziert werden. Eine Arbeit von Irmeler et al. 2007 erbrachte, dass insbesondere IL-17 in der akuten Phase der AIA das Ausmaß der Zellinfiltration und Synovitis bestimmt. Die zitierten Arbeiten legen nahe, dass MMPs als Matrixspaltende Enzyme eine eher untergeordnete Rolle in Bezug auf die Ausprägung der Entzündung spielen. Allerdings ist von immer mehr MMPs bekannt, dass sie durch die Spaltung von nicht-Matrixkomponenten wie z.B. IL-1 durchaus Entzündungsvorgänge beeinflussen können. Dies wurde auch bei einer Studie von Itoh et al. 2002 an MMP-2 Knockout-Mäusen deutlich, bei denen die Zellinfiltration durchschnittlich stärker ausgeprägt war als bei den Wildtypen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich sagen, dass MMP-19 die Entzündung wohl nicht beeinflusst, was daran liegen könnte, dass entweder der Mangel durch andere MMPs und Zytokine kompensiert wird oder dass MMP-19 hauptsächlich Matrixkomponenten aufspaltet und nicht durch andere Interaktionen in die Entzündungskaskade eingreift.

Bei der Evaluation der Destruktion wurden die Knorpelveränderungen und die Bildung von Pannusgewebe berücksichtigt. Diese sollen zusammen mit den Ergebnissen der Safranin-O und den immunhistochemischen Färbungen charakterisiert werden.

Bei der Mehrzahl der arthritischen rechten Knie von Wildtypen und Knockouts fand sich Pannusartig strukturiertes Gewebe, welches mit Entzündungszellen infiltriert war. Jedoch waren diese Formationen bei den beiden Versuchsgruppen gleichmäßig vorhanden, was wiederum auf eine untergeordnete Bedeutung von MMP-19 bei der Ausbildung von Pannusgewebe hinweisen könnte.

Im Verlauf der Arthritis kommt es zur Transformation der Synoviozyten zu Pannusgewebe. Pannus wächst lokal invasiv, einem Tumor ähnlich in das Gelenk vor und erodiert Gelenkknorpel, Knochen, Sehnen und Bänder. Diese Transformation wird von einer Vielzahl von Mediatoren vermittelt, wozu Cytokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und auch MMPs gehören. Wang et al. konnten 2004 zeigen, dass eine Überexpression von MMP-12 zu einer Exazerbation der Arthritis u.a. mit überschießender Pannusformation führte. Im Gegensatz zu MMP-19 ist MMP-12 in der Lage eine Vielzahl anderer MMPs zu aktivieren und kann so weitere Kaskaden in Gang setzen, die das Voranschreiten der Entzündung triggern (Stracke, 2000a). MMP-12 wird hauptsächlich von Makrophagen exprimiert und ist somit spezifischer als MMP-19, welche ein sehr uncharakteristisches Expressionsmuster aufweist. Das bedeutet bei einer Überexpression von MMP-12 auch einen schnelleren Abbau

der umgebenden Matrix durch Makrophagen und somit möglicherweise ein schnelleres Voranschreiten der Pannusformation.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Entstehung von Pannusgewebe ist die gesteigerte Vaskularisation der Membrana synovialis, um dem erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen gerecht zu werden. Der potenteste Faktor, der diesen Prozess unterhält, ist VEGF. Da VEGF auch eine erhöhte Permeabilität der Gefäße mit sich bringt, trägt es zur Entstehung der Gelenkschwellung bei (Malemud, 2007). Die immunhistochemische Färbung gegen VEGF erbrachte, dass VEGF wie erwartet vermehrt im Pannusgewebe und im Entzündungszellinfiltrat sowie teilweise in Chondrozyten nachweisbar war. Die Expression von VEGF war in den arthritischen Knien von Wildtyp und Knockout gleichmäßig stark ausgeprägt. Obwohl MMP-19 in den Endothelzellen von Kapillaren in akut entzündetem Synovium nachgewiesen wurde (Kolb et al., 1999) und somit durchaus auf die Ausbildung der Pannusformationen Einfluss nehmen könnte, scheint der Effekt in dieser Arbeit von geringerer Bedeutung. Auch scheint MMP-19 die Expression von VEGF nicht zu beeinflussen. Dies stimmt mit den gewonnenen Erkenntnissen aus der Beurteilung der Kniegelenksschwellung überein.

Bei der Auswertung der Knorpelveränderungen zeigte sich zum ersten Mal ein Unterschied zwischen den arthritischen Knien von Knockout und Wildtyp. Berücksichtigt wurden Arthritis-typische Knorpelschäden wie Chondrozytenhyperplasie, Störungen der Knorpelarchitektur und der Integrität wie z.B. Fissuren. So zeigte sich, dass diese Knorpeldefekte bei den Wildtypen doppelt so häufig vorkommen wie bei den MMP-19^{-/-}-Mäusen. In den Safranin O gefärbten Schnitten ließ sich allerdings nicht zwischen Wildtyp und Knockout differenzieren. Jedoch war auch hier der Proteoglykangehalt im Vergleich zu den linken nicht-arthritischen Knien deutlich vermindert.

Die Proteoglykane des Gelenkknorpels sind überwiegend vom Typ des Aggrecan, welches für die elastischen und Krafttragenden Eigenschaften des Knorpels verantwortlich ist. Der Abbau von Aggrecan kann enzymatisch an zwei Angriffstellen erfolgen, wobei jeweils spezifische Epitope abgespalten werden. Nach Spaltung durch Aggrecanasen entsteht das Neoepitop NITEGE. Wird Aggrecan durch Matrixmetalloproteinasen u.a. auch MMP-19 gespalten, entsteht das Neoepitop VDIPEN (Stracke et al., 2000a). MMP-19 wird ein nicht unbedeutender Anteil an der Aggrecanspaltung zugesprochen, da es autoaktivierend ist und keiner weiteren Aktivierung bedarf (Stracke et al., 2000b). Dies erklärt den Proteoglykanabbau in den

Wildtyp-Mäusen. Warum aber zeigen sich dann auch in den arthritischen Knien der Knockout-Mäuse Proteoglykanverluste?

Studien von van Meurs konnten zeigen, dass die Distribution der genannten Neoepitope im Zusammenhang mit dem Stadium der AIA steht (van Meurs et al., 1999). Das Aggrecanase Spaltprodukt NITEGE ist verstärkt in der akuten Phase des Proteoglykanabbaus nachweisbar, während das von MMPs produzierte VDIPEN in diesem Stadium noch nicht nachweisbar ist. VDIPEN wurde bei der AIA erst im weiteren Verlauf im Zusammenhang mit irreversiblen Knorpelschäden belegt.

Mit einer Safranin O Färbung lässt sich der Proteoglykanverlust nur unspezifisch anfärben. Es ist nicht möglich zu differenzieren, welche enzymatische Reaktion dem zugrunde liegt. In beiden arthritischen Knien wurde ein Proteoglykanverlust offensichtlich, welcher aber bei den Wildtyp-Mäusen in ausgeprägteren Knorpelschäden resultierte als bei den Knockout-Tieren. Ursächlich dafür könnte eine Zunahme des Aggrecanabbaus durch MMP-19 im späteren Stadium der AIA sein. Zudem scheint es, dass dieser Effekt bei den Knockout-Tieren nicht durch andere MMPs kompensiert wird. Denn ansonsten wären die Knorpelschäden bei den Knockouts genauso stark ausgeprägt wie bei den Wildtypen. Diese Aussage könnte durch eine genauere Untersuchung der Distribution der Neoepitope von Aggrecan im Verlauf der AIA gestützt werden.

Bisher gibt es nur wenige Angaben über eine Interaktion von MMP-19 mit anderen MMPs und einer möglichen Rolle bei deren Aktivierung. Es gibt lediglich Hinweise darauf, dass MMP-19 an der Aktivierung von MMP-9 mitwirkt, wobei die abschließende Aktivierung aber durch ein anderes Enzym vorgenommen werden muss (Stracke et al., 2000a). Sollte MMP-19 allerdings zur Aktivierung von MMP-9 beitragen, könnte dies eine weitere Erklärung für eine stärkere Ausprägung der Knorpelschäden in den Wildtypen sein. Aus Versuchen mit MMP-9 Knockout-Mäuse ist bekannt, dass sich dort in den Knockouts eine mildere Form der AIA ausbildet (Itoh et al., 2002). Eine ausbleibende Koaktivierung von MMP-9 durch MMP-19 in den Knockout-Mäusen könnte also auch ein Grund für die erhobenen Beobachtungen sein. Allerdings bedarf dieses noch weiterer Erkenntnisse über die Interaktion von MMP-19 mit anderen Matrixmetalloproteinasen.

Weiterhin ist MMP-19 in der Lage COMP zu spalten. Als extrazelluläres Protein bindet COMP Kollagen I, II, und IX sowie Fibronectin, Matrilisine und Aggrecan und ist somit wesentlich für die Aufrechterhaltung der Knorpelintegrität. Allein über diesen Mechanismus ist es denkbar, dass eine vermehrte COMP-Spaltung durch MMP-19 die Knorpeldestruktion vorantreibt. Doch auch ein anderer Aspekt könnte dazu beitragen. 2007 führten Gagarina et

al. eine Studie zur Funktion von COMP durch. Diese zeigte, dass COMP in humanen Chondrozyten einen antiapoptotischen Effekt hat. Dieser Effekt wird über eine Blockade des Apoptoseproteins Caspase 3 und die Hochregulation von Proteinen der IAP-Familie (Inhibitoren der Apoptose Proteine) vermittelt. So könnte die vermehrte Spaltung von COMP im Rahmen einer Arthritis und die damit verbundene Abschwächung des antiapoptotischen Effekts sich negativ auf das Überleben der Chondrozyten auswirken. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die mRNA von MMP-19 mit proliferierenden Chondrozyten während der embryonalen Entwicklung des muskuloskeletalen Systems assoziiert ist (Stracke et al., 2000b). Die vermehrte Proliferation ist wiederum ein Kennzeichen der Knorpeldestruktion im Verlauf der rheumatoiden Arthritis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MMP-19 nicht nur über die direkte Destruktion von Bestandteilen der Knorpelmatrix und eine Störung der Knorpelintegrität den Verlauf der AIA negativ beeinflusst. Sondern auch über eine indirekte Wechselwirkung mit den Chondrozyten und deren Manipulation, was einerseits zu deren Hyperplasie und andererseits zu einer verkürzten Lebensdauer führt, könnte MMP-19 die Gelenkdestruktion vorantreiben.

In Bezug auf den Proteoglykanverlust gibt es ähnliche Erkenntnisse aus einer Arbeit von Mudgett et al. 1998 mit MMP-3 Knockout-Mäusen am Beispiel der Kollagen-induzierten Arthritis. Diesbezüglich ließ sich wie in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen Knockout und Wildtypen herausarbeiten. Allerdings gilt dies hinsichtlich MMP-3 im Gegensatz zu MMP-19 auch für das Ausmaß der weiteren Knorpelschädigungen. Stracke et al. konnten zeigen, dass MMP-19 und MMP-3 zwar eine teils gemeinsame Substratspezifität aufweisen, dass aber MMP-19 einen Großteil dieser Substrate wie z.B. Fibronectin mit einer höheren Effektivität spaltet. Zudem liegt MMP-3 in großen Mengen als latentes Zymogen vor, während MMP-19 autoaktiv ist. Dies könnte erklären, warum sich im Gegensatz zu den MMP-3 Knockout-Mäusen in dieser Arbeit ein Unterschied hinsichtlich der Knorpelschädigung aufzeigen lässt.

4.3. Micro-CT

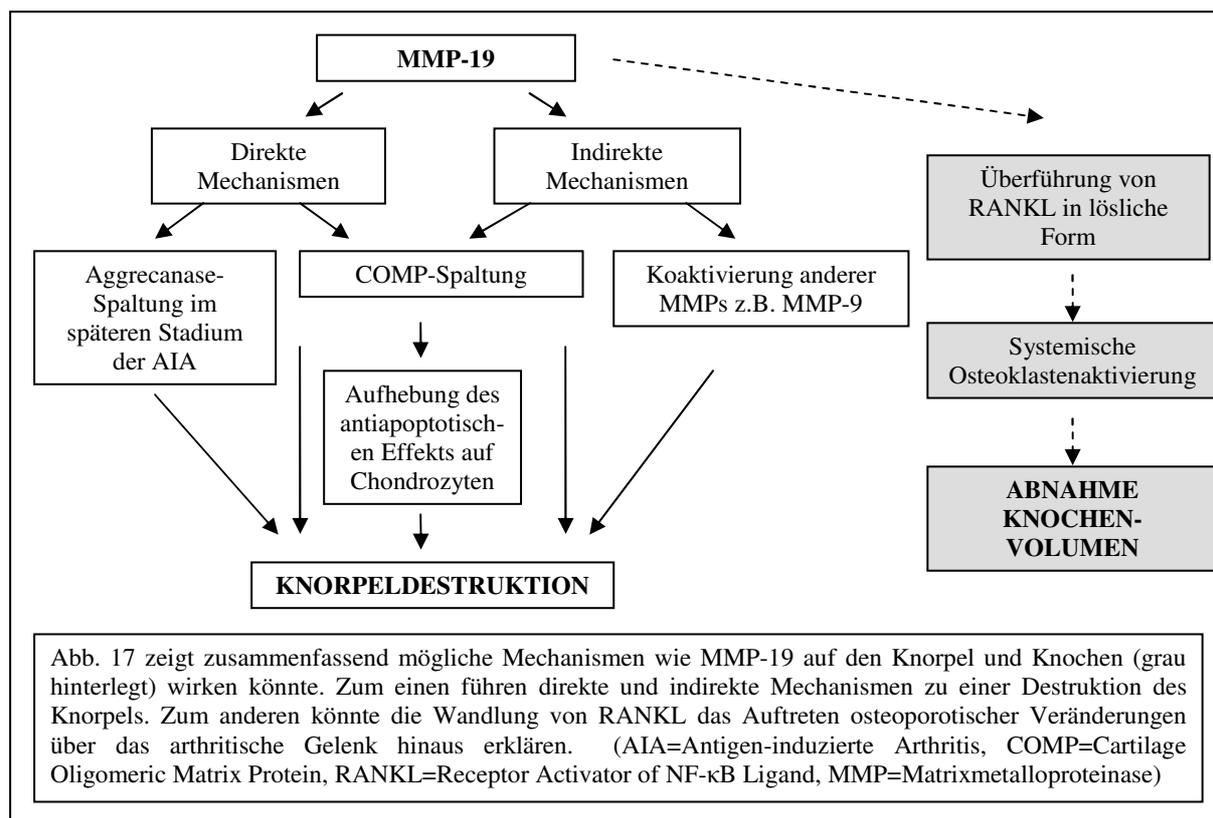
Neben der chronisch fortschreitenden Gelenkdestruktion durch Knorpelabbau und entzündliche Prozesse, kommt es im Verlauf einer Arthritis auch zu Veränderungen der Knochenstruktur. Diese können sich durch einzelne Erosionen oder aber durch eine periartikuläre Abnahme des Knochenvolumens bzw. eine generalisierte Osteoporose zeigen. Insbesondere der periartikuläre Verlust von Knochenmasse ist für die die AIA beschrieben (Oelzner et al., 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jeweils Osteoklasten

vermittelt. Daran beteiligt sind die gleichen proinflammatorischen Enzyme wie z.B. IL-1 und TNF- α , die auch die Entzündung der Synovialmembran induzieren und T-Zellen aktivieren. Über diese Kaskade kommt es von T-Zellen und Typ-B Synoviozyten zur Expression von RANKL (engl. Receptor Activator of NF- κ B Ligand), einem Liganden, der die Osteoklasten-abhängige Knochenresorption stimuliert (Kim et al., 2007). Es ist vorstellbar, dass MMPs insbesondere MMP-19 in diese Kaskade regulierend eingreift. Zum einen degradieren MMPs als Effektormoleküle des Osteoblasten das nicht-mineralisierte Osteoid (Catteral et al., 2003). Dadurch erst wird der Knochen für die Osteoklasten angreifbar. Aber besonders in neuen Studien wird deutlich, dass MMPs zu viel mehr in der Lage sind, als nur zur Spaltung von Komponenten der EZM. Viele Substrate finden sich außerhalb der EZM, wozu Zytokine (z.B. IL-1), Wachstumsfaktoren, Apoptosemediatoren und Adhäsionsmoleküle gehören (McCawley et al., 2001). Es wird deutlich, dass MMPs vielfältige Möglichkeiten haben in die Zell-Zell Kommunikation und das Zellverhalten einzugreifen (Cauwe et al., 2007). Dies wiederum könnte also auch den Prozess des periartikulären Knochenverlusts beeinflussen. Gerade über MMP-19 ist in Bezug auf die Spaltung von nicht-Matrix Substraten noch wenig bekannt. Auch gibt es kaum Hinweise darauf, welche Bedeutung MMP-19 im Auf- und Umbau von Knochen zukommt.

Die mittels micro-CT durchgeführte Trabekelstrukturanalyse ermöglicht es, die periartikulären Veränderungen des Knochens zu beurteilen. Wie erwartet erbrachten diese Analysen für die arthritischen Knie der Versuchstiere eine periartikuläre Verminderung des Knochenvolumens ähnlich einer gelenknahen Osteoporose. Die gemessenen Parameter zeigen eine dafür typische Konstellation. Dazu zählt die Abnahme der Trabekelanzahl und -dicke, die Zunahme des Abstandes der Trabekel zueinander und die Abnahme des relativen Knochenvolumens. Die Ausprägung der osteoporotischen Veränderungen war zumindest auf der rechten arthritischen Seite nicht unterschiedlich im Vergleich Wildtyp und Knockout. Dies impliziert, dass die direkten Auswirkungen der Gelenkentzündung einen möglichen Effekt von MMP-19 kompensieren. So scheint MMP-19 nicht in der Lage zu sein proinflammatorische Zytokine in einem Ausmaß zu spalten, dass es die osteoporotischen Entwicklung verlangsamen oder reduzieren könnte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der histologischen Auswertung der Entzündungsparameter.

Bei der weiteren Analyse der micro-CT Daten ergab sich ein überraschendes Ergebnis. Es stellte sich heraus, dass die Abnahme des Knochenvolumens der Tibia nicht nur auf der arthritischen Seite auftritt, sondern auch auf der bisher unauffälligen linken Seite von Wildtyp und Knockout zu belegen ist. Dies scheint doch ungewöhnlich, da diese Knie histologisch

keine Anzeichen einer Gelenkentzündung aufweisen. Jedoch sind auch hier die Parameter der Trabekelstrukturanalyse in gleicher Weise verändert wie bei den arthritischen Knien. Ähnliche bisher unveröffentlichte Beobachtungen wurden von Chotzidis et al. bei der Beurteilung der Trabekelstruktur von Ratten mit einer AIA gemacht. Auch dort zeigte sich in der Tibia eine bilaterale Abnahme des Knochenvolumens. Wie ist dieser bilaterale Effekt zu erklären? RANKL, das Schlüsselmolekül in der Induktion der Osteoklastogenese wird unter physiologischen Bedingungen zellständig u.a. auf T-Zellen und Synoviozyten exprimiert. Unter entzündlichen Bedingungen kommt es aber zur Abspaltung des Liganden durch Matrix-Metalloproteinasen (Green, 2001). Diese lösliche Form des Liganden kann somit auf der kontralateral zur Entzündung gelegenen Seite, eine Kaskade auslösen, die für die Osteoporose-ähnlichen Veränderungen verantwortlich ist. Da der Ligand von Matrix-Metalloproteinasen abgespalten wird, besteht hier ein weiterer Angriffspunkt für die Regulation des Knochenabbaus durch MMPs. Und tatsächlich zeigt sich in dieser Arbeit dass die Osteoporose-ähnlichen Entwicklungen in zwei Parametern bei den linken Knien des Knockouts geringer ausgeprägt sind, als bei den Wildtypen. Dies betrifft die Trabekeldicke und den Parameter BS/BV der bei porösem also osteoporotischen Knochen ansteigt. Die anderen Parameter Trabekelabstand, relativer Knochenvolumenanteil und Trabekelanzahl sind davon nicht betroffen. Da die beschriebenen Unterschiede jeweils signifikant sind, ist es möglich, dass MMP-19 bei der Überführung von RANKL von seiner zellständigen in seine lösliche Form von Bedeutung ist und somit die Ausprägung der generalisierten Osteoporose beeinflussen könnte.



Abschließend lassen sich die Ergebnisse der Diskussion wie folgt zusammenfassen:

- MMP-19 hat keinen messbaren Einfluss auf die Ausprägung der initial durch proinflammatorische Zytokine oder VEGF gesteuerten Gelenkveränderungen. Dazu zählen die Gelenkschwellung, die Zellinfiltration, die Entzündung der Membrana synovialis und die Ausbildung von Pannusgewebe. Dies legt nahe, dass MMP-19 an der Spaltung von proinflammatorischen Zytokinen möglicherweise gar nicht oder nur marginal beteiligt ist.
- Die in einer Studie von Kolb et al. beobachtete Expression von MMP-19 in akut entzündetem Synovium hat in diesem murinen Modell keinen Einfluss auf den Verlauf der AIA.
- MMP-19 hat möglicherweise einen die Knorpeldestruktion fördernden Einfluss. Dies könnte über eine potente Aggrecanspaltung in der späteren Phase der AIA vermittelt sein. Auch die Degradation von COMP und die damit verbundene mögliche Abschwächung des antiapoptotischen Effekts auf Chondrozyten kann dazu beitragen.

- MMP-19 scheint einen Einfluss auf die Ausprägung des generalisierten Abbaus von Knochensubstanz zu haben. Ein denkbarer Mechanismus wäre eine verstärkte Überführung des Osteoklastogenese Faktors RANKL von seiner zellständigen in die lösliche Form.

Es bleibt darauf hinzuweisen, dass MMP-19 zu den neueren MMPs gehört und somit erst selten Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung war. Trotzdem sind die Ergebnisse dieser Arbeit vielversprechend, zeigen sie doch, dass MMP-19 über viele mögliche Wege die Schwere der AIA beeinflussen kann. Doch erfordern sie auch in vielen Aspekten eine vertiefende Erforschung, um die Mechanismen aufzudecken und eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Erst dann ist es möglich, Parallelen zwischen diesem Tiermodell und der Arthritis des Menschen zu ziehen und eventuelle Hinweise auf einen therapeutischen Ansatz erlangen.

5. Zusammenfassung

Für die rheumatoide Arthritis ist bekannt, dass ein Ungleichgewicht von Matrixmetalloproteinasen untereinander und ihren natürlichen Inhibitoren bei der pathognomonischen Zerstörung der Gelenke eine nicht unerhebliche Rolle spielt. Diese Endopeptidasen sind in der Lage ein breites Spektrum extrazellulärer Matrix wie z.B. Knorpelbestandteile zu spalten. Die derzeit zur Verfügung stehenden Pharmazeutika dienen vielmehr dazu Entzündung und Schmerz zu lindern bzw. die Gelenkdestruktion zu verlangsamen, als dazu sie nachhaltig zum Stillstand zu bringen. Ein möglicher Ansatz ist somit die Inhibition einzelner Matrixmetalloproteinasen, was allerdings Erkenntnisse über deren genaue Funktion voraussetzt.

Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht die spezifische Rolle von MMP-19 bei der Ausprägung einer Antigen-induzierten Arthritis herauszuarbeiten. Dieses Tiermodell weist große Ähnlichkeit zum Verlauf der humanen rheumatoiden Arthritis auf. Die Arthritis wird einseitig in einem Kniegelenk induziert. Es wird der Krankheitsverlauf von Knockoutmäusen mit dem von Wildtypen verglichen. Dazu dienen klinische Verlaufsparemeter wie die Gelenkschwellung *in vivo*, histologische und immunhistochemische Kriterien über die Gelenkdestruktion und Entzündung sowie die Beurteilung der periartikulären Knochenstruktur mittels Micro-CT Analysen.

Es zeigt sich, dass MMP-19 keinen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung der *akuten Arthritis* zu haben scheint. Gelenkschwellung und Entzündungszeichen sind in ihrer Schwere bei den Versuchsgruppen identisch. Die Auswertung der Knorpeldestruktion legt allerdings nahe, dass MMP-19 über direkte und indirekte Mechanismen einen die Knorpeldestruktion fördernden Einfluss haben könnte. Dies könnte zum einen über die direkte Spaltung von Knorpelbestandteilen wie Aggrecan und COMP vermittelt sein. Aber auch indirekte Mechanismen wie die Beeinflussung der Chondrozytenüberlebenszeit und die Koaktivierung anderer Matrixmetalloproteinasen sind denkbar. Untergeordnet scheint ein Einfluss auf die Neoangiogenese zu sein, da sich bei der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF keine signifikanten Unterschiede ergeben.

Die Analyse der periartikulären Knochenstruktur zeigt eine Verminderung des Knochenvolumens ähnlich einer tibialen Osteoporose im arthritischen Knie, aber auch auf der kontralateralen gesunden Seite. Die Entwicklung dieser generalisierten Osteoporose ist bei den Knockout-Mäusen weniger stark ausgeprägt als bei den Wildtypen. Ein Schlüsselmolekül der Osteoklastogenese ist RANKL, ein Rezeptoraktivator für NF- κ B. Dieser wird z.B. von Matrixmetalloproteinasen von einer zellständigen in seine lösliche Form überführt, was eine

systemische Abnahme des Knochenvolumens erklären könnte. Die genaue Rolle, die MMP-19 dabei spielt, bleibt jedoch ungeklärt.

Die gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass MMP-19 über verschiedene Mechanismen die Schwere der chronischen Antigen-induzierten Arthritis beeinflussen könnte. Es bleibt jedoch offen, inwiefern sich diese im Tiermodell gewonnenen Hinweise auf den Menschen übertragen lassen.

6. Literaturverzeichnis

- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS:
The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 1988 Mar;31(3):315-24.
- Bennet B, Check IJ, Olsen MR, Hunter RL: *A comparison of commercially available adjuvants for use in research.*
Journal of Immunological Methods 1992; 153:31-40.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA: *Matrix metalloproteinases: a review.*
Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(2):197-250
- Böcker W, Denk H, Heitz PU: *Pathologie.* 3. Auflage 2004, Urban & Fischer bei Elsevier, München
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Miller JA.: *Antigen-induced arthritis in mice: genetic and immunologic studies.*
Verh Dtsch Ges Rheumatol. 1978;5:154-9.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR: *Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice.*
Arthritis Rheum. 1977 Apr;20(3):841-50.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF: *Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice.*
J Immunol. 1977 May;118(5):1639-44.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR: *Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments.*
J Immunol. 1977 May;118(5):1645-8.
- Brahn E: *Animal models of rheumatoid arthritis. Clues to etiology and treatment.*
Clin Orthop Relat Res. 1991 Apr;(265):42-53.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM: *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.*
Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Mar;3(3):207-14.
- Camplejohn KL, Allard SA: *Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies* Histochemistry 1988; 89(2):185-8
- Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G: *The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases.*
Crit Rev Biochem Mol Biol. 2007 May-Jun;42(3):113-85.
- Catterall JB, Cawston TE: *Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors.*

Arthritis Res Ther. 2003;5(1):12-24.

Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, Adams SE, Gearing AJ: *Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview.* J Neuroimmunol. 1997 Feb;72(2):155-61.

Cooke TD, Sumia M, Elliott S, Maeda M: *Immune complex mediated destruction of cartilage in antigen-induced arthritis of rabbits.* J Rheumatol Suppl. 1983 Dec;11:103-7.

Dorner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR: *Rheumatoid factor revisited.* Curr Opin Rheumatol. 2004 May;16(3):246-53.

Dumonde DC, Glynn LE : *The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin.* Br J Exp Pathol. 1962 Aug;43:373-83.

Firestein GS: *Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* J Clin Rheumatol. 2005 Jun;11(3 Suppl):S39-44.

Firestein GS: *Evolving concepts of rheumatoid arthritis.* Nature. 2003 May 15;423(6937):356-61.

Gagarina V, Carlberg AL, Pereira-Mouries L, Hall DJ: *Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) protects cells against death by elevating members of the IAP family of survival proteins.* J Biol Chem. 2007 Nov 8

Glant TT, Bardos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdez JC, Otto JM, Gerard D, Velins S, Lovasz G, Zhang J: *Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice: evidence of genetically acquired resistance to autoimmune disease.* Arthritis Rheum 2001 44, 682-692.

Green MJ, Deodhar AA: *Bone changes in early rheumatoid arthritis.* Best Pract Res Clin Rheumatol. 2001 Mar;15(1):105-23

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H: *MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover.* Cell. 1999 Oct 1;99(1):81-92.

Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y: *Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice.* J Exp Med. 2000 Jan 17;191(2):313-20.

Huckel M, Schurigt U, Wagner AH, Stockigt R, Petrow PK, Thoss K, Gajda M, Henzgen S, Hecker M, Brauer R: *Attenuation of murine antigen-induced arthritis by treatment with a*

decoy oligodeoxynucleotide inhibiting signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1). Arthritis Res Ther. 2006;8(1):R17.

Huscher D, Merkesdal S, Thiele K, Zeidler H, Schneider M, Zink A: *Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany*.

Ann Rheum Dis. 2006 Sep;65(9):1175-83. Epub 2006 Mar 15.

Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R:

The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis.

J Immunol. 2002 Sep 1;169(5):2643-7.

Irmeler IM, Gajda M, Bräuer R:

Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response.

J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):6228-36.

Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D: *Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease*.

Pathophysiology. 2005 Oct;12(3):167-81.

Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G:

Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis.

EMBO J. 1991 Dec;10(13):4025-31.

Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC: *Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement*.

Arthritis Rheum. 1977 Sep-Oct;20(7):1396-1401.

Kim KW, Cho ML, Lee SH, Oh HJ, Kang CM, Ju JH, Min SY, Cho YG, Park SH,

KimHY: *Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation*.

Immunol Lett. 2007 May 15;110(1):54-64. Epub 2007 Apr 17.

Kramer I, Wibulswas A, Croft D, Genot E: *Rheumatoid arthritis: targeting the proliferative fibroblasts*.; Prog Cell Cycle Res. 2003;5:59-70.

Koga T, Kakimoto K, Hirofuji T, Kotani S, Ohkuni H, Watanabe K, Okada N, Okada H, Sumiyoshi A, Saisho K: *Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria*.

Infect Immun. 1985 Oct;50(1):27-34.

Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, López-Otín C, Takagi M:

Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis. 1999 Nov;58(11):691-7.

Kolb C, Mauch S, Krawinkel U, Sedlacek R: *Matrix metalloproteinase-19 in capillary endothelial cells: expression in acutely, but not in chronically, inflamed synovium.* Exp Cell Res. 1999 Jul 10;250(1):122-30.

Kyburz D, Corr M: *The KRN mouse model of inflammatory arthritis.* Springer Semin Immunopathol. 2003 Aug;25(1):79-90.

Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T: *Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis* Ann Rheum Dis. 2005 Feb;64(2):196-201. Epub 2004 Sep 30.

Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE: *Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study.* Arthritis Rheum. 2005 Mar;52(3):722-32.

Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, Mathis D, Benoist C: *How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease.* Nat Immunol. 2002 Apr;3(4):360-5. Epub 2002 Mar 18.

McCawley LJ, Matrisian LM: *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* Curr Opin Cell Biol. 2001 Oct;13(5):534-40.

Mengshol JA, Mix KS, Brinckerhoff CE: *Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark?* Arthritis Rheum. 2002 Jan;46(1):13-20.

Merkesdal S, Huelsemann JL, Mittendorf T, Zeh S, Zeidler H, Ruof J: *Productivity costs of rheumatoid arthritis in Germany. Cost composition and prediction of main cost components* Z Rheumatol. 2006 Oct;65(6):527-34.

Mudgett JS, Hutchinson NI, Chartrain NA, Forsyth AJ, McDonnell J, Singer II, Bayne EK, Flanagan J, Kawka D, Shen CF, Stevens K, Chen H, Trumbauer M, Visco DM: *Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction.* Arthritis Rheum. 1998 Jan;41(1):110-21.

Nagase H, Woessner JF Jr: *Matrix metalloproteinases.* J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Nagase H, Visse R, Murphy G: *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.* Cardiovasc Res. 2006 Feb 15;69(3):562-73. Epub 2006 Jan 5.

Oelzner P, Bräuer R, Henzgen S, Thoss K, Wünsche B, Hersmann G, Abendroth K, Kinne RW: *Periarticular bone alterations in chronic antigen-induced arthritis: free and liposome-encapsulated clodronate prevent loss of bone mass in the secondary spongiosa.* Clin Immunol. 1999 Jan;90(1):79-88

- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS: *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity.*
Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):617-29.
- Paulsen F, Pufe T, Conradi L, Varoga D, Tsokos M, Papendieck J, Petersen W: *Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes.*
J Pathol. 2002 Nov;198(3):369-77.
- Pendás AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, López-Otín C: *Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution.*
J Biol Chem. 1997 Feb 14;272(7):4281-6.
- Peterson JT: *The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors.* Cardiovasc Res. 2006 Feb 15;69(3):677-87
- Pincus T, Callahan LF: *The 'side effects' of rheumatoid arthritis: joint destruction, disability and early mortality.*
Br J Rheumatol. 1993 Mar;32 Suppl 1:28-37.
- Roudier J: *Association of MHC and rheumatoid arthritis. Association of RA with HLA-DR4: the role of repertoire selection.*
Arthritis Res. 2000;2(3):217-20. Epub 2000 Apr 12.
- Roudier J: *HLA-DRB1 genes and extraarticular rheumatoid arthritis.*
Arthritis Res Ther. 2006;8(1):103. Epub 2006 Jan 12.
- Scott JE: *Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape.*
J Anat. 1995 Oct;187 (Pt 2):259-69.
- Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schatzlein C, Eibel H, Peter HH, Schmitt J, Krawinkel U: *Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis.*
Immunobiology. 1998 Feb;198(4):408-23.
- Simon J, Surber R, Kleinstauber G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, Brauer R: *Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis.*
J Autoimmun. 2001 Sep;17(2):127-36.
- Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G, Sherer Y, Orbach H, Gerli R, Shoenfeld Y: *The diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, matrix metalloproteinase-3, rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein in patients with erosive and non-erosive rheumatoid arthritis.*
Clin Dev Immunol. 2005 Sep;12(3):197-202.
- Somerville RP, Oblander SA, Apte SS: *Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.*
Genome Biol. 2003;4(6):216. Epub 2003 May 29.
- Stamp LK, James MJ, Cleland LG: *Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis?*
Immunol Cell Biol. 2004 Feb;82(1):1-9.

Steinberg ME, McCrae CR, Cohen LD, Schumacher HR Jr: *Pathogenesis of antigen-induced arthritis.*

Clin Orthop Relat Res. 1973 Nov-Dec;(97):248-60.

Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen JS: *Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis.*

Rheumatology (Oxford). 1999 Mar;38(3):202-13.

Steiner G: *Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools.*

Clin Rev Allergy Immunol. 2007 Feb;32(1):23-36.

Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V: *Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme.*

J Biol Chem. 2000a May 19;275(20):14809-16.

Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G, Knauper V: *Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP).*

FEBS Lett. 2000b Jul 28;478(1-2):52-6.

Strunk J, Lange U, Muller-Ladner U: *[Rheumatoid arthritis]*

Dtsch Med Wochenschr. 2005 Jul 29;130(30):1761-8; quiz 1769-72.

Symmons DP, Jones MA, Scott DL, Prior P: *Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well;* J Rheumatol. 1998 Jun;25(6):1072-7.

Tran CN, Davis MJ, Tesmer LA, Endres JL, Motyl CD, Smuda C, Somers EC, Chung KC, Urquhart AG, Lundy SK, Kovats S, Fox DA: *Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes.*

Arthritis Rheum. 2007 Apr 27;56(5):1497-1506

van den Berg WB, van de Putte LB, Zwarts WA, Joosten LA: *Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice.*

J Clin Invest. 1984 Nov;74(5):1850-9.

van Meurs JB, van Lent PL, Holthuysen AE, Singer II, Bayne EK, van den Berg WB: *Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neoepitopes in various stages of cartilage destruction in murine arthritis.*

Arthritis Rheum. 1999 Jun;42(6):1128-39.

Varisco PA, Peclat V, van Ness K, Bischof-Delaloye A, So A, Busso N:

Effect of thrombin inhibition on synovial inflammation in antigen induced arthritis.

Ann Rheum Dis. 2000 Oct;59(10):781-7.

Visse R, Nagase H: *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.*

Circ Res. 2003 May 2;92(8):827-39.

Vogt T: *Rheumatoid arthritis--clinical picture and important differential diagnoses*
Ther Umsch. 2005 May;62(5):265-8.

von Banchet GS, Petrow PK, Brauer R, Schaible HG: *Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats.*
Arthritis Res. 2000;2(5):424-7.

Wang X, Liang J, Koike T, Sun H, Ichikawa T, Kitajima S, Morimoto M, Shikama H, Watanabe T, Sasaguri Y, Fan J: *Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits.*
Am J Pathol. 2004 Oct;165(4):1375-83.

Williams AS, Richards PJ, Thomas E, Carty S, Nowell MA, Goodfellow RM, Dent CM, Williams BD, Jones SA, Topley N:
Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints.
Arthritis Rheum. 2007 Jul;56(7):2244-54.

Wooley PH, Seibold JR, Whalen JD, Chapdelaine JM: *Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease.*
Arthritis Rheum. 1989 Aug;32(8):1022-30.

Zvaifler NJ: *The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis.*
Adv Immunol. 1973;16(0):265-336.

Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, Dunstan C, Kollias G, Steiner G, Smolen J, Schett G:
Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction.
Arthritis Rheum. 2004 Jan;50(1):277-90.

Färbeprotokolle

1) H.E.-Färbung nach Mayer

Mit 1% wässrigem Eosin an Paraplastschnitten

- Entplasten bis zu Aqua dest.
- Kernfärbung Hämalaun nach Mayer für 5 Min.
- Mit Aqua dest. spülen
- Fließend wässern über 5 min.
- Differenzierung in 0,1% HCL-Alkohol für 3 sec., dann in Aqua dest.
- Fließend wässern über 15 min.
- Überführen in Aqua dest.
- Für 4 min. in 1% wässrigem Eosin + ca. 40µl Eisessig auf 200 ml
- Überführen in Aqua dest.
- Differenzierung in 70% Alkohol, dann Alkoholreihe hoch
- Schnitte für je 5 Min in Xylol
- eindecken in Depex

2) Safranin O

- Entplasten der Schnitte bis zum Aqua dest.
- Schnitte für 10 min. in 0,5% Safranin O, gelöst in 0,1M Na-acetatpuffer, pH 4,6
- Schnitt mit Aqua dest. spülen
- sehr kurz in 96% und 100% Alkohol, da sich die Farbe sonst völlig rauslöst
- Schnitte für je 5 Min in Xylol
- eindecken in Depex

Na-acetat Mol.Gew. 82,03 g/l = 1M

8,2 g/l = 0,1 M

3.) Toluidinblau als Übersichtsfärbung an Paraplastschnitten

- Entplasten der Schnitte bis zum Aqua dest.
- Toluidinblaugemisch 1:1 mit Aqua dest. verdünnen
- Schnitt für 5 – 6 min. darin färben
- Differenzierung. in 96 % Alkohol
- Schnitte für 2 x 5 min. in Propanol
- Schnitte für je 5 Min in Xylol.,
- eindecken in Depex

Das Farbgemisch vor Gebrauch filtrieren.

Borax: di-Natriumtetraborat-10-hydrat z.A. ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$)

Stammlösungen Toluidinblau:

- 1% Pyronin G in 1% Borax in Aqua dest., filtrieren
- 1% Toluidinblau in 1% Borax in Aqua dest., filtrieren

Gebrauchslösung:

die Stammlösungen 1:1 mischen und die gleiche Menge Aqua dest. dazu geben

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

- Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Pufe für die wissenschaftliche Betreuung, für die Überlassung des interessanten Themas und die persönliche Unterstützung.

- Herrn PD Dr. Radek Sedlacek für die Bereitstellung der Versuchstiere.

- Herrn Prof. Dr. C.-C. Glüer für die Möglichkeit der Mitbenutzung des Micro-CTs und Herrn Dipl.-Ing. Christian Graeff für die geduldige Einarbeitung.

- Für die ausdauernde Unterstützung bei allen labortechnischen Fragen und nicht zuletzt für die praktische Hilfe und das häufige Aufmuntern danke ich dem Team aus Haus 2: Frau Bettina Facompré, Frau Inka Geurink, Frau Sonja Seiter, Frau Sabine Sepke und allen anderen guten Seelen.

Lebenslauf

Name: Inga Valk
Geburtstag: 10. Juli 1981 in Moers
Wohnhaft in: Feldstraße 8, 24105 Kiel
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1988 - 07/1992 Konrad-Duden Grundschule, Wesel
08/1992 - 06/2001 Andreas-Vesalius Gymnasium, Wesel

Studium

10/2002 - 07/2004 Vorklinisches Studium an der Universität Kiel
10/2004 - 07/2007 Klinisches Studium an der Universität Kiel
08/2007 - 07/2008 Praktisches Jahr
11/2008 Abschluss des Studiums
04/2009 – aktuell Assistenzärztin in der II. Medizinischen Klinik im Städtischen Krankenhaus Kiel, Abteilung für Hämatologie und Onkologie

Erstellung der Dissertation

April 2006 - April 2008