

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemische Validierung von Mikroarray-Daten aus  
dem Vergleich der Genexpressionsprofile des Riesenzelltumors  
und der Rheumatoiden Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Jakobs

aus Trier

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Krenn  
2. Prof. Dr. med. W. Rüter  
3. Prof. Dr. med. Th. Dörner

Datum der Promotion: 18. November 2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Morphologie der Synovialmembran	1
1.2	Rheumatoide Arthritis	1
1.2.1	Definition	1
1.2.2	Pathogenese	2
1.3	Riesenzelltumor	3
1.3.1	Definition	3
1.3.2	Pathogenese	4
1.4	Matrixdegradation in RA und RZT	5
1.4.1	Gemeinsamkeiten der histopathologischen Morphologie	5
1.4.2	Aktivierte Fibroblasten	6
1.4.3	Gemeinsame Genregulation in RA und RZT	8
1.4.4	Chemokinrezeptoren (CCRs)	9
1.4.5	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	10
1.4.6	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	10
1.4.7	<i>Fibroblast Activation Protein</i> (FAP)	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Patienten und Gewebe	17
2.2	Aufarbeitung des Gewebes	20
2.2.1	Aufarbeitung des Gewebes für Kryoschnitte	20
2.2.2	Aufarbeitung des Gewebes für Paraffinschnitte	20
2.3	Herstellung der Hämatoxylin-Eosin Färbung	20
2.4	Immunhistochemie	21
2.4.1	Immunhistochemie für Paraffinschnitte	21
2.4.2	Immunhistochemie für Kryoschnitte	22
2.4.3	Positiv- und Negativkontrollen	24
2.5	Validierung der immunhistochemischen Färbungen (IRS)	27
2.6	Histopathologische Graduierung der HE-Schnitte (Synovialitis-Score)	27
2.7	Statistische Auswertung	28

2.7.1	Signifikanztestung des immunreaktiven Scores (IRS)	28
2.7.2	Korrelationsuntersuchung zwischen IRS und Synovialitis-Score	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Voruntersuchungen	29
3.1.1	Mikroarray Analysen	29
3.1.2	Funktionelle Profilkomponentenanalyse (FPCA)	37
3.2	Ergebnisse dder immunhistochemischen Färbungen	39
3.2.1	CCR1	40
3.2.2	CCR5	41
3.2.3	VEGF	43
3.2.4	MMP-1	45
3.2.5	MMP-2	46
3.2.6	MMP-3	48
3.2.7	MMP-9	49
3.2.8	MMP-14	51
3.2.9	FAP	53
3.3	Ergebnisse des Korrelationsvergleichs zwischen IRS und Synovialitis-Score	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Diskussion der immunhistochemischen Daten	57
4.2	Vergleich zwischen IRS und Array Daten	64
4.3	Korrelation zwischen Synovialitis-Score und MMP-9	68
4.4	Hypothesenmodell zum Matrixabbau durch aktivierte Fibroblasten	70
4.5	Aktivierte Fibroblasten als Link zwischen Inflammation und Tumor	72
4.6	FAP-Inhibitoren	74
4.6.1	Biologicals in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis	74
4.6.2	FAP-Inhibitoren bei malignen Erkrankungen	75
4.6.3	FAP-Inhibitoren in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis	77
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>

<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>
7.1	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	98
7.2	Curriculum vitae	100
7.3	Publikationsverzeichnis	101
7.3.1	Originalarbeiten	101
7.3.2	Posterbeiträge und Vorträge	103
7.4	Erklärung	105
7.5	Danksagung	106

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ac	Acetyl-
Ala	Alanin
AP-1	Adapterprotein 1
Arg	Arginin
As	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
Bcl	Beclin
Bp	Basenpaar
CA	Karzinom
CCR	CC Chemokinrezeptor
CCP	<i>cyclic citrullinated peptide</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CMK	Chloromethyl-Keton
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DASH	Dipeptidyl-Peptidase IV and structure homologues
DPP	Dipeptidyl-Peptidase
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGR1	<i>early growth response 1</i>
eNOS	endotheliale Stickoxid Synthetase
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
FAP	<i>fibroblast activation protein</i>
FäZ	fibroblastenähnliche Zelle
FDA	<i>US food and drug administration</i>
FPCA	<i>functional profile component analysis</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
Glu	Glutamat
GLP	<i>Glucagon like peptide</i>
Gly	Glycin

HCC	hemofiltrate CC chemokine
HE	Hämatoxylin Eosin
HIF	Hypoxieinduzierter Faktor
His	Histidin
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
IRS	Immunreaktiver Score
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
kD	Kilodalton
LSAB	<i>labelled streptavidin-biotin</i>
MäZ	makrophagenähnliche Zelle
MCP	<i>macrophage chemoattractant protein</i>
MHC	major histocompatibility complex
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinazid
mRZ	multinukleäre Riesenzelle
MT-MMP	Membrantyp-MMP
n	nano
n.b.	nicht bewertbar
ND	Normaldonor
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa b</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
OA	Osteoarthritis
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C

PP	<i>Percentage of positive cells</i>
Pro	Prolin
PTEN	<i>phosphatase &amp; tensin homologue deleted on chromosome ten</i>
PVNS	pigmentierte villonoduläre Synovialitis
RA	Rheumatoide Arthritis
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed & secreted
RZT	Riesenzelltumor
Ser	Serin
SI	<i>staining intensity</i>
SIG	Stärke des Fluoreszenzsignals hybridisierter Chip-DNA
Syn	Synovialgewebe / Synovialitis
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TGF $\beta$	<i>tissue growth factor <math>\beta</math></i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tyr	Tyrosin
uPAR	<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vergr.	Vergrößerung
X	beliebige Aminosäure



## 1. Einleitung

### 1.1 Morphologie der Synovialmembran

Die sogenannte Gelenksinnenhaut beziehungsweise Synovialmembran besitzt mit einem zweischichtigen Aufbau eine einfache Morphologie. Der Gelenkhöhle zugewandt ist die Deckzellschicht mit zwei phänotypisch verschiedenen Zellarten: den makrophagenähnlichen Typ-A-Zellen, sowie den fibroblastenähnliche Typ-B-Zellen [65]. Hierbei üben die Typ-A-Zellen eine phagozytotische Funktion aus. Die Typ-B-Zellen produzieren hingegen Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM). Der Deckzellschicht schließt sich eine lockere und gut vaskularisierte Gewebsschicht mit Fibroblasten, Adipozyten und reichlich ECM an. Das gut ausgebildete Kapillarsystem erstreckt sich bis an die Deckzellschicht und versorgt sowohl diese, als auch den hyalinen Gelenkknorpel. Zur Bildung der Synovia, der Gelenksflüssigkeit, tragen die fenestrierten Kapillaren in unmittelbarer Nähe der Basalmembran der Deckzellschicht bei. Das ausgetretene Ultrafiltrat des Blutes wird mit Sekretionsprodukten der Deckzellen angereichert [118] und in den Gelenkraum abgegeben.

Eine Hauptaufgabe der Synovialmembran ist die Ernährung des Knorpels. Es finden sich jedoch ebenfalls Strukturen zur Nozizeption und Mechanozeption [62], welche elementar für die koordinierte Ausübung von Bewegungen sind, in ihr.

Anzumerken ist, dass in der gesunden Synovialmembran bis auf die Typ-A-Zellen der Deckzellschicht keine immunologischen Zellen auftreten, jedoch bei pathologisch entzündlichen Vorgängen die Zahl und Vielfalt derer stark ansteigt [21].

### 1.2 Rheumatoide Arthritis

#### 1.2.1 Definition

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist definiert als eine chronisch entzündliche Systemerkrankung mit meist symmetrischem Befall der distalen Hand- und Fußgelenke und Zerstörung des Knochens, des Gelenkknorpels, sowie des Weichgewebes. Das Fortschreiten der Gelenkszerstörung führt in vielen Fällen zur Invalidität (Definition nach den Kriterien des *American College of Rheumatology*, ACR).

Die Prävalenz der RA liegt bei über 1% der Weltbevölkerung und unterscheidet sich zwischen ethnischen Gruppen sowie zwischen den Geschlechtern. So tritt die

Erkrankung in der afrikanischen und ostasiatischen Bevölkerung seltener auf als in der kaukasischen. Frauen sind dreimal häufiger von der RA betroffen als Männer [36]. Der Gipfel der Neuerkrankungsrate liegt bei Männern bei 55 - 64 Jahren und bei Frauen zwischen 65 - 75 Jahren [108]. In 90% der Fälle können zwei Jahre nach Diagnosestellung radiologisch nachweisbare Knochendestruktionen vorliegen [110].

Eine genaue Diagnose der RA gestaltete sich lange Zeit für den einzelnen Patienten als schwierig. Jedoch wurde durch das ACR ein Kriterienkatalog festgelegt, der es erlaubt, bei Vorliegen von 4 der 7 Kriterien (wenn diese über einen ärztlich beobachteten Zeitraum von mindestens 6 Wochen auftreten), die RA zu diagnostizieren [4]. Die Kriterien lauten: Morgensteifigkeit (>1h), Arthritis in mindestens drei Gelenken (mit Schwellung), Arthritis an Hand- und/oder Fingergelenken (v.a. Fingergrund- und proximale Interphalangealgelenke), symmetrische Arthritis (mindestens einer Gelenkregion), subkutane Rheumaknoten, Rheumafaktornachweis im Serum und radiologische Veränderung (typischerweise der Handgelenke).

Als Spätfolgen der Rheumatoiden Arthritis können extraartikuläre Manifestationen der Nieren (Nephritis), der Haut (Erythema nodosum), der Gefäße (Digitale Vaskulitiden), der Augen (Keratokonjunktivits), der serösen Häute (Polyserositis) sowie der Knochen (Osteoporose) auftreten [21].

### **1.2.2 Pathogenese**

Die Pathogenese der RA ist trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies ist unter anderem durch die Heterogenität der chronischen Synovialitis begründet. Unter den derzeit vorliegenden Theorien zur Pathogenese werden folgende zwei hervorgehoben: Theorie 1) Geht davon aus, dass die RA als immunologische Antwort auf ein bisher unbekanntes Antigen entsteht und mit einer Fehlregulation der körpereigenen T-Zellen einhergeht [21]. Nach Theorie 2) entsteht die RA durch einen nicht immunologisch-reaktiven Fehler des Proliferations- und Apoptosesystems der Synovialmembran, ähnlich der Tumorigenese [5].

Zwar können virale und bakterielle Infektionen, mechanische Traumata, sowie genetische Einflüsse als Faktoren in der Pathogenese der RA gelten, ein einziger Auslöser scheint jedoch noch nicht gefunden zu sein, der sämtliche histologischen, immunologischen und klinischen Symptome erklärt [105].

Beispielsweise wird bei bis zu 70% der Erkrankten wird eine Assoziation zum HLA-Antigen DR4 gefunden [42].

Zu den histopathologischen Veränderungen in der RA zählen die Hyperplasie der Deckzellschicht, eine Aktivierung des synovialen Stromas mit erhöhter Zelldichte der residenten Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen) mit Riesenzellaggregaten, sowie leukozytäres Infiltrat mit Lymphozytenaggregaten, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen. Die Ausprägung der einzelnen Parameter ist abhängig von der Schwere der Erkrankung und ist durch den histopathologischen Synovialitis-Score semiquantitativ erfassbar [64].

Schon sehr früh im Krankheitsverlauf finden sich Autoimmunantikörper gegen Citrullin (eine nicht proteinogene Aminosäure) im Serum von RA Patienten. Dies geht meist mit einer schlechteren Prognose des Krankheitsverlaufs einher [42].

Diese anti-CCP-Antikörper sind die sensitivsten (60%) und spezifischsten (>90%) serologischen Marker der RA und sind teilweise Jahre vor Krankheitsmanifestation nachweisbar [42].

Eine weitere Theorie zur Entstehung der RA beruht auf den Makrophagen. So korrelieren der Schweregrad sowie die Schmerzausprägung mit der Anzahl der Makrophagen im Synovialgewebe [59]. Durch erhöhte Expression von MHC-II Molekülen auf ihrer Zellmembran und gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, -6, -10, -13, -15, -18 sowie Wachstumsfaktoren wie TNF- $\alpha$  fördern sie den entzündlichen Fortgang der Erkrankung [12].

Seit einiger Zeit finden jedoch die aktivierten Fibroblasten im Stroma und in der Deckzellschicht eine größere Beachtung. Sie scheinen das Zentrum der Matrixdegeneration und damit der Gelenkszerstörung darzustellen [81].

## **1.3 Riesenzelltumor**

### **1.3.1 Definition**

Der Riesenzelltumor des Knochens ist eine durch osteolytische Läsionen gekennzeichnete Neoplasie mit unterschiedlicher Ausprägung des Krankheitsbildes [10]. Die Riesenzelltumore (RZT) machen einen Anteil von etwa 4 - 5% aller Tumore des Skelettsystems aus [14, 111] und zählen damit zu den seltenen Tumorentitäten des Menschen. Etwa 80% der RZTs nehmen einen gutartigen Verlauf mit einer

Rezidivrate von 20 - 50% [32]. Junge Erwachsene nach Schluss der Epiphysenfuge sind am häufigsten von RZTs betroffen. Etwa 60% der Patienten sind männlich [35]. Die Tumore sind in den Epiphysen der langen Röhrenknochen (distaler Femur, proximale Tibia/Radius, Humerus), aber auch in 5% der Fälle im Os Sacrum [7] lokalisiert. Das Wachstum des RZTs bleibt unbehandelt jedoch nicht auf den Knochen beschränkt, sondern greift auch auf das angrenzende Bindegewebe und auf Nachbarstrukturen über [70]. Damit gilt der RZT als semimaligne. In ca. 2% der Fälle treten bei fortgeschrittener RZT-Erkrankung Lungenmetastasen auf. Die chirurgische Resektion des Tumors ist die Therapie erster Wahl, welche ggf. zur besseren Operabilität von neoadjuvanten Therapien ergänzt wird [111].

### **1.3.2 Pathogenese**

Der zelluläre Ursprung der RZTs wird bei den Osteoklasten vermutet, da diese in ihrer charakteristischen histologischen Erscheinung mit multinukleären Riesenzellen diesen gleichen [54]. Neben den multinukleären Riesenzellen (mRZ) besteht der Riesenzelltumor aus zwei weiteren mononukleären Zelltypen: die spindelförmigen fibroblastenähnlichen Stromazellen (FäZ) und die makrophagenähnlichen Zellen (MäZ), welche CD68 positiv sind.

Die tumorogene Komponente des RZTs besteht jedoch - nicht wie zunächst vermutet - aus den mRZs, da diese ebenso wie die MäZs nach einige vollzogenen Zellzyklen absterben. Lediglich die FäZs stellen die proliferative Komponente mit gestörtem programmierten Zelltod dar [37, 122]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die FäZs die Formierung der Riesenzellen kontrollieren. Der Ursprung der neoplastischen Stromazellen bleibt bisher unklar [85].

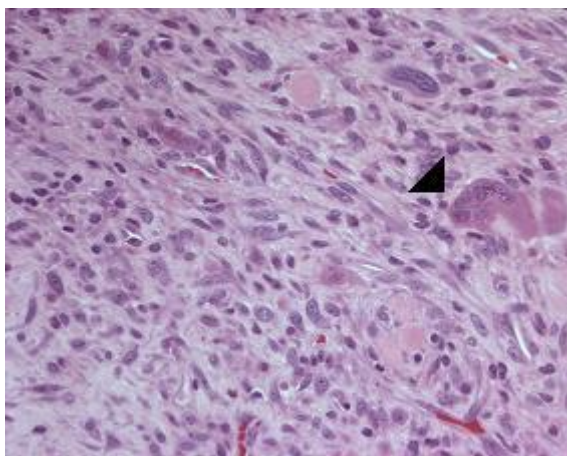
Als mesenchymaler Tumor, existiert für den RZT kein uniformes Normalgewebe, aus welchem er sich entwickelt.

## 1.4 Matrixdegradation in RA und RZT

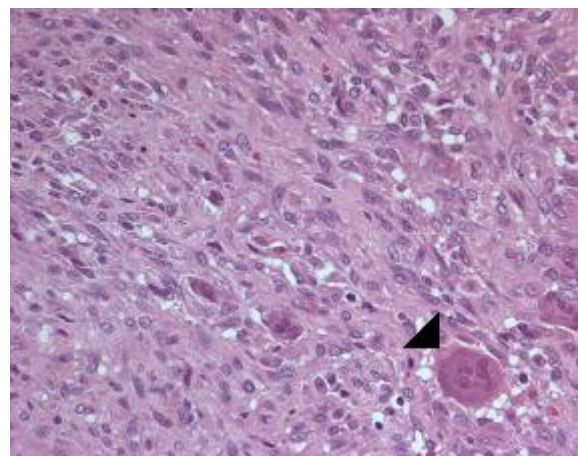
### 1.4.1 Gemeinsamkeiten der histopathologischen Morphologie

Wie zuvor beschrieben findet sowohl in RA als auch RZT extensiver Umbau und Abbau von extrazellulärer Matrix statt, der zu Knorpel- und Knochendestruktion führt. Daneben finden sich in beiden Erkrankungen lichtmikroskopische Gemeinsamkeiten in der Morphologie: Sowohl RA als auch RZT weisen ein dichtes fibroblastäres Stroma auf. Ferner treten in beiden Entitäten multinukleäre Riesenzellen (siehe Abbildung 1.1) auf. Diese sind jedoch unterschiedlichen Ursprungs. Hierbei bleibt zu beachten, dass die Riesenzellen in der RA einen viel geringeren Beitrag zur aktiven Matrixdegradation als im RZT haben. In beiden Fällen unterscheiden sich die Fibroblasten jedoch von ihrem normalen Phänotyp [84]. Sie werden als aktivierte Fibroblasten, Tumor-assoziierte Fibroblasten oder Myofibroblasten bezeichnet [53]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden diese Zellen durchgängig als aktivierte Fibroblasten bezeichnet.

**RA**



**RZT**



*Abbildung 1.1 Darstellung der histopathologischen Morphologie von RA (high-grade Synovialitis) und RZT*

*HE-Färbung, 400x (Original)*

*RA: Hohe Zellularität des Stromas mit Riesenzelle; 3 Punkte gemäß Synovialitis-Score*

*RZT: Monomorph fibroblastenartiges Stroma mit einzelnen Riesenzellen*

▲ *multinukleäre Riesenzelle*

Bereits Rudolf Virchow beobachtete 1867 Leukozyten im Stroma von malignen Tumoren und knüpfte die Entstehung von malignen Prozessen eng an chronische Entzündungen auf Grund lichtmikroskopischer Gemeinsamkeiten der Gewebearchitektur [5]. Heute weiß man, dass weltweit 15% aller Tumore auf infektiöse/inflammatorische Mechanismen zurückzuführen sind [19].

#### 1.4.2 Aktivierte Fibroblasten

Die Fibroblasten im Stroma von RA und Tumoren (hier am Beispiel des RZT) unterscheiden sich von Fibroblasten in Normalgewebe. Morphologisch weisen sie eine eher abgerundete Zellform, ein ausgeprägtes Zytoplasma, ein reich entwickeltes endoplasmatisches Retikulum sowie blasse Zellkerne mit mehreren prominenten Nucleoli auf [15, 27].

Neben morphologischen Unterschieden besitzen aktivierte Fibroblasten auch ein verändertes Genexpressionsprofil. Eine Mikroarrayanalyse zeigt, dass sich über 170 differenziell exprimierte Gene gegenüber normalen Hautfibroblasten finden [82]. So gelten derzeit als Hauptmerkmale der differenziellen Genexpression ein erhöhter Wert für *β-smooth muscle* Aktin, Vimentin und die Expression von *Fibroblast Activation Protein* (FAP) [15, 113]. Da aktivierte Fibroblasten im Genexpressionsprofil deutlich erhöhte Signale für matrixabbauende Proteine wie FAP oder Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aufweisen [89], nehmen sie die Rolle der Schaltzentrale von Matrixumbeziehungsweise –abbau ein.

Besonders reichlich finden sich diese aktivierten Fibroblasten in der Deckzellschicht der RA sowie in unmittelbarer Umgebung von Primärtumoren und Metastasen.

Trotz der direkten Nachbarschaft zu Tumorzellen sind aktivierte Fibroblasten genetisch stabil und diploid; daher gelten sie zurzeit als vielversprechendes Ziel in der Tumorbekämpfung [75].

Die besondere Destruktivität der aktivierten Fibroblasten im Vergleich zu ruhenden Gewebsfibroblasten wird durch eine erhöhte Motilität und ein anderes Muster von Adhäsionsmolekülen - wie den  $\beta_1$ -Integrinen - unterstützt. Integrine sind Transmembran-Heterodimere. Einige der Integrine weisen eine Funktion als Fibronectin-Rezeptoren auf, was im fibronectinreichen Milieu der RA zum Anheften der Fibroblasten an den Gelenkknorpel führt [89]. Diese Moleküle besitzen keine reine

Adhäsionsfunktion, sondern beeinflussen auch über Tyrosinkinase-Signalwege das intrazelluläre Milieu und sind im Tumorgewebe mit einer verringerten Chemotherapeutika-Aufnahme assoziiert [71].  $\alpha_3\beta_1$ -Integrin ist in der Lage, die matrixzerstörenden MMPs über den Transkriptionsfaktor AP-1 zu induzieren [114].

Die Transformation normaler zu aktivierten Fibroblasten ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheinen proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren einhergehend mit veränderten intrazellulären Signalwegen Schlüsselemente zu sein [59]. Ein spezifisches tumorbezogenes Mitogen zur Transformation ist bisher nicht bekannt. Hier zeigen besonders TNF- $\alpha$  und IL-1 besonderes Potential, da sie die Aktivierung und Destruktivität von Fibroblasten steigern. Die Quelle dieser Zytokine liegt in der pathologischen Immunantwort von Makrophagen, die die größten Produzenten darstellen. So weisen aktivierte Fibroblasten eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun auf, die zusammen den bereits erwähnten Komplex Adapterprotein AP-1 bilden [89]. Durch pro-inflammatorische Zytokine induziert führt neben AP-1 ebenfalls der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zu Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und MMPs bei [84, 89].

Untersuchte aktivierte Fibroblasten weisen in großer Anzahl Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* und des erst kürzlich entdeckten Tumorsuppressors *PTEN* auf, was *in vitro* mit der Umwandlung in den aggressiven Fibroblastentyp einhergeht [90]. Protoonkogene zeigen in aktivierten Fibroblasten eine pathologische Expression, die sich auf Ras abhängige Signalwege konzentrieren [81]. Die aktivierten Fibroblasten entgehen dem programmierten Zelltod und weisen eine größere Proliferationsrate auf, was histologisch mit der Hyperplasie der Deckzellschicht in RA einhergeht [52]. Trotz erhöhter Expression von Fas-Rezeptoren entgehen aktivierte Fibroblasten durch eine proteinvermittelte Fas-Ligand Resistenz der Apoptose [84]. Das Protein Sentrin findet sich überexprimiert in aktivierten Fibroblasten. Sentrin interagiert mit dem TNF- $\alpha$  Rezeptor sowie dem Fas-Rezeptor und verhindert somit die Apoptose. Antiapoptotische Wirkung besitzt auch das erhöhte Bcl-2 Niveau [84, 89].

Neben der eigenen Destruktivität steuern aktivierte Fibroblasten auch über andere Zellen die Matrixdegradation. Die Fibroblasten interagieren mit Gewebsmakrophagen und stimulieren deren Transformation zu Osteoklasten [41]. Ein ähnlicher Mechanismus wird bei der Bildung der mRZs im RZT diskutiert.

Des Weiteren weisen Kokulturen von aktivierten Fibroblasten und T- bzw. B-Zellen eine verzögerte Apoptose dieser auf, was auf eine Erhaltungsfunktion der pathologischen Immunantwort durch die aktivierten Fibroblasten hindeutet [89]. Alle genannten zellulären Veränderungen münden in einen stabilen Phänotypenwechsel der Fibroblasten, der auch nach Beendigung einer inflammatorischen Phase weiterhin besteht und zur Matrixdegradation beiträgt [81]. Dies deutet darauf hin, dass die aktivierten Fibroblasten nicht nur eine auf andere Zellarten reagierende, sondern vielmehr eine selbst agierende Rolle im pathologischen Geschehen von RA und Tumorwachstum haben. Somit können gemeinsame Mechanismen der Matrixdegradation in inflammatorisch wie nicht-inflammatorischen Erkrankungen vorliegen.

### **1.4.3 Gemeinsame Genregulation in RA und RZT**

Zur Untersuchung auf gemeinsame pathogenetische Mechanismen der Matrixdegradation und Invasion wurden genomweite Genexpressionsprofilanalysen von Normaldonor Synovialgewebe (ND) mit RA und RZT Gewebe (ein Normalgewebe zum Riesenzelltumor als mesenchymale Neoplasie ist nicht verfügbar) mittels des Affymetrix Genchip HG-U133A durchgeführt. Hierbei wurde besonders eine paarweise Überexprimierung von mRNA in RA und RZT gegenüber ND untersucht (siehe Kapitel 3.1.1).

Eine anschließend durchgeführte funktionelle Profilkomponentenanalyse (FPCA) gibt bei Arrayuntersuchungen von Gewebeproben mit heterogenem Zellbild Auskunft über die zelluläre Zusammensetzung des Gewebes, sowie über die Genaktivität der pathologischen Probe im Vergleich zu einer Probe gleicher Mischung dieser Zellen von normaler Aktivität [43].

Mittels Vergleich der Gewebekomponenten durch Mikroarrays und FPCA wurden 9 Kandidatengene ermittelt, die differentiell exprimiert werden. Diese neun Gene sind: CCR1, CCR5, VEGF, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-14 und FAP.



#### 1.4.4 Chemokin-Rezeptoren (CCRs)

Chemokine sind kleine Peptide von 8-17kD, deren Signalwege unter anderem an der Änderung von Ionenströmen, der Zellform und der Sekretion lysosomaler Enzyme beteiligt sind. Die Chemokin-Rezeptoren bestehen aus derzeit 18 Typen in 4 Subklassen, die nach der Anordnung der ersten beiden konservierten Cysteinreste eingeteilt werden. Die hier untersuchten Rezeptoren CCR1 und CCR5 gehören der CC-Klasse mit zwei direkt benachbarten Cysteinresten an [79]. Die CCRs sind Transmembranrezeptoren vom heptahelikalen Typ mit einer kurzen N-terminalen extrazellulären Domäne und einer C-terminalen intrazellulären Domäne, die Phosphorylierungsstellen zur Rezeptorregulation aufweist [72]. Zwischen den Transmembrandomänen spannen sich jeweils drei intra- und extrazelluläre Loops. Die CCRs sind an G-Proteine vom  $G_i$ -Typ gekoppelt und nehmen Einfluss auf das intrazelluläre Geschehen.

**CCR1** ist der erste entdeckte CC-Rezeptor und wird vorwiegend auf Lymphozyten und Monozyten in der peripheren Blutbahn exprimiert, befindet sich aber auch auf neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen sowie auf Astrozyten. Der 355 Aminosäuren umfassende Rezeptor ist hochaffin für die Zytokine RANTES und MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory protein*) und bindet des weiteren MCP-2/3 (*Monocyte chemoattractant protein*) sowie die noch wenig untersuchten Zytokine HCC-1 und CK $\beta$ 8 [79]. Das proinflammatorische IL-10 bewirkt auf Monozyten eine erhöhte CCR1 Expression durch eine längere mRNA Halbwertszeit [106].

**CCR5** besteht aus 352 Aminosäuren und besitzt eine Ähnlichkeit von 55% zu CCR1. Er bindet wie CCR1 RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2 und zusätzlich MIP-1 $\beta$ . Die Signale durch Zytokine werden intrazellulär zusätzlich über MAP-Kinase weitergeleitet. T-Lymphozyten, Monozyten und dendritische Zellen [96] sind CCR5-positiv.

Besondere Bekanntheit hat CCR5 dadurch erlangt, dass er als Korezeptor zu CD4 bei der gp120 Bindung von HI-Viren fungiert und somit den Eintritt der Viren in Lymphozyten ermöglicht. Eine homozygote 32bp Deletion im CCR5 Gen bietet eine erhöhte Resistenz gegen eine HIV-Infektion [8]. Der Entry-Inhibitor Maraviroc wird in der HIV-Therapie gegen CCR5 eingesetzt.

#### 1.4.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Das Zytokin **VEGF** ist einer der Hauptregulatoren endothelialer Zellphysiologie, der in mehreren gewebsspezifischen Isoformen auftritt. Als dimeres Glykoprotein (48kD) bindet es an den VEGF-Rezeptor (VEGF-R). VEGF-R gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren und dimerisiert bei Ligandenbindung [109]. VEGF wird von Makrophagen, Fibroblasten, aktivierten T-Zellen und Endothelzellen selbst produziert. Eine erhöhte VEGF-Bildung geht auf p53 Mutationen und Hypoxie zurück [28]. VEGF bewirkt hauptsächlich eine Endothelzellproliferation, erhöht aber auch über die induzierbare eNOS die Gefäßpermeabilität und wirkt so neben der Gefäßsprossung auch als proinflammatorisches Zytokin [109]. Die VEGF Expression ist während der Tumorprogression ebenfalls erhöht [115.]

#### 1.4.6 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die MMPs sind eine Gruppe von derzeit 24 zinkabhängigen Endopeptidasen, die an einer Reihe von Vorgängen wie Zellproliferation, Migration, Angiogenese, Apoptose, sowie dem Abbau und Freisetzung von Wachstumsfaktoren beteiligt sind [74].

In ihrer Vielfalt sind die MMPs in der Lage viele Proteine der ECM zu spalten und abzubauen. Dabei werden, in Teilen der ECM-Proteine als Vorstufen gebundene, Mediatoren freigesetzt und Zellsignalwege moduliert [25]. Die MMPs bestehen aus einem Signalpeptid (zur endosomalen Translokation), einem Propeptid (mit einem konservierten Cysteinrest, der als vierte Koordinationsstelle des katalytischen Zinkions dient), einer katalytischen Region, einer prolinreichen Domäne (*Hinge-Region*) sowie einer hämopexinähnlichen Domäne mit einem 4-blättrigen Propeller, der zur Substratspezifität beiträgt. Eine Besonderheit stellen die fünf Membrantyp-MMPs (MT-MMPs) dar, da sie als einzige nicht sezerniert sondern lediglich in die Zellmembran transloziert werden und daher zusätzlich noch eine C-terminale lipophile Transmembrandomäne aufweisen [60].

MMPs werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert, jedoch ist ihre Expression in pathologischen Geweben mit hohem Matrixum- und -abbau wie Tumorgewebe und RA stark erhöht. Chemokine und Zytokine aus Makrophagen und Tumorzellen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 regulieren über den MAP-Kinase Signalweg AP-1 und NF $\kappa$ B und somit eine Vielzahl der MMPs [88].

MMPs werden (mit Ausnahme der MT-MMPs) als Zymogene exprimiert, deren Propeptid mittels des Cysteinschalters das katalytische Zink-Ion blockiert und so vor frühzeitiger Aktivierung schützt. Für die Abspaltung des Propeptids sind proteolytische Enzyme, aber auch andere MMPs verantwortlich [74].

Die Deaktivierung von MMPs geschieht spezifisch durch die Gewebsinhibitoren der MMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) im Verhältnis von 1:1. Festzuhalten ist, dass zwar ein Ungleichgewicht von MMPs und TIMPs zu Gunsten der MMPs mit Matrixdestruktion einhergeht, ein Überschuss an TIMPs aber auch negative Auswirkungen auf den Matrixumbau haben kann [88].

Eine besondere Zellstruktur bei Matrixdegradation sind Invadopodien mit einer großen Dichte von matrixabbauenden Enzymen (neben FAP finden sich dort besonders MMP-2, -9 und -14) [77].

**MMP-1** oder auch Kollagenase 1 ist in der Lage die Kollagene I, II, III, VII, VIII und X sowie das Proteoglykan Aggrecan abzubauen. MMP-1 ist als eines von wenigen MMPs in der Lage, auch fibrilläres Kollagen zu spalten, was seine Bedeutung im Matrixabbau von Knochen und Knorpel unterstreicht [74]. Es wurde gezeigt, dass das Urokinase Plasminogenaktivator/Plasmin System an der Aktivierung von pro-MMP-1 beteiligt ist [66].

**MMP-2** (Gelatinase A) gehört zur Gruppe der Gelatinasen und ist in der Lage Gelatine, sowie die Kollagene IV, V, VII, XI abzubauen. Daneben spaltet MMP-2 Fibronectin, Laminin, Proteoglykane und aktiviert pro-MMP13. MMP-2 kommt eine besondere Rolle bei Zellinvasion, mit der Fähigkeit das in der Basalmembran vorkommende Kollagen IV sowie Laminin zu spalten, zu Gute. Die Aktivierung von MMP-2 geschieht durch einen einzigartigen Mechanismus. Hierbei bindet TIMP-2 C-terminal pro-MMP-2 und N-terminal MMP-14. Ein weiteres Molekül MMP-14 spaltet anschließend das Propeptid und aktiviert dadurch MMP-2 [74].

**MMP-3** gehört zu den Aktivatoren von pro-MMP-1 und pro-MMP-13 und baut als Stromelysin-1 die Kollagene II, IV, IX und XI sowie Fibronectin, Aggrecan, Laminin und Elastin ab. Das Enzym ist jedoch nicht in der Lage, fibrilläres Kollagen zu spalten [74]. Des Weiteren wird MMP-3 eine Rolle in der Regulation von Apoptose zugeschrieben [25].

**MMP-9** (Gelatinase B) besitzt im Vergleich zu MMP-2 die Fähigkeit Kollagen III zu spalten, vermag aber an sonstigen Matrixproteinen nur Proteoglykane und Elastin abzubauen. Zur Aktivierung von MMP-9 trägt im besonderem Maße MMP-13 bei [74]. Erhöhte Konzentrationen von MMP-9 in Synovialflüssigkeit gehen mit hoher Expression von VEGF einher, sodass eine Aktivierung der Angiogenese durch MMP-9 anzunehmen ist [110].

**MMP-14** ist eine membrangebundene MMP (MT1-MMP), welches an der Aktivierung von pro-MMP-2 und -13 beteiligt ist. Wie MMP-1 kann MMP-14 fibrilläres Kollagen abbauen. Neben den Kollagenen I, II und III spaltet MMP-14 Proteoglykane, Laminin und Fibronectin [74].

#### 1.4.7 *Fibroblast Activation Protein (FAP)*

Im Gegensatz zu den ubiquitär zu findenden MMPs ist **FAP** ein spezifisch exprimiertes Protein und eine N-glykosilierte Typ-II Transmembran-Serinprotease[53], die als Homodimer aktiv ist.

FAP wurde von zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander entdeckt. Eine Gruppe wies FAP als Epitop des monoklonalen Antikörpers F19, die andere als Seprase (*surface expressed protease*) auf Melanomzellen nach [117].

Das FAP-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 2 und weist eine Promotorregion von 245bp für den Masterregulator EGR1 auf, welcher für die Expression von Chemokinen wie TGF $\beta$  und PDGF verantwortlich ist [121].

Das FAP-Molekül besteht aus 760 Aminosäuren und besitzt als katalytisch inaktives Monomer ein Molekulargewicht von 95kD und als aktives Homodimer ein Gewicht von 170kD [1].

Das Homodimer teilt sich in drei funktionelle Gruppen ein. Extrazellulär sitzt ein  $\beta$ -Propeller (As 54-492), bestehend aus sieben Propellerblättern mit jeweils drei oder vier antiparallelen Proteindomänen [1, 95]. Der  $\beta$ -Propeller besitzt durch hervorstehende Loops mit zwei konservierten Glutamatresten (Glu 202 & 204) die Fähigkeit zur Substrat- und Matrixbindung [57].

Der  $\beta$ -Propeller sitzt der ebenfalls extrazellulären  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Region (As 27-53 & 493-760) auf, an deren Schnittstelle sich die nicht-klassische katalytische Triade von FAP befindet [1, 85]. Die Triade besteht aus Ser624, Asp702 und His734 [34, 100]. Die

katalytische Domäne sitzt in einer Tasche, die sowohl über eine flexible Pore des  $\beta$ -Propellers ( $\varnothing$  14Å), als auch über seitliche Öffnungen ( $\varnothing$  24Å) zugänglich ist [1]. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass FAP Substrate bevorzugt über die weiteren seitlichen Öffnungen zur katalytischen Region gelangen [46].

Zur Funktionsfähigkeit von FAP muss das Protein N-glykosiliert werden. Dafür sind 5 potentielle Glykosilierungsstellen vorhanden. Eine genaue Konfiguration der Glykosilierungen ist jedoch nicht bekannt [1].

Der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Region folgt eine Transmembrandomäne, die FAP in der Zellmembran verankert. Intrazellulär befindet sich eine lediglich sechs Aminosäuren lange N-terminale Proteindomäne[57]. Fibroblast Activation Protein wird nicht als Zymogen synthetisiert [91].

FAP wird heute zu einer Gruppe von Proteasen gezählt, welche gemeinhin als DASHs (*dipeptidyl-peptidase IV and structure homologues*) bezeichnet wird. Hierzu zählen neben FAP die Dipeptidyl-Peptidasen DPP-IV (auch CD26), DPP-8 und DPP-9 [119]. DPP-IV und FAP sind in ihrer Aminosäuresequenz zu etwa 50% homolog, in der katalytischen Region sogar über 70% [57]; DPP-IV und FAP sind wahrscheinlich aus einer Genduplikation hervorgegangen [1].

FAP weist neben der Dipeptidyl-Peptidase (Exopeptidase) Aktivität, welche alle DASHs aufweisen, auch als Alleinstellungsmerkmal eine Endopeptidase-Aktivität auf, die beide über die gemeinsame katalytische Domäne vermittelt werden[117].

Die DASH-Familie besitzt unter allen Proteasen als einzige die Fähigkeit, eine Peptidbindung nach einem Prolinrest (Pro-XAs) zu spalten [57]. Eine Vielzahl von Proteinen (hierunter Signalmoleküle, Chemokine) ist vor vorzeitiger Aktivierung durch eine N-terminale Dipeptid Prolinkappe geschützt, welche eine Unterscheidung von intakten und schon prozessierten Proteinen erlaubt [1, 13]. DPPs spalten die N-terminalen Dipeptide mit konserviertem Prolin in der P1-Position ab und aktivieren diese damit oder ändern ihre Rezeptorpräferenz [13].

FAP weist lediglich 3% der DPP-Aktivität von DPP-IV auf, was auf eine geringere Azidität in der Substratbindungsregion und den Austausch von Asp663 gegen Ala657 zurückzuführen ist [1]. Diese verminderte Azidität der Bindungstasche fördert wiederum die Endopeptidaseaktivität von FAP, da in der hydrophoben Region kein positiv geladener N-Terminus, sondern eine Peptidbindung zu liegen kommt [117]. In

Aktivitätsstudien zeigte sich Ac-Gly-Pro als selektivstes Substratmotiv für FAP DPP-Aktivität, gefolgt von anderen hydrophoben Aminosäureresten in der P2-Position [26].

Als Substrat für FAPs Endopeptidase-Aktivität wurde lange Kollagen I angenommen. Kürzlich wurde jedoch festgestellt, dass FAP nur nach vorheriger Kollagenproteolyse durch MMP-1 Kollagen I in kleinere Fragmente spalten kann. Des Weiteren wurde ein ähnlicher Vorgang für Kollagen III entdeckt. [17].

FAP übt seine Endopeptidase-Aktivität ab einer Peptidlänge von vier Aminosäuren aus [18] und spaltet Gelatin nach Prolin bevorzugt im Gly-Pro-Ala Motiv [2]. In der Bevorzugung von ungeladenen Aminosäuren in der P2 und P1' Position spiegelt sich erneut die hydrophobe Taschenstruktur von FAP wieder [117].

Vor einigen Jahren wurde eine Serumform von FAP ohne Transmembrandomäne entdeckt. Das *Antiplasmin cleaving enzyme* (APCE) spaltet Met- $\alpha$ 2-Antiplasmin, welches dadurch aktiviert wird und über Fibrinvernetzung und Plasmininhibition, die Fibrinolyse hemmt [68].

Im Gegensatz zu ubiquitär und unspezifisch -exprimierten MMPs und DPPs weist FAP eine restriktive und spezifische Expression auf [47]. Interessanterweise wurden Komplexe aus einem FAP und einem DPP-IV Homodimer entdeckt, deren genaue Aufgabe jedoch noch nicht bekannt ist [57]. Es besteht aber ein Zusammenhang mit Wachstum, Differenzierung und Angiogenese [57, 71].

In 90% aller epithelialen Karzinomgewebe (Primärtumore wie Metastasen) wird FAP im Stroma (und damit auf aktivierten Fibroblasten) aber nicht auf den Tumorzellen selbst exprimiert. Lediglich Melanome, Karzinome des Ovars, der Nieren [93] sowie Karzinome neuroendokrinen Ursprungs weisen kein FAP-positives Stroma auf [31]. Auf Mammakarzinomzellen wird FAP jedoch direkt exprimiert [47]. Eine Untereinheit der Sarkome (Spindelzellsarkome, Histiozytome) sowie Magenkarzinome vom zirrhotischen Typ weisen ebenfalls FAP-positive Tumorzellen auf [77]. Neben Tumorgewebe finden sich ebenfalls im RA-Stroma (besonders in der Deckzellschicht) sowie bei Leberzirrhose und Wundheilung FAP-positive Fibroblasten [23]. In normalen Geweben findet sich, bis auf Endometrium (Zyklus-abhängig in der proliferativen Phase) und Haut (proliferierende Melanozyten in Naevi) keine FAP-Expression [48]. Physiologisch tritt FAP in der fetalen Lungenentwicklung auf [57]. In Fibroatheromen vom Typ IV-V

(hochgradige Arteriosklerose) wurde FAP kürzlich auf *smooth-muscle*-Aktin exprimierenden Zellen in der Media von Koronararterien nachgewiesen [11].

FAP wird auch im Zusammenhang mit geringerer Invasivität beobachtet. Patientinnen mit invasivem duktalem Brustkarzinom mit FAP-Expression im Stroma eine längere Überlebenszeit als Patientinnen ohne FAP auf [3].

Somit agiert FAP in unterschiedlichen Fällen invasivitätsfördernd oder -hemmend. Dieser Widerspruch löst sich in den Gemeinsamkeiten zwischen Wundheilung und Matrixzerstörung: Hyperpermeabilität von Gefäßen, Fibrinablagerung und Fibrinolyse [3] treten in beiden Prozessen auf, führen aber zu unterschiedlichen Ergebnissen. Des Weiteren wird die unterschiedliche Wirkung von FAP durch unterschiedlichen Abbau von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren vermutet [93]. Durch die spezifische Expression von FAP in Tumorstroma und RA scheint ein gemeinsamer Mechanismus der Matrixdegradation wahrscheinlich und bietet möglicherweise effektive Therapiemöglichkeiten im Kampf gegen die jeweilige Erkrankung.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Von gemeinsamen morphologischen Merkmalen der inflammatorisch bestimmten RA und dem nicht-inflammatorischen Stroma des RZT ausgehend, wurden in Vorarbeiten gemeinsam differenziell exprimierte Gene mittels Genexpressionsvergleich in RA/RZT-Proben gegenüber Normalgewebe ermittelt, welche Kandidaten für gemeinsame Mechanismen von Matrixum- und -abbau darstellen. Auf Grund dieser Übereinstimmung sollte untersucht werden, inwieweit sich die einzelnen Gene und ihre Produkte in allen drei Entitäten verhalten.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden in folgenden Punkten:

- 1) Eine immunhistochemische Validierung der Genexpressionsprofile sollte darüber Aufschluss geben, inwieweit beide Entitäten Konvergenzen aber auch Divergenzen bezüglich ihrer Proteinexpression aufweisen. Ziel ist es, einen detaillierten Einblick in die quantitative Ausprägung zu erlangen.
- 2) Ein Vergleich beider Datensätze sollte signifikante Änderungen der Expression der einzelnen Antigene in einer Entität bzw. zwischen den Entitäten darlegen.
- 3) Es sollte untersucht werden, welches der Gene in seiner Ausprägung mit dem histopathologische Synovialitis-Score zur semiquantitativen Bestimmung der Schwere einer rheumatischen Gelenkserkrankung korreliert und damit als immunhistochemischer Marker in der diagnostischen Praxis dienen könnte.
- 4) Unter den einzelnen Antigenen sollte besonders FAP in den Fokus genommen werden, da es am spezifischsten für RA und Tumorgewebe steht und auf aktivierten Fibroblasten exprimiert wird.
- 5) Es sollte abschließend beleuchtet werden, wie FAP als therapeutisches Target bei malignen Erkrankungen genutzt werden kann und wie diese Ergebnisse auf die Therapie der RA übertragen werden können. Es erfolgt ein Ausblick auf zukünftige Entwicklungen der anti-FAP-Therapie.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Gewebe

Es wurde Material von 55 Patienten (30 Proben in Paraffin fixiert und 25 Proben nativ, d. h. in Stickstoff schockgefroren) verwendet. Das paraffinfixierte Gewebe teilt sich in 20 Proben von Synovialgewebe und 10 Proben von Riesenzelltumoren (RZT; Ø35 Jahre 53% ♂ 47% ♀) auf. Von den nativen Geweben stammen jeweils 10 Proben der Gelenksinnenhaut von gesunden Normal Spendern (ND; Ø48 Jahre 88% ♂ 12% ♀) und 10 Proben von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA; Ø62 Jahre 25% ♂ 75% ♀). Die Proben von Normal Spendern wurden bei Sektionen entnommen und eine entzündliche oder degenerative Erkrankung ausgeschlossen.

Das kryoasservierte Material teilt sich in 15 Proben von Synovialgewebe und 10 Proben von Riesenzelltumoren auf. Die Proben der Gelenksinnenhaut bestehen aus 5 Fällen von Normalgewebe und 10 Fällen von Rheumatoider Arthritis. Siehe dazu auch Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1 Gewebeproben

<b>Probencode</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Syn-Sc.</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Schnitte</b>
Syn 66b	ND	1/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Paraffin
Syn 517a	ND	2/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Paraffin
Syn 559a	ND	0/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Paraffin
Syn 561a	ND	0/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Paraffin
Syn 564b	ND	0/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Paraffin
Syn 568b	ND	0/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Paraffin
Syn 709c	ND	0/9	männlich	43	Knie	Paraffin
Syn 745a	ND	0/9	männlich	63	Knie	Paraffin
Syn 746	ND	1/9	männlich	60	Knie	Paraffin
Syn 757a	ND	0/9	männlich	22	Knie	Paraffin
Syn 504a	RA	5/9	weiblich	60	Knie	Paraffin
Syn 588a	RA	8/9	weiblich	39	Knie	Paraffin
Syn 589c	RA	7/9	weiblich	61	Knie	Paraffin
Syn 590c	RA	7/9	männlich	60	Knie	Paraffin
Syn 656c	RA	8/9	männlich	71	Knie	Paraffin
Syn 662a	RA	6/9	weiblich	44	Knie	Paraffin
Syn 664c	RA	5/9	weiblich	71	Knie	Paraffin
Syn 675a	RA	4/9	weiblich	60	Knie	Paraffin
Syn 684a	RA	4/9	weiblich	64	Knie	Paraffin
Syn 702a	RA	5/9	weiblich	74	Knie	Paraffin
RT 10	RZT	n.b.	männlich	23	Femur	Paraffin
RT 16B	RZT	n.b.	weiblich	32	Humerus	Paraffin
RT 18	RZT	n.b.	männlich	28	Femur	Paraffin
RT 21A	RZT	n.b.	männlich	39	Tibia	Paraffin
RT 30	RZT	n.b.	weiblich	32	Mittelhand	Paraffin
RT 31	RZT	n.b.	weiblich	17	Tibia	Paraffin
RT 32	RZT	n.b.	weiblich	14	Femur	Paraffin
RT 35	RZT	n.b.	männlich	34	unbekannt	Paraffin
RT 37	RZT	n.b.	männlich	27	Humerus	Paraffin
RT 38B	RZT	n.b.	weiblich	61	Tibia	Paraffin

Syn 47	ND	1/9	männlich	37	Knie	Kryo
Syn 66b	ND	1/9	unbekannt	unbekannt	Knie	Kryo
Syn 89	ND	0/9	männlich	24	Knie	Kryo
Syn 481	ND	1/9	weiblich	64	Knie	Kryo
Syn 914	ND	1/9	männlich	71	Knie	Kryo
Syn 115	RA	7/9	männlich	51	Knie	Kryo
Syn 116	RA	6/9	männlich	56	Knie	Kryo
Syn 232	RA	5/9	weiblich	73	Knie	Kryo
Syn 235	RA	7/9	weiblich	76	Knie	Kryo
Syn 236	RA	5/9	weiblich	47	Knie	Kryo
Syn 246	RA	6/9	weiblich	62	Knie	Kryo
Syn 262	RA	2/9	weiblich	65	Hüfte	Kryo
Syn 266	RA	7/9	männlich	46	Knie	Kryo
Syn 458	RA	4/9	weiblich	80	Knie	Kryo
Syn 581	RA	3/9	weiblich	78	Knie	Kryo
RT 1	RZT	n.b.	männlich	46	Femur	Kryo
RT 2	RZT	n.b.	männlich	48	LWS	Kryo
RT 3	RZT	n.b.	weiblich	22	Femur	Kryo
RT 4	RZT	n.b.	männlich	57	Becken	Kryo
RT 5	RZT	n.b.	weiblich	24	Radius	Kryo
RT 6	RZT	n.b.	männlich	67	Becken	Kryo
RT 12	RZT	n.b.	weiblich	46	Radius	Kryo
RT 13	RZT	n.b.	männlich	41	Radius	Kryo
RT 36	RZT	n.b.	weiblich	8	unbekannt	Kryo
RT 37	RZT	n.b.	männlich	27	Humerus	Kryo

## **2.2 Aufarbeitung des Gewebes**

### **2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes für Kryoschnitte**

Das Gewebe wurde nach Entnahme in etwa 1x1x2cm große Blöcke geschnitten und in Cryo-Vials (Cryo-S non-pyrogenic, Greiner, Frickenhausen) mit Tissue-Tech (Miles, Eckhart, USA) eingedeckt und bei -180°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C (VIP-Series, Sanyo, Osaka, Japan). Zur weiteren Untersuchung wurde das Gewebe am Kryostat (2800 Frigocut N, Reichert Jung, Nussloch) zu 7µm dicken Gefrierschnitten verarbeitet und auf Objektträger aufgebracht (Super Frost Plus, Microm, Walldorf). Die Schnitte wurden anschließend 12 Stunden luftgetrocknet und bei -20°C (Premium-Series, Liebherr, Ort, Land) gelagert.

### **2.2.2 Aufarbeitung des Gewebes für Paraffinschnitte**

Nach Gewebeentnahme wurden die Proben in etwa 1x1x2cm große Blöcke geschnitten und unmittelbar in 4%-igem gepufferten Formalin fixiert. Das Gewebe wurde anschließend mit Paraffin (Paraplast Plus 56°C, McCormick, St. Louis, USA) in Kassetten (Einbettkassetten, Klinipath, Duiven, Niederlande) eingebettet. Anschließend wurden von den Blöcken mittels eines Rotationsmikrotoms (RM2035, Leica, Solms) 1 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger (Super Frost Plus, Microm, Walldorf) aufgebracht und 12 Stunden bei 58°C im Wärmeschrank (Functionline T12, Hereaus, Hanau) getrocknet wurden. Hierbei wurde das Paraffin abgeschmolzen.

## **2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die Schnitte wurden neben der Immunhistochemie (IHC) auch für HE-Färbungen zur morphologischen Kontrolle des Gewebes und zur Diagnostik durch den Pathologen genutzt. Hierbei erfolgte bei den Paraffinschnitten eine kurze Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe. Die Paraffin- und Kryostatschnitte wurden dann für 3 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer überführt, um saure Strukturen anzufärben. Die Gegenfärbung der basischen Gewebsstrukturen erfolgte nach kurzem Bad in destillierten Wasser durch 3 minütiges Überführen in Eosin. Abschließend wurde die Alkoholreihe in Gegenrichtung durchlaufen und die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

## 2.4 Immunhistochemie

### 2.4.1 Immunhistochemie für Paraffinschnitte

Die Schnitte wurden zunächst in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierbei werden auf jeder Stufe zwei Bäder von jeweils 5 Minuten durchgeführt (Ausnahme: erstes Xylolbad 10 Minuten) in folgender Reihe durchgeführt: Xylol (Xylene UN1307, JT Baker, Phillipsburg, USA), Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70% (alle Herbeta, Berlin), destilliertes Wasser. Anschließend wurden die Schnitte in 1x TBS-Puffer überführt. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte 5 Minuten bei einem pH-Wert von 6,1 in Zitratpuffer gekocht.

Hierbei handelt es sich um eine der derzeit spezifischsten und am besten zu handhabenden Färbemethoden.

Um falsch positive Signale durch endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes zu verhindern, wurden die Schnitte aus dem TBS-Waschpuffer entnommen, der Puffer abrinnen gelassen und 5 Minuten mit Wasserstoffperoxid (Peroxidase Blocking Solution S2001, DAKO, Glostrup, Dänemark) behandelt.

Zwischen allen nun folgenden Schritten wurden die Schnitte zweimal 3 Minuten lang in TBS gewaschen.

Als Detektionsmethode wurde die indirekte *Labeled Streptavidin-Biotin* (LSAB) Methode gekoppelt an eine Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) benutzt. Die Primärantikörper wurden in Verdünnungen von 1:20 bis 1:150 mit Diluent (Antibody Diluent 00-3118, Zymed, Wien, Österreich) für 30 oder 60 Minuten aufgetragen (siehe Tabelle 2.2). Nach Bindung des Primärantikörpers an das jeweils darzustellende Epitop wurde der biotinylierte Link (Biotinylated Universal Link, K0690, DAKO, Glostrup, Dänemark) für 15 Minuten aufgetragen. Der verwendete Brückenantikörper bindet universell an die Primärantikörper jeglicher Spezies und kann daher bei allen Färbungen verwendet werden. Der HRP-Streptavidin Komplex (HRP-Streptavidin K0690, DAKO, Glostrup, Dänemark) wurde im dritten Schritt ebenfalls für 15 Minuten inkubiert.

Zur Darstellung der Epitope mittels einer Farbreaktion wurde nun das Chromogen (Liquid DAB + Substrate, K3468, DAKO, Glostrup, Dänemark) hinzugegeben. Die chemische Farbreaktion geschieht hier durch DAB (3`3-Diaminobenzidin) und ergibt

eine bräunliche Färbung. Die Farbreaktion lief bei allen Färbungen für 10 Minuten ab und wurde dann mit Leitungswasser beendet.

Als Gegenfärbung wurden die Schnitte für 3 Minuten in ein Hämatoxylin-Bad (nach Mayer, für Ansatz siehe dazu Tabelle 2.5) gestellt, um als Kontrast zur spezifisch-immunhistochemischen Färbung die Kerne aller Zellen darzustellen. Abschließend bläuten die Schnitte in heißem Leitungswasser, um überschüssiges Hämatoxylin abzuwaschen und wurden mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex, Merck, Darmstadt) eingedeckelt (Deckgläser 24x46mm, Menzel-Gläser, Braunschweig).

#### **2.4.2 Immunhistochemie für Kryoschnitte**

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden zunächst in PBS-Waschpuffer überführt und 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Fixierung mit Aceton (Acetone UN1090, JT Baker, Phillipsburg, USA), um eine zu starke Zersetzung des nativen Gewebes zu verhindern.

Bei den Kryostatschnitten wurde als Detektionssystem die indirekte Peroxidasemethode gekoppelt an ein Polymer verwendet. Zunächst wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Dies wurde zwischen allen nun folgenden Schritten wiederholt. Analog zu den Paraffinschnitten wurde der Peroxidaseblock zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität durchgeführt. Der Primärantikörper (F11-24, Calbiochem, Darmstadt) wurde in der Verdünnung 1:1000 in Diluent (Antibody Diluent 00-3118, Zymed, Wien, Österreich) für 20 Minuten in einer Feuchtkammer aufgebracht (siehe auch Tabelle 2.2).

Als Sekundärantikörper und Peroxidaseträger fungierte das HRP-Polymer (Super Picture Polymer HRP 87-9963, Zymed, Wien, Österreich), welches für 20 Minuten auf die Schnitte aufgetragen wurde. Die Farbreaktion erfolgte mittels des DAB-Chromogens (Liquid DAB +Substrate, K3468, DAKO, Glostrup, Dänemark) mit einer Einwirkzeit von 10 Minuten, sowie die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer und das Eindeckeln. Hierbei wurde xylohaltiges Eindeckmedium (Merck, Darmstadt) verwendet.

Tabelle 2.2 Primäre Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zeit</b>	<b>Produktdaten</b>
CCR1	Maus	1:50	60 min	MAB145, R&D Systems, Minneapolis, USA
CCR5	Ziege	1:150	30min	ab1673, abcam, Cambridge, USA
VEGF	Maus	1:100	30min	VG1, invitrogen, Carlsbad, USA
MMP-1	Maus	1:75	30min	MAB3307, Chemicon, Temecula, USA
MMP-2	Kaninchen	1:100	30min	513-3654, Zytomed, Berlin
MMP-3	Maus	1:20	30min	MAB3369, Chemicon, Temecula, USA
MMP-9	Kaninchen	1:100	30min	513-3661, Zytomed, Berlin
MMP-14	Kaninchen	1:30	30min	513-3864, Zytomed, Berlin
FAP	Maus	1:1000	20min	F11-24, Calbiochem, Darmstadt

### 2.4.3 Positiv- und Negativkontrollen.

Zur Kontrolle der Färbungen wurden jeweils eine Negativ- sowie eine Positivkontrolle angefertigt. Als Negativkontrolle diente ein Synovial- oder Riesenzelltumorschnitt, der an Stelle des Primärantikörpers mit Diluent behandelt wurde. Die übrigen Arbeitsschritte erfolgten regulär. Als Positivkontrolle diente Gewebe, das laut Antikörper-Datenblatt gesichert die Zielproteine exprimiert (siehe Tabelle 2.3).

*Tabelle 2.3 Positivkontrollen*

<b>Antikörper</b>	<b>Positivgewebe</b>
CCR1	Tonsille
CCR5	Milz
VEGF	Colonkarzinom
MMP-1	Mammakarzinom
MMP-2	Mammakarzinom
MMP-3	Mammakarzinom
MMP-9	Mammakarzinom
MMP-14	Mammakarzinom
FAP	Leberzirrhose

Sämtliche in dieser Untersuchung verwendeten Reagenzien, Apparate und Hilfsmittel (wie etwa Computerprogramme), sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Ansätze für verwendete Lösungen, sowie deren Anfertigung sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.



Tabelle 2.4 Verwendete Reagenzien und Apparate

## 1. Abschnitt Chemikalien &amp; Reagenzien

## 2. Abschnitt Apparate &amp; Programme

Reagenz / Gerät	Code (falls vorhanden)	Hersteller
Aceton	UN1090	JT Baker, Phillipsburg, USA
DAB System	K3468	DAKO, Glostrup, Dänemark
Diluent	00-3118	Zymed, Wien, Österreich
Eindeckmedium		Merck, Darmstadt
Ethanol	64193 / 64116	Herbeta, Berlin
HRP-Polymer	87-9963	Zymed, Wien, Österreich
LSAB/HRP System	K0690	DAKO, Glostrup, Dänemark
NaCl	1.06404	Merck, Darmstadt
Natriumzitrat	1.06448	Merck, Darmstadt
Paraffin		McCormick, St. Louis, USA
PBS	14220	Invitrogen, Carlsbad, USA
Peroxidaseblock	S2001	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tissue-Tech	0201.08926	Reichert Jung, Nussloch
Tris-Base	1.08382	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	1.08219	Merck, Darmstadt
Xylol	UN1307	JT Baker, Phillipsburg, USA
Zitronensäure	1.00244	Merck, Darmstadt
Blockschlitten		Klinipath, Duiven, Niederlande
Cryo-Vials		Greiner, Frickenhausen
Deckgläser		Menzel-Gläser, Braunschweig
Foto-Mikroskop		Leica, Solms
Foto-Programm		Leica, Solms
Kryostat-Mikrotom		Reichert Jung, Nussloch
Objektträger		Microm, Walldorf
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage		Sartorius, Göttingen
Rotationsmikrotom		Leica, Solms

Statistikprogramm	SPSS, Chicago, USA
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeschrank	Hereaus, Hanau

*Tabelle 2.5 Ansätze für Lösungen*

<b>Lösung</b>	<b>Ansatz</b>
Tris-Puffer 10x	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9,0g Tris-Base</li> <li>- 68,5g Tris-HCl</li> <li>- 87,8g NaCl</li> <li>- 1000ml Aqua dest</li> </ul>
Zitratpuffer (pH 6)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9ml 0,1M Zitronensäure (in Aqua dest gelöst)</li> <li>- 41ml 0,1M Natriumzitrat (in Aqua dest gelöst)</li> <li>- 950ml Aqua dest</li> </ul> <p>(ggf. auf pH6 hin titrieren)</p>
Hämatoxylin nach Mayer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 8g Hämatoxylin</li> <li>- 1g Natriumjodat</li> <li>- 250g Kalialaun</li> <li>- 250g Chloralhydrat</li> <li>- 5g Zitronensäure</li> <li>- 4000ml Aqua dest</li> </ul> <p>(über Nacht rühren lassen)</p>
Eosin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25g Eosin gelblich</li> <li>- 600ml Aqua dest</li> <li>- 1400 Ethanol 100%</li> <li>- 3ml Eisessig je 300ml</li> </ul>

## 2.5 Validierung der Immunhistochemischen Färbungen (Immunreaktiver-Score)

Zur Bestimmung und Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (DMRBE, Leica, Solms) beurteilt. Hierbei diente der Immunreaktive Score (IRS, nach Remmele et al. 1987 [94], modifiziert) als Grundlage. Der Score bedient sich zweier Parameter: der Prozentzahl der Positivpopulation (PP) sowie der Färbeintensität (*Staining Intensity* SI).

Für die Positivpopulation wurden wie folgt Punkte vergeben: 0% gefärbt = 0, 1 - 25% gefärbt = 1, 26 - 50% gefärbt = 2, 51 - 75% gefärbt = 3, 76 - 100% gefärbt = 4. Die Färbeintensität wurde in folgende Abstufungen bewertet: keine Färbung = 0, schwache Färbung = 1, mittlere Färbung = 2, starke Färbung = 3. Die Punkte der beiden Parameter wurden zum Immunreaktiven Score multipliziert, es gilt  $PP \times SI = IRS$ . Somit können für einen Schnitt 0 bis 12 Punkte vergeben werden.

Der Score wurde von zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt. Neben des eigentlichen Scores wurde das Anfärbungsverhalten der einzelnen Gewebekompartimente beachtet.

## 2.6 Histopathologische Graduierung der HE-Schnitte (Synovialitis-Score)

Die HE gefärbten Schnitte von Synovialgewebe wurden mittels eines Lichtmikroskops (DMRBE, Leica, Solms) dem histopathologischen Synovialitis Score nach Krenn [63, 64] bewertet, um die Ausprägung der Erkrankung zu quantifizieren. Beim Synovialitis-Score handelt es sich um einen standardisierten Bewertungsmechanismus des Synovialgewebes, der sich aus drei Komponenten zusammensetzt.

Synoviale Deckzellschicht (Anzahl der Zelllagen), synoviales Stroma (Dichte der Bindegewebszellen) und leukozytäres Infiltrat (Lymphfollikel) werden hierbei als Kriterien herangezogen und auf eine semiquantitative Weise mit einem Zahlenwert belegt. Es werden hierbei für jedes Kriterium Punkte auf einer Skala von 0 bis 3 (0=normal, 1=leichtgradig, 2=mäßig, 3=schwergradig) vergeben und die einzelnen Werte addiert, so dass man einen Score zwischen 0 und 9 erhält.

Ein Score von 4 oder höher (Sensitivität 73%, Spezifität 86%) spricht für das Vorliegen einer primär entzündlichen, rheumatischen Gelenkerkrankung [64]. Diese *high-grade* Synovialitis ist das morphologische Korrelat der Systemerkrankung RA im

Synovialgewebe. Die Einstufung der Gewebeproben durch den Synovialitis-Score ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

## **2.7 Statistische Auswertung**

### **2.7.1 Signifikanztestung des Immunreaktiven Scores (IRS)**

Zur semiquantitativen Bewertung des IRS der einzelnen Färbungen wurden zunächst für jeden Schnitt die Mittelwerte aus den Scores beider Beobachter gebildet. Anschließend wurden aus diesen Werten die Mittelwerte des IRS für Normalgewebe, Rheumatoide Arthritis und Riesenzelltumor in den jeweiligen Färbungen ermittelt.

Diese Mittelwerte wurden durch einen nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test (SPSS 14.0, SPSS, Chicago, USA) auf signifikante Änderungen des IRS innerhalb der Entitäten einer immunhistochemischen Färbung untersucht um festzustellen, inwieweit die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Daten zufällig entstanden sind. Hierbei wurden ND gegen RA, ND gegen RZT und RA gegen RZT bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  verglichen.

### **2.7.2 Korrelationsuntersuchung zwischen IRS und Synovialitis-Score**

Die verwendeten Proben von Synovialgewebe wurden daraufhin untersucht, ob sich eine Beziehung zwischen dem das gesamte Gewebe betrachtenden Synovialitis-Score und dem sich auf nur ein Epitop beziehenden Immunreaktiven Score darstellt. Hierzu wurde Korrelationskoeffizient nach Pearson aus den Werten des Synovialitis-Scores und des IRS der jeweils 20 (15 bei FAP) Synovialproben gebildet (SPSS 14.0, SPSS, Chicago, USA). Es bleibt zu beachten, dass sich dadurch zwar gemeinsame Änderungen zweier Größen darstellen lassen, sich jedoch keine kausale Beeinflussung der Größen untereinander ergeben muss.

### 3. Ergebnisse

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden von jeder Entität 30 Schnitte gefärbt (10x ND, 10x RA, 10x RZT). Als Ausnahme gilt FAP mit 25 gefärbten Schnitten (5x ND, 10x RA, 10x RZT). Die Proben von Synovial- und Riesenzelltumorgewebe wurden auf die Antigene CCR1, CCR5, VEGF, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-14 und FAP untersucht. Mittels des IRS (Abbildung 3.4) wurde die immunhistochemische Anfärbung an den gesamten Schnitten von zwei unabhängigen Beobachtern bewertet und statistisch auf signifikante Unterschiede zwischen den Entitäten eines Antigens untersucht. Es wurde ein Korrelationsvergleich zwischen Synovialitis-Score und dem IRS der jeweiligen Antigene durchgeführt. Die Bewertung nach dem Synovialitis-Score erfolgte anhand von begutachteten Proben aus einer Gewebedatenbank.

#### 3.1 Voruntersuchungen

##### 3.1.1 Mikroarray Analysen

Bei Mikroarray-Analysen werden Genchips (Affymetrix HG-U133A; Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet, die jeweils einzelsträngige Oligonukleotid-DNA-Sequenzen von bestimmten Genen enthalten. Im vorliegenden Fall enthält der Chip eine spezifische Nukleotidsequenz jedes Gens des menschlichen Genoms an einer spezifischen Stelle des Chips.

Die in den Geweben enthaltene RNA wird mittels reverser Transkriptase zu cDNA umgeschrieben und durch Transkription zu cRNA amplifiziert, welche radioaktiv oder fluoreszenztechnisch markiert wird.

Diese markierte RNA wird dann mit dem Chip hybridisiert. Hierbei gibt die an einem bestimmten Ort auf dem Chip gemessene Radioaktivität bzw. Fluoreszenz Auskunft über die Menge der entsprechenden RNA bzw. DNA eines Gens der untersuchten Probe [43].

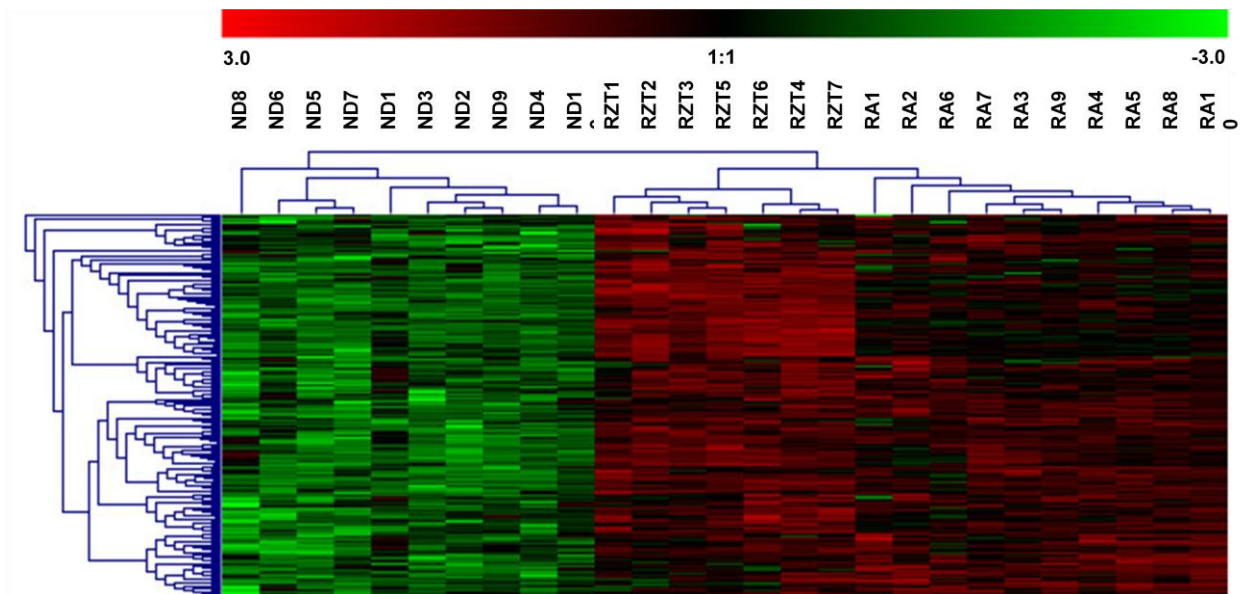
Die Findung der neun zu validierenden Gene bestand aus einem mehrstufigen Prozess, welcher auf der Annahme beruht, dass der lichtmikroskopischen Ähnlichkeit der Gewebe von RA und RZT (dichtes fibroblastäres Stroma, multinukleäre Riesenzellen) auch ähnliche Pathomechanismen der Matrixdegradation und Invasion zu Grunde

liegen. Dies ähnelt der auf Virchow zurückzuführenden These, dass chronische Entzündungen in Ihrem Verhalten und Ihrer Morphologie malignen Prozessen entsprechen können [5].

In einer ersten Untersuchung wurden Gewebeproben von Patienten mit bekannter RA (n=10), von Patienten mit bekannter (n=10) Osteoarthritis (OA) mit physiologischen ND Gewebeproben (n=10) unter Zuhilfenahme des Mikroarrays untersucht [39]. Mittels FPCA Analyse wurde die prozentuale Zellzusammensetzung der Gewebeproben, sowie die zu erwartende Genaktivität für den Normalzustand dieser Mischung bestimmt (siehe Kapitel 3.1.2.). Hieraus ergaben sich eine signifikante Überexprimierung der Gene MMP-1, MMP-3 sowie CCR5 in der RA im Vergleich zum ND-Synovium, welche in dieser Arbeit validiert werden sollen. Signifikante erhöhte mRNA Signale zwischen RA und OA zeigten sich für die Gene CCR1 und VEGF [40].

In einer zweiten Analyse wurden mittels gleicher Verfahren insgesamt n=7 Gewebeproben von RZT (5 Primärtumore, 2 Rezidive) untersucht [39]. Neben differenziell zwischen Primär- und Rezidivtumor exprimierten Genen wie (FGFR3, Ephrin A1, CD52 und Claudin 7) zeigten sich signifikante Unterschiede für MMP-1 und CCR1 [40], welche zur Validierung ausgewählt wurden.

Die dritte Analyse beruht auf dem paarweisen Vergleich der Genexpressionsprofile der in den beiden vorangegangenen Untersuchungen verwandten RA (n=10) und RZT (n=7) Proben mit ND-Synovium (n=10). Insgesamt 169 Gene zeigen eine mehr als 70% differenzielle Expression in RA und RZT Proben gegenüber dem Normalspendergewebe (Fritsche-Guenther & Häupl, Charité Berlin; nicht publiziert). In der Clusteranalyse (siehe Abbildung. 3.1) zeigt sich die gemeinsam differenzielle Genaktivität der RA/RZT-Gruppe gegenüber der ND-Gruppe, welche zum überwiegenden Teil eine bis zu dreifach erhöhte Aktivität gegenüber dem Normalgewebe aufweist. Hierunter befindet sich neben den bereits in den Voruntersuchungen gefundenen Genen für MMP-1, MMP-3, CCR1 und CCR5 auch FAP, welches ebenfalls in die Validierung aufgenommen wurde.



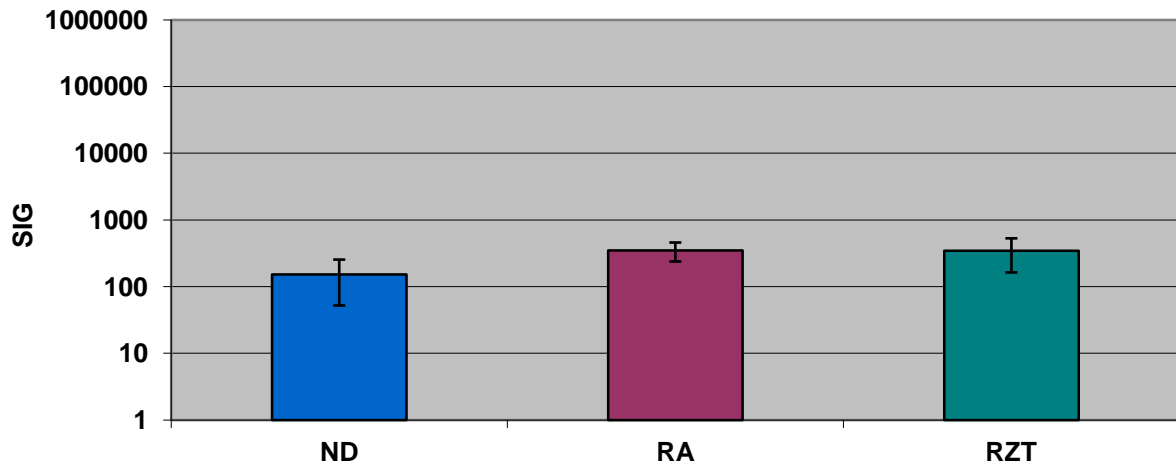
*Abbildung 3.1 Cluster-Analyse des Genexpressionsprofilvergleichs RA/RZT vs. ND*  
 Der Vergleich zeigt eine differenzielle Expression zwischen ND und RA- bzw. RZT-Gewebe, die größtenteils gemeinsam erhöhte Signale für Kandidatengene gegenüber dem Normal-Synovium aufweisen. Rote Balken markieren eine bis zu dreifach erhöhte, grüne Balken hingegen eine bis zu dreifach erniedrigte Genaktivität  
 (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. R. Fritsche und PD Dr. med. T. Häupl, Charité, Berlin)

Daneben zeigte sich eine Reihe von weiteren MMPs deutlich überexprimiert. Zur Validierung wurden die MMPs -2 und -9, welche der noch nicht vertretenden Gelatinase-Familie angehören und MMP-14 als Membrantyp-MMP ausgewählt. Zur Beurteilung der Änderung der Angiogenese zwischen den drei Entitäten wurde VEGF ebenfalls zur Validierung durch die Immunhistochemie bestimmt.

Die Ergebnisse des Genexpressionsprofilvergleichs sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

a)

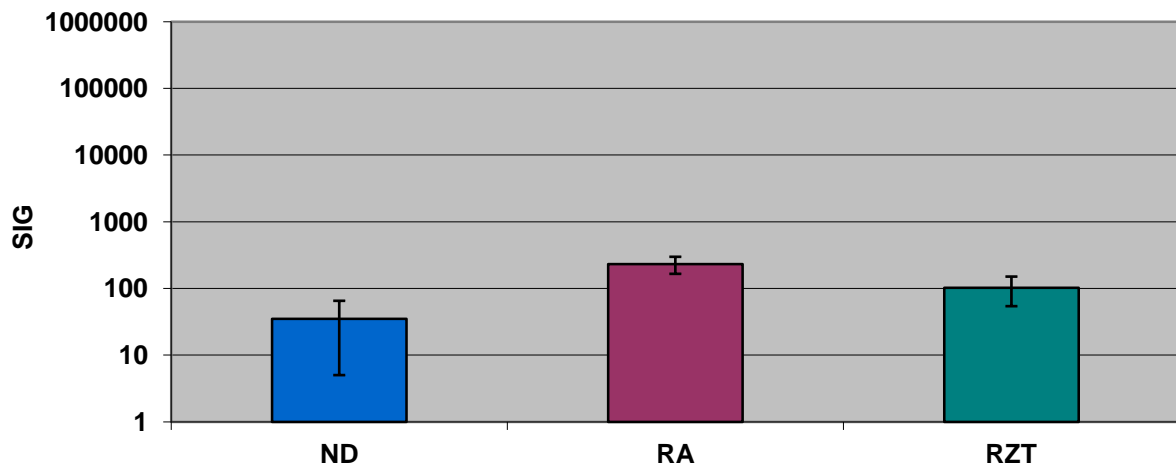
## CCR1



<b>CCR1</b>	153 (+/- 101)	348 (+/- 10)	346 (+/- 183)
-------------	---------------	--------------	---------------

b)

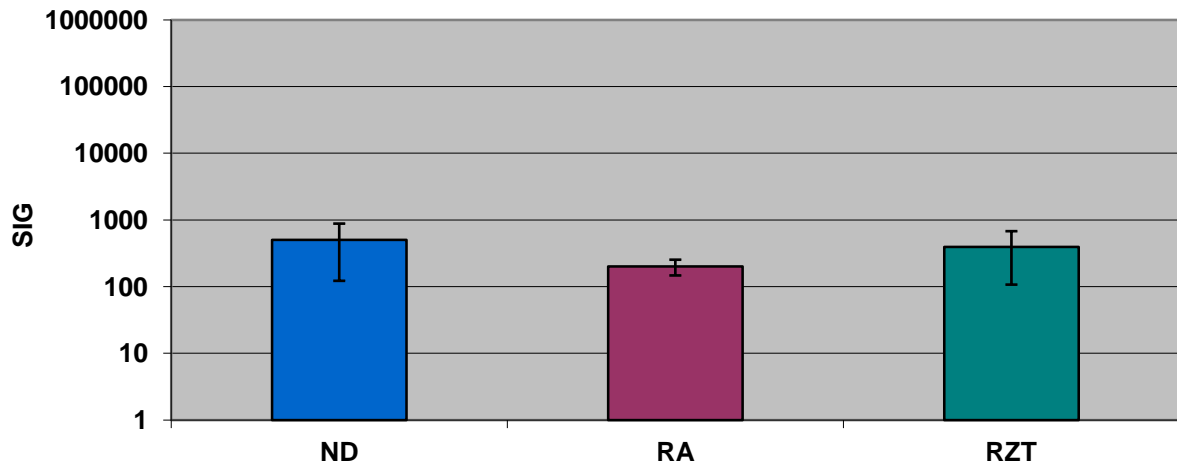
## CCR5



<b>CCR5</b>	35 (+/- 30)	231 (+/- 66)	102 (+/- 48)
-------------	-------------	--------------	--------------

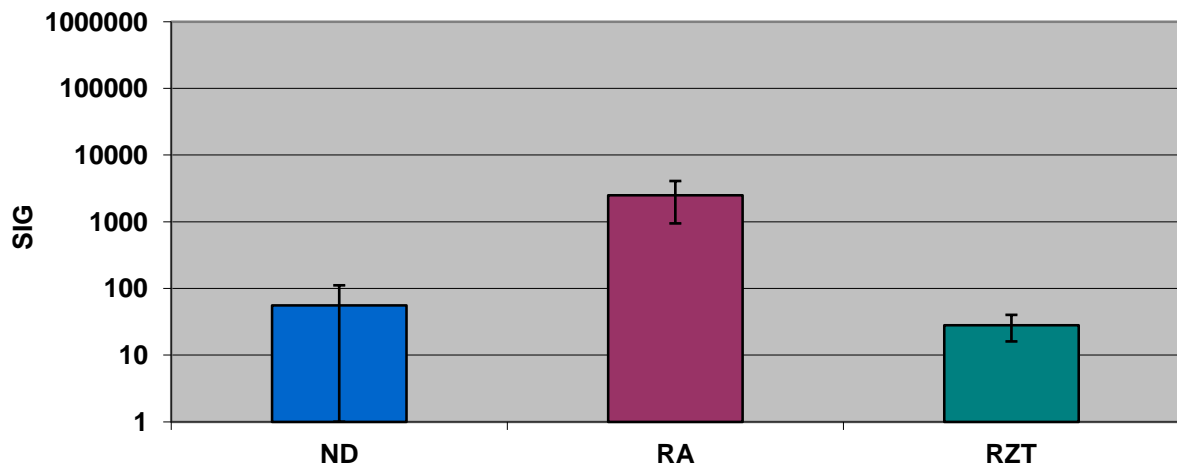


c) **VEGF**



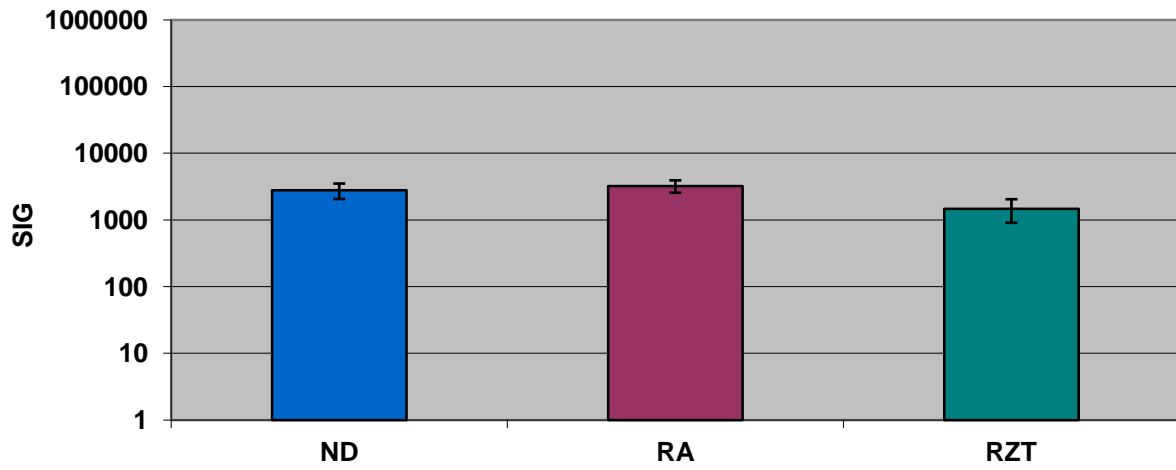
<b>VEGF</b>	501 (+/- 379)	200 (+/- 53)	392 (+/- 284)
-------------	---------------	--------------	---------------

d) **MMP-1**



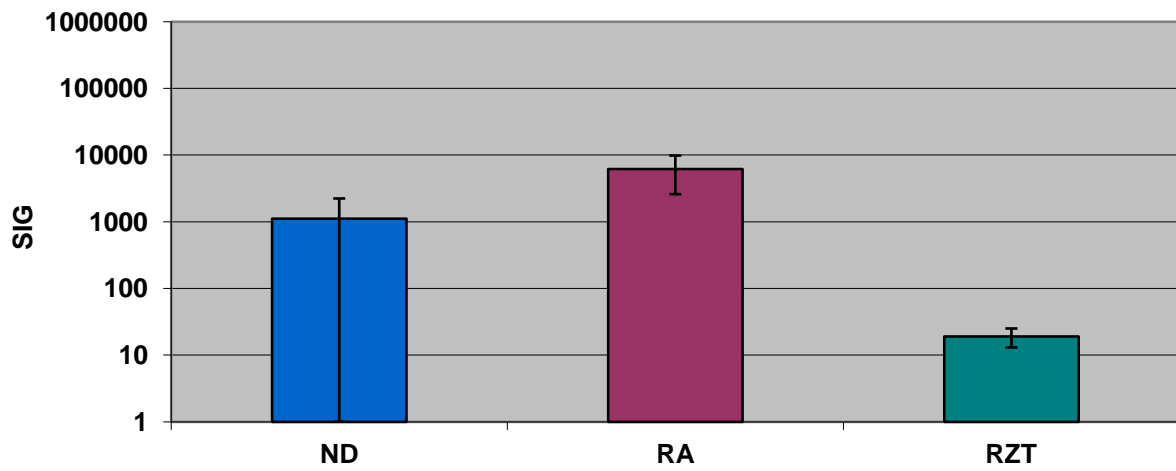
<b>MMP-1</b>	56 (+/- 106)	2504 (+/- 1563)	28 (+/- 12)
--------------	--------------	-----------------	-------------

e)

**MMP-2**

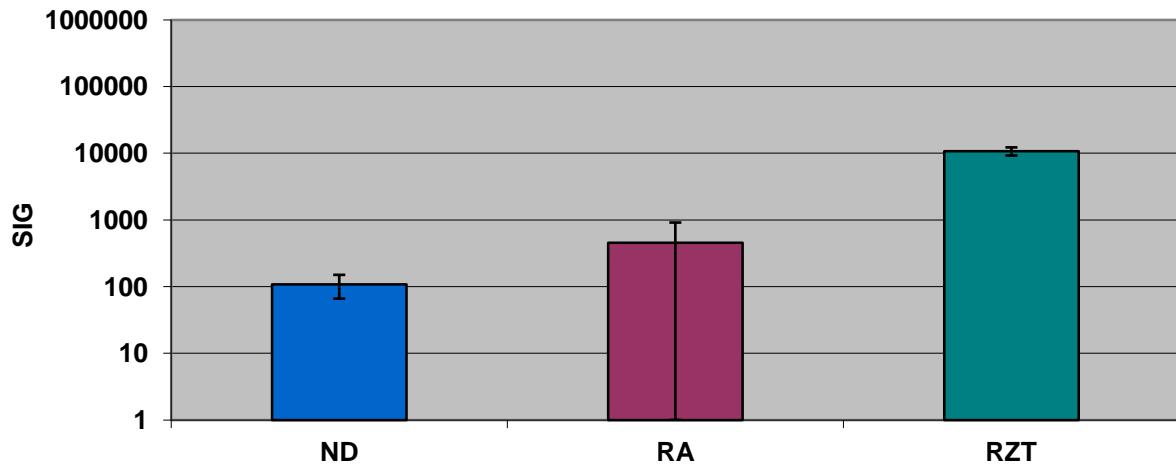
<b>MMP-2</b>	2781 (+/- 725)	3233 (+/- 682)	1472 (+/- 568)
--------------	----------------	----------------	----------------

f)

**MMP-3**

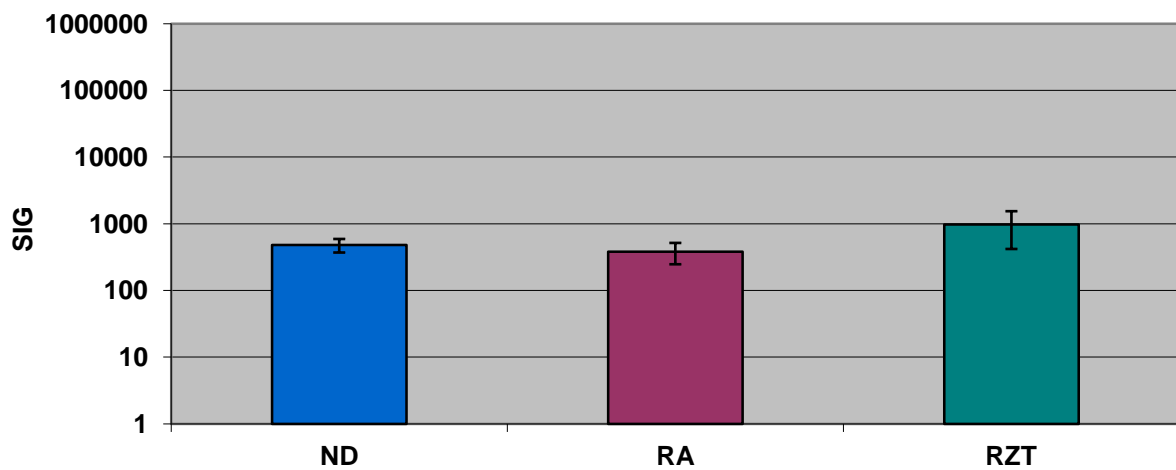
<b>MMP-3</b>	1113 (+/- 1181)	6184 (+/- 3603)	19 (+/- 6)
--------------	-----------------	-----------------	------------

g)

**MMP-9**

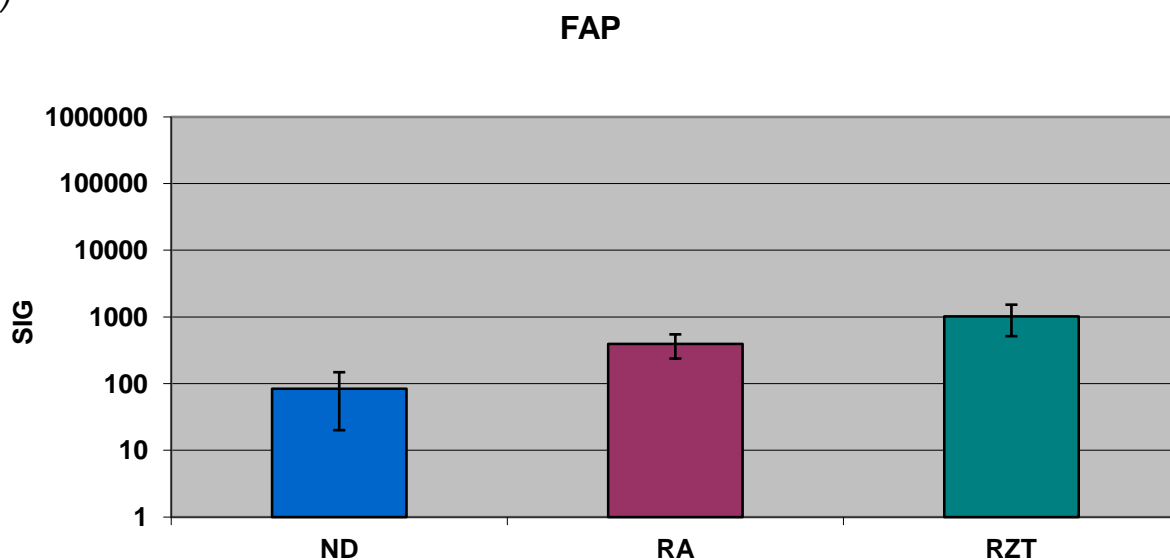
<b>MMP-9</b>	108 (+/- 42)	457 (+/- 532)	10726 (+/- 1493)
--------------	--------------	---------------	------------------

h)

**MMP-14**

<b>MMP-14</b>	479 (+/- 110)	380 (+/- 134)	977 (+/- 560)
---------------	---------------	---------------	---------------

i)



<b>FAP</b>	84 (+/- 64)	392 (+/- 155)	1019 (+/- 505)
------------	-------------	---------------	----------------

*Abbildung 3.2 Genexpressionsprofil*

Die Ordinate entspricht in zehnerlogarithmischer Darstellung der relativen Expression der Gene auf dem Affymetrix Chips (SIG). Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

SIG = Stärke des Fluoreszenzsignals hybridisierter DNA

(Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. R. Fritsche und PD Dr. med. T. Häupl, Charité, Berlin)

Um gemeinsame Mechanismen der Genregulation in RA und RZT zu finden, wurde nach signifikant erhöhten Signalwerten sowohl in der RA, als auch im RZT gegenüber der ND-Synovialis (ND vs. RA und ND vs. RZT) gesucht. Lediglich die Chemokinrezeptoren **CCR1** und **CCR5**, sowie **FAP** weisen in beiden Entitäten signifikant erhöhte mRNA-Signale gegenüber dem ND-Gewebe auf (siehe Tabelle 3.1).

*Tabelle 3.1 Signifikanztestung der Ergebnisse der Mikroarrayuntersuchungen ( $p < 0,05$ ); signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet.*

*Grau hinterlegte Antigene weisen in RA & RZT gegenüber ND signifikant höhere SIG-Werte auf.*

Antigen	ND vs. RA	ND vs. RZT	RA vs. RZT
CCR1	<0,001*	0,013*	0,978
CCR5	<0,001*	0,003*	<0,001*
VEGF	0,024*	0,530	0,052*
MMP-1	<0,001*	0,496	<0,001*
MMP-2	0,168	0,001*	0,035*
MMP-3	<0,001*	0,028*	<0,001*
MMP-9	0,053	<0,001*	<0,001*
MMP-14	0,087	0,014*	0,005*
FAP	0,012*	0,021*	0,002*

*(Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. R. Fritsche, Charité, Berlin)*

Es fällt auf, dass das VEGF-Signal in der RA signifikant geringer ausfällt, als im Normalgewebe. Im RZT weisen MMP-2 und MMP-3 signifikant geringere Werte der Signalstärke auf, als in der ND-Synovialis (Abbildung 3.2).

### **3.1.2 Funktionelle Profilkomponentenanalyse (FPCA)**

Die Untersuchung von Gewebeproben (im Gegensatz zu Zellkulturen) mit Variabilität an Zellarten und Zellzahl erschwert die Aussage über das „wahre“ Genexpressionsprofil einer Entität. Gerade bei mit Entzündungszellen durchsetzten Geweben wie der RA stellt dies ein großes Problem dar, da zwischen erhöhter Genexpression als pathogenetische Ursache der Erkrankung und erhöhter Messwerte aufgrund einer inflammatorisch reaktiven Antwort unterschieden werden muss.

Um Genregulationen zu erkennen, muss daher die zelluläre Zusammensetzung der Gewebeprobe ermittelt werden, um hieraus ein virtuelle Signatur der Genaktivität aller Zellen der Probe in ihrem Normalzustand zu erstellen. Der Vergleich dieses virtuellen Mischprofils mit dem vorliegenden Messprofil lässt erkennen, ob es sich um eine echte Hochregulierung eines Gens, oder nur um einen erhöhten Messwert aufgrund des

inflammatorischen Infiltrates handelt [40, 43]. Diese über Algorithmen erzeugbaren Datensätze werden auch *functional profile component analysis* (FPCA) genannt und wurden auf alle mit dem Genchip untersuchten Gewebeproben von RA, ND und RZT angewandt [43].

Mittels FPCA wurden die Anteile der verschiedenen Zellklassen an den Gewebeproben von RA und RZT bestimmt. Während beim RZT der Anteil der neutrophilen Granulozyten höher liegt als bei der RA (12,8 % vs. 1,8 %), weist die RA eine größere Komponente von Lymphozyten auf (12,0 % vs. 7,0 %). Die dominierende Zellart sind in beiden Entitäten jedoch die fibroblastären Zellen mit 68,0 % und 71,2 % (siehe Tabelle 3.2).

*Tabelle 3.2 Zellzusammensetzung von RA- und RZT-Gewebeproben mittels FPCA*

<b>Zellart</b>	<b>RA</b>	<b>RZT</b>
Monozyten	13,96 %	12,14 %
Neutrophile	1,75 %	12,80 %
T-Zellen	4,96 %	2,81 %
B-Zellen	6,93 %	4,24 %
Fibroblasten	71,17 %	68,0 %
Sonstige (z.B. Endothel)	1,23 %	0,1 %

*(Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. med. T Häupl und Dr. rer. nat. R. Fritsche, Charité, Berlin)*

### 3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Die Ergebnisse des Immunreaktiven Scores (IRS), der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen, sowie die Färbeintensität gibt folgende Tabelle 3.3 wieder.

*Tabelle 3.3 Ergebnisse des immunreaktiven Scores (IRS)*

*IRS=PP\*SI; Es ist zu beachten, dass die angegebenen Werte für PP und SI die gerundeten Mittelwerte darstellen, der angegebene Wert für den IRS aber ohne Mittelung der Einzelkomponenten berechnet wurde.*

	ND			RA			RZT		
	<i>PP</i>	<i>SI</i>	<i>IRS</i>	<i>PP</i>	<i>SI</i>	<i>IRS</i>	<i>PP</i>	<i>SI</i>	<i>IRS</i>
<b>CCR1</b>	1,3	1,0	<b>2,0</b>	3,6	2,2	<b>8,0</b>	3,2	1,7	<b>4,5</b>
<b>CCR5</b>	1,9	1,7	<b>3,4</b>	3,3	1,9	<b>6,4</b>	3,6	2,0	<b>7,2</b>
<b>VEGF</b>	0,7	1,2	<b>0,9</b>	2,1	1,5	<b>3,1</b>	1,8	1,7	<b>3,1</b>
<b>MMP-1</b>	2,6	1,7	<b>4,6</b>	4,0	2,2	<b>9,8</b>	3,6	2,1	<b>7,4</b>
<b>MMP-2</b>	1,1	2,3	<b>2,6</b>	2,3	2,4	<b>5,4</b>	2,8	1,8	<b>4,7</b>
<b>MMP-3</b>	0,8	0,6	<b>0,8</b>	2,8	1,7	<b>5,4</b>	0,8	0,8	<b>1,2</b>
<b>MMP-9</b>	0,0	0,0	<b>0,0</b>	3,1	2,4	<b>6,5</b>	3,1	2,9	<b>9,4</b>
<b>MMP-14</b>	1,3	1,6	<b>2,4</b>	3,0	2,1	<b>6,2</b>	3,1	2,0	<b>5,4</b>
<b>FAP</b>	0,8	1,3	<b>1,3</b>	3,3	2,4	<b>7,6</b>	3,9	2,5	<b>9,7</b>

### 3.2.1 CCR1

CCR1 zeigt im Normalgewebe (IRS 2,0) eine Anfärbung von Endothelzellen, im Stroma verteilten Makrophagen und Makrophagen in der Deckzellschicht. Im gesamten Gewebe finden sich in lockerer Einstreuung gefärbte und ungefärbte Zellen. Die RA-Fälle (IRS 8,0) weisen eine deutlich ausgedehntere Expression auf. Es zeigt sich eine ausgeprägte Färbung der synovialen Deckzellschicht. Die Lymphfollikel weisen eine besonders kräftige Expression auf (SI=2,2), wobei eine stärkere Expression der Lymphozyten am zur Deckzellschicht zugewandten Pol auffällt. Es zeigt sich weiterhin eine große Dichte von gefärbten Zellen im Stroma, mit Anfärbung von Makrophagen und Fibroblasten. Ebenso zeigt das Endothel eine starke Expression des Chemokinrezeptors. Riesenzelltumore (IRS 4,5) zeigen im Vergleich zur RA eine deutlich schwächere Expression (SI=1,7). Die multinukleären Riesenzellen weisen eine blasse und teilweise mosaikähnliche Anfärbung für CCR1 auf. Die Färbintensität der Fibroblasten- und Makrophagen-ähnlichen Zellen im Stroma ist stärker als die der multinukleären Riesenzellen.

Für CCR1 ergibt sich eine signifikante Steigerung des IRS zwischen ND und RA sowie ND und RZT. Auch die Werte von RA und RZT unterscheiden sich signifikant von einander, wobei sich eine Steigerung von RZT zu RA ergibt (Tabelle 3.4).

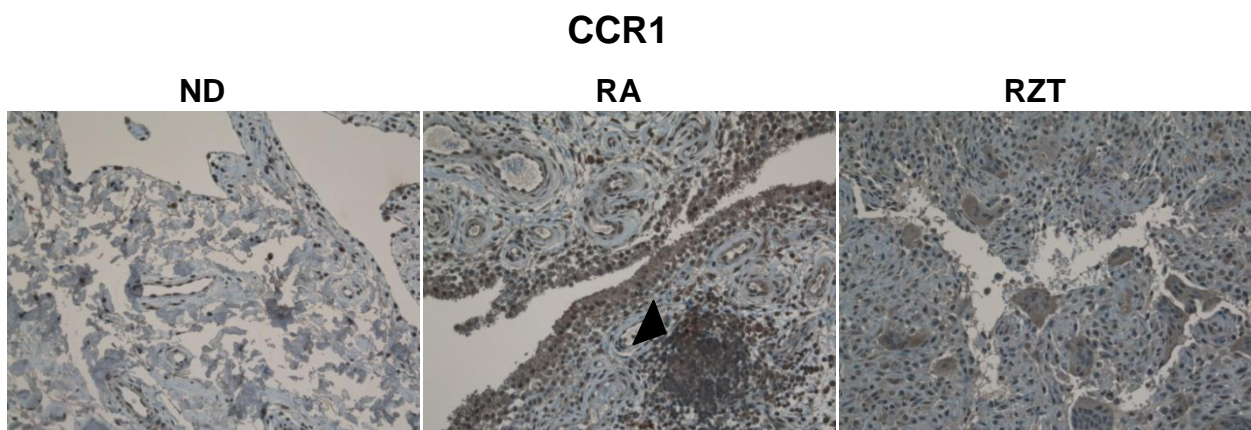
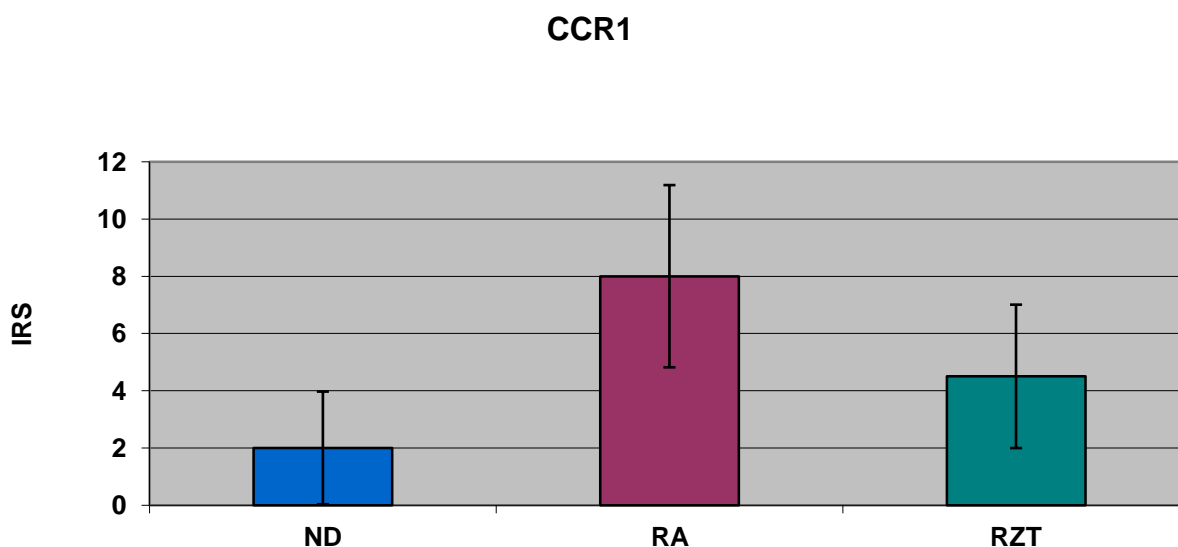


Abbildung 3.3 a) IHC

Vergr. 200x, Original





CCR1	2,0 (+/- 1,97)	8,0 (+/- 3,18)	4,5 (+/- 2,51)
------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 a) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

### 3.2.2 CCR5

Für CCR5 konnte mittels immunhistochemischer Untersuchung im Normalsynovium (IRS 3,4) eine deutliche Färbung der Endothelzellen sowie der perivaskulären Zellen detektiert werden. Im Stroma zeigen sich vereinzelt schwächer gefärbte Makrophagen und seltener CCR5-positive Fibroblasten. Die Deckzellschicht weist in einigen Fällen nur eine schwache Expression auf.

Das Bild der Expression in RA-Fällen (IRS 6,1) zeigt eine große Bandbreite von angefärbten Zellen (Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten). Besonders die Deckzellschicht ist sehr dicht und fokal besonders intensiv gefärbt (SI=1,9). Endothel und perivaskuläre Zellen zeigen ebenso eine Expression des CCR5-Antigens. Es fällt eine im Vergleich zu CCR1 geringere Dichte von gefärbten Stromazellen auf, wobei sowohl Makrophagen, als auch Fibroblasten eine CCR5 Expression aufweisen. Insgesamt zeigt CCR5 aber eine schwächere Expression als CCR1.

Im Riesenzelltumor liegt das Expressionsniveau mit einem IRS von 7.2 deutlich höher. Die multinukleären Riesenzellen zeigen eine zytoplasmatische Anfärbung. Der Anteil

nicht gefärbter Zellen im Tumorstroma ist gering, es überwiegen mittelstark (SI=2,0) angefärbte makrophagen- und fibroblastenähnliche Zellen. Das Endothel ist weniger stark gefärbt.

Bei CCR5 liegt eine Steigerung der Werte von ND über RA zu RZT vor, wobei sich signifikante Erhöhungen des IRS zwischen ND und RA sowie ND und RZT ergeben. Zwischen pathologischem und normalem Gewebe liegen somit signifikante Steigerungen des CCR-5 Levels vor, unter den beiden pathologischen Geweben jedoch nicht (Tabelle 3.4).

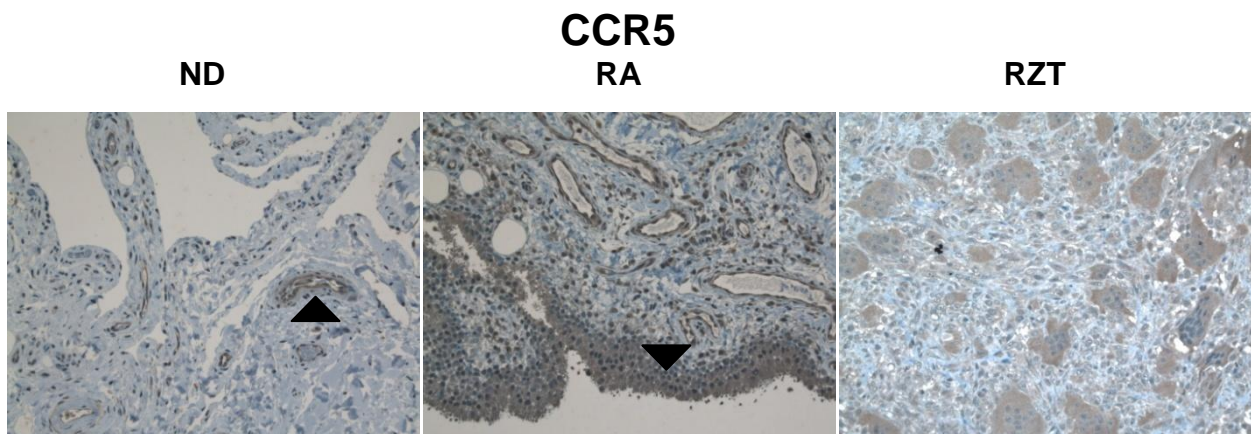
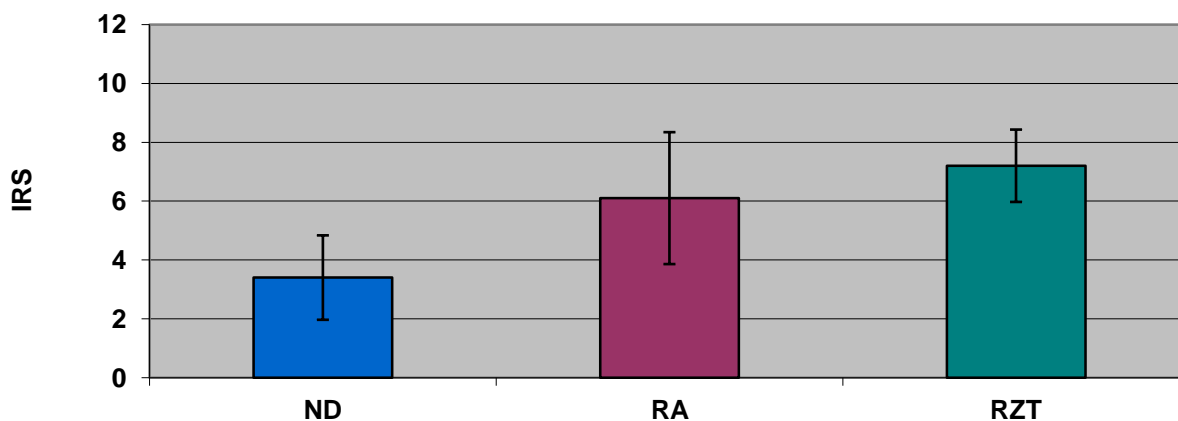


Abbildung 3.3 b) IHC

Vergr. 200x, Original

## CCR5



CCR5	3,4 (+/- 1,44)	6,1 (+/- 2,24)	7,2 (+/- 1,23)
------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 b) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

## 3.2.3 VEGF

VEGF als proangiogenetischer Faktor findet sich im Normalgewebe auf Endothelzellen exprimiert. Darüber hinaus weist die Deckzellschicht eine schwache Anfärbung auf. Insgesamt kann nur eine geringe Expression von VEGF detektiert werden (IRS 0,9).

Im pathologisch veränderten RA-Gewebe hingegen kann eine deutlich stärkere Expression von VEGF im Vergleich zu ND festgestellt werden (IRS RA 3,1 vs. IRS ND 0,9). Zwar weist das Endothel ebenfalls eine Expression von VEGF auf, jedoch ohne Intensitätsunterschiede zu ND-Schnitten (SI RA 1,5 vs. SI ND 1,2). Eine intensivere Färbung weisen die Deckzellschicht, Aggregate von Lymphozyten und Stromazellen auf. Insgesamt tritt eine Anfärbung bei etwa der Hälfte aller Zellen auf (PP=2,1).

Die multinukleären Riesenzellen in RZT-Schnitten (IRS 3,1) zeigen ein mittelstark angefärbtes, inhomogenes Zytoplasma. Eine stärkere Reaktion weisen die Endothelzellen sowie die Stromazellen auf. Diese sind locker zwischen den ungefärbten Zellen eingestreut.

Bei VEGF liegt eine Steigerung der Werte von ND über RA zu RZT vor, wobei sich signifikante Erhöhungen des IRS zwischen ND und RA sowie ND und RZT ergeben. Zwischen pathologischem und normalem Gewebe liegen somit signifikante Steigerungen des VEGF Levels vor, unter den beiden pathologischen Geweben jedoch nicht (Tabelle 3.4).

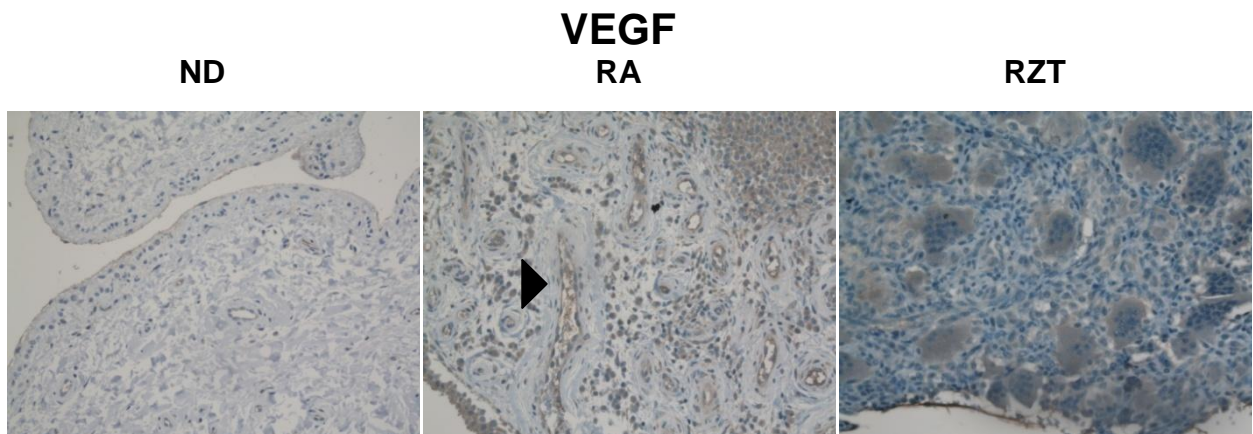
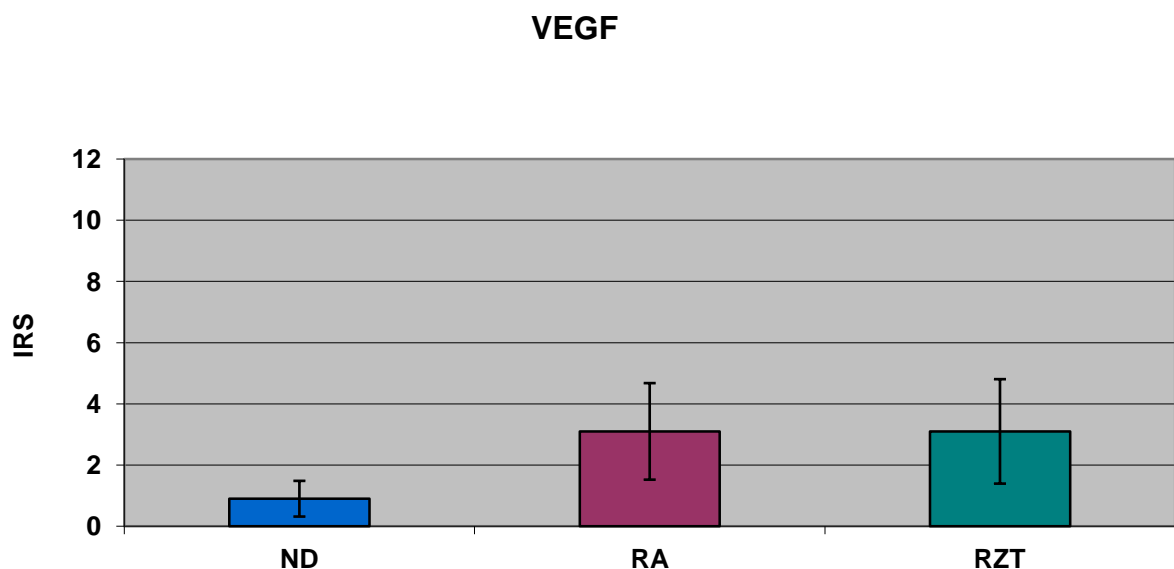


Abbildung 3.3 c) IHC

Vergr. 200x, Original



VEGF	0,9 (+/- 0,58)	3,1 (+/- 1,58)	3,1 (+/- 1,71)
------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 c) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

### 3.2.4 MMP-1

Die deutlichste immunhistochemische Reaktion in Normalgewebe zeigt der MMP-1 Antikörper (IRS 4,5). In allen Komponenten des Synovialgewebes finden sich stark gefärbte Zellen (SI=2,2). Endothel- und Stromazellen weisen eine deutliche Expression auf. Es zeigen sich keine Unterschiede der Expression zur Deckzellschicht.

Der Großteil der Zellen im RA-Synovium (PP=4) weist eine starke Expression auf (IRS 9,8). Die komplette Deckzellschicht exprimiert das MMP-1-Antigen. Lymphozytenaggregate und Stromazellen weisen bis auf einzelne Zellen eine starke Färbung auf. Schwächer gefärbt ist das Endothel.

Ein stark und fast komplett angefärbtes Stroma weisen die RZT-Schnitte (IRS 7,4) auf. Ebenso sind alle multinukleären Riesenzellen mittelstark gefärbt, wobei es sich um eine nukleare Expression handelt.

Bei MMP-1 liegt schon im Normalgewebe ein vergleichsweise hoher Wert vor, der jedoch sehr deutlich von den Werten bei RZT und vor allem bei RA überboten wird. Zwischen allen Geweben ergeben sich signifikante Unterschiede im Vergleich der IRS Werte (Tabelle 3.4).

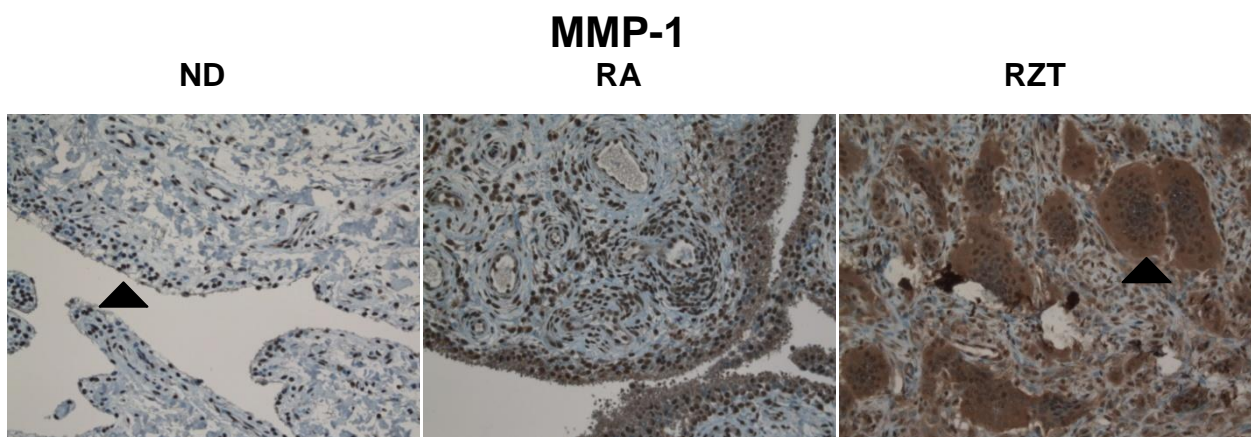
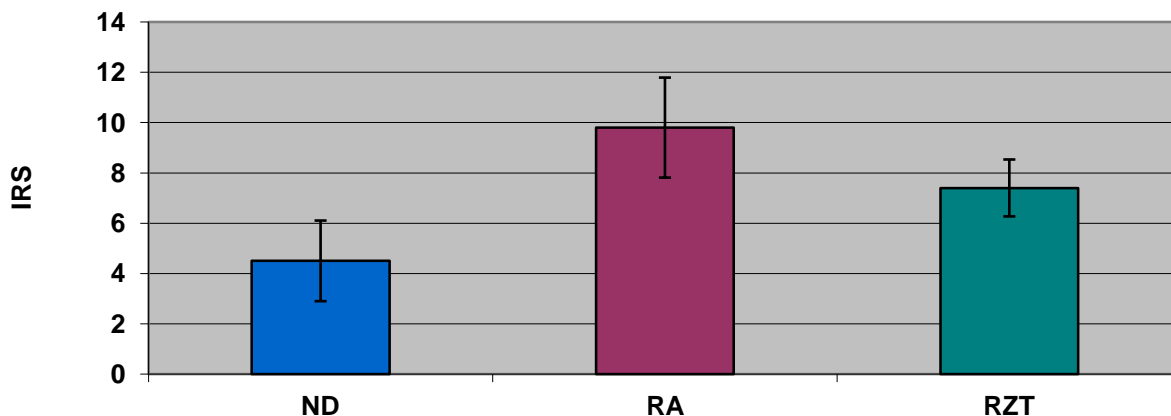


Abbildung 3.3 d) IHC

Vergr. 200x, Original

**MMP-1**

MMP-1	4,5 (+/- 1,60)	9,8 (+/- 1,99)	7,4 (+/- 1,13)
-------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 d) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

**3.2.5 MMP-2**

Eine deutliche Färbung in wenigen Zellen des Synovialgewebe konnte für MMP-2 gezeigt werden (IRS 2,6). Diese Zellen umfassen das Endothel sowie vereinzelt mononukleäre Stromazellen. Eine gesonderte Anfärbung der Deckzellschicht ist bis auf einzelne Zellen nicht zu erkennen.

Die Rheumatoide Arthritis (IRS 5,4) zeigt keine intensivere aber eine quantitativ erhöhte Expression für MMP-2 (PP RA 2,3 vs. PP ND 1,1). Endothelzellen und Stromazellen (Makrophagen und Fibroblasten) zeigen jedoch erhöhte Positivität. Eine hohe Anzahl positiv gefärbter Zellen findet sich in Lymphozytenaggregaten. Ähnlich zu CCR-1 ist der zur Deckzellschicht zugewandte Pol der Follikel deutlicher gefärbt.

Die Zahl der angefärbten Zellen im RZT-Stroma (IRS 4,7) ist geringer als die in der RA. Die fibroblasten- und makrophagenähnlichen Zellen weisen eine mittelstarke Anfärbung auf. Das Zytoplasma der Riesenzellen zeigt eine durchgängige, wenn auch wolkige Ausprägung von MMP-2. Im Gegensatz zu MMP-1 ist die Färbung zytoplasmatisch.

Der IRS für MMP-2 liefert signifikante Unterschiede zwischen normalem und pathologischem Gewebe, jedoch nicht zwischen RA und Riesenzelltumor (Tabelle 3.4).

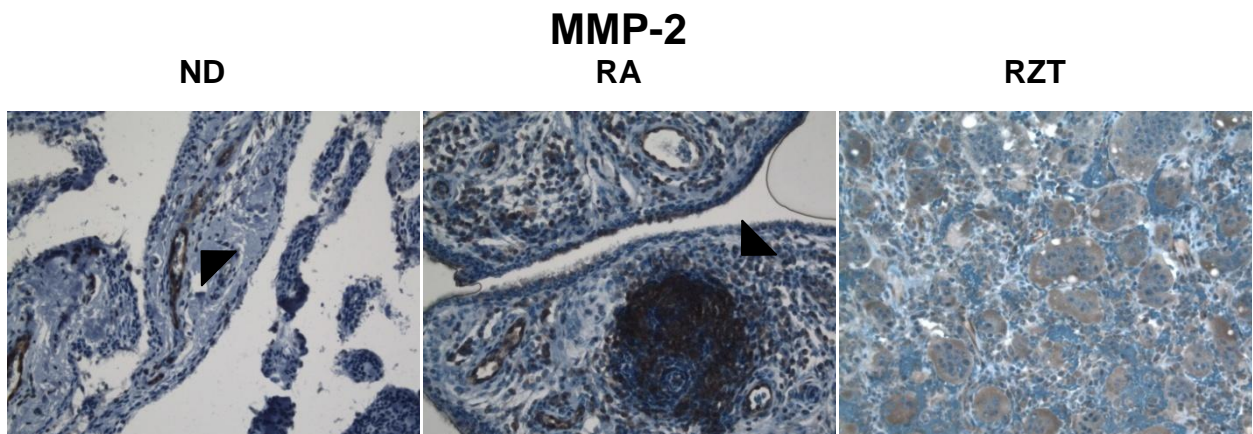
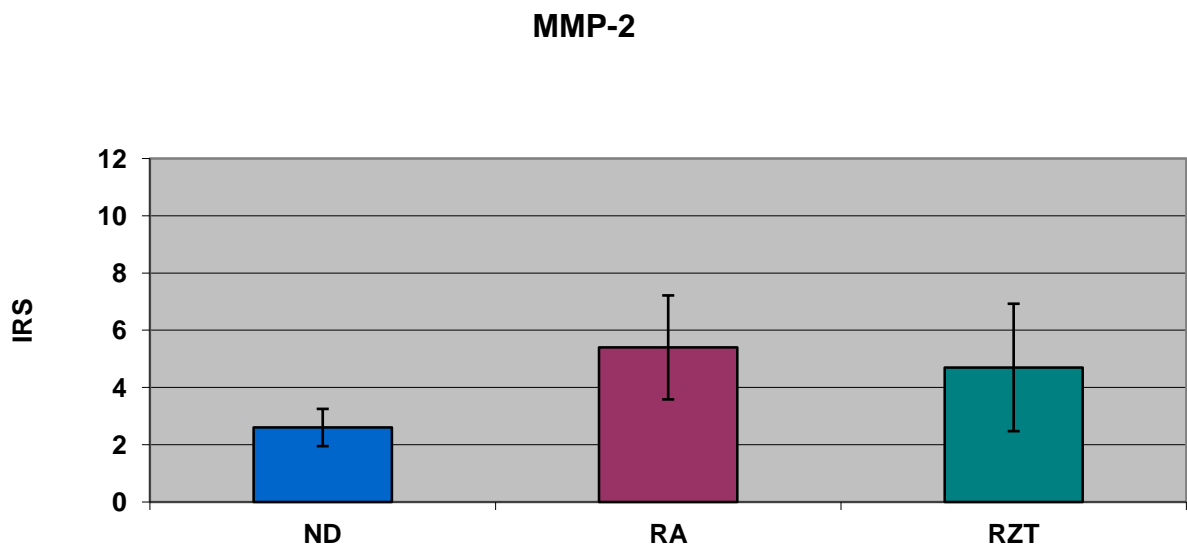


Abbildung 3.3 e) IHC  
Vergr. 200x, Original



MMP-2	2,6 (+/- 0,66)	5,4 (+/- 1,82)	4,7 (+/- 2,23)
-------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 e) IHC

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

### 3.2.6 MMP-3

Eine geringe Expression in Anzahl (PP=0,8) und Intensität (SI=0,6) weist das ND-Gewebe für das Stromelysin MMP-3 auf (IRS 0,8). Regelmäßig finden sich positive Makrophagen und Fibroblasten in der Deckzellschicht und im Zottenstroma, mit leichter Bevorzugung der Deckzellen. Kaum intensiver zeigt sich das Endothel gefärbt.

Im RA-Synovium (IRS 5,4) zeigt sich die Deckzellschicht durchgehend positiv mittelstark angefärbt. Die Anzahl mittelstark positiv gefärbter Stromazellen (SI=1,7) ist im Gegensatz zum Normalgewebe erhöht. Die Lymphfollikel zeigen ein diffuses Mosaik von gefärbten und ungefärbten Zellen.

Ein heterogenes Muster zeigt das RZT-Gewebe (IRS 1,2). In 4 von 10 Schnitten konnte keine Expression nachgewiesen werden. In 6/10 Fällen konnte MMP-3 die schwach zytoplasmatisch in den Riesenzellen detektiert werden (SI=0,6). Einzelne positive Stromazellen zeigten ebenfalls eine Expression.

MMP-3 liefert sowohl für das Normal- als auch für das Riesenzelltumorgewebe beinahe identische, niedrige Werte. Diesen beiden steht eine signifikante Steigerung des IRS-Werts bei Rheumatoider Arthritis gegenüber (Tabelle 3.4).

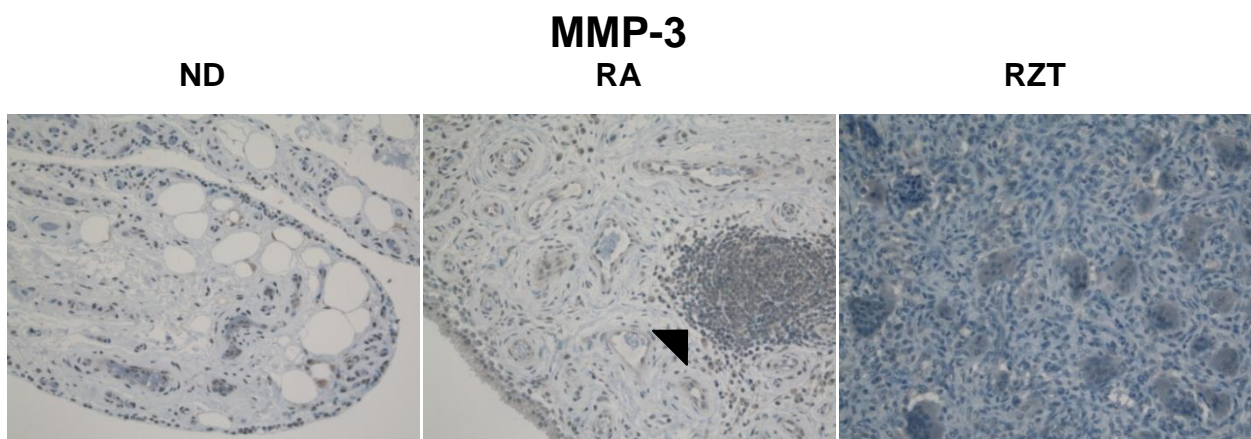
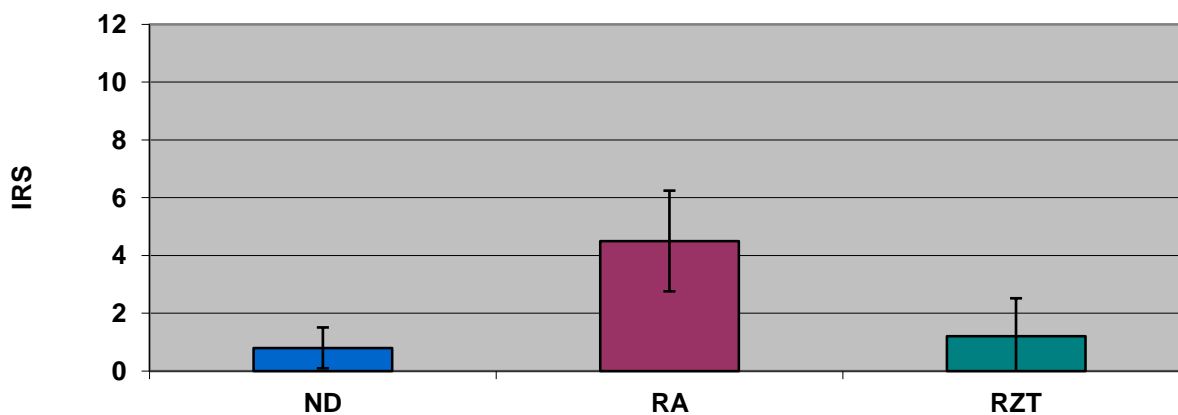


Abbildung 3.3 f) IHC

Vergr. 200x, Original



**MMP-3**

MMP-3	0,8 (+/- 0,71)	4,5 (+/- 1,74)	1,2 (+/- 1,32)
-------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 f) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

**3.2.7 MMP-9**

Die Schnitte von ND-Synovium waren durchgehend negativ auf MMP-9 (IRS= 0). Deckzellschicht, Stromazellen und Endothel wiesen in keinem der Fälle eine MMP-9 Positivität auf.

Im Gegensatz dazu weisen die RA-Schnitte für mehr als 50% der Zellen (PP=3,1) eine MMP-9 Expression auf (IRS 6,5). Die Deckzellschicht ist in acht von zehn Fällen durchgängig angefärbt. Eine stärkere Farbintensität weisen die Makrophagen und Fibroblasten im Stroma auf (SI=2,4). Ein dichtes Mosaik positiv angefärbter Zellen findet sich in Lymphozytenaggregaten.

Als sehr intensiv und homogen kann die Färbung im Zytoplasma der multinukleären Riesenzellen detektiert werden (IRS 8,6). Im Gegensatz dazu ist das Zytoplasma der Makrophagen- und Fibroblastenähnlichen mononukleären Stromazellen heterogen, aber sehr kräftig (SI=2,9) angefärbt.

Im Normalgewebe findet sich für MMP-9 keinerlei Anfärbung und damit ein IRS von 0. Die Funktionstüchtigkeit des verwendeten Antikörpers wurde durch die gefärbte

Positivkontrolle (Mammakarzinom) belegt. In den pathologischen Geweben liegt MMP-9 mit vergleichsweise hohen Werten vor; wobei der Unterschied von 6,5 bei RA und 8,6 bei RZT ebenfalls eine signifikante Steigerung darstellt (Tabelle 3.4).

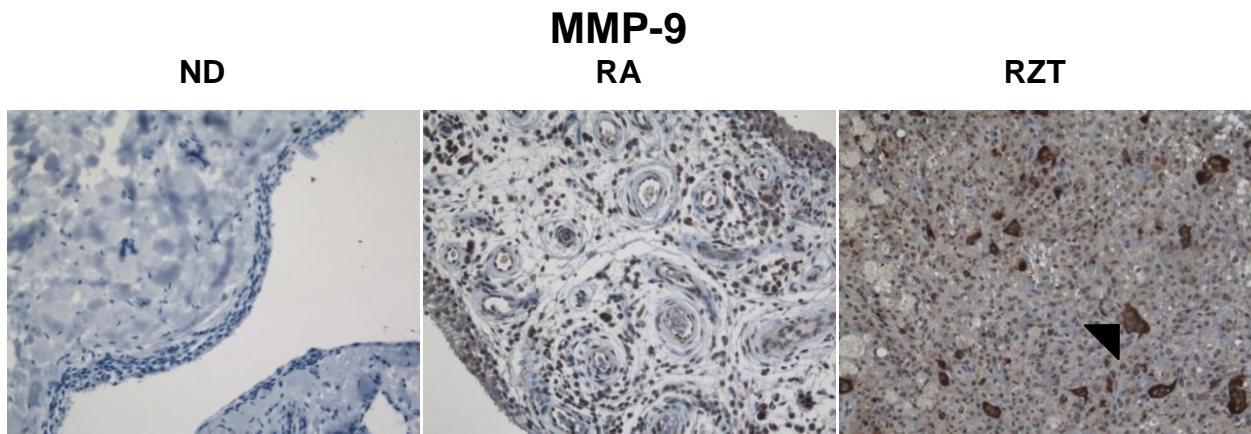
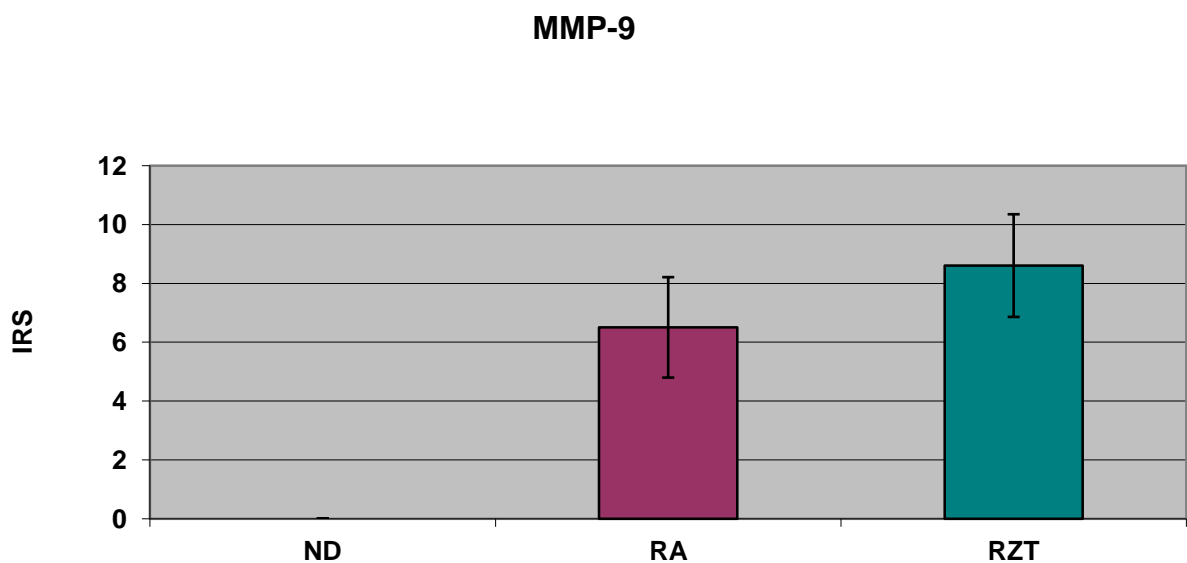


Abbildung 3.3 g) IHC

Vergr. 200x, Original



MMP-9	0,0 (+/- 0,00)	6,5 (+/- 1,71)	8,6 (+/- 1,74)
-------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.3 g) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

### 3.2.8 MMP-14

Insgesamt bestätigt dies die Beobachtung, dass aktivierte Fibroblasten im Tumorstroma vermehrt MMP-2, MMP-3 und MMP-9 produzieren [9].

Neu beschrieben werden kann die immunhistochemische Färbung in Synovialgewebe und Riesenzelltumor für MMP-14 (IRS 2,4). Im normalen Synovium zeigen nur wenige Zellen mittelstarke Intensität (SI=1,6) für MMP-14. Eine verstärkte Expression findet sich in der Deckzellschicht. Das Stroma ist locker mit positiven Zellen durchsetzt. Ebenfalls positiv ist das Endothel der zahlreichen Gefäße.

Mit ähnlicher Intensität wie im Normalgewebe, aber mit erhöhter positiver Zellzahl präsentiert sich das RA-Synovium (IRS 6,2). Die Deckzellschicht weist fokale stärkere Färbung auf. Angefärbt sind Fibroblasten und Makrophagen im Stroma. Es fallen besonders die komplett angefarbten Lymphfollikel auf, die ein homogenes Muster an MMP-14 positiven Zellen aufweisen.

Im RZT (IRS 5,4) ist die Zahl positiver Zellen (PP RA 3 vs. PP RZT 3,1) ebenso wie die Intensität der Anfärbung gleich (SI RA 2,1 vs. SI RZT 2,0). Das Zytoplasma der Riesenzellen weist nur eine heterogene Anfärbung auf. Eine Verdichtung zeigt sich auf den Kernen der Riesenzellen. Das Stroma des RZT-Gewebes zeigt einen hohen Anteil von Zellen mit positivem Zytoplasma in einer höheren Intensität als die multinukleären Riesenzellen. Gefäßreiche Tumorregionen zeigen positives Endothel.

Das Bild für MMP-14 gleicht dem von MMP-3, wobei sich zwischen ND und RZT nur geringe, nicht-signifikante Unterschiede ergeben. Eine signifikante Erhöhung des IRS und damit des Proteinlevels - liegt bei RA-Gewebe im Vergleich zum Normalspender vor (Tabelle 3.4).

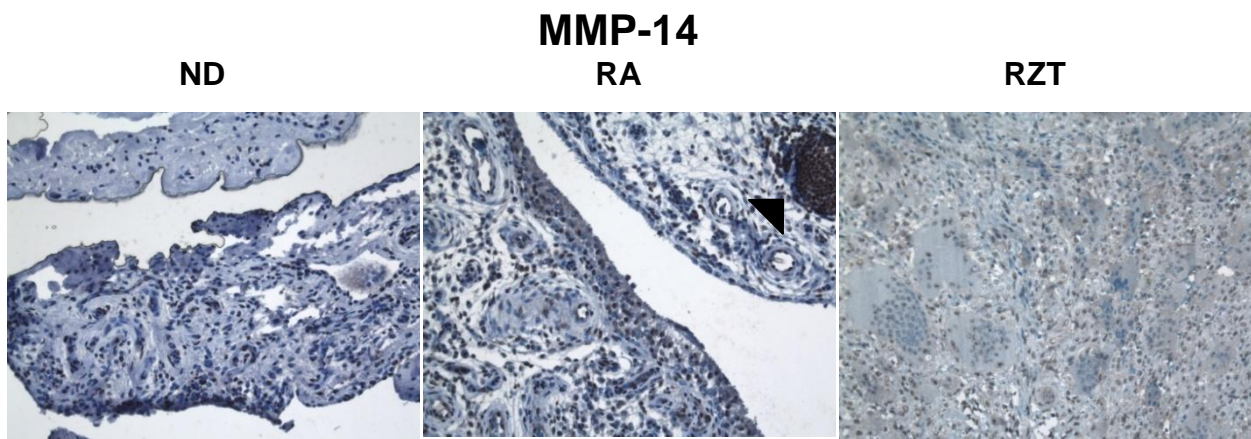
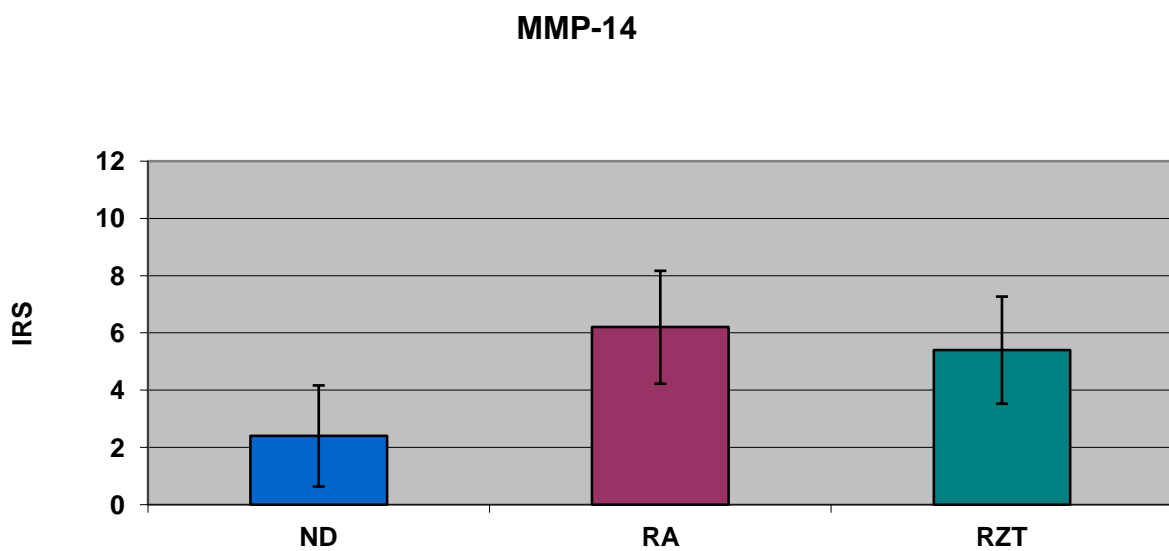


Abbildung 3.3 h) IHC  
Vergr. 200x, Original



<b>MMP-14</b>	2,4 (+/- 1,77)	6,2 (+/- 1,97)	5,4 (+/- 1,87)
---------------	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 h) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

### 3.2.9 FAP

Das Normalgewebe zeigt für FAP bei 4 von 5 Fällen nur in einigen Fibroblasten schwache bis mäßige Positivität (IRS 1,3). Bis auf diese Ausnahmen sind alle Zellen negativ.

Dagegen weist das RA-Gewebe (IRS 7,6) eine deutlich erhöhte Expression für FAP auf. Starke Färbung ist in Fibroblasten der Deckzellschicht und im Stroma - auffallend in perivaskulären Regionen (aber nicht auf Endothelzellen selbst) zu finden, wobei die Deckzellschicht eine dichtere Anfärbung aufweist. Dies entspricht den Erkenntnissen, dass in der Entwicklung der RA besonders die Deckzellschicht verbreitert und mit aktivierten Fibroblasten angereichert ist [52]. Lymphozytenaggregate sind FAP-negativ.

Die Beschränkung von FAP auf Fibroblasten bestätigt sich im RZT (IRS 9,7). Zytoplasma und Kerne von Riesenzellen sind ebenso wie ebenso wie Makrophagen durchgehend FAP-negativ. Die Mehrheit an positiven Stromazellen verdeutlicht die Verhältnisse zwischen den Makrophagen und Fibroblasten im Riesenzelltumor.

Zwischen allen Gewebegruppen ergeben sich im Vergleich hierbei signifikante Unterschiede. Es konnte in dieser Untersuchung erstmals der immunhistochemische Nachweis von FAP im Riesenzelltumor nach vorheriger Messung eines mRNA Signals [23] erbracht werden (Tabelle 3.4).

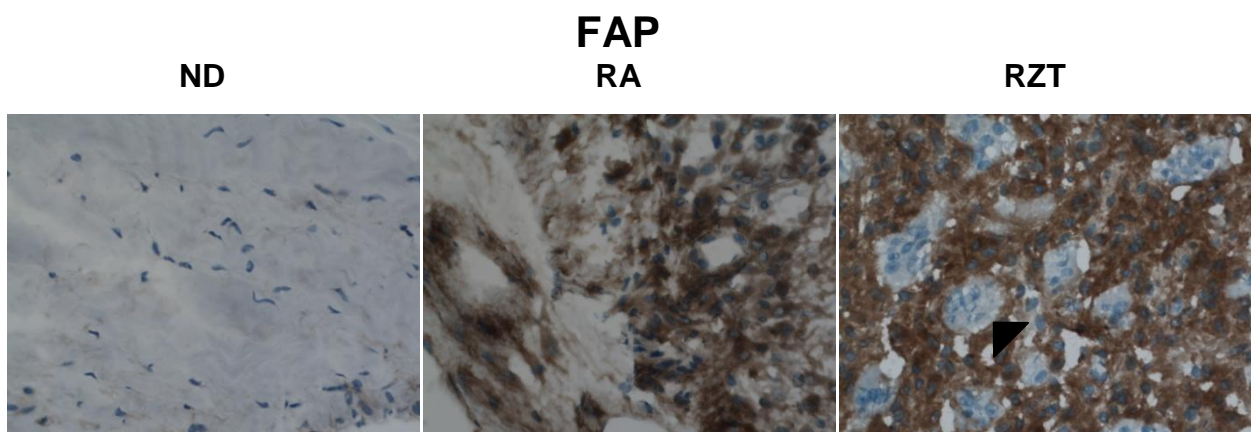
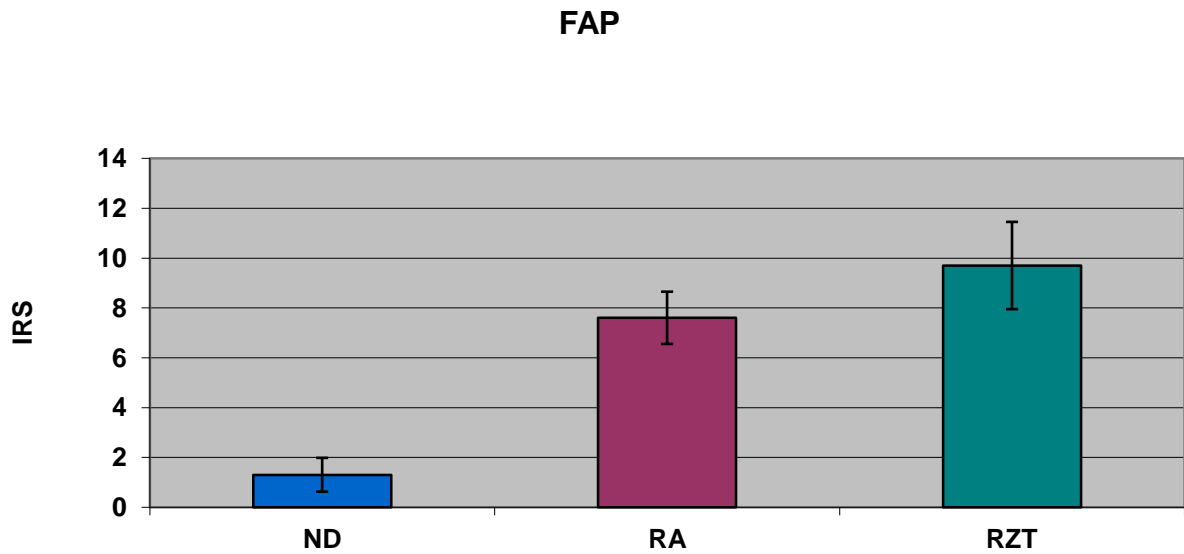


Abbildung 3.3 i) IHC

Vergr. 400x, Original



FAP	1,3 (+/- 0,68)	7,6 (+/- 1,05)	9,7 (+/- 1,75)
-----	----------------	----------------	----------------

Abbildung 3.4 i) IRS

Die Ordinate entspricht in dem IRS-Wert. Die absoluten Expressionswerte sind unterhalb der Balkendiagramma für jede Entität angegeben.

Um gemeinsame Mechanismen der Genregulation in RA und RZT zu finden, wurde nach signifikant erhöhten IRS-Werte sowohl in der RA, als auch im RZT gegenüber der ND-Synovialis (ND vs. RA und ND vs. RZT) gesucht. Lediglich MMP-3 und MMP-14 weisen diese signifikante Steigerung der IRS-Werte in RA und RZT gegenüber dem Normalgewebe nicht auf (Tabelle 3.4).

*Tabelle 3.4 Signifikanztestung der Ergebnisse des IRS*

*( $p < 0,05$ ); signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet*

*Grau hinterlegte Antigene weisen in RA und RZT gegenüber ND signifikant höhere IRS-Werte auf.*

Antigen	ND vs. RA	ND vs. RZT	RA vs. RZT
CCR1	0,010*	0,029*	0,024*
CCR5	0,024*	0,001*	0,209
VEGF	0,001*	0,003*	0,908
MMP-1	<0,001*	0,001*	0,017*
MMP-2	0,002*	0,020*	0,277
MMP-3	<0,001*	0,801	0,001*
MMP-9	0,035*	0,018*	0,003*
MMP-14	0,006*	0,321	0,002*
FAP	0,002*	0,002*	0,012*

### 3.3 Ergebnisse des Korrelationsvergleichs zwischen IRS und Synovialitis-Score

Die Untersuchung darauf, welches Protein bei Änderungen des Synovialitis-Scores am ähnlichsten Änderungen des immunreaktiven Scores aufweist, zeigt für VEGF mit 0,60 die geringste Korrelation. Es folgt eine Gruppe mit Werten zwischen 0,64 und 0,77 (CCR5, MMP-1, -2, -14, FAP). Die höchsten Korrelationen ergeben sich bei MMP-3 (0,83) und MMP-9 (0,85). Die einzelnen Daten des Korrelationsvergleichs sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

*Tabelle 3.5 Korrelationsvergleich zwischen IRS und Synovialitis-Score*

<b>Epitop</b>	<b>Korrelationskoeffizient (Syn vs. IRS)</b>
CCR1	0,75
CCR5	0,67
VEGF	0,61
MMP-1	0,72
MMP-2	0,70
MMP-3	0,82
MMP-9	0,85
MMP-14	0,64
FAP	0,77



## 4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit die Gemeinsamkeiten in der Matrixdegradation in zwei pathogenetisch unterschiedlichen aber histopathologisch ähnlichen Entitäten, der *high-grade* Synovialitis (Rheumatoiden Arthritis) und dem Riesenzelltumor des Knochens (RZT), untersuchen. Hierbei wurden immunhistochemisch die Befunde der Array-Analyse validiert und somit die Expression der einzelnen Antigene auf Proteinebene semiquantitativ und morphologisch zu klären. Das bisher wenig untersuchte Protein FAP stellt ein mögliches Bindeglied zwischen beiden Entitäten dar, wobei es sich im Gegensatz zu den ubiquitär vorhandenen MMPs um ein spezifisch exprimiertes Antigen handelt, dessen genaue Funktion, Induktion und Signalwege bisher nicht bekannt sind. Diskutiert werden soll des Weiteren der Zusammenhang der einzelnen Antigene mit dem semiquantitativen Synovialitis-Score. Hohe Korrelationen zwischen dem IRS eines Antigens und dem histopathologischen Synovialitis-Score in den untersuchten Synovialproben könnten auf ein Protein hindeuten, welches in Abhängigkeit des Schweregrades der Erkrankung exprimiert wird.

FAP als Marker aktivierter Fibroblasten wird unter dem Aspekt der molekülspezifischen Therapie durch monoklonale Antikörper und Enzyminhibitoren bei malignen Erkrankungen beleuchtet und deren Einsatzmöglichkeiten bei der Rheumatoiden Arthritis diskutiert.

### 4.1 Diskussion der Immunhistochemischen Daten

Die neun untersuchten Antigene haben ihren Ursprung in einer Array Analyse der Genexpressionsprofile von RA-Synovium und Riesenzelltumorgewebe gegen ND-Synovium mit anschließender FPCA. CCR1, CCR5, VEGF, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-14 und FAP sind am Abbau kollagener Matrix und bei der Invasion in Fremdgewebe beteiligt. Die immunhistochemische Untersuchung oben genannter Gene dient der Validierung der Array-Daten. Darüber hinaus soll untersucht werden, auf welchen Zellen, beziehungsweise in welchen Gewebekompartimenten die einzelnen Antigene exprimiert werden.

Die immunhistochemische Analyse der Expression von **CCR1** zeigt die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse. Anfärbung von Makrophagen sowie Lymphozyten sind auf

Grund der bisher beschriebenen Eigenschaften des Chemokinrezeptors zu erwarten gewesen, ebenso wie die fehlende Anfärbung für neutrophile Granulozyten [5]. Es fällt auf, dass selbst im Normalgewebe Endothelzellen positiv sind. Ein Befund, der sich in RA- und RZT-Schnitten weiter verstärkt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass CCRs in der Angiogenese und Endothelzellmigration eine Rolle spielen [49]. In dieser Untersuchung wurde das bisher fest mit Makrophagen assoziierte Chemokin CCL23 (oder auch MIP-1, MIP-3, oder CK $\beta$ 8) als proangiogenetischer Faktor beschrieben. Ähnliches könnte auch für Fibroblasten gelten. In den RA-Schnitten finden sich kaum negativ gefärbten Stromazellen, die Deckzellschicht ist aber durchgehend positiv auf CCR1. Dies lässt vermuten, dass das Antigen auch auf Fibroblasten exprimiert wird, welche hierdurch Einfluss auf die Sprossung neuer Gefäße nehmen könnten.

Die Expression von CCR1 auf den multinukleären Riesenzellen ist insofern konsistent, als diese spekulativ von Osteoklasten abstammen, welche wie Makrophagen dem mononukleären phagozytotischen System zugeordnet werden.

Die Zellzusammensetzung von RA und RZT Gewebe weist jedoch eine Mehrheit von 60 - 70% für fibroblastoide Zellen aus (Tabelle 3.2), so dass bei dem Muster der Expression davon ausgegangen werden kann, dass Fibroblasten positiv auf CCR1 sind. Man kann spekulieren, dass CCR1 auf Fibroblasten exprimiert wird, wenn wie in der RA eine entzündliche Komponente und damit auch eine größere Verfügbarkeit von Chemokinen vorhanden ist. Eine weniger entzündliche Entität wie der semimaligne Riesenzelltumor lässt dies gegebenenfalls aber nicht zu.

Das Bild in den immunhistochemischen Färbungen gegen **CCR5** gleicht dem von CCR1. Positiv gefärbtes Endothel in allen drei Entitäten ist konsistent mit bereits beschriebenem Effekt auf Angiogenese und Intimaproliferation [102]. Die Dichte des vaskulären Netzwerks bereits im Normal-Synovium und der damit einhergehende ständige Umbau von Gefäßen erklärt das Vorhandensein der Chemokinrezeptoren bereits im physiologischen Zustand des Gewebes.

Aktivierte Fibroblasten in RA-Synovium exprimieren CCR5 und die korrespondierenden Chemokine (MCP-1, RANTES, IL-6 und IL-8), so dass hierbei neben parakrinen auch autokrine Funktionen auftreten, welche über ERK1 und ERK2 Signalwege vermittelt werden [112]. Die Expression auf Makrophagen und den multinukleären Riesenzellen ist mit bisherigen Daten konsistent.

Es zeigt sich anhand der immunhistochemischen Daten eine Kongruenz zwischen CCR1 und CCR5 Expression, was auf eine ähnliche Funktion in der Pathogenese von RA und RZT hindeutet. Neu ist an dieser Stelle der immunhistochemische Nachweis der Chemokinrezeptoren auf aktivierten Fibroblasten, was die zentrale Rolle dieser Zellen in der Gewebeerstörung unterstreicht. Durch die Expression der Chemokinrezeptoren profitieren die aktivierten Fibroblasten vom inflammatorischen Milieu, welches den aggressiven Zellcharakter fördert. Es wurde gezeigt, dass TNF $\alpha$  in Kombination mit CC-Chemokinen die Produktion proteolytischer Enzyme fördert [5]

Die IHC-Daten für **VEGF** (Anfärbung von Endothel & mononukleären Zellen) entsprechen den Angaben aus der Literatur [109]. Im Normal-Synovium findet sich VEGF nur auf Endothelzellen, in RA und RZT zeigen daneben auch Makrophagen und T-Zellen eine Expression. Die Wichtigkeit einer verstärkten Vaskularisation in der Pathogenese der RA unterstreicht die Vielzahl von Zellen, die den proangiogenetischen Faktor VEGF exprimieren. Darüber hinaus sind eine Aktivierung der eNOS und damit eine erhöhte Gefäßpermeabilität durch VEGF beschrieben [109], was zu einer erhöhten Infiltration von Leukozyten beiträgt. Das in der RA prominente TNF $\alpha$ , sowie IL-1 steigern die VEGF-Produktion [110], was mit der signifikanten Steigerung der Expression gegenüber den ND-Schnitten übereinstimmt.

Im Vergleich zu ND und RA Proben weisen die RZT-Schnitte eine schwächere Färbeintensität auf. In einigen Fällen sind die multinukleären Riesenzellen schwach positiv, in anderen negativ. Positive Riesenzellen sind auf Grund ihrer mutmaßlichen Abstammung von Osteoklasten und damit verbundenen Verwandtschaft zu Makrophagen aber nicht verwunderlich.

**MMP-1** weist im Normalgewebe die stärkste Expression aller untersuchten Proteine auf. Die Aktivität von Fibroblasten - besonders in der Deckzellschicht - sowie Endothelzellen deutet schon im physiologischen Zustand auf einen hohen Umbau durch Kollagenaseaktivität im Synovialgewebe hin, was auf die dynamische Belastung der Gelenke zurückzuführen ist. Die starke Färbung in RA-Schnitten in der Mehrheit der Zellen deutet auf eine Rolle im pathologischen Matrixabbau hin. Im Vergleich zwischen traumainduzierter und rheumatoider Synovialitis zählt MMP-1 zu den RA assoziierten MMPs [60].

Es zeigte sich, dass der Grad der MMP-1 Expression im Synovialgewebe mit der Invasivität der RA korreliert, was den Einfluss auf die Matrixdegradation unterstreicht [97].

Das sehr stark gefärbte Zytoplasma der multinukleären Riesenzellen in RZT-Schnitten, sowie die Fähigkeit von MMP-1 fibrilläres Kollagen I zu spalten, legt eine Führungsrolle im Knochenabbau bei Tumorprogression nahe. Kritisch zu betrachten ist der Befund, dass auch Kerne multinukleärer Riesenzellen eine Anfärbung gegen MMP-1 aufweisen. MMP-1 als sezerniertes Enzym sollte bei der Detektion durch Antikörper keine nukleäre Expression aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen Stromazellen die beschriebene zytoplasmatische Anfärbung.

Ein Vergleich zwischen **MMP-2** und **MMP-14** (welches direkt zur MMP-2 Aktivierung benötigt wird) weist im Normalgewebe einige Unterschiede auf. Während die membranständige MMP-14 vorwiegend auf Fibroblasten im Stroma und in Gefäßnähe (inklusive Endothel) exprimiert wird, weist MMP-2 eher eine endotheliale als eine fibroblastoide Expression auf. Daraus ist zu schließen, dass die Aktivierung von MMP-2 unter physiologischen Bedingungen eher am Endothel stattfindet und die Kollagenase-Aktivität von MMP-2 zum Umbau des Gefäßnetzes benutzt wird. Dieser Zusammenhang wurde bereits beim vaskulären Remodeling nach tiefer Beinvenenthrombose festgestellt [20]. Eine Verlagerung der MMP-2 Aktivität ins Stroma und in Lymphozytenaggregate belegt das aggressivere Verhalten im Abbau von Matrixkomponenten. Auffällig ist die Konzentration beider Antigene in Lymphfollikeln. Ob es sich vermehrt um T-Zellen oder Makrophagen handelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Eine immunhistochemische Doppelfärbung mit MMP-2 und dem makrophagenspezifischen Antigen CD68 kann an dieser Stelle Klarheit schaffen.

Ein differenziertes Bild der Expression liefern die RZT-Schnitte. MMP-14 wird fast ausschließlich auf mononukleären Stromazellen exprimiert, MMP-2 findet sich aber besonders ausgeprägt auf den multinukleären Riesenzellen. Da der MMP-2 Antikörper sowohl das Proenzym als auch die aktive Matrix-Metalloproteinase bindet, scheinen die multinukleären Riesenzellen die Hauptproduzenten von pro-MMP-2 zu sein, welche dann vor allem auf den Stromazellen aktiviert werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde bezüglich der Expression von MMP-2 im Riesenzelltumor sind mit der

bisherigen Datenlage konsistent [103]. MMP-14 wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal im Riesenzelltumor immunhistochemisch beschrieben.

**MMP-3** zeigt in allen drei Entitäten eine nur geringe Ausprägung. Vorherige Studien haben MMP-3 eher mit traumainduzierter, als mit RA-bedingter Synovialitis in Verbindung gebracht [60], so dass eine zentrale Rolle fraglich erscheint. Einige Studien weisen jedoch auf die Bedeutung der Höhe des MMP-3 Serumspiegels hin, welcher klinisch gut mit dem Krankheitsverlauf korreliert [97] und sogar ein besserer Prädiktor für die Gelenkzerstörung als die anti-CCP Antikörper darstellt [73].

In einer aktuellen Untersuchung zeigten sich bei Patienten mit schwerer RA vermehrt Genpolymorphismen des MMP-3 Gens, deren Auftreten mit extraartikulären Manifestationen der RA assoziiert war [101].

Ein interessantes Bild zeichnet sich für **MMP-9** ab. ND-Schnitte sind durchgängig negativ auf MMP-9. Dahingegen ist MMP-9 in den RA- und RZT-Schnitten stark exprimiert. Die Fähigkeit von MMP-9 die Basalmembran Kollagene III und IV zu spalten, legt eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Matrixdegradation und Gewebsinvasion nahe.

Wie MMP-1 ist MMP-9 eine mehr durch rheumatoide als durch eine traumatische Synovialitis gekennzeichnete Matrix-Metalloproteinase [60]. Hohe Werte von MMP-9 in der Synovialflüssigkeit gehen mit hoher Expression von VEGF einher, so dass eine Aktivierung der Angiogenese durch MMP-9 anzunehmen ist [110]. Die starke Expression auf multinukleären Riesenzellen und die fokale aber dennoch kräftige Färbung von Stromazellen ist eine Bestätigung vorheriger Untersuchungen [103].

**FAP** bestätigte die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften. Da in Normalgewebe (Ausnahme Endometrium und Haut) keine Expression von FAP auftritt [48], ist der Befund in der immunhistochemischen Untersuchung mit einer Anfärbung von nur einzelnen Fibroblasten konsistent. Als einige der wenigen nicht eindeutig tumorassoziierten Erkrankungen weist die RA eine hohe Dichte an FAP-positiven Fibroblasten auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich dabei mit der bisherigen Datenlage. FAP-Expression findet sich neben Fibroblasten im Zottenstroma besonders in der Deckzellschicht. Hierbei fällt die FAP-Expression mit anderen Aktivierungsmarken wie MMP-1, MMP-9, VEGF und MMP-13 zusammen [6], was die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen.

Dabei wiesen die Regionen mit hoher FAP-Expression die höchste inflammatorische Aktivität aus. Synoviale Fibroblasten in der RA weisen das Oberflächenantigen CD90 auf. Das durch  $TNF\alpha$  und IL-1 induzierte CD90, oder Thy-1 (Thymocyte differentiation antigen), spielt eine Rolle im Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt [58] und verschwindet bei FAP-Expression von der Zelloberfläche. Eine Doppelfärbung mit FAP und CD90 könnte hierüber weiteren Aufschluss geben. Dies belegt die aggressive Rolle der aktivierten Fibroblasten, die eine erhöhte Motilität und Invasivität durch Invadopodien mit MMP- und FAP-Besatz aufweisen. Dazu trägt die verstärkte Expression von *smooth-muscle* Aktin, die in den FAP-positiven Fibroblasten detektiert wird, ebenso bei wie die Ausprägung von Invadopodien mit Besatz von MMPs (-2, -9, -14) und FAP, bei.

Ein interessanter Befund ist, dass FAP-Fibroblasten zwar auch in der weniger von Inflammation bestimmten Osteoarthritis (OA) auftreten, aber in deutlich geringerer Anzahl als in der RA [6, 47]. Einzelne FAP-positive Fibroblasten in ND-Gewebeproben können daher Ausdruck der alters- und belastungsbedingten Knorpeldegeneration arthrotischer Anteile darstellen [76].

Im Gegensatz zur RA scheinen bei der pigmentierten villonodulären Synovialitis (PVNS) nicht die aktivierten Fibroblasten, sondern die Makrophagen für den Charakter der lokalen Gewebsdestruktion verantwortlich zu sein. Der Vergleich der Genexpressionsprofile zwischen PVNS und RA zeigt 141 hoch- und 47 herabregulierte Gene. Die Signatur des Genexpressionsprofils der PVNS ähnelt dem eines aktivierten Makrophagen. Differenziell exprimierte Gene gehören vor allem in den Bereich der Apoptoseresistenz, Matrixdegradation und Inflammation. Interessanterweise zeigt sich in der RT-PCR eine signifikante Überexpression von MMP-9 in der PVNS im Vergleich zur RA [30], was von den Autoren als unterstützendes Argument für die These benutzt wird, dass die PVNS ein komplexes Krankheitsmuster mit inflammatorischen und tumorösen Eigenschaften besitzt.

Durch die matrixabbauenden Fähigkeiten von FAP liegt eine wichtige Rolle im Fortschritt der Tumorigenese wie auch der RA nahe. Die Aufgabe von FAP geht aber wahrscheinlich über den reinen Matrixabbau hinaus. Die Expression von FAP kumuliert an Invadopodien der aktivierten Fibroblasten, die ebenfalls verschiedene MMPs (-2, -9, -14) als Mittel des Matrixabbaus aufweisen. Eine mögliche Verbindung zwischen FAP und der MMP-Aktivierung stellt die Bindung von  $\alpha3\beta1$ -Integrin dar [57], welches

wiederum den Urokinase Plasminogenaktivator-Rezeptor binden kann, welcher bei MMP-Aktivierung einen Zwischenschritt darstellt. So kann FAP ebenfalls in ECM-Proteinen enthaltene Signalmoleküle freisetzen und somit die Zellphysiologie verändern. Ähnlich der Rolle eines G-Proteins wird die Bindung und Prozessierung von Mediatoren vermutet [57].

Weitestgehend unbekannt sind die Signalwege, die zur Induktion einer FAP-Expression führen, ebenso wie die Prozesse, die FAP auf die Zellphysiologie der Fibroblasten zu haben scheint. Hierbei spielen vermutlich Adapterproteine und durch FAP-abhängige Spaltung aus der Matrix herausgelöste Mediatoren eine entscheidende Rolle. Damit könnte die Zusammensetzung der Grundmatrix eine Bedeutung haben, ob FAP tumor-suppressiv oder – progressiv wirkt.

Klinische Phase 1 Studien, die eine Anti-FAP-Impfung untersuchen, zeigen vielversprechende Ergebnisse über eine CD8+ Zellen vermittelte Immunantwort. Die Tumorprogression wird stark gehemmt, eine totale Langzeit-Regression tritt aber dennoch nicht auf [53].

Erstmals kann in dieser Arbeit die Expression von FAP im Riesenzelltumor beschrieben werden. Anders als ein Teil der Sarkome zeigen sich die multinukleären Riesenzellen im RZT als binde- und stützgewebige Entität FAP-negativ. Dafür ist die Stromazelldichte an aktivierten Fibroblasten sehr hoch. Dadurch bestätigt sich die Annahme, dass die fibroblastenähnlichen Zellen die tumorigene Komponente im Riesenzelltumorgewebe [39] und damit hauptverantwortlich für die Invasion in Nachbargewebe sind.

Eine später durchgeführte Arbeit führte FAP-Färbungen für verschiedene mesenchymale Tumore durch und bestätigte diese Befunde von positiven Fibroblasten im Riesenzelltumor. Des Weiteren zeigten sich das myofibroblastische Sarkom, das Osteosarkom, sowie die fibröse Histiozytose als FAP-positive Tumorentitäten. FAP-negative mesenchymale Tumore sind das Ewing-Sarkom und das Rhabdomyosarkom [22].

In den Befunden der immunhistochemischen Daten zeigt sich die Ambiguität von FAP. Zum einen wird es im stark inflammatorischen RA-Synovium stärker exprimiert als in der weniger entzündlichen OA [76], zum anderen ist Tumorstroma deutlich FAP-positiv. Somit ist ein Mechanismus der Gewebszerstörung in der RA anzunehmen, der nicht alleine durch klassisch inflammatorische Faktoren unterhalten und gesteuert wird,

sondern sich auch tumorähnliche Komponenten an der Knorpeldestruktion beteiligen. Das Expressionsprofil in der inflammatorischen RA und dem wenig inflammatorischen RZT weist FAP als einen möglichen Link zwischen beiden Entitäten auf.

Die Bewertung der Proben mittels zweier unabhängiger Beobachter wurde eingesetzt um das Risiko einer falschpositiven Diagnose und etwaige subjektive Bewertungen zu minimieren.

Die gemeinsame Expression von matrixabbauenden Enzymen, proangiogenetischen Faktoren, sowie Komponenten der Immunzell-Infiltration auf aktivierten Fibroblasten in beiden Entitäten, rückt diese Zellart in den Fokus der Pathogenese und Krankheitsprogression.

#### 4.2 Vergleich zwischen IRS und Array Daten

Die mittels des Genchips HG-U113A erhobenen Daten aus dem Vergleich der Genexpressionsprofile dienen als Grundlage für diese Arbeit.

Ausgehend von morphologischen Gemeinsamkeiten zwischen RA-Synovium und Riesenzelltumor (Fibroblastenreiches Stroma, Riesenzellen), wurde nach gemeinsamen Veränderungen der beiden Entitäten in der Genexpression im Vergleich zum ND-Synovium gesucht (siehe hierzu auch Kapitel 1.4.3). Diese Untersuchung lieferte auf der Suche ein Set von 9 Genen, die mit großer Wahrscheinlichkeit reguliert werden und nicht auf Grund der unterschiedlichen Zellzusammensetzung der Zellen differenziell exprimiert vorliegen, und durch Immunhistochemie detektiert werden können.

Nach immunhistochemischer Färbung wurden die Schnitte von ND-Synovium, RA-Synovium und Riesenzelltumoren der einzelnen Antigene von zwei Beobachtern auf den Prozentsatz der gefärbten Zellen und deren Färbeintensität untersucht (IRS).

Ein Teil dieser Arbeit besteht darin, die Ergebnisse der Array-Daten immunhistochemisch zu validieren. Die Darstellung der Signalwerte (SIG) und IRS erfolgt immer in der Form ND / RA / RZT.

Der Vergleich der Array Daten und des IRS für **CCR1** weist eine Übereinstimmung im Verhalten der Expressionswerte in beiden Methoden auf. Das Änderungsverhalten zwischen den einzelnen Entitäten ist auf Gen- und Proteinebene identisch: IRS und Signalstärke steigen von einem niedrigen Wert im ND-Synovium stark in der RA an und weisen im RZT-Gewebe einen minimal geringeren Wert auf (SIG 153 / 348 / 346; IRS 2



/ 8 / 4,5). Hier validiert die Immunhistochemie die Array-Daten. Die Änderung der mRNA spiegelt sich in den Änderungen der Expression des Proteins in den Geweben wider. Die Translation wird nicht gesondert restriktiert.

CCR1 weist sowohl im Array als auch in der Immunhistochemie gemeinsam in RA und RZT signifikant erhöhte Expressionswerte gegenüber dem Normalgewebe auf.

Ein ähnliches Bild liegt bei **CCR5** vor. IRS und Signalstärke steigen von ND zu RA signifikant an (Abbildung 3.2 b und Abbildung 3.4 b). Das Verhalten auf Proteinebene unterscheidet sich jedoch im RZT (SIG 35 / 231 / 102; IRS 3,4 / 6,1 / 7,2). So weist der IRS höhere Werte im Riesenzelltumor als in der RA aus, wohingegen die Signalstärke im Array zwischen ND und RA liegt.

CCR5 weist jedoch ebenso wie CCR1 paarweise in RA und RZT signifikant höhere IRS- und Signalwerte als das Normalgewebe auf.

Ein differenzielles Bild liefert **VEGF** (SIG 501 / 200 / 392; IRS 0,9 / 3,1 / 3,1). Während im Array das ND-Synovium die höchsten Signalwerte liefert, und in der RA sogar signifikant weniger mRNA-Signal gemessen wird, zeigen die IRS-Werte ein umgekehrtes Bild mit signifikant höheren IRS-Werten in der RA. Die pathologischen Gewebe RA und RZT zeigen niedrigere Signalstärken im Array, aber erhöhte IRS Werte. Offenbar reicht hier eine verringerte Menge von mRNA aus, um mehr VEGF-Protein zu bilden.

Ein Mechanismus zur Steigerung der Translationsrate (z.B. verlängerte mRNA Halbwertszeit) kann vermutet werden. Des Weiteren liegen uns keinerlei Informationen zur medikamentösen Therapie der RA bei den Gewebespendern vor. Es wurde bereits gezeigt, dass trotz nicht-nachweisbarer VEGF-mRNA unter RA-Therapie das Synovium Gefäßproliferate aufweist [107].

Das Änderungsverhalten von IRS und Signalstärke bei **MMP-1** gleicht sich zwischen den einzelnen Entitäten. Der Steigerung der Werte von ND zu RA wird, folgt eine Erniedrigung von RA zu RZT (SIG 56 / 2504 / 28; IRS 4,5 / 9,8 / 7,4). Die Array-Daten zeigen, dass die MMP-1 Transkription in RA im Gegensatz zu ND und RZT massiv erhöht ist. MMP-1 erzielt in der RA den höchsten IRS aller Entitäten und Antigene bei geringem Signal im Array, was für eine entscheidende Rolle in der Matrixdegradation bei rheumatoider Arthritis spricht. Der Abfall der Signalstärke im RZT-Gewebe auf ein Niveau noch unter das des Normalgewebes legt nahe, dass im Riesenzelltumor ein

anderes Protein federführend im Matrixabbau ist. Der IRS liefert für MMP-1 mit 7,4 aber dennoch einen sehr hohen Wert (bei SIG 28), so dass hier ein translationssteigernder Mechanismus vermutet werden muss.

Für **MMP-2** zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier ist die Signalstärke wie der IRS im RA-Synovium am höchsten. Für RZT-Gewebe sinkt auch hier die Signalstärke auf ein Niveau unterhalb des ND-Synoviums ab, der IRS hält sich aber auf einem höheren Niveau als im Normalgewebe (SIG 2781 / 3233 / 1472; IRS 2,6 / 5,4 / 4,7). Auffällig ist das sehr hohe Signal für MMP-2 im Normalgewebe mit mäßiger Translation. Offenbar ist die Translationsrate in Bezug zur vorliegenden Menge von mRNA im Normalgewebe sehr gering, im Riesenzelltumor sehr hoch.

Gleiches gilt für **MMP-3**, wobei hier das Verhältnis zwischen RA/ND für die Werte von IRS und Signalstärke proportional ist (SIG 1113 / 6184 / 19; IRS 0,8 / 4,5 / 1,2). Daher kann hier bei ähnlich niedrigen IRS-Werten in ND und RZT nicht von einer geringeren Translationsrate in Normalgewebe gesprochen werden, sondern nur von einer sehr hohen Translationsrate im Riesenzelltumor. Hier gehen aus nur knapp 2% (SIG RZT:19) der mRNA Signale des ND-Synoviums 150% (IRS RZT: 1,2) der MMP-3 Proteine hervor, wobei das IRS Niveau sehr niedrig ist.

Eine vergleichsweise geringe Expression im Riesenzelltumor findet sich für **MMP-9** (SIG 108 / 457 / 10726; IRS 0 / 6,5 / 8,6). Hier liegt das Signal für mRNA rund 23mal höher als im RA-Synovium, der IRS erhöht sich aber nur gut um die Hälfte. MMP-9 scheint daher im Riesenzelltumor keine führende Rolle im Matrixum- und -abbau einzunehmen. Besonders auffällig für MMP-9 ist, dass die vorhandene mRNA im Normalgewebe überhaupt nicht in Proteine umgesetzt wird. Offenbar unterliegt die Translation hier sehr strenger Kontrolle auf zellulärer Ebene. Mit welchen Mechanismen (z.B. mRNA Abbau) die Zelle eine Expression von MMP-9 unterdrückt, sind derzeit nicht bekannt.

Ein eher expressionshemmender Effekt für MMP-9 zeigt sich im Riesenzelltumor. Hier wird das mit Abstand stärkste aller Signale in der gesamten Untersuchung erzielt (SIG 10726), es wird aber gemessen am mRNA Pool vergleichsweise schwach in Proteine umgesetzt. Dennoch scheint MMP-9 im Gegensatz zu den übrigen löslichen MMPs den entscheidenden Beitrag im Matrixumbau im Riesenzelltumor zu leisten.

Zusammenfassend lässt dies eine wichtige Position für MMP-9 in der Pathogenese der RA vermuten. Obwohl RA-Synovium global betrachtet eine geringe Signalstärke aufweist, ist der IRS sehr hoch, was eine hohe Translationsrate vermuten lässt.

Als notwendiger Aktivator von MMP-2 dient **MMP-14** (siehe auch Kapitel 1.4.6). Die Array-Daten liefern im RA-Synovium das geringste Signal für MMP-14 aller drei Entitäten, der IRS liegt aber am höchsten (SIG 479 / 380 / 977; IRS 2,4 / 6,2 / 5,4). Auffällig ist die Ähnlichkeit der IRS-Werte für MMP-2 und MMP-14 (MMP-2: 2,6 / 5,4 / 4,7; MMP-14: 2,4 / 6,2 / 5,4). Stöchiometrisch werden zur Aktivierung von einem Molekül MMP-2, 2 Moleküle MMP-14 benötigt. Bei ähnlichen IRS Werten deutet dies auf einen hohen Umsatz von pro-MMP-2 hin.

Die Array-Daten für **FAP** werden durch die Immunhistochemie validiert. IRS und Array liefern eine Steigerung für FAP von ND über RA zu RZT (SIG 84 / 392 / 1019; IRS 1,3 / 7,6 / 9,7). FAP erreicht im RZT-Gewebe den höchsten IRS Score aller Antigene und nimmt hier wohl die bedeutendste Rolle im Abbau von Matrixkomponenten ein.

Die Immunhistochemie kann die Datenlage der Array-Analyse insofern bestätigen, dass die Antigene im pathologischen Gewebe auf Proteinebene immer stärker exprimiert werden als im Normalgewebe und daher wohl einen bedeutenden Beitrag zur Pathogenese und damit zur Matrixdegradation beitragen. Für MMP-1, MMP-2 und MMP-3 finden sich aber Unterschiede zwischen Gen- und Proteinexpression im Riesenzelltumor. Dort liefert eine geringere Menge von mRNA eine höhere Proteinmenge als im Normalgewebe. Ob tumorigene Mechanismen existieren, die es ermöglichen, aus einem vergleichsweise geringen mRNA Signal einen hohen Proteinoutput zu erzielen, bleibt zu klären.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Immunhistochemie in weiten Teilen die Array-Daten bestätigt, in einzelnen Fällen, sich aber translationshemmende bzw. – fördernde Systeme vermuten lassen. Um welche Mechanismen es sich hier im Einzelnen handelt, kann an dieser Stelle aber nicht geklärt werden.

Kritisch anzumerken bleibt, dass die Anzahl der Proben der Array-Analyse mit n=10 für ND- und RA-, n=7 für RZT-Proben gering ist und eine Heterogenität in den Proben des Riesenzelltumors vorliegt (Primärtumore und Rezidive). So werden im Vergleich zwischen Rezidiven und Primärtumoren 3203 Gene signifikant unterschiedlich (*fold change* 1,3) exprimiert [39].

Durch die immunhistochemisch festgestellte erhöhte Expression aller untersuchten Antigene in RA und RZT (im Vergleich zum ND-Synovium) lässt sich schließen, dass die durch die Array-Analyse gefundenen Gene relevant für die Pathogenese in beiden Entitäten sind.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, gemeinsame Mechanismen des Matrixum- und -abbaus in RA und RZT zu finden und damit in der rheumatoiden Arthritis Vorgänge, welchen (semi)malignen Prozessen ähneln, auszumachen.

Belege hierfür liefern Gene, welche sowohl in der RA als auch im RZT auf mRNA-(Array) und auf Proteinniveau (Immunhistochemie) signifikant höhere Expressionswerte im Vergleich zum Normalgewebe aufweisen. Von allen 9 untersuchten Genen entsprechen CCR1, CCR5 und FAP diesen Bedingungen -. Die CCRs werden unspezifisch auf einer Reihe von Zellen im RA-Synovium exprimiert (Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten). FAP hingegen wird sehr spezifisch auf aktivierten Fibroblasten im Stroma maligner Tumore und im RA-Synovium exprimiert. Diese fibroblastäre Komponente ist in beiden Entitäten mit ca. 70% Anteil die dominierende Zellart. Daher scheint FAP eines der Gene zu sein, die für einen gemeinsamen Mechanismus der Gewebsinvasion in der rheumatoiden Arthritis und im Riesenzelltumor verantwortlich sein könnten.

#### **4.3 Korrelation zwischen Synovialitis-Score und MMP-9**

Der Synovialitis Score nach Krenn [63, 64] ist eine semiquantitative Methode und ein standardisierter Bewertungsmodus für Erkrankungen des Synovialgewebes.

Zur *low-grade* Synovialitis zählen Arthrose-assoziierte, posttraumatische sowie Meniskopathie Synovialitis. Die *high-grade* Synovialitis beinhaltet die Rheumatoide Arthritis, die Lyme-Arthritis, die Reaktive Arthritis, sowie die Psoriasisarthritis [63]. Damit deckt ein Score von  $\geq 4$  eine große Bandbreite an Erkrankungen des Synovialgewebes ab. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von Normalgewebe sowie RA-Gewebe untersucht. Die Ergebnisse des IRS und des Synovialitis-Scores wurden für die neun untersuchten Antigene gegeneinander korreliert.

Die Gelatinase MMP-9 lieferte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,85 in dieser Untersuchung die höchste Korrelation zwischen den beiden Bewertungsmechanismen.

Damit kann eine Verbindung zwischen MMP-9 Expression und Schwere der Rheumatoiden Arthritis angenommen werden.

Genau betrachtet werden muss die Tatsache, dass MMP-9 in ND-Synovium immunhistochemisch, also auf Proteinebene, auch nach zweifacher Durchführung nicht detektierbar ist, die Array Daten jedoch ein eindeutiges Signal auf Gen-Ebene liefern. Das Nicht-Umsetzen der genetischen Information deutet auf eine strikte Regulation der Proteinbiosynthese von MMP-9 hin; ein mögliches Anzeichen für die destruktive Rolle von MMP-9 in der Pathogenese von RA. Durch die Fähigkeit das Kollagen-IV der Basalmembran zu spalten, könnte auf eine Rolle schon in der frühen Verbreiterung der Deckzellschicht in der RA hindeuten [29]. Die hohe Korrelation von IRS und Synovialitis-Score macht MMP-9 zu einem möglichen Kandidaten für ein Leitenzym des Matrixabbaus in der Synovialmembran. Dies bekräftigt die noch einmal erhöhte Genexpression von MMP-9 in der PVNS [30].

Die hohen Korrelationsraten von MMP-9 und FAP (0,77) mit dem Synovialitis-Score spiegeln sich gut in einer Untersuchung wieder, bei der mittels Zymografie MMP-9 als hauptsächlich von FAP-positiven Fibroblasten produzierte Protease, mit 2-4x gegenüber der Norm erhöhten Werten, nachgewiesen wurde [47]. So kooperieren FAP und MMP-9 in der Gelatinedegradation, was einer gesteigerten Invasion von RA-Synovium in umliegenden Knorpel entspricht.

Das Kernprotein Ki-67, welches eng mit Zellproliferation verknüpft ist und in jeder sich teilenden Zelle detektierbar ist, wird sowohl in der Deckzellschicht, als auch im subintimalen Stroma exprimiert. Untersuchungen zeigen eine deutliche Überexpression von Ki-67 im Stroma nahe Lymphfollikeln und in hochvaskularisierten Pannus-Regionen [92]. In einer Untersuchung mit 37 Proben, zeigt sich eine hohe Korrelation mit dem Synovialitis-Score ( $r=0,80$ ) [92]. Somit wäre MMP-9 neben Ki-67 ein zweiter möglicher Biomarker für entzündliche Arthropathien, der genauerer Untersuchung bedarf.

Neben MMP-9 und FAP, wies MMP-3 eine hohe Korrelation mit dem Synovialitis-Score auf. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich (neben der Korrelation der Serumlevel) auch eine Korrelation zwischen MMP-3 Expression im Synovium und klinischem Fortschreiten der RA [97]. Dies spiegelt indirekt auch die gute Korrelation zwischen Synovialitis-Score und klinischem Verlauf der Erkrankung. Bei Krebsleiden zeigt sich ein sehr sensibles Ansprechen des Serum MMP-9 Levels bei Tumorprogress, sodass

MMP-9 hier bereits als Tumormarker diskutiert wird [78]. Ein ähnliches Verhalten in der RA muss jedoch erst untersucht werden.

Eine Validierung der Datenlage mit einer größeren Anzahl von Gewebeproben sowie der Vergleich zu anderen *high-grade* Synovialitis Erkrankungen wie Psoriasisarthritis muss klären, ob eine hohe MMP-9 Expression spezifisch für das Vorliegen einer RA oder generell für *high-grade* Synovialitiden spricht. Dies könnte klären, ob MMP-9 in der pathologischen Praxis als Diagnostikum für spezifische Synovialitiden Einzug halten würde.

#### **4.4 Hypothesenmodell zum Matrixabbau durch aktivierte Fibroblasten**

Lange Zeit wurde auf Grund der Vielzahl der Immunzellen im Synovium der RA das Hauptaugenmerk im Hinblick auf die Pathogenese auf diese Zellen gelegt. Seit einigen Jahren treten die aktivierten Fibroblasten bezüglich ihrer Rolle bei der Matrixdegradation und Invasion vermehrt in den Fokus.

In der Tumorthherapie versprechen diese ebenfalls ein Target zu sein, da sie einen stabil veränderten Phänotyp aufweisen und weniger variabel Oberflächenproteine exprimieren als Tumorzellen selbst [84].

Das unten angeführte Hypothesenmodell (siehe Abbildung 4.1) beinhaltet einen hypothetischen Signalweg, der die vermutete Aktivierung von MMPs durch FAP und damit die potenzierte Aktivität im Matrixabbau durch aktivierte Fibroblasten beschreibt.

Das Modell beruht auf den in der Arbeit vorliegenden Daten sowie in der Literatur zu findenden Induktionsschritten. Bei der Zusammenführung der einzelnen Schritte handelt es sich um eine Spekulation. Ob die einzelnen Aktivierungskaskaden tatsächlich in dieser Form oder in Teilen in Rheumatoider Arthritis und Riesenzelltumor vorliegen, bleibt ungewiss, sollte jedoch anhand weiterer Experimente überprüft werden.

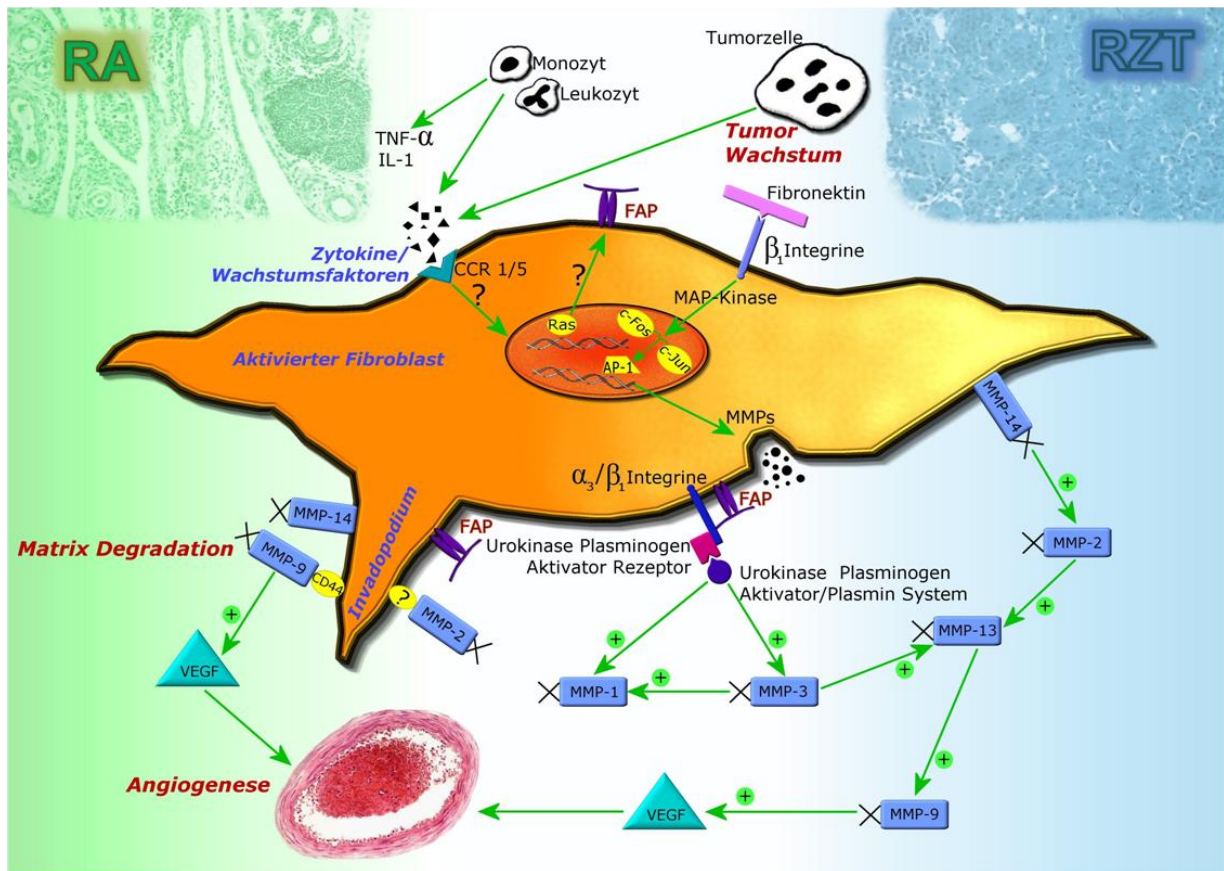


Abbildung 4.1 Hypothesenmodell zum Matrixabbau in RA und RZT, Original

Der  $\beta$ -Propeller des FAP Homodimers weist ein Bindungsvermögen für  $\alpha_3\beta_1$ -Integrin [80] auf, welches wiederum den Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR) bindet [120]. uPAR selbst dient als Rezeptor für das Urokinase Plasminogen Aktivator / Plasmin System, welches über Signalkaskaden MMP-1 und MMP-3 aktiviert [66]. In neueren Studien wurden bereits Heterodimere aus FAP und uPAR auf aktivierten Fibroblasten in stark dysplastischen Anteilen von ösophagealen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen, was diese als Stellen intensiven Matrixum- und -abbaus auswies [38].

Integrine gelten als Link zwischen Matrixkomponenten und intrazellulären Signalwegen [84], sodass FAP mit seinen Integrin-Bindungsstellen eine zentrale Rolle in der Transformation der Fibroblasten einnehmen könnte.

Das sich anschließende System der gegenseitigen Aktivierung von MMPs bzw. VEGF ist ebenfalls in der Literatur gesichert [25, 74, 88]. Ob es sich in dieser Form *in vivo* in RA und/oder RZT darstellt bleibt hier ungeklärt.

Neben der MMP-Aktivierung durch FAP dient die Bindung zu Fibronectin über  $\alpha_3\beta_1$ -Integrin einer verstärkten Anheftung der Fibroblasten an den Knorpel [89].

Der schematisierte Signalweg zur FAP Induktion soll nur beispielsweise als Modell dienen. Da in aktivierten Fibroblasten nicht nur Ras abhängige Signalwege konstitutiv aktiv sind, sondern auch Mutationen von p53 und PTEN und erhöhte NF $\kappa$ B Aktivität zu finden sind [81], lassen sich zahlreiche Induktionswege für FAP vermuten. Ein kompletter Signalweg sowie das induzierende Zytokin sind bisher nicht bekannt.

Gesichert ist die Darstellung des Invadopodiums mit dem matrixabbauenden Quartett FAP, MMP-2, MMP-9 und MMP-14, welches erheblich zur Destruktivität der aktivierten Fibroblasten beiträgt [25, 51].

#### **4.5 Aktivierte Fibroblasten als Link zwischen Inflammation und Tumor**

Die in dieser Arbeit vorliegende Validierung von Mikroarray-Daten erfolgte vor dem Hintergrund, gemeinsame Mechanismen der Gewebsinvasion in RA und RZT zu finden. Da FAP sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene signifikant höhere Expressionswerte in RA und RZT gegenüber dem ND-Synovium aufweist, liegt es nahe, die aktivierten FAP-positiven Fibroblasten als Link zu verstehen [55].



Tumorzellen können sich vom Primärtumor lösen und über Blut oder Lymphe in andere Organe gelangen und dort Metastasen bilden. Es wurde gezeigt, dass auch aktivierte Fibroblasten Anschluss an das Gefäßsystem erlangen können und über den Blutstrom andere noch unbefallene Gelenke erreichen und in Ihnen eine Synovialitis hervorrufen können [69].

Die tragende Rolle für aktivierte Fibroblasten in malignem Tumorwachstum zeigt die Zahl, dass die Stromakomponente maligner Tumoren 20-50% des Tumorgewichts ausmacht [2, 82].

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zwischen FAP und DPP-IV zeigte sich, dass letzteres Molekül primär in gut differenzierten Tumoren exprimiert wird [61], wohingegen FAP-Expression mit vermehrter Invasivität und schlechterem Outcome assoziiert ist [93, 98]. Aktivierte Fibroblasten sind eine der Hauptquellen für matrixabbauende MMPs und daher eine wichtige Komponente bei Gewebsinvasion. Zwar ist FAP selbst nicht in der Lage das Kollagen IV der Basalmembran zu spalten und so den Durchbruch eines malignen Prozesses in subepitheliale Schichten zu fördern [47], jedoch ist dies ebenfalls durch aktivierte Fibroblasten exprimierten Gelatinase MMP-2 möglich.

Die Inhibition von MMPs ist derzeit ein viel beforschtes Thema. So zeigte sich eine MMP-14 Inhibition (welches wiederum Aktivator von MMP-2 ist) eine langanhaltende verminderte Invasivität bei Fibroblasten in der RA [97].

Der Einsatz eines MMP-Inhibitors gegen Kollagenase, Gelatinasen und MT-MMPs hatte eine verminderte Knorpeldestruktion zur Folge [50].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass aktivierte FAP-exprimierende Fibroblasten eine zentrale Rolle im Um- und Abbau von Matrixkomponenten, sowohl in der RA als auch in malignen und semimalignen Prozessen wie dem RZT einnehmen. Hierbei weisen sie einen stabilen Phänotyp auf und eignen sich daher als potentiell Ziel in der Therapie maligner Erkrankungen, aber auch in der RA.

## 4.6 FAP-Inhibitoren

### 4.6.1 Biologicals in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Aktivierte Fibroblasten übernehmen eine Schlüsselrolle in der Produktion matrixabbauender Enzyme, in der Interaktion mit Zytokinen und in der Gewebsinvasion. Darüber hinaus weisen sie einen stabilen (epi)genetischen Phänotyp auf und eignen sich als therapeutisches Target.

In der modernen Medizin werden zunehmend target- beziehungsweise zellspezifische Therapeutika eingesetzt, welche im Gegensatz etwa zu klassischen Chemotherapeutika nicht auf jede sich teilende Zelle des Körpers wirken und somit effizienter und nebenwirkungsärmer agieren.

In der RA-Therapie werden seit einigen Jahren sogenannte Biologicals angewendet. Diese Medikamentengruppe besteht aus monoklonalen Antikörpern und molekularen Inhibitoren, welche zielgerichtet Zytokine ausschalten oder Rezeptoren blockieren können.

Biologicals richten sich in der RA-Therapie bisher gegen Komponenten der inflammatorischen/immunologischen Antwort:

Gegen **TNF $\alpha$**  richten sich der chimäre Antikörper (Fab: Maus, Fc: Mensch) Infliximab, der humanisierte Antikörper Adalimumab, sowie das TNF-Rezeptor Fusionsprotein Etanercept [33].

**Lymphozyten** als Hauptbestandteil des entzündlichen Infiltrats der RA sind Ziel von Rituximab, welches als monoklonaler Antikörper gegen CD20-positive Zellen (B-Zellen) und von Abatacept, einem T-Zell-Inhibitor, welcher die CD80/86 Oberflächenantigene blockiert [33].

**Proinflammatorische Zytokine** stellen die dritte Targetgruppe der Biologicals dar. Hierbei richten sich die Medikamente gegen die jeweiligen Zytokinrezeptoren. Der Inhibitor Anakinra, blockiert den IL-1 Rezeptor, wohingegen Tocilizumab sich als monoklonaler Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor richtet [33].

Die Wirksamkeit dieser Biologicals ist hoch und zeigt Auswirkungen auf die histologische Architektur des Synoviums. Nach Etanercept-Therapie zeigen sich signifikant weniger MMP-3, CD68-positive Makrophagen und VEGF im Synovium [107]. Die Breite der Deckzellschicht als Ort der dichtesten Ansammlung von aktivierten Fibroblasten nimmt unter anti-TNF Therapie signifikant ab [52].

Jedoch steigt die Zahl der Therapieversager unter langfristiger Anwendung von Biologicals, da unter Infliximab-Therapie eine vermehrte baseline-Produktion von TNF $\alpha$  beobachtet wurde [107] und Patienten mit Polymorphismen im TNF $\alpha$  Gen ein generell schlechteres Ansprechen auf Biologicals aufweisen.

Vorliegende Arbeit weist FAP-positive Fibroblasten als wichtigen Mitspieler in der Knorpel- und Gelenkszerstörung in der RA aus. Dies erschließt FAP als neues mögliches Target für Biologicals.

#### 4.6.2 FAP-Inhibitoren bei malignen Erkrankungen

Aktivierte Fibroblasten stellen einen tumorähnlichen Aspekt der Gewebeerstörung in der RA dar [55]. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, aktivierte Fibroblasten im Tumorstroma mittels FAP als Targetprotein anzugreifen und Tumorprogression einzudämmen.

**FAP-Antikörper:** Ein Ansatz zur FAP-Inhibition ist die Herstellung monoklonaler Antikörper. *Sibrotuzumab* wurde als monoklonaler Antikörper bereits in klinischen Studien erprobt. In einer Phase I Studie an Patienten mit metastasiertem Colon- und Bronchial-CA (*NSCLC*) zeigten sich keinerlei dosislimitierende Nebenwirkungen. Es wurde ein schnelle Aufnahme des Antikörpers in den Tumor mittels Fluoreszenzstudien belegt. Objektive Tumorantworten wurden jedoch auch nicht beobachtet [104]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Phase II Studie bei metastasiertem Colon-CA. *Sibrotuzumab* wurde gut toleriert. Es zeigten sich keinerlei partielle oder komplette Remissionen [45]. Unkonjugierte monoklonale Antikörper gegen FAP Konjugation inhibieren die Enzymtätigkeit nicht und führen nicht zu einer immunologischen Antwort gegen aktivierte Fibroblasten [45, 99].

**Enzyminhibitoren:** FAP besitzt eine Dipeptidyl-Peptidase (Exopeptidase), sowie eine Endopeptidaseaktivität, welche beide durch die gleiche katalytische Region vermittelt werden. DPP-IV und FAP weisen eine 70% Kongruenz der Aminosäuresequenz in der katalytischen Region auf [1], jedoch besitzt DPP-IV ein weiteres Substratspektrum und ist nicht in der Lage als Endopeptidase zu wirken. DPP-IV Inhibitoren (Gliptine) werden heutzutage in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt, da eine Hemmung der Spaltung von GLP-1 (*glucagon like peptide 1*) einen insulinotropen Effekt auslöst

und damit den Blutzuckerspiegel senkt. Gliptine hemmen jedoch nur DPPs, jedoch nicht FAP [46].

Um FAP-Enzymaktivität zu hemmen wurden in klinischen Studien Dipeptid-Inhibitoren eingesetzt, welche ein an Prolin gebundenes Borsäure-Motiv aufweisen. Der in klinischen Studien eingesetzte und am besten untersuchte Vertreter der sogenannten *Boroproline* ist Val-boro-Pro (PT-100), auch Talabostat genannt. Talabostat wurde in einer Phase I Studie an Lymphompatienten in Kombination mit Rituximab erprobt. Hier zeigten sich jedoch Nebenwirkungen, welche auf erhöhte Zytokinfreisetzung zurückgeführt wurden [24]. Es folgten Phase II Studien an Patienten mit fortgeschrittenen Melanom und Colon-CA Erkrankungen. In keiner der Studien zeigte sich eine klinische Wirksamkeit mit einer Rate an partiellen Remissionen von 6,1% [24]. Als unerwünschte Nebenwirkungen wurden neben Nausea und Rigor auch vermehrt akute Nierenversagen aufgezeichnet, woraufhin die Studien seitens der FDA gestoppt wurden [24, 99].

Die Erhöhung der Zytokineffekte, sowie die fehlende klinische Wirksamkeit lassen sich darauf zurückführen, dass Boroproline unselektiv alle DASHs hemmen und besonders DPP-8 und -9 zum Abbau von Zytokinen beitragen [83, 99]. Daneben zeigt Talabostat eine geringere Affinität zu FAP ( $K_i$  6,2nmol) als zu DPP-IV ( $K_i$  0,18 nmol) [46].

Die fehlende klinische Wirksamkeit von FAP-Enzyminhibitoren oder anti-FAP-Impfungen lässt sich darauf zurückführen, dass in einigen Studien Xenograft-Tumore verwendet wurden, welche mittels Gensonden FAP exprimierten [99]. Wie beschrieben exprimieren jedoch nur Stromazellen, jedoch nicht Tumorzellen selbst das FAP-Antigen. Verminderungen der Invasivität und des Tumorwachstums müssen daher in solchen Studien mit unphysiologischem Setting kritisch beurteilt werden.

Zusammenfassend stehen derzeit mehrere Möglichkeiten der FAP Inhibition zur Verfügung, welche sich jedoch in klinischen Studien bei malignen Erkrankungen nicht durchsetzen konnten. FAP als Targetmolekül in der RA verlangt eine Reevaluation der vorhandenen Möglichkeit und ein Überdenken der Therapiestrategien.

#### 4.6.3 FAP-Inhibition in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Zwar wird FAP-Expression in Melanomen mit einer geringeren Invasivität in Verbindung gebracht, jedoch weist die überwiegende Mehrzahl der Studien an Tumoren auf eine gesteigerte Invasivität bei FAP-positivem Stroma hin [98, 116, 119]. In einer neueren Studie zeigen homozygote FAP-negative *Knockout* Mäuse, ein signifikant erniedrigtes, heterozygote Mäuse ein immer noch erniedrigtes Wachstum eines Xenograft-Tumors gegenüber FAP exprimierenden Mäusen [99]. FAP-Mutanten mit Austausch des katalytischen Ser624 zu Alanin zeigen auf Tumorzellen eine bis zu 100.000-fach verringerte Enzymaktivität und eine geringere Invasivität [16].

Diese Kenntnisse sowie die überzeugende Validierung der Array-Daten durch Immunhistochemie für FAP lassen diese Arbeit zu dem Schluss kommen, dass Inhibition von FAP auf aktivierten Fibroblasten in der RA eine Hemmung des Matrixabbaus und der Knorpeldestruktion zur Folge hätte.

Hierzu liegt nach aktuellem Stand lediglich eine Arbeit von *Ospelt et al.* [86] vor, in welcher versucht wurde, FAP-exprimierende Fibroblasten von RA-Patienten mittels des Boroprolins Glu-BoroPro (PT-630) in ihrer „DPP-IV ähnlichen Aktivität“ einzuschränken. *Ospelt et al.* kommen zu dem Ergebnis, dass Hemmung der „DPP-IV ähnlichen Aktivität“ mittels PT630 zu einer gesteigerten Invasivität und zu einem Anstieg von MMP-1 und -3 führt. [86]. Die gesteigerte Invasivität wurde anhand von aktivierten Fibroblasten beurteilt, welche in gesunden menschlichen Knorpel implantiert wurden.

Diese Ergebnisse scheinen der Feststellung dieser Arbeit zunächst zu widersprechen. Jedoch gilt es einige wichtige Punkte in dieser Studie zu beachten, die das Setting als suboptimal gelten lassen.

Bei PT-630 handelt es sich um ein Boroprolin, welches sich dem Dipeptid Glu-Pro bedient. Boroproline hemmen unspezifisch alle DASHs und somit auch das ebenfalls untersuchte DPP-IV [99]. Eine klare Trennung zwischen Effekten durch Inhibition von DPP-IV und FAP wird in dieser Arbeit fortschreitend vernachlässigt.

Des Weiteren gibt es mehrere Gründe, warum Glu-BoroPro ein wenig erfolgreicher FAP-Inhibitor ist: So weist PT-630 eine geringere Affinität zu FAP ( $K_i$  5nmol), als zu DPP-IV ( $K_i$  3nmol) auf [46] und bindet bis zu 7x spezifischer an DPP-IV [26].

Darüber hinaus ist bekannt, dass FAP lediglich 3% der Exopeptidase-Aktivität von DPP-IV aufweist [1] und eine Hemmung dieser Aktivität um 90%, die Endopeptidase-Aktivität von FAP lediglich um 20% verringert [57].

Wie bereits beschrieben unterscheidet sich die Substratbindungstasche von FAP von DPP-IV in ihrer niedrigeren Azidität [117]. Daher binden stark elektrophile Molekülereste nur schlecht an die katalytische Region von FAP. Boroproline aber weisen den elektrophilen Borsäurerest auf, welcher ein Boronat mit dem katalytischen Serin bildet [83]. Darüber hinaus verwandten Ospelt et al. einen Inhibitor, welcher an P2-Position mit Glutamat einen ebenfalls geladenen Aminosäurerest aufweist, was eine zusätzliche Affinitätssenkung gegenüber FAP darstellt. Es wurde gezeigt, dass lediglich Glycin in P2-Position eine hohe Affinität zur FAP-Substratbindungstasche aufweist [1, 117].

Dies legt nahe, dass lediglich Inhibitoren, welche geeignet sind, ebenfalls die Exopeptidase (als Hauptfunktion FAPs) zu hemmen, geeignet sind. Hierfür werden Oligopeptide benötigt, welche das bevorzugte Substratbindungsmotiv Gly-Pro aufweisen [56] und an den Positionen P3 und P4 weitere hydrophobe oder aromatische Aminosäurereste aufweisen und erst an P7 geladene aufweisen sollten, um eine möglichst große Affinität zu FAP herzustellen [46, 68].

Von *Ospelt et al.* außer Acht gelassen wurden weiterhin die nicht-enzymatisch vermittelten Wirkungen durch FAP. So wurde gezeigt, dass FAP-Formen ohne Enzymaktivität einen Tumor schneller und aggressiver wachsen ließen, als einen Tumor in einer FAP-Knockout Maus [47]. Wie bereits beschrieben weist FAP Bindungsstellen für  $\beta$ 1-Integrine auf, welche intrazelluläre Signalwege auslösen können und Verbindungen zur ECM herstellen.

Weiterhin ist allgemein akzeptiert, dass die Wirkung von FAP ebenfalls vom umgebenden Milieu abhängt und davon, welche zu spaltenden Zytokine, Matrixkomponenten u.a. als Substrate verfügbar sind. Die postulierte gesteigerte Invasivität nach PT-630 Gabe, wurde jedoch an gesundem Knorpelgewebe untersucht, welches bei weitem nicht dem eines RA-Pannus (auch unter Biological-Therapie) entspricht.

Aus diesen Gründen scheint die These, dass FAP auf aktivierten Fibroblasten in der RA als „Rettungsprotein“ exprimiert wird [86], für äußerst unwahrscheinlich. Unter Verwendung eines unspezifischen und für FAP wenig affinen Inhibitors, ohne getrennte

Begutachtung der DPP-IV Aktivität, ohne Betrachtung der Endopeptidaseaktivität und der extraenzymatischen Wirkungen FAPs und ohne die Beachtung der komplexen Interaktion mit ECM-Molekülen von RA-Gewebe, ist diese These nur schwer haltbar.

Kritisch hinterfragt werden sollte generell der Einsatz von Inhibitoren der Enzymaktivität, wie die klinischen Studien zu Talabostat bereits nahelegen. Die Spezifität für FAP ohne Affektion der übrigen DASHs unter Hemmung der Endo- und Exopeptidase-Aktivität und den Zusammenhang zu den verfügbaren ECM-Komponenten abzubilden, scheint derzeit ein sehr komplexes Vorhaben zu sein.

Wie bereits in Antwort auf die Studie von *Ospelt et al.* vorgeschlagen [56], müssen neue Ansätze gewählt werden um FAP erfolgreich als therapeutisches Target zu erschließen. Die Hemmung der Enzymaktivität scheint keinen klinischen Vorteil zu erbringen. Stattdessen sollte man FAP nicht nur als Protease, sondern auch als spezifischen Marker für aktivierte Fibroblasten mit aggressivem Phänotyp als Quelle für zahlreiche matrixabbauende Enzyme betrachten. Ein interessanter Ansatz ist hierbei sich die Peptidase-Aktivität zu Nutze zu machen, um Zellgifte zu aktivieren. Peptide mit Prolin-Motiven werden hierbei an Promellitin (Gift der europäischen Honigbiene) gebunden. Spaltet FAP-tragende Fibroblasten das Peptid hinter dem Prolinrest, wird das Gift freigesetzt und kann direkt im Stroma auf die aktivierten Fibroblasten wirken [44, 67].

Des Weiteren erscheinen konjugierte monoklonale Antikörper eine mögliche Option darzustellen, aktivierte Fibroblasten anzugreifen. Eine Konjugation an ein Maytansinoid (Ein Spindelzellgift, welches zum Zellzyklusarrest über Bindung an Mikrotubuli führt) bewirkt nach Endozytose des FAP-Antikörper-Komplexes und lysosomalem Abbau eine lokale Nekrose durch Zelluntergang [87].

Fraglich ist in diesem Fall der klinische Effekt, da Fibroblasten selbst im Gegensatz zu Tumorzellen keine stark erhöhte Mitoserate aufweisen und Spindelgifte daher nur verzögert wirken sollten.

Wirksamkeitsstudien von monoklonalen Antikörpern gegen FAP gekoppelt an Zytostatika befinden sich derzeit in Vorbereitung und umgehen die Notwendigkeit der Ausbildung von Mitosespindeln.

Unter Betrachtung der immunhistochemischen Validierung der Mikroarray-Daten durch diese Arbeit für FAP und dessen Expression auf Invadopodien aktivierter Fibroblasten neben anderen matrixabbauenden Proteasen besonders in der aggressiv verbreiteten

Deckzellschicht der RA, zeigt sich, dass das Augenmerk in der RA-Therapie verstärkt auf die Stromakomponente gelegt werden sollte. FAP bietet sich hierfür als Targetprotein mit seiner hochspezifischen Expression für die Entwicklung zukünftiger Biologicals mit gezielter Wirkung auf die Synovialis an.



## 5. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung ungeklärter Ätiologie. Morphologische Gemeinsamkeiten des Stromas von *high-grade* Synovialitiden bei RA und dem semimalignen Riesenzelltumor des Knochens (RZT) wie etwa ein fibroblastenreiches Stroma und das Auftreten multinukleärer Riesenzellen lassen ähnliche Mechanismen des Matrixum-/abbaus und Invasion beider Entitäten vermuten.

Der Vergleich der Genexpressionsprofile beider Gewebe mittels Affymetrix Genchips im Vergleich zu nicht pathologisch verändertem Synovialgewebe (ND) liefert das Ergebnis einer quantitativen Dominanz (ca. 70% Zellanteil) fibroblastenähnlicher Zellen in beiden Entitäten. In diesen Geweben konnte eine zu 70% differentielle Expression von Genen detektiert werden, wobei neun Kandidatengene zur weiteren Untersuchung herausgefiltert wurden.

Es handelt sich hierbei um die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5, den proangiogenetischen Faktor VEGF, die matrixabbauenden Enzyme MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-14 sowie das spezifisch auf aktivierten, tumorähnlichen Fibroblasten exprimierte *Fibroblast Activation Protein* (FAP).

Die vorliegende Arbeit validiert die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen mittels semiquantitativer Immunhistochemie und bewertet die Umsetzung des mRNA-Signals in Proteine.

Die immunhistochemische Untersuchung der einzelnen Antigene wurde an paraffinfixierten Gewebsschnitten mit jeweils n=10 ND, RA und RZT Gewebssproben ausgeführt. FAP wurde mittels kryokonserviertem Material mit n=10 RA und RZT Proben und n=5 ND Schnitten untersucht. Zur Bewertung der Schnitte wurde der semiquantitative immunreaktive Score (IRS) benutzt.

Die untersuchten Antigene weisen in RA Gewebe eine signifikant höhere Expression als in ND-Synovium auf. Alle untersuchten Antigene konnten auf aktivierten Fibroblasten (besonders in der Deckzellschicht von RA-Proben) nachgewiesen werden, was die zentrale Stellung dieser Zellart in der destruktiven Progression beider Erkrankungen unterstreicht.

Gene, welche sowohl im Mikroarray und im IRS in RA und RZT gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöhte Expressionswerte aufweisen, können gemeinsame Mechanismen der Gewebsinvasion darstellen. Von den neun untersuchten Genen erfüllen CCR1, CCR5 und FAP diese Kriterien.

MMP-9 zeigt Unterschiede zwischen den Array-Daten und der Immunhistochemie. Das Signal im Array kann im Gewebe immunhistochemisch nicht als MMP-9 Protein detektiert werden. Das lässt eine Regulation und damit verbunden eine wichtige Rolle in der frühen Matrixdestruktion vermuten. Ein Korrelationsvergleich zwischen dem IRS der einzelnen Antigene und dem histopathologischen Synovialitis-Score zur Unterscheidung von *low-* und *high-grade* Synovialitiden weist für MMP-9 den höchsten Koeffizienten ( $r=0,847$ ) aus.

Erstmals konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch MMP-14 auf multinukleären Riesenzellen im RZT nachgewiesen werden.

FAP wurde auf synovialen Fibroblasten sowie auf fibroblastoiden Stromazellen des Riesenzelltumors nachgewiesen. Dieser Befund legt möglicherweise nicht nur ausschließlich inflammatorische sondern auch tumorähnliche Mechanismen der Gewebsdestruktion in der Rheumatoiden Arthritis nahe.

FAP wurde bereits als therapeutisches Target in der Therapie maligner Erkrankungen diskutiert. Diese Therapie ist gegebenenfalls auf die RA übertragbar.

Aktivierete Fibroblasten können über verschiedenste Mechanismen (Matrixdestruktion, Angiogenese) die Progression der lokalen Gewebsdestruktion sowohl in der RA als auch im RZT verursachen und sich an der Knorpel- und Knochendestruktion von Gelenken beteiligen. Hierdurch wird das inflammationsunabhängige Pathogenese-konzept der RA unterstützt.

## 6. Literaturverzeichnis

1 **Aertgeerts K**, Levin I, Shi L, et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein. *J Biol Chem* 2005;280:19441-4.

2 **Aggarwal S**, Brennen, WN, Kole TP, et al. Fibroblast activation protein peptide substrates identified from human collagen I derived gelatin cleavage sites. *Biochemistry* 2008;47:1076-86.

3 **Ariga N**, Sato E, Nagura H, et al. Stromal expression of fibroblast activation protein/seprase, a cell membrane serine protease and gelatinase is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast. *Int J Cancer* 2001;95:67-72.

4 **Arnett FC**, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.

5 **Balkwill F**, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-45.

6 **Bauer S**, Jendro M, Wadle A, et al. Fibroblast Activation Protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2006;8:1-11.

7 **Biscaglia R**, Bacchini P, Bertoni F. Giant cell tumor of the bones of the hand and foot. *Cancer* 2000;88:2022-32.

8 **Biti R**, French R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T, et al. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* 1997;3:252-3.

- 9 **Blavier L**, Lazaryev A, Dorey F, Shackelford GM, DeClerck YA. Matrix metalloproteinases play an active role in wnt1-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2006;66:2691-9.
- 10 **Böcker W**, Denk H, Heitz Ph. Tumore des Knochens. In: Pathologie. 3. Auflage. München, Deutschland. Urban & Fischer, 2004;1053-4 ISBN.
- 11 **Brokopp CE**, Schoenauer R, Richards P, et al. Fibroblast activation protein is induced by inflammation and degrades type I collagen in thin-cap fibroatheroma. *Europ Heart J* 2011; Feb 2 [Epub ahead of print].
- 12 **Burmester G**, Stuhlmüller B, Keyser G, Kinne RW. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhouse in arthritis? *Arthritis Rheum* 1997;40:5-18.
- 13 **Busek P**, Malik R, Sedo A. Dipeptidyl peptidase IV activity an/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:408-21.
- 14 **Cheng JC**, Johnston JO. Giant cell tumor of bone. Prognosis and treatment of pulmonary metastasis. *Clin Orthop* 1997;338:205-14.
- 15 **Cheng JD**, Weiner LM. Tumors and their microenvironments: Tilling the soil. *Clin Canc Res* 2003;9:1590-5.
- 16 **Cheng JD**, Valianou M, Canutescu AA, et al. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2005;4:351-60.
- 17 **Christiansen V**, Jackson K, Lee KN, McKee PA. Effect of fibroblast activation protein and  $\alpha_2$ -antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. *Arch Biochem Biophys* 2007;457:177-86.

- 18 **Collins PJ**, McMahon G, O'Brien P, O'Connor B. Purification, identification and characterisation of seprase from bovine serum. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2320-33.
- 19 **Coussens L**, Werb Z. Inflammation and cancer. *Back to Virchow? Nature* 2002;420:860-7.
- 20 **Dahi S**, Lee JG, Lovett DH, Sarkar R. Differential transcriptional activation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane type-1 matrix-metalloproteinase by experimental deep vein thrombosis and thrombin. *J Vasc Surg* 2005;42:539-45.
- 21 **Davidson A**, Diamon B. Autoimmune diseases.Review. *New Engl J Med* 2001;345:340-50.
- 22 **Dohl O**, Ohtani H, Hatori M, et al. Histogenesis-specific expression of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase-IV in human bone and soft tissue tumors. *Histopathology* 2009;55:432-40.
- 23 **Dolznic H**, Schweifer N, Purl C, et al. Characterization of cancer stroma markers: In silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immunology* 2005;5:1-10.
- 24 **Eager RM**, Cunningham CC, Senzer NN, et al. Phase II assessment of talabostat and cisplatin in second-line stage IV melanoma. *BMc Cancer* 2009;263:1-11.
- 25 **Egablád M**, Werb Z. New functions for the matrix-metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews* 2002;2:161-74.
- 26 **Egosada C**, Quan C, Wiesmann C, et al. Selective inhibition of fibroblast activation protein protease based on dipeptide substrate specificity. *J Biol Chem* 2006;281:7437-44.

- 27 **Fassbender H.** Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983;3:141-55.
- 28 **Ferrara N,** Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Endocr. Rev* 1997;18:4-25.
- 29 **Fiedorczyk M,** Klimiuk PA, Sierakowski S, et al. Serum matrix-metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:1523-9.
- 30 **Finis K,** Sültmann H, Ruschhaupt M, et al. Analysis of pigmented villonodular synovitis with genome-wide complementary DNA microarray and tissue array technology reveals insight into potential novel therapeutic approaches. *Arthritis & Rheumatism* 2006;54:1009-19.
- 31 **Garin-Chesa P,** Old L, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Immunology* 1990;87:7235-9.
- 32 **Ghert M,** Rizzo M, Harelson J, et al. Giant cell tumor in the appendicular skeleton. *Clin Orthop* 2002;40:201-10.
- 33 **Gibbons LJ,** Hyrich KL. Biological therapy for rheumatoid arthritis – clinical efficacy and predictors of response. *Biodrugs* 2009;23:111-24.
- 34 **Gilmore BF,** Lynas JF, Scott CJ, McGoohan C, Martin L, Walker B. Dipeptide proline diphenyl phosphonates are potent, irreversible inhibitors of seprase (FAP $\alpha$ ). *Biochem Biophys Res Comm* 2006;346:436-46.
- 35 **Goldenberg R,** Campbell C, Bonifiglio M. Giant cell tumor of bone; an analysis of two hundred and eighteen cases. *J Bone Joint Surg* 1970;52:619-64.

- 36 **Goldring R.** Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? *J Rheumatol Suppl.* 2002;65:44-8.
- 37 **Goldring R,** Schiller AL, Mankin HJ, Dayer JM, Krane SM. Characterization of cells from human giant cell tumors of bone. *Clin Orthop Relat* 1986;59-75.
- 38 **Goscinski MA,** Suo ZH, Nesland JM, et al. Seprase, dipeptidyl peptidase IV and urokinase-type plasminogen activator expression in dysplasia and invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology* 2008;75:49-59.
- 39 **Guenther R,** Krenn V, Morawietz L, et al. Giant cell tumor of the bone: molecular profiling and expression analysis of ephrin A1 receptor, Claudin 7, CD52, FGFR3 and AMFR. *Pathol Res* 2005;201:649-63.
- 40 **Guenther R,** Krenn V, Häupl T. Expressionsanalysen bei derr rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* 2008;67:17-24.
- 41 **Hamann J,** Wishaupt J, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. Expresssion of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:650-8.
- 42 **Harten P.** Rheumatologie. In: Herold et al. *Innere Medizin* 2009. 1. Auflage. Köln, Deutschland. Herold Verlag, 2008:617-51.
- 43 **Häupl T,** Burmester GR, Stuhlmüller B. Neue Aspekte der molekularbiologischen Diagnostik. *Z Rheumatol* 2002;61:396-404.
- 44 **Hayward SW.** Preclinical assessment of fibroblast activation protein as a target for antitumor therapy. *Future Oncol* 2010;6:347-9.

- 45 **Hofheinz RD**, al-Batran SE, Hartmann F, et al. Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* 2003;26:44-8.
- 46 **Huang CH**, Suen CS, Lin CT, et al. Cleavage-site specificity of prolyl endopeptidase FAP investigated with a full length protein substrate. *J Biochem* 2011;149:685-92.
- 47 **Huang Y**, Simms AE, Mazur A, et al. Fibroblast activation protein- $\alpha$  promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions. *Clin Exp Metastasis* 2011; May 22 [Epub ahead of print].
- 48 **Huber M**, Kraut N, Park J, et al. Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors. *J Inv Dermatol* 2004;120:182-8.
- 49 **Hwang J**, Kyung-No S, Chan K, et al. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* 2005;30:254-63.
- 50 **Ishikawa T**, Nishigaki F, Miyata S, et al. Prevention of progressive joint destruction in collagen-induced arthritis in rats by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, FR255031. *Brit J Pharmacol* 2005;144:133-43.
- 51 **Itoh Y**, Seiki M. MT1-MMP: A potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Phys* 2006;206:1-8.
- 52 **Izquierdo E**, Canete JD, Celis R, et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathological correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum* 2001; May 5 [Epub ahead of print].



53 **Jaewoo L**, Fassnacht M, Nair S, Boczkowski D, Gilboa E. Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2005;65:11156-63.

54 **Jaffe L**, Poartis R. Giant cell tumor of bone – its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch Pathol* 1940;30:993-1031.

55 **Jakobs M**, Häupl T, Krenn V, Guenther R. MMP- und FAP-vermittelte inflammationsunabhängige Destruktion von Knochen und Knorpel in der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* 2009;68:683-94.

56 **Jakobs M**, Fritsche-Guenther R. Specificity of inhibitors and frequency of expression of target proteins used to study cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: comment on the article by Ospelt et al. *Arthritis Rheum* 2010;62:3513-4.

57 **Kelly T**. Fibroblast activation protein- $\alpha$  and dipeptidyl peptidase IV (CD26): cell surface proteases that activate cell signalling and are potential targets for cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 2005;8:51-8.

58 **Kemshead J**, Ritter M, Cotmore S, et al. Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Res* 1982; 236:451-61.

59 **Kinne R**, Bräuer R, Stuhlmüller B, et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:189-202.

60 **Kontinen Y**, Ainola M, Valleala H, et al. 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;58:691-7.

- 61 **Kotackova L**, Balaziova E, Sedo A. Expression pattern of dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues in cancer. *Folia Biologica* 2009;55:77-84.
- 62 **Krenn V**, Hoffman S, Engel A. First description of mechanoreceptors in the corpus adiposum infrapatellare of men. *Acta Ana* 1990;137:187-9.
- 63 **Krenn V**, Morawietz L, Häupl T, et al. Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract.* 2002;198:317-25.
- 64 **Krenn V**, Morawietz L, Burmester G, Häupl T. Synovialitis score: Histopathologisches Graduierungsschema rheumatischer und nicht-rheumatischer Synovialitiden. *Z Rheumatol* 2005;64:334-42.
- 65 **Kriegsmann J**, Keyszer G, Geiler T, et al. Expression of vascular cell adhesion molecule mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Lab Invest* 1995;72:209-14.
- 66 **Kummer J**, Abbink J, deBoer J, et al. Analysis of intraarticular fibrinolytic pathways in patients with inflammatory and non-inflammatory joint disease. *Arthritis Rheum* 1992;35:884-93.
- 67 **Lebeau AM**, Brennen WN, Aggarwal S, Denmeade SR: Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promellitin protoxin. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1378-86.
- 68 **Lee KN**, Jackson KW, Terzyan S, Christiansen VJ, McKee PA. Using substrate specificity of antiplasmin-cleaving enzyme for fibroblast activation protein inhibitor design. *Biochemistry* 2009;48:5149-58.

- 69 **Lefevre S**, Knedia A, Tennie C, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature Medicine* 2009;15:1414-20.
- 70 **Lindemann J**, Hanemaaijer R, Mulder A, et al. Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor. *Am Journ Path* 2004;165:593-600.
- 71 **Loeffler M**, Krüger J, Niethammer AG, Reisfeld RA. Targeting tumor-associated fibroblasts improving cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 2006;116:1955-62.
- 72 **Ma B**, Zuo Zhou, Homer RJ, Gerard Craig, Strieter R, Elias JA. The CC10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodelling. *J Immunol* 2004;172:1872-81.
- 73 **Mamehara A**, Sugimoto T, Sugiyama D, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci* 2010;56:98-107.
- 74 **Mengshol J**, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46:13-20.
- 75 **Mersmann M**, Schmidt A, Rippman J, et al. Human antibody derivates against the fibroblast activation protein for tumor stroma targeting carcinomas. *Int J Cancer* 2001;92:240-8.
- 76 **Milner JM**, Kevorkian L, Young DA, et al. Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:1-8.
- 77 **Mori Y**, Kono K, Matsumoto Y, et al. The expression of a type II transmembrane serine protease (seprase) in human gastric carcinoma. *Oncology* 2004;67:411-19.

- 78 **Mroczko B**, Kozlowski M, Groblewska M, et al. The diagnostic value of measurement of MMP-9, SCC and CEA in the sera of esophageal cancer patients. *Clin Chim Acta* 2008;389:61-6.
- 79 **Murdoch C**, Finn A,. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000;95:3032-43.
- 80 **Müller S**, Gherzi G, Akiyama S, et al. A novel-protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem* 1999;274:24947-52.
- 81 **Müller-Ladner U**, Pap T.Das Immunsystem ist nicht alles. *Z Rheumatol* 2005;63:396-401.
- 82 **Nakagawa H**, Liyanarachchi S, Davuluri RV, et al. Role of cancer associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004;23:7366-77.
- 83 **Narra K**, Mullins SR, Lee HO, et al. Phase II trial of single agent val-boropro (talabostat) inhibiting fibroblast activation protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol & Ther* 2007;6:1691-9.
- 84 **Niedermeier M**, Pap T, Korb A. Therapeutic oppurtunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheum* 2010;24:527-40.
- 85 **Oreffo R**, Marshall G, Kirchen M, et al. Characterization of a cell line derived from a human giant cell tumor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 1993;296:229-41.
- 86 **Ospelt C**, Mertens JC. Juengel A, et al. Inhibition of fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase IV increases cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2010;62:1224-35.

87 **Ostermann E**, Garin-Chesa P, Heider KH, et al. Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. Clin Cancer Res 2008;12:4584-92.

88 **Overall C**, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nature Reviews 2002; 2:657-71.

89 **Pap T**, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast Biology – Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Res 2000;2:361-7.

90 **Pap T**, Auperle K, Gay S, Firestein GS, Gay RE. Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. Arthritis Rheum 2001;44:676-81.

91 **Park J**, Lentert M, Zimmermann R, et al. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. J Biol Chem 1999;274:36505-12.

92 **Pessler F**, Ogdie A, Diaz-Thome C, et al. Subintimal Ki-67 as a synovial tissue biomarker for inflammatory arthropathies. Ann Rheum Dis 2008;67:162-7.

93 **Ramirez-Montagut T**, Blachere N, Sviderskaya E, et al. FAP $\alpha$ , a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. Oncogene 2004;23:5435-45.

94 **Remmele W**, Stegner H. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (E-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Pathologie 1987;8:138-40.

95 **Rosenblum JS**, Kozarich JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. Curr Opin Chem Biol 2003;7:496-504.

96 **Ruffing N**, Sullivan N, Sharmeen L, Sodroski J, Wu L. CCR5 has an expanded ligand-binding repertoire and is the primary receptor used by MCP-2 on activated T-cells. *Cell Immunol* 1998;189:160-8.

97 **Rutkauskaite E**, Volkmer D, Shigcyama Y, et al. Retroviral gene transfer of an antisense construct against membrane type 1 matrix metalloproteinase reduces the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2005;52:2010-4.

98 **Saadi A**, Shannon NB, Lao-Sirieix P, et al. Stromal genes discriminate preinvasive from invasive disease, predict outcome, and highlight inflammatory pathways in digestive cancers. *PNAS* 2010;107:2177-82.

99 **Santos AM**, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Pure E. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3613-26.

100 **Scanlan M**, Ray B, Calvo B. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Froc Nud Acad Sci* 1994;91:5657-61.

101 **Scherer S**, Barboza de Souza T, de Paoli J, et al. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2010;30:369-73.

102 **Schober A**, Zerneck A. Chemokines in vascular remodelling. *Thromb Haemost* 2007;97:730-7.

103 **Schoedel K**, Greco M, Stehler-Stevenson W, et al. Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in giant cell tumor of bone. *Human Pathology* 1996;27:1144-8.

104 **Scott AM**, Wiseman G, Welt S, et al. A phase I dose-escalation study of sibtuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein protein-positive cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1639-47.

105 **Seemayer C**, Distler O, Kuchen S, et al. Die Rheumatoide Arthritis: Neuentwicklungen in der Pathogenese unter besonderer Berücksichtigung der synovialen Fibroblasten. *Z Rheumatol* 2001;60:309-18.

106 **Sozzani S**, Ghezzi S, Iannolo G, et al. Interleukin-10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J Exp Med* 1998;187:439-44.

107 **Suzuki Y**, Inoue K, Chiba J, Inoue Y, Kanbe K. Histological analysis of synovium by treatment of etanercept for rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2009;12:7-13.

108 **Symmons D**. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16:707-22.

109 **Takahashi H**, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 2005;109:227-41.

110 **Taylor P**. VEGF and imaging of vessels in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4:99-107.

111 **Thomas DM**, Skubitz KM. Giant cell tumor of bone. Review. *Curr Opin Oncol* 2009;21:338-44.

112 **Toshihiro N**, Nagasaka K, Hayashida K, et al. Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001;167:5381-5.

113 **Tuxhorn J**, Ayala G, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 2001;66 :2472-83.

114 **Wang A**, Wang J, Fisher G. Interleukin-1 stimulated invasion of articular cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by antibodies to specific integrin receptors and by collagenase inhibitors. *Arthritis Rheum* 1997;40:1298-307.

115 **Weis S**, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated src activity potentiates tumor cell extravasion and metastasis. *J Cell Biol* 2004;167:223-9.

116 **Wen Y**, Wang CT, Ma TT, et al. Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model. *Cancer Sci* 2010;101:2325-32.

117 **Wolf BB**, Quan C, Thuy T, Wiesmann C, Sutherlin D. On the edge of validation – cancer protease fibroblast activation protein. *Mini-Rev Med Chem* 2008;8:719-27.

118 **Wysocki G**, Brinkhous K. Scanning electron microscopy of synovial membranes. *Arch Path* 1972;93:172-7.

119 **Yu DM**, Yao TW, Chowdhury S, et al. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010;277:1126-44.

120 **Zhang F**, Tom C, Kugler M, et al. Distinct ligand binding sites in integrin alpha3beta1 regulate matrix adhesion and cell-cell contact. *J Cell Biol* 2003;163:177-88.

121 **Zhang J**, Valianou M, Cheng JD. Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010;2:1154-63.



122 **Zheng M**, Robbins P, Xu J, et al. The histogenesis of giant cell tumor of bone : a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol* 2001;16:297-307.

## 7. Anhang

### 7.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<b>#</b>	<b>Name</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 1.1	Darstellung der histopathologischen Morphologie von RA (high-grade Synovialitis) und RZT	5
Tabelle 2.1	Gewebeproben	18
Tabelle 2.2	Primäre Antikörper	23
Tabelle 2.3	Positivkontrollen	24
Tabelle 2.4	Verwendete Reagenzien und Apparate	25
Tabelle 2.5	Ansätze für Lösungen	26
Abbildung 3.1	Clusteranalyse des Genexpressionsprofilvergleichs RA/RZT vs. ND	31
Abbildung 3.2	Genexpressionsprofildaten	
	a) CCR1	32
	b) CCR5	32
	c) VEGF	33
	d) MMP-1	33
	e) MMP-2	34
	f) MMP-3	34
	g) MMP-9	35
	h) MMP-14	35
	i) FAP	36
Tabelle 3.1	Signifikanztestung der Ergebnisse der Mikroarrayuntersuchungen	37
Tabelle 3.2	Zellzusammensetzung von RA- und RZT-Gewebeproben mittels FPCA	38
Tabelle 3.3	Ergebnisse des Immunreaktiven Scores (IRS)	39
Abbildung 3.3	IHC	
	a) CCR1	40
	b) CCR5	42
	c) VEGF	44
		98

---

	d) MMP-1	45
	e) MMP-2	47
	f) MMP-3	48
	g) MMP-9	50
	h) MMP-14	52
	i) FAP	53
Abbildung 3.4	IRS	
	a) CCR1	41
	b) CCR5	43
	c) VEGF	44
	d) MMP-1	46
	e) MMP-2	47
	f) MMP-3	49
	g) MMP-9	50
	h) MMP-14	52
	i) FAP	54
Tabelle 3.4	Signifikanztestung der Ergebnisse des IRS	55
Tabelle 3.5	Korrelationsvergleich zwischen IRS und Synovialitis-Score	56
Abbildung 4.1	Hypothesenmodell zum Matrixabbau in RA und RZT	71

## **7.2 Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

---

## 7.3 Publikationsverzeichnis

### 7.3.1 Originalarbeiten

Krukemeyer MG, Krenn V, **Jakobs M**, Wagner W. Mitoxantrone-iron oxide biodistribution in blood, tumor, spleen and liver – Magnetic nanoparticles in cancer treatment. J Surg Res. 2011; Mar 2 [Epub ahead of print].

Krenn V, Morawietz L, **Jakobs M**, Kienapfel H, Ascherl R, Baue, L, Kuhn H, Matziolis, G, Gehrke T. Gelenkendoprothesenpathologie: Histopathologische Diagnostik und Klassifikation. Pathologe. 2011;32:210-9.

Tiemann AH, Krenn V, Krukemeyer MG, **Jakobs M**, Hofmann GO. Infektiöse Knochenerkrankungen. Pathologe. 2011;32:200-9.

Knöss P, Kurz B, **Jakobs M**, Otto M, Möllenhoff G, Krukemeyer MG, Krenn V. NITEGE-expression in meniscal matrix – a new, immunohistochemical marker of meniscal tissue degeneration. J Orthop Traumatol. 2011;1:1-7.

**Jakobs M**, Fritsche-Guenther R. Specificity of inhibitors and frequency of expression of target proteins used to study cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: comment on the article by Ospelt et al. Arthritis Rheum. 2010;62:113513-4.

Krenn V, Knöss P, Rütter W, **Jakobs M**, Otto M, Krukemeyer MG, Heine A, Möllenhoff G, Kurz B. Meniskus-Degenerations-Score und NITEGE Expression: Immunhistochemischer NITEGE Nachweis in der schwergradigen Meniskusdegeneration. Orthopade 2010;39:475-85.

Krenn V, Kurz B, Krukemeyer MG, Knöss P, **Jakobs M**, Poremba, C, Möllenhoff G. Histopathologischer Degenerations-Score des Faserknorpels. *Low- und High-grade* Meniskusdegeneration. Z Rheumatol 2010;69: 644-52.

Krenn V, **Jakobs M**, Kriegsmann J, Krukemeyer MG, Rieger A. Ist eine bioptische Sicherung beim Sjögren-Syndrom sinnvoll? Vom Focus-Score zur Vaskulitidiagnostik. Z Rheumatol 2010;69:11-8.

Krukemeyer M, Wagner W, **Jakobs M**, Krenn V. Tumor regression by means of magnetic drug targeting. Nanomed 2009;4:875-82.

**Jakobs M**, Häupl T, Krenn V, Guenther. MMP- und FAP-vermittelte Inflammationsunabhängige Destruktion von Knochen und Knorpel in der Rheumatoiden Arthritis. Z Rheumatol 2009;68:683-94.

Walker UA, Knoess P, **Jakobs M**, Krenn V. Sklerodermie und fibrosierende Erkrankungen. Z Rheumatol 2009;68:312-9.

Krenn V, Otto M, Morawietz L, Hopf T, **Jakobs M**, Klauser W, Schwantes B, Gehrke T. Histopathologische Diagnostik in der Endoprothetik. Periprothetische Neosynovialitis, Hypersensitivitätsreaktion und Arthrofibrose. Orthopade 2009;38:520-30.

Berger I, Morawietz L, **Jakobs M**, Krenn V. Stellenwert der histologischen Diagnostik der Synovialkrankheiten. Orthopade 2009;38:484-90.

**Jakobs M**, Morawietz L, Rothschenk H, Hopf T, Weiner S, Schausten H, Krukemeyer MG, Krenn V. Synovialitis-Score: Wertigkeit histopathologischer Diagnostik bei unklaren Arthritiden. Fallberichte aus der rheumatologisch-pathologischen Praxis. Z Rheumatol 2007;66:708-12.

### 7.3.2 Posterbeiträge und Vorträge

Krukemeyer MG, Wagner W, **Jakobs M**, Hartlapp JH, Krenn V. Tumor regression by means of iron oxide cytostatic drug targeting. ASCO Annual Meeting 2011. J Clin Oncol 2011;29 Suppl:e13502.

Krenn V, Morawietz L, **Jakobs M**, Kienapfel H, Ascherl R, Bause L, Kuhn H, Matziolis G, Skutek M, Gehrke T . Erweiterte Konsensus-Klassifikation der Endoprothesen-pathologie DGP-Kongress 2011. Pathologe 2011;32 Suppl:131.

Knöss P, **Jakobs M**, Otto M, Möllenhoff G, Krenn V. Low- und high-grade Degeneration des Faserknorpels bei Meniskopathien. DGP-Kongress 2011. Pathologe 2011;32 Suppl:132.

Krenn V, **Jakobs M**, Krukemeyer MG. On the diagnostic significance of histopathology. DGRh-Kongress 2010. Vortrag.

**Jakobs M**, Krenn V, Guenther R. Comparing a semimalignant tumor and chronic inflammation: common mechanisms in tissue destruction? DGP-Kongress 2009. Pathologe 2009;30 Suppl:68.

Krenn V, Knöss P, Otto M, Kriegsmann J, Poremba C, **Jakobs M**, Schwantes B, Klauser W, Gehrke T Classification, grading and typing of arthrofibrosis. DGRh-Kongress 2009. Z Rheumatol 2009;68 Suppl:47.

Krenn V, Knöss P, **Jakobs M**, Kriegsmann J, Klauser W, Gehrke T, Krukemeyer MG, Kurz B. NITEGE – a possible immunohistochemical marker of fibrous cartilage degeneration. DGRH-Kongress 2009. Z Rheumatol 2009;68 Suppl:54.

**Jakobs M**, Krenn V, Häupl T, Guenther R. Aktivierte Fibroblasten im Riesenzelltumor und der Rheumatoiden Arthritis: Tumorähnliche Mechanismen der Gewebeerstörung in einer chronischen Entzündung. DKOU-Kongress 2009. eAbstract.

**Jakobs M**, Guenther R, Morawietz L, Häupl T, Kriegsmann J, Krukemeyer MG, Krenn V. Immunohistochemical validation of array-data of rheumatoid high-grade synovitis and giant cell tumor of bone versus normal donor synovium. DGRh-Kongress 2007. Z Rheumatol 2007;66 Suppl:97.

**Jakobs M**, Morawietz L, Häupl T, Krukemeyer MG, Krenn V, Guenther R. Fibroblast Activation Protein: Tumor-like Tissue destruction in rheumatoid arthritis – an immunohistochemical validation of array-data. NGFN-Meeting 2007. 2007;Suppl:138.



#### 7.4 Erklärung

Ich, Martin Jakobs, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Immunhistochemische Validierung von Mikroarray-Daten aus dem Vergleich der Genexpressionsprofile des Riesenzelltumors und der Rheumatoiden Arthritis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Heidelberg, 13.07.2011

M. Jakobs

---

## 7.5 Danksagung

Ich danke zu allererst Herrn Prof. Dr. med. V. Krenn für das Möglichmachen dieser Dissertation und die dauerhafte Unterstützung und Betreuung.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Kriegsmann, der mir die Kooperation zwischen dem pathologischen Institut in Trier für diese Promotion ermöglicht hat.

Mein Dank gilt in besonderer Weise Frau Dr. rer. nat. R. Fritsche (geborene Guenther), die mich während des Aufenthalts in Berlin betreut hat und auch in der Zeit danach bei Fragen immer zur Verfügung stand.

Des Weiteren habe ich in Berlin Unterstützung von Herrn PD Dr. med. L. Morawietz vom Pathologischen Institut der Charité (nun Stuttgart) und von Herrn PD Dr. med. T. Häupl von der Klinik für Rheumatologie der Charité genossen, wofür ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Besonders herzlicher Dank geht an Frau G. Fernahl, die mich als MTA in Berlin betreut, unterwiesen und technisch unterstützt hat.

Diese Arbeit entstand mit freundlicher Unterstützung durch den SFB 421 (Protektive und pathologische Folgen der Antigenverarbeitung, Teilprojekt Z3) und durch das Nationale Genomforschungsnetz (NGFN, SIPAGE, Teilprojekt 30).

