

Aus dem Charité Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt

Rheumatologie und Klinische Immunologie (CCM)

Direktor: Prof. Dr. med. Gerd-Rüdiger Burmester

## **Habilitationsschrift**

**MICROARRAYS ZUR ERFORSCHUNG**

**RHEUMATISCHER ERKRANKUNGEN:**

**VOM EINZELMARKER ZUR SYSTEMBIOLOGISCHEN**

**BETRACHTUNG**

zur Erlangung der Lehrfähigkeit

für das Fach

**EXPERIMENTELLE MEDIZIN**

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Herrn Dr. med. Thomas Häupl**

geboren am 31.3.1964 in Neustadt an der Waldnaab

eingereicht am: .....23.10.2008.....

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter:...Prof. Dr. med. Steffen Gay.....

2. Gutachter:...Prof. Dr. med. Thomas Pap.....

# Index

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Charakterisierung und Quantifizierung der Entzündung bei rheumatischen Erkrankungen mit histopathologischen Methoden</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Verwendung der Microarray Technologie und Entwicklung von Strategien zur Interpretation der Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
3.1	Untersuchung von komplexem Entzündungsgewebe unter Beschränkung auf Gene einer definierten Funktionsgruppe .....	14
3.2	Transkriptomanalyse von aufgereinigten Synovialfibroblasten und Untersuchung pharmakologischer Einflüsse .....	25
3.3	Untersuchung von krankheitsspezifischen Stimulationseffekten auf Knorpelgewebe .....	39
3.4	Verwendung von Referenzsignaturen zur Untersuchung der krankheitsspezifischen Expressionsänderung im Blut .....	56
3.5	Validierung des methodischen Vorgehens durch den Vergleich mit klinischen Parametern der Krankheitsaktivität .....	69
3.6	Analyse funktioneller Profilkomponenten zur Differenzierung zwischen Änderungen der zellulären Zusammensetzung und tatsächlicher Genaktivierung....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>105</b>
4.1	Ausgangssituation.....	105
4.2	Anforderungen an die Interpretation von Genexpressionsprofilen .....	106
4.3	Interpretationslücken beim Vergleich von entzündetem und normalem Gewebe....	107
4.4	Erkenntnisse aus der Untersuchung von definierten Zelltypen für die Entwicklung neuer Strategien zur Auswertung von Genexpressionsprofilen .....	108
4.5	Stimulationssignaturen als Referenzprofile für die Erkennung molekularer Pathomechanismen .....	109
4.6	Zelltypspezifische Referenzsignaturen als Grundlage für die Erkennung der zellulären Zusammensetzung einer Probe .....	109
4.7	Systembiologische Betrachtungen durch die Erkennung funktioneller Profilkomponenten .....	111
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>125</b>

# 1 Einleitung

---

Die Microarray-Technologie hat bei fast allen bekannten Erkrankungen einen zentralen Platz auf der möglichst umfassenden Suche nach Biomarkern oder relevanten therapeutischen Zielstrukturen eingenommen. Mit Anwendungsmöglichkeit für verschiedenste Molekülararten (RNA, DNA, Proteine, Antikörper, ...) [1-6] ist die Suche und Quantifizierung spezifischer RNA oder DNA-Sequenzen zum Zweck der Genotypisierung [7, 8] oder der Genexpressionsanalyse [9, 10] die derzeit am weitesten verbreitete Technik.

Die Genotypisierung ist zur Zeit die am stärksten verfolgte Analysetechnik. Dies ist zurückzuführen auf die relativ klare Aussage (das genetische Merkmal ist bei einem Individuum vorhanden oder nicht vorhanden) und das Potential, eine genetisch bedingte Ursache für einen pathobiologischen Sachverhalt zu liefern. Dennoch kann die Identifizierung eines genetischen Risikos keine Aussage über den aktuellen Zustand einer Erkrankung liefern. Für diese Fragestellung nimmt die Genexpressionsanalyse mittels Array-Technologie wohl den wichtigsten Platz ein. Sie ermöglicht genomweit die Aktivierung von Genen zu untersuchen und den zum Zeitpunkt der Untersuchung herrschenden pathobiologischen Zustand möglichst umfassend molekular zu beschreiben.

Besondere Attraktivität gewinnt diese Untersuchungstechnik für Krankheitsgebiete, in denen bislang trotz intensiver jahrzehntelanger gezielter Forschung keine schlüssige pathophysiologische oder ätiologische Erklärung für das Krankheitsgeschehen geliefert werden konnte. Hierzu gehört insbesondere auch die Rheumatologie [11] mit einer Vielzahl von chronischen Entzündungszuständen, die in den meisten Fällen ätiologisch ungeklärt sind. Aufgrund verschiedenster Autoimmunphänomene werden sie als autoaggressive Erkrankungen relativ einheitlich mit entzündungshemmenden und zytotoxischen Substanzen behandelt [12-14].

Mit der zunehmenden Einführung von Biologika im Verlauf der letzten 10-15 Jahre hat in der Rheumatologie eine neue Ära der Behandlung eingesetzt [15, 16]. Entzündungsvermittler wie der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) oder verschiedene Interleukine (IL-1, IL-6) sind zur Zielstruktur von spezifisch hemmenden Antikörpern geworden. Diese Antikörpertherapien haben zum Teil erstaunliche Potenz in der Unterdrückung ausufernder und zerstörerischer Entzündungen gezeigt.

Jedoch darf nicht missachtet werden, dass viele dieser Therapieprinzipien derzeit nicht gezielt für ein Krankheitsbild in Folge einer umfassenden, d.h. genomweiten Analyse mittels Array-Technologie ausgewählt wurden. Vielmehr wurden aufgrund der schon vor der Zeit der Array-Technologie erforschten Schlüssel-moleküle entzündlicher und spezifischer immunologischer Prozesse diese neuen Entzündungshemmer in Form blockierender

Antikörper entwickelt. Diese müssen erst in klinischen Studien bei verschiedenen Erkrankungen getestet werden. Selbst danach muss in jedem Einzelfall ein Therapieerfolg klinisch geprüft werden. Bei anti-TNF Therapie wird z.B. in ca. 30%-60% der Fälle je nach Besserungsrate ein unzureichendes Ansprechen auf die Therapie beobachtet [17].

Biologika sind zwar selektiv auf ein bestimmtes Molekül ausgerichtet, die Hemmwirkung kann jedoch sehr unspezifisch sein. Dies trifft z.B. für Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD20 auf B-Zellen zu, die durch B-Zell-Depletion den Nachschub an neu nachreifenden Plasmazellen inhibieren und damit auch ein Risiko für Infektionen darstellen [18]. Gleiches gilt bei der Hemmung von zentralen Entzündungsvermittlern wie TNF, der ebenfalls für Infektabwehr aber auch Tumorabwehr ein wichtiger und vielseitiger Botenstoff ist [19, 20].

Dass diese genannten Prinzipien der modernen Immunsuppression nur bei einem Teil der Patienten mit rheumatoider Arthritis erfolgreich sind, bei anderen wegen Therapieversagen wieder abgesetzt werden müssen [17], zeigt ebenfalls den noch „experimentellen“ Charakter der Anwendung und hat ein intensives Bemühen um die Entwicklung von Biomarkern für die Vorhersage des Therapieerfolgs entfacht [21-24]. Es stellt sich aber auch die Frage, ob die Hemmung solcher grundlegenden Abwehrprozesse eine langfristige Lösung für Rheumapatienten darstellt. Genomweite systembiologische Betrachtungen und der Vergleich mit anderen Erkrankungen, die Entzündungen durch virale oder bakterielle Infekte ausbilden, kann ein differenzierteres pathophysiologisches Verständnis aufbauen und darüber zu verbesserten Therapien führen.

Mit dem Ziel, die Komplexität der Entzündung zu erkennen und Array-Technologie sowie Grundlagen für bioinformatische Strategien der Interpretation aufzubauen, wurden unter anderem nachfolgend dargestellte Untersuchungen durchgeführt. Sie gehen schrittweise von der Quantifizierung der Entzündung mittels konventioneller Techniken aus und zeigen Methoden zur Entwicklung von verschiedenen zell- und entzündungsspezifischen sowie therapeutischen Signaturen auf. Schließlich werden mit einem neuen Ansatz der bioinformatischen Analyse funktionelle Aspekte der Entzündung auf molekularer Ebene quantifiziert und zelluläre Mischeffekte aufgedeckt. Mit Hilfe der sogenannten funktionellen Profilkomponentenanalyse kann in Zukunft auch bei klinischen Proben wie Blut oder Entzündungsgewebe, die aus Zellmischungen bestehen, eine quantitative Abschätzung dominanter molekularer Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen durchgeführt werden.

## **2 Charakterisierung und Quantifizierung der Entzündung bei rheumatischen Erkrankungen mit histopathologischen Methoden**

---

Chronische systemische Entzündungen spiegeln sich in bestimmten Laborparametern bei der Untersuchung von Blut wider. Dazu gehören z.B. das C-reaktive Protein (CrP) und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, zwei unspezifische Entzündungsmarker, die eine Grundsäule darstellen für die Beurteilung der Entzündung in der Rheumatologie. Diese Marker sind jedoch nur ein Spiegel der Entzündung und werden selbst nicht als Entzündungsmediatoren verstanden. Sie werden über die eigentlichen Entzündungsprozesse an einem bestimmten Ort im Körper induziert und sind vor allem Teil einer Veränderung im Kompartiment Blut, das eine systemische Ausbreitungen bis hin zur Sepsis verhindern soll. Bei der rheumatoiden Arthritis ist der Hauptentzündungsort das Gelenk. Typische molekulare Prozesse der krankheitsspezifischen Entzündung und Gelenkzerstörung sind deshalb am besten im Synovialgewebe des Gelenks, dem Ort der stärksten Entzündung zu finden.

Die konventionelle histopathologische Untersuchung dieses Gewebes zeigt die Komplexität der Entzündungsprozesse auf. Diese muss bei der Untersuchung mittels Microarrays berücksichtigt werden. Die verschiedenen histologisch erkennbaren Prozesse sollten zumindest teilweise aus den Ergebnissen der Microarrayanalyse ableitbar sein. In der nachfolgenden Arbeit wurde ein histopathologisches Bewertungssystem aufgebaut, das qualitativ und quantitativ diese Prozesse und ihre Änderungen anzeigt. Es ist angelehnt an allgemein etablierte Methoden der histologischen Beurteilung wie sie insbesondere auch bei der Beurteilung von Tumorgewebe verwendet werden.

Funktionelle Veränderungen wie i) die Einwanderung von Entzündungszellen, ii) eine Verdickung der Deckzellschicht, die über den direkten Kontakt zur Knorpeloberfläche an der Zerstörung des Gelenks wesentlich beteiligt ist, und iii) die morphologischen Änderungen der Bindegewebszellen als Ausdruck ihrer Aktivierung werden zu einem Bewertungssystem und zu einer Graduierung der Entzündung und Destruktion zusammengefasst. Im Vergleich zu Normalgewebe und degenerativen Gelenkerkrankungen zeigen die rheumatischen Arthritiden bei allen drei Qualitäten eine deutlich stärkere Ausprägung und werden als hochgradige Synovitiden eingestuft.

# Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis

V Krenn, L Morawietz,<sup>1</sup> G-R Burmester,<sup>2</sup> R W Kinne,<sup>3</sup> U Mueller-Ladner,<sup>4</sup> B Muller<sup>5</sup> & T Haupl<sup>2</sup>  
Institute for Pathology, Trier,<sup>1</sup>Institute for Pathology and <sup>2</sup>Department for Rheumatology, Charité University Hospital, Berlin, <sup>3</sup>Experimental Rheumatology, University Jena, Jena, <sup>4</sup>Hospital for Internal Medicine III, Justus-Liebig-University, Giessen and <sup>5</sup>Institute for Immunology, University Rostock, Rostock, Germany

Date of submission 7 October 2005  
Accepted for publication 22 January 2006

Krenn V, Morawietz L, Burmester G-R, Kinne R W, Mueller-Ladner U, Muller B & Haupl T  
(2006) *Histopathology* 49, 358–364

## Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis

**Aims:** To standardize the histopathological assessment of synovial membrane specimens in order to contribute to the diagnostics of rheumatic and non-rheumatic joint diseases.

**Methods and results:** Three features of chronic synovitis (enlargement of lining cell layer, cellular density of synovial stroma, leukocytic infiltrate) were semiquantitatively evaluated (from 0, absent to 3, strong) and each feature was graded separately. The sum provided the synovitis score, which was interpreted as follows: 0–1, no synovitis; 2–4, low-grade synovitis; 5–9, high-grade synovitis. Five hundred and fifty-nine synovectomy specimens were graded by two independent observers. Clinical diagnoses were osteoarthritis ( $n = 212$ ), post-traumatic arthritis ( $n = 21$ ), rheumatoid arthritis ( $n = 246$ ), psoriatic arthritis ( $n = 22$ ), react-

ive arthritis ( $n = 9$ ), as well as controls ( $n = 49$ ) from autopsies of patients without joint damage. Median synovitis scores when correlated with clinical diagnoses were: controls 1.0, osteoarthritis 2.0, post-traumatic arthritis 2.0, psoriatic arthritis 3.5, reactive arthritis 5.0 and rheumatoid arthritis 5.0. The scores differed significantly between most disease groups, especially between degenerative and rheumatic diseases. A high-grade synovitis was strongly associated with rheumatic joint diseases ( $P < 0.001$ , sensitivity 61.7%, specificity 96.1%). The correlation between the two observers was high ( $r = 0.941$ ).

**Conclusion:** The proposed synovitis score is based on well-defined, reproducible histopathological criteria and may contribute to diagnosis in rheumatic and non-rheumatic joint diseases.

**Keywords:** grading, histopathology, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, synovitis

**Abbreviations:** OA, osteoarthritis; PsA, psoriatic arthritis; PtA, post-traumatic arthritis; RA, rheumatoid arthritis; ReA, reactive arthritis

## Introduction

Only a few diseases manifest themselves in the synovial membrane, the majority being different forms of synovitis in the context of degenerative, metabolic or inflammatory/autoimmune diseases. The histopathological picture of synovitis shows a variety of forms, some with clearly defined, disease-specific features and others with uncharacteristic findings.<sup>1–3</sup>

In recent years, histopathological scores for the evaluation of synovitis have been developed with the following aims: (i) to contribute to standardized histopathological diagnosis,<sup>4,5</sup> (ii) to objectify the effects of drug treatment in rheumatoid arthritis (RA),<sup>6,7</sup> (iii) to identify subtypes of RA<sup>8</sup> and (iv) to correlate the degree of severity of arthritis with synovitis by the quantification of the inflammatory infiltrate in synovial biopsy specimens.<sup>8–12</sup> Most of the grading systems cited above are used for the characterization of RA, so the histopathological criteria include RA-characteristic alterations, such as palisading or ulceration of the lining cell layer and rheumatoid granulomas. As the main focus of these systems is on the early diagnosis

V.K. and L.M. contributed equally to this work.  
Address for correspondence: Prof. Dr med. Veit Krenn, Institute for Pathology, Moltkestrasse 32, D-54292 Trier, Germany.  
e-mail: krenn@patho-trier.de

of the initial inflammation in rheumatoid diseases, the typical synovitis biopsy specimens obtained by arthroscopy have been used as research material.

The purpose of the present study, on the other hand, was to draw up a histopathological synovitis score that is a semiquantitative transcription of the entire spectrum of rheumatic and degenerative diseases and that is related to cellular and quantifiable changes in the synovial membrane. This score should also be applicable to long-term synovitis and provide a basis for the assessment of synovectomy specimens. Synovectomy specimens obtained, for example, during therapeutic synovectomies and total joint replacement operations are frequently sent to the pathologist for histopathological diagnosis. The diagnosis of joint diseases is not only the rheumatologist's but also the orthopaedic surgeon's task. Although both evaluate rheumatic diseases clinically according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria, synovectomy specimens and synovial biopsy specimens are sent to the pathologist. The orthopaedic surgeon frequently asks if a rheumatic disease, especially RA, can be diagnosed or excluded. A systematic evaluation of routinely surgically removed synovectomy specimens is lacking.

Furthermore, synovial tissue samples are used in experimental rheumatology, e.g. for the generation of gene expression profiles. A standardized histopathological evaluation of these samples according to a synovitis score could serve as a basis for further experimental use and could enhance the comparison of different specimens.

Synovial tissue can principally be divided into resident cell populations (fibrocytes, fibroblasts, endothelial cells, macrophages), non-resident cell populations (lymphocytes and plasma cells) and the lining cell layer. The latter can easily be identified by histopathology.<sup>13</sup> The immunological basis for the inflammatory infiltrate differs between degenerative and rheumatic diseases, and so does the histopathological picture.<sup>14,15</sup> These three compartments of synovial tissue show variable changes depending on the disease and are easily analysable. Therefore we propose to evaluate the enlargement of the synovial lining cell layer, the cellular density of the synovial stroma and the density of the inflammatory infiltrate in order to generate a synovitis score.

## Materials and methods

### PATIENTS

Synovectomy samples from 559 patients (14–88 years old, mean 61.6 years, SD 14.8 years; female  $n = 347$ ,

62.1%; male  $n = 212$ , 37.9%) were analysed. Clinical diagnoses were based on defined criteria. Osteoarthritis (OA) was classified according to Altman *et al.*,<sup>16</sup> RA according to ACR criteria<sup>17</sup> and psoriatic arthritis (PsA) according to Moll und Wright.<sup>18</sup> Reactive arthritis (ReA) was diagnosed on the grounds of a urogenital or gastrointestinal infection confirmed up to 6 months before clinical and radiological symptoms of arthritis occurred.<sup>19</sup> Samples from patients with a history of joint injury such as lesions of the meniscus or ligaments were classified as post-traumatic arthritis (PtA). The numbers of samples analysed in each

**Table 1.** Scheme for the histopathological assessment of the three features of chronic synovitis

Enlargement of the synovial lining cell layer	
0 points	The lining cells form one layer
1 point	The lining cells form 2–3 layers
2 points	The lining cells form 4–5 layers, few multinucleated cells might occur
3 points	The lining cells form more than 5 layers, the lining might be ulcerated and multinucleated cells might occur
Density of the resident cells	
0 points	The synovial stroma shows normal cellularity
1 point	The cellularity is slightly increased
2 points	The cellularity is moderately increased, multinucleated cells might occur
3 points	The cellularity is greatly increased, multinucleated giant cells, pannus formation and rheumatoid granulomas might occur
Inflammatory infiltrate	
0 points	No inflammatory infiltrate
1 point	Few mostly perivascular situated lymphocytes or plasma cells
2 point	Numerous lymphocytes or plasma cells, sometimes forming follicle-like aggregates
3 points	Dense band-like inflammatory infiltrate or numerous large follicle-like aggregates
Sum 0 or 1	No synovitis
Sum 2–4	Low-grade synovitis
Sum 5–9	High-grade synovitis

category were as follows: OA  $n = 212$ , PtA  $n = 21$ , RA  $n = 246$ , PsA  $n = 22$  and ReA  $n = 9$ . Analysis was carried out on 49 control samples (Co) obtained at autopsy of patients with normal joints. Biopsies from at least two ( $n = 112$ ) or up to five ( $n = 23$ ) separate areas of the same joint were available. Informed consent for the use of tissue samples in this study was given in all cases.

#### STATISTICAL EVALUATION

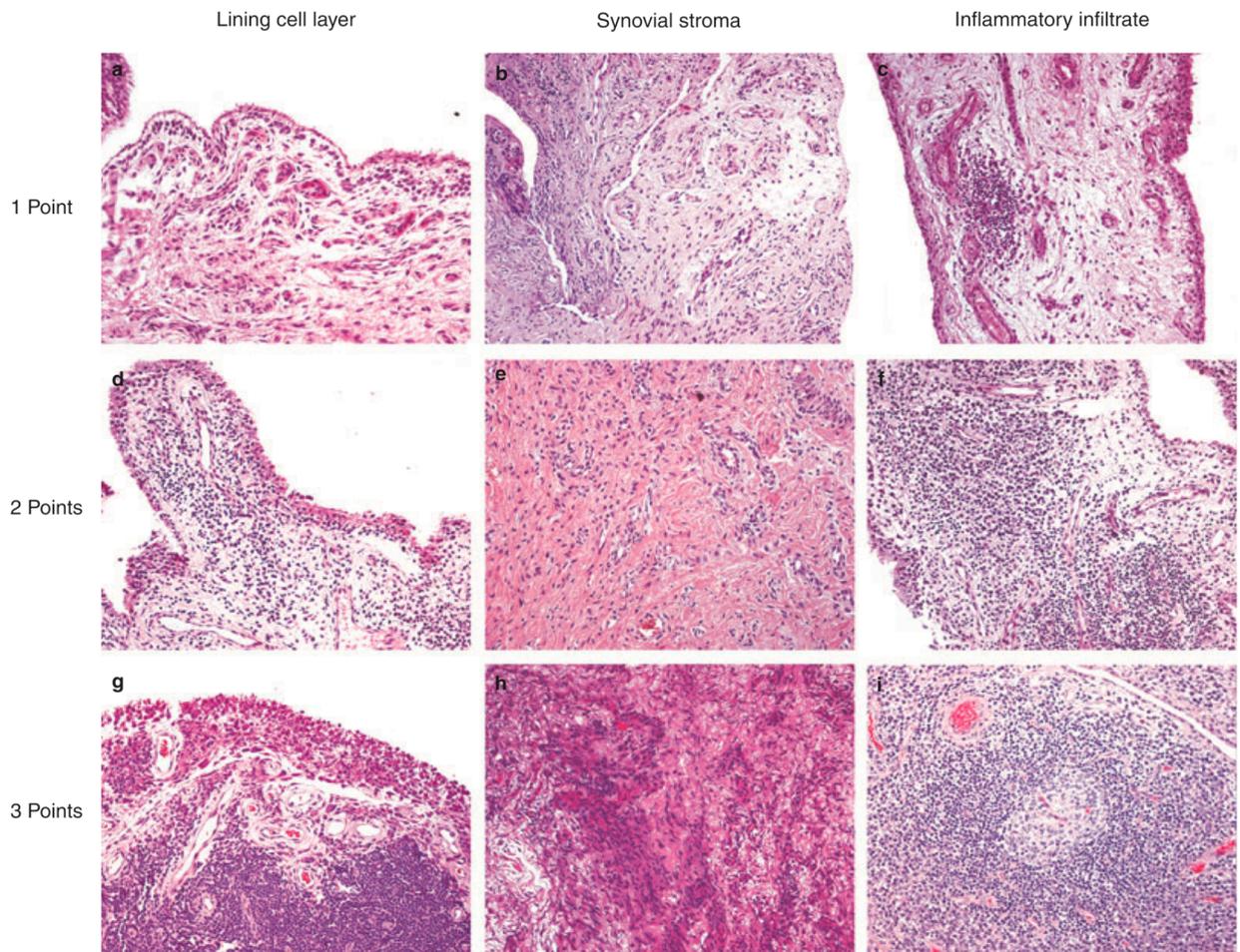
The values of this score are on an ordinal scale of measurement. Frequencies and median values were chosen for descriptive statistics and Pearson's correlation coefficient was used to investigate the correlation between the grading results of the two observers. The Mann-Whitney test was used to answer the question as to whether the scores differed in terms of diagnoses.

The sensitivity of the synovitis score for the diagnosis of an inflammatory joint disease was calculated as the ratio of correctly identified patients with a rheumatic disease (synovitis score at  $\geq 5$ ) to all of these patients. The specificity was assessed as the quotient of correctly allocated patients with non-rheumatic diseases (score  $< 5$ ) to all of these patients.

With regard to the scores for different samples from the same patient, Spearman's  $\rho$  was used to calculate the correlation coefficient.

#### HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SYNOVITIS SCORE

The grading of the synovial membranes was carried out on routine haematoxylin and eosin (H&E)-stained slides, according to the three synovial membrane features (synovial lining cell layer, stroma cell density, inflammatory infiltrate).



**Figure 1.** Examples of the histomorphological aspects of the enlarged lining cell layer (left column, a,d,g), the cellular density of the synovial stroma (centre column, b,e,h) and the inflammatory infiltrate (right column, c,f,i), gradually increasing from top to bottom (H&E).