

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Reaktion primärer humaner Endothelzellkulturen unter  
Einfluss von Antigenen der Rheumatoiden Arthritis**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Hans-Christian Lux  
aus Wolfsburg

Meinen lieben Eltern

Gutachter/in:           1. Dr. sc. med. Dr. rer. nat. K. Egerer  
                                  2. Prof. Dr. med. Th. Dörner  
                                  3. Prof. Dr. med. G. Keyßer

Datum der Promotion:   20. November 2009

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
1.1. Die Rheumatoide Arthritis	8
1.2. Das Endothel - Grenzfläche des Körpers	9
1.3. Adhäsionsmoleküle	11
1.3.1. Leukozytendiapedese	13
1.3.2. E-Selektin bei RA und SLE	14
1.3.3. ICAM-1 bei RA und SLE	14
1.3.4. VCAM-1 bei RA und SLE	14
1.4. Mögliche Autoantigene der RA	15
<b>2. PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
3.1. Material	20
3.1.1. Zellkultur	20
3.1.2. Antigene	21
3.2. Methoden	22
3.2.1. Stimulation	22
3.2.2. ELISA	23
3.2.2.1. ELISA zur Bestimmung von Adhäsionsmolekülen im Zellüberstand	23
3.2.2.2. ELISA zur Bestimmung von Interleukin-6 und -10 im Zellüberstand	24
3.2.3. Gelelektrophorese und Immunumsetzung zur Bestimmung von Adhäsionsmolekülen im Zellysat	25
3.2.4. Proliferationstest	26
3.2.5. Immunhistochemische Anfärbung der Endothelzellkulturen mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)	26
3.3. Statistik	27

---

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>28</b>
<b>4.2.</b>	<b>Untersuchungen der Zellüberstände</b>	<b>29</b>
<b>4.2.1.</b>	<b>Kinetik der Adhäsionsmolekül- und Interleukinexpression</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2.</b>	<b>Vergleich der Adhäsionsmolekülkonzentrationen im Überstand</b>	<b>47</b>
<b>4.2.3.</b>	<b>Vergleich der Interleukinkonzentrationen im Überstand</b>	<b>51</b>
<b>4.3.</b>	<b>Adhäsionsmolekülnachweis im Western Blot</b>	<b>54</b>
<b>4.4.</b>	<b>Proliferationsverhalten humaner mikrovaskulärer Endothelzellkulturen unter Antigeneinfluss</b>	<b>55</b>
<b>4.5.</b>	<b>Immunhistochemische Anfärbung von fixierten Endothelzellkulturen mittels Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)</b>	<b>55</b>
<b>4.6.</b>	<b>Schematische Darstellung der tendenziellen Reaktionen des Endothels</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.</b>	<b><i>In-vitro</i>-Versuche an primären Endothelzellkulturen</b>	<b>60</b>
<b>5.2.</b>	<b>Reaktionen des Endothels in Abhängigkeit der einzelnen Antigene</b>	<b>63</b>
<b>5.3.</b>	<b>Ausblick – Endothelzellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>79</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACR	American College of Rheumatology
AKA	anti-Keratin Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
BiP	Heavy chain binding Protein
CCP	zyklisch citrullinierte Peptide
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DM	Dermatomyositis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym Linked Immunosorbend Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR	Erythrozyte Sedimantation Rate
FCS	fetal calv serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GlyCAM	glycosyliertes Cell Adhesion molecule
HA	hyaluronic acid
HAEC	humane aortale Endothelzellen
HAQ	health assessment questionnaire
HEV	high endothelial venules
HMVEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM-1 bis 5	intercellular cell adhesion molecule 1-5 (lösliche Form: sICAM-1)
Ig (-G, -M, -A)	Immunglobulin (-G, -M, -A)
IL	Interleukine
LFA-1	leukocyte function antigen-1
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	membran attack complex - 1
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule 1
MCTD	mixed Connective Tissue Disease

PBMC	polymorphkernige Monozyten
PBS	phosphate buffered Saline
PBST	PBS Pufferlösung mit Tween 20
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (= P-Selektin)
PM	Polymyositis
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (lösliche Form: sVCAM-1)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late activation (antigens)
WBC	white bloodcell count

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Rheumatoide Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, entzündliche Systemerkrankung unbekannter Ursache, die mit einer schmerzhaften und funktionsbeeinträchtigenden Störung des Stütz- und Bewegungssystems verbunden ist <sup>1</sup>. Sie führt innerhalb von 20 Jahren in 80% der Fälle zu einer schweren Behinderung der Patienten und ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung des Menschen <sup>2</sup>. Die höchste Inzidenz liegt im zweiten und vierten Lebensjahrzehnt, Frauen sind zwei- bis dreimal so häufig betroffen wie Männer <sup>2,3</sup>. Der Verlauf der Krankheit ist schubweise progredient mit gelegentlichen Remissionen. Zunächst sind kleine Gelenke, mit Ausnahme der distalen Interphalangealgelenke, in symmetrischer Verteilung betroffen. Erst mit fortschreitendem Krankheitsverlauf sind größere Gelenke betroffen, die mit destruktiven Veränderungen wie Mutilationen und Ankylosen einhergehen können. Der systemische Charakter der RA kann sich durch Rheumaknoten, Perikarditiden, Pleuritiden, intrapulmonale Rheumaknoten und das Felty Syndrom mit rezidivierenden Infekten durch grampositive Stäbchen und Kokken äußern <sup>1</sup>.

Der häufig schleichende Beginn gestaltet die Diagnosestellung besonders problematisch. Seit 1987 werden zur Klassifikation der RA die sieben Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) herangezogen <sup>4</sup>. Werden vier Kriterien davon erfüllt, muss von einer RA ausgegangen werden. Kritisch anzumerken ist, dass es sich um klinische, relativ unspezifische Symptome handelt, die auch auf andere polyarthritische Erkrankungen oder metabolische Prozesse hindeuten könnten. Gleichzeitig hat eine frühe Diagnosestellung positiven Einfluss auf die Therapie und Verlaufsprognose der RA <sup>5</sup>. Als einziger serologischer Parameter der ACR-Kriterien kommt der Nachweis von Rheumafaktor IgM zur Anwendung, der mit einer Spezifität von 70-80% nicht zur sicheren Diagnosestellung ausreicht, da auch einige andere akute oder chronisch entzündliche Erkrankungen, sowie circa 5% in der gesunden Bevölkerung einen positiven Rheumafaktor aufweisen <sup>6</sup>. Zunehmende Relevanz in der serologischen Diagnostik erlangen Autoantikörper der RA gegen citrullinierte Antigene, die seit 2006 von der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie zur Diagnose einer frühen RA empfohlen werden <sup>7</sup>.

### **Pathologie und Pathophysiologie**

Histologisch kommt es bei der RA zu einer destruierend-proliferativen Entzündung der Synovialmembran mit einer erosiven Zerstörung des sich darunter befindlichen

Gelenkknorpels und des Gelenkkopfes. Es bildet sich eine stark verbreiterte Synovialmembran, in die lymphoide Zellen diffus infiltrieren, so dass sich lymphfollikelähnliche Aggregate ausbilden (Abb. 1). Veränderungen am Endothel führen zu einer intensiven Vaskularisation der Synovialmembran. Neben der Verbreiterung der synovialen mehrzelligen Deckzellschicht, entsteht eine erhebliche Zunahme der normalerweise nur gering vorhandenen Synovialflüssigkeit, deren Viskosität abnimmt. In der entzündlich veränderten Synovialflüssigkeit sind Granulozyten (80%) und andere mononukleäre Zellelemente (20%) zu finden sind <sup>8,9</sup>. Die proliferierende Synovialmembran bildet zusammen mit dem Granulationsgewebe den sogenannten Pannus, der den Gelenkknorpel erodiert und in die Tiefe des Knochens vordringen kann. Dort steigt die Osteoklastenaktivität, der Knochen wird porös, und es erscheinen juxta-artikuläre Erosionen, Usuren und subchondrale Zysten. Bei fortschreitendem Krankheitsverlauf kann der Pannus in den Gelenkspalt hineinwachsen und ihn zuerst bindegewebig, später aber auch verknöchernd überbrücken (Ankylose).

Die genaue Ätiologie ist bis heute nicht geklärt. Es können sowohl genetische Faktoren, als auch infektiöse Agentien mikrobieller Herkunft oder autoimmune Regulationsstörungen bei der Entstehung der RA eine Rolle spielen. Entscheidend für die Ausbildung lymphfollikelartiger Strukturen im Bereich der Synovialmembran ist, neben der intensiven Vaskularisation, vor allem die Leukozytenmigration aus dem Blut in das betroffene Gewebe. Das Endothel nimmt dabei eine zentrale Stellung ein.

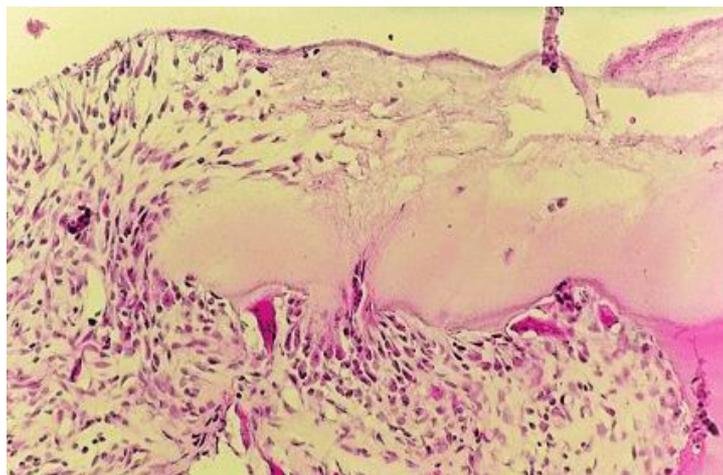


Abb. 1.: *Leukozyteneinwanderung im Gelenkknorpel eines befallenen Gelenkes bei Rheumatoider Arthritis (zur Verfügung gestellt von Dr. F. Schumann)*

## 1.2. Das Endothel - Grenzfläche des Körpers

Als Endothel bezeichnet man die Gesamtheit der Zellen, die die innere Auskleidung aller Gefäße und serösen Höhlen bilden. Im Kapillarbereich liegen die Endothelzellen direkt auf

der Basalmembran. Insgesamt hat das Endothel des menschlichen Körpers eine Masse von 1 bis 1,5 kg, bei einer Oberfläche von ca. 700-1000 m<sup>2</sup> <sup>10</sup>. Es bildet die Grenzschicht zwischen Blut und interstitiellem Raum und übt eine Vielzahl von Funktionen aus, die für die Kontrolle der Hämostase, für den Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalem Raum, sowie für den Ablauf akuter und chronischer Entzündungsreaktionen und verschiedener immunologischer Prozesse von Bedeutung sind <sup>11</sup>. Neben seinen physiologischen Eigenschaften ist das Endothel in pathologische Vorgänge involviert. Zum Beispiel nimmt VEGF (Vascular endothelial growth factor) Einfluss auf die Rezeptoren der Endothelzellen <sup>12</sup>. Damit ist es ein limitierender Faktor in normaler, sowie in pathophysiologischer Angiogenese. Ein weiteres Beispiel sind die Funktionstörungen des Endothels bei artherosklerotischen Prozessen, die zum Verlust der Fähigkeit zur Vasodilatation und Thrombolysen, bei gleichzeitig vasokonstriktorischer und prothrombotischer Disregulation führen. Dadurch steigt das Risiko artherosklerotischer Prozesse mit Bildung einer instabilen Plaque <sup>13</sup>.

### **Reaktionen des Endothels bei Entzündung**

Die Leukozytenmigration aus dem Blut ins Gewebe ist eine wichtige Funktion zur immunologischen Überwachung des Körpers und bei Entzündungen im Gewebe <sup>14</sup>. Am Endothel kommt es dabei zu einer Reaktion in drei Schritten <sup>15</sup>.

*1. Die Erhöhung der Blutversorgung des betroffenen Gebietes:* Bei Verletzung eines Gefäßes kommt es zu einer initialen Vasokonstriktion, auf die unmittelbar eine Dilatation folgt. Diese Sofortreaktion wird durch eine Vielzahl von Zytokinen gesteuert. Das Endothel nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein und bildet Leukotriene und Vasodilatoren, wie Prostazyklin, EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) und Stickstoffmonoxid <sup>16</sup>. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Anstieg der kapillären Permeabilität.

*2. Anstieg der kapillären Permeabilität:* Im Anschluss beginnt eine Abwehrreaktion, bei der Leukozyten, Endothelzellen und andere Zellen Interleukine im betroffenen Gewebe ausschütten. Diese potenten Zytokine haben entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Entzündung. Dabei handelt es sich um ein überaus komplexes Zusammenspiel, bei dem den verschiedenen Zytokinen nur schwer einzelne Funktionen zugeschrieben werden können <sup>15</sup>. Es konnte aber gezeigt werden, dass mehrere Zytokine u.a. IL-1 und TNF- $\alpha$  eine aktivierende Wirkung auf Endothelzellen entfalten, welches den Ablauf einer Entzündungskaskade initiiert <sup>17</sup>.

*3. Leukozytenmigration in das umliegende Gewebe:* Als Folge dieser parakrinen und

autokrinen Entzündungsreaktionen der Endothelzellen kommt es schließlich zur Präsentation von Adhäsionsmolekülen an der luminalen Wand. Die durch die entsprechende Chemotaxis angelockten Leukozyten migrieren nun in das interstitielle Gewebe und können lokal am Entzündungsherd wirken (Abb. 2)

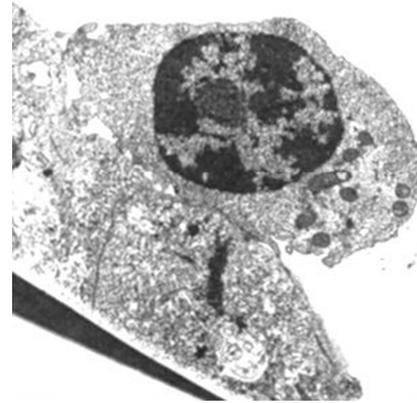


Abb. 2.  
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten, der am Endothel anhaftet<sup>18</sup>.

### 1.3. Adhäsionsmoleküle

Zu den vielseitigen Funktionen von Adhäsionsmolekülen gehören Bindungsvorgänge im Rahmen der Immunabwehr, sowie die Steuerung von Zellmigration und Zellsortierung während der Ontogenese. Außerdem sind sie Kontaktmoleküle beim Aufbau von Gewebeverbänden und von Zwischenzellgerüsten<sup>19,20</sup>.

Man unterscheidet aufgrund ihrer Struktur vier verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen: Cadherine, Integrine, Adhäsionsmoleküle vom Typ der Immunglobulin-Gensuperfamilie und Selektine<sup>21</sup>. Für die Immunabwehr kommt nur den letzten drei Gruppen eine Bedeutung zu<sup>22</sup>

#### **Integrine**

Integrine sind eine Gruppe transmembraner, heterodimerer Glykoproteine, die jeweils aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit bestehen. Sie binden an extrazelluläre Matrixproteine (z.B. Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen und Komplementfaktor C3b) oder Liganden anderer Zellen, insbesondere an Oberflächenmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (ICAM-1-5, VCAM-1 und MadCAM-1)<sup>17</sup>. Werden sie auf Leukozyten exprimiert, haben Integrine wichtige Funktionen im Rahmen vieler Immunreaktionen, wie zytotoxische T-Zellreaktionen, Natural-Killer-Funktionen, CD4-abhängige Reaktionen, Phagozytose antikörperbeladener Antigene und der Extravasation aktivierter Leukozyten<sup>20</sup>. Zu den wichtigsten Integrinen gehören LFA-1, Mac-1 und VLA-4. Im Verlauf der

Leukozytendiapedese haben Integrine vor allem bei der Ausbildung einer festen Adhäsion am Endothel, die Voraussetzung für die Transmigration ist, eine tragende Rolle.

### **Immunglobulin-Gensuperfamilie**

Die Gruppe der Immunglobulin-Gensuperfamilie umfasst eine große Bandbreite strukturell und funktionell verschiedener Proteine. Sie zeigen in ihrer Struktur und ihrer DNA-Sequenz Parallelen zu den Immunglobulinen<sup>23</sup>. Die Proteine dieser Gruppe besitzen verschiedene Funktionen, unter anderem bei der Entwicklung des Nervensystems, wobei sie hier in erster Linie für axonales Wachstum und den Schutz der Integrität sorgen<sup>24</sup>. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen. Bedeutende Vertreter hierbei sind die ICAMs (intercellular adhesions molecules), von denen fünf bekannt sind. Weitere Vertreter sind: VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) und PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1)<sup>25,26</sup>. Diese Proteine sind die endothelseitigen Liganden für die Integrine, wobei die Steuerung der Expression von Entzündungsmediatoren abhängig ist<sup>27,28</sup>.

### **Selektine**

Selektine sind transmembrane Glykoproteine, die in erster Linie vaskuläre Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Zurzeit sind die Moleküle L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin bekannt.

L-Selektin wird auf Lymphozyten und Leukozyten exprimiert und hat vor allem auf die Rezirkulation naiver Lymphozyten Einfluss. Es bindet an verschiedene Liganden der high endothelial venules (HEVs), und kontrolliert zusammen mit dem  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin die gesamte Rezirkulation naiver Lymphozyten<sup>29</sup>.

P-Selektin wurde zuerst an Blutplättchen entdeckt. Es wird aber auch in den Weibel-Palade-Körperchen im Zytoplasma von Endothelzellen gespeichert und kann binnen weniger Minuten exprimiert werden. Die P-Selektin kodierenden Liganden sind Lewis X verwandte sialysierte Kohlenhydratgruppen, sowie L-Selektin und Glykoproteine an neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und Monozyten<sup>30,31</sup>.

E-Selektin wird ausschließlich von aktivierten Endothelzellen exprimiert. Über seine Liganden, das Sialyl Lewis X-Oligosaccharid und andere Glykoproteine vermittelt es Kontakt zu neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Gedächtnis T-Zellen. Außerdem kann es Leukozytenintegrine aktivieren und so die Migration von Zellen in entzündliches Gewebe fördern<sup>20,32,33</sup>.

### 1.3.1. Leukozytendiapedese

Bei der Leukozytenwanderung aus den Blutgefäßen ins Gewebe handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bestehend aus der Kontaktherstellung (Capturing), Rollen am Endothel (Rolling), Anheftung an die Gefäßwand und dem anschließenden Durchwandern (Transmigration) durch die Endothelzellschicht<sup>14,34-36</sup>. Die Zusammensetzung der luminal präsentierten Adhäsionsmoleküle ist von der Art des Stimulus abhängig und bestimmt, welchen Leukozyten der Übertritt ermöglicht wird<sup>14</sup>. So locken Endothelzellen der HEVs in erster Linie Lymphozyten an<sup>14</sup>, während Endothelzellen in traumatisiertem Gewebe ähnliche Zyklen durchlaufen, hierbei aber auch Zellen der unspezifischen Abwehr binden. An den Abläufen sind in jedem Schritt verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt. (Abb. 3) Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Selektine das „Rolling“ bei jeweils bestimmten Fließgeschwindigkeiten begünstigen<sup>37</sup>. Darüber hinaus scheinen aber auch andere Oberflächenmoleküle in dieser Phase beteiligt zu sein<sup>36,38</sup>. Im nächsten Schritt, der festen Adhäsion, sind weiterhin E-Selektin und zunehmend auch ICAM-1 und VCAM-1 beteiligt<sup>39-41</sup>. Durch diese Erhöhung der Leukozytenaffinität kommt es zum Stillstand und zur festen Adhäsion der Leukozyten (Homing). Für die Transmigration spielen ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 eine zentrale Rolle. Zusätzlich zur festen Verbindung zwischen Endothel und Leukozyten werden auf diese Weise outside-in Signale getriggert, die Einfluss auf das Zytoskelett der Endothelzellen nehmen<sup>42-47</sup>.

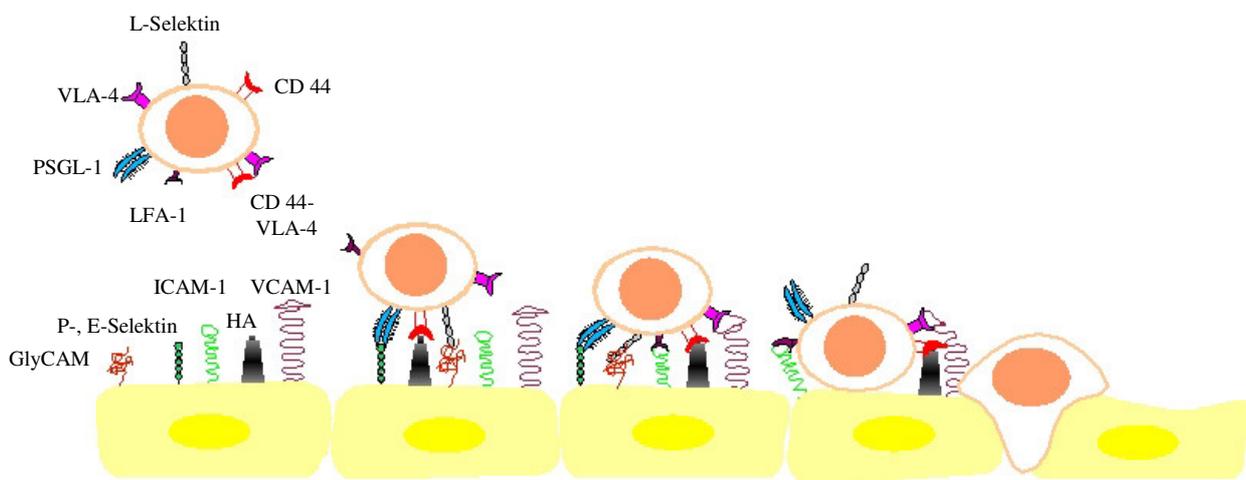


Abb. 3.:

*Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten migrieren in entzündetes Gewebe in Abhängigkeit von der Aktivierung des Endothels. Dabei werden verschiedene Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden exprimiert. Der erste Kontakt, soweit bekannt, wird durch L-Selektin zu GlyCAM und durch CD44 Verknüpfung zu endotheliale HA vermittelt. Im weiteren Verlauf führen Bindungen von E- und P-Selektin zur vorläufigen Anheftung. Auch die Integrine LFA-1 und VLA-4 werden nach und nach aktiviert, die dann die feste Adhäsion durch Bindung zu ICAM-1 und VCAM-1 vermitteln.*

### 1.3.2. E-Selektin bei RA und SLE

Aufgrund der zentralen Rolle bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen kommt dem Endothel bei allen chronisch-entzündlichen Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu. Verschiedene Studien konnten erhöhte Werte an löslichem E-Selektin (sE-Selektin) im Serum bei Patienten mit RA belegen<sup>48-50</sup>. Dabei bestanden signifikante Unterschiede zwischen den sE-Selektin-Konzentrationen bei mild und aggressiv verlaufender RA. Dies könnte interessante Rückschlüsse für die prognostische Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung zulassen. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zum Rheumafaktor beobachtet werden<sup>50</sup>. Weitere Studien konnten einen Zusammenhang zu CRP-Werten, WBC, active joint count, progression of joint destruction und HAQ-score nach fünf Jahren bei juveniler RA herstellen<sup>51,52</sup>.

Verschiedene Arbeiten zeigten einen erhöhten sE-Selektinspiegel bei SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen und zu Patienten mit einer Sepsis<sup>53-56</sup>. Eine Korrelation konnte auch hier zum Schweregrad der Erkrankung festgestellt werden. Weitere Korrelationen bestanden zu erhöhten Werten von löslichem ICAM-1 sowie zum löslichen Endotoxinrezeptor CD14<sup>56</sup>.

### 1.3.3. ICAM-1 bei RA und SLE

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass erhöhte Werte an löslichem ICAM-1 im Serum von RA-Patienten vorkommen<sup>48,57</sup>. Unterschiedliche Serumkonzentrationen von sICAM-1 und anderen Adhäsionsmolekülen legen nahe, dass diese mit verschiedenen histologischen Erscheinungsformen der RA korrelieren. Ferner bestand eine Korrelation zu anderen Markern, wie ESR und CRP<sup>48</sup>. Es konnte jedoch keine prognostische Aussage bezüglich des Krankheitsverlaufes getroffen werden<sup>57</sup>.

Bei Patienten mit SLE wurden in verschiedenen Studien erhöhte Werte von sICAM-1 im Serum nachgewiesen, welche mit einem erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegel einhergingen<sup>56,58</sup>. In Bezug auf die Krankheitsprognose konnte gezeigt werden, dass erhöhte Werte von sICAM-1 in Verbindung mit sE-Selektin und sCD14 mit der Krankheitsprognose korrelieren<sup>56</sup>.

### 1.3.4. VCAM-1 bei RA und SLE

Untersuchungen zu Konzentrationen von löslichem VCAM-1 im Serum von Patienten mit RA zeigten, genauso wie sE-Selektin und sICAM-1, signifikant erhöhte Werte<sup>48</sup>. Die gemessenen Serumkonzentrationen korrelierten dabei mit anderen Parametern zur Messung der Krankheitsaktivität, wie ESR und CRP. Wie bei sICAM-1 scheinen die

unterschiedlich hohen sVCAM-1-Titer in Beziehung mit verschiedenen histologischen Erscheinungsbildern der Gelenkentzündung zu stehen<sup>48</sup>.

In Untersuchungen an Patientenseren von SLE-Patienten konnten erhöhte sVCAM-1 Werte nachgewiesen werden<sup>59</sup>. Besonders hohe Spiegel herrschen bei Patienten mit einer Lupus-Nephritis<sup>55,58</sup>. Die unterschiedlichen Serumkonzentrationen scheinen dabei den Krankheitsverlauf wider zu spiegeln, eine Verminderung konnte zum Beispiel bei der Remission einer Nephritis gezeigt werden<sup>60,61</sup>. Des Weiteren bestand eine Korrelation zwischen sVCAM-1 Spiegeln mit dem Verlauf der Anti-dsDNA-AK-Titer, als auch mit den Werten der Komplementfaktoren C3 und C4<sup>61,62</sup>.

#### **1.4. Mögliche Autoantigene der RA**

Die RA wird als chronisch entzündliche Systemerkrankung und als Autoimmunerkrankung betrachtet. Autoimmunkrankheiten sind Erkrankungen, die ganz oder teilweise auf die Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Zellen und die daraus folgende Schädigung des Gesamtorganismus bzw. seiner Organsysteme zurückzuführen sind. Hierzu gehört die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, wie auch die Aktivierung anderer Zellen, die an entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Das Vorhandensein autoreaktiver T- und B-Zellen ist physiologisch und wird durch einen immunologischen Mechanismus kontrolliert, der Immuntoleranz genannt wird<sup>63-65</sup>.

In verschiedenen Arbeiten wurden Autoantigene der RA beschrieben, die in Bezug auf das Vorliegen der Erkrankung alleine, oder in Kombination eine relativ hohe Sensitivität oder Spezifität für eine Diagnosestellung aufweisen<sup>66</sup>. Weitere Studien konnten zeigen, dass die verwendeten Antigene eine aktivierende Wirkung auf B- und T-Zellen aufweisen<sup>67</sup>.

#### **Heavy chain binding Protein (BiP)**

Eukaryontische Zellen beginnen die Ausschleusung von sekretorischen Proteinen aus der Zelle mit der Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER)<sup>68</sup>. Die meisten interagieren im ER mit BiP, einem dort angesiedelten Protein, das als molekulares Chaperon fungiert<sup>69,70</sup>. Es hat eine molekulare Masse von 78kD. Gleichzeitig wird BiP als ein Stressprotein angesehen, das unter zellulärem Stress vermehrt gebildet wird, und teilweise an der Zelloberfläche und sogar extrazellulär nachgewiesen wurde<sup>71</sup>. Hier kann es dann als Antigen erkannt werden. In der von RA betroffenen Synovia wird BiP im Vergleich zur gesunden Synovia und bei Arthrosen überexprimiert<sup>72</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass BiP die Proliferationsaktivität von T-Zellen aus Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA im Gegensatz zu gesunden Patienten stimuliert<sup>73</sup>.

BiP wurde als starkes T- und B-Zell-Autoantigen mit einer Sensitivität von 66% und einer Spezifität von 99% für die RA beschrieben<sup>72</sup>. Eine andere Arbeitsgruppe fand bei 30% der RA-Patienten Antikörper im Serum gegen BiP mit einer Krankheitsspezifität von 90%<sup>73</sup>. In Synovialflüssigkeiten wurden bei 39% der RA-Patienten durch Immunoblot Antikörper gegen BiP nachgewiesen. 25% der Kontrollgruppen bildeten ebenfalls BiP-spezifische Antikörper aus (75% Spezifität)<sup>66</sup>.

### **Calpastatin**

Calpastatin ist ein natürlicher Inhibitor für Calpaine. Calpaine sind intrazelluläre, Calcium-abhängige Cysteinproteasen, die verschiedenste Substrate umwandeln. Hierzu gehören Proteine des Zytoskeletts, nukleäre Proteine, Zytokine und extrazelluläre Matrixproteine, wie zum Beispiel Proteoglykane<sup>74</sup>. Es konnten erhöhte Werte an extrazellulärem Calpain im entzündeten Synovium beobachtet werden, was bedeuten könnte, dass es von Synovialzellen ausgeschüttet wird und in Ermangelung der Inhibition durch Calpastatin zu einer Schädigung des Knorpels kommt<sup>75,76</sup>. Calpastatin wurde in verschiedenen anderen Geweben in unterschiedlichen Größen und Isoformen nachgewiesen, deren Funktionen bis auf wenige Ausnahmen unbekannt sind<sup>77</sup>.

Nach Aktivierung von Zellen kommt Calpastatin auch extrazellulär vor und ist somit für Antikörper zugänglich<sup>76</sup>. Gegen Calpastatin gerichtete Antikörper wurden unter anderem bei Patienten mit RA, SLE, Polymyositis/Dermatomyositis, Mixed Connective Tissue Disease, aktivierter Arthrose und venöser Thrombose gefunden<sup>78-80</sup>. Da Calpastatin, Calpaine und Calpastatin-spezifische Antikörper insbesondere in entzündeten Gelenken von RA- und Arthrose-Patienten nachgewiesen werden konnten, erscheint eine Reaktion des Endothels auf Calpastatin möglich.

### **Citrulliniertes Fibrinogen**

1964 wurden in Untersuchungen an Mund- und Schleimhautzellen Autoantikörper auf orale Mukosazellen bei Patienten mit RA gefunden, bei denen es sich auch um Antikörper auf citrullinierte Antigene handelt<sup>81</sup>. Einige Jahre später wurden Antikeratin-Antikörper (AKA) in Ösophaguspräparaten beschrieben<sup>82</sup>. Später konnte gezeigt werden, dass es sich bei beiden um Antikörper gegen Fillagrin oder seiner Vorstufe Profillagrin handelt. Das hierbei relevante Epitop ist die posttranslational veränderte Aminosäure Citrullin<sup>83</sup>. In der Diagnostik der RA kommen derzeit synthetisch hergestellte zyklisch citrullinierte Peptide (CCP) zum Einsatz<sup>84</sup>. Dies führte zu einer Verbesserung in der serologischen Diagnostik der RA. Aktuelle ELISA-Kits erreichen eine Sensitivität von 65-70% bei einer Spezifität

von 96-98%, und sind von der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie für die Diagnostik der frühen RA empfohlen <sup>7</sup>.

Als mögliche physiologische Zielantigene wurden citrulliniertes Fibrin und Fibrinogen beschrieben <sup>85</sup>.

### **Fibrinogen**

Fibrinogen besitzt eine Masse von 340kD und ist aus drei globulären Einheiten aufgebaut, die durch stabförmige Elemente miteinander verbunden sind. Durch das proteolytische Enzym Thrombin wird es zu Fibrin umgewandelt und ist somit wichtiger Bestandteil der Blutgerinnung. Fibrin(ogen) liegt in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis vor und zeigte im Vergleich zu Kontrollgruppen einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen <sup>86</sup>.

### **Citrulliniertes BSA**

Als ein weiteres citrulliniertes Protein wurde citrulliniertes bovines Serumalbumin in unsere Untersuchungen einbezogen. Dies ermöglicht einen Vergleich der Reaktionen auf citrulliniertes Fibrinogen mit einem anderen citrullinierten Protein.

### **P3**

Das Peptid P3 ist ein synthetisch hergestelltes Peptid. Es wurde nach der Veröffentlichung der Sequenz des Proteins p205 synthetisiert, welches aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA isoliert wurde <sup>87</sup>. Für dieses Peptid konnte eine sehr hohe T-Zell stimulierende Potenz beschrieben werden <sup>87</sup>. Das Vorkommen von p205 wird von den Autoren als ubiquitär angenommen. Bislang konnte seine physiologische Funktion nicht geklärt werden, es besitzt jedoch eine identische Sequenz zum Fc-Teil der IgG-Antikörper, welcher die Bindungsstelle der Rheumafaktoren darstellt <sup>67</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass (1.) aktivierte, P3-reaktive T-Zellen in entzündlichem Gewebe zu finden sind und in periphere Lymphgefäße migrieren, von wo sie isoliert durch Leukophorese herausgefiltert werden können und (2.) P3-reaktive T-Zellen hochspezifisch für RA (96%) sind <sup>67</sup>. Des Weiteren können bei Patienten mit RA spezifische T-Zellen für dieses Peptid gefunden werden, welches die Rheumafaktor bindende Domäne P3 besitzt. Eine Überprüfung einer stimulierenden Aktivität vom Peptid P3 an Endothelzellen liegt nicht vor. Im Versuchsaufbau wird es an IgG-Antikörper als Trägermolekül gekoppelt.

### **Immunglobulin A, G und M**

Das Immunglobulin G (IgG) ist das am häufigsten beschriebene Autoantigen der RA. Es

konnte sowohl im Synovium als auch im Serum isoliert werden und wird von anderen Antikörpern als Antigen erkannt. Diese werden als Rheumafaktoren bezeichnet und treten in den verschiedenen Isotypen IgG, IgM und IgA auf, wobei IgM der am häufigsten bestimmte RF und gleichzeitig der einzige serologische Parameter ist, der in den ACR-Kriterien Berücksichtigung findet<sup>4</sup>. Er wird bei ca. 65% der RA-Patienten nachgewiesen, ist aber nicht spezifisch für das Vorliegen einer RA<sup>6,88</sup>. Ein hoher RF-Titer kann aber als prognostischer Marker für einen erosiven und/oder sehr schnellen Verlauf der Erkrankung angesehen werden. Insbesondere bei IgA konnte ein Bezug zum Auftreten von besonders schweren Erscheinungsformen der RA hergestellt werden<sup>89,90</sup>. Der Immunglobulin-Antikörper besteht aus einer symmetrischen Grundstruktur. Diese setzt sich aus zwei identischen, leichten Ketten (jede von ungefähr 24kD) und zwei identischen schweren Untereinheiten (jede von ungefähr 55-70kD) zusammen. Die Unterscheidung zwischen den einzelnen Untergruppen wird als Isotypisierung bezeichnet und richtet sich nach strukturellen Unterschieden in der C-Region der schweren Kette. Eine *in-vitro*-Untersuchung zur Reaktion von Endothelzellen auf erhöhte Konzentrationen von Immunglobulinen liegt bislang nicht vor.

### **IL-15**

Das Zytokin IL-15 wird vor allem von mononukleären Monozyten bzw. Makrophagen als Antwort auf einen viralen Infekt produziert. Es wird der unspezifischen Abwehr zugeordnet und besitzt große strukturelle Ähnlichkeit mit IL-2, dessen Funktion die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist<sup>91</sup>. Auch für IL-15 konnte eine Aktivierung von NK-Zellen beschrieben werden, darüber hinaus konnte ein Einfluss auf die Produktion von CD8+ Gedächtniszellen gezeigt werden<sup>92</sup>. Im rheumatisch veränderten Gelenk liegen relativ wenig IL-2, hingegen aber hohe Konzentrationen IL-15 vor<sup>93</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass IL-15 die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen bewirkt, sowie die Stimulation der Immunglobulinproduktion durch B-Zellen anregt<sup>91</sup>. Dies könnte bedeuten, dass IL-15 eine krankheitsmodulierende Funktion einnimmt<sup>93</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-15 in der Lage ist, an T-Zellen eine TNF- $\alpha$ -Produktion zu bewirken, weshalb eine entsprechende Regulation von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch IL-15 diskutiert wird<sup>93</sup>. Untersuchungen zur Reaktion von Endothelzellen auf IL-15 liegen bislang noch nicht vor.

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Die RA ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf es zu einer entzündlichen Destruktion bindegewebeartiger Strukturen, vor allem an den Gelenken, kommt. Die Ausbildung eines entzündlich veränderten Gewebes im Bereich der Synovia wird durch eine verstärkte Vaskularisation und eine erhöhte Migration von Granulozyten, anderen mononukleären Zellen und Lymphozyten, begünstigt. Eine zentrale Rolle hierbei spielt das Endothel, welches durch die Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen die Migration der Abwehrzellen steuert. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Patienten mit RA erhöhte Spiegel der löslichen Adhäsionsmoleküle sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 im Serum auftreten und diese mit dem Schweregrad der Krankheit korrelieren<sup>48-51</sup>. Ein besseres Verständnis der Rolle des Endothels bei der RA könnte weitere diagnostische und therapeutische Ansätze ermöglichen. Eine zentrale Fragestellung bildet hierbei die Reaktion von Endothelzellen auf RA-relevante Antigene.

In der vorliegenden Untersuchung wurde überprüft, inwieweit es zur Produktion der löslichen Adhäsionsmoleküle sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 von primären Endothelzellmonokulturen mikrovaskulärer und aortaler Herkunft kommt. Um Auswirkungen auf das Zytokinmilieu zu untersuchen wurden exemplarisch die Interleukine-6 und -10 in den Zellüberständen untersucht. Des Weiteren wurde das Vorhandensein von membranständigen Adhäsionsmolekülen durch Fluoresceinisothiocyanat-Färbung (FITC) der Kulturen evaluiert. Außerdem erfolgte eine Überprüfung des Proliferationsverhaltens der Endothelzellen unter Einfluss der Antigene. Die primären Endothelzellkulturen wurden mit den Proteinen BiP, Calpastatin und Fibrinogen, der citrullinierten Variante des Fibrinogens, dem IgG-Peptid P3, sowie dem Rheumafaktor IgM stimuliert. Zum Vergleich wurden Zellkulturen mit den Immunglobulinen -A und -G, sowie mit den Proteinen anti-Calpain, citrulliniertes BSA und IL-15 versetzt. Die Negativkontrolle bestand in einer unstimulierten Zellkultur bei jedem Versuchsansatz.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Zellkultur**

###### **3.1.1.1. Zelllinien**

Beim gewählten Versuchsaufbau kamen Endothelzellkulturen von gesunden Primärspendern zur Anwendung. Charakteristisch für diese Zellen ist ein konfluentes Wachstum im Monolayer in Zellkulturflaschen. Dabei haben sie ein länglich-ovales bis spindelförmiges Erscheinungsbild, welches ab der 17. bis 18. Generation in eine kugelige Morphologie übergeht. Mit noch weiter zunehmendem Kulturalter verändert sich die Morphologie in eine mehrschichtige, geklumpte Erscheinung.

###### **Humane aortale Endothelzellen (HAEC)**

Humane aortale Endothelzellen wurden in Passage 3 von der Firma Cambrex (Cambrex, Walkersville, MD, USA) bezogen. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte laut Herstellerangaben aus Geweben von frisch verstorbenen, gesunden Spendern.

###### **Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC)**

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen wurden in Passage 2 von der Firma Cell-Lining (Cell-Lining GmbH, Berlin) bezogen. Die Isolation erfolgte laut Herstellerangaben aus Spendergeweben, von Mammareduktionsplastiken und Zirkumzisionen oder kosmetischen Operationen.

###### **3.1.1.2. Kulturbedingungen**

###### **Endothelzellkultivierung**

Alle Endothelzellkulturen wurden nach Herstellerempfehlungen in 75cm<sup>2</sup> oder 175cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (BD Labware, Le Pont De Claix, Frankreich) gezüchtet, in denen sie adhärent als Monolayer wuchsen. Die Zellkulturen wurden im Wärmeschrank (Heraeus Function Line, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit gelagert. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der Kultur unter dem Durchlichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Die Wahl des Kulturmediums erfolgte nach Herstellerempfehlung. Es wurde alle 2-4 Tage gewechselt. Für die HAEC kam EGM-2 (Cambrex, Walkersville, MD, USA) und für die HMVEC das Endothelial Cell Growth Medium MV (Promo-Cell GmbH, Heidelberg) zur Anwendung. Der Unterschied besteht im 5%-igen Anteil an fetalem Kälberserum des Endothelial Cell Growth Mediums MV gegenüber dem EGM mit 2%.

Passagieren, Einfrieren oder Stimulieren der Zellen erfolgte bei ca. 80-90% Konfluenz. Die Reinheit der Endothelzellkultur wurde anhand von Verunreinigungen im Medium und der Morphologie der Zellen überprüft.

### **Endothelzellpassage**

Zur Passagierung wurden die Endothelzellen zweimal mit 37°C warmem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem ebenfalls 37°C warmen Trypsin/EDTA Gemisch (0,0125% / 0,05% in PBS) inkubiert. Der Ablösevorgang dauerte 3-4 Minuten und wurde unter dem Durchlichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung kontrolliert. Sofort nach dem Ablösen der Zellen wurde der Vorgang mit Zellmedium mit einem 10%-igen Anteil an fetalem Kälberserum unterbrochen. Die Gesamtlösung wurde in 50ml Falconröhrchen überführt und zehn Minuten bei 250g zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit auf 37°C temperiertem PBS (Biochrom AG, Berlin) wurde das Zellpellet in ebenfalls vortemperiertem Zellmedium resuspendiert.

### **Endothelzelllagerung**

Nach dem Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA-Gemisch (siehe Zellpassagierung) wurde die Zellzahl des Suspensates bestimmt. Dazu wurden tote Zellen und defektes Zellmaterial mittels Trypanblau angefärbt, im Anschluss konnte die Zellzahl unter dem Durchlichtmikroskop auf der Neubauer Zählkammer bei fünfzigfacher Vergrößerung quantifiziert werden. Die Endothelzellen wurden zu jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingefroren. Nach dem Aliquotieren erfolgte die Zugabe von DMSO (Sigma Inc., St. Louis, MS, USA) in einer Verdünnung von 1:11. Sofort im Anschluss wurden die Cryoröhrchen in einer Cryobox bei einem konstanten Temperaturabfall von 1°C pro Minute auf -80°C eingefroren. Nach ca. 3-4 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

#### **3.1.2. Antigene**

Es wurden die Proteine BiP, Calpastatin und Fibrinogen, die citrullinierte Variante des Fibrinogens, das IgG-Peptid P3, sowie der Rheumafaktor IgM berücksichtigt. Zum Vergleich wurden die Immunglobuline -A und -G, sowie die Proteine anti-Calpain, citrulliniertes BSA und IL-15 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde in jedem Versuchsansatz eine Zellkultur mit dem normalen Zellmedium ohne Zusatz von Antigenen angesetzt. Die zur Stimulation verwendeten Antigene wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und mit dem Zellmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt, wobei das Peptid IgG-P3 im Vorfeld an das bovine Serumalbumin

gekoppelt wurde. Die folgende Tabelle zeigt die Konzentration der bei den Stimulationsversuchen verwendeten Antigene (siehe Tabelle 1).

<b>Antigen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
BiP	STRESSGEN, Victoria, B.C., Kanada	40 µg/ml
BSA citr	CALBIOCHEM, MERCK, Darmstadt,	40 µg/ml
Anti-Calpain	van Venrooij, W.J., Department of Biochemistry, Radboud University of Nijmegen, Niederlande	40 µg/ml
Calpastatin	van Venrooij, W.J., Department of Biochemistry, Radboud University of Nijmegen, Niederlande	40 µg/ml
Fibrinogen	van Venrooij, W.J., Department of Biochemistry, Radboud University of Nijmegen, Niederlande	40 µg/ml
Fibrinogen citr.	van Venrooij, W.J., Department of Biochemistry, Radboud University of Nijmegen, Niederlande	40 µg/ml
IgG-P3	Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee	40 µg/ml
IgA	CALBIOCHEM, MERCK, Darmstadt	40 µg/ml
IgG	CALBIOCHEM, MERCK, Darmstadt	40 µg/ml
IgM	CALBIOCHEM, MERCK, Darmstadt	40 µg/ml
IL-15	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA	1 µg/ml

*Tab. 1: Verwendete Antigene mit Herstellerangaben und verwendeter Konzentration*

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Stimulation

Zur Durchführung der Stimulationsversuche wurden  $8 \times 10^5$  Endothelzellen pro Well auf 24-Well-Mikrotiterplatten überführt. Analog dazu wurden bei den Proliferationsversuchen die 96-Well-Mikrotiterplatten mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well bestückt. In gleicher Weise wurden die Endothelzellen auf die achteiligen Chamberslides ausgesät; die Anzahl betrug hierbei  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well. Nach einer Anwachszeit von 3 Tagen im Brutschrank bei 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>-Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit erfolgte das nochmalige Waschen der Kultur mit angewärmtem PBS (37°C). Zum Zeitpunkt der Stimulation befanden sich die Zellen in der 5. (HMVEC) bzw. der 7. (HAEC) Passage, was ca. der 10. bis 15. Generation entspricht.

Die Verdünnung der Antigene wurde mit dem jeweiligen Zellmedium in einer Gesamtmenge von 500µl/Well durchgeführt. Anschließend wurden die Kulturen im

Brutschrank bei 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>-Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit über den versuchsabhängigen Zeitraum inkubiert. Zellen der HAEC-Linie wurden über einen Zeitraum von 3h, 6h, 12h, 24h und 48h mit citrulliniertem BSA, BiP, anti-Calpain, Calpastatin, Fibrinogen, citrulliniertem Fibrinogen, IgG-P3, IgA, IgG, IgM und IL-15 stimuliert.

Die Stimulationszeiten der HMVEC betragen jeweils 3h, 6h und 12h. Zur Beendigung der Versuche wurden die Zellüberstände abgenommen und bei 10 000g 5 Minuten zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde zügig aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

### **3.2.2. ELISA**

#### **3.2.2.1. ELISA zur Bestimmung von Adhäsionsmolekülen im Zellüberstand**

##### **Prinzip**

Die Bestimmung der Konzentration von Adhäsionsmolekülen im Zellüberstand der stimulierten primären humanen Endothelzellkulturen erfolgte mittels Enzymimmunoassay. Die Konzentrationen der löslichen Adhäsionsmoleküle sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 wurden durch ein Sandwich-ELISA-Verfahren mittels kommerzieller Assays detektiert und photometrisch quantifiziert.

##### **Durchführung**

Zunächst erfolgte ein behutsames Auftauen der Zellüberstände aus den Endothelzellstimulationen. Zur Untersuchung der Überstände kamen ELISA-Kits für die *in vitro* Diagnostik von Antigenen der Firma R&D Systems (Parameter<sup>®</sup> und Quantikine<sup>®</sup> ELISA, R&D Systems GmbH, Wiesbaden) zur Anwendung. Alle ELISA-Kits basierten auf einer quantitativen Sandwich-Enzymimmunoassay-Technik (Abb. 4) Dabei ermöglichten die mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper beschichteten 96-Well-Platten eine Ankopplung der vorhandenen Adhäsionsmoleküle im Untersuchungsmaterial.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Überstände in einer Verdünnung von 1:20 als Doppelproben auf die 96-Well-Platten ausgebracht. Nach einem Waschschrift erfolgte in einem zweiten Schritt die Zugabe eines zweiten, Meerrettichperoxidase (HRP) - gebundenen Antikörpers, dessen Spezifität ebenfalls gegen das zu detektierende Antigen gerichtet war. Die HRP setzt das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) um. Der durch Zugabe einer Stopplösung eintretende Farbumschlag ist proportional zur Konzentration der

gebundenen Antikörper und wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm quantifiziert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

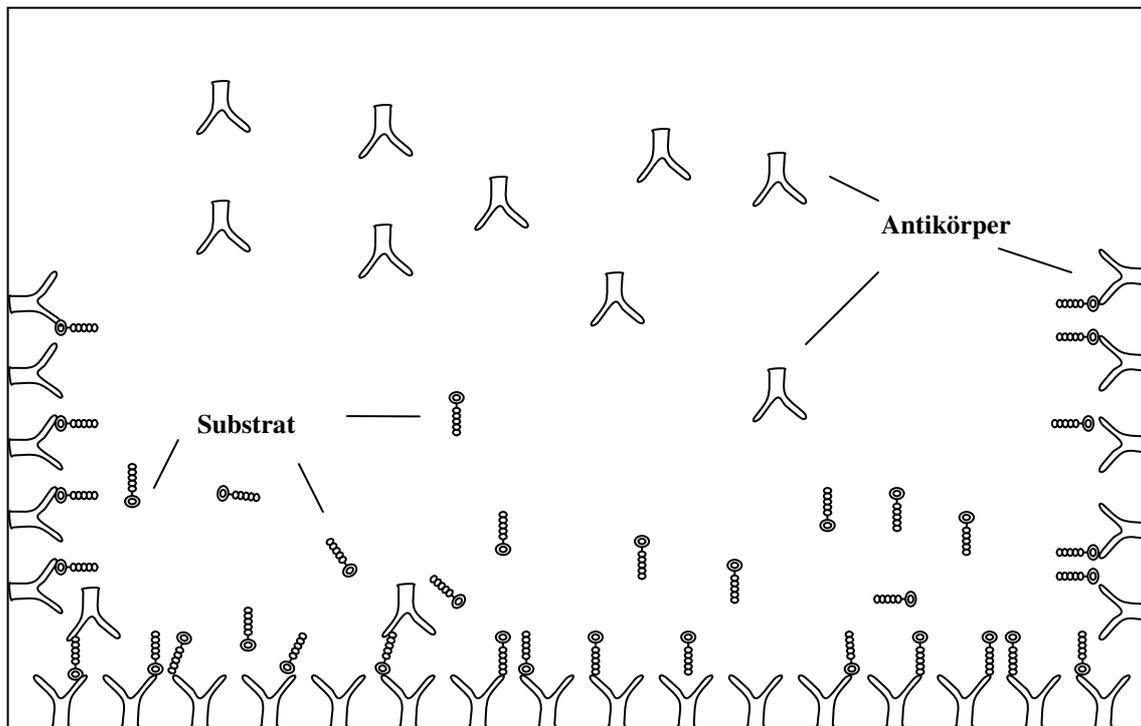


Abb. 4: *Prinzip des Sandwich ELISA. Ein Substrat wird an die antikörperbeschichteten Wände gebunden. Ein zweiter Antikörper bindet das Antigen und leitet die weiteren Reaktionen ein.*

### 3.2.2.2. ELISA zur Bestimmung von Interleukin-6 und -10 im Zellüberstand

#### Prinzip

Die Bestimmung der Konzentration der Interleukine -6 und -10 im Zellüberstand von stimulierten, primären humanen Endothelzellkulturen erfolgte ebenfalls mittels Enzymimmunoassay. Die Konzentrationsunterschiede der Interleukine wurden durch ein Sandwich-ELISA-Verfahren detektiert und photometrisch quantifiziert.

#### Durchführung

Die quantitative Bestimmung von Interleukin-6 und -10 in den Zellüberständen erfolgte mit Enzymimmunoassays der Firma Immunotech® (Immunotech, Marseille, Frankreich). Die Analyse erfolgte nach langsamem auftauen der Zellüberstände. Dabei ermöglichten die mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper beschichteten 96-Well-Platten eine Ankopplung der vorhandenen Interleukine im Untersuchungsmaterial. Zunächst wurden die zu untersuchenden Überstände in einer Verdünnung von 1:20 in doppelten Ansätzen aufgebracht. Nach 3-fachem Waschen erfolgte in einem zweiten Schritt die Zugabe eines

zweiten biotinylierten Antikörpers zusammen mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Dieser bindet auch an die gebundenen Antigene. Nach einem weiteren Waschschrift wurde ein chromergenes Substrat der Peroxidase zugegeben. Die Intensität des Farbumschlages ist proportional zur Konzentration des jeweiligen Interleukins. Dieses wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm quantifiziert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### **3.2.3. Gelelektrophorese und Immunumsetzung zur Bestimmung von Adhäsionsmolekülen im Zelllysate**

#### **Prinzip**

Neben gelösten Adhäsionsmolekülen, die im Serum bestimmt werden können, kann eine verstärkte Präsentation von Adhäsionsmolekülen an der luminalen Zellwand vorliegen. Zum Ausschluss dieser Möglichkeit wurden die Zelllysate nach 3h Antigenexposition durch einen Western Blot auf enthaltene Adhäsionsmoleküle untersucht.

#### **Durchführung**

Nach Beendigung der Zellstimulation durch Entnahme der Zellüberstände erfolgte die Lyse der in den Wells adhärierenden Endothelzellen mittels Harnstoff (8M in H<sub>2</sub>O). Das Lysat wurde bei -20°C eingefroren. In einem weiteren Schritt erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels 10% SDS Minigele nach Laemmli<sup>94</sup>. Anschließend wurden die Proteine nach dem Verfahren von Towbin auf Nitrocellulose überführt<sup>95</sup>. Zur Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle in den Zelllysaten erfolgte eine Immunumsetzung des Western Blots mit Antikörpern gegen E-Selektin, ICAM und VCAM (R&D Systems GmbH, Wiesbaden). Hierbei wurden die Nitrocellulosemembranen zunächst mittels einer 5%-igen PBS Pufferlösung mit Tween 20 (5% BSA, 1% Tween 20 (Serva Heidelberg) in PBS) blockiert. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in PBSN-Lösung (2,5% PBS, 0,1% Tween 20 in PBS) wurden sie mit dem entsprechenden Erstantikörper 1h inkubiert. Zur Anwendung kamen anti-humane monoklonale IgG Maus-Antikörper gegen die Adhäsionsmoleküle (R&D Systems GmbH, Wiesbaden). Danach wurden die Membranen 3x5 Minuten mit PBSN gewaschen, um anschließend mit einem polyklonalen Rabbit-Anti-Mouse IgG HRP-gekoppelten Zweitantikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) eine weitere Stunde zu inkubieren. Nach erneutem fünfmaligem Waschen für 5 Minuten mit PBSN wurden die Membranen 3 Minuten in Rotilumin-Lösung (ROTH, Karlsruhe) geschwenkt und die entstandene Chemolumineszenz auf einen Röntgenfilm entwickelt.

### **3.2.4. Proliferationstest**

#### **Prinzip**

Die Proliferationsaktivität der Endothelzellen kann durch den Einbau von radioaktivem [Methyl-3H]-Thymidin (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) in die DNA mit Hilfe eines Szintillationszählers (Packard Bioscience, CT, USA) bestimmt, und Auswirkungen der Antigene auf das Zellwachstum untersucht werden.

#### **Durchführung**

Zur Untersuchung der Proliferation wurde die DNA-Synthese durch den Einbau von [Methyl-3H]-Thymidin bestimmt. Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit den jeweiligen Antigenen in 250  $\mu$ l Medium auf 96-Well-Mikrotiterplatten über einen Zeitraum von 3h oder 6h inkubiert. Jeder Ansatz wurde als Triplikat erstellt, um eventuelle Wachstumsschwankungen berücksichtigen zu können. Jeder Versuch beinhaltete eine Negativkontrolle in Form eines reinen Zellkulturmediums. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit. Zeitgleich mit Beginn der Antigenstimulation wurde [Methyl-3H]-Thymidin, mit einer Radioaktivität von 1  $\mu$ Ci (=0,037MBq) pro Well zugegeben. Nach Ablauf der Versuchszeiten wurden die Zellen mit einem Cell Harvester (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) auf einen Glasfaserfilter transferiert und fünfmal mit aqua dest. gewaschen. Auf diese Weise konnten die Zellen auf dem Filter fixiert und die nicht eingebauten Nukleotide entfernt werden. Nach dem Trocknen bei 50°C für 20 Minuten, Zugabe von 30  $\mu$ l Szintillationsflüssigkeit Microscint (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) pro Well und Versiegelung des Filters war es möglich, mit Hilfe eines Top-Count-Mikroplate-Szintillationszählers die inkorporierte Nukleotidmenge zu messen. Die Anzahl der registrierten Zerfälle (counts per minute = cpm) ist hierbei zu der aufgenommenen Nukleotidmenge bzw. der proliferativen Aktivität der Endothelzellen proportional.

### **3.2.5. Immunhistochemische Anfärbung der Endothelzellkulturen mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)**

#### **Prinzip**

Die membranständigen Adhäsionsmoleküle wurden immunhistochemisch markiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop evaluiert.

## **Durchführung**

Zur immunhistochemischen Anfärbung der Endothelzellkulturen erfolgte zunächst die Kultivierung und Stimulation der Endothelzellkulturen auf 8 Well-Platten (BD Labware, Le Pont De Claix, Frankreich) analog zur Zellstimulation auf 24 Well-Platten in 250µl Medium pro Well. Nach dem Entfernen der Wellunterteilung wurden diese wie Objektträger für die Durchlichtmikroskopie bearbeitet.

Im ersten Schritt erfolgte die Fixierung der Kultur in einem  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Gemisch aus Methanol und Aceton (1:2). Anschließend fand ein halbstündiger Blockierschritt mit Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:10 statt. Bei dieser Inkubation, wie auch bei allen folgenden Inkubationsschritten, wurde der Objektträger in einer feuchten Kammer gelagert. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Objektträger drei Mal in TRIS-Puffer (50µM TRIS, pH 7,6, 1% BSA) gewaschen. Darüber hinaus erfolgte eine Inkubation mit anti-humanen monoklonalen IgG Maus-Antikörpern gegen eines der drei Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1) für 1h. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit einem gegen Mausproteine gerichtete, polyklonale Kaninchen-Antikörper, der zusätzlich mit einem FITC-Zweitantikörper gekoppelt war, weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation und weiterem Waschen wurden die Objektträger mittels Microscopy-Aquatex-Fixierlösung und Deckgläschen eingedeckelt und dunkel gelagert. Das Auswerten und Fotografieren der FITC-Anfärbung erfolgte innerhalb von 48h am Fluoreszenzmikroskop mit digitaler Bildbelichtung. Charakteristische Befunde wurden bei größtmöglicher Vergrößerung (20 bzw. 100-fach) photographiert.

### **3.3. Statistik**

Die statistischen Analysen wurden mittels SPSS-System Version 16.0.1 (SPSS inc., Chicago, IL USA) für nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Als signifikant wurden Werte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  ( $p \leq 0,05$ ) angenommen. In den Abbildungen und Tabellen erfolgte die Darstellung der Ergebnisse unter Angabe des Mittelwertes mit der jeweiligen Standardabweichung.

## 4. ERGEBNISSE

Die Reaktion der Endothelzellen auf die Stimulation mit möglichen Autoantigenen der RA wurde auf verschiedene Weisen analysiert. Den Kern der Untersuchung bildeten (1.) die Quantifizierung der in den Zellüberstand sezernierten Adhäsionsmoleküle und Interleukine mittels ELISA, (2.) die Untersuchung des Zellwachstums unter Antigeneinfluss durch einen Proliferationstest, sowie (3.) die Bestimmung membranständiger Moleküle auf der Zelloberfläche der lebenden Kultur mittels FITC-Markierung der Adhäsionsmoleküle an fixierten Zellkulturen. Des Weiteren wurden (4.) die Zelllysate auf enthaltene, zum Zeitpunkt der Stimulation an der Membran gebundene Adhäsionsmoleküle, im Western Blot untersucht.

### 4.1. Zellkulturen

Die Versuche wurden an den primären Zellkulturen HAEC und HMVEC durchgeführt. Alle verwendeten Zellkulturen zeigten ein konstantes Wachstumsmuster. Die Versuche wurden in Passage 5 in der 10.-15. Generation durchgeführt. Sowohl in den Zellkulturflaschen als auch in den 24- bzw. 96-Well-Platten und Chamberslides war eine gleichmäßige Konfluenz und Zellmorphologie zu beobachten (Abb. 5). Es wurden jeweils  $8 \times 10^5$  Zellen auf 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer Anwachsphase von 3 Tagen erfolgte die Stimulation mit Antigenen der RA.

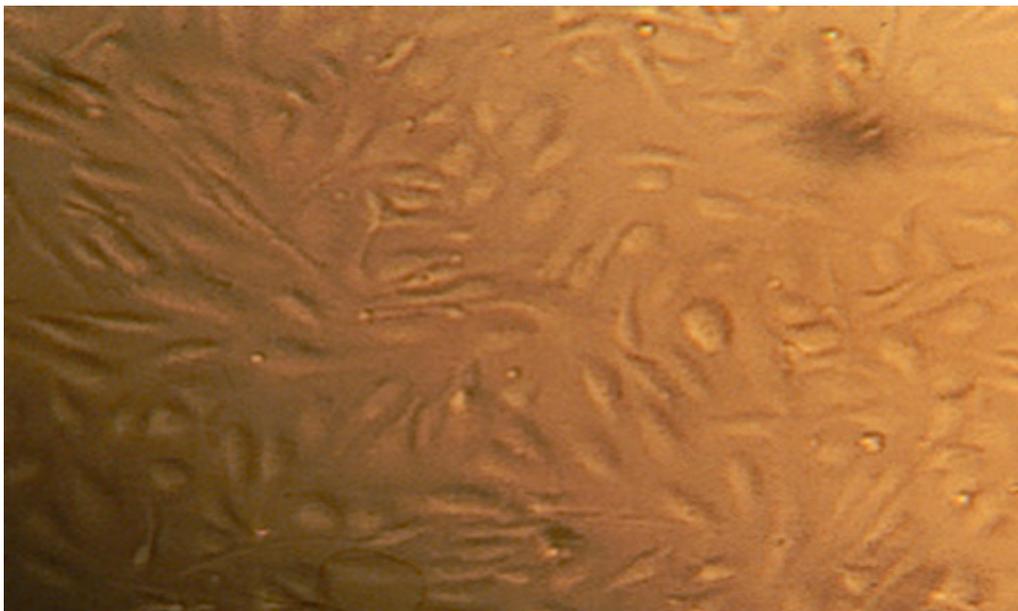


Abb. 5: *Humane aortale Zellen in Passage 5 vor Stimulation im Auflichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung*

## **4.2. Untersuchungen der Zellüberstände**

Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte mit den möglichen Autoantigenen der RA BiP, Calpastatin und Fibrinogen, Fibrinogen citrulliniert, dem IgG-Peptid P3, sowie dem Rheumafaktor IgM. Zusätzlich wurden Vergleichskulturen angelegt, die mit den Proteinen anti-Calpain, citrulliniertem BSA, IL-15, sowie mit den Immunglobulinen -A und -G stimuliert wurden. Ein Kulturansatz für jede Stimulationszeit enthielt nur reines Zellmedium. Die hier gemessene Adhäsionsmolekülkonzentration diente als Vergleichsgröße zu den stimulierten Kulturen und bildete den Referenzwert von 100%.

Die gewonnenen Kulturüberstände wurden mittels ELISA auf die löslichen Adhäsionsmoleküle sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1, sowie die IL-6 und -10 untersucht. Die Auswertungen im ELISA wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Berechnung erfolgte anhand des Mittelwertes. Von HAEC wurden Zellüberstände nach 3h, 6h, 12h, 24h und 48h gewonnen (n=3). Für HMVEC-Kulturen wurden Stimulationsdurchläufe über die Zeiträume 3h, 6h und 12h durchgeführt (n=4).

### **4.2.1. Kinetik der Adhäsionsmolekül- und Interleukinexpression**

Ziel war es, die zeitlichen Verläufe der Adhäsionsmolekül- und Interleukinexpression bei Stimulation mit den Autoantigenen darzustellen, wobei die beiden Zellarten unterschiedliche Reaktionen auf die Antigenexposition zeigten. Bei beiden kam es zu einer Ausschüttung von sE-Selektin. Nach 3h zeigten sich erhöhte Konzentrationen im Überstand der HAEC-Kulturen bei den Antigenen anti-Calpain, citrulliniertes BSA, Calpastatin, Fibrinogen, citrulliniertes Fibrinogen, IgG-P3, IgM. Im Vergleich dazu kam es bei den HMVEC-Kulturen zu erhöhten sE-Selektin-Konzentrationen nach 6h und nach 12h bei folgenden Antigenen: BiP, Calpastatin, Fibrinogen, IgG, IgG-P3, IgA und IgM. Auch bei der Interleukinproduktion bestanden Unterschiede zwischen den beiden Zellkulturen. Aortale Zellen exprimierten nur bei BiP und IgG zu allen Messzeitpunkten deutlich mehr IL-6 in den Überstand. Hingegen konnten für die mikrovaskulären Kulturen nach 3h bei allen Antigenen mit der Ausnahme von citrulliniertem Fibrinogen erhöhte IL-6 Werte im Zellkulturüberstand gemessen werden. Im Folgenden werden die zeitlichen Abläufe der Adhäsionsmolekül- und Interleukinexpression dargestellt.

#### **4.2.1.1. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit anti-Calpain (Abb. 6 und 7)**

Die Stimulation der HAEC mit anti-Calpain führte nach 3h zu einer Konzentrationssteigerung des sE-Selektins im Überstand auf 178%. Nach 6h war der sE-

Selektingehalt wieder nahezu auf den Wert der Kontrollkultur gefallen (105%). Auch nach 12 und 24h lag die sE-Selektinkonzentration im Bereich der Kontrollkultur. Nach 48h stieg die Konzentration des sE-Selektins jedoch wieder auf 142% an.

Die Konzentration der löslichen ICAM-1-Moleküle im Überstand stieg von 84% nach 3h auf 119% nach 6h. Nach 12h lag der Wert bei 110%. Ein Maximum wurde nach 24h erreicht (126%). Danach fiel der sICAM-1-Gehalt wieder auf 75% der Vergleichskultur.

Der Gehalt an sVCAM-1-Molekülen im Überstand bei Stimulation mit anti-Calpain lag im Bereich der Kontrollkultur.

Die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand bewegte sich zwischen 57% nach 3h und 120% nach 48h, wobei sich ein gewisses Plateau nach 6 bis 24h einstellte (87-96%).

Die IL-10-Konzentrationen lagen nach 6 und 12h bei ca. 90% im Vergleich zur Kontrollkultur. Nach 24h zeigte sich ein Minimum bei 68%, um danach wieder auf 108% (48h) anzusteigen.

#### **4.2.1.2. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit anti-Calpain (Abb. 6 und 7)**

Nach Stimulation der HMVEC-Kulturen mit anti-Calpain zeigte sich ein verringerter Gehalt an sE-Selektin nach 3 und 6h (72%). Nach 12h lag dieser im Bereich der Kontrollkultur.

Die sICAM-1-Konzentration stieg auf 121% nach 3h und blieb auch nach 6h nahezu unverändert (119%).

Die Menge an gelöstem sVCAM-1 im Überstand lag nach allen Untersuchungszeiträumen im Bereich der Konzentration der Vergleichskulturen.

Der im Überstand gelöste Anteil an IL-6 betrug nach 3h 146%, fiel nach 6h auf 92% und war nach 12h leicht erhöht bei 116%.

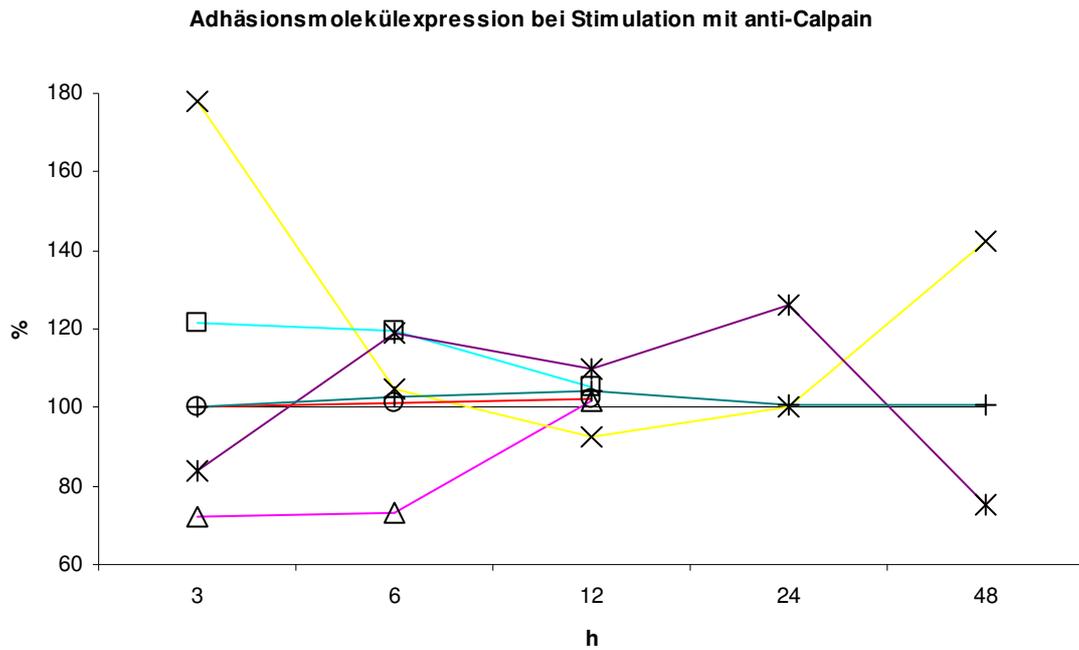


Abb. 6: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit anti-Calpain. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  sE-Selektin HMVEC,  $\times$  sE-Selektin HAEC,  $\square$  sICAM-1 HMVEC,  $*$  sICAM-1 HAEC,  $\circ$  sVCAM-1 HMVEC,  $+$  sVCAM-1 HAEC

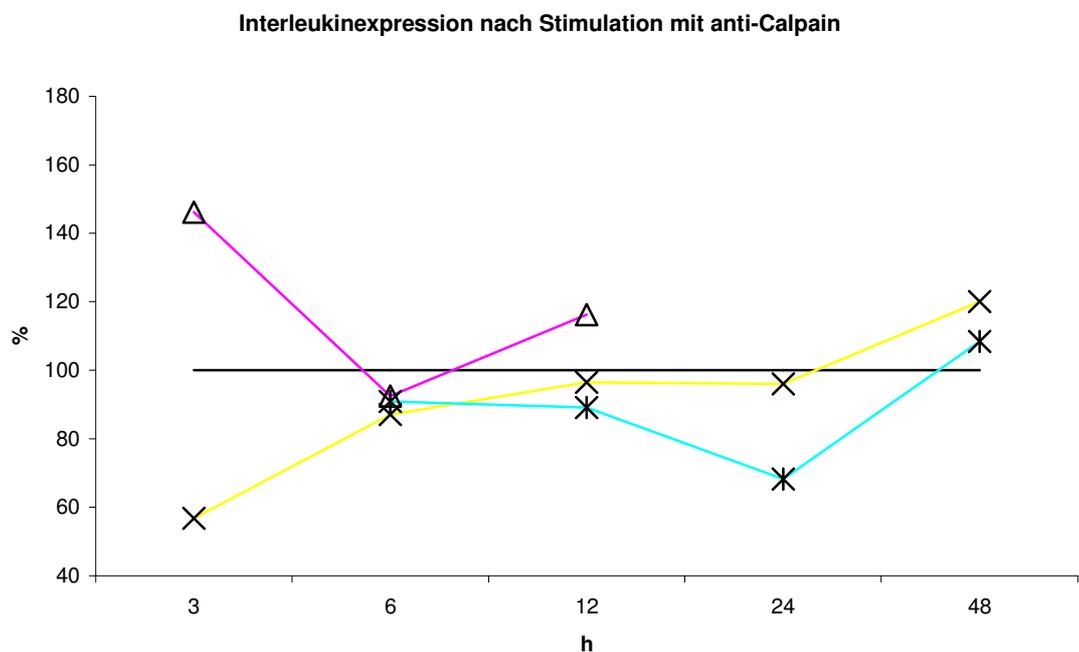


Abb. 7: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit anti-Calpain. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  IL-6 im Überstand von stimulierten HMVEC-Kulturen,  $\times$  IL-6 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen,  $*$  IL-10 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen

#### 4.2.1.3. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit BiP (Abb. 8 und 9)

Die Stimulation von HAEC-Kulturen führte zu einer sE-Selektinkonzentration nach 6, 12 und 24h von 104% bis 106%. Nach 48h zeigte sich eine Steigerung auf 162%. Die sICAM-1 und sVCAM-1-Werte lagen zu allen Messzeitpunkten im Bereich der Kontrollkulturen. Der Gehalt an im Zellüberstand gelöstem IL-6 zeigte sich deutlich erhöht. Nach 6h lag er bei 264% und sank nach 12h auf 217%. Nach 24 und 48h war er geringfügig weiter gesunken und lag bei 210%.

Der IL-10-Anteil im Überstand der HAEC-Kulturen zeigte sich geringfügig verringert. Nach 6h betrug er 91%, nach 12h 89%. Es kam zu einem weiteren Rückgang auf 68% nach 24h bevor die Konzentration nach 48h wieder auf 113% anstieg.

#### 4.2.1.4. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit BiP (Abb. 8 und 9)

Der sE-Selektingehalt der Überstände zeigte bei der Stimulation mit BiP eine fast lineare Zunahme und stieg von 70% nach 3h, über 100% nach 6h, auf 130% nach 12h.

Die sICAM-1-Konzentration schwankte geringfügig. Nach 3h lag sie bei 108%, erreichte ihr Maximum nach 6h (118%) und lag nach 12h wieder bei 106%.

Der sVCAM-1-Gehalt bewegte sich gemäßigt zwischen 99% (3h) und 102% (12h).

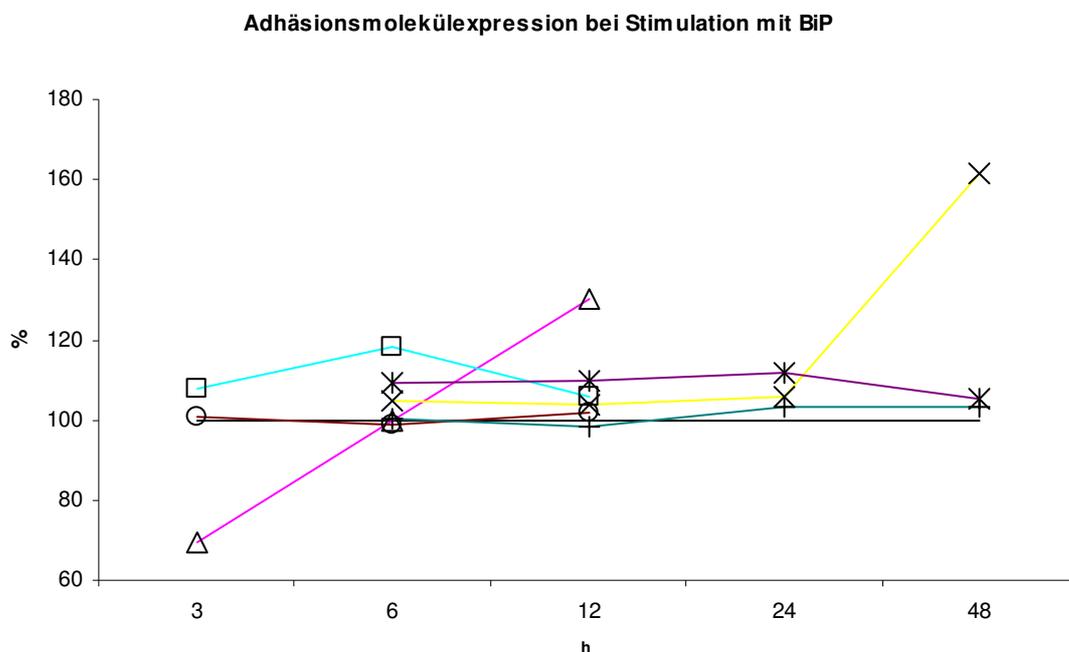


Abb. 8: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit anti-Calpain. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  sE-Selektin HMVEC,  $\square$  sICAM-1 HMVEC,  $\circ$  sVCAM-1 HMVEC,  $\times$  sE-Selektin HAEC,  $*$  sICAM-1 HAEC,  $+$  sVCAM-1 HAEC

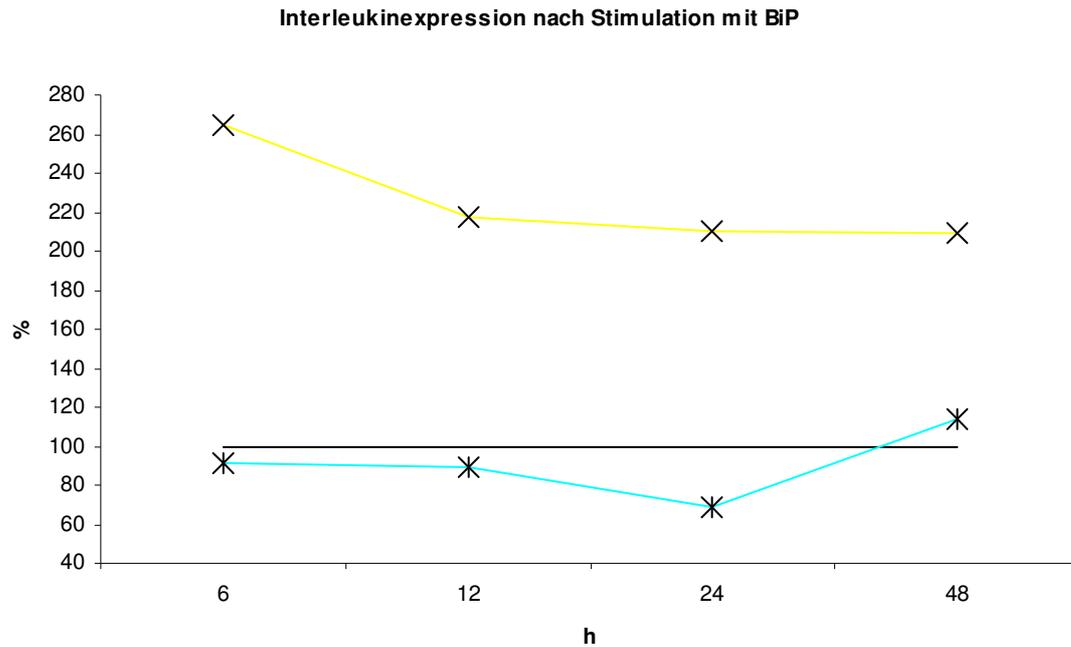


Abb. 9: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit anti-Calpain. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz, × IL-6 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen, \* IL-10 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen

#### 4.2.1.5. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit citrulliniertem BSA

HAEC-Kulturen, die mit citrulliniertem BSA stimuliert wurden, zeigten nach 3h die höchste sE-Selektin-Ausschüttung (156%). Nach 6h ging die E-Selektin-Menge im Überstand auf 115% zurück. Nach weiterem Rückgang auf 93% nach 12h kam es wieder zu einer Zunahme auf 123% (24h) und 150% nach 48h.

Die sICAM-1-Konzentrationen entwickelten sich wie folgt: nach 3h lag der Wert bei 86%, danach kam es zu einem Anstieg auf 113% (6h), 119% (12h) und 113% (24h), um danach wieder auf 63% (48h) abzusinken.

Die sVCAM-1-Konzentration lag im Bereich der Kontrollen und schwankte zwischen 97% und 103%.

Die IL-6-Menge im Überstand lag nach 3h bei 106% und stieg nach 6h auf 109% an. Nach 12h zeigte sich der Wert leicht verringert bei 96%. Das Minimum wurde nach 24h mit 87% erreicht. Nach 48h lag die Konzentration bei 99%.

Die IL-10-Werte veränderten sich von 91% nach 6h auf 100% nach 12h, bevor sie nach 24h auf 79% sanken; nach 48h lag der Wert bei 89% der Vergleichskultur.

#### **4.2.1.6. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit citrulliniertem BSA**

Der sE-Selektin-Gehalt im Überstand stieg kontinuierlich von 66% (3h) auf 81% (6h) und erreichte sein Maximum von 108% nach 12h.

Die sICAM-1-Konzentration fiel von 112% (3h) auf 103% (6h) und stieg dann wieder auf 106% (12h) an.

sVCAM-1-Moleküle im Überstand wiesen keine Unterschiede zu den Konzentrationen der Vergleichskultur auf.

Die IL-6-Konzentration im Überstand zeigte ein Maximum nach 3h (164%), lag nach 6h bei 97% und stieg nach 12h wieder auf 104% an.

#### **4.2.1.7. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit Calpastatin (Abb. 10 und 11)**

Bei der Stimulation von HAEC-Kulturen mit Calpastatin fiel die sE-Selektin-Konzentration im Überstand kontinuierlich ab. Nach 3h lag sie bei 128%, nach 6h bei 120%, nach 12h bei 115%, nach 24h bei 114% und nach 48h bei 100%.

Der sICAM-1-Gehalt lag nach 3h bei 102%, stieg nach 6h bzw. 12h auf ein Plateau (128% bzw. 124%), um danach wieder abzufallen (24h: 87%, 48h: 74%).

Die sVCAM-1-Konzentration im Überstand der HAEC-Kulturen zeigte lediglich nach 6h und 12h eine leichte Steigerung auf 110% bzw. 101%.

Der Anteil an IL-6-Molekülen im Überstand bei HAEC-Kulturen stieg von 49% nach 3h auf 100% nach 6 bzw. 12h an. Nach 24h konnten 88% und nach 48h 95% gemessen werden.

Der IL-10-Gehalt betrug nach 6h 103% und nach 12h 84%. Der Messwert erreichte nach 24h 92% und nach 48h 103%.

#### **4.2.1.8. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit Calpastatin (Abb. 10 und 11)**

Der Gehalt an löslichen sE-Selektin-Molekülen im Überstand lag nach 3h bei 63% und zeigte nach 6h einen Wert von 83%. Das Maximum wurde nach 12h erreicht (141%).

Die mittlere sICAM-1-Konzentration nach Stimulation mit Calpastatin betrug nach 3h und 6h 128% bzw. 129% und fiel nach 12h auf 71% ab.

Ausgeprägte Konzentrationsänderungen von sVCAM-1 im Vergleich zu den Kontrollkulturen wurden nicht beobachtet.

Die IL-6-Konzentration bei Stimulation mit Calpastatin zeigte mit 142% ein Maximum nach 3h und fiel nach 6h auf 79% ab. Nach 12h konnten 123% gemessen werden.

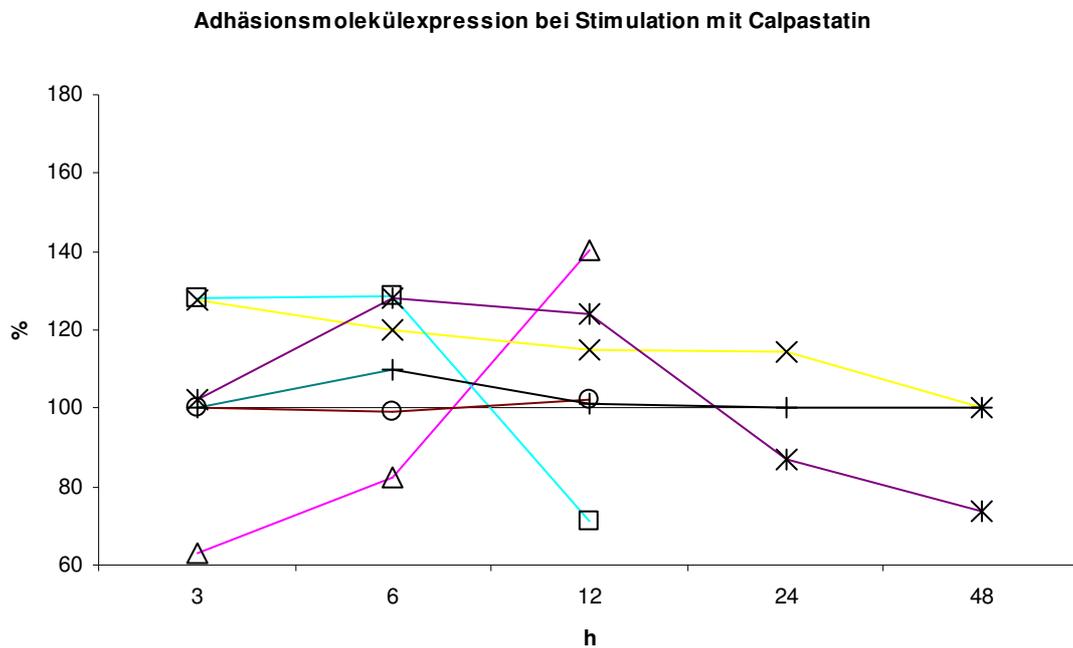


Abb. 10: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit Calpastatin. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  sE-Selektin HMVEC,  $\times$  sE-Selektin HAEC,  $\square$  sICAM-1 HMVEC, \* sICAM-1 HAEC,  $\circ$  sVCAM-1 HMVEC, + sVCAM-1 HAEC

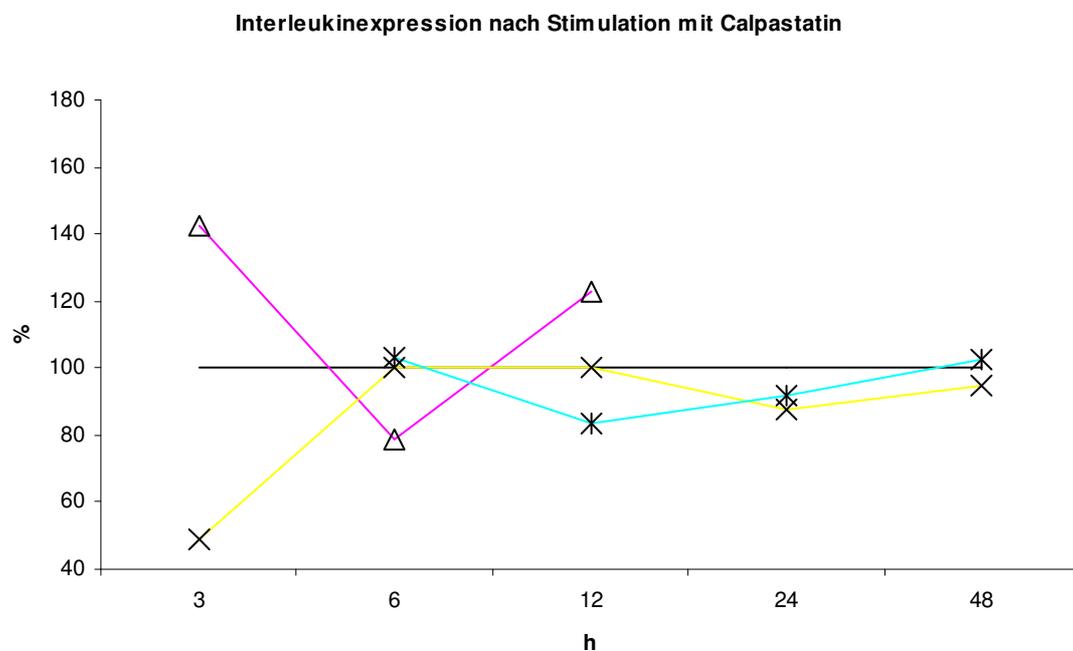


Abb. 11: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit Calpastatin. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  IL-6 im Überstand von stimulierten HMVEC-Kulturen,  $\times$  IL-6 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen, \* IL-10 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen

#### **4.2.1.9. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit Fibrinogen**

Die sE-Selektin-Werte nach Stimulation aortaler Zellen mit Fibrinogen lagen nach 3h bei 172% und gingen nach 6h auf 110% zurück. Nach einem erneuten, leichten Anstieg nach 12h auf 122% sanken sie nach 24h wieder auf 103%, bevor sie nach 48h 123% erreichten. Die sICAM-1-Konzentration stieg von 91% nach 3h auf 135% nach 6h an. Der 12h-Wert lag bei 119%; danach sank der sICAM-1-Anteil im Überstand wieder auf 88% (24h) bzw. 89% (48h).

Der sVCAM-1-Gehalt zeigte nur geringe Schwankungen von maximal 5%.

Die IL-6-Konzentration im Überstand stieg von 106% nach 3h auf 109% nach 6h. Nach 12h lag die Konzentration bei 96%, nach 24h bei 87%. Nach 48h kam es zu einem leichten Anstieg auf den annähernden Wert der Kontrollkultur (99%).

Die IL-10-Expression betrug 91% nach 6h. Nach 12h lag sie bei 100%. Die Messung nach 24h ergab 79% und nach 48h 89% der Kontrollkultur.

#### **4.2.1.10. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit Fibrinogen**

Auch bei Stimulation mikrovaskulärer Endothelzellen mit Fibrinogen zeigte sich ein fast linearer Anstieg der sE-Selektin-Konzentration von 81% nach 3h, über 133% nach 6h, auf ein Maximum nach 12h bei 176%.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die sICAM-1-Konzentration rückläufig. Das Maximum wurde nach 3h gemessen (135%). Nach 6h fiel der Wert auf 123% der Vergleichskultur und sank weiter auf 76% nach 12h.

Die sVCAM-1-Werte im Überstand nach Stimulation mit Fibrinogen zeigten geringgradige Schwankungen von 3-5%.

Der IL-6-Gehalt im Überstand zeigte eine deutliche Erhöhung nach 3h mit 164%. Nach 6h war er auf 97% gesunken und stieg danach wieder auf 104% (12h) an.

#### **4.2.1.11. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit citrulliniertem Fibrinogen (Abb. 12 und 13)**

Die höchste sE-Selektin-Konzentration bei Stimulation von HAEC-Kulturen mit citrulliniertem Fibrinogen wurde nach 3h (144%) gemessen. Nach 6h kam es zu einem Rückgang auf 110%, nach 12h auf 107% und nach 24h auf 89%. Nach 48h konnte ein Wiederanstieg der Konzentration auf 115% gemessen werden.

Im Vergleich dazu zeigte der Verlauf der sICAM-1-Konzentration zunächst einen Anstieg von 91% nach 3h auf ein Maximum nach 6h (143%) mit einem langsamen Abfall über 91% (12h) und 90% (24h) auf 85% nach 48h.

Die sVCAM-1-Werte zeigten geringe Schwankungen im Vergleich zur Kontrolle von maximal 12% (6h).

Bei der Inkubation der humanen aortalen Zellen mit citrulliniertem Fibrinogen konnte die geringste Konzentration an IL-6 im Überstand nach 3h gemessen werden (51%). Der Verlauf zeigte nach 6, 12 und 24h keine ausgeprägten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollkultur. Ein Maximum konnte nach 48h beobachtet werden (119%).

Ähnlich geringe Schwankungen nach 6, 12 und 24h zeigten sich bei der Messung des IL-10 Gehaltes im Überstand. Erst nach 48h wurde hier ein Maximalwert von 111% erreicht.

#### **4.2.1.12. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit citrulliniertem Fibrinogen (Abb. 12 und 13)**

Unter Einfluss von citrulliniertem Fibrinogen stieg die sE-Selektin-Menge im Zellüberstand von 97% nach 3h auf ein Maximum von 179% nach 6h. Nach 12h war der Wert wieder auf 109% gefallen.

Die sICAM-1-Werte im Überstand nach Stimulation mit citrulliniertem Fibrinogen zeigten ein Maximum bei 3h (145%) und lagen nach 6h und 12h jeweils bei 83%.

sVCAM-1-Konzentrationen wiesen maximale Abweichungen von +/- 3% im Vergleich zur Kontrollkultur auf.

Der Verlauf der IL-6-Konzentration im Überstand nach Stimulation mit citrulliniertem Fibrinogen zeigte eine Abnahme auf 106% nach 3h und 89% nach 6h. Nach 12h konnte ein Maximum von 141% im Vergleich zum Referenzwert gemessen werden.

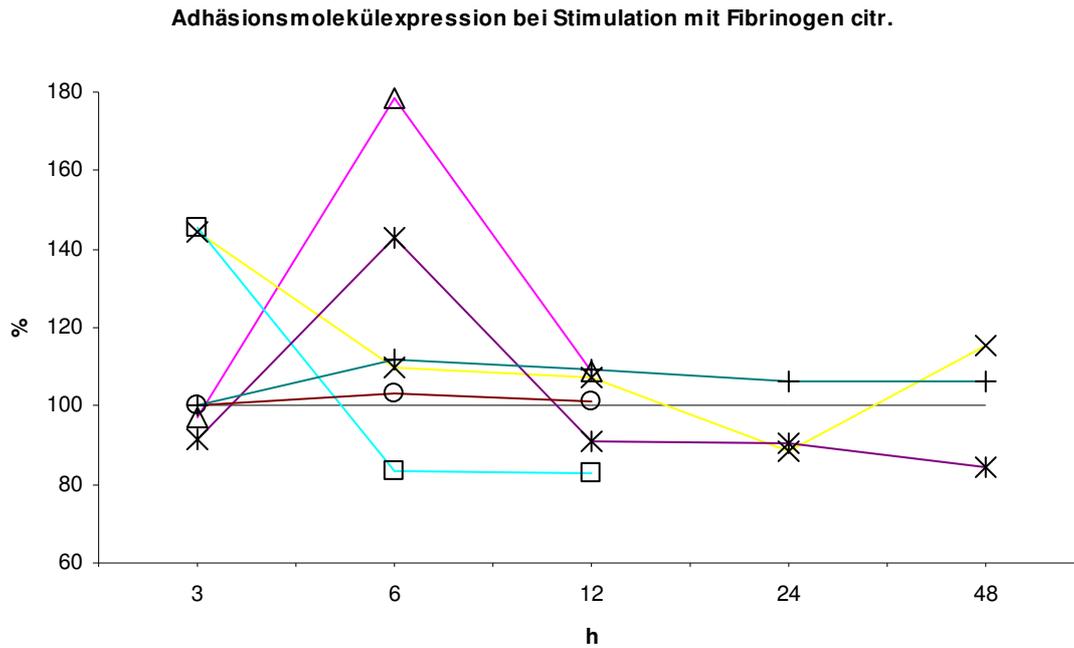


Abb. 12: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit citr. Fibrinogen. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  sE-Selektin HMVEC,  $\times$  sE-Selektin HAEC,  $\square$  sICAM-1 HMVEC, \* sICAM-1 HAEC,  $\circ$  sVCAM-1 HMVEC, + sVCAM-1 HAEC

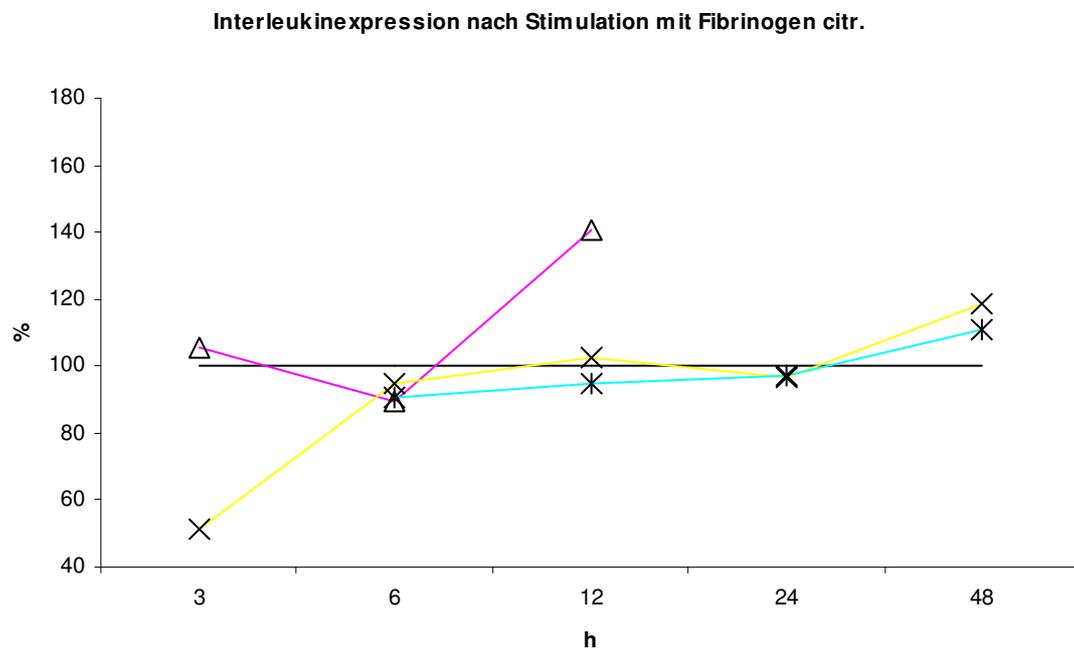


Abb. 13: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit citr. Fibrinogen. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  IL-6 im Überstand von stimulierten HMVEC-Kulturen,  $\times$  IL-6 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen, \* IL-10 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen

#### **4.2.1.13. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit Immunglobulin G (Abb. 14 und 15)**

Bei der Inkubation von humanen aortalen Zellen mit IgG zeigte sich eine Steigerung der sE-Selektin-Konzentration im Überstand. Nach 3h betrug diese 117% und erreichte den höchsten Wert nach 6h (145%). Nach 12h kam es wieder zu einem Rückgang der Konzentration auf 115%. Die weiteren Werte zeigten sich relativ konstant und leicht erhöht mit 120% nach 24h und 112% nach 48h.

Auch die sICAM-1-Konzentration erreichte ihren Maximalwert nach 6h (151%). Zu allen anderen Messzeitpunkten variierte die Konzentration geringfügig bei +/- 4% Punkten.

Auch die sVCAM-1-Konzentrationen zeigten geringe Schwankungen nach Einwirken von IgG von max. +/- 8% (12h).

Die Stimulation der HAEC-Kulturen mit IgG zeigte eine geringfügige Verringerung der IL-6 Konzentrationen im Überstand nach 3h von 91%. Danach kam es zu einem deutlichen Anstieg auf 512% nach 6h. Auch nach 12h konnte eine stark erhöhte Konzentration von 441% gemessen werden. Das Maximum wurde mit 706% nach 24h erreicht bevor die Werte nach 48h wieder auf 457% sanken.

Der IL-10-Gehalt im Überstand zeigte weniger starke Veränderungen. Nach 6h konnten 114% gemessen werden. Danach sank der Wert auf 92% (12h und 24h), bevor nach 48h 100% gemessen werden konnten.

#### **4.2.1.14. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit Immunglobulin G (Abb. 14 und 15)**

Die Inkubation der HMVEC-Kulturen mit IgG führte zu einer verringerten Konzentration von 83% an gelöstem sE-Selektin im Zellüberstand nach 3h. Ein deutlicher, stimulierender Einfluss konnte nach 6h festgestellt werden (140%), der nach 12h noch abgeschwächt vorhanden war (111%).

Im Vergleich hierzu zeigte die Konzentration an gelöstem sICAM-1 im Überstand schon nach 3h einen Maximalwert von 147%. Bei den weiteren Messungen nach 6h und nach 12h lagen die Werte bei deutlich geringeren 84% bzw. 94%.

Bei der Stimulation der mikrovaskulären Zellen mit IgG konnte keine Veränderung des sVCAM-1-Gehaltes im Überstand festgestellt werden.

Die Stimulation der HMVEC-Kulturen zeigte eine deutliche Steigerung der IL-6-Menge im Überstand nach 3h auf 171% der Vergleichskultur. Hingegen war es nach 6h zu einer Abnahme auf 89% gekommen. Jedoch zeigte sich nach 12h wieder eine Steigerung auf 129%.

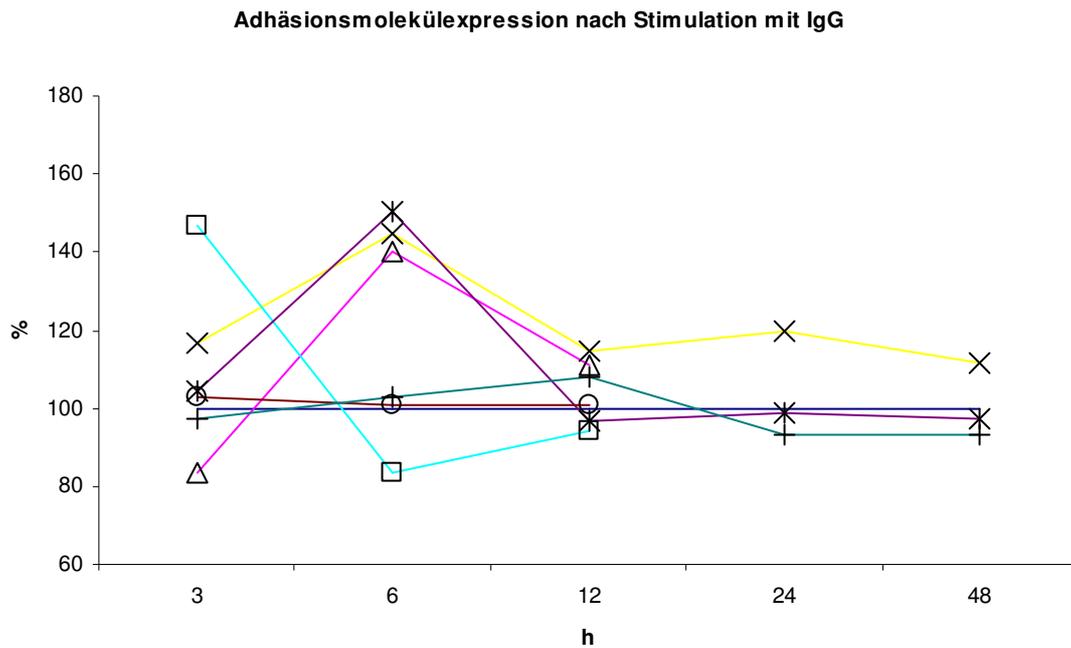


Abb. 14: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit IgG. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz, Δ sE-Selektin HMVEC, × sE-Selektin HAEC, □ sICAM-1 HMVEC, \* sICAM-1 HAEC, ○ sVCAM-1 HMVEC, + sVCAM-1 HAEC

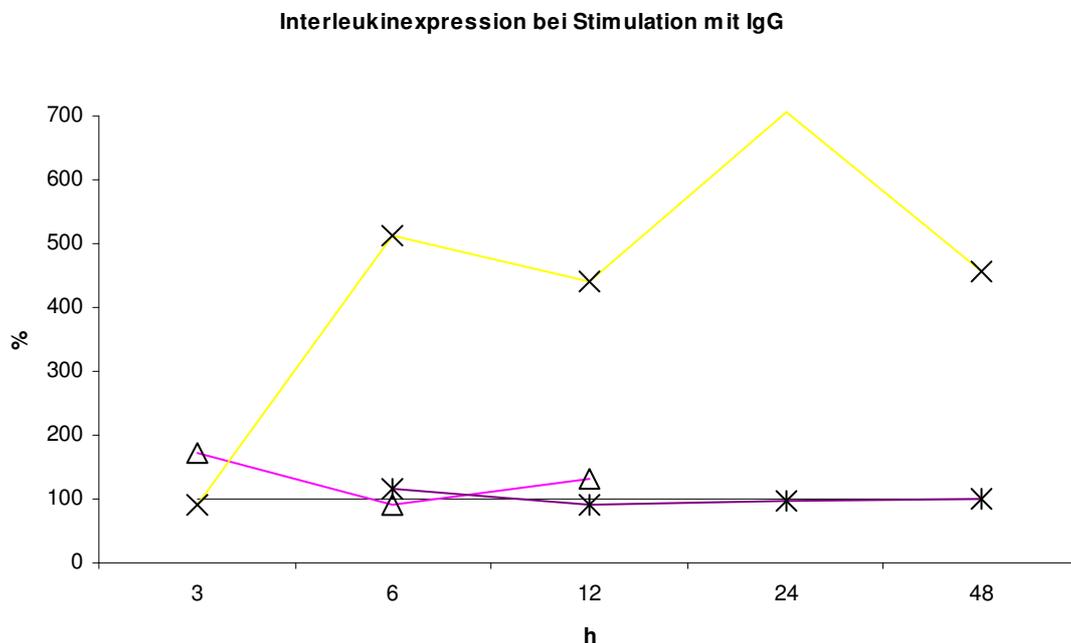


Abb. 15: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit IgG. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz, Δ IL-6 im Überstand von stimulierten HMVEC-Kulturen, × IL-6 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen, \* IL-10 im Überstand von stimulierten HAEC-Kulturen

#### **4.2.1.15. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit IgG-Peptid P3**

Die Inkubation von HAE-Zellen mit dem IgG-gekoppelten Peptid P3 zeigte nach 3h einen sE-Selektin-Gehalt im Überstand von 142%. Im Gegensatz dazu konnte nach 6h nahezu keine Konzentrationsveränderung festgestellt werden (98%). Allerdings zeigte sich ein Wiederanstieg auf 137% nach 12h. Nach 24h war es zu einem erneuten Abfall auf 86% gekommen und nach 48h konnten wiederum 127% gemessen werden.

Im Vergleich zu sE-Selektin nahm die sICAM-1-Konzentration einen gegensätzlichen Verlauf. Nach 3h wurden 89% gemessen, dann kam es zu einem Anstieg nach 6h auf 140%. Die Messung nach 12h ergab einen Abfall auf 94% und nach 24h einen Anstieg auf 111%, bevor nach 48h wieder nur 89% im Vergleich zur Kontrollkultur vorhanden waren. Die sVCAM-1-Konzentrationen zeigten keine ausgeprägten Abweichungen zur Kontrollkultur.

Die Stimulation der HAEC mit IgG-P3 zeigte eine stetige aber geringe Zunahme der IL-6-Konzentration im Überstand. Nach 3h lag der Wert bei 81%. Nach 6 und 12h waren keine deutlichen Abweichungen zur Kontrolle zu beobachten (103 bzw. 104%). Nach 24h betrug die Konzentration 115% und erreichte ein Maximum nach 48h mit 123%.

Die Konzentration an gelöstem IL-10 im Überstand zeigte ein Maximum nach 6h (118%), wonach es zu einer Abnahme auf 103% kam (12h). Nach weiteren 12h konnten nur noch 92% gemessen werden, jedoch zeigte sich nach 48h ein Wiederanstieg auf 111%.

#### **4.2.1.16. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit IgG-Peptid P3**

Die Stimulation der HMVEC-Kulturen zeigte zunächst einen verringerten Gehalt an löslichem E-Selektin von 81% nach 3h. Hingegen war die Konzentration nach 6h auf 132% gestiegen und lag nach 12h wieder ungefähr im Bereich der Kontrollkultur (103%).

Die Menge an sICAM-1 im Überstand nach Stimulation mit IgG-P3 lag nach 3h bei 87% der Vergleichskultur. Auch nach 6 und 12h bewegte sie sich im Bereich der Kontrollkultur (94% bzw. 104%).

Der sVCAM-1-Gehalt im Überstand betrug zu allen Messzeiten 101% des Vergleichswertes.

Die IL-6-Konzentrationen im Überstand hatten ein Maximum von 148% nach 3h. Im Gegensatz dazu konnten nach 6h nur noch 83% gemessen werden. Nach 12h wurde eine Konzentration von 127% im Vergleich zur Kontrolle bestimmt.

**4.2.1.17. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit IgA (Abb. 16 und 17)**

Eine Stimulation von humanen aortalen Zellen mit IgA erfolgte nur über den Zeitraum von 3h. Die sE-Selektin-Konzentration erreichte bei diesem Versuchsaufbau 127%.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die sICAM-1-Konzentration leicht verringert bei 91%. Außerdem wurde ein nahezu unveränderter sVCAM-1-Gehalt im Überstand von 99% gemessen.

Die Bestimmung der IL-6-Konzentration im Überstand nach 3h ergab 92%.

**4.2.1.18. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit IgA (Abb. 16 und 17)**

Ähnlich wie bei der Stimulation von HAEC-Kulturen mit IgA zeigte sich bei den mikrovaskulären Zellen eine erhöhte sE-Selektin-Konzentration im Überstand nach 3h (145%). Auch nach 6 und 12h waren die gemessenen sE-Selektinwerte mit 191% bzw. 175% deutlich erhöht.

Der sICAM-1-Gehalt im Überstand zeigte eine Verstärkung nach 3h (127%). Nach 6h konnten allerdings nur noch 94% festgestellt werden und auch nach 12h gab es nur geringfügige Abweichungen zur Kontrolle auf 106%.

Die gemessenen sVCAM-1-Konzentrationen zeigten zu allen Messzeitpunkten keine ausgeprägten Schwankungen zur Kontrollkultur.

Die Inkubation der HMVEC-Kulturen mit IgA führte nach 3h zu einem IL-6-Gehalt von 158%. Die Messung nach 6h zeigte eine Konzentration von 89%. Im Gegensatz dazu kam es nach 12h wieder zu einer Zunahme auf eine Konzentration von 130%.

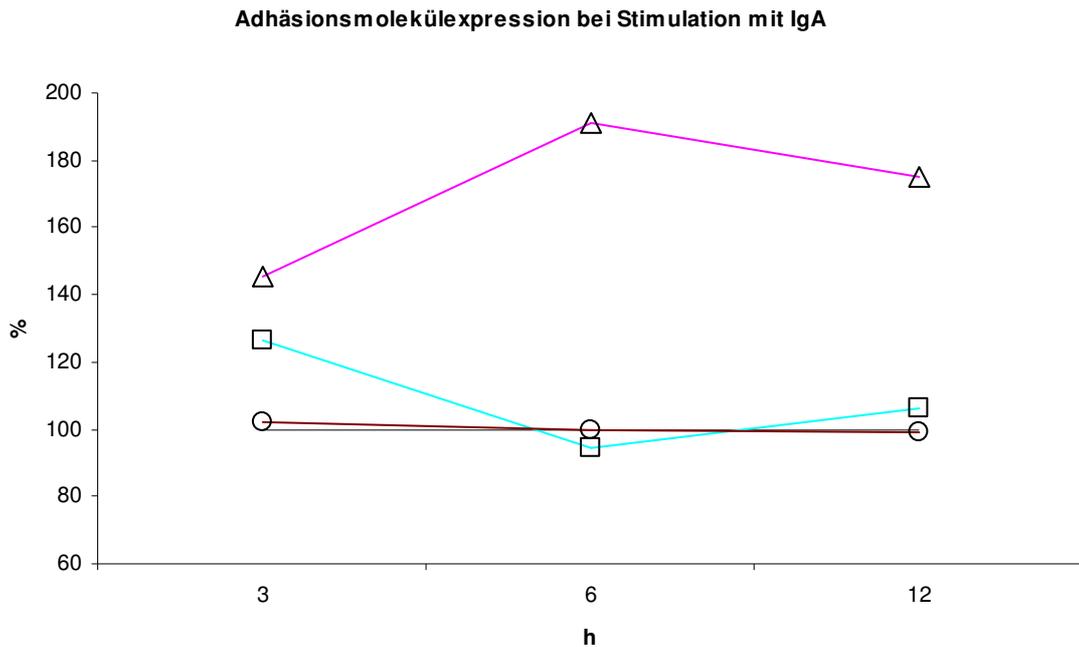


Abb. 16: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit IgA. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz, Δ sE-Selektin HMVEC, × sE-Selektin HAEC, □ sICAM-1 HMVEC, \* sICAM-1 HAEC, ○ sVCAM-1 HMVEC, + sVCAM-1 HAEC

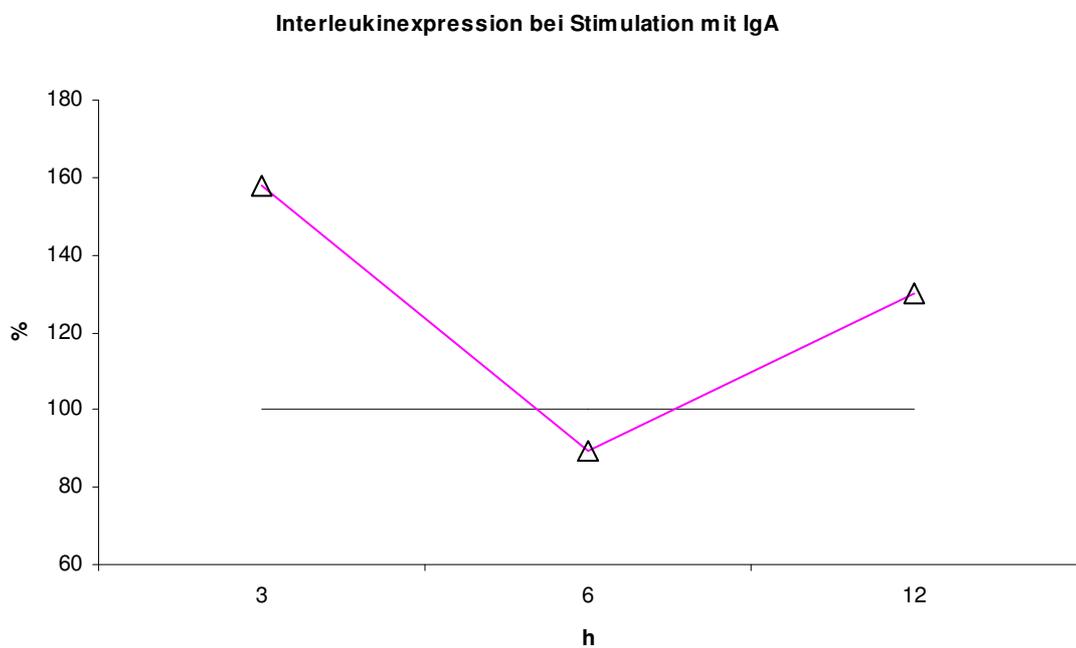


Abb. 17: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit IgA. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz, Δ IL-6 im Überstand von stimulierten HMVEC-Kulturen

#### **4.2.1.19. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit IgM (Abb. 18 und 19)**

Auch die Stimulation der HAEC-Kulturen mit IgM wurde über einen Zeitraum von 3h vorgenommen. Dabei zeigte die Konzentrationsbestimmung von sE-Selektin im Überstand einen deutlich erhöhten Wert von 239%. Die sICAM-1 und sVCAM-1-Werte zeigten sich mit Konzentrationen von 98% bzw. 100% nahezu unverändert.

Der IL-6-Gehalt im Überstand lag nach 3h bei 64%.

#### **4.2.1.20. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit IgM (Abb. 18 und 19)**

Für humane mikrovaskuläre Zellen konnte eine Auswertung über die Versuchszeiträume von 3h, 6h und 12h durchgeführt werden. Dabei zeigte sich eine Zunahme der sE-Selektin-Konzentration von 121% nach 3h, über 127% nach 6h bis auf 150% nach 12h.

Nach Stimulation der HMVEC-Kulturen mit IgM zeigten sich nur geringfügige Konzentrationsänderungen von sICAM-1 nach 3h und 6h (103% bzw. 107%). Erst nach 12h konnte eine deutlichere Steigerung auf 134% festgestellt werden.

Die sVCAM-1-Konzentration im Überstand zeigte kaum Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollkulturen.

Hingegen zeigte sich die Konzentration von IL-6 im Überstand erhöht. Dabei konnten nach 3h 133% gemessen werden. Nach 6h kam es zu einem weiteren leichten Anstieg auf 136%. Die höchste IL-6-Konzentration im Überstand der HMVEC-Kulturen wurde nach 12h gemessen (194%).

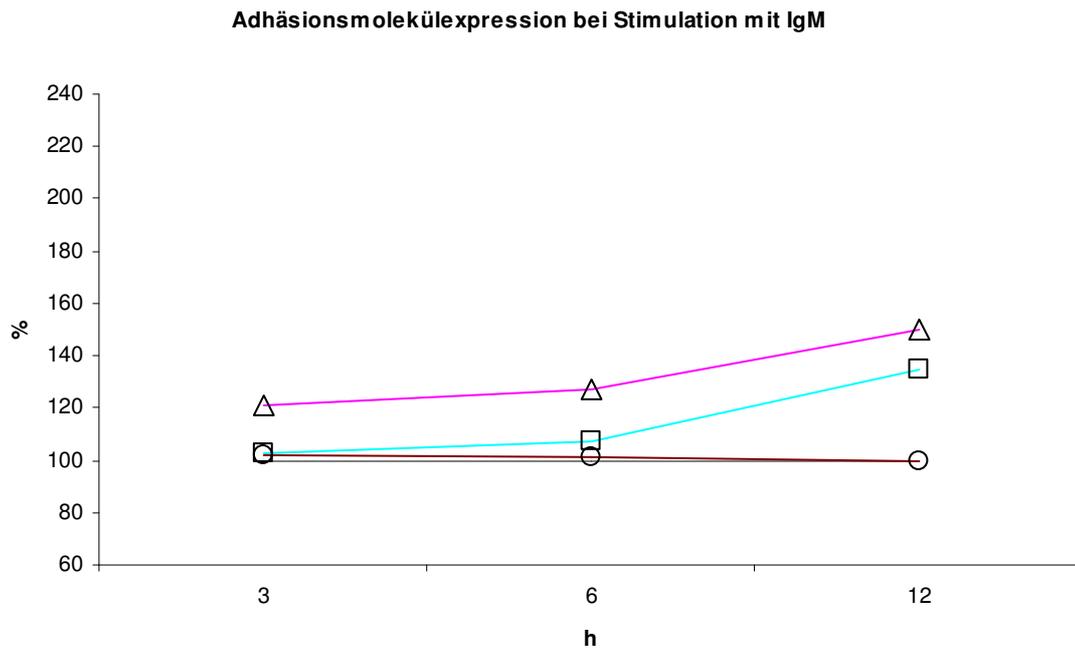


Abb. 18: Verlauf des Adhäsionsmolekülgehaltes im Überstand nach Stimulation mit IgM. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  sE-Selektin HMVEC,  $\times$  sE-Selektin HAEC,  $\square$  sICAM-1 HMVEC,  $*$  sICAM-1 HAEC,  $\circ$  sVCAM-1 HMVEC,  $+$  sVCAM-1 HAEC

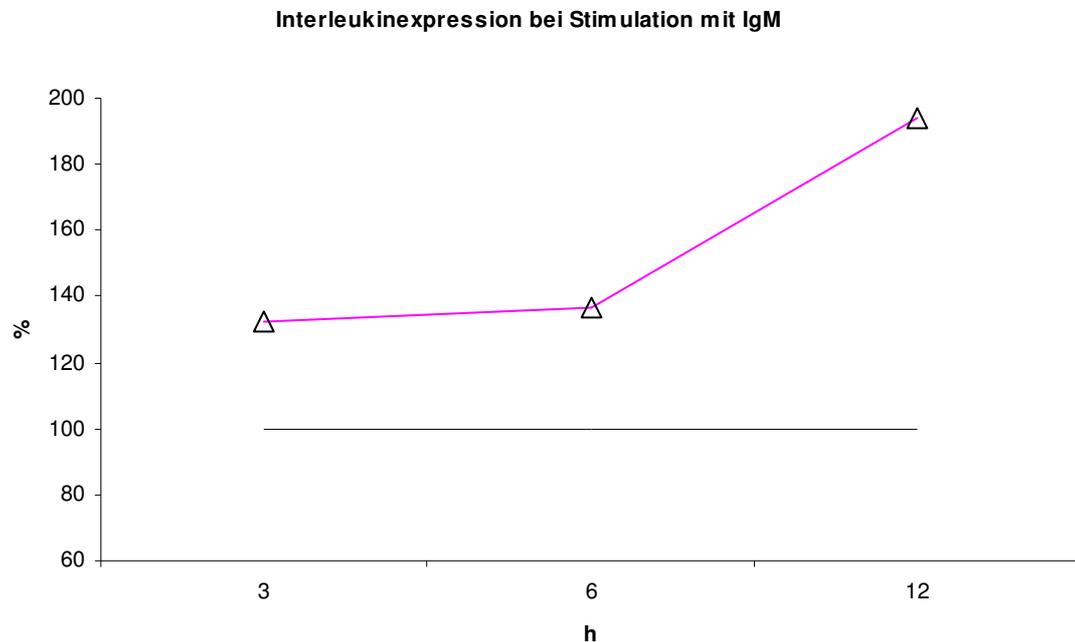


Abb. 19: Verlauf des Interleukingehaltes im Überstand nach Stimulation mit IgM. Zeichenerklärung: – unstimulierte Kultur als Referenz,  $\Delta$  IL-6 im Überstand von stimulierten HMVEC-Kulturen

#### **4.2.1.21. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HAEC-Kulturen mit IL-15**

Die Inkubation der HAEC-Kulturen mit IL-15 führte insgesamt zu einer Steigerung der sE-Selektin-Konzentration im Überstand. Nach 6h lag diese bei 135%. Im Vergleich dazu konnte nach 12h und 24h eine geringere Konzentration gemessen werden (122% bzw. 106%). Erst nach 48h kam es wieder zu einer deutlichen Zunahme (165%).

Auch die Konzentration des löslichen sICAM-1 im Überstand war nach 3h vergleichbar mit der sE-Selektin-Konzentration. Sie betrug 131%. Bei den Messungen nach 12h, 24h und 48h lag die sICAM-1-Menge im Überstand im Bereich der Kontrollkulturen.

Auch die Bestimmung der sVCAM-1-Konzentration zeigte Werte, die alle im Bereich der Kontrollkulturen lagen.

Bei der Überprüfung der IL-6-Konzentrationen im Überstand zeigten sich nach 6h 116%, der 12h-Wert betrug 121%. Nach 24h zeigte sich wiederum eine Abnahme auf 113%. Auch nach 48h lag der gemessene Wert mit 121% in einem vergleichbaren Rahmen.

Nach der Inkubation der HAEC-Kulturen mit IL-15 verringerte sich die IL-10-Konzentration im Überstand nach 12h auf 73%. Alle anderen gemessenen Werte lagen im Bereich der Kontrollkulturen.

#### **4.2.1.22. Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Überstand nach Stimulation von HMVEC-Kulturen mit IL-15**

Die Inkubation von HMVEC-Kulturen mit IL-15 zeigte eine sE-Selektin-Konzentration nach 3h von 73%. Die Messungen nach 6h lag mit 93% auf dem Niveau der Kontrollkulturen und zeigte erst nach 12h eine Steigerung auf 118%.

Die Bestimmung der sICAM-1-Moleküle im Überstand ergab nach 3h keinen deutlichen Unterschied zu den nicht-stimulierten Kulturen. Die über 6h stimulierten Kulturen wiesen eine Konzentration von 110% auf. Nach 12h sank die Konzentration auf 104%.

Die sVCAM-1-Konzentration zeigte nahezu keine Abweichung im Vergleich zur Kontrolle.

#### 4.2.2. Vergleich der Adhäsionsmolekülkonzentrationen im Überstand

Die Inkubation von primären Endothelzellkulturen mit Autoantigenen der RA führte teilweise zu deutlichen Konzentrationsveränderungen von sE-Selektin, sICAM-1, IL-6 und IL-10 im Zellüberstand. Dabei konnte jedoch eine hohe Variabilität der Werte festgestellt werden. Dies betraf sowohl Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Zellarten, als auch Unterschiede zwischen verschiedenen Stimulationszeiträumen. Des Weiteren waren die Ergebnisse nicht immer eindeutig reproduzierbar. Um die Aussagekraft der Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurden diese einer statistischen Analyse unterzogen. Die Konzentrationsunterschiede der Adhäsionsmoleküle und Interleukine im Zellüberstand einer stimulierten Kultur zur unstimulierten Kontrollkultur wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p \leq 0,05$ ) als signifikant angenommen.

##### 4.2.2.1. sE-Selektin-Konzentrationen im Überstand von HAEC- und HMVEC-Kulturen

###### HAEC

Ein ausgeprägter Einfluss auf die Abgabe von E-Selektin in den Überstand bei humanen aortalen Endothelzellkulturen konnte vor allem nach Stimulation mit IgM (239%) nach 3h gezeigt werden ( $p \leq 0,05$ ) (Abb. 20). Weitere signifikante Veränderungen der Menge an gelöstem E-Selektin zeigten sich bei den Antigenen BSA citr. (156%), anti-Calpain (178%) und IgG-P3 (156%) ( $p$  jeweils  $\leq 0,05$ ). Allerdings bestanden bei diesem Versuchsansatz auch die größten Variationen. Die Standardabweichung erreichte bei der Stimulation mit Fibrinogen 71%.

Nach 6h zeigte sich eine signifikante Zunahme an gelöstem E-Selektin im Überstand nach Stimulation mit IgG (145%,  $p \leq 0,05$ ).

Signifikant erhöhte Werte bestanden nach 12-stündiger Stimulation mit Fibrinogen (122%,  $p \leq 0,05$ ), IgG-P3 (137%,  $p \leq 0,05$ ) und IL-15 (122%,  $p \leq 0,05$ ). Nach 24h ergaben sich wieder signifikant erhöhte Werte bei Stimulation mit IgG (120%,  $p \leq 0,05$ ), während nach 48h keine signifikanten Abweichungen mehr gemessen werden konnten.

###### HMVEC

Nach Inkubation von HMVEC-Kulturen mit den verschiedenen Antigenen konnten nach 3h keine signifikanten Konzentrationsänderungen an gelöstem E-Selektin im Überstand gemessen werden.

Nach 6-stündiger Inkubation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration durch Stimulation mit citrulliniertem Fibrinogen (179%,  $p=0,042$ ), IgG (140%,  $p=0,02$ ),

IgA (190%,  $p=0,02$ ) und IgM (127%,  $p=0,028$ ) (s. Abb. 21). Nach 12-stündiger Antigenexposition bestanden signifikant erhöhte Konzentrationen nach Stimulation mit den Antigenen Fibrinogen (176%), IgA (175%,  $p=0,021$ ) und IgM (150%,  $p=0,029$ ) (s. Abb. 22).

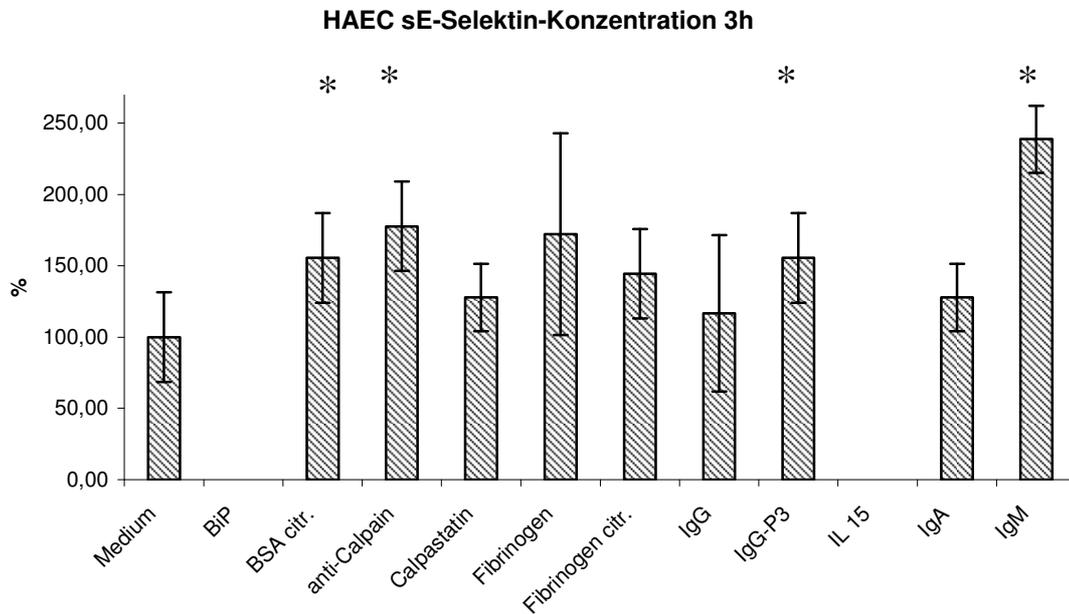


Abb. 20: Mittelwert und Standardabweichung der sE-Selektin-Konzentration in den Überständen nach 3h Inkubation von HAEC-Kulturen ( $n=3$ ), \* Erreichen des Signifikanzniveaus ( $p \leq 0,05$ )

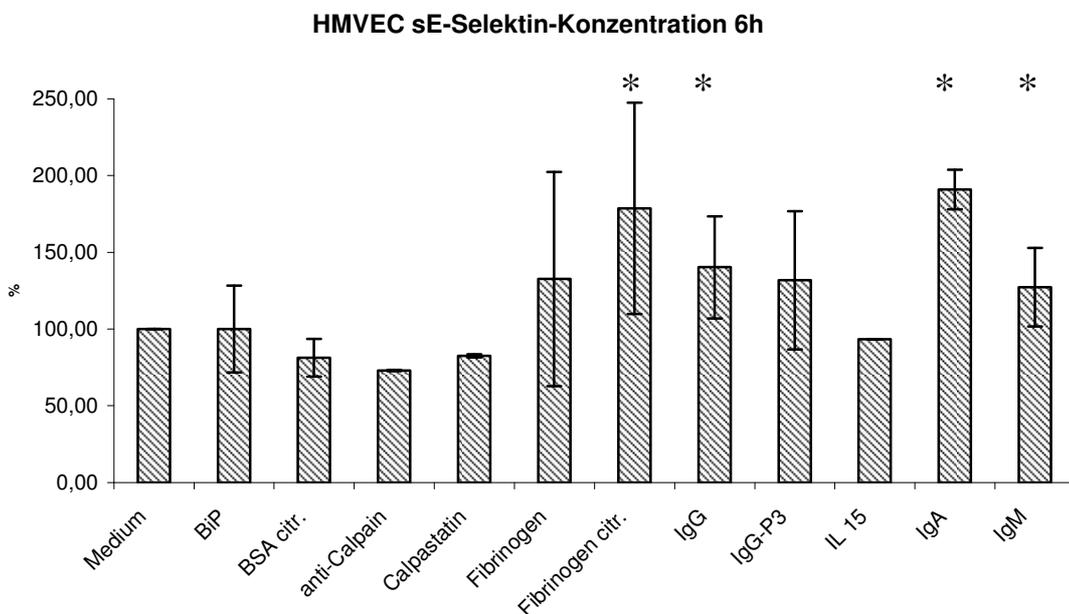


Abb. 21: Mittelwert und Standardabweichung der sE-Selektin-Konzentration im Überstand nach 6h Inkubation von HMVEC-Kulturen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen, ( $n=4$ ), \* Erreichen des Signifikanzniveaus ( $p \leq 0,05$ )

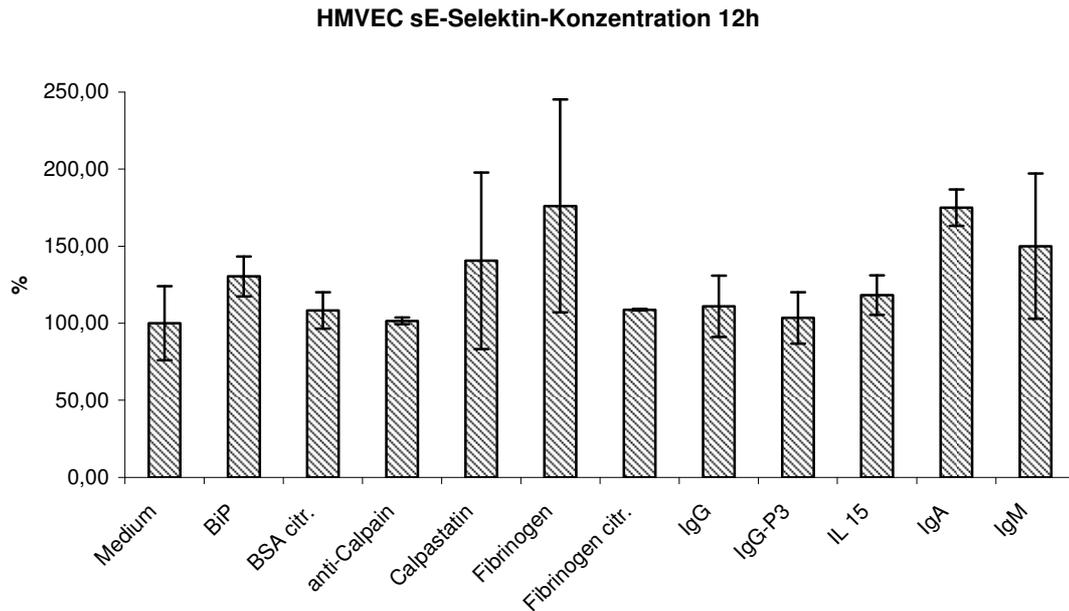


Abb. 22: Mittelwert und Standardabweichung der sE-Selektin-Konzentration im Überstand bei 12h Inkubation von HMVEC-Kulturen mit verschiedenen Antigenen, (n=4), \* Erreichen des Signifikanzniveaus ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.2.2.2. sICAM-1-Konzentrationen im Überstand von HAEC- und HMVEC-Kulturen

##### Humane aortale Zellkulturen (HAEC)

Nach 3-stündiger Antigenexposition der HAEC konnten folgende signifikante Verringerungen der sICAM-1-Konzentration im Überstand festgestellt werden: citr. BSA (86%,  $p=0,037$ ), anti-Calpain (84%,  $p=0,025$ ), Fibrinogen (91%,  $p=0,025$ ), citr. Fibrinogen (91%,  $p=0,037$ ), IgA (91%,  $p=0,025$ ) und IgG-P3 (89%,  $p=0,037$ ).

Nach 6-stündiger Stimulation bestanden signifikante Konzentrationssteigerungen bei allen Antigenen: BiP (109%,  $p=0,037$ ), citr. BSA (113%,  $p=0,037$ ), anti-Calpain (119%,  $p=0,037$ ), Calpastatin (128%,  $p=0,037$ ), Fibrinogen (136%,  $p=0,037$ ), citr. Fibrinogen (143%,  $p=0,025$ ), IgG (151%,  $p=0,037$ ), IgG-P3 (140%,  $p=0,025$ ) und IL-15 (131%,  $p=0,037$ ) (s. Abb. 23).

Auch nach 12-stündiger Stimulation der HAEC zeigten sich signifikante Veränderungen der sICAM-1-Konzentrationen in den Zellüberständen. Zu erhöhten Konzentrationen kam es nach Stimulation mit BiP (110%,  $p \leq 0,05$ ), citr. BSA (113%,  $p \leq 0,05$ ) und IL-15 (104%,  $p=0,037$ ). Hingegen kam es zu einer Abnahme des sICAM-1-Gehaltes im Überstand nach Einwirken von IgG-P3 (94%,  $p \leq 0,05$ ) (s. Abb. 24).

Nach 24h zeigten sich signifikant erhöhte Konzentrationen nach Stimulation mit BiP (112%,  $p=0,037$ ), citr. BSA (119%,  $p=0,037$ ), anti-Calpain (126%,  $p=0,037$ ) und IgG-P3

(111%,  $p=0,037$ ). Signifikant verringerte Werte konnten hingegen bei Calpastatin, (87%,  $p=0,037$ ), Fibrinogen (89%,  $p=0,037$ ) und citr. Fibrinogen (90%,  $p=0,037$ ) gemessen werden.

Die 48-stündige Stimulation ergab gegenüber dem sICAM-1-Mediumwert signifikant verringerte sICAM-1-Konzentrationen bei den Antigenen BSA citr. (63%,  $p\leq 0,05$ ), anti-Calpain (75%,  $p=0,046$ ), Calpastatin (74%,  $p=0,05$ ), Fibrinogen citr. (85%,  $p\leq 0,05$ ) und IgG-P3 (89%,  $p\leq 0,05$ ). Eine Konzentrationssteigerung konnte nach Stimulation mit BiP (105%,  $p=0,046$ ) und IL-15 (107%,  $p\leq 0,05$ ) gemessen werden.

### Humane mikrovaskuläre Zellkulturen (HMVEC)

Die Auswertung der sICAM-1-Konzentrationen im Überstand der HMVEC-Kulturen zeigte große Unterschiede bei der Verteilung der Ergebnisse. Signifikante Veränderungen bestanden nach 3-stündiger Stimulation mit IgA (127%,  $p=0,019$ ). Des Weiteren zeigten sich nach 6h erhöhte Konzentrationen nach Exposition der Kulturen mit BiP (118%,  $p=0,019$ ). Die Auswertung des 12-stündigen Stimulationszeitraumes zeigte eine signifikant verringerte Konzentration an sICAM-1 im Überstand durch Stimulation mit citr. Fibrinogen (83%,  $p=0,042$ ). Eine Steigerung der sICAM-1-Konzentration nach 12h konnte im Kulturansatz mit IgM (134%,  $p=0,019$ ) nachgewiesen werden.

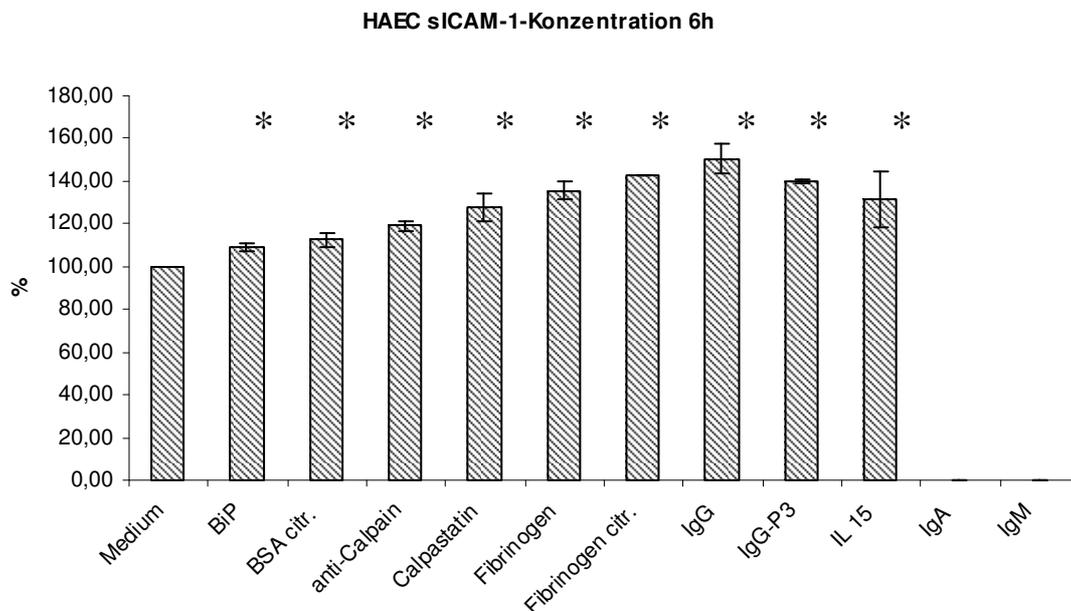


Abb. 23: Mittelwert und Standardabweichung der sICAM-1-Konzentration im Überstand nach 6h Inkubation von HAEC-Kulturen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen ( $n=3$ ), \* Erreichen des Signifikanzniveaus ( $p\leq 0,05$ )

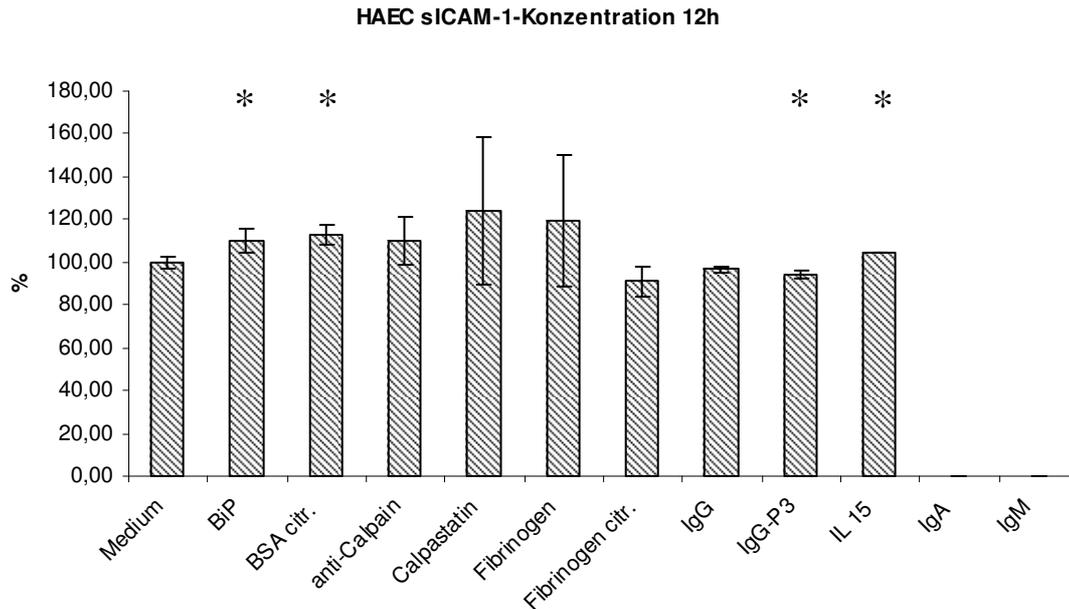


Abb. 24: Mittelwert und Standardabweichung der sICAM-1-Konzentration im Überstand nach 12h Inkubation von HAEC-Kulturen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen ( $n=3$ ), \* Erreichen des Signifikanzniveaus ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.2.1.3. sVCAM-1-Konzentrationen im Überstand von HAEC- und HMVEC-Kulturen

s

Beide Endothelzellarten zeigten bei keinem der verwendeten Antigene zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Erhöhung oder Verminderung von sVCAM-1 im Überstand im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollkulturen. Diese Non-Sensitivität konnte in mehreren Versuchen bestätigt werden und zeigte sich sowohl im R&D Systems Parameter<sup>®</sup> ELISA, als auch im sensitiveren R&D Systems Quantikine<sup>®</sup>.

#### 4.2.3. Vergleich der Interleukinkonzentrationen im Überstand

##### 4.2.3.1. IL-6-Konzentrationen im Überstand von HAEC- und HMVEC-Kulturen

###### Humane aortale Zellkulturen (HAEC)

Nach 3h Stimulation der Zellkulturen zeigte die Untersuchung des Überstandes eine signifikante Verringerung der IL-6-Konzentration bei Inkubation mit anti-Calpain (57%,  $p \leq 0,05$ ), Calpastatin (49%,  $p \leq 0,05$ ), Fibrinogen (56%,  $p \leq 0,05$ ), citr. Fibrinogen (51%,  $p \leq 0,05$ ) und IgM (64%,  $p \leq 0,05$ ). Es bestand auch bei keinem weiteren Antigen eine Zunahme der IL-6-Konzentration im Überstand.

Im Gegensatz dazu konnte nach 6h, 12h, 24h und 48h durch Stimulation mit den Antigenen BiP und IgG eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentrationen in den Zellüberständen beobachtet werden. Die Konzentration erreichte bei IgG nach 24h mit 706% die größte Steigerung, unter dem Einfluss von BiP wurde mit 217% nach 12h die höchste Konzentration erreicht ( $p$  jeweils  $\leq 0,05$ ). Auch die Stimulation der HAEC-Kulturen mit IL-15 führte zu einer signifikanten Konzentrationssteigerung auf 120% nach 12h ( $p \leq 0,05$ ). Das Signifikanzniveau lag hierbei bei  $p \leq 0,05$  (Abb. 25).

#### **Humane mikrovaskuläre Zellkulturen (HMVEC)**

Nach Stimulation der mikrovaskulären Zellen ergaben sich nach 3h signifikant höhere IL-6-Konzentrationen im Zellüberstand bei den Antigenen BSA citr. (164%,  $p \leq 0,05$ ), Calpastatin (142%,  $p \leq 0,05$ ), IgG (171%,  $p \leq 0,05$ ), IgG-P3 (148%,  $p \leq 0,05$ ), IgA (158%,  $p \leq 0,05$ ) und IgM (133%,  $p \leq 0,05$ ).

Nach 6h zeigte sich eine Abnahme der IL-6-Konzentration im Überstand bei der Inkubation mit Fibrinogen (79%,  $p \leq 0,05$ ). Nach 12h Inkubation zeigten sich wiederum signifikant höhere Konzentrationen nach Inkubation mit citr. Fibrinogen (141%,  $p \leq 0,05$ ) und IgM (194%,  $p \leq 0,05$ ).

#### **4.2.3.2. IL-10-Konzentrationen im Überstand von HAEC-Kulturen**

Der Vergleich der IL-10-Konzentration im Medium von HAE-Zellen zeigte eine signifikante Verringerung 6h nach Exposition mit Fibrinogen (88%,  $p = 0,037$ ). Eine Erhöhung der Konzentration trat im Zellüberstand des IgG-P3-stimulierten Zellkulturansatzes auf.

Eine Verringerung der IL-10-Konzentration im Zellüberstand konnte auch nach 12h in den Kulturansätzen mit Calpastatin (84%,  $p = 0,037$ ), Fibrinogen (78%  $p = 0,037$ ) und IL-15 (73%,  $p \leq 0,05$ ) gemessen werden.

Die 24-stündige Inkubation zeigte ebenfalls Verringerungen der IL-10-Konzentrationen in den Kulturansätzen mit BiP (82%,  $p \leq 0,05$ ), citrulliniertem BSA (79%,  $p \leq 0,05$ ) und anti-Calpain (68%,  $p \leq 0,05$ ). Nach 48h konnten wiederum leicht erhöhte Konzentrationen nach Stimulation mit citrulliniertem Fibrinogen und IgG-P3 (jeweils 111%,  $p \leq 0,05$ ) verzeichnet werden.

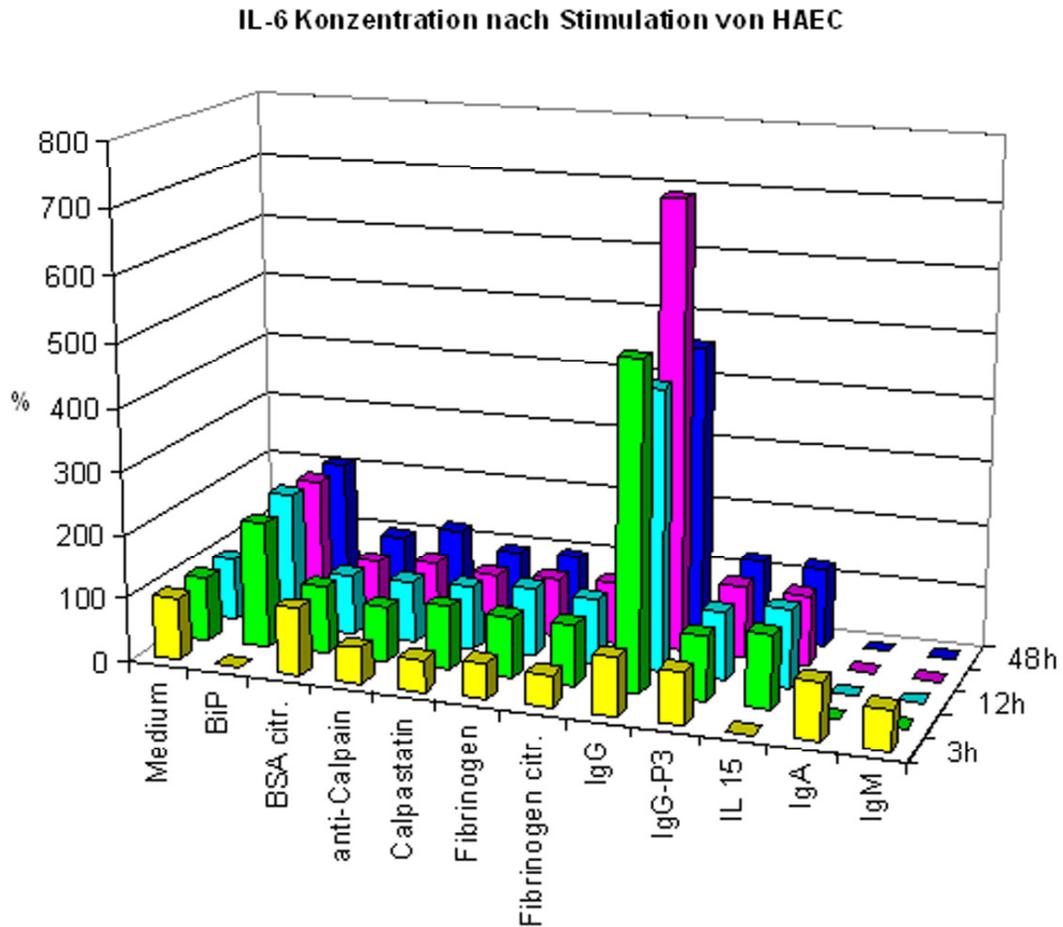


Abb. 25: *IL-6 Expression von aortalen Endothelzell-Kulturen (HAEC) nach Inkubation mit RA-Antigenen nach 3h (gelb), 6h (grün), 12h (hellblau), 24h (rosa), 48h (dunkelblau) in Prozent im Vergleich zur Konzentration unstimulierter Zellkulturen (n=3). Signifikante Konzentrationszunahme bei Stimulation mit BiP und IgG nach 6, 12, 24 und 48h. Signifikante Abnahme nach 3h bei anti-Calpain, Calpastatin, Fibrinogen, citr. Fibrinogen und IgM.*

### 4.3. Adhäsionsmolekülnachweis im Western Blot

Zur qualitativen Analyse der membranständigen sE-Selektin-, sICAM-1- bzw. sVCAM-1-Moleküle wurden HMVEC-Kulturen nach Beendigung des Versuches nach 3h, 6h oder 12h mit 8M Harnstoff lysiert und eingefroren.

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die anschließende Umsetzung zeigte unabhängig von der Inkubationszeit oder dem Adhäsionsmolekül die gleichen Banden. Jeweils nur bei anti-Calpain bestanden positive Banden im Bereich von 85kD. Abbildung 26 zeigt exemplarisch einen derartigen Blot. Alle anderen Banden entsprachen exakt der Bandengröße der Markerproteine.

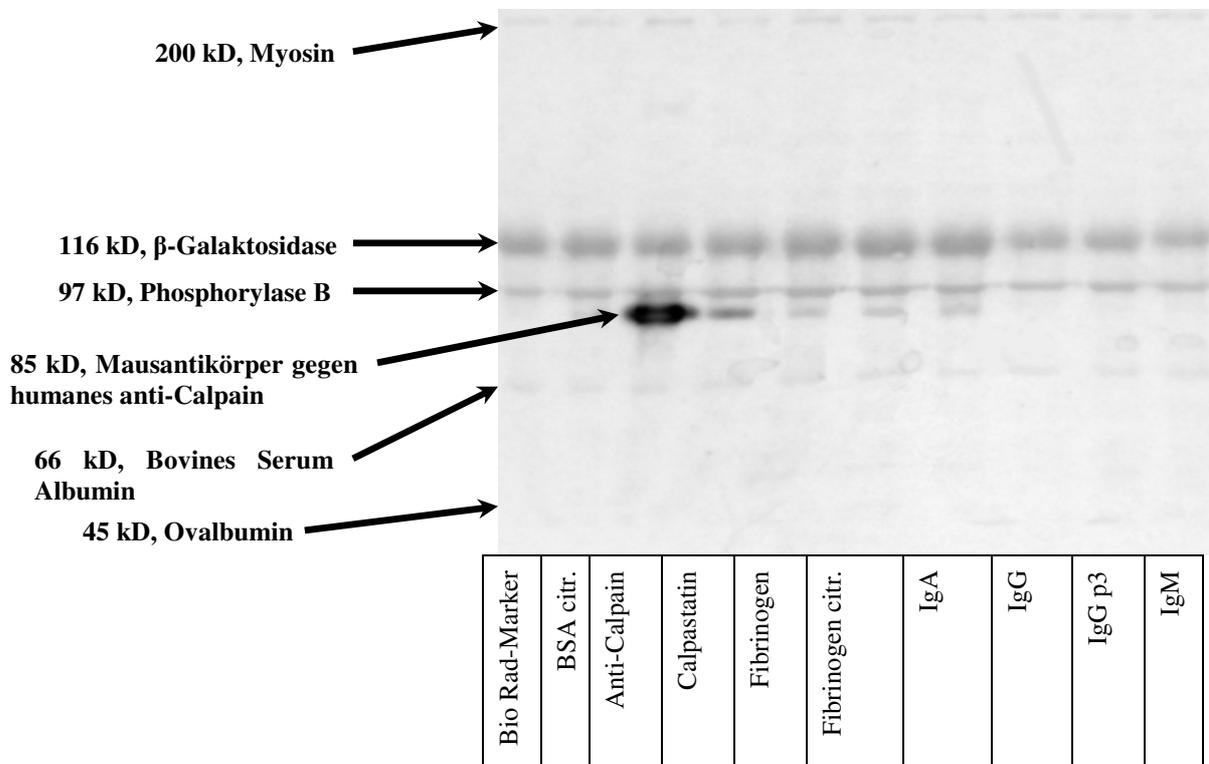


Abb. 26: Western Blot der Zelllysate humaner mikrovaskulärer Zellen nach 3h Stimulation. Erstantikörper: anti-human monoklonaler IgG-Maus-Antikörper gegen E-Selektin. Zweitantikörper: HRP-gekoppelter anti-Maus. Die Beschriftung nennt die Größe der Markerproteine. Die starke Bande bei 85 kD bei anti-Calpain-Proteinen entsteht durch einen bei der Stimulation der Zellkulturen verwendeten Anti-Calpain-Maus-Antikörper, der hier vom Zweitantikörper gebunden wird.

#### 4.4. Proliferationsverhalten humaner mikrovaskulärer Endothelzellkulturen unter Antigeneinfluss

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der HMVEC-Kulturen wurde durch den Einbau von [Methyl-3H]-Thymidin in die DNA der Zellen untersucht.

Die Kulturen wurden mit den verschiedenen Antigenen inkubiert und über 3h und 6h im CO<sub>2</sub>-Schrank gelagert. Nach der Stimulation erfolgte die Quantifizierung der Proliferation durch die Messung der inkorporierten Menge an [Methyl-3H]-Thymidin in die zelluläre DNA, die anhand der Zerfälle im Top Count Mikroplate Scintillation Counter bestimmt wurde (Abb. 27).

Nach 3h zeigte sich gegenüber der Negativkontrolle eine signifikant verringerte Zellteilung bei Stimulation mit anti-Calpain (79%), IgG (77%) und IgM (61%). Eine signifikant erhöhte Proliferation konnte hingegen bei IL-15 (128%) gemessen werden.

Der 6-stündige Versuchsansatz ergab geringfügig verringerte Werte bei citr. BSA (96%) und mäßig erhöhte Zellteilungsraten wurden nach Inkubationen mit den Antigenen BiP (113%), anti-Calpain (104%) und Calpastatin (116%) gemessen.

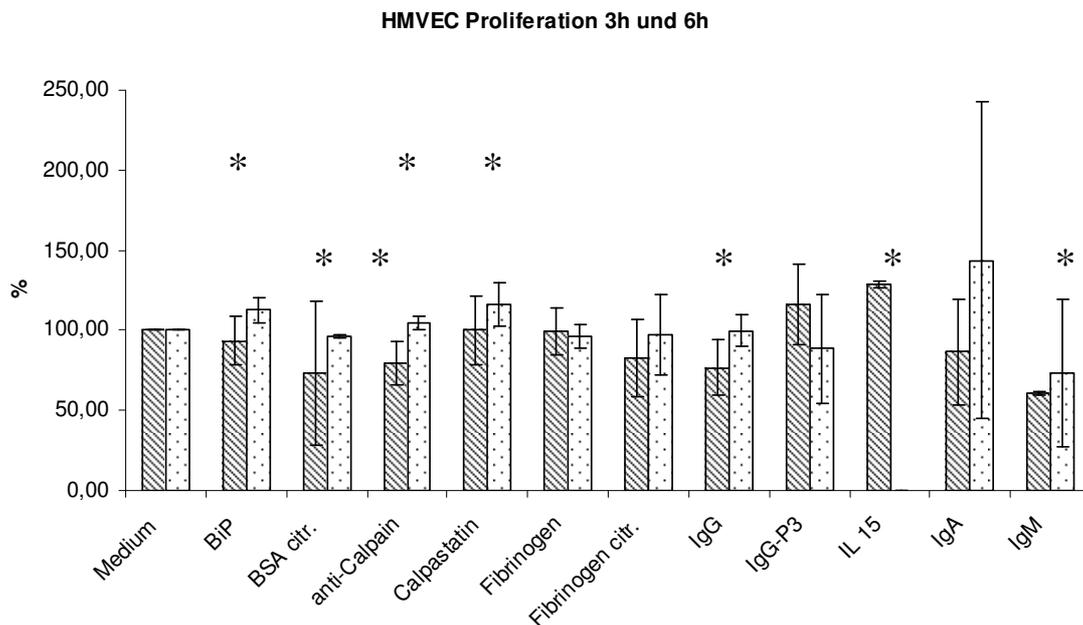


Abb. 27: Proliferation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter Antigeneinfluss nach 3h (gestrichelt) und 6h (gepunktet). \* Erreichen des Signifikanzniveaus bei allen Stimulationszeiten ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.5. Immunhistochemische Anfärbung von fixierten Endothelzellkulturen mittels Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde an humanen mikrovaskulären Zellkulturen durchgeführt, die über einen Zeitraum von 3h den Autoantigenen BiP, Calpastatin und

Fibrinogen, citrulliniertem Fibrinogen, dem IgG-Peptid P3, sowie IgM ausgesetzt wurden. Analog zur Adhäsionsmolekülbestimmung im Überstand wurden ebenfalls Kulturen, mit den Proteinen anti-Calpain, citr. BSA, mit IL-15, sowie mit IgA und G angelegt.

Die Bestimmung der VCAM-1-Moleküle auf der Zelloberfläche wurde mit einem Kulturansatz nach 48h Inkubation durchgeführt.

Die abschließende Auswertung der Bilder konnte bei einigen Ansätzen eine FITC-Bindung an die Endothelzellen bei E-Selektin und ICAM-1 nach 3h zeigen. Im Vergleich zur Kultur ohne Antigenexposition zeigten sich deutliche Häufungen von E-Selektinmolekülen bei den Antigenen Calpastatin und IgM (Abb. 28 A-C).

Für ICAM-1 zeigte sich insgesamt eine deutlich schlechtere Darstellung der Strukturen. Es konnten nur Abbildungen bei 20-facher Vergrößerung angefertigt werden. Häufungen von FITC-markierten Zellen waren bei Fibrinogen und IgM zu finden (Abb. 29 A-C).

Membranständige VCAM-1-Moleküle zeigten sich im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kulturansätzen nach Inkubation mit anti-Calpain und Fibrinogen. Auffallend hierbei waren unregelmäßige Plaques an der Oberfläche (Abb. 30 A-C).

### E-Selektin

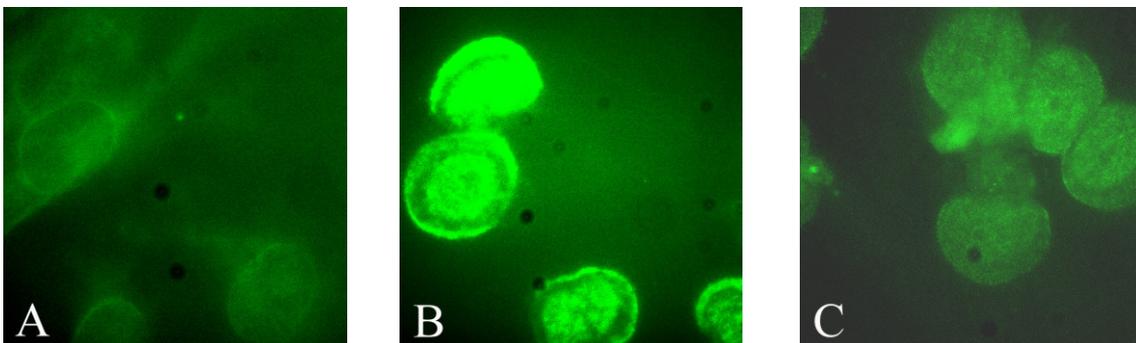


Abb. 28: FITC-markiertes E-Selektin nach 3h Stimulation von HMVEC bei 100-facher Vergrößerung (A: Medium, B: Calpastatin, C: IgM)

### ICAM

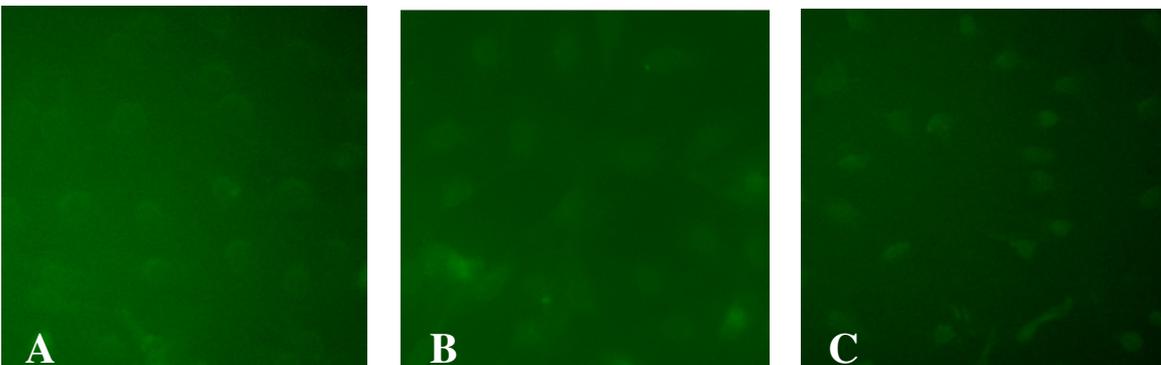


Abb. 29: FITC-markiertes ICAM-1 nach 3h Stimulation von HMVEC bei 20-facher Vergrößerung (A: Medium, B: Fibrinogen, C: IgM)

## VCAM

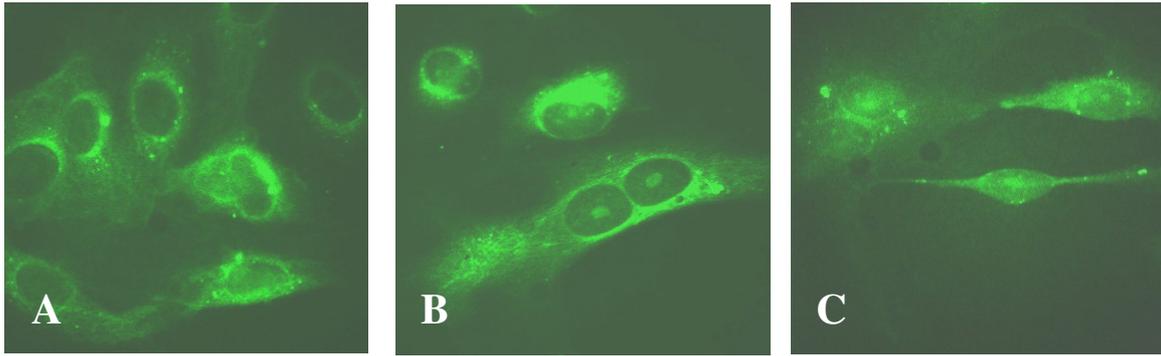


Abb. 30: FITC-markiertes VCAM-1 nach 48h Stimulation von HMVEC bei 100-facher Vergrößerung (A: Medium, B: anti-Calpain, C: Fibrinogen)

#### 4.6. Schematische Darstellung der tendenziellen Reaktionen des Endothels

Die untersuchten Endothelzellkulturen zeigten eine hohe Variabilität in ihrer Reaktion auf die verschiedenen Antigene. Dies führt zu einer erhöhten Standardabweichung, die einen dementsprechend großen Einfluss auf die Signifikanz des Ergebnisses hat. Zur Verbesserung der Übersicht der Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 die Reaktionen der Endothelzellen auf die Antigene erfasst und vereinfacht von - - bis + + dargestellt.

Antigen	h	E-Selektin		ICAM-1		VCAM-1		IL-6		IL-10		Proli
		HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	
Anti-Calpain	3	++	-	-	+	0	0	--	++	0		-
	6	0	-	+	+	0	0	-	0	-		0
	12	0	0	+	0	0	0	0	+	--		
	24	0		+		0		0		0		
	48	++		-		0		+				
BiP	3		--		0		0					0
	6	0	0	0	+	0	0	++		0		+
	12	0	++	+	0	0	0	++		-		
	24	0		+		0		++		--		
	48	++		0		0		++		+		
citr BSA	3	++	--	-	+	0	0	0	++			-
	6	+	-	+	0	0	0	0	0	0		0
	12	0	0	+	0	0	0	0	0	0		
	24	+		+		0		-		-		
	48	++		--		0		0		-		
Calpastatin	3	+	--	0	+	0	0	--	++			0
	6	+	-	+	+	+	0	0	-	0		+
	12	+	++	+	-	0	0	0	+	-		
	24	+		-		0		-		0		
	48	0		-		0		0		0		
Fibrinogen	3	++	-	0	++	0	0	0	++			0
	6	+	++	++	+	0	0	0	0	0		0
	12	+	++	+	-	0	0	0	0	0		
	24	0		-		0		-		-		
	48	+		-		0		0		-		

Tab. 2: Qualitative Bewertung der Ergebnisse ohne Berücksichtigung statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich zu nicht stimulierten Kulturen für die Antigene Anti-Calpain, BiP, citrulliniertes BSA, Calpastatin und Fibrinogen. Veränderung zur Referenz: -- =  $\geq -30\%$ , - =  $-10 - 29\%$ , 0 =  $\pm 10\%$ , + =  $+10-29\%$ , ++ =  $\geq +30\%$

Antigen	h	E-Selektin		ICAM-1		VCAM-1		IL-6		IL-10		Proli
		HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HAEC	HMVEC	HMVEC
citr. Fibrinogen	3	++	0	0	++	0	0	--	0			-
	6	+	++	++	-	+	0	0	-			0
	12	0	0	0	-	0	0	0	++			
	24	-		-		0		0				
	48	+		-		0		+		+		
IgG-P3	3	++	-	-	-	0	0	-	++			+
	6	0	++	++	0	0	0	0	-	+		-
	12	++	0	0	0	0	0	0	+	0		
	24	-		+		0		+		0		
	48	+		-		0		+		+		
IgA	3	+	++	0	+	0	0	0	++			-
	6		++		0		0		-			0
	12		++		0		0		++			
	24											
	48											
IgG	3	+	-	0	++	0	0	0	++			
	6	++	++	++	-	0	0	++	-	+		
	12	+	+	0	0	0	0	++	++	0		
	24	+		0		0		++		0		
	48	+		0		0		++		0		
IgM	3	++	+	0	0	0	0	--	++			
	6		+		0		0		++			
	12		++		++		0		++			
	24											
	48											
IL-15	3		-		0		0					+
	6	++	0	++	+	0	0	+		0		
	12	+	+	0	0	0	0	+		-		
	24	0		0		0		+		0		
	48	++		0		0		+		0		

Tab. 3: *Qualitative Bewertung der Ergebnisse ohne Berücksichtigung statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich zu nicht stimulierten Kulturen für die Antigene citrulliniertes Fibrinogen, IgG-P3, IgA, IgG, IgM und IL-15. Veränderung zur Referenz: -- =  $\geq -30\%$ , - =  $-10 - 29\%$ , 0 =  $\pm 10\%$ , + =  $+10-29\%$ , ++ =  $\geq +30\%$*

## 5. DISKUSSION

Das Endothel stellt eine selektive Barriere der Blutgefäße gegen das umliegende Gewebe dar und nimmt eine aktive Rolle bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen ein<sup>14</sup>. Es ermöglicht die Leukozytenadhäsion und -diapedese in das umliegende Gewebe durch die Expression von Adhäsionsmolekülen<sup>14</sup>. In klinischen Untersuchungen an Patientenserien konnten bei der RA erhöhte Werte der löslichen Adhäsionsmoleküle sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 nachgewiesen werden<sup>48,50,57</sup>, welche durch das Endothel gebildet werden<sup>17</sup>.

In der vorliegenden *in-vitro*-Untersuchung wurden daher primäre Endothelzellkulturen auf ihre Reaktion nach Stimulation mit verschiedenen, aus der B- und T-Zellforschung bekannten Antigenen der RA untersucht. Neben der Konzentration von sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 im Zellüberstand wurde die Konzentration der Interleukine -6 und -10, ebenso wie die Proliferationsrate der Zellen überprüft. Des Weiteren wurden die Zellmonokulturen lysiert und im Western Blot auf membranständige Adhäsionsmoleküle untersucht.

Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass es zu einer direkten Aktivierung des Endothels durch Antigene der Rheumatoiden Arthritis kommt. Insbesondere bei der Inkubation mit Immunglobulinen A, M und G kam es im Zellüberstand zu einer verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle sE-Selektin und sICAM-1, sowie von Interleukin-6. Darüber hinaus wurde eine Konzentrationszunahme von Interleukin-6 unter Einfluss des Chaperokins BiP gemessen. Die Analyse der zellulären Proteine im Western Blot konnte keine verwendbaren Daten liefern.

Die Sezernierung der Adhäsionsmoleküle und Zytokine belegt, dass das Endothel einen eigenen Beitrag an der Aufrechterhaltung eines pro-inflammatorischen Zytokinmilieus leistet. Im Folgenden soll zunächst auf die Möglichkeiten und Grenzen von Zellkulturversuchen eingegangen werden und eine Einordnung der Ergebnisse im Kontext der derzeitigen Antigenforschung erfolgen.

### 5.1. *In-vitro*-Versuche an primären Endothelzellkulturen

Versuche an Zell-Monokulturen bieten die Möglichkeit, die Reaktion von einzelnen Zellarten auf physiologische und pathologische Reize isoliert zu untersuchen. Dabei repräsentieren sie aber nie die tatsächliche *in-vivo*-Situation<sup>96,97</sup>. Vor diesem Hintergrund müssen auch die in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse interpretiert werden.

Die vorliegende Auswertung zeigte relativ hohe Variabilitäten der Endothelzellreaktion der einzelnen Kulturen, die sowohl zwischen den Zellarten, als auch innerhalb eines Zellstammes bei gleichen Bedingungen auftraten. Hierfür können verschiedene Ursachen diskutiert werden.

Im Gegensatz zu immortalisierten Zellen bieten Zellkulturen von Primärspendern die Möglichkeit, dass sie in ihren Funktionen näher am „physiologischen Original“ liegen. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer schnelleren und stärkeren Entdifferenzierung nach der Aufreinigung aus dem Spendergewebe. Dies steht im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien, die besonders konstante Proliferations- und Wachstumsphasen aufweisen, wodurch ihre Eigenschaften auch nach vielen tausend Reproduktionszyklen beständig bleiben <sup>98</sup>. Ein weiterer Nachteil von primären Endothelzellkulturen sind individuelle Unterschiede der Spender. Neben den Variablen Alter und Geschlecht können auch ungleiche Dispositionen für chronisch entzündliche Erkrankungen einen Einfluss haben.

Bei der Verwendung primärer Zellkulturen muss des Weiteren zwischen Herkunftsgeweben unterschieden werden. Innerhalb eines Organismus können große Unterschiede in Bezug auf die Zellbiologie bestehen <sup>99</sup>. Untersuchungen zur Genaktivierung bei verschiedenen Endothelzellarten wiesen darauf hin, dass die Gefäßart des Spendergewebes eine Rolle spielt <sup>100</sup>. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen arteriellen, venösen und mikrovaskulären Endothelzellen. Bei großen Blutgefäßen kam es in erster Linie zur Aktivierung der Biosynthese zur Remodellierung von extrazellulären Matrixproteinen, während im Vergleich dazu bei gleicher Stimulation bei mikrovaskulären Zellen vor allem Gene für Membranmoleküle und Interaktionsmoleküle mit anderen Zellen aktiviert wurden <sup>101</sup>. Die Reaktionen von mikrovaskulären Zellen sind außerdem vom Herkunftsorgan abhängig <sup>102</sup>. Dennoch sind zurzeit keine Studien bezüglich der Eignungen bestimmter Endothelzellenarten für verschiedene *in-vitro*-Zellkulturversuche bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung beschreiben vor diesem Hintergrund somit die vaskuläre Reaktion am entzündeten Gelenk (mikrovaskuläre Zellen), und, im Vergleich dazu, lässt die Reaktion der aortalen Zellen Rückschlüsse auf die Wirkung der Antigene an großen Gefäßen zu.

### **Proliferations- und Produktionsphasen**

Eine weiterer Faktor für die Untersuchungen an Zellkulturen sind Proliferations- und Produktionsphasen des jeweiligen Zelltyps, da die Reaktionsfähigkeit auf Stimulationen starke Unterschiede in diesen Phasen zeigen können <sup>103</sup>. Endothelzellen weisen mitunter

eine sehr geringe Mitoserate auf und können bis zu einem Jahr „alt“ werden<sup>99</sup>. In diesen langen Produktionsphasen kommen sie ihren physiologischen Funktionen nach, die in den Proliferationsphasen hingegen nicht abrufbar sind<sup>104</sup>. Ausgangsstimuli für Proliferations- und Produktionsphasen können verschiedene Einflussfaktoren sein. Im Zellkulturversuch sind biomechanische Reize, Wachstumsfaktoren, sowie der Gehalt an fetalem Kälberserum im Zellmedium von Bedeutung<sup>103,105</sup>. Durch einen erhöhten Anteil an fetalem Kälberserum sind viele Zellkulturmedien in ihrer Zusammensetzung auf eine hohe Proliferationsrate ausgerichtet, weisen dabei aber nur geringe Ähnlichkeit zur interstitiellen Flüssigkeit auf, der die Zellen in einer *in-vivo*-Situation ausgesetzt sind. Nach Minuth et al. sind Zellkulturmedien ohne fetales Kälberserum oder mit reduzierter Konzentration das Mittel der Wahl<sup>104</sup>.

In Anlehnung an Studien zur Adhäsionsmolekülproduktion und IL-6- und -8-Produktion nach Stimulation mit Adrenomodulin, Corticotropin und verschiedenen Konzentrationen von Lipopolysacchariden (LPS) bei humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene, wurde im hiesigen Versuchsaufbau ein statisches Zellkulturmodell gewählt<sup>96,97</sup>.

Als problematisch bei statischen Zellkulturen ist grundsätzlich die Akkumulation von Stoffwechselprodukten im Zellüberstand anzusehen. Dies könnte eine Erklärung für die im gewählten Versuchsaufbau gemessenen Adhäsionsmolekül- und Interleukinkonzentrationen bei den nicht-stimulierten Kulturen sein. Des Weiteren sind unterschiedliche Zellzahlen aufgrund unterschiedlich hoher Proliferationsraten nicht endgültig auszuschließen<sup>106,107</sup>. Statische Zellkulturversuche bieten nur begrenzte Möglichkeiten der Zufuhr von Nährstoffen in Form von Zellmedium und damit Einschränkungen bei der Länge der Stimulationszeiträume. Die Unterbrechung nach verschiedenen Stimulationszeiträumen bedeutet ein nur ausschnitthaftes Untersuchen der Zellüberstände und -medien. Aufgrund der fehlenden Veränderungen der sVCAM-1-Spiegel in allen Versuchen ist zu diskutieren, ob es innerhalb der jeweiligen Stimulationszeiträume überhaupt zu einer erhöhten Expression von VCAM-1 kommen konnte. Denn verschiedene Studien zeigten, dass VCAM-1 als Bindungsmolekül des very late activation Antigen-Moleküls (VLA-4) zu einem späten Zeitpunkt der Leukozytendiapedese aktiviert wird<sup>108</sup>. Diese Annahme würde durch das Vorhandensein von VCAM-1-Molekülen bei den Immunfluoreszenzbildern nach 48h auf der Zelloberfläche gestützt. Hingegen steht dies im Widerspruch zum fehlenden sVCAM-1-Gehalt in den Zellüberständen nach allen Versuchzeiträumen. Abschließend kann gesagt werden, dass bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse der Unterschied von

Zellmonokulturmodellen zur *in-vivo*-Situation und die allgemein limitierten Möglichkeiten von Zellkulturversuchen berücksichtigt werden müssen<sup>104,105,109</sup>.

## 5.2. Reaktionen des Endothels in Abhängigkeit der einzelnen Antigene

### Immunglobuline

Die vorliegende Untersuchung konnte erstmalig eine Aktivierung von Endothelzellkulturen durch die Stimulation mit den Immunglobulinen A, G und M zeigen. Dabei kam es zu zeitlich unterschiedlichen Abläufen der Adhäsionsmolekül- und Interleukinproduktion mit relativ hohen Standardabweichungen. Dennoch bestanden signifikante Konzentrationsveränderungen, sowohl bei mikrovaskulären, als auch bei aortalen Zellkulturen.

Die Steigerung der sE-Selektin-Konzentration, sICAM-1-Konzentration, sowie der IL-6-Konzentration im Überstand nach Stimulation mit IgA, IgM und IgG geben einen Hinweis auf einen direkten Aktivierungsweg zwischen Immunglobulinen und dem Endothel. Des Weiteren könnte die Verringerung der IL-10-Konzentrationen im Überstand auf eine Inhibition der Produktion dieses anti-inflammatorischen Zytokins hindeuten, was einen weiteren Weg der Beeinflussung des lokalen Zytokinmilieus am rheumatoiden Gelenk impliziert. Die Sensitivität des Endothels auf erhöhte IgA-Konzentrationen würde darüber hinaus eine Begründung für die Korrelation der Krankheitsaktivität der RA mit IgA-Antikörper-Titern liefern<sup>89,110,111</sup>. Auch eine Verbindung zwischen dem Auftreten von Rheumafaktoren und der lokalen Entzündungsreaktion könnten hiermit erklärt werden. Deshalb sollte neben den bekannten Funktionen der Rheumafaktoren dieser als ein weiterer pathologischer Mechanismus in Betracht gezogen werden<sup>88,112-114</sup>.

Ein direkter Vergleich der Reaktion der beiden verwendeten Zellarten auf die Immunglobulineinwirkung gestaltet sich schwierig. Gemeinsamkeiten bestanden in der Art der Reaktion auf Antigene (sE-Selektin, sICAM-1 und IL-6-Konzentrationssteigerung). Unterschiede traten dabei in der zeitlichen Abfolge auf. Hierbei kam es tendenziell zu einer etwas schnelleren und ausgeprägteren Reaktion bei aortalen Zellen (vgl. Tabelle 3).

### Immunglobulin Binding Protein (BiP)

Das Stressprotein BiP wurde von zwei Arbeitsgruppen als Marker der RA identifiziert<sup>73,115</sup>. Es konnte aus der Synovialflüssigkeit isoliert werden und zeigte in *in-vitro*-Versuchen eine stimulierende Wirkung auf humane polymorphkernige Monozyten (PBMCs)<sup>116</sup>. Beide Arbeitsgruppen konnten eine verstärkte Proliferation von T-Zellen

unter Einfluss von BiP beschreiben. Außerdem kann BiP als ein extrazelluläres Stressprotein angesehen werden <sup>116</sup>. Des Weiteren wies Corrigan unter Einfluss BiP eine deutlich erhöhte Produktion von IL-10 an PBMCs nach <sup>116</sup>. Dies deutet darauf hin, dass BiP eine modulierende Funktion bei der Ausprägung einer Entzündung, sowohl bei der RA, als auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen, zukommt. Es wurde postuliert, dass BiP auf zwei Wegen regulierend auf entzündliche Reaktionen wirkt; zum einen stimuliert es die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen wie z.B. IL-10, zum anderen wird die Proliferation von Lymphozyten vom TH2-Typ verstärkt, die eine Beendigung der Entzündung hervorrufen <sup>117</sup>.

Im gewählten Versuchsaufbau konnte kein eindeutiger Einfluss auf die Produktion von sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 gezeigt werden. Es bestanden teilweise signifikante Abweichungen, die jedoch alle im Bereich von +/- 10% lagen. Dennoch spricht die deutliche Steigerung der IL-6-Expression durch aortale Endothelzellen für eine pro-inflammatorische Wirkung des BiPs am Endothel. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass BiP auch die Produktion von IL-6 und damit die Expression eines pro-inflammatorischen Zytokins bewirken kann <sup>118,119</sup>. Weshalb vielmehr von einer entzündungsmodulierenden Funktion des Chaperokins ausgegangen werden sollte. Zur weiteren Beurteilung der Rolle von BiP und seiner Wirkung in entzündlich verändertem Gewebe werden weitere Studien benötigt.

### **Calpastatin / anti-Calpain Antikörper**

Calpastatin wurde 1995 als Autoantigen der RA beschrieben <sup>78</sup>. Dabei konnte eine T-Zell-stimulierende Wirkung bei 57% der untersuchten Seren beobachtet werden. Zwar wurde im Tierversuch keine krankheitsauslösende Wirkung von Calpastatin nachgewiesen, jedoch sprechen die gegen Calpastatin gerichteten Antikörper für eine relative Verstärkung der proteolytischen Aktivität von Calpainen <sup>78</sup>. Darüber hinaus konnten Studien weiterer Arbeitsgruppen eine pro-inflammatorische Aktivität von Endothelzellen durch die Aktivierung von zelleigenen Calpainen zeigen, die zu einer verstärkten Leukozytendiapedese führten <sup>120</sup>.

Bei den vorliegenden Versuchen wies die Wirkung von Calpastatin auf Endothelzellen sehr unterschiedliche Ausprägungen auf. So war die Produktion von gelöstem E-Selektin im Überstand von HMVE-Zellen zunächst verringert (3h: -37%, 6h: -17%), um nach 12h wiederum anzusteigen (+41%). Auch die sICAM-1-Konzentration variierte stark, sodass keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Reaktion der Endothelzellen auf die Inkubation mit Calpastatin möglich sind. In Bezug auf die VCAM-1-Expression stehen die Ergebnisse

der FITC-angefärbten Endothelzellen nach 48-stündigen Inkubation mit anti-Calpain-Antikörpern im Widerspruch zu den sVCAM-1-Konzentrationen im Überstand der Zellkulturen bei allen Versuchszeiträumen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht abschließend beurteilt werden, ob es unter Einfluss von Calpastatin zu einer Auswirkung auf die Adhäsionsmolekülexpression oder Interleukinproduktion durch Endothelzellen kommt.

### **Fibrinogen**

Untersuchungen zur Proliferationsaktivität von T-Zellen unter Einfluss von Fibrinogen, als citrulliniertes und nicht citrulliniertes Protein, konnten eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate aufzeigen<sup>86,121</sup>. Dabei erwies sich zwar die nicht-citrullinierte Form des Fibrinogens als schwächerer Stimulus auf die Proliferation von T-Zellen, hatte aber dennoch eine stimulierende Wirkung<sup>86</sup>.

Im vorliegenden Versuchsaufbau bestanden sehr widersprüchliche Ergebnisse in der Wirkung von Fibrinogen auf die Endothelzellkulturen. Sowohl die Expression von sE-Selektin und sICAM-1, als auch von IL-6 und IL-10 zeigten ein sehr stark differenziertes Verteilungsmuster. Eine Expression von VCAM-1 an der Oberfläche von mikrovaskulären Endothelzellkulturen konnte nur durch FITC-Färbung nach 48-stündiger Inkubation nachgewiesen werden. Eine klare Aussage bezüglich einer pro- oder anti-inflammatorischen Wirkung von Fibrinogen auf Endothelzellen ist daher nicht möglich.

### **Citrulliniertes Fibrinogen / BSA**

Citrulliniertes Fibrinogen wurde wiederholt als ein mögliches Antigen der RA beschrieben<sup>85,122</sup>. Es erreichte als diagnostischer Marker für die RA eine ähnlich gute Sensibilität und Spezifität wie zyklisch citrullinierte Peptide, die zur Frühdiagnostik eingesetzt werden<sup>85,123</sup>, konnte dabei aber ausschließlich in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit RA isoliert werden<sup>123</sup>. Des Weiteren wurde eine erhöhte Proliferation von T-Zellen unter Einfluss von citrulliniertem Fibrinogen gezeigt<sup>86</sup>.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen konnten keine vergleichbare stimulierende Wirkung von Fibrinogen auf Endothelzellen nachweisen. Die geringfügige Konzentrationsverringerng von sICAM-1 nach dreistündiger Exposition von aortalen Zellen stand im Widerspruch zu der nach 6h gemessenen signifikanten Erhöhung. Auch die Veränderungen der sE-Selektinkonzentrationen zeigten sich sehr inhomogen über die Versuchszeiträume. An mikrovaskulären Zellen konnte zwar nach 3h eine Erhöhung der sICAM-1 Konzentration festgestellt werden, aber auch hier lagen nach 6 und 12h

Konzentrationsabnahmen vor. Die Unterschiede der sE-Selektinkonzentrationen erreichten durchweg nicht das Signifikanzniveau. Die IL-6-Konzentration zeigte sich bis auf eine Konzentrationserhöhung nach 12h im Überstand von mikrovaskulären Zellen nahezu unverändert. Im Vergleich zum citrullinierten BSA waren diese Schwankungen ähnlich gering ausgeprägt.

Aufgrund der starken Variationen und einer fehlenden Unterscheidung zum citrullinierten BSA, können diese Daten citrulliniertes Fibrinogen nicht eindeutig als ein Antigen mit endothelzell-stimulierender oder -inhibierender Wirkung identifizieren. Weitere Untersuchungen zur Interaktion mit anderen Zytokin-produzierenden Zellen könnten neue Anhaltspunkte für die Rolle von citrulliniertem Fibrinogen offenbaren.

### **P3**

Für das synthetisch hergestellte Peptid P3 wurde eine sehr hohe stimulierende Potenz für T-Zellen beschrieben<sup>87</sup>. Das Peptid entspricht der gleichen Sequenz des Fc-Teils der schweren Kette von IgG-Antikörpern, an denen der IgM-Rheumafaktor bindet, und könnte eine Ursache für die Rheumafaktorproduktion sein<sup>67</sup>. In der vorliegenden Untersuchung konnten keine eindeutigen Ergebnisse für den Einfluss von dem an IgG gekoppelten Protein P3 festgestellt werden. Signifikante Auswirkungen auf die Adhäsionsmolekülkonzentration im Überstand wurden zwar beobachtet. Diese wiesen allerdings sowohl stimulierende (sE-Selektin bei HAEC-Kulturen nach 3h) als auch inhibierende (sICAM-1 bei HAEC- und HMVEC-Kulturen nach 3h) Effekte auf. Außerdem bestanden hohe Standardabweichungen der gemessenen Werte. Gleiches gilt für die Interleukinkonzentrationen im Überstand.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen somit keinen direkten Einfluss des P3-Peptids auf Endothelzellen.

### **IL-15**

McInnes et al. konnten zeigen, dass Interleukin-15 in stark erhöhten Konzentrationen im rheumatoiden Gelenk vorliegt, was zu einer verstärkten Gedächtnis-T-Zell- und CD45RO-Rekrutierung, und zu einer unspezifischen Entzündung mit verstärkter TNF- $\alpha$ -Produktion durch Monozyten führt<sup>93</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe wies nach, dass IL-15 in Endothelzellen in rheumatisch verändertem Gewebe gebildet wird, und dass es zu einem Anstieg der transendothelialen CD4 und CD8 Zellmigration kommt<sup>124</sup>. Dies kann sowohl eine Erhöhung der Motilität von T-Zellen bewirken, als auch zu einer erhöhten Leukozytendiapedese durch das Endothel führen, was wiederum eine T-Zell-

Akkumulation in synovialen Geweben begründet <sup>124</sup>. Andere Arbeiten beobachteten einen Zusammenhang zwischen IL-15-Regulationsdefiziten bei anderen Autoimmunerkrankungen <sup>91,93</sup>. In einer *in-vitro*-Studie zur Auswirkung von IL-15 auf die T-Zell-Klonalität von PBM-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA konnte zwar eine verstärkte Proliferation beobachtet werden, im rheumatoiden Gelenk wurde diese aber nicht allein auf die Wirkung von IL-15 zurückgeführt <sup>125</sup>.

Auch die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen an *in-vitro*-Endothelzellkulturen zeigten signifikante Veränderungen der Konzentrationen von sE-Selektin, sICAM-1, IL-6 und IL-10 im Überstand. Hierbei waren die Ergebnisse auch im Vergleich beider Endothelzelllinien in ihrer Tendenz konstant. Konzentrationssteigerungen für die Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 im Überstand traten jeweils erst nach 6h auf und konnten für humane aortale Zellen bis zu 48h nachgewiesen werden. Auch die IL-6-Konzentrationen waren erhöht und die gemessene Verringerung der IL-10-Konzentration spricht für eine Hemmung der Synthese dieses anti-inflammatorischen Zytokines.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Aktivierung des Endothels durch IL-15 eine besondere Rolle dieses Interleukins beweisen und Parallelen zu vergleichbaren Arbeiten herstellt <sup>124</sup>. Deshalb sollte diese Interleukin als möglicher Stimulus für die Leukozytenmigration durch weitere Studien untersucht werden.

### **5.3. Ausblick – Endothelzellen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis**

Die besondere Rolle des Endothels für die RA ist durch die Steuerung der Leukozytendiapedese im entzündeten Gewebe gekennzeichnet. Die Reaktionen des Endothels weisen auf seine direkte Aktivierung durch mögliche Autoantigene der RA hin, wodurch es zu einer gesteigerten Produktion von IL-6, E-Selektin und ICAM-1 kommt. Dennoch können die in klinischen Studien aufgezeigten erhöhten Serumkonzentrationen an sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 nicht vollständig im verwendeten Zellkulturmodell nachvollzogen und klar einem Antigen zugeordnet werden.

Für die Aktivierung des Endothels müssen somit weitere Wege in Betracht gezogen werden. So könnte das gleichzeitige Einwirken mehrerer Antigene zu kumulativen Effekten führen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass Endothelzellen durch die Sezernierung von IL-6 zum Entstehen des pathogenen Zytokinmilieus am Gelenk beitragen. Diese Beobachtung deckt sich mit klinischen Untersuchungen, die in

Patientenseren und Synovialflüssigkeiten erhöhte Konzentrationen von IL-6 nachweisen konnten<sup>119,121,124,126</sup>. Weitere Arbeiten zeigten einen bis zu tausendfach erhöhten IL-6-Spiegel in der Synovia, hingegen aber relativ geringe Mengen im Serum<sup>128</sup>. Gleichzeitig legt die beobachtete Verringerung der IL-10-Expression eine Hemmung der Produktion eines anti-inflammatorischen Zytokins nahe.

Somit könnte die Einflussnahme der untersuchten Antigene auf das Endothel zusätzlich über einen indirekten Weg verlaufen: Denkbar wäre, dass die Aktivierung des Endothels primär zu einer Veränderung zu einem pro-inflammatorischen Zytokinmilieu führt, und es in Folge erst sekundär zur Präsentation von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche kommt. Dieses Modell ist auch für verschiedene andere Zytokine anwendbar, da wiederholt sehr unterschiedliche Zytokinmuster identifiziert wurden<sup>118,119,129,130</sup>. Allgemein wird ein Zusammenspiel von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen angenommen, dessen Gesamtheit den Verlauf der Erkrankung bestimmt<sup>131</sup>.

Die Inhibition von IL-6 stellt bereits einen therapeutischen Ansatz dar<sup>131</sup>. Es werden aber weitere Untersuchungen auf zellulärer Ebene zur Wirkung der Zytokine am rheumatoiden Gelenk, sowie zu Aktivierungswegen der Endothelzellen benötigt, um neue therapeutische Ansätze zu erschließen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

*Hintergrund:* Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung bei der erhöhte Konzentrationen an sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 im Serum bestehen. Dies könnte eine erhöhte Aktivität des Endothels bedeuten.

*Fragestellung:* Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob verschiedene mögliche Autoantigene der RA in der Lage sind, primäre endotheliale Zellen zu aktivieren. Die Aktivierung wurde durch erhöhte Werte an Adhäsionsmolekülen (AM) und Interleukinen (IL) in den Zellüberständen, durch erhöhte Präsentation von AM an der Zelloberfläche an fixierten Zellkulturen und anhand einer gesteigerten Proliferationsrate der Zellen untersucht.

*Methoden:* Humane Endothelzellkulturen aus aortalem und mikrovaskulärem Spendergewebe wurden über Zeiträume von 3, 6, 12, 24 und 48h mit den Antigenen Protein Binding Peptid (BiP), Calpastatin, Fibrinogen, citrulliniertes Fibrinogen, IgG gebundenes Peptid P3, IgM, IgA, IgG und IL-15 inkubiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte im Zellüberstand mittels ELISA, sowie an fixierten Zellkulturen durch Immunfluoreszenzfärbung (FITC). Des Weiteren wurden IL-6 und IL-10 durch ELISA-Messung der Überstände quantifiziert. Ergänzend wurde die Proliferation der Endothelzellen durch den Einbau von radioaktiv markiertem [Methyl-3H]-Thymidin in die DNA evaluiert. Eine Kontrolle erfolgte sowohl anhand nicht-stimulierter Kulturen, als auch mit den Vergleichsantigenen anti-Calpain und citrulliniertem BSA.

*Ergebnisse:* Die Ergebnisse zeigten insgesamt eine relativ hohe Variabilität. Eine eindeutige Aktivierung konnte für die gemessenen Zeiträume nach Stimulation mit IgG, IgM, IgA und IL-15 gezeigt werden. Hierbei kam es zu signifikant erhöhten Konzentrationen an sE-Selektin, sICAM-1 und IL-6. Darüber hinaus bestand eine leichte aber nicht signifikante Verringerung der IL-10 Konzentrationen nach Stimulation mit IL-15. Weitere signifikante positive oder negative Stimulationen zeigten sich nicht ausreichend konstant.

*Schlussfolgerung:* Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es zu einer direkten Aktivierung des Endothels in Form einer erhöhten AM-Expression durch mögliche Autoantigene der RA kommt. Den Anstieg von IL-6 und sE-Selektin durch IgA wäre eine mögliche Erklärung für die in anderen Studien beschriebene Korrelation der IgA-Konzentration im Serum und der Krankheitsaktivität. Die Verringerung der IL-10 Konzentration durch die Stimulation mit IL-15 könnte ein Hinweis auf eine Inhibition anti-inflammatorischer Zytokine sein.

Zur Aufklärung der Rolle des Endothels in der Pathogenese der RA werden weitere Untersuchungen benötigt.

### **Summary**

*Background:* Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease showing elevated markers of vascular activation including sE-selectin, sICAM-1 and sVCAM-1, which could point to enhanced endothelial activity.

*Objectives:* The aim of this study was to examine whether seven possible RA autoantigens are capable of activating primary endothelial cells: protein binding peptid (BiP), calpastatin, fibrinogen, citrullinated fibrinogen, IgG-bound peptid P3, IgM, IgA, IgG and IL-15. Activation was measured in terms of increased adhesion molecule and interleukine secretion into cellular supernatants, elevated presentation of adhesion molecules on cell surfaces, and raised cellular proliferation rates.

*Methods:* Human aortical endothelial (HAEC) and human microvascular endothelial (HMVEC) cell lines were incubated for 3, 6, 12, 24, and 48 h. Levels of sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1, interleukine -6 and -10 were measured with ELISA, adhesion molecule presentation on cell surfaces was evaluated on fixed cell cultures with immunofluorescent staining (FITC). Proliferation rates were additionally evaluated by measuring the incorporation of radioactively labeled [Methyl-3H]-Thymidin. Controls included non-stimulated cultures as well as cultures stimulated with anti-calpain, and citrullinated BSA.

*Results:* Results displayed high overall variability. Evident endothelial activation over the measured periods of incubation could be shown after stimulation with IgG, IgA, IgM, and IL-15 with significantly elevated levels of sE-selectin, sICAM-1 and IL-6 concentrations. Moreover, a slight decrease in the IL-10 concentration occurred after stimulation with IL-15. Significantly positive or negative stimuli could be shown for various other antigens, which, however, were not consistent enough over the respective stimulation periods.

*Conclusion:* For the first time it could be shown that possible autoantigens of the RA cause direct activation of the endothelium, as apparent from higher expressions of adhesion molecules. Additionally, this activation contributes to the local cytokine environment. Elevated secretion of IL -6 and sE-Selectin under the influence of IgA could be a reason for the association between IgA concentrations and disease activity described in other investigations. The decrease in IL-10 secretion after stimulation with IL-15 could indicate an inhibition of anti-inflammatory agents. Further studies are needed to clarify the endothelium's complex role in the chronic inflammation of RA.

**7. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Lipsky, P. E. Rheumatoide Arthritis. *Harrisons Innere Medizin* **15**, 2111-2120 (2003).
2. Gabriel, S. E. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **27**, 269-81 (2001).
3. Symmons, D. P., Jones, M. A., Scott, D. L. & Prior, P. Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *J Rheumatol* **25**, 1072-7 (1998).
4. Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H. & Luthra, H. S. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315-24 (1988).
5. Quinn, M. A. & Emery, P. Window of opportunity in early rheumatoid arthritis: possibility of altering the disease process with early intervention. *Clin Exp Rheumatol* **21**, S154-7 (2003).
6. Dorner, T., Egerer, K., Feist, E. & Burmester, G. R. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* **16**, 246-53 (2004).
7. Schneider, M., Lelgemann, M., Abholz, H.-H., Caratti, R., Flügge, C., Jäniche, H., Kunz, R., Krüger, K., Rehart, S. & Specker, C. *DGRh-Leitlinie Interdisziplinäre Leitlinie - Management der frühen rheumatoiden Arthritis* (Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2007).
8. Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R. E. & Gay, S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**, 361-7 (2000).
9. Kurosaka, M. & Ziff, M. Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium. *J Exp Med* **158**, 1191-210 (1983).
10. Jaffe, E. A. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* **18**, 234-9 (1987).
11. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M. & Stern, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-61 (1998).
12. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* **2**, 795-803 (2002).
13. Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F., Jr. & Vita, J. A. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **42**, 1149-60 (2003).
14. Cook-Mills, J. M. & Deem, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* **77**, 487-95 (2005).
15. Rankin, J. A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* **15**, 3-17 (2004).
16. Crowley, S. R. The pathogenesis of septic shock. *Heart Lung* **25**, 124-34; quiz 135-6 (1996).
17. Petruzzelli, L., Takami, M. & Humes, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* **106**, 467-76 (1999).
18. Pustoslemsek, P., Giesel, M., Brockob, I. & Schumacher, A. Das Endothel - eine der wichtigsten Grenzflächen des Organismus. *Aspekte*, 3-7 (1995).
19. Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. & Peifer, M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 91-100 (2000).
20. Mally, M. & Schade, M. Adhäsionsmoleküle steuern die Kommunikation der Zellen. *Lab Med* **15** (1991).

21. Pigott, R. & Power, C. *The Adhesion molecule Factsbook* (Academic Press, London, 1999).
22. Pigott, R. & Power, C. *The Adhesion Molecule Factsbook* (Academic Press Limited, London, 1993).
23. Osborn, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* **62**, 3-6 (1990).
24. Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C. S. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33 (1996).
25. Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-14 (1994).
26. Carlos, T. M. & Harlan, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**, 2068-101 (1994).
27. Diamond, M. S., Staunton, D. E., Marlin, S. D. & Springer, T. A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**, 961-71 (1991).
28. Hayflick, J. S., Kilgannon, P. & Gallatin, W. M. The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res* **17**, 313-27 (1998).
29. Steeber, D. A., Tang, M. L., Zhang, X. Q., Muller, W., Wagner, N. & Tedder, T. F. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and beta7 integrin. *J Immunol* **161**, 6638-47 (1998).
30. Sperandio, M., Smith, M. L., Forlow, S. B., Olson, T. S., Xia, L., McEver, R. P. & Ley, K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* **197**, 1355-63 (2003).
31. Vestweber, D. & Blanks, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**, 181-213 (1999).
32. Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr. & Seed, B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **243**, 1160-5 (1989).
33. Patel, K. D., Cuvelier, S. L. & Wiehler, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* **14**, 73-81 (2002).
34. McEver, R. P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 581-6 (2002).
35. Vestweber, D. Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. *Eur J Immunol* **33**, 1361-4 (2003).
36. Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E. & Springer, T. A. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* **128**, 1243-53 (1995).
37. Kunkel, E. J. & Ley, K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* **79**, 1196-204 (1996).
38. Steeber, D. A. & Tedder, T. F. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res* **22**, 299-317 (2000).
39. Campbell, J. J., Qin, S., Bacon, K. B., Mackay, C. R. & Butcher, E. C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol* **134**, 255-66 (1996).
40. Shamri, R., Grabovsky, V., Feigelson, S. W., Dwir, O., Van Kooyk, Y. & Alon, R. Chemokine stimulation of lymphocyte alpha 4 integrin avidity but not of leukocyte

- function-associated antigen-1 avidity to endothelial ligands under shear flow requires cholesterol membrane rafts. *J Biol Chem* **277**, 40027-35 (2002).
41. Alon, R. & Feigelson, S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol* **14**, 93-104 (2002).
  42. Weber, C. & Springer, T. A. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol* **161**, 6825-34 (1998).
  43. Oppenheimer-Marks, N., Davis, L. S., Bogue, D. T., Ramberg, J. & Lipsky, P. E. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* **147**, 2913-21 (1991).
  44. Wong, D., Prameya, R. & Dorovini-Zis, K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 138-52 (1999).
  45. Greenwood, J., Wang, Y. & Calder, V. L. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* **86**, 408-15 (1995).
  46. Reiss, Y., Hoch, G., Deutsch, U. & Engelhardt, B. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur J Immunol* **28**, 3086-99 (1998).
  47. Lyck, R., Reiss, Y., Gerwin, N., Greenwood, J., Adamson, P. & Engelhardt, B. T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells. *Blood* **102**, 3675-83 (2003).
  48. Klimiuk, P. A., Sierakowski, S., Latosiewicz, R., Cylwik, J. P., Cylwik, B., Skowronski, J. & Chwiecko, J. Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis* **61**, 804-9 (2002).
  49. Ates, A., Kinikli, G., Turgay, M. & Duman, M. Serum-soluble selectin levels in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Scand J Immunol* **59**, 315-20 (2004).
  50. Egerer, K., Hertzner, J., Feist, E., Albrecht, A., Rudolph, P. E., Dorner, T. & Burmester, G. R. sE-selectin for stratifying outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **49**, 546-8 (2003).
  51. Kuuliala, A., Eberhardt, K., Takala, A., Kautiainen, H., Repo, H. & Leirisalo-Repo, M. Circulating soluble E-selectin in early rheumatoid arthritis: a prospective five year study. *Ann Rheum Dis* **61**, 242-6 (2002).
  52. Dolezalova, P., Telekesova, P., Nemcova, D. & Hoza, J. Soluble adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin in juvenile arthritis: clinical and laboratory correlations. *Clin Exp Rheumatol* **20**, 249-54 (2002).
  53. Boehme, M. W., Raeth, U., Galle, P. R., Stremmel, W. & Scherbaum, W. A. Serum thrombomodulin-a reliable marker of disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE): advantage over established serological parameters to indicate disease activity. *Clin Exp Immunol* **119**, 189-95 (2000).
  54. Carson, C. W., Beall, L. D., Hunder, G. G., Johnson, C. M. & Newman, W. Serum ELAM-1 is increased in vasculitis, scleroderma, and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **20**, 809-14 (1993).

55. Mrowka, C. & Sieberth, H. G. Detection of circulating adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in Wegener's granulomatosis, systemic lupus erythematosus and chronic renal failure. *Clin Nephrol* **43**, 288-96 (1995).
56. Egerer, K., Feist, E., Rohr, U., Pruss, A., Burmester, G. R. & Dorner, T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **9**, 614-21 (2000).
57. Littler, A. J., Buckley, C. D., Wordsworth, P., Collins, I., Martinson, J. & Simmons, D. L. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **36**, 164-9 (1997).
58. Sari, R. A., Taysi, S., Erdem, F., Yilmaz, O., Keles, S., Kiziltunc, A., Odabas, A. R. & Cetinkaya, R. Correlation of serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* **21**, 149-52 (2002).
59. Horak, P., Scudla, V., Hermanovo, Z., Pospisil, Z., Faltynek, L., Budikova, M. & Kusa, L. Clinical utility of selected disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* **20**, 337-44 (2001).
60. Ho, C. Y., Wong, C. K., Li, E. K., Tam, L. S. & Lam, C. W. Elevated plasma concentrations of nitric oxide, soluble thrombomodulin and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **42**, 117-22 (2003).
61. Ikeda, Y., Fujimoto, T., Ameno, M., Shiiki, H. & Dohi, K. Relationship between lupus nephritis activity and the serum level of soluble VCAM-1. *Lupus* **7**, 347-54 (1998).
62. Spronk, P. E., Bootsma, H., Huitema, M. G., Limburg, P. C. & Kallenberg, C. G. Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study. *Clin Exp Immunol* **97**, 439-44 (1994).
63. Sebbag, M., Parry, S. L., Brennan, F. M. & Feldmann, M. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* **27**, 624-32 (1997).
64. Kamradt, T., Hansen, G., Bechmann, I. & Burmester, G. R. [T-cell tolerance and autoimmunity]. *Internist (Berl)* **44**, 146-52 (2003).
65. Dighiero, G. & Rose, N. R. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* **20**, 423-8 (1999).
66. Behrens, S. Definition von Autoreaktivitätsmustern bei rheumatoider Arthritis (Dissertation). *Rheumatologie und Klinische Immunologie Charite Berlin* (2001).
67. Schumann, F. Autoantigene bei der Rheumatoiden Arthritis (Dissertation). *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie* (2004).
68. Blobel, G. & Dobberstein, B. Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**, 852-62 (1975).
69. Munro, S. & Pelham, H. R. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300 (1986).
70. Sawa, T., Imamura, T., Haruta, T., Sasaoka, T., Ishiki, M., Takata, Y., Takada, Y., Morioka, H., Ishihara, H., Usui, I. & Kobayashi, M. Hsp70 family molecular chaperones and mutant insulin receptor: differential binding specificities of BiP and Hsp70/Hsc70 determines accumulation or degradation of insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 449-53 (1996).

71. Gething, M. J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 465-72 (1999).
72. Blass, S., Union, A., Raymackers, J., Schumann, F., Ungethum, U., Muller-Steinbach, S., De Keyser, F., Engel, J. M. & Burmester, G. R. The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **44**, 761-71 (2001).
73. Corrigall, V. M., Bodman-Smith, M. D., Fife, M. S., Canas, B., Myers, L. K., Wooley, P., Soh, C., Staines, N. A., Pappin, D. J., Berlo, S. E., van Eden, W., van Der Zee, R., Lanchbury, J. S. & Panayi, G. S. The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J Immunol* **166**, 1492-8 (2001).
74. Menard, H. A. & el-Amine, M. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* **17**, 545-7 (1996).
75. Szomor, Z., Shimizu, K., Fujimori, Y., Yamamoto, S. & Yamamuro, T. Appearance of calpain correlates with arthritis and cartilage destruction in collagen induced arthritic knee joints of mice. *Ann Rheum Dis* **54**, 477-83 (1995).
76. Yamamoto, S., Shimizu, K., Shimizu, K., Suzuki, K., Nakagawa, Y. & Yamamuro, T. Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum* **35**, 1309-17 (1992).
77. Wang, K. K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., Talanian, R. V., Keegan, M., Herzog, L. & Allen, H. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **356**, 187-96 (1998).
78. Mimori, T., Suganuma, K., Tanami, Y., Nojima, T., Matsumura, M., Fujii, T., Yoshizawa, T., Suzuki, K. & Akizuki, M. Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7267-71 (1995).
79. Schlosser, U., Lackner, K. J., Scheckenhofer, C., Spannagl, M., Spengel, F. A., Hahn, G., Lang, B. & Schmitz, G. Autoantibodies against the protease inhibitor calpastatin: a new risk factor for venous thrombosis? *Thromb Haemost* **77**, 11-3 (1997).
80. Takada, R., Matsumoto, M., Yosida, M., Nojima, T., Hirakata, M., Ohosone, Y. & Mimori, T. [Detection of isotype-specific autoantibodies to calpastatin in sera from patients with rheumatic diseases using heat-treated HeLa cell extract as an antigen source for immunoblotting]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **21**, 150-8 (1998).
81. Nienhuis, R. L. & Mandema, E. A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* **23**, 302-5 (1964).
82. Young, B. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D., Clark, C. J. & Hamblin, T. J. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* **2**, 97-9 (1979).
83. Sebbag, M., Simon, M., Vincent, C., Masson-Bessiere, C., Girbal, E., Durieux, J. J. & Serre, G. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* **95**, 2672-9 (1995).
84. Snijders, G. F., Broeder, A. A., Bevers, K., Jeurissen, M. E., van Eerd, J. E. & van den Hoogen, F. H. Measurement characteristics of a new rapid anti-CCP2 test compared to the anti-CCP2 ELISA. *Scand J Rheumatol* **37**, 151-4 (2008).
85. Nielen, M. M., van der Horst, A. R., van Schaardenburg, D., van der Horst-Bruinsma, I. E., van de Stadt, R. J., Aarden, L., Dijkmans, B. A. & Hamann, D. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 1199-204 (2005).

86. Vossenaar, E., R. B., F. S., GR, B., JM, E., WJ, v. V. & S, B. Fibrinogen-specific T cells in Rheumatoid Arthritis *23rd European Workshop for Rheumatology Research* **5(Suppl 1):31** (2003).
87. Hain, N. A., Stuhlmuller, B., Hahn, G. R., Kalden, J. R., Deutzmann, R. & Burmester, G. R. Biochemical characterization and microsequencing of a 205-kDa synovial protein stimulatory for T cells and reactive with rheumatoid factor containing sera. *J Immunol* **157**, 1773-80 (1996).
88. Newkirk, M. M. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin Immunol* **104**, 1-13 (2002).
89. Berglin, E., Johansson, T., Sundin, U., Jidell, E., Wadell, G., Hallmans, G. & Rantapaa-Dahlqvist, S. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Ann Rheum Dis* **65**, 453-8 (2006).
90. Jorgensen, C., Legouffe, M. C., Bologna, C., Brochier, J. & Sany, J. IgA isotype rheumatoid factor in rheumatoid arthritis: clinical implications. *Clin Exp Rheumatol* **14**, 301-4 (1996).
91. Waldmann, T. A. & Tagaya, Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* **17**, 19-49 (1999).
92. Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. & Marrack, P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* **288**, 675-8 (2000).
93. McInnes, I. B., Leung, B. P., Sturrock, R. D., Field, M. & Liew, F. Y. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **3**, 189-95 (1997).
94. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
95. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).
96. Weglarz, L., Dzierzewicz, Z., Skop, B., Orchel, A., Parfiniewicz, B., Wisniowska, B., Swiatkowska, L. & Wilczok, T. *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides induce endothelial cell IL-6 and IL-8 secretion and E-selectin and VCAM-1 expression. *Cell Mol Biol Lett* **8**, 991-1003 (2003).
97. Hagi-Pavli, E., Farthing, P. M. & Kapas, S. Stimulation of adhesion molecule expression in human endothelial cells (HUVEC) by adrenomedullin and corticotrophin. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C239-46 (2004).
98. Krump-Konvalinkova, V., Bittinger, F., Unger, R. E., Peters, K., Lehr, H. A. & Kirkpatrick, C. J. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest* **81**, 1717-27 (2001).
99. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **100**, 158-73 (2007).
100. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* **100**, 174-90 (2007).
101. Chi, J. T., Chang, H. Y., Haraldsen, G., Jahnsen, F. L., Troyanskaya, O. G., Chang, D. S., Wang, Z., Rockson, S. G., van de Rijn, M., Botstein, D. & Brown, P. O. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10623-8 (2003).
102. Auerbach, R., Alby, L., Morrissey, L. W., Tu, M. & Joseph, J. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res* **29**, 401-11 (1985).

103. Strehl, R., Schumacher, K., de Vries, U. & Minuth, W. W. Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng* **8**, 37-42 (2002).
104. Minuth, W. W., Schumacher, K., Strehl, R. & Kloth, S. Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* **11**, 495-522 (2000).
105. Dewey, C. F., Jr., Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A., Jr. & Davies, P. F. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* **103**, 177-85 (1981).
106. Lin, K., Hsu, P. P., Chen, B. P., Yuan, S., Usami, S., Shyy, J. Y., Li, Y. S. & Chien, S. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9385-9 (2000).
107. Tajima, S., Akagi, A., Tanaka, N., Ishibashi, A., Kawada, A. & Yamaguchi, N. Expression of type XVI collagen in cultured skin fibroblasts is related to cell growth arrest. *FEBS Lett* **469**, 1-4 (2000).
108. Steeber, D. A., Venturi, G. M. & Tedder, T. F. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *Trends Immunol* **26**, 9-12 (2005).
109. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Majeau, G. R., Cotran, R. S. & Gimbrone, M. A., Jr. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* **160**, 618-23 (1984).
110. Lindqvist, E., Eberhardt, K., Bendtzen, K., Heinegard, D. & Saxne, T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 196-201 (2005).
111. Bobbio-Pallavicini, F., Caporali, R., Alpini, C., Avalle, S., Epis, O. M., Klersy, C. & Montecucco, C. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **66**, 302-7 (2007).
112. Haberman, A. M., William, J., Euler, C. & Shlomchik, M. J. Rheumatoid factors in health and disease: structure, function, induction and regulation. *Curr Dir Autoimmun* **6**, 169-95 (2003).
113. Shlomchik, M. J., Euler, C. W., Christensen, S. C. & William, J. Activation of rheumatoid factor (RF) B cells and somatic hypermutation outside of germinal centers in autoimmune-prone MRL/lpr mice. *Ann N Y Acad Sci* **987**, 38-50 (2003).
114. Stewart, J. J., Agosto, H., Litwin, S., Welsh, J. D., Shlomchik, M., Weigert, M. & Seiden, P. E. A solution to the rheumatoid factor paradox: pathologic rheumatoid factors can be tolerized by competition with natural rheumatoid factors. *J Immunol* **159**, 1728-38 (1997).
115. Blass, S., Engel, J. M. & Burmester, G. R. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **42**, 2499-506 (1999).
116. Corrigall, V. M., Bodman-Smith, M. D., Brunst, M., Cornell, H. & Panayi, G. S. Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to express an antiinflammatory cytokine profile by the stress protein BiP: relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **50**, 1164-71 (2004).
117. Panayi, G. S. & Corrigall, V. M. BiP regulates autoimmune inflammation and tissue damage. *Autoimmun Rev* **5**, 140-2 (2006).
118. Nishimoto, N., Kishimoto, T. & Yoshizaki, K. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* **59 Suppl 1**, i21-7 (2000).
119. Ulfgren, A. K., Grondal, L., Lindblad, S., Khademi, M., Johnell, O., Klareskog, L. & Andersson, U. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory

- cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis* **59**, 439-47 (2000).
120. Dewitt, S. & Hallett, M. Leukocyte membrane "expansion": a central mechanism for leukocyte extravasation. *J Leukoc Biol* **81**, 1160-4 (2007).
  121. Houssiau, F. A., Devogelaer, J. P., Van Damme, J., de Deuxchaisnes, C. N. & Van Snick, J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* **31**, 784-8 (1988).
  122. Rubin, B. & Sonderstrup, G. Citrullination of self-proteins and autoimmunity. *Scand J Immunol* **60**, 112-20 (2004).
  123. Takizawa, Y., Suzuki, A., Sawada, T., Ohsaka, M., Inoue, T., Yamada, R. & Yamamoto, K. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis* **65**, 1013-20 (2006).
  124. Oppenheimer-Marks, N., Brezinschek, R. I., Mohamadzadeh, M., Vita, R. & Lipsky, P. E. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo. *J Clin Invest* **101**, 1261-72 (1998).
  125. Masuko-Hongo, K., Kurokawa, M., Kobata, T., Nishioka, K. & Kato, T. Effect of IL15 on T cell clonality in vitro and in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **59**, 688-94 (2000).
  126. Isomaki, P. & Punnonen, J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med* **29**, 499-507 (1997).
  127. Koch, A. E., Kunkel, S. L. & Strieter, R. M. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Investig Med* **43**, 28-38 (1995).
  128. Barrera, P., Boerbooms, A. M., Janssen, E. M., Sauerwein, R. W., Gallati, H., Mulder, J., de Boo, T., Demacker, P. N., van de Putte, L. B. & van der Meer, J. W. Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis. Longitudinal evaluation during methotrexate and azathioprine therapy. *Arthritis Rheum* **36**, 1070-9 (1993).
  129. Sivalingam, S. P., Thumboo, J., Vasoo, S., Thio, S. T., Tse, C. & Fong, K. Y. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* **36**, 96-9 (2007).
  130. Shankar, S. & Handa, R. Biological agents in rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med* **50**, 293-9 (2004).
  131. Brennan, F. M. & McInnes, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **118**, 3537-45 (2008).

## 8. ANHANG

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Hans-Christian Lux, eidesstattlich, dass die hier vorgelegte Dissertation zum Thema „Reaktion primärer humaner Endothelzellen unter Einfluss von Antigenen der Rheumatoiden Arthritis“ von mir persönlich und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel und die Literatur vollständig angegeben sind.

Freiburg, den 05. April 2009

Hans-Christian Lux

**DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich zu allererst bei Herrn Dr. Dr. sc. med. Egerer für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für die konstruktiven Gespräche und Anregungen bedanken. Ein weiterer Dank geht an das Team des rheumatologisch-immunologischen Labors, das immer hilfsbereit und kooperativ war. Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Frank Schumann für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten danken. Außerdem möchte ich an dieser Stelle meinen Lektoren Clarissa, Christian und Jan danken, die sich die Zeit genommen haben diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester, die mich immer motiviert und mich mit ihrer Unterstützung und Liebe durch meine gesamte Ausbildung begleitet haben.

## **LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Veröffentlichung dieser Arbeit nicht angezeigt.