

**Rheumaklinik Berlin-Buch der Immanuel Diakonie Group  
Chefarzt: Professor Dr. med. Andreas Krause**

## **Habilitationsschrift**

# **„Charakterisierung von Kollagenase 3 (MMP-13) in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis“**

**zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Herrn Dr.rer.nat. Dr.med. Dirk Wernicke**

**geboren am 31. Oktober 1957**

<b>Eingereicht:</b>	<b>April 2008</b>
<b>Dekan:</b>	<b>Professor Dr. med. Martin Paul</b>
<b>1. Gutachter</b>	<b>Professor Dr. med. U. Müller-Ladner</b>
<b>2. Gutachter</b>	<b>Professor Dr. med. R. W. Kinne</b>

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Einleitung</b>	
2.1. Die Rheumatoide Arthritis – eine Erkrankung unklarer Ätiologie und Pathogenese....	5
2.2. Proteasen und der Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion.....	12
2.3. Kollagenase 3 – eine Matrix-Metalloprotease mit besonderen Eigenschaften.....	16
<b>3. Problemstellung.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1. Nachweis der Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis bei Rheumatoider Arthritis.....	21
4.2. Nachweis der Expression von Kollagenase 3 mRNA in Fibroblasten-ähnlichen Zellen und Analyse ihrer Regulation in synovialen Fibroblastenkulturen.....	30
4.3. Stimulation der Kollagenase 3 Expression in synovialen Fibroblasten durch Zell-Matrix-Wechselwirkungen.....	44
4.4. Vergleichende Untersuchungen der mRNA Expression von Kollagenase 3, MT1-MMP und Gelatinase A in der Synovialis bei Rheumatoider Arthritis.....	58
4.5. Kollagenase 3 – ein potentieller Marker der Rheumatoiden Arthritis.....	68
<b>5. Diskussion</b>	
5.1. Kollagenase 3 – biochemische Eigenschaften und Besonderheiten im Expressionsprofil.....	95
5.2. Regulation der Kollagenase 3 Expression in synovialen Fibroblasten.....	97
5.3. Regulation der Kollagenase 3 Expression in synovialen Fibroblasten durch Zell-Matrix-Wechselwirkungen.....	99
5.4. Zeitgleiche Expression von Kollagenase 3, MT-1 MMP und Gelatinase A an der Synovialis-Knorpel-Grenze.....	102
5.5. Kollagenase 3 – ein potentieller klinischer und histopathologischer Marker der Rheumatoiden Arthritis.....	103

---

<b>6. Zusammenfassung</b> .....	107
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	111
<b>8. Danksagung</b> .....	122
<b>9. Erklärung</b> .....	124

## 1. Abkürzungsverzeichnis

BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCP	zyklische citrullinierte Peptide
CRP	C- reaktives Protein
DMARD	disease modifying drugs
mAB	monoklonaler Antikörper
MMP	Matrix-Metalloprotease
MT-MMP	Membran-Typ Matrix-Metalloprotease
NOD/SCID Maus	Mausstamm nach Kreuzung von NOD (nonobesity) und SCID (severe combined immune deficiency) Stämmen
OA	Osteoarthritis
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
SF	primäre synoviale Fibroblasten

## 2. Einleitung

### 2.1. Die Rheumatoide Arthritis – eine Erkrankung unklarer Ätiologie und Pathogenese

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine immunvermittelte, chronisch-entzündliche Systemerkrankung mit einer großen klinischen Heterogenität. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur unzureichend verstanden. Klinische Manifestationen der Erkrankung sind destruktive Gelenkveränderungen, insbesondere der kleinen peripheren Gelenke, und der nicht obligatorische Befall verschiedener innerer Organe. In der Gruppe der chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen ist die RA mit einer Inzidenz von bis zu 1 % die häufigste chronisch-entzündliche Bindegewebserkrankung in Europa und Nordamerika (Choy & Panayi, 2001; Lee & Weinblatt, 2001).

Das pathogenetische Substrat der RA ist die persistierende Synovialitis, die mit einer progredienten Destruktion artikulärer Strukturen einhergeht. In der Synovialis, der Synovialflüssigkeit und in den gelenknahen Strukturen manifestiert sich ein Entzündungsprozess, der mit einer ausgeprägten Infiltration vor allem durch Makrophagen und Lymphozyten einhergeht und gekennzeichnet ist durch eine Hyperplasie der Synovialmembran mit Zeichen eines invasiv wachsenden Granulationsgewebes (Gay et al., 2002; Gay et al., 1993; Johnson et al., 1993, Kinne et al., 2007). Trotz erheblicher Fortschritte im Verständnis der pathogenetischen Mechanismen der RA in den zurückliegenden Jahren sind diese Erkenntnisse nach wie vor fragmentarisch und unser Wissen über die Ätiologie der Erkrankung nach wie vor unzureichend. Nachfolgend soll deshalb der Versuch unternommen werden, bisherige Erkenntnisse über die Pathogenese der RA in Form von *Hypothesen* zusammenzufassen.

#### Die RA – eine genetisch bedingte Erkrankung

Die RA ist, wie der arterielle Hypertonus, der Diabetes mellitus oder die Arteriosklerose, keine monogenetische Erkrankung sondern wird durch multiple genetische Faktoren verursacht. Dabei handelt es sich eher um die Kombination von genetischen Merkmalen als um krankheits-assoziierte Genmutationen.

Ähnlich wie andere Autoimmunerkrankungen ist die RA eine HLA - assoziierte Erkrankung (Stastny, 1978; Gregersen et al., 1987). Im Vergleich zur Gesamtpopulation wird bei den meisten RA Patienten ein nur geringes Spektrum von HLA DRB1 - Allelen exprimiert (Wordsworth et al., 1989). Die Expression der Allele DRB1 0401 und 0404 ist dabei mit der Schwere des Krankheitsverlaufes korreliert (Weyand et al., 1995; Ollier & MacGregor, 1995). So entwickeln HLA DRB1 0401 - homozygote Patienten häufig eine rheumatoide Vaskulitis.

Möglicherweise erfolgt über die Expression spezifischer HLA - Muster die Selektion krankheitsrelevanter T-Zellklone (Weyand & Goronzy, 1994). HLA - Gene sind damit für die Schwere des Krankheitsverlaufes der RA relevant, weniger jedoch für den Ausbruch der Erkrankung (Feist et al., 2007).

Das genetische Risiko, an der RA zu erkranken, definiert sich nicht ausschliesslich über HLA - assoziierte Gene (Seldin et al., 1999). Eineiige Zwillinge haben mit 12-15% eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit, an RA zu erkranken, als zweieiige Zwillinge, bei denen die Wahrscheinlichkeit 4% beträgt (Silman et al., 1993). Dabei scheint die Krankheitsprädisposition zu 60% genetisch determiniert zu sein, wobei eine grosse klinische Heterogenität auffällig ist (MacGregor et al., 1995). Das Spektrum potentieller Krankheitsgene ist vielfältig und schliesst Regulatoren der Immunantwort und des Zellzyklus sowie Gene von artikulären Strukturproteinen ein (McDermott et al., 1995; Mulcahy et al., 1996).

#### Die RA – eine Infektionserkrankung

Zahlreiche akute und chronisch-entzündliche Prozesse werden durch Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren und Mycoplasmen verursacht. Diese Beobachtungen, die Infiltration der chronisch-entzündlichen Synovialis durch immunkompetente Zellen sowie das Verursachen einer chronischen Arthritis durch *Borrelia burgdorferi* führten zu dem Konzept einer infektiösen Genese der RA (Burmester et al., 1995; Nocton & Steere, 1995). Desweiteren ist in Synoviozyten von HTLV1 – positiven Patienten, welche klinisch eine RA - ähnliche Polyarthritiden entwickeln können, HTLV1 – provirale DNA nachweisbar (Nakajima et al., 1993; Nishioka et al., 1996). Darüber hinaus gibt es Beobachtungen zur Existenz Virus-ähnlicher Partikel in der rheumatoiden Synovialis (Stransky et al., 1993). Es ist eine gegenwärtig weder bewiesene noch widerlegte Vermutung, dass die RA (a) auf einer ständigen Erregerpersistenz (permanent hit) beruhen könnte, (b) Erreger wirksam geworden sind, aber nicht mehr nachweisbar sind (hit & hide) bzw. (c) vom Organismus bereits eliminiert wurden (hit & run). So blieben alle Bemühungen, spezifische Erreger aus der Synovialis von RA-Patienten zu isolieren bzw. nachzuweisen, bisher erfolglos. Gleichzeitig liefert auch die Epidemiologie der RA keine Hinweise für das Vorliegen einer infektiösen Ursache im klassischen epidemiologischen Sinn. Es ist somit wenig wahrscheinlich, dass der chronische Entzündungsprozess bei RA durch ein einziges exogenes infektiöses Antigen verursacht wird.

#### Die RA – eine Erkrankung der gestörten Immunantwort

Es besteht die potentielle Möglichkeit, dass es sich bei der RA um eine Erkrankung handelt, der eine gestörte Immunantwort auf unterschiedliche Antigene zugrunde liegt. Eine solche

Hypothese findet ihre Analogie in der Pathogenese von Erkrankungen wie der Pneumonie oder der Meningitis, die trotz eines mannigfaltigen Erregerspektrums charakteristische Organmanifestationen aufweisen. Entsprechend eines solchen Konzeptes müssten bei der RA immunkompetente Zellen, wie T- und B-Zellen sowie Makrophagen, ein charakteristisches Spektrum an Zytokinen exprimieren und damit den Verlauf der Immunantwort definieren.

Zytokine von T-Zellen und Makrophagen werden in pro- und anti-entzündliche Zellmediatoren unterteilt. Zu den stärksten proentzündlichen Zytokinen zählen die Interleukine IL-1, -2, -6, -12 und -15, Interferon  $\text{INF-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$ . Anti-entzündliche Zytokine sind die Interleukine IL-4, -10 und -13 sowie  $\text{TGF-}\beta$  (Andreacos et al., 2002). Bisher durchgeführte Studien zur Charakterisierung der Zytokinexpression bei RA sind jedoch vieldeutig. Dabei scheint die ausgesprochen niedrige Expressionshöhe von T-Zellzytokinen in der Synovialis ein prinzipielles Problem zu sein (Chen et al., 1993). So konnte nur mittels molekularbiologischer Methoden der Nachweis einer IL-2 - und Interferon- $\gamma$  - Produktion in der Synovialis erbracht und die RA als eine TH1 - assoziierte Erkrankung charakterisiert werden (Simon et al., 1994; Dolhain et al., 1996). Möglicherweise muss die RA konkreter als eine TH17 – assoziierte Erkrankung eingestuft werden, da mit den Th17-Helfer-Zellen und dem IL-17 ein Zytokin mit besonderer proentzündlicher Aktivität identifiziert werden konnte (Lundy et al., 2007). Eine zentrale Bedeutung für die Aufrechterhaltung des proentzündlichen Geschehens in der Synovialis kommt  $\text{TNF-}\alpha$  zu (Deleuran et al., 1992; Maini et al., 1995; Maini, 2004; Schwartzman et al., 2004). Entsprechend eindrucksvoll sind die Therapieergebnisse bei RA-Patienten mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\text{TNF-}\alpha$  bzw. seinen Rezeptor (Andreacos et al., 2002; Maini, 2004; Schwartzman et al., 2004). Offen bleibt die Frage, warum in ca. 20% der Fälle ein diesbezüglicher Therapieerfolg ausbleibt. Als weiteres proentzündliches Zytokin wird IL-1 $\beta$  klinisch erfolgreich unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers geblockt (Furst et al., 2003; Fleischmann et al., 2003) und IL-15 als ein vielversprechendes therapeutisches Zielmolekül angesehen (McInnes et al., 1996; Andreacos et al., 2002). Ungeachtet dessen bleibt zu hinterfragen, warum es sich bei letztgenannten proentzündlichen Zytokinen um Zellmediatoren handelt, die in der Synovialis bei RA überwiegend durch Makrophagen, nicht jedoch durch T-Zellen sezerniert werden (Kinne et al., 2007). Ungeklärt ist auch die Rolle der anti-entzündlichen Zytokine in der Pathogenese der RA: So ist IL-10 in der Synovialis bei RA in grösseren Konzentrationen nachweisbar, offenbar aber von untergeordneter klinischer Relevanz bezüglich der Knorpel- und Knochendestruktion (Isomaki et al., 1996; van Roon et al., 1996). In diesem Zusammenhang sind neue Erkenntnisse aus den Untersuchungen über CD25 – positive regulatorische Treg – Zellen zu erwarten, die IL-10 und  $\text{TGF-}\beta$  in grösseren Mengen produzieren und die Funktion der anderen T-Zell-Populationen kontrollieren (Bluestone et al., 2005; Lundy et al., 2007). Durch die Interaktionen der T-Zelle sowohl mit den anderen Zellen des Immunsystems als

auch mit anderen Zelltypen, wie den aktivierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen, kommt der T-Zelle eine Schlüsselrolle in der Regulation von Entzündung und Gelenkdestruktion zu (Lundy et al., 2007).

Charakteristisch für die RA ist das Vorhandensein eines Rheumafaktors (RF), d.h. von Autoantikörpern gegen multiple Epitope des Fc-Fragmentes vom Immunglobulin G (Mauri & Ehrenstein, 2007; Dörner & Burmester, 2008). Im Unterschied zum RF bei maligne entarteten B-Zellen ist die molekulare Heterogenität des RF bei RA sehr gross (Carson et al., 1987; Randen et al., 1992). Dabei ist nicht endgültig geklärt, ob es sich bei den RF-positiven B-Zellen um vorrangig Immunglobulin-sezernierende oder Antigen-produzierende Zellen handelt (Carson et al., 1991; Dörner et al., 2004). Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass die Schwere der RA mit der Anwesenheit des RF korreliert (Symmons et al., 2006). Neben der Antikörperproduktion sind B-Zellen auf verschiedene Weise in die Pathogenese der RA involviert: B-Zellen formieren gemeinsam mit T-Zellen Follikel-ähnliche Strukturen in den betroffenen Geweben (Stiehl 1997; Takemura et al., 2001) und stellen in den Spätphasen der Erkrankung die dominante Antigen-präsentierende Zelle dar (MacLennan et al., 1997). B-Zellen werden nicht nur durch andere Zellen über Zytokine, wie den B-cell activating factor der TNF- $\alpha$  - Familie (BAFF), CXC chemokine – Liganden CXCL12 und CXCL13 sowie Lymphotoxin  $\beta$  reguliert, sondern sind selbst über die Produktion von Zytokinen, wie IL-4 und -10, in die Regulation des Immunsystems involviert (Mauri & Ehrenstein, 2007).

Es muss Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, die Rolle von immunkompetenten Zellen in der Pathogenese der RA aufzuklären. In diesem Zusammenhang ist auch die Frage zu beantworten, welche pathogenetischen Mechanismen für die Chronifizierung des entzündlichen Geschehens bei RA relevant sind. Bezüglich des Prozesses der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion haben Untersuchung des Einflusses des Immunsystems auf Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten eine besondere Bedeutung. Diese Zelltypen sind nicht nur passiv dem Einfluss von Zytokinen ausgesetzt, sondern sie spielen selbst eine aktive Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix unter den Bedingungen eines chronisch-entzündlichen Geschehens bei RA (Müller-Ladner et al., 2005; Neumann et al., 2005; Schett, 2007; Boyce & Xing, 2007; Otero & Goldring, 2007).

### Die RA – eine Erkrankung der gestörten Selbst-Toleranz

Das antigene Rezeptorrepertoire von T-Zellen ist nicht genetisch festgelegt, sondern wird in einem komplexen Selektionsprozess erworben (Kamradt & Mitchison, 2001; Kamradt et al., 2003). Somit können Defekte in diesem Selektionsprozess zu Störungen in der Selbst-Toleranz des Organismus führen. „Verbotene“ T-Zellklone, welche spezifisch mit antigenen



Determinanten aus dem Knorpelgewebe und der Synovialis interagieren, könnten auf diese Weise das pathogenetische Geschehen bei der RA initiieren. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass in unterschiedlichen Maus- und Rattenlinien eine Polyarthritits durch die Injektion von Kollagen-Typ II induzierbar ist (Cremer et al., 1994; Erlandsson et al., 1994; Nabozny et al., 1996) bzw. andere Komponenten artikulärer Strukturen eine chronische Immunantwort hervorrufen können (Goodacre et al., 1993 ; Buzas et al., 1995). Es ist jedoch bisher nicht gelungen, eine entsprechend spezifische Zellaktivierung im Rezeptorrepertoire der lokalen T-Zellen nachzuweisen. Eine solche Zielstellung ist möglicherweise auch deshalb wenig realistisch, da spezifische T-Zellklone zellzahlmässig und im Vergleich zu Bystander-T-Zellen eher klein sind (Gonzalez-Quintal et al., 1996). Ausserdem werden T-Zellklone häufig nur über einen sehr begrenzten Zeitraum exprimiert. Erschwerend kommt nicht nur das gleichzeitige Auftreten von über 100 spezifischen lokalen T-Zellklonen hinzu, sondern auch die Plastizität des T-Zell-Rezeptorrepertoires. Es bleibt abzuwarten, ob sich das Spektrum potentieller krankheitsinduzierender Autoantigene auf einige wenige einschränken lässt. Deren Identifizierung wäre jedoch wenig sinnvoll, sollte sich herausstellen, dass vielfältige Autoantigene einen gemeinsamen pathogenetischen Signaltransduktionsweg in der Synovialis bei RA induzieren sollten.

#### Die RA – eine Erkrankung der unkontrollierten Zellproliferation

Charakteristisch für die RA ist die unkontrollierte Proliferation unterschiedlicher Zelltypen, wie der CD4+ T-Zellen (Waase et al., 1996; Schmidt et al., 1996) und Fibroblasten-ähnlicher Zellen (Lafyatis et al., 1989; Gay et al., 1993; Gay, 2000; Müller-Ladner et al., 2000). Die Ursachen einer unkontrollierten Proliferation von immunkompetenten und Fibroblasten-ähnlichen Zellen sind im einzelnen nicht geklärt und schliessen eine gestörte Regulation des Zellzyklus und der Apoptose ein (Neumann et al., 2004; Choy & Panayi, 2001; Franz et al., 2000; Krammer et al., 1994).

#### *Proliferation immunkompetenter Zellen.*

Bei RA konnte gezeigt werden, dass nur wenige klonale Populationen von T-Zellen ausschliesslich in artikulären Geweben nachweisbar sind (Fitzgerald et al., 1995; Goronzy et al., 1994). Die meisten der CD4+, CD8+ und CD4-CD8- T-Zellklone sind gleichzeitig auch im peripheren Blut anzutreffen, wobei CD8+ und CD4-CD8- T-Zellklone häufig in der Normalbevölkerung, insbesondere im Alter nachweisbar sind (Posnett et al., 1994). Im Gegensatz dazu weisen RA Patienten, wie auch Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, ein klonales Wachstum von CD4+ T-Zellen auf (Waase et al., 1996). Die Besonderheit dieser CD4+ T-Zellklone besteht im Fehlen einer CD28 Expression (CD4+CD28-), ohne dass dadurch die Antigen-induzierte Stimulierbarkeit dieser Zellen

wesentlich beeinträchtigt ist (Park et al., 1997). Gleichzeitig weisen CD4+CD28- T-Zellen veränderte Proliferationseigenschaften auf und sind Apoptose-induzierenden Signalen gegenüber deutlich insensitiver (Jendro et al., 1995). Es ist interessant, dass der Anteil von CD4+CD28- T-Zellen im peripheren Blut von RA Patienten mit dem klinischen Auftreten extraartikulärer Manifestationen der Erkrankung, wie rheumatoider Vaskulitis und Rheumaknoten, korreliert. Somit vermitteln CD4+CD28 - T-Zellklone vermutlich durch eine inkomplette Toleranz eher die systemische Autoimmunreaktion bei RA und weniger den lokalen Entzündungsprozess in der Synovialis. Es muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, ob es sich bei den CD4+ T-Zellen-Klonen tatsächlich um einen intrinsischen Proliferationsdefekt handelt, oder ob die Oligoklonalität auf eine permanente Induktion durch Autoantigene zurückzuführen ist (Schmidt et al., 1996; Park et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass offensichtlich ein Polymorphismus im programmed death – 1 (PD-1) Gen zu einer verzögerten Eliminierung autoreaktiver T-Zellen führt (Lin et al., 2004).

#### *Invasives Wachstum Fibroblasten-ähnlicher Zellen.*

Die bei der RA nachweisbare hyperplastische Synovialis weist Merkmale eines transformierten, invasiv wachsenden Granulationsgewebes auf (Gay et al., 1993; Gay, 2000; Müller-Ladner et al., 2000; Neidhart et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in den Frühphasen der Erkrankung histomorphologisch keine Entzündungszellen nachweisbar sind (Fassbender & Gay, 1988), bereits zu diesem Zeitpunkt aber Fibroblasten-ähnliche Zellen aus der hyperplastischen Synovialmembran in angrenzende Knorpel- und Knochenstrukturen eindringen (Shiozawa et al., 1983; Fassbender, 1983). Fassbender (1983) konnte zeigen, daß 5 - 10 % der Zellen des Pannusgewebes transformierten mesenchymalen Zellen ähneln. Synoviale Fibroblasten von Patienten mit RA zeigen in vitro dreidimensionales Wachstum (Lafyatis & Wilder, 1989), fehlende Kontaktinhibition (Yocum & Wilder, 1988) und invasives Wachstum in rekonstruierten Basalmembranen (Frye et al., 1992). Dabei bestehen allerdings histopathologisch prinzipielle Unterschiede zwischen dem invasiven Wachstum Fibroblasten-ähnlicher Zellen bei RA und dem malignen Wachstum von Tumorzellen (Fassbender, 1998). Ergänzend weisen RA-ähnliche Arthropathien in unterschiedlichen Tiermodellen nicht auf eine primäre Beteiligung autoimmuner Prozesse hin: Die MRL/l-Maus entwickelt spontan eine destruiende Gelenkerkrankung, wobei an den Stellen der Knorpeldestruktionen transformiert erscheinende Fibroblasten-ähnliche Zellen nachweisbar sind (O'Sullivan et al., 1985). c-fos transgene Mäuse entwickeln eine Antigen-induzierte Arthritis ohne lymphozytäre Infiltrate aber mit Fibroblasten-ähnlichen Zellen an den Stellen der Knorpel- und Knochendefekte (Shiozawa et al., 1992). In Kenntnis dieser experimentellen Daten muss hinterfragt werden, ob progrediente Gelenkdestruktion und

autoimmune Entzündungsreaktion bei RA nicht eher als separate pathogenetische Prozesse in einem gemeinsamen Krankheitsgeschehen zu betrachten sind (Zvaifler & Firestein, 1994, Geiler et al., 1997, Müller-Ladner & Gay, 2002). Knorpel- und Knochendestruktion sind dann nicht ausschliesslich als ein immunologisch vermitteltes pathogenetisches Geschehen aufzufassen, sondern als ein T-Zell- und Makrophagen - unabhängiger Prozess, der seinerseits zu einer Stimulation des Immunsystems führen könnte.

Zusammenfassend ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, aus den komplexen und zum Teil kontroversen experimentellen Ergebnissen und klinischen Befunden ein einheitliches Konzept der Pathogenese der RA zu entwickeln. Begründet liegt dies vor allem in der grossen klinischen und histopathologischen Heterogenität der Erkrankung und in einem wechselhaften Krankheitsverlauf, der sich oft über Jahre und Jahrzehnte erstreckt. Darüber hinaus wird durch langjährige medikamentöse Therapien in die Krankheitsverläufe eingegriffen, was das Verständnis der pathogenetischen Mechanismen der RA nicht erleichtert. Unzureichend sind nach wie vor unsere Kenntnisse über die initialen Veränderungen in den betroffenen Gelenken. Dies ist u.a. begründet in einer immer noch verzögerten Vorstellung der Patienten beim Rheumatologen nach Erstmanifestation der Erkrankung, aber auch in den eingeschränkten Möglichkeiten einer frühzeitigen invasiven Materialgewinnung. Somit kann nur die Gesamtheit der Erkenntnisse aus experimentellen Arbeiten, tierphysiologischen Untersuchungen und klinischen Studien zum besseren Verständnis der Ätiologie und Pathogenese der RA beitragen.

## 2.2. Proteasen und der Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion

Einer der am wenigsten verstandenen Aspekte des chronisch-entzündlichen Geschehens bei RA sind die irreversiblen Umbauprozesse im Bindegewebe. Im Ergebnis der chronisch-entzündlichen Veränderungen in der Synovialis kommt es in den betroffenen Gelenkabschnitten zu einer Zerstörung der normalen Gewebestruktur, zu fibrotischen Umbauten und letztlich zum Funktionsverlust der Gelenke. Die Destruktion der extrazellulären Matrix kann dabei sowohl mit der Proliferation von immunkompetenten Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten in Zusammenhang stehen, als auch das Ergebnis Matrix-degradierender Prozesse sein.

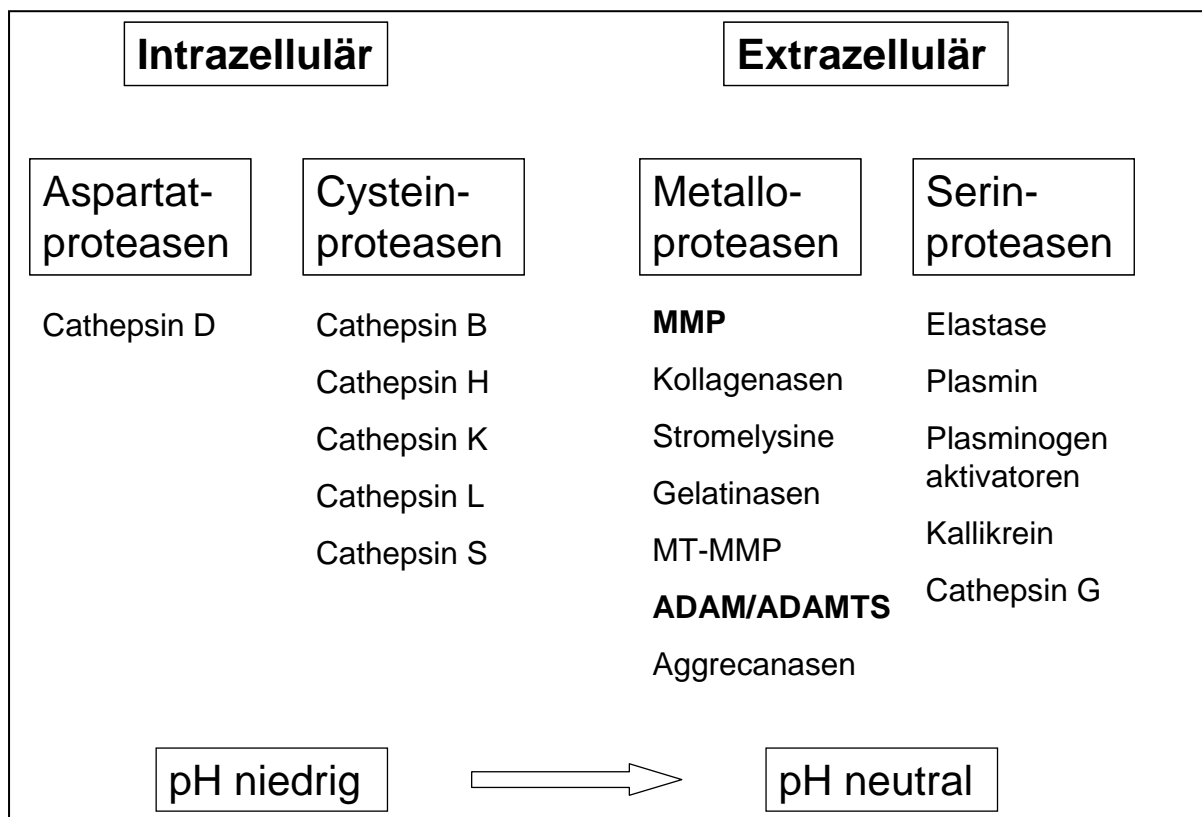
Die Komponenten der extrazellulären Matrix werden vorrangig durch Proteasen (Endopeptidasen) gespalten. Proteasen sind entweder in Lysosomen enthalten, wo sie Proteine spalten, die durch Endozytose aufgenommen wurden, oder sie werden extrazellulär sezerniert und degradieren extrazelluläre Matrixproteine in Geweben, Gewebsflüssigkeiten und im Plasma. Cystein- und Aspartat-Proteasen wirken intrazellulär bei niedrigem pH-Wert, Serin- und Metalloproteasen sind extrazellulär bei neutralem pH aktiv. Die wichtigsten Proteasen, deren Beteiligung am Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA beschrieben wurde, sind in Abb. 1 zusammengefasst. Eine besondere Bedeutung im Prozess des Umbaus und der Degradation der extrazellulären Matrix haben die bei neutralem pH aktiven Serin- und Metalloproteasen. Die Rolle der Serinproteasen ist dabei vor allem eine indirekte, da diese Proteasen hauptsächlich eine regulatorische Rolle spielen und Bestandteil von Proteinkaskaden wie der Koagulation, der Fibrinolyse, des Komplement-Systems und des Kinin-Systems sind (Walker & Lynas, 2001; Rakic et al., 2003; Hollenberg, 2003; Wegner, 2003; Yousef & Diamandis, 2003). Metalloproteasen sind demgegenüber in der Lage, einzelne Komponenten der extrazellulären Matrix mit hoher Effizienz zu spalten (Woessner, 2002; Overall, 2002; Flannery, 2006). Entsprechend ihrer hohen katalytischen Aktivität sind Metalloproteasen auf mehreren Ebenen streng reguliert: (a) auf der Ebene der Genexpression, (b) der proteolytischen Proenzymaktivierung und (c) über Wechselwirkungen mit spezifischen Inhibitoren (Visse & Nagase, 2003; Stone et al., 1999; Flannery 2006; Jones, 2006; Rengel et al., 2007). Zu den Metalloproteasen gehört die Familie der Matrix-Metalloprotease (MMP) sowie die Familien der ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) und ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) (Flannery 2006; Jones, 2006; Burrage et al., 2006).

Die Proteasen der MMP-Familie spalten vor allem verschiedene Kollagene und Kollagenspaltprodukte, aber auch andere extrazelluläre Matrixmoleküle wie Laminin, Fibronectin, Vitronectin (Visse & Nagase, 2003; Overall, 2002, Malemud, 2006). Gleichzeitig ist bekannt, dass MMP eine Vielzahl von nicht-extrazellulären Matrix-Molekülen spalten, wie

Precursor-Formen von Wachstumsfaktoren, Integrine und Adhäsionsmoleküle, sowie darüber hinaus an der Aktivierung von Rezeptoren der Wachstumsfaktoren und Zytokine beteiligt sind (Stamenkovic, 2003; Flannery 2006). Mit diesen Eigenschaften haben MMP nicht nur eine grosse Bedeutung für die Spaltung von Komponenten der extrazellulären Matrix, sondern auch für Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose (Elliott & Cawston, 2001; Bigg & Rowan, 2001; Muller-Ladner & Gay, 2002).

MMP werden in Abhängigkeit von ihrer Substratspezifität, der Domänenstruktur und Sequenzhomologie in sechs Gruppen unterteilt:

Kollagenasen sind Kollagenase 1 (MMP-1, interstitielle Kollagenase), Kollagenase 2 (MMP-8, neutrophile Kollagenase) und Kollagenase 3 (MMP-13). Kollagenasen spalten die dreifach helikalen Kollage der Typen I, II und III spezifisch zwischen Gly 775 und Leu/Ile 776 in zwei



**Abb. 1** Proteasen im Prozess der Degradation der extrazellulären Matrix.

Proteasen sind entsprechend der Struktur ihres aktiven Zentrums in Familien eingeteilt. Cystein- und Aspartat-Proteasen wirken intrazellulär bei niedrigem pH-Wert, Serin- und Metalloproteasen sind extrazellulär bei neutralem pH aktiv. ADAM – **a** disintegrin **and metalloprotease**, ADAMTS – **a** disintegrin **and metalloprotease with thrombospondin motif**, MMP – Matrix-Metalloprotease.

Fragmente mit einem  $\frac{3}{4}$  grossen N-terminalen Fragment und einem  $\frac{1}{4}$  grossen C-terminalen Fragment. Die katalytische Aktivität der Kollagenasen ist bezüglich der einzelnen Kollagen-Typen unterschiedlich. Nach erfolgtem Aufspalten dreifach helikalen Kollagens sind die Kollagenspaltprodukte einer weiteren Degradation zugänglich, was den Prozess der Zerstörung der extrazellulären Matrix irreversibel macht (Ivaska & Heino, 2000).

Gelatinasen sind Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9). Beide Gelatinasen spalten das Kollagen-Typ IV der Basalmembran und die Kollagen-Spaltprodukte (Gelatine) mit hoher Effizienz. Es scheint eine besondere Eigenschaft von Gelatinase A zu sein, auch dreifach helikales Kollagen spalten zu können (Patterson et al., 2001). Darüber hinaus spielt Gelatinase A möglicherweise eine wichtige Rolle in der Osteogenese (Martignetti et al., 2001).

Stromelysine, zu denen Stromelysin 1 (MMP-3), Stromelysin 2 (MMP-10) und Stromelysin 3 (MMP-11) zählen, sind für den Abbau von nicht-Kollagen-Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Proteoglykane und Glykoproteine verantwortlich. Darüber hinaus besteht eine wichtige Funktion der Stromelysine in der proteolytischen Aktivierung mehrerer proMMP, insbesondere der Kollagenasen (Suzuki et al., 1990).

Matrilysine umfassen Matrilysin 1 (MMP-7) und Matrilysin 2 (MMP-26, Endometase). Ihre Substratspezifität ist mit der der Stromelysine vergleichbar. Matrilysin 1 prozessiert eine Reihe von Zelloberflächenmolekülen, wie Fas-Ligand, pro-TNF- $\alpha$  und E-cadherin (Stamenkovic, 2003).

Membran-Typ MMP (MT-MMP) bestehen aus sechs Vertretern, wobei vier MT-MMP (MT1-MMP, MMP-14; MT2-MMP, MMP-15; MT3-MMP, MMP-16; und MT5-MMP, MMP-24) über eine transmembrane Domäne verfügen und zwei MT-MMP (MT4-MMP, MMP-17 und MT6-MMP, MMP-25) einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) - Anker aufweisen. MT-MMP spalten unterschiedliche Moleküle der extrazellulären Matrix und sind, MT4-MMP ausgenommen, zur Zellmembran-assoziierten Aktivierung von proMMP-2 befähigt. MT1-MMP spaltet darüber hinaus dreifach helikales Kollagen (Ohuchi et al., 1997). MT1-MMP ist wichtig für die postnatale Entwicklung des Skelettsystems (Holmbeck et al., 1999) und die Angiogenese (Pepper, 2001).

Andere MMP schliessen insgesamt 7 MMP ein. Von diesen wird Metalloelastase (MMP-12) hauptsächlich in Makrophagen exprimiert und ist essentiell für deren Migration (Shiple et al., 1996, Kinne et al., 2007). MMP-19 wurde als ein T-Zell-abhängiges Autoantigen bei RA Patienten identifiziert (Kolb et al., 1997).

Die Metalloproteasen der ADAM-Familie zeichnen sich insbesondere durch ihre „shedase“-Aktivität aus. So bewirkt ADAM-17 das shedding von TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ -Rezeptoren, was die parakrine und endokrine Wirkung von TNF- $\alpha$  ermöglicht (Böhm et al., 2001; Huovila et al.,

2005). Zur Familie der ADAMTS zählen mit den Prokollagen-N-Propeptidasen ADAMTS-2, -3 und -14 Proteasen, die den N-Terminus der Prokollagene I, II und III spalten. Grosse Bedeutung für die Spaltung des Aggrecans, des dominierenden Proteoglycanmoleküls des hyalinen Knorpels, haben die ADAMTS mit Glutamyl-Endopeptidase-Aktivität, ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 und -15 (Nagase & Kashiwagi, 2003; Jones, 2006). Insbesondere ADAMTS-4 und -5 haben nicht nur eine hohe Aggrecanase-Aktivität, sondern weisen auch eine breite proteolytische Aktivität gegenüber unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix (Versican, Brevican, Decorin, Fibromodulin, COMP) auf. ADAMTS-13 hat eine besondere Funktion, indem diese ADAMTS die von Willebrand Faktor – spaltende Protease darstellt (Jones, 2006).

Unser Wissen über extrazellulär wirkende Proteasen hat sich in den zurückliegenden 15 Jahren durch die Entdeckung neuer Proteasen erheblich erweitert. Das ermöglicht zum einen, diejenigen Proteasen zu identifizieren, die für die spezifische Destruktion der extrazellulären Matrix bei umschriebenen Erkrankungen, wie der RA, verantwortlich sind. Zum anderen haben Proteasen eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der Prozesse der limitierten Proteolyse und für die Aktivierung von Zytokinen und deren Rezeptoren. Damit werden sich unsere Erkenntnisse nicht nur bezüglich der Mechanismen der Knorpel- und Knochendestruktion deutlich erweitern, sondern auch bezüglich der Regulation akuter und chronischer entzündlicher Prozesse. Das wiederum birgt ein erhebliches Potential für innovative Therapieansätze, u.a. bei destruierenden Gelenkerkrankungen wie der RA.

### 2.3. Kollagenase 3 – eine Matrix-Metalloprotease mit besonderen Eigenschaften

Kollagenase 3 (MMP-13) ist die dritte derzeit bekannte humane Kollagenase und weist im Vergleich zu den beiden anderen Kollagenasen, Kollagenase 1 (MMP-1) und Kollagenase 2 (MMP-8), Besonderheiten auf, die für ihre Rolle in der Pathogenese der RA von Relevanz sind.

Kollagenase 3, erstmals von Freije et al. (1994) aus Mammakarzinomgewebe kloniert, hat im Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Kollagenasen verschiedener Spezies die höchste Sequenzhomologie mit 86% zu den Kollagenasen der Ratte und Maus und besitzt nur eine ca. 50%ige Homologie zu den humanen Kollagenasen 1 und 2. Entsprechend dieser Sequenzhomologie sind auch die katalytischen Eigenschaften von Kollagenase 3 eher vergleichbar mit denen der Nagerkollagenasen. Von der Ratten- und Mauskollagenase ist bekannt, dass diese Proteasen alle drei Kollagen-Typen I, II und III mit vergleichbarer Effizienz spalten (Welgus et al., 1983). Dagegen spalten humane Kollagenase 1 und 2 nur die Kollagen-Typen III bzw. I mit jeweils hoher Effizienz und haben gegenüber Kollagen-Typ II, den Hauptkollagenbestandteil des hyalinen Knorpels, nur eine sehr geringe katalytische Aktivität (Hasty et al., 1987). Darüber hinaus ist Kollagenase 3 zur effizienten Spaltung weiterer Kollagen-Typen des hyalinen Knorpels, der Kollagen-Typen IX und X, befähigt (Knäuper et al., 1997; Danfelter et al., 2007). Ausserdem spaltet Kollagenase 3 Aggrecan (Fosang et al., 1996), Kollagen-Typ IV, den Hauptkollagenbestandteil der Basalmembran, und denaturierte Kollagene (Gelatine) mit hoher Effizienz (Knäuper et al., 1996 und 1997). Damit ist Kollagenase 3 eine hochpotente extrazelluläre Protease mit einer breiten Substratspezifität.

Als weitere Besonderheit von Kollagenase 3 konnte eine Expression dieser MMP in adulten menschlichen Geweben bisher nur unter pathologischen Bedingungen gezeigt werden. So gelang der Nachweis von Kollagenase 3 in unterschiedlichen malignen Tumoren (Heppner et al., 1996; Uria et al., 1997; Johansson et al., 1999a, Cazorla et al., 1998; Uria et al., 1998; Airola et al., 1999; Pendas et al., 2000, Elnemr et al., 2003; Hattori et al., 2003), in chronischen Wunden (Vaalamo et al., 1997, 1998), bei Periodontitis (Hernandez et al., 2007), bei Erkrankungen der Kornea (Li et al., 2003), bei chronischen Gefässprozessen, wie der Arteriosklerose (Sukhova et al., 1999; Yoon et al., 2002) und beim Aortenaneurysma (Mao et al., 1999). In artikulären Geweben wurde Kollagenase 3 im Knorpelgewebe bei Osteoarthritis (OA) (Reboul et al., 1996, Mitchell et al., 1996, Shlopov et al., 1997, Moldovan et al., 1997, Kozaci et al., 1997) und in der Synovialis bei RA (Wernicke et al., 1996, Stahle-Bäckdahl et al., 1997, Lindy et al., 1997, Tetlow & Woolley, 1998, Kontinen et



al., 1999a, 1999b) gefunden. Unter physiologischen Bedingungen konnte eine Expression von Kollagenase 3 bislang nur während der Embryogenese des Knochengewebes in Osteoblasten und hyperthrophen Chondrozyten (Johansson et al., 1997b, Stahle-Bäckdahl et al., 1997) gezeigt werden. In keinem der bisher untersuchten normalen adulten Gewebe, einschließlich der normalen Synovialis (Wernicke et al., 1996, Konttinen et al., 1999b) sowie gutartiger Tumoren (Freije et al., 1994), war eine Expression von Kollagenase 3 nachweisbar.

Die Analyse der genomischen Sequenz von Kollagenase 3 und ihrer Promoterstruktur weisen auf eine weitere Besonderheit von Kollagenase 3 im Vergleich zu anderen MMP hin. Bezüglich der genomischen Lokalisation bildet Kollagenase 3 zusammen mit sieben anderen MMP, Kollagenase 1 und 2, Stromelysin 1 und 2, Matrilysin 1, Metalloelastase und Enamelysin, ein Cluster (Pendas et al., 2000). Wie bei den meisten MMP beinhaltet die Promoter-Sequenz von Kollagenase 3 eine TATA-Box (TATAAA) und ein AP-1 Element (TGACTCA). Letztere vermittelt die Bindung von Proteinen der Fos- und Jun-Familie (Samuel et al., 2007). Darüber hinaus verfügt Kollagenase 3 jedoch nur über ein PEA-3 Motiv (TAGGAAGT), welches die Bindung von Oncoproteinen der Ets-Familie vermittelt, und drei HRE Elemente (AGGA/TCA). Der geringe GC-Gehalt und der hohe Anteil an CpG/GpC-Dinukleotiden lassen vermuten, dass Kollagenase 3 kein permanent exprimiertes sondern eher ein kurzfristig anschaltbares Gen ist (Pendas et al., 1997). In Übereinstimmung damit konnte im proximalen MMP-13-Promoter ein negatives Regulationselement mit der Sequenzfolge AGRE nachgewiesen werden, welches die konstitutive Expression von Kollagenase 3 supprimiert und bisher in keiner weiteren Promoterregion von MMP-Genen nachgewiesen werden konnte (Benderdour et al., 2002). Der biologische Sinn einer eher kurzfristigen Aktivierung von Kollagenase 3 ist in dem hohen katalytischen Potential dieser Protease zu sehen, das auf eine solche Weise streng kontrolliert wird. Interessanterweise hat die Promoter-Sequenz von Kollagenase 3 ein OSE-2 Element (CAAACCACA), welches den Transkriptionsfaktor Cbfa I bindet und über die Regulation von Genen, die spezifisch in Osteoblasten exprimiert werden, die Knochenbildung beeinflusst (Jimenez et al., 1999).

In tierexperimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression der konstitutiv aktiven Kollagenase 3 in transgenen Mäusen zu einer exzessiven Spaltung des Kollagen-Typs II führt und mit erosiven Knorpelveränderungen verbunden ist (Neuhold et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor p53, der als Tumorsuppressor in synovialen Fibroblasten bei RA überexprimiert ist, unterdrückt die Kollagenase 3 – Transkription (Sun et al., 2000). Entsprechend ist im Kollagen-induzierten Arthritismodell in p53<sup>-/-</sup> DBA/1 Mäusen sowohl eine

höhere Kollagenase 3 – Expression als auch eine schwerere Arthritis nachweisbar (Yamanishi et al., 2002).

Die genannten Besonderheiten charakterisieren Kollagenase 3 als eine MMP, die möglicherweise für die Prozesse der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion von grosser Bedeutung ist. Die Rolle von Kollagenase 3 im Prozeß der Knorpel- und Knochendestruktion wurde bisher vor allem bei der OA näher untersucht. Bei Patienten mit OA kommt es zu einer deutlichen Stimulation der Expression von Kollagenase 3 in Chondrozyten (Reboul et al., 1996; Borden et al., 1996). Dabei konnte eine Kollagenase 3 Expression im osteoarthritischen Knorpel überwiegend in den tieferen Gewebsschichten des Knorpels nachgewiesen werden (Moldovan et al., 1997; Fernandes et al., 1998, Freemont et al., 1999). Genexpression und Proteinsynthese von Kollagenase 3 sind in primären Chondrozyten durch proentzündliche Zellmediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , stimulierbar. Dabei werden unterschiedliche Signaltransduktionswege über die Aktivierung von p38, ERK1/2 und JNK MAP Kinasen bedient (Shlopov et al., 1997 und 1999; Mengshol et al. 2000; Liacini et al., 2003; Ohno et al., 2006; Im et al., 2007; Muddasani et al., 2007).

Weniger untersucht ist die Rolle von Kollagenase 3 im Prozess der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion bei RA. Dies ist Gegenstand der nachfolgend referierten Arbeiten.

### 3. Problemstellung

Anliegen der Forschungsarbeiten ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese der RA, insbesondere des Prozesses der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion zu leisten. Trotz neuer und hochwirksamer immunsuppressiver Therapieformen besteht ein klinisches Hauptproblem bei der Behandlung der RA in einem nach wie vor unbefriedigenden Therapieerfolg der progredienten Gelenkdestruktion, welche letztlich zum Funktionsverlust der Gelenke und zu Invalidität führen. Entsprechend gross ist die sozial-ökonomische Relevanz dieses Problems. In Deutschland sind etwa 0.5 – 0.8% der erwachsenen Bevölkerung (ca. 600 000 Personen) von einer RA betroffen. Drei Viertel der Patienten haben deutliche bis schwere Funktionseinschränkungen der Gelenke. Mit regelmäßiger Hilfebedürftigkeit ist bei einem Drittel, mit Pflegebedürftigkeit bei einem Sechstel dieser Patienten zu rechnen.

Die bisher nur unbefriedigenden diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten bei der Behandlung der RA basieren auf einer nach wie vor unverstandenen Ätiologie und einer grossen klinischen Heterogenität der Erkrankung. Um neue Ansatzpunkte für die Behandlung der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA zu finden, wurde in der vorliegenden Arbeit nach Proteasen gesucht, die im Krankheitsgeschehen der RA bisher nicht beschrieben wurden. Im Mittelpunkt des Interesses standen dabei MMP, die in der Lage sind, unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix mit hoher Effizienz zu spalten. Mittels Homologiescreening mit degenerierten Primern gegen konservierte Genabschnitte der MMP Familie wurde in der Synovialis von RA Patienten nach MMP gesucht, deren Beteiligung am Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA bisher nicht bekannt war. Auf diese Weise wurde in der chronisch-entzündliche Synovialis ein cDNA Fragment mit Sequenzhomologie zu Kollagenase 3 (MMP-13) identifiziert.

Weiterführend wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Klonierung von Kollagenase 3 aus der Synovialis von Patienten mit RA.
2. Charakterisierung der mRNA Expression von Kollagenase 3 und anderer MMP in der Synovialis und an der Synovialis-Knorpel-Grenze.
3. Untersuchung der Zelltyp-spezifischen mRNA Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis von RA Patienten mittels *in situ* Hybridisierung in Kombination mit dem immunhistochemischen Nachweis von Zelltyp-spezifischen Antigenen.
4. Untersuchung der Regulation der mRNA Expression von Kollagenase 3 im Vergleich zu Kollagenase 1 in primären synovialen Fibroblasten (SF) - Kulturen von Patienten mit RA.

5. Analyse des Einflusses einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix auf die Expression von Kollagenase 3 in SF Kulturen.
6. Untersuchung der mRNA Expression von Kollagenase 3 in Zell-Knorpel-Implantaten nach Koimplantation von SF mit normalem humanem Knorpel in NOD/SCID-Mäuse.
7. Analyse der mRNA Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis in einer Kohorte von RA Patienten in Bezug auf klinische, paraklinische und histopathologische Parameter.

Die eigenen Forschungsergebnisse zu diesen Fragestellungen werden nachfolgend in Form einer Monographie mit Originalarbeiten vorgestellt und diskutiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Nachweis der Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis bei Rheumatoider Arthritis

Entsprechend der Zielstellung der vorliegenden Arbeit wurde in der Synovialis von Patienten mit RA nach MMP gesucht, deren Beteiligung am Prozess der Korpel- und Knochendestruktion bei dieser chronisch-entzündlichen Bindegewebserkrankung bisher nicht bekannt war. Mittels PCR mit degenerierten Primern gegen konservierte Genabschnitte in der Propeptid-Region (PRGXPD) und in der katalytischen Domäne (HEXGHXXG) von Proteasen der MMP Genfamilie wurde ein cDNA Fragment von 418 bp Länge mit Homologie zu MMP Genen in der Synovialis eines Patienten mit schwerer destruierender RA identifiziert. Dieses cDNA Fragment mit 86% Homologie zur Kollagenase der Ratte und Maus wurde verwendet, um nach der von Frohmann et al. (1988) beschriebenen Methode der RACE (Rapid amplification of cDNA ends) die vollständige cDNA-Sequenz von Kollagenase 3 zu klonieren. In der Northern blot-Analyse wurden zwei Transkripte von 2.0 und 2.8 kb Länge in der Synovialis von mehreren Patienten mit RA nachgewiesen, nicht jedoch bei Patienten ohne chronisch-entzündliche und destruierende Gelenkerkrankungen. Ausserdem war keine Expression von Kollagenase 3 mRNA in verschiedenen normalen menschlichen Geweben nachweisbar. Da von MMP bekannt ist, dass ihre Expression streng reguliert wird und gewebs- bzw. krankheitsspezifisch erfolgt, liessen diese Ergebnisse eine Beteiligung von Kollagenase 3 in der Pathogenese der Korpel- und Knochendestruktion bei RA vermuten.

Weiterführend wurde die mRNA Expression von Kollagenase 3 im Vergleich zu zwei anderen MMP, Kollagenase 1 (MMP-1) und Stromelysin 1 (MMP-3) bei 7 Patienten mit RA untersucht. Im Unterschied zu Kollagenase 1 und Stromelysin 1, deren mRNA Expression in der Synovialis bei allen Patienten nachweisbar war, konnte eine Expression von Kollagenase 3 mRNA nur bei 3 dieser Patienten gezeigt werden. Auffällig war, dass bei Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression die Expressionshöhe von Kollagenase 1 und Stromelysin 1 mRNA geringer war als bei Patienten ohne Kollagenase 3 mRNA Expression. Diese Ergebnisse sind ein erster Hinweis darauf, dass sich die Regulation der Kollagenase 3 Expression von der Regulation der beiden anderen MMP unterscheidet. Des weiteren lassen die Untersuchungen zur Sequenzhomologie vermuten, dass die katalytische Aktivität von Kollagenase 3 eine andere ist als die von Kollagenase 1 und Kollagenase 2 (MMP-8): Die Sequenzhomologie von Kollagenase 3 zu diesen beiden humanen Kollagenasen beträgt ca.

50%, zur Kollagenase der Ratte und Maus hingegen 86%. Interessanterweise ist für die Kollagenase der Ratte und Maus eine hohe katalytische Aktivität gegenüber unterschiedliche extrazelluläre Komponenten beschrieben worden, insbesondere auch gegenüber Kollagen-Typ II, den Hauptkollagenbestandteil des hyalinen Knorpels. Dagegen spalten humane Kollagenase 1 und 2 vor allem die Kollagen-Typen I bzw. III mit hoher Effizienz.

### **Veröffentlichung I.**

Wernicke D., Seyfert Ch., Hinzmann B., Gromnica-Ihle E., Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J. Rheumatol. 23 ( 4 ): 590-595, 1996.

#### 4.2. Nachweis der Expression von Kollagenase 3 mRNA in Fibroblasten-ähnlichen Zellen und Analyse ihrer Regulation in synovialen Fibroblastenkulturen

Das pathogenetische Substrat der RA ist die chronisch entzündliche und hyperplastische Synovialmembran, welche durch infiltratives Wachstum das angrenzende Knorpel- und Knochengewebe zerstört. Dabei kommt es sowohl zu einer Proliferation von Fibroblasten-ähnlichen Zellen, als auch zur Infiltration der Synovialis mit mononukleären Zellen. Um die Rolle von Kollagenase 3 in der Pathogenese der RA zu untersuchen, wurde die Expression von Kollagenase 3 mRNA in der Synovialis mittels in situ Hybridisierung mit dem immunhistochemischen Nachweis von Zelltyp-spezifischen Antigenen kombiniert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass eine diffuse Expression von Kollagenase 3 mRNA sowohl im synovialen lining als auch im sublining nachweisbar ist. Die Untersuchung von Präparaten der Synovialis-Knorpel-Grenze zeigt eine Expression von Kollagenase 3 mRNA unmittelbar an den Stellen der Knorpelerosionen. Bei der Charakterisierung der Zelltyp-spezifischen Expression von Kollagenase 3 ist deren mRNA fast ausschliesslich in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis lokalisiert. Nur weniger als 5% der CD 68 – positiven Makrophagen und vereinzelte Endothelzellen weisen eine Expression von Kollagenase 3 mRNA auf. CD 45 – positive Leukozyten zeigen keine mRNA Expression von Kollagenase 3.

Ausgehend von der Erkenntnis, dass Kollagenase 3 fast ausschliesslich in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis exprimiert wird, wurden SF Kulturen etabliert, um die Regulation von Kollagenase 3 im Vergleich zu Kollagenase 1 zu untersuchen. In 4 von 10 SF Kulturen konnte eine basale Expression von Kollagenase 3 mRNA nachgewiesen werden, wohingegen alle Zellkulturen eine deutliche basale Expression von Kollagenase 1 mRNA zeigten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass in der Synovialis von RA Patienten Kollagenase 1 mRNA bei allen, Kollagenase 3 mRNA jedoch nur bei einem Teil der Patienten exprimiert wird (siehe Abschnitt 4.1.).

Die beiden proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulieren in SF sowohl die mRNA Expression von Kollagenase 3 als auch von Kollagenase 1. Im Unterschied dazu wird nur die Expression von Kollagenase 3 mRNA über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und eine Aktivierung des Proteinkinase A Signaltransduktionsweges stimuliert. Gleichzeitig stimuliert PMA, ein direkter Aktivator von Proteinkinase C, die mRNA Expression von Kollagenase 1, nicht jedoch Kollagenase 3 mRNA.

Der stimulierende Effekt der proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  auf die mRNA Expression von Kollagenase 3 über eine Aktivierung des Proteinkinase A Signaltransduktionsweges ist spezifisch für SF und konnte nicht für primäre



Hautfibroblastenkulturen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wird die mRNA Expression von Kollagenase 1 durch TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  über eine Aktivierung des Proteinkinase C Signaltransduktionsweges sowohl in SF als auch in Hautfibroblasten stimuliert.

Somit wird bei RA Kollagenase 3 mRNA fast ausschliesslich in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis exprimiert. Die Expression von Kollagenase 3 und Kollagenase 1 mRNA ist durch die beiden proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulierbar. Darüber hinaus ist eine deutliche Erhöhung der Expression von Kollagenase 3 mRNA über eine Aktivierung des Proteinkinase A Signaltransduktionsweges spezifisch für die Regulation von Kollagenase 3 in SF.

### **Veröffentlichung II.**

Schulze Westhoff C., Freudiger D., Petrow P., Seyfert Ch., Zacher J., Kriegsmann J., Pap T., Gay S., Stiehl P., Gromnica-Ihle E., Wernicke D., Characterization of collagenase 3 (MMP-13) mRNA expression in the synovial membrane and in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum.* 42 (7): 1517-1527, 1999.

#### 4.3. Stimulation der Kollagenase 3 Expression in synovialen Fibroblasten durch Zell-Matrix-Wechselwirkungen

Die Expression von MMP wird sowohl durch humorale Faktoren, wie Zytokine, als auch über Zell-Matrix-Wechselwirkungen, z.B. via Integrin-Rezeptoren, reguliert. Um den Einfluss von Zell-Matrix-Wechselwirkungen auf die Expression von Kollagenase 3 in SF zu untersuchen, wurden SF in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix kultiviert. Die Expression von Kollagenase 3 wurde auf mRNA- und Proteinebene mittels Northern – bzw. Western Blot - Analyse untersucht und mit der Expression von Kollagenase 1 verglichen. Eine Kultivierung von SF in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix führt zu einer deutlichen Stimulation der Expression von Kollagenase 3 mRNA, die den stimulierenden Effekt der proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  um eine Größenordnung übersteigt. Im Gegensatz dazu kommt es zu keiner Stimulation der Kollagenase 3 mRNA Expression, wenn SF auf einer Kollagen-beschichteten Oberfläche kultiviert werden. Im Unterschied zu Kollagenase 3 mRNA wird die Expression von Kollagenase 1 mRNA durch die Kultivierung von SF in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix bzw. durch proentzündliche Zytokine (TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ ) in vergleichbarer Weise stimuliert. Die Erhöhung der mRNA Expression von Kollagenase 1 und 3 geht mit einer Erhöhung der Proteinsekretion beider Kollagenasen in das Zellkulturmedium einher, wobei beide Kollagenasen als Zymogene sezerniert werden. Somit wird in SF die Expression von Kollagenase 3, im Unterschied zu Kollagenase 1, stärker durch den Kontakt mit einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix stimuliert als durch proentzündliche Zytokine.

Um zu untersuchen, ob die Expression von Kollagenase 3 mRNA in SF durch den Kontakt mit Knorpelgewebe induzierbar ist, wurden SF von RA Patienten mit gesundem humanem Knorpel subkutan in immundefiziente NOD/SCID Mäuse koimplantiert. Nach 60 Tagen wurden die Zell-Knorpel-Implantate entnommen, histopathologisch begutachtet und mittels in situ Hybridisierung auf eine Expression von Kollagenase 1 und 3 untersucht. Nach dieser Inkubationszeit kommt es zu einer deutlichen Infiltration des koimplantierten Knorpels durch SF, die mit einer hochgradigen Destruktion des Knorpelgewebes einhergeht. Mittels in situ Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass eine mRNA Expression von Kollagenase 3 sowohl an der Oberfläche als auch in den Erosionsstellen des koimplantierten Knorpelgewebes nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu konnte in den Zell-Knorpel-Implantaten keine Expression von Kollagenase 1 mRNA beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist überraschend, da Kollagenase 1 in allen SF Kulturen eine deutliche basale Expression aufwies, welche sich darüber hinaus bei Kultivierung der Zellen in einer

dreidimensionalen Kollagen-Matrix deutlich erhöhte. Somit ist die Expression von Kollagenase 3 in synovialen Fibroblasten nicht nur durch die Kultivierung dieser Zellen in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix stimulierbar, sondern auch über den Kontakt mit normalem Knorpelgewebe. Da nach einer Inkubationszeit von 60 Tagen Kollagenase 3 mRNA, nicht jedoch Kollagenase 1 mRNA, in den synovialen Fibroblasten der Zell-Knorpel-Implantate nachweisbar war, ist zu vermuten, dass in dem hier untersuchten in vivo Modell der Knorpeldestruktion die Destruktion des Knorpelgewebes massgeblich durch Kollagenase 3 verursacht wird. Darüber hinaus beschreibt die Induktion der Expression von Kollagenase 3 mRNA in synovialen Fibroblasten nach Koimplantation mit Knorpelgewebe in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse einen pathogenetischen Mechanismus der Knorpeldestruktion, der unabhängig vom unmittelbaren Einfluss zellulärer bzw. humoraler Komponenten des Immunsystems zur Gelenkdestruktion bei RA beitragen kann.

### **Veröffentlichung III.**

Wernicke D., Schulze Westhoff C., Petrow P., Bräuer R., Zacher J., Gay S., Gromnica-Ihle E., Stimulation of collagenase-3 expression in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis by contact with a three-dimensional collagen matrix or with normal cartilage when coimplanted in NOD/SCID mice. *Arthritis & Rheum.* 46 (1): 64-74, 2002.

#### 4.4. Vergleichende Untersuchungen der mRNA Expression von Kollagenase 3, MT1-MMP und Gelatinase A in der Synovialis bei Rheumatoider Arthritis

MMP werden als Zymogene sezerniert und extrazellulär durch andere Proteasen, insbesondere aus den Familien der Serinproteasen und der MMP, aktiviert. Von besonderem Interesse für die Herausbildung eines invasiven Phänotyps bei transformierten und malignen Zellen ist eine Zellmembran-assoziierte Aktivierung von MMP durch membrangebundene MMP (MT-MMP).

In vitro konnte gezeigt werden, daß Prokollagenase 3 durch zwei andere MMP, Membran-Typ 1 MMP (MT1-MMP, MMP-14) und Gelatinase A (MMP-2), an der Zelloberfläche aktiviert werden kann. Um die potenzielle Relevanz dieser Aktivierungsmechanismen von Prokollagenase 3 für die progrediente Knorpel- und Knochendestruktion bei RA zu analysieren, wurde die Verteilung der mRNA Expression von Kollagenase 3, MT1-MMP und Gelatinase A in Synovialispräparaten von 36 Patienten mit RA und in 7 Synovialispräparaten von Patienten ohne chronisch-entzündliche, destruierende Gelenkerkrankungen untersucht. In 19 von 21 RA Patienten (90%) mit Kollagenase 3 mRNA Expression war eine Koexpression von MT1-MMP und Gelatinase A mRNA in der Synovialis nachweisbar. Dagegen wiesen nur 2 von 7 Patienten ohne chronisch-entzündliche, destruierende Gelenkerkrankung eine Koexpression von MT1-MMP und Gelatinase A mRNA auf. Darüber hinaus wurde Kollagenase 3 mRNA nicht nur zeitgleich mit MT1-MMP und Gelatinase A in der Synovialis exprimiert, sondern auch in gleicher Lokalisation. So war eine mRNA Expression von allen drei MMP insbesondere an den Stellen der Knorpelerosionen nachweisbar.

Zur Analyse der Zelltyp-spezifischen Expression von MT1-MMP und Gelatinase A wurde die in situ Hybridisierung dieser beiden MMP mit dem immunhistochemischen Nachweis von Zelltyp-spezifischen Antigenen kombiniert. Unter Verwendung dieser Methode konnte eine deutliche Expression von MT1-MMP und Gelatinase A mRNA in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wird MT1-MMP und Gelatinase A mRNA durch SF an den Erosionsstellen von Zell-Knorpel-Implantaten in immundefizienten NOD/SCID Mäusen exprimiert. Eine Expression von MT1-MMP mRNA war darüber hinaus in Endothelzellen und in vereinzelt CD 68 – positiven Makrophagen nachweisbar, nicht jedoch in CD 45 – positiven Leukocyten. Gelatinase A mRNA wird ausserdem in wenigen CD 45 – positiven Leukocyten und CD 68 – positiven Makrophagen exprimiert, nicht jedoch in Endothelzellen.

Somit wird Kollagenase 3 mRNA zeitgleich mit MT1-MMP und Gelatinase A mRNA in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis und an der Synovialis-Knorpel-Grenze bei RA exprimiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Fibroblasten-ähnlichen Zellen durch die gleichzeitige Expression mehrerer MMP über ein hohes proteolytisches Potenzial gegenüber unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix verfügen. Zum anderen kann eine Zellmembran-assoziierte Aktivierung von Kollagenase 3 durch MT1-MMP und Gelatinase A zur Herausbildung eines invasiven Phänotyps von Fibroblasten-ähnlichen Zellen gegenüber dem angrenzenden Knorpelgewebe beitragen.

**Veröffentlichung IV.**

Petrow P.\*, Wernicke D.\*, Schulze Westhoff C., Hummel K.M., Bräuer R., Kriegsmann J., Gromnica-Ihle E., Gay R., Gay S., Characterization of the cell type-specificity of collagenase 3 mRNA expression in comparison with membrane-type 1 matrix metalloprotease and gelatinase A in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 61(5): 391-397, 2002. (\*beide Autoren haben gleichermassen Anteil an der Arbeit)



#### 4.5. Kollagenase 3 – ein potentieller Marker der Rheumatoiden Arthritis

Die RA ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung mit grosser Heterogenität bezüglich Krankheitsmuster, Ansprechbarkeit auf therapeutische Maßnahmen (internistische und chirurgische) und Prognose der Erkrankung. Die klinische Heterogenität ist mit einer Vielzahl histopathologischer Veränderungen in der Synovialis der betroffenen Gelenke verbunden. Diese klinische und histopathologische Heterogenität der Erkrankung, verbunden mit unzureichenden Kenntnissen über Ätiologie und relevante pathogenetische Mechanismen, führte bisher zu nicht befriedigenden Behandlungsergebnissen von RA Patienten, insbesondere bezüglich des Aufhaltens der progredienten Knorpeldestruktion. Letztere bestimmt massgeblich das klinische Endstadium der Erkrankung, welches durch den Funktionsverlust der Gelenke bis hin zur Invalidität gekennzeichnet ist. Verlässliche prognostische Marker der Erkrankung, insbesondere bezüglich der Knorpel- und Knochendestruktion, stehen derzeit nicht zur Verfügung, sind aber entscheidend für eine frühzeitig einsetzende adäquate medikamentöse Therapie und die Rechtfertigung einer solchen in Anbetracht der zu erwartenden Nebenwirkungen.

Es wurden 36 Patienten mit gesicherter Diagnose einer RA in Übereinstimmung mit den Diagnosekriterien des American College of Rheumatology untersucht. Bei den in die Untersuchungen einbezogenen Patienten war ein rheumachirurgischer Eingriff zur Entfernung der entzündlichen und hyperplastischen Synovialis (Synovektomie) in jeweils einem der Handgelenke erforderlich, um ein Fortschreiten der Gelenkdestruktion aufzuhalten und um die Beweglichkeit des Gelenkes zu verbessern. Das chirurgisch entfernte Material wurde sowohl histopathologisch begutachtet als auch zur Präparation von mRNA verwendet. Die Patienten wurden in der Rheumaklinik Berlin-Buch internistisch betreut und in der Orthopädischen Klinik des Helios Klinikums Berlin-Buch operiert.

Die mRNA Expression von Kollagenase 3 wurde in den Synovialispräparaten von allen 36 Patienten mittels Northern Blot Analyse untersucht. Dabei wiesen nur 21 der Patienten (58%) eine mRNA Expression von Kollagenase 3 auf - im Unterschied zu zwei anderen MMP (Kollagenase 1, Stromelysin 1) welche in den Synovialispräparaten von allen Patienten nachweisbar waren.

Paraklinisch hatten Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis signifikant erhöhte systemische Entzündungsmarker BSG ( $p < 0.05$ ) und CRP ( $p < 0.005$ ), wohingegen keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen bezüglich des

Differenzialblutbildes und des RF bestanden. Entsprechend der höheren systemischen Entzündungsaktivität bei Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis wurden diese häufiger mit Prednisolon behandelt. Ausserdem erhielten zum Zeitpunkt der Synovektomie 15 Patienten (71%) mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis mindestens 5 mg/ml Prednisolon im Vergleich zu 7 Patienten (47%) ohne Kollagenase 3 mRNA Expression. Die Therapie mit disease modifying drugs (DMARD) wurde bei den Patienten als Monotherapie durchgeführt. DMARD wurden in folgender Reihenfolge - entsprechend ihrer Wirksamkeit - verordnet bzw. gewechselt: Chloroquin, Sulfasalazin, Methotrexat, Gold-Natriumthiomalat und Azathioprin. Es zeigte sich, dass Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis häufiger mit DMARD behandelt wurden. Darüber hinaus mussten diese öfter wegen Ineffektivität gewechselt werden. Somit wurden Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis aggressiver medikamentös behandelt und zeigten eine schlechtere Ansprechbarkeit auf medikamentöse Therapien.

Der Grad der Knorpel- und Knochendestruktion wurde radiologisch mittels Larsen-Index bestimmt, indem Röntgenaufnahmen der Hände, Handgelenke und Vorfüße ausgewertet wurden. Dabei liess sich kein signifikanter Unterschied im Grad der Knorpel- und Knochendestruktion zwischen beiden Patientengruppen nachweisen. Es war jedoch auffällig, dass in der Patientengruppe mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis 5 Patienten (24%) einen Krankheitsverlauf von weniger als 2 Jahren hatten, wogegen in der Patientengruppe ohne Kollagenase 3 mRNA Expression nur ein Patient (7%) weniger als 2 Jahre an RA erkrankt war. Ausserdem hatten in der Patientengruppe mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis 6 Patienten (29%) vorangegangene rheumachirurgische Eingriffe im Gegensatz zu nur 2 Patienten (14%) in der Patientengruppe ohne Kollagenase 3 mRNA Expression. Somit wurden Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis zu einem früheren Zeitpunkt rheumachirurgischen Eingriffen zugeführt, was mit einem schwereren Krankheitsverlauf und/oder mit einer geringeren Ansprechbarkeit auf medikamentöse Therapien erklärbar ist.

Die histopathologische Begutachtung der Synovialispräparate erfolgte nach der histologischen Klassifikation der Synovialitis bei RA nach Stiehl (1997). Es zeigte sich, dass alle Synovialispräparate von Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression ausgeprägte Infiltrationen durch Makrophagen und Lymphozyten aufwiesen. Darüber hinaus zeigten alle diese Synovialispräparate von Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression weitere histopathologische Merkmale, die für einen histologischen Typ II der Synovialitis kennzeichnend sind. Für diesen histologischen Synovialitis-Typ ist ein invasives und destruierendes Wachstum der chronisch-entzündlichen Synovialis in angrenzende Knochen-

und Knorpelstrukturen charakteristisch. Weiterführend konnte in den vorliegenden Arbeiten gezeichnet werden, dass der histopathologische Typ II der Synovialitis nicht nur mit der Expression von Kollagenase 3 mRNA korreliert, sondern auch mit dem Gehalt am Kollagenspaltprodukt Pyridinolin in der Synovialis.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass Kollagenase 3 im Gegensatz zu anderen MMP sowohl als klinischer wie auch histopathologischer Marker der RA geeignet sein könnte. Kollagenase 3 ist dabei vor allem aus zwei Gründen von Interesse: Zum einen könnte Kollagenase 3 in Anbetracht ihrer spezifischen Regulation empfindlicher als andere Parameter den schubartigen Krankheitsverlauf der RA widerspiegeln. Zum anderen könnte Kollagenase 3, entsprechend ihrer Substratspezifität und breiten katalytischen Aktivität, besser als andere Proteasen mit dem Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion korrelieren.

### Veröffentlichungen V. – VII.

Wernicke D., Seyfert Ch., Gromnica-Ihle E., Stiehl P., The expression of collagenase 3 (MMP-13) mRNA in the synovial tissue is associated with histopathologic type II Synovialitis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 39 (4): 307-313, 2006.

Wernicke D., Voigt A., Müller A., Schmidt W.A., Stiehl P., Hein G., Assoziation zwischen dem histopathologischen Synovialitis-Typ II und einem erhöhten Pyridinolingehalt im Synovialgewebe bei Rheumatoider Arthritis. *Z. Rheumatol.* in press:  
(<http://dx.doi.org/10.1007/s00393-008-0292-7>)

Wernicke D., Gromnica-Ihle E., Freudiger D., Schulze Westhoff C., Collagenase 3 as a prognostic marker for rheumatoid arthritis. United States Patent No. US 6,756,197 B1, Jun. 29, 2004.

## 5. Diskussion

### 5.1. Kollagenase 3 – biochemische Eigenschaften und Besonderheiten im Expressionsprofil

Das klinische Bild der RA, die Ansprechbarkeit der Patienten auf medikamentöse Therapien, der Verlauf der Erkrankung sowie die Histopathologie der Synovialitis sind gekennzeichnet durch eine hohe Heterogenität (Firestein, 1994; Pincus, 1995; Pincus et al., 1997; Ruschpler & Stiehl, 2002). Diese Heterogenität der RA sowie die lückenhaften Kenntnisse über die Ätiologie und die relevanten pathogenetischen Mechanismen der Gelenkdestruktion erschweren nachhaltig eine adäquate Behandlung der Erkrankung.

Die progrediente Gelenkdestruktion wird massgeblich durch MMP verursacht, einer Familie von Zink-abhängigen Proteasen, die mit hoher Effizienz die meisten Komponenten der extrazellulären Matrix spalten (Visse & Nagase, 2003; Overall, 2002). Bei der RA sind folgende MMP in die Destruktion artikulärer Strukturen involviert: (a) Kollagenasen: Kollagenase 1 (MMP-1) (Gravallese et al., 1991; MacNaul et al., 1990; Wolfe et al., 1993), Kollagenase 2 (MMP-8) (Hanemaaijer et al., 1997) und Kollagenase 3 (MMP-13) (Wernicke et al., 1996; Tetlow & Woolley, 1998), (b) Gelatinasen: Gelatinase A (MMP-2) (Hembry et al., 1995) und Gelatinase B (MMP-9) (Tetlow et al., 1993), (c) Stromelysine: Stromelysin 1 (MMP-3) (Gravallese et al., 1991; Walakovits et al., 1992) und Matrilysin (MMP-7) (Hembry et al., 1995) und (d) MT1-MMP (MMP-14) (Ohuchi et al., 1997).

Kollagenase 3 ist für den Prozess der Knorpel- und Kochendestruktion von besonderem Interesse: (1) Zum einen spaltet Kollagenase 3 dreifach-helikale Kollagene mit hoher Effizienz, wobei im Vergleich zu den beiden anderen bekannten Kollagenasen eine deutlich höhere katalytische Aktivität gegenüber dem Kollagen-Typ II, dem Hauptkollagenbestandteil des hyalinen Knorpels, besteht (Knäuper et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Billingham et al., 1997). Kollagenase 1 spaltet den Kollagen-Typ III 10-fach effizienter als den Kollagen-Typ I, wohingegen Kollagenase 2 den Kollagen-Typ I 7-fach effizienter katalysiert als den Kollagen-Typ III. Kollagen-Typ II wird von Kollagenase 2 nur mit einer Effizienz von 40% ihrer Kollagen-Typ I – Aktivität katalysiert und von Kollagenase 1 lediglich mit 0.2% der Kollagen-Typ III – Aktivität (Hasty et al., 1987). Die Aminosäuresequenz von Kollagenase 3 weist die höchste Sequenzhomologie mit 86% zur Ratten- und Mauscollagenase auf, gefolgt von Kollagenase 2 mit nur 50.2%. Von der Ratten- und Mauscollagenase ist bekannt, dass diese Proteasen alle drei helikalen Kollagen-Typen I, II und III mit vergleichbarer Effizienz spalten (Welgus et al., 1983). Kollagenase 3 hat somit nicht nur in ihrer Primärstruktur eine hohe Homologie zur Ratten- und Mauscollagenase, sondern auch ähnliche katalytische Eigenschaften. Neben einer effektiven Spaltung von Kollagen-Typ II ist Kollagenase 3 zur effizienten Spaltung weiterer Kollagen-Typen des hyalinen Knorpels, der Kollagen-Typen IX

und X, befähigt (Knäuper et al., 1997; Danfelter et al., 2007). Ausserdem spaltet Kollagenase 3 Aggrecan (Fosang et al., 1996), Kollagen-Typ IV, den Hauptkollagenbestandteil der Basalmembran, und denaturierte Kollagene (Gelatine) (Knäuper et al., 1996; Knäuper et al., 1997). Damit ist Kollagenase 3 eine hochpotente extrazelluläre Protease mit einer breiten Substratspezifität.

(2) Als weitere Besonderheit im Vergleich zu anderen MMP wurde eine Expression von Kollagenase 3 in adulten menschlichen Geweben bisher nur unter pathologischen Bedingungen nachgewiesen: in malignen Tumoren (Pendas et al., 2000), wie Mammakarzinomen (Freije et al., 1994, Heppner et al., 1996, Uria et al., 1997), Squamosazellkarzinomen (Johansson et al., 1997a, Airola et al., 1997, Cazorla et al., 1998), Chondrosarkomen (Uria et al., 1998) und malignen Melanomen (Airola et al., 1999), in chronischen Wunden, wie bei Ulcus cruris (Vaalamo et al., 1997, 1998), bei Arteriosklerose (Sukhova et al., 1999; Yoon et al., 2002) und in Aortenaneurysmen (Mao et al., 1999). In artikulären Geweben wurde Kollagenase 3 im Knorpelgewebe bei Osteoarthritis (Reboul et al., 1996, Mitchell et al., 1996, Shlopov et al., 1997, Moldovan et al., 1997, Kozaci et al., 1997) und in der Synovialis bei RA (Wernicke et al., 1996, Stahle-Bäckdahl et al., 1997, Lindy et al., 1997, Tetlow & Woolley, 1998, Konttinen et al., 1999a, 1999b) gefunden. Die vollständige cDNA von Kollagenase 3 wurde erstmals aus Mammakarzinomgewebe kloniert (Freije et al. (1994). Die identische cDNA Sequenz von Kollagenase 3 wurde nachfolgend aus der Synovialis von RA Patienten, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben (Wernicke et al., 1996), und aus einer  $IL-1\alpha$  stimulierten Organkultur von humanem Knorpelgewebe (Mitchell et al., 1996) isoliert. Unter physiologischen Bedingungen konnte eine Expression von Kollagenase 3 bislang nur während der Embryogenese des Knochengewebes (Johansson et al., 1997b, Stahle-Bäckdahl et al., 1997) gefunden werden. In keinem der bisher untersuchten normalen adulten Gewebe, einschließlich der normalen Synovialis (Wernicke et al., 1996, Konttinen et al., 1999b) sowie gutartiger Tumoren (Freije et al., 1994), war eine Expression von Kollagenase 3 nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde das mRNA Expressionsmuster von Kollagenase 3 in der Synovialis von RA Patienten im Vergleich zu Kollagenase 1 und Stromelysin 1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine mRNA Expression von Kollagenase 3 nur bei 21 von 36 (58%) Patienten nachweisbar war, wohingegen Kollagenase 1 und Stromelysin 1 mRNA in der Synovialis von allen Patienten gefunden wurde (Wernicke et al., 1996; Schulze Westhoff et al., 1999). Diese Beobachtung wurde durch Tetlow & Woolley (1998) bestätigt, die immunhistochemisch eine Kollagenase 3 Produktion in nur 7 von 28 Synovialpräparaten nachweisen konnten. Dagegen haben sowohl Lindy et al. (1997) als auch Konttinen et al. (1999a) immunhistochemisch eine Kollagenase 3 Produktion in allen untersuchten

Synovialpräparaten gezeigt. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Stahle-Bäckdahl et al. (1997), die in der Synovialis bei RA nur im ektopischen Knorpelgewebe eine Kollagenase 3 mRNA Expression nachweisen konnten. Gründe für diese Unterschiede im Expressionsprofil könnten die eher geringen Fallzahl bzw. die Heterogenität der Erkrankung sein.

Die gleichzeitige Expression von Kollagenase 3, Kollagenase 1 und Stromelysin 1 in der Synovialis bei RA, aber auch im Knorpelgewebe bei OA (Mitchell et al., 1996; Borden et al., 1996), stellt eine Besonderheit dar, da eine gleichzeitige Expression von mehreren MMP in einem Gewebe eher selten beschrieben wurde. Eine solche Beobachtung wurde nur bei einigen malignen Erkrankungen gemacht (Pajouh et al., 1991; Kossakowska et al., 1993). Durch die zeitgleiche Expression mehrerer MMP erhöht sich das extrazelluläre proteolytische Potential erheblich: Zum einen wird durch die hohe Substratspezifität individueller MMP gegenüber einzelnen Komponenten der extrazellulären Matrix eine hohe katalytische Effizienz erreicht. Zum anderen sind MMP in der Lage, sich durch limitierte Proteolyse unter Abspaltung eines Propeptides gegenseitig zu aktivieren, wie für die Aktivierung von Prokollagenase 1 und Prokollagenase 3 durch Stromelysin 1 gezeigt (Knäuper et al., 1997; Suzuki et al., 1990). Im Ergebnis dessen weist die Synovialis bei RA ein ausgesprochen hohes proteolytisches Potential gegenüber angrenzende Knorpel- und Knochenstrukturen auf.

## 5.2. Regulation der Kollagenase 3 Expression in synovialen Fibroblasten

Wie bereits diskutiert, konnte eine Expression von Kollagenase 3 mRNA in der Synovialis nur bei einem Teil der RA Patienten nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass bei zeitgleicher Expression von Kollagenase 1 und 3 die Expressionshöhe von Kollagenase 1 mRNA niedriger ist als in denjenigen Fällen, in denen Kollagenase 1 nicht mit Kollagenase 3 koexprimiert wird (Wernicke et al., 1996). Das ist ein erster Hinweis darauf, dass in der Synovialis bei RA die Genexpression von Kollagenase 1 und 3 unterschiedlich reguliert wird. Um diese Besonderheiten in der Genregulation von Kollagenase 3 näher zu analysieren, wurde mit der Identifizierung derjenigen Zelltypen begonnen, die Kollagenase 3 in der Synovialis exprimieren. Da Kollagenase 3 extrazellulär sezerniert wird, wurde der Nachweis von Kollagenase 3 mRNA mittels in situ Hybridisierung mit dem immunhistochemischen Nachweis von Zelltyp-spezifischen Antigenen kombiniert (Kriegsmann et al., 1994). So konnte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers (mAB) D7-Fib gezeigt werden, dass Kollagenase 3 mRNA in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis exprimiert wird (Petrow et al., 2002). Die Untersuchungsergebnisse zeigen

weiter, dass Kollagenase 3 mRNA nur in einigen wenigen CD68-positiven Makrophagen nachweisbar ist, nicht jedoch in CD45-positiven Leukozyten und in Endothelzellen (Schulze Westhoff et al., 1999; Petrow et al., 2002). Somit wird Kollagenase 3 fast ausschliesslich in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis exprimiert. Dabei ist die Expression eher diffus über die gesamte Synovialis verteilt und nicht vorrangig im Bereich der Deckzellen lokalisiert, wie für Kollagenase 1 gezeigt (Petrow et al., 2002). Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von Lindy et al. (1998) und Kontinen et al. (1999a) bestätigt. Lindy et al. (1998) haben auf Proteinebene, Kontinen et al. (1999a) auf Protein- und mRNA-Ebene gezeigt, dass Kollagenase 3 sowohl in Fibroblasten-ähnlichen Zellen, als auch in Makrophagen und Endothelzellen exprimiert wird. Letztere Ergebnisse sind kritisch zu bewerten, da der immunhistochemische Nachweis von Kollagenase 3 als extrazellulär sezernierte Protease nur bedingte Rückschlüsse auf die Zelltyp-spezifische Sekretion erlaubt.

Ausgehend von einer Expression von Kollagenase 3 vor allem in Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis wurde die Genregulation von Kollagenase 3 im Vergleich zu Kollagenase 1 in primären SF Kulturen untersucht. Dazu wurden SF Kulturen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA etabliert (Schulze Westhoff et al., 1999). Eine basale Expression von Kollagenase 3 mRNA konnte dabei in 4 von 10 SF Kulturen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wiesen alle SF Kulturen eine basale Expression von Kollagenase 1 mRNA auf. Im Unterschied zu Kollagenase 1 (DiBattista et al., 1994; Case et al., 1990) konnte die mRNA Expression von Kollagenase 3 über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration via Aktivierung des Proteinkinase A Signaltransduktionsweges stimuliert werden. Phorbolster, starke Stimulatoren der Genexpression von Kollagenase 1 über eine Aktivierung des Proteinkinase C Signaltransduktionsweges, haben keinen Einfluss auf die mRNA Expression von Kollagenase 3 in SF (Schulze Westhoff et al., 1999) und in Chondrozyten (Borden et al., 1996), induzieren die Kollagenase 3 Expression aber in transformierten Zelllinien, wie der synovialen Sarkomzelllinie SW 982 (Schulze Westhoff et al., 1999), der Chondrosarkomzelllinie SW 1353 (Cowell et al., 1998) und in immortalisierten embryonalen Fibroblasten KMS-6 (Uria et al., 1997). Somit bestehen prinzipielle Unterschiede in der Regulation der Genexpression von Kollagenase 3 und 1 in SF, wie in Kenntnis einer unterschiedlichen Promoterstruktur beider Gene zu erwarten ist (Pendas et al., 1997; Tardif et al., 1997). Weiterführende Untersuchungen sind erforderlich, um die Signaltransduktionswege von Kollagenase 3 in SF zu analysieren. Aus bisherigen Untersuchungen an Chondrozyten ist bekannt, dass unterschiedliche MAP Kinasen die Expression von



Kollagenase 3 regulieren (Shlopov et al., 1997 und 1999; Mengshol et al. 2000; Liacini et al., 2003; Ohno et al., 2006; Im et al., 2007; Muddasani et al., 2007).

### 5.3. Regulation der Kollagenase 3 Expression in synovialen Fibroblasten durch Zell-Matrix-Wechselwirkungen

Die unterschiedliche Regulation der Genexpression von Kollagenase 1 und 3 in SF Kulturen lässt auf eine unterschiedliche Beteiligung beider Kollagenasen im Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA schliessen. Um diese Fragestellung weiterführend zu untersuchen, wurde der Einfluss einer dreidimensionalen Kollagenmatrix auf die Expression von Kollagenase 3 analysiert. Von primären Hautfibroblastenkulturen ist bekannt, dass eine Stimulation der Expression von Kollagenase 3 durch den Kontakt mit einer dreidimensionalen Kollagenmatrix erfolgen kann, nicht jedoch durch zweidimensionales Wachstum auf einer Kollagen-beschichteten Oberfläche (Vaalamo et al., 1997). Entsprechend wurden die SF Kulturen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kultiviert. Die Kultivierung von SF in einer solchen Kollagenmatrix führte zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von Kollagenase 3 mRNA, die den stimulierenden Effekt der proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  um eine Grössenordnung übertraf. Im Gegensatz dazu kommt es zu keiner Veränderung der Kollagenase 3 mRNA Expression, wenn SF auf einer Kollagen-beschichteten Oberfläche kultiviert werden. Im Unterschied zu Kollagenase 3 wird die Expression von Kollagenase 1 mRNA durch die Kultivierung von SF in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix bzw. durch TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  in vergleichbarer Weise stimuliert (Wernicke et al., 2002). Die Veränderungen in der Expression von Kollagenase 1 und 3 mRNA in SF korrelieren mit der Höhe von Kollagenase 1 - und Kollagenase 3 - Antigen im Kulturüberstand, wobei beide Kollagenasen als nicht-aktive Proenzyme im Zellkulturmedium nachweisbar waren. Dieses Ergebnis entspricht der Beobachtung, dass MMP vordergründig auf Transkriptionsebene reguliert sind (Visse & Nagase, 2003). Die durchgeführten zellbiologischen Experimente zeigen somit, dass in SF Kollagenase 1 und 3 unterschiedlich reguliert werden, wobei Kollagenase 3 insbesondere über Zell-Matrix-Interaktionen stimuliert wird.

Es war Gegenstand weiterer Untersuchungen, die relevanten Signaltransduktionswege für Zell-Matrix-Wechselwirkungen näher zu analysieren. Bezüglich einer Integrin-vermittelten Regulation von Kollagenasen konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_1\beta_2$  Integrine essentiell für die Kollagen-abhängige Stimulation der mRNA Expression von Kollagenase 3 in Hautfibroblasten sind (Ravanti et al., 1999). Das lässt vermuten, dass Kollagen-Rezeptoren vom Integrin-Typ, wie  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  und  $\alpha_{11}\beta_1$ , in die Kollagen-abhängige Stimulation der

mRNA Expression von Kollagenase 3 in SF involviert sind (Langholz et al., 1995; Riikonen et al., 1995; Lehnert et al., 1999; Camper et al., 1998). In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der Integrin-Bindungsmotive RGD und LDV für die Regulation der Expression von Kollagenase 3 in SF untersucht (Wernicke et al., 2002). Es ist bekannt, dass diese Sequenzmotive in unterschiedlichen Molekülen der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Vitronectin und Kollagenspaltprodukten, die Bindung an Integrine vermitteln (Ivaska & Heino, 2000; Zeller et al., 1998; Tselepis et al., 1997). SF von Patienten mit RA binden an Fibronectin über die Integrine  $\alpha_v$  und  $\alpha_5\beta_1$ , was mit einer gleichzeitigen Erniedrigung der Expression von Kollagenase 1 verbunden ist (Sarkissian & Lafyatis, 1999). In SF kooperieren die Signalmotive RGD und LDV im Fibronectin bei der Regulation von Kollagenase 1, Stromelysin 1 und Gelatinase B über die entsprechenden Integrine  $\alpha_5\beta_1$  bzw.  $\alpha_4\beta_1$  (Huhtala et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peptide RGD bzw. LDV keinen Einfluß auf die Stimulation der Expression von Kollagenase 3 durch eine dreidimensionale Kollagen-Matrix haben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Integrine, welche das RGD- bzw. LDV-Motiv erkennen, nicht an der Kollagen-abhängigen Regulation der Expression von Kollagenase 3 in SF bei RA beteiligt sind.

Die obigen Beobachtungen unterstützen das Konzept einer stufenweisen Integrin-vermittelten Spaltung des Kollagens – ein Konzept, welches auch für den Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA relevant sein könnte (Ivaska & Heino, 2000). In einem ersten Schritt wird über die Bindung von nativen Kollagenen an Kollagenrezeptoren vom Integrin-Typ die Produktion von Kollagenasen in der Zelle induziert, die zu einer Spaltung der dreifach-helikalen Kollagene führt. In einem zweiten Schritt induzieren die so entstandenen Kollagenspaltprodukte über die Präsentation des RGD-Motivs die Stimulation der Expression u.a. von Gelatinasen und vermitteln damit die endgültige Spaltung der Kollagene. Es muss Gegenstand weiterführender Arbeiten sein, die Bedeutung dieser Mechanismen der Kollagenspaltung für die Pathogenese der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA zu prüfen.

In Kenntnis der grossen Relevanz von Zell-Matrix-Wechselwirkungen für die Regulation der Expression von Kollagenase 3 in SF wurde der Einfluss der extrazellulären Matrix des nativen Knorpels auf die Expression von Kollagenase 3 in SF untersucht und mit der Expression von Kollagenase 1 verglichen. Untersuchungen mittels in situ Hybridisierung von Kollagenase 3 mRNA an der Synovialis-Knorpel-Grenzschicht von RA Patienten haben gezeigt, dass Kollagenase 3 mRNA unmittelbar an den Stellen der Knorpelerosionen exprimiert wird, weniger jedoch in den nicht unmittelbar an den Knorpel angrenzenden Synovialisabschnitten (Schulze Westhoff et al., 1999; Petrow et al., 2002). Diese Beobachtung wurde durch Kontinen et al. (1999a) mittels immunhistochemischer

Untersuchungen bestätigt. Somit scheint natives Knorpelgewebe Einfluss auf die Expression von Kollagenase 3 in SF zu haben.

Experimentell lassen sich die Prozesse an der Synovialis-Knorpel-Grenzschicht in einem in vivo Modell der Knorpeldestruktion untersuchen, indem Synovialisgewebe bzw. SF in direktem Kontakt mit nativem humanem Knorpelgewebe subkutan bzw. unter die Nierenkapsel in immundefiziente NOD/SCID Mäuse koimplantiert werden (Geiler et al., 1994; Müller-Ladner et al., 1996). Entsprechend führte die subkutane Koimplantation von SF mit normalem Knorpel in NOD/SCID Mäuse zu einem invasiven Wachstum der SF in das angrenzende Knorpelgewebe, verbunden mit einer deutlichen Stimulation der mRNA Expression von Kollagenase 3 in SF unmittelbar an den Erosionsstellen der Zell-Knorpel-Implantate (Wernicke et al., 2002). Da NOD/SCID Mäuse über keine immunkompetenten Zellen und damit über keine proentzündlichen Zytokine verfügen, kann dieser stimulierende Effekt auf die Kollagenase 3 Expression nicht auf Zytokin-vermittelte Signaltransduktionswege zurückgeführt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ist die Expression von Kollagenase 3 in SF sowohl in der Monolayerkultur als auch bei Kultivierung in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix nur schwach durch die proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulierbar (Schulze Westhoff et al., 1999; Wernicke et al., 2002).

Weiterführend wurde der Einfluss des normalen Knorpelgewebes auf die Expression von Kollagenase 1 und 3 miteinander verglichen. Interessanterweise konnte 60 Tage nach Implantation der Zell-Knorpel-Implantate in den NOD/SCID Mäusen keine mRNA Expression von Kollagenase 1 in den SF nachgewiesen werden, obwohl alle verwendeten SF Kulturen eine deutliche basale Expression dieser MMP aufwiesen. Somit zeigen SF bei RA nicht nur eine unterschiedliche Regulation von Kollagenase 3 und 1 mRNA in der Zellkultur, sondern auch, wenn SF in engem Kontakt mit nativem Knorpel kultiviert werden. Da NOD/SCID Mäuse über keine immunkompetenten Zellen und damit über keine proentzündlichen Zytokine verfügen, scheint die Stimulation der Expression von Kollagenase 1 im Unterschied zu Kollagenase 3 an eine permanente Aktivierung der SF durch proentzündliche Zellmediatoren und/oder die Wechselwirkung mit immunkompetenten Zellen gebunden zu sein. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  einen starken stimulierenden Effekt auf die Kollagenase 1 Expression haben, insbesondere auch in chronisch-entzündlichen artikulären Geweben (Schulze Westhoff et al., 1999; Wernicke et al., 1996; Konttinen et al., 1999a; McCachren, 1991).

Im Unterschied zu Kollagenase 1, konnte 60 Tage nach Implantation der Zell-Knorpel-Implantate in NOD/SCID Mäuse eine deutliche Expression von Kollagenase 3 mRNA in den das Knorpelgewebe infiltrierenden SF nachgewiesen werden. Vermutlich hat Kollagenase 3 einen erheblichen Anteil am Prozess der Knorpeldestruktion in diesen Zell-Knorpel-

Implantaten. Interessanterweise weist Kollagenase 3 eine Besonderheit in der Regulation der Transkription auf: In der 3' nicht-translatierten Region des Kollagenase 3 - Gens sind mehrere Stop-Codons vorhanden, infolgedessen mehrere Kollagenase 3 Transkripte synthetisiert werden (Freije et al., 1994; Wernicke et al., 1996; Reboul et al., 1996). Neben zwei hauptsächlich Transkripten von 2,5 und 3,0 kb Länge ist ein drittes Transkript von 2,0/2,2 kb Länge nachweisbar. Transkripte weiterer Längen werden infolge alternativen splicings und durch Deletionen gebildet (Tardif et al., 2003). Interessanterweise unterscheiden sich die durch alternatives splicing bzw. Deletionen entstandenen Transkripte ausschliesslich in ihrer Hemopexin-ähnlichen Domäne. Diese Domäne ist für die Spaltung der dreifach-helikalen Kollagene notwendig und hat vermutlich keine Bedeutung für die Spaltung anderer Komponenten der extrazellulären Matrix. (Knäuper et al., 1997). Möglicherweise führt die Synthese unterschiedlicher Kollagenase 3 – Transkripte zu alternativen Proteinen mit unterschiedlicher Substratspezifität. Darüber hinaus ist eine lange 3' nicht-translatierte Region mit mehreren Stop-Codons eine Besonderheit in der Regulation von Genen, wie sie in transformierten und malignen Zellen gefunden wird. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die Expression von Kollagenase 3 in adulten menschlichen Geweben bisher nur unter pathologischen Bedingungen nachweisbar war - bei malignen Prozessen und chronisch-entzündlichen Veränderungen (Cazorla et al., 1998; Uria et al., 1998; Airola et al., 1999; Vaalamo et al., 1998; Sukhova et al., 1999; Mao et al., 1999; Elnemr et al., 2003; Hattori et al., 2003; Hernandez et al., 2007). Berücksichtigt man die breite Substratspezifität von Kollagenase 3, so ist zu vermuten, dass Kollagenase 3 eher von Zellen exprimiert wird, welche einen gewissen Grad an unkontrollierter Proliferation bzw. Transformiertheit aufweisen, wie es auch bei den invasiv wachsenden Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis bei RA der Fall zu sein scheint. Weiterführende Untersuchungen werden diesbezüglich Aufschluss geben.

#### 5.4. Zeitgleiche Expression von Kollagenase 3, MT-1 MMP und Gelatinase A an der Synovialis-Knorpel-Grenze

MMP werden als Zymogene sezerniert und extrazellulär durch andere Proteasen (Serinproteasen, MMP) aktiviert. Von besonderem Interesse für die Herausbildung eines invasiven Phänotyps bei transformierten und malignen Zellen ist eine Zellmembran-assoziierte Aktivierung von MMP durch membrangebundene MMP. In vitro konnte gezeigt werden, dass Prokollagenase 3 direkt durch MT1-MMP oder indirekt über Gelatinase A an der Zelloberfläche aktiviert werden kann (Stronglin et al., 1995, Will et al., 1996). Um die potenzielle Relevanz dieser Aktivierungsmechanismen von Prokollagenase 3 für die

progrediente Knorpel- und Knochendestruktion bei RA zu analysieren, wurde die Verteilung der mRNA Expression von Kollagenase 3, MT1-MMP und Gelatinase A in Synovialispräparaten von 36 Patienten mit RA und in 7 Synovialispräparaten von Patienten ohne chronisch-entzündliche und destruierende Gelenkerkrankungen untersucht. In 19 von 21 Synovialispräparaten (90%) von RA Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression war gleichzeitig eine Koexpression von MT1-MMP und Gelatinase A mRNA nachweisbar. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die mRNA von Kollagenase 3 nicht nur zeitgleich mit MT1-MMP und Gelatinase A mRNA in der Synovialis exprimiert wird. Mittels in situ Hybridisierung wurde nachgewiesen, dass eine Expression von allen drei MMP insbesondere an den Stellen der Knorpelerosionen erfolgt, wobei nicht nur Kollagenase 3, sondern auch MT1-MMP und Gelatinase A überwiegend durch Fibroblasten-ähnliche Zellen exprimiert werden (Petrow et al., 2002). Diese Untersuchungsergebnisse an humanen Präparaten der Synovialis-Knorpel-Grenze konnten an Zell-Knorpel-Implantaten in NOD/SCID Mäusen bestätigt werden (Wernicke et al., 2002). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bei RA Fibroblasten-ähnliche Zellen durch die gleichzeitige Expression mehrerer MMP über ein hohes proteolytisches Potenzial gegenüber unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix verfügen. Zum anderen kann eine Zellmembran-assoziierte Aktivierung von Kollagenase 3 durch MT1-MMP und Gelatinase A zur Herausbildung eines invasiven Phänotyps von Fibroblasten-ähnlichen Zellen gegenüber dem angrenzenden Knorpelgewebe beitragen (Knäuper et al., 1997).

#### 5.5. Kollagenase 3 – ein potentieller klinischer und histopathologischer Marker der Rheumatoiden Arthritis

Kollagenase 3 mRNA ist in der hier untersuchten Kohorte von 36 Patienten mit RA nur bei 21 Patienten in der Synovialis nachweisbar war. Hierin unterscheidet sich Kollagenase 3 von anderen MMP wie Kollagenase 1 und Stromelysin 1, die bei allen RA Patienten sowohl in der Synovialis als auch in der Synovialflüssigkeit und im Serum nachgewiesen wurden (Gravallese et al., 1991; Wernicke et al., 1996; Tetlow & Woolley, 1998). Mit dieser Besonderheit stellt Kollagenase 3 einen potentiellen Marker der RA, insbesondere des Prozesses der Knorpel- und Knochendestruktion, dar.

Bisher etablierte Marker der Erkrankung spiegeln das komplexe Geschehen von chronischer Entzündung und progredienter Gelenkdestruktion nur unvollständig wider. Als paraklinische Parameter dienen CRP und BSG vordergründig der Beurteilung der systemischen entzündlichen Aktivität. Der Nachweis von RF der IgM- und IgA-Immunglobulin-Klassen

haben insbesondere bei zeitgleichem Auftreten eine hohe Spezifität bei der Frühmanifestation der RA, wobei der Nachweis von RF-Ablagerungen in der Synovialis Immunkomplex-vermittelte pathogenetische Prozesse sehr wahrscheinlich macht (Feist et al., 2007). Der Nachweis von Antikörpern gegen zyklische citrullinierte Peptide (CCP) haben zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität und Spezifität insbesondere bei der Frühdiagnostik der RA beigetragen. Eine pathogenetische Bedeutung ist für die Anti-CCP-Antikörper bisher jedoch nicht bewiesen worden. Ausserdem konnte bisher keine Korrelation zwischen Anti-CCP-Antikörper-Titer und Krankheitsaktivität der RA nachgewiesen werden, was diesen Antikörper nicht als Verlaufparameter der RA favorisiert (Feist et al., 2007). Vielversprechend sind dagegen Untersuchungen über citrulliniertes Vimentin (Vossenaar et al., 2004) und mutiertes citrulliniertes Vimentin (MCV) (Bang et al., 2007), die möglicherweise in ihrer Titerhöhe mit der Krankheitsaktivität bei RA korrelieren. Anti-RA33-Antikörper gelten als ein aussagefähiger serologischer Marker mit hoher diagnostischer Spezifität bei seronegativer RA, jedoch ohne nachweislichen Bezug zum Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion (Nell et al., 2005). Offen ist, ob die Serumkonzentration von E-selectin mit der Schwere der RA korreliert und Bedeutung für die Knorpel- und Knochendestruktion besitzt (Egerer et al., 2003). Dagegen scheint der frühzeitige Nachweis vom IgA-RF (Lindqvist et al., 2005) und von citrulliniertem Fibrin und Fillagrin eine prädiktive Bedeutung für die radiologische Progression bei RA zu haben (Feist et al., 2007).

Auf der Suche nach Markern für die Knorpel- und Knochendestruktion kommen, wie soeben diskutiert, nicht nur Proteine in Frage, die mit der Aktivierung des Immunsystems in Zusammenhang stehen. Es stellen sowohl Spaltprodukte der extrazellulären Matrix als auch Proteasen potentielle Marker des Prozesses der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA dar. Klinische Marker für frühzeitige destruierende Knorpel- und Knochenveränderungen sollten bereits nachweisbar sein, wenn röntgenologisch oder mittels anderer bildgebender Verfahren noch keine Knorpel- und Knochenveränderungen sichtbar sind. Es ist deshalb zu hinterfragen, ob Marker des Knochenmetabolismus, wie osteocalcin, bone sialoprotein oder Telopeptide des Kollagens als frühzeitige Marker destruierender Prozesse bei RA geeignet sein können (Garnero et al., 1999; Wollheim, 1999 & 2000). Anders verhält es sich möglicherweise mit Markern des Knorpelmetabolismus, wie Aggrecan-Spaltprodukte (Frisbie et al., 1999; Fosang et al., 2003), Chondrocalcin (Nelson et al., 1998), Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) (Mansson et al., 1997; Lindqvist et al., 1997; Joosten et al., 1999; Skoumal et al., 2003; Christgau & Cloos, 2004), bzw. Pyridinolin (Kaufmann et al., 2003). Von den genannten Spalt- bzw. Syntheseprodukten der extrazellulären Matrix stellen COMP einen vielversprechenden Marker dar, der sich sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im Serum nachweisen lassen (den Broeder et al., 2002).

Untersuchungen über Proteasen haben gezeigt, dass die Serumspiegel der beiden MMP Kollagenase 1 (MMP-1) und Stromelysin 1 (MMP-3) einen erosiven Verlauf bei RA vorhersagen (Green et al., 2003; Cunnane et al., 2001). Dabei korreliert der Serumspiegel von Stromelysin 1 gut mit der Höhe des CRP-Wertes (Keyszer et al., 1999; So et al., 1999) und kann als Verlaufsparemeter einer TNF- $\alpha$  - Blocker - Therapie dienen (Christgau & Cloos, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein gestörtes Verhältnis von MMP und deren Inhibitoren ursächlich im Zusammenhang mit der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA stehen könnte (Keyszer et al., 1999).

Bei der Etablierung von Markern der Knorpel- und Knochendestruktion erweist es sich als ein generelles Problem, dass der Gehalt der Marker in der Synovialis nicht zwangsläufig mit der Konzentration in der Synovialflüssigkeit, im Serum und im Urin korreliert (Wollheim, 2000; Kaufmann et al., 2003; Prince, 2005; Young-Min et al., 2007). Zum einen ist wenig über die Kinetik der Freisetzung von Spaltprodukten der extrazellulären Matrix aus der Synovialis in die Synovialflüssigkeit bzw. in die Blutzirkulation bekannt. Unbekannt ist auch, wie rasch Spaltprodukten der extrazellulären Matrix aus der Synovialflüssigkeit bzw. aus dem Blut eliminiert werden. Gleichzeitig kommt es unter den Bedingungen einer chronischen Entzündung in der Synovialis zu quantitativen und qualitativen Veränderungen sowohl im Abbau, als auch in der Synthese der extrazellulären Matrix, deren Mechanismen im Detail unvollständig untersucht sind. Entsprechend konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass der Gehalt des Knorpel-spezifischen Kollagenspaltproduktes Pyridinolin in der Synovialis zwar mit einem histopathologischen Typ II der Synovialitis korreliert, eine solche Korrelation jedoch nicht bezüglich der Konzentration des Pyridinolins im Serum, in der Synovialflüssigkeit und im Urin gefunden werden konnte (Wernicke et al., 2008).

Auf der Suche nach Proteasen als Marker der Knorpel- und Knochendestruktion ist zu berücksichtigen, dass die bildgebenden Verfahren des Nachweises von Knochen- bzw. Knorpeldefekten möglicherweise nicht empfindlich genug sind, um den Beitrag einer einzelnen Protease im komplexen Geschehen der Knorpel- und Knochendestruktion zu dokumentieren. Unter dem Aspekt einer möglichst frühzeitigen Diagnosestellung und Prognoseabschätzung der RA stellt sich in diesem Zusammenhang nicht nur die Frage nach geeigneten paraklinischen Markern der RA, sondern auch nach „synovialen“ Markern. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der histopathologische Typ II der Synovialitis mit der Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis korreliert und mit einem erhöhten Pyridinolingehalt einhergeht (Wernicke et al., 2006 & 2008). „Synoviale“ Marker der RA könnten insbesondere klinische Studien aussagefähiger gestalten und die Diagnostik der Früharthritis sicherer gestalten.

Es muss Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, die Rolle von Kollagenase 3 in der Pathogenese der RA zu analysieren und die Bedeutung dieser MMP als Marker für Krankheitsverlauf und Prognose der RA zu evaluieren. Dabei könnte Kollagenase 3 (a) entsprechend ihrer breiten katalytischen Aktivität mit dem Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion korrelieren, (b) den Grad der Aktivierung bzw. Transformation SF widerspiegeln und (c) in Anbetracht ihrer spezifischen Regulation empfindlicher als andere Parameter den schubartigen Verlauf der RA anzeigen.



## 6. Zusammenfassung

Gegenstand meiner Forschungsarbeiten war es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese der RA, insbesondere des Prozesses der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion zu leisten, um neue Ansatzpunkte zur effektiveren Diagnostik und Therapie dieser chronisch-entzündlichen Systemerkrankung zu finden. Vor dem Hintergrund einer grossen klinischen und histopathologischen Heterogenität der RA sind die Behandlungserfolge trotz neuer und hochwirksamer immunsuppressiver Therapieformen bezüglich des Aufhaltens der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion nach wie vor unbefriedigend. Entsprechend besteht das klinische Hauptproblem bei der RA in einem zunehmenden Funktionsverlust der Gelenke bis hin zur Invalidität der Patienten. Da in Mitteleuropa und Nordamerika etwa 0.5 – 0.8 % der erwachsenen Bevölkerung von einer RA betroffen sind, haben diese medizinischen Probleme gleichzeitig eine grosse sozial-ökonomische Relevanz.

Die Knorpel- und Knochendestruktion bei RA wird durch unterschiedliche Proteasen verursacht. Dabei kommt den MMP eine grosse Bedeutung zu, da diese Proteasen unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix mit hoher Effizienz spalten. In der vorliegenden Arbeit wurde Kollagenase 3 (MMP-13) aus der Synovialis von Patienten mit RA kloniert. Kollagenase 3 ist für den Prozess der Knorpeldestruktion von besonderem Interesse, da diese Kollagenase im Vergleich zu den beiden anderen humanen Kollagenasen, Kollagenase 1 (MMP-1, interstitielle Kollagenase) und Kollagenase 2 (MMP-8, neutrophile Kollagenase) eine deutlich höhere katalytische Aktivität gegenüber dem Hauptkollagenbestandteil des hyalinen Knorpels, Kollagen Typ II, aufweist und andere Komponenten der extrazellulären Matrix ebenfalls mit hoher Effizienz spaltet. Ausserdem ist Kollagenase 3 fast ausschliesslich unter pathologischen Bedingungen nachweisbar, insbesondere bei chronisch-entzündlichen und malignen Prozessen des Bindegewebes.

Dementsprechend war es Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis zu charakterisieren und ihre Regulation in SF zu untersuchen. Die Expression von Kollagenase 3 wurde mit der Expression von Kollagenase 1, der zweiten am Prozess der Knorpel- und Knochendestruktion bei RA beteiligten Kollagenase, verglichen. Weiterführend wurde in einer Kohorte von RA Patienten die Expression von Kollagenase 3 mRNA in der Synovialis in Bezug auf klinische, paraklinische und histopathologische Parameter analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Expression von Kollagenase 3 mRNA sowohl im synovialen lining, als auch im sublining zu beobachten ist. Bei der Untersuchung von Präparaten der Synovialis-Knorpel-Grenze ist eine Expression von Kollagenase 3 mRNA unmittelbar im Bereich der Knorpelerosionen nachweisbar. Die Zelltyp-spezifische Expression von Kollagenase 3 wurde analysiert, indem die in situ Hybridisierung von Kollagenase 3 mRNA mit dem immunhistochemischen Nachweis von Zelltyp-spezifischen Antigenen kombiniert wurde. Hierbei zeigte sich, dass Kollagenase 3 mRNA fast ausschliesslich in Fibroblasten-ähnlichen Zellen exprimiert wird. Somit ist Kollagenase 3 an der Fibroblasten-vermittelten Knorpeldestruktion bei RA beteiligt.

In SF Kulturen stimulieren die proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowohl die mRNA Expression von Kollagenase 3 als auch die von Kollagenase 1. Unterschiede bestehen zwischen beiden Kollagenasen bezüglich der involvierten Signaltransduktionswege. Die mRNA Expression von Kollagenase 3 wird über die intrazelluläre cAMP-Konzentration und eine Aktivierung des Proteinkinase A Signaltransduktionsweges erhöht, wohingegen die Expression von Kollagenase 1 mRNA über eine Aktivierung des Proteinkinase C Signaltransduktionsweges stimuliert wird. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass der stimulierende Effekt einer Aktivierung des Proteinkinase A Signaltransduktionsweges auf die Expression von Kollagenase 3 mRNA spezifisch für SF ist.

Um den Einfluss von Zell-Matrix-Wechselwirkungen auf die mRNA und Proteinexpression von Kollagenase 3 in SF zu untersuchen, wurden SF in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix kultiviert. Eine dreidimensionale Matrix-Struktur erwies sich als essentiell für die Stimulation der Kollagenase 3 Expression in SF, da eine Kultivierung dieser Zellen auf Kollagen-beschichteten Oberflächen nicht mit einer Stimulation der mRNA- und Proteinexpression von Kollagenase 3 verbunden war. Eine dreidimensionale Kollagen-Matrix stimulierte die Kollagenase 1 Expression in SF in vergleichbarer Höhe wie die beiden proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Im Gegensatz dazu wurde die Expression von Kollagenase 3 durch eine dreidimensionalen Kollagen-Matrix um eine Grössenordnung stärker stimuliert als durch die proentzündlichen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Somit wird die Expression von Kollagenase 3 in SF insbesondere über Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix stimuliert.

Die Expression von Kollagenase 3 in SF ist nicht nur durch die Kultivierung dieser Zellen in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix stimulierbar, sondern auch durch den Kontakt mit normalem Knorpelgewebe. In einem in vivo Modell der Knorpeldestruktion wurden SF von Patienten mit RA mit normalem humanem Knorpel subkutan in immundefiziente NOD/SCID-

Mäuse koimplantiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Tagen kam es zu einer Infiltration des Knorpelgewebes durch die SF, die mit einer hochgradigen Destruktion des Knorpelgewebes einherging. In den Zell-Knorpel-Implantaten war sowohl an der Knorpeloberfläche als auch an den Erosionsstellen des Knorpels die Expression von Kollagenase 3 mRNA, nicht jedoch die von Kollagenase 1 mRNA, nachweisbar. Somit weist auch dieses in vivo Modell der Knorpeldestruktion eine unterschiedliche Regulation der Expression von Kollagenase 3 und Kollagenase 1 in SF nach. Gleichzeitig beschreibt die Stimulation der Kollagenase 3 Expression über den Kontakt von SF mit normalem Knorpel in immundefizienten NOD/SCID-Mäusen einen pathogenetischen Mechanismus der Knorpeldestruktion, der unabhängig vom Einfluss zellulärer bzw. humoraler Komponenten des Immunsystems stattfindet.

In den Synovialispräparaten der untersuchten Kohorte von RA Patienten wird Kollagenase 3 mRNA in 90 % der Fälle mit Membran-Typ 1 MMP (MMP 14, MT1-MMP) mRNA und Gelatinase A (MMP 2) mRNA koexprimiert. Dabei ist eine zeitgleiche Expression von Kollagenase 3, MT1-MMP und Gelatinase A mRNA sowohl in den Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Synovialis, als auch an der Synovialis-Knorpel-Grenze nachweisbar. In SF, welche in NOD/SCID Mäuse mit normalem Knorpel koimplantiert wurden, werden die mRNA von Kollagenase 3, MT1-MMP und Gelatinase A ebenfalls zeitgleich an den Erosionsstellen des Knorpels exprimiert. Aus in vitro Experimenten ist bekannt, dass Prokollagenase 3 durch MT1-MMP und Gelatinase A Zellmembran-assoziiert aktiviert werden kann. Somit kann bei RA eine Zellmembran-assoziierte Aktivierung von Prokollagenase 3 durch MT1-MMP und Gelatinase A zur Herausbildung eines invasiven Phänotyps von Fibroblasten-ähnlichen Zellen gegenüber dem angrenzenden Knorpelgewebe beitragen. Gleichzeitig verfügen die Fibroblasten-ähnlichen Zellen durch die zeitgleiche Expression mehrerer MMP über ein hohes proteolytisches Potential gegenüber unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix.

Die RA ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung von grosser Heterogenität, wobei die Krankheitsaktivität und der zu erwartende Verlauf der Erkrankung nur unzureichend beurteilbar sind. Als paraklinische Parameter dienen dazu gegenwärtig die systemischen Entzündungsparameter CRP und die BSG, der RF, die Citrullin-Antikörper sowie, in eingeschränktem Maße, die Charakterisierung des HLA DR4 - Musters des Patienten. Diese Parameter spiegeln vor allem die entzündliche Aktivität der Patienten wider bzw. charakterisieren dessen Immunsystem, sind jedoch für die Bewertung der Aggressivität des Prozesses der Knorpel- und Knochendstruktion nur eingeschränkt verwertbar. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Korrelation zwischen einer

Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis und klinischen Parametern in einer Kohorte von 36 RA Patienten untersucht. 21 der 36 untersuchten Patienten (58%) wiesen eine mRNA Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis auf. Im Unterschied dazu waren zwei andere MMP, Kollagenase 1 und Stromelysin 1, in den Synovialispräparaten von allen Patienten nachweisbar. Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis hatten erhöhte systemische Entzündungsparameter CRP ( $p < 0.005$ ) und BSG ( $p < 0.05$ ), wurden häufiger und höher dosiert mit Prednisolon behandelt und erhielten aggressivere Basistherapien, welche öfters wegen Ineffektivität gewechselt werden mussten. Es war auffällig, dass in der Patientengruppe mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialis Patienten frühzeitiger bzw. zum wiederholten Male rheumachirurgischen Eingriffen unterzogen werden mussten. Dies spricht für einen schwereren Krankheitsverlauf und/oder eine geringere Ansprechbarkeit auf medikamentöse Therapien bei diesen Patienten. Histopathologisch korreliert die mRNA Expression von Kollagenase 3 in der Synovialis mit einem histopathologischen Typ II der Synovialitis nach Stiehl (1997), die durch eine invasiv und knorpeldestruierend proliferierende Synovialis gekennzeichnet ist. Weiterführend konnte in den vorliegenden Arbeiten gezeigt werden, dass der histopathologische Typ II der Synovialitis mit dem Gehalt des Kollagenspaltproduktes Pyridinolin in der Synovialis korreliert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Kollagenase 3 als klinischer bzw. histopathologischer Marker für den Verlauf des Prozesses der Knorpeldestruktion bei RA geeignet sein könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Airola K, Johansson N, Kariniemi AL, Kahari VM, Saarialho-Kere UK. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *Journal Of Investigative Dermatology* 1997; 109(2):225-231.
- (2) Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL et al. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer* 1999; 80(5-6):733-743.
- (3) Balbin M, Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Freije JP, Lopez-Otin C. Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* 1999; 107(1):45-53.
- (4) Bang H, Egerer K, Gauliard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(8):2503-2511.
- (5) Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Geng C, Martel-Pelletier J. A novel negative regulatory element in the human collagenase-3 proximal promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(5):1151-1159.
- (6) Bigg HF, Rowan AD. The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1(3):314-320.
- (7) Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Journal Of Clinical Investigation* 1997; 99(7):1534-1545.
- (8) Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17(6):638-642.
- (9) Bohm BB, Aigner T, Blobel CP, Kalden JR, Burkhardt H. Highly enhanced expression of the disintegrin metalloproteinase MDC15 (metargidin) in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2001; 44(9):2046-2054.
- (10) Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *Journal Of Biological Chemistry* 1996; 271(38):23577-23581.
- (11) Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 Suppl 1:S1.
- (12) Burmester GR, Daser A, Kamradt T, Krause A, Mitchison NA, Sieper J et al. Immunology of reactive arthritides. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:229-250.
- (13) Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006; 11:529-543.
- (14) Buzas EI, Brennan FR, Mikecz K, Garzo M, Negroiu G, Hollo K et al. A proteoglycan (aggrecan)-specific T cell hybridoma induces arthritis in BALB/c mice. *J Immunol* 1995; 155(5):2679-2687.
- (15) Camper L, Hellman U, Lundgren-Akerlund E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(32):20383-20389.
- (16) Carson DA, Chen PP, Fox RI, Kipps TJ, Jirik F, Goldfien RD et al. Rheumatoid factor and immune networks. *Annu Rev Immunol* 1987; 5:109-126.
- (17) Carson DA, Chen PP, Kipps TJ. New roles for rheumatoid factor. *J Clin Invest* 1991; 87(2):379-383.
- (18) Case JP, Lafyatis R, Kumkumian GK, Remmers EF, Wilder RL. IL-1 regulation of transin/stromelysin transcription in rheumatoid synovial fibroblasts appears to involve two antagonistic transduction pathways, an inhibitory, prostaglandin-dependent pathway mediated by cAMP, and a stimulatory, protein kinase C-dependent pathway. *J Immunol* 1990; 145(11):3755-3761.
- (19) Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001; 11(11):S37-S43.
- (20) Chen E, Keystone EC, Fish EN. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36(7):901-910.
- (21) Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344(12):907-916.
- (22) Christgau S, Cloos PA. Cartilage degradation products as markers for evaluation of patients with rheumatic diseases. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2004; 4(5):277-294.

- (23) Cowell S, Knauper V, Stewart ML, dOrtho MP, Stanton H, Hembry RM et al. Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochemical Journal* 1998; 331 Part 2:453-458.
- (24) Cremer MA, Ye XJ, Terato K, Owens SW, Seyer JM, Kang AH. Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat. Characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent alpha-chains. *J Immunol* 1994; 153(2):824-832.
- (25) Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Youssef PP, Gay RE, Gay S et al. Synovial tissue protease gene expression and joint erosions in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(8):1744-1753.
- (26) Danfelter M, Onnerfjord P, Heinegard D. Fragmentation of proteins in cartilage treated with interleukin-1: specific cleavage of type IX collagen by matrix metalloproteinase 13 releases the NC4 domain. *J Biol Chem* 2007; 282(51):36933-36941.
- (27) Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Mitchell T, Feldmann M et al. Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1992; 35(10):1170-1178.
- (28) den Broeder AA, Joosten LA, Saxne T, Heinegard D, Fenner H, Miltenburg AM et al. Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(4):311-318.
- (29) DiBattista JA, Martel Pelletier J, Fujimoto N, Obata K, Zafarullah M, Pelletier JP. Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* 1994; 71(2):270-278.
- (30) Dolhain RJ, ter Haar NT, Hoefakker S, Tak PP, de Ley M, Claassen E et al. Increased expression of interferon (IFN)-gamma together with IFN-gamma receptor in the rheumatoid synovial membrane compared with synovium of patients with osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 1996; 35(1):24-32.
- (31) Dorner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16(3):246-253.
- (32) Dorner T, Burmester GR. New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20(3):263-268.
- (33) Egerer K, Hertzner J, Feist E, Albrecht A, Rudolph PE, Dorner T et al. sE-selectin for stratifying outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 49(4):546-548.
- (34) Elliott S, Cawston T. The clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic disorders. *Drugs Aging* 2001; 18(2):87-99.
- (35) Elnemr A, Yonemura Y, Bandou E, Kinoshita K, Kawamura T, Takahashi S et al. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in human gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6(1):30-38.
- (36) Erlandsson H, Mussener A, Klareskog L, Gold DP. Restricted T-cell receptor usage in DA rats during early collagen-induced arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 756:225-226.
- (37) Fassbender HG. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983; 3(2):141-155.
- (38) Fassbender HG, Gay S. Synovial processes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1988; 76:1-7.
- (39) Fassbender HG. What destroys the joint in rheumatoid arthritis? *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 117(1-2):2-7.
- (40) Feist E, Egerer K, Burmester GR. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2007; 66(3):212-218.
- (41) Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynauld JP et al. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* 1998; 25(8):1585-1594.
- (42) Firestein GS. Rheumatoid Synovium and Pannus. In: Klippel JH, Dieppe PA, editors. *Rheumatology*. St Louis Baltimore Chicago London Philadelphia: Mosby, 1994: 3.12.1-3.12.30.
- (43) Fitzgerald JE, Ricalton NS, Meyer AC, West SG, Kaplan H, Behrendt C et al. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1995; 154(7):3538-3547.
- (44) Flannery CR. MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front Biosci* 2006; 11:544-569.

- (45) Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, Handel ML, Burmester GR, Tesser J et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2003; 48(4):927-934.
- (46) Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *Febs Letters* 1996; 380(1-2):17-20.
- (47) Fosang AJ, Stanton H, Little CB, Atley LM. Neopeptides as biomarkers of cartilage catabolism. *Inflamm Res* 2003; 52(7):277-282.
- (48) Franz JK, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y et al. Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(3):599-607.
- (49) Freemont AJ, Byers RJ, Taiwo YO, Hoyland JA. In situ zymographic localisation of type II collagen degrading activity in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(6):357-365.
- (50) Freije JM, Diez Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269(24):16766-16773.
- (51) Frisbie DD, Ray CS, Ionescu M, Poole AR, Chapman PL, McIlwraith CW. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. *Am J Vet Res* 1999; 60(3):306-309.
- (52) Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):8998-9002.
- (53) Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, Dougados M et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other immune mediated inflammatory diseases (May 2003). *Ann Rheum Dis* 2003; 62 Suppl 2:ii2-ii9.
- (54) Garnero P, Jouvenne P, Buchs N, Delmas PD, Miossec P. Uncoupling of bone metabolism in rheumatoid arthritis patients with or without joint destruction: assessment with serum type I collagen breakdown products. *Bone* 1999; 24(4):381-385.
- (55) Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993; 52 Suppl 1:S39-47.
- (56) Gay S. Rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12(3):179-180.
- (57) Gay S, Kuchen S, Gay RE, Neidhart M. Cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61 Suppl 2:ii87.
- (58) Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 1994; 37(11):1664-1671.
- (59) Gonzalez-Quintanilla R, Baccala R, Pope RM, Theofilopoulos AN. Identification of clonally expanded T cells in rheumatoid arthritis using a sequence enrichment nuclease assay. *J Clin Invest* 1996; 97(5):1335-1343.
- (60) Goodacre JA, Middleton S, Lynn S, Ross DA, Pearson J. Human cartilage aggrecan CS1 region contains cryptic T-cell recognition sites. *Immunology* 1993; 78(4):586-591.
- (61) Goronzy JJ, Bartz-Bazzanella P, Hu W, Jendro MC, Walser-Kuntz DR, Weyand CM. Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994; 94(5):2068-2076.
- (62) Gravalles EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH. In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1991; 34(9):1076-1084.
- (63) Green MJ, Gough AK, Devlin J, Smith J, Astin P, Taylor D et al. Serum MMP-3 and MMP-1 and progression of joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(1):83-88.
- (64) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205-1213.
- (65) Hanemaaijer R, Sorsa T, Kontinen YT, Ding YL, Sutinen M, Visser H et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells - Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *Journal Of Biological Chemistry* 1997; 272(50):31504-31509.
- (66) Hasty KA, Jeffrey JJ, Hibbs MS, Welgus HG. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 1987; 262(21):10048-10052.

- (67) Hattori Y, Nerusu KC, Bhagavathula N, Brennan M, Hattori N, Murphy HS et al. Vascular expression of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in basal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2003; 74(3):230-237.
- (68) Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL. Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Annals Of The Rheumatic Diseases* 1995; 54(1):25-32.
- (69) Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996; 149(1):273-282.
- (70) Hernandez M, Martinez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34(9):729-735.
- (71) Hollenberg MD. Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci* 2003; 74(2-3):237-246.
- (72) Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999; 99(1):81-92.
- (73) Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 1995; 129(3):867-879.
- (74) Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(7):413-422.
- (75) Im HJ, Muddasani P, Natarajan V, Schmid TM, Block JA, Davis F et al. Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2007; 282(15):11110-11121.
- (76) Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1996; 39(3):386-395.
- (77) Ivaska J, Heino J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(1):16-24.
- (78) Jendro MC, Ganten T, Matteson EL, Weyand CM, Goronzy JJ. Emergence of oligoclonal T cell populations following therapeutic T cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38(9):1242-1251.
- (79) Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 1999; 19(6):4431-4442.
- (80) Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, Florescu A, Horslev-Petersen K, Lorenzen I et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(7):618-626.
- (81) Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho KU, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 1997; 151(2):499-508.
- (82) Johansson N, SaarialhoKere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Developmental Dynamics* 1997; 208(3):387-397.
- (83) Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1993; 36(2):137-146.
- (84) Jones GC. ADAMTS proteinases: potential therapeutic targets? *Curr Pharm Biotechnol* 2006; 7(1):25-31.
- (85) Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, De-Loo FA, Heinegard D, Den-Berg WB. IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* 1999; 163(9):5049-5055.
- (86) Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001; 344(9):655-664.
- (87) Kamradt T, Hansen G, Bechmann I, Burmester GR. T-Zelltoleranz und Autoimmunitat. [T-cell tolerance and autoimmunity]. *Internist (Berl)* 2003; 44(2):146-152.



- (88) Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, Keysser C, Keysser M, Gromnica-Ihle E et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J Rheumatol* 1999; 26(2):251-258.
- (89) Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(6):224.
- (90) Knauper V, Lopez OC, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271(3):1544-1550.
- (91) Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez Otin C, O'Shea M, Morris H et al. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 1997; 272(12):7608-7616.
- (92) Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R. The matrix metalloproteinase RAS1-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol Lett* 1997; 57(1-3):83-88.
- (93) Konttinen YT, Salo T, Hanemaaijer R, Valleala H, Sorsa T, Sutinen M et al. Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: localization in the pannus-hard tissue junction and inhibition by alendronate. *Matrix Biol* 1999a; 18(4):401-412.
- (94) Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999b; 58(11):691-697.
- (95) Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR. Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. *Oncol Res* 1993; 5(1):19-28.
- (96) Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP. Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum* 1997; 40(1):164-174.
- (97) Krammer PH, Dhein J, Walczak H, Behrmann I, Mariani S, Matiba B et al. The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev* 1994; 142:175-191.
- (98) Kriegsmann J, Keyszer G, Geiler T, Gay RE, Gay S. A new double labeling technique for combined in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 1994; 71(6):911-917.
- (99) Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989; 83(4):1267-1276.
- (100) Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T et al. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* 1995; 131(6 Pt 2):1903-1915.
- (101) Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358(9285):903-911.
- (102) Lehnert K, Ni J, Leung E, Gough SM, Weaver A, Yao WP et al. Cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the novel human integrin alpha11 subunit (ITGA11). *Genomics* 1999; 60(2):179-187.
- (103) Li DQ, Shang TY, Kim HS, Solomon A, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(7):2928-2936.
- (104) Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003; 288(1):208-217.
- (105) Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW et al. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3):770-775.
- (106) Lindqvist E, Saxne T. Cartilage macromolecules in knee joint synovial fluid. Markers of the disease course in patients with acute oligoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(12):751-753.
- (107) Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(2):196-201.
- (108) Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T, Ding YL, Santavirta S, Ceponis A et al. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis And Rheumatism* 1997; 40(8):1391-1399.

- (109) Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(1):202.
- (110) MacGregor AJ, Bamber S, Carthy D, Vencovsky J, Mageed RA, Ollier WE et al. Heterogeneity of disease phenotype in monozygotic twins concordant for rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34(3):215-220.
- (111) MacLennan IC, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DM et al. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 1997; 156:53-66.
- (112) MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990; 265(28):17238-17245.
- (113) Maini RN, Elliott MJ, Brennan FM, Williams RO, Chu CQ, Paleolog E et al. Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. *Immunol Rev* 1995; 144:195-223.
- (114) Maini RN. Current and new antitumor necrosis factor agents in perspective. *Arthritis Res Ther* 2004; 6 Suppl 2:S1-S2.
- (115) Malesud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11:1696-1701.
- (116) Manicourt DH, Poilvache P, Nzeuseu A, van Egeren A, Devogelaer JP, Lenz ME et al. Serum levels of hyaluronan, antigenic keratan sulfate, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 change predictably in rheumatoid arthritis patients who have begun activity after a night of bed rest. *Arthritis Rheum* 1999; 42(9):1861-1869.
- (117) Mansson B, Geborek P, Saxne T. Cartilage and bone macromolecules in knee joint synovial fluid in rheumatoid arthritis: relation to development of knee or hip joint destruction. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(2):91-96.
- (118) Mao D, VanVickle SJ, Curci JA, Thompson RW. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1999; 13(2):236-237.
- (119) Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA et al. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 2001; 28(3):261-265.
- (120) Mauri C, Ehrenstein MR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. B cells. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(2):205.
- (121) McCachren SS. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum* 1991; 34(9):1085-1093.
- (122) McDermott M, Kastner DL, Holloman JD, Schmidt-Wolf G, Lundberg AS, Sinha AA et al. The role of T cell receptor beta chain genes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38(1):91-95.
- (123) McInnes IB, al Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996; 2(2):175-182.
- (124) Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000; 43(4):801-811.
- (125) Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti ML, Yocum SA, Rosner PJ et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97(3):761-768.
- (126) Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel PJ. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1653-1661.
- (127) Muddasani P, Norman JC, Ellman M, van Wijnen AJ, Im HJ. Basic fibroblast growth factor activates the MAPK and NFkappaB pathways that converge on Elk-1 to control production of matrix metalloproteinase-13 by human adult articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2007; 282(43):31409-31421.
- (128) Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK et al. Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1996; 59(3):676-683.

- (129) Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Activation of synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12(3):186-194.
- (130) Muller-Ladner U, Gay S. MMPs and rheumatoid synovial fibroblasts: Siamese twins in joint destruction? *Ann Rheum Dis* 2002; 61(11):957-959.
- (131) Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996; 149(5):1607-1615.
- (132) Nabozny GH, Baisch JM, Cheng S, Cosgrove D, Griffiths MM, Luthra HS et al. HLA-DQ8 transgenic mice are highly susceptible to collagen-induced arthritis: a novel model for human polyarthritis. *J Exp Med* 1996; 183(1):27-37.
- (133) Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(2):94-103.
- (134) Nagaya H, Ymagata T, Ymagata S, Iyoda K, Ito H, Hasegawa Y et al. Examination of synovial fluid and serum hyaluronidase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients (by zymography). *Ann Rheum Dis* 1999; 58(3):186-188.
- (135) Nakajima T, Aono H, Hasunuma T, Yamamoto K, Maruyama I, Nosaka T et al. Overgrowth of human synovial cells driven by the human T cell leukemia virus type I tax gene. *J Clin Invest* 1993; 92(1):186-193.
- (136) Neidhart M, Wehrli R, Bruhlmann P, Michel BA, Gay RE, Gay S. Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(4):622-630.
- (137) Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 2003; 48(7):1873-1880.
- (138) Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(12):1731-1736.
- (139) Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998; 102(12):2115-2125.
- (140) Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001; 107(1):35-44.
- (141) Neumann E, Gay RE, Gay S, Muller-Ladner U. Functional genomics of fibroblasts. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16(3):238-245.
- (142) Nishioka K, Sumida T, Hasunuma T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 1996; 39(8):1410-1418.
- (143) Nocton JJ, Steere AC. Lyme disease. *Adv Intern Med* 1995; 40:69-117.
- (144) O'Sullivan FX, Fassbender HG, Gay S, Koopman WJ. Etiopathogenesis of the rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. I. The histomorphologic basis of joint destruction. *Arthritis Rheum* 1985; 28(5):529-536.
- (145) Ohno S, Im HJ, Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan oligosaccharides induce matrix metalloproteinase 13 via transcriptional activation of NFkappaB and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2006; 281(26):17952-17960.
- (146) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272(4):2446-2451.
- (147) Ollier WE, MacGregor A. Genetic epidemiology of rheumatoid disease. *Br Med Bull* 1995; 51(2):267-285.
- (148) Otero M, Goldring MB. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(5):220.
- (149) Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 2002; 22(1):51-86.
- (150) Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117(2):144-150.
- (151) Park W, Weyand CM, Schmidt D, Goronzy JJ. Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells. *Eur J Immunol* 1997; 27(5):1082-1090.
- (152) Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 2001; 503(2-3):158-162.

- (153) Pendas AM, Balbin M, Llano E, Jimenez MG, LopezOtin C. Analysis and promoter characterization of the human collagenase- 3 gene (MMP13). *Genomics* 1997; 40(2):222-233.
- (154) Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JP, Lopez-Otin C. An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin Chim Acta* 2000; 291(2):137-155.
- (155) Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86(1):346-355.
- (156) Petrow PK, Wernicke D, Schulze-Westhoff C, Hummel KM, Brauer R, Kriegsmann J et al. Characterisation of the cell type-specificity of collagenase 3 mRNA expression in comparison with membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(5):391-397.
- (157) Pincus T. Long-term outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34 Suppl 2:59-73.
- (158) Pincus T, Larsen A, Brooks RH, Kaye J, Nance EP, Callahan LF. Comparison of 3 quantitative measures of hand radiographs in patients with rheumatoid arthritis: Steinbrocker stage, Kaye modified Sharp score, and Larsen score. *J Rheumatol* 1997; 24(11):2106-2112.
- (159) Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 1994; 179(2):609-618.
- (160) Prince HE. Biomarkers for diagnosing and monitoring autoimmune diseases. *Biomarkers* 2005; 10 Suppl 1:S44-S49.
- (161) Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L et al. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(3):463-473.
- (162) Randen I, Thompson KM, Pascual V, Victor K, Beale D, Coadwell J et al. Rheumatoid factor V genes from patients with rheumatoid arthritis are diverse and show evidence of an antigen-driven response. *Immunol Rev* 1992; 128:49-71.
- (163) Ravanti L, Heino J, Lopez OC, Kahari VM. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999; 274(4):2446-2455.
- (164) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, MartelPelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes - A role in osteoarthritis. *Journal Of Clinical Investigation* 1996; 97(9):2011-2019.
- (165) Rengel Y, Ospelt C, Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(5):221.
- (166) Riikonen T, Westermarck J, Koivisto L, Broberg A, Kahari VM, Heino J. Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *J Biol Chem* 1995; 270(22):13548-13552.
- (167) Ruschpler P, Stiehl P. Shift in Th1 (IL-2 and IFN-gamma) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA). *Cell Mol Biol (Noisy le grand)* 2002; 48(3):285-293.
- (168) Samuel S, Beifuss KK, Bernstein LR. YB-1 binds to the MMP-13 promoter sequence and represses MMP-13 transactivation via the AP-1 site. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1769(9-10):525-531.
- (169) Sarkissian M, Lafyatis R. Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999; 162(3):1772-1779.
- (170) Schett G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(1):203.
- (171) Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest* 1996; 97(9):2027-2037.
- (172) Schulze Westhoff C, Freudiger D, Petrow P, Seyfert C, Zacher J, Kriegsmann J et al. Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1517-1527.
- (173) Schwartzman S, Fleischmann R, Morgan G-JJ. Do anti-TNF agents have equal efficacy in patients with rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 2004; 6 Suppl 2:S3-S11.
- (174) Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(6):1071-1079.

- (175) Shiozawa S, Shiozawa K. A review of the histopathological evidence on the pathogenesis of cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1988; 74:65-72.
- (176) Shiozawa S, Tanaka Y, Fujita T, Tokuhisa T. Destructive arthritis without lymphocyte infiltration in H2-c-fos transgenic mice. *J Immunol* 1992; 148(10):3100-3104.
- (177) Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(9):3942-3946.
- (178) Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: Involvement of three different collagenases. *Arthritis And Rheumatism* 1997; 40(11):2065-2074.
- (179) Shlopov BV, Smith G-NJ, Cole AA, Hasty KA. Differential patterns of response to doxycycline and transforming growth factor beta1 in the down-regulation of collagenases in osteoarthritic and normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1999; 42(4):719-727.
- (180) Shlopov BV, Gumanovskaya ML, Hasty KA. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):195-205.
- (181) Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32(10):903-907.
- (182) Simon AK, Seipelt E, Sieper J. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(18):8562-8566.
- (183) Skoumal M, Kolarz G, Klingler A. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003; 32(3):156-161.
- (184) So A, Chamot AM, Peclat V, Gerster JC. Serum MMP-3 in rheumatoid arthritis: correlation with systemic inflammation but not with erosive status. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(5):407-410.
- (185) StahleBackdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Laboratory Investigation* 1997; 76(5):717-728.
- (186) Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200(4):448-464.
- (187) Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298(16):869-871.
- (188) Stiehl P. Histologie der Rheumatoid-Arthritis. Beitrag zur diagnostischen und pathogenetischen Heterogenität, zur Aktivitätsdiagnose und zur Prognose. In: Sack U, editor. *Arthritiden*. Lengerich-Berlin-Düsseldorf-Leipzig-Riga-Scottsdale AZ-Wien-Zagreb: Pabst, 1997: 188-200.
- (189) Stone AL, Kroeger M, Sang QX. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem* 1999; 18(4):447-465.
- (190) Stransky G, Vernon J, Aicher WK, Moreland LW, Gay RE, Gay S. Virus-like particles in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993; 32(12):1044-1048.
- (191) Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995; 270(10):5331-5338.
- (192) Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999; 99(19):2503-2509.
- (193) Sun Y, Cheung JM, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Wenger L, Altman RD et al. Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). *J Biol Chem* 2000; 275(15):11327-11332.
- (194) Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29(44):10261-10270.
- (195) Symmons DP, Silman AJ. Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(4):214.
- (196) Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001; 167(2):1072-1080.

- (197) Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Hambor JE, MartelPelletier J. Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene. *Biochemical Journal* 1997; 323 Part 1:13-16.
- (198) Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 2004; 14(3):197-204.
- (199) Tetlow LC, Lees M, Ogata Y, Nagase H, Woolley DE. Differential expression of gelatinase B (MMP-9) and stromelysin-1 (MMP-3) by rheumatoid synovial cells in vitro and in vivo. *Rheumatol Int* 1993; 13(2):53-59.
- (200) Tetlow LC, Woolley DE. Comparative immunolocalization studies of collagenase 1 and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes in vitro. *Br J Rheumatol* 1998; 37(1):64-70.
- (201) Tselepis VH, Green LJ, Humphries MJ. An RGD to LDV motif conversion within the disintegrin kistrin generates an integrin antagonist that retains potency but exhibits altered receptor specificity. Evidence for a functional equivalence of acidic integrin-binding motifs. *J Biol Chem* 1997; 272(34):21341-21348.
- (202) Uria JA, Stahle BM, Seiki M, Fueyo A, Lopez OC. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 1997; 57(21):4882-4888.
- (203) Uria JA, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Vizoso F, Takigawa M et al. Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 1998; 153(1):91-101.
- (204) Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, KarjalainenLindsberg ML, Kahari VM et al. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *Journal Of Investigative Dermatology* 1997; 109(1):96-101.
- (205) Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol* 1998; 152(4):1005-1014.
- (206) van Roon JA, van Roy JL, Gmelig-Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum* 1996; 39(5):829-835.
- (207) Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8):827-839.
- (208) Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der HA, Lora M, Senshu T et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(2):R142-R150.
- (209) Waase I, Kayser C, Carlson PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Oligoclonal T cell proliferation in patients with rheumatoid arthritis and their unaffected siblings. *Arthritis Rheum* 1996; 39(6):904-913.
- (210) Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum* 1992; 35(1):35-42.
- (211) Walker B, Lynas JF. Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(4):596-624.
- (212) Wegner J. Biochemistry of serine protease inhibitors and their mechanisms of action: a review. *J Extra Corpor Technol* 2003; 35(4):326-338.
- (213) Welgus HG, Kobayashi DK, Jeffrey JJ. The collagen substrate specificity of rat uterus collagenase. *J Biol Chem* 1983; 258(23):14162-14165.
- (214) Werb Z, Alexander CM. Proteinases and matrix degradation. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, editors. 248-268. 1993. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, W.B. Saunders Company. Textbook of Rheumatology.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (215) Wernicke D, Seyfert C, Hinzmann B, Gromnica-Ihle E. Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1996; 23(4):590-595.
- (216) Wernicke D, Schulze-Westhoff C, Brauer R, Petrow P, Zacher J, Gay S et al. Stimulation of collagenase 3 expression in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis by contact with a three-dimensional collagen matrix or with normal cartilage when coimplanted in NOD/SCID mice. *Arthritis Rheum* 2002; 46(1):64-74.
- (217) Wernicke D, Seyfert C, Gromnica-Ihle E, Stiehl P. The expression of collagenase 3 (MMP-13) mRNA in the synovial tissue is associated with histopathologic type II synovitis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 2006; 39(4):307-313.
- (218) Wernicke D, Voigt A, Muller A, Schmidt WA, Stiehl P, Hein G. Association between histopathologic type II synovitis and increased amounts of pyridinoline in synovial tissue samples in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2008, DOI 10.1007/s00393-008-0292-7.

- (219) Weyand CM, McCarthy TG, Goronzy JJ. Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95(5):2120-2126.
- (220) Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 1996; 271(29):17119-17123.
- (221) Woessner J-FJ. MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002; 22(1):33-49.
- (222) Wolfe GC, MacNaul KL, Buechel FF, McDonnell J, Hoernner LA, Lark MW et al. Differential in vivo expression of collagenase messenger RNA in synovium and cartilage. Quantitative comparison with stromelysin messenger RNA levels in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients and in two animal models of acute inflammatory arthritis [see comments]. *Arthritis Rheum* 1993; 36(11):1540-1547.
- (223) Wollheim FA. Bone sialoprotein-a new marker for subchondral bone. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7(3):331-332.
- (224) Wollheim FA. Markers of disease in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12(3):200-204.
- (225) Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(24):10049-10053.
- (226) Yamanishi Y, Boyle DL, Pinkoski MJ, Mahboubi A, Lin T, Han Z et al. Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2002; 160(1):123-130.
- (227) Yocum DE, Lafyatis R, Remmers EF, Schumacher HR, Wilder RL. Hyperplastic synoviocytes from rats with streptococcal cell wall-induced arthritis exhibit a transformed phenotype that is thymic-dependent and retinoid inhibitable. *Am J Pathol* 1988; 132(1):38-48.
- (228) Young-Min S, Cawston T, Marshall N, Coady D, Christgau S, Saxne T et al. Biomarkers predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis and perform well compared with traditional markers. *Arthritis Rheum* 2007; 56(10):3236-3247.
- (229) Yousef GM, Diamandis EP. Tissue kallikreins: new players in normal and abnormal cell growth? *Thromb Haemost* 2003; 90(1):7-16.
- (230) Zeller Y, Lohr J, Sammar M, Butcher EC, Altevogt P. Asp-698 and Asp-811 of the integrin alpha4-subunit are critical for the formation of a functional heterodimer. *J Biol Chem* 1998; 273(12):6786-6795.
- (231) Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001; 276(44):41059-41063.
- (232) Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37(6):783-789.

## 8. Danksagung

Besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Erika Gromnica-Ihle, Chefärztin der Rheumaklinik Berlin-Buch, die mich für die klinische Rheumatologie begeisterte und insbesondere die klinischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit grosszügig unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charite - Universitätsmedizin Berlin, sei herzlichst gedankt für die Vertretung dieser Arbeit vor dem Fakultätsrat der Charite - Universitätsmedizin Berlin, die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit und die Vermittlung der Lehrtätigkeit.

Herrn Prof. Dr. F. C. Luft, Chefarzt der I. Inneren Klinik des Helios-Klinikums Berlin-Buch, möchte ich aufrichtig danken für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit, seine inspirierende Art als klinischer Lehrer und die Vermittlung eines wissenschaftlichen Arbeitsstils in der Inneren Medizin.

Herrn Prof. Dr. Steffen Gay, Direktor des WHO Collaborating Center for Molecular Biology and Novel Therapeutic Strategies for Rheumatic Diseases des Universitäts-Spitals Zürich, möchte ich insbesondere für die konstruktive Begleitung der Forschungsarbeiten und die richtungsweisenden Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Detlev Ganten, Gründungsdirektor des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin Berlin-Buch, und Herrn Prof. Dr. Ludwig Thierfelder, Geschäftsführender Direktor der Franz-Volhard-Klinik Berlin-Buch, gebührt mein besonderer Dank für die dauerhafte Unterstützung der Forschungsarbeiten und die Schaffung der erforderlichen Rahmenbedingungen für die experimentellen Arbeiten.

Frau Dr. Claudia Schulze Westhoff und Herr Dr. Dirk Freudiger haben unter meiner Betreuung ihre Promotionsarbeiten am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch angefertigt und so zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ein persönlicher Dank gilt Frau Ilona Trippmacher für die vielfältige technische Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten, insbesondere der zellbiologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Peter Petrow, Prof. Dr. Jörg Kriegsmann und Prof. Dr. Rolf Bräuer, Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, gilt mein besonderer Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Zelltyp-spezifischen Expression der Matrix-Metalloproteasen in den Synovialispräparaten und bei der Durchführung der Experimente mit immundefizienten Mäusen.

Herrn Prof. Dr. Peter Stiehl, Institut für Pathologie der Universität Leipzig, sei herzlichst für die unkomplizierte und angenehme Zusammenarbeit bei der histopathologischen Charakterisierung der Synovialispräparate gedankt.



Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Josef Zacher, Chefarzt der Orthopädischen Klinik des Helios-Klinikums Berlin-Buch, und Frau Dr. Christine Seyfert, Chefärztin der Orthopädischen Abteilung des Krankenhauses Kyritz, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Operationspräparate.

Frau Marion Bimmler und Frau Christine Gernat, BBB Management GmbH Campus Berlin-Buch, gebührt mein besonderer Dank für ihr Interesse an den Forschungsarbeiten und die Unterstützung bei der Schaffung der Rahmenbedingungen für die experimentellen und theoretischen Arbeiten.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Dorothea Busjahn, Leiterin der Bibliothek des Max-Delbrück-Centrums Berlin-Buch, für Rat und Tat bei der Literaturarbeit.

Frau Dr. Karin Zerbes, Klinik für Radiologie des Helios-Klinikums Berlin-Buch, bin ich für die röntgenologische Bewertung des Grades der Gelenkdestruktion bei der untersuchten Kohorte von RA Patienten zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihr Verständnis, meiner Frau Ute für Ihre tatkräftige Unterstützung und insbesondere meiner Tochter Josephine, die oft auf meine Anwesenheit verzichten musste.

## 9. ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift