

Aus der Abteilung Prothetik
(Komm. Direktor PD Dr. med. dent. N. Gersdorff)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss von Interleukin 17 auf chondrogene Vorläuferzellen in der
rheumatoiden Arthritis.

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jens Johannleweling
aus Münster

Göttingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Miosge
II. Berichterstatter/in	PD Dr. rer. nat. Kaomei Guan-Schmidt
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Dent. Rainer Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	10.02.2014

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs. Ethanol	Ethanol absolut 99%
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine
ACR	<i>"American College of Rheumatology"</i>
ADAMTS-5	<i>"A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5"</i>
AK	Antikörper
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CD	Differenzierungscluster (Cluster of Differentiation)
CD4+	positiv für Differenzierungscluster Nummer 4
CD4+ T-Zellen	T-Lymphozyten-positiv für den Differenzierungscluster Nummer 4
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPC	chondrogene Vorläuferzellen <i>"chondrogene progenitor cells"</i>
CRP	C-reaktives Protein
ct-Wert	<i>"threshold cycle"</i> (Grenzwert-Zyklus)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMARD	<i>"disease modifying anti rheumatic drugs"</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinas
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E	Effizienz
et al.	und andere
EULAR	<i>„European League Against Rheumatism“</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLS	fibroblastenähnliche Synovialzellen <i>"fibroblast like synoviocyte"</i>
G	Gram
GPT	Glycosylphosphatidylinositol-Gruppe
H	Stunde
HCl	Salzsäure
HLA	<i>"human leucozyte antigen"</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL1	Interleukin 1
IL17	Interleukin 17
IL17A	Interleukin-17-Isoform A
IL17F	Interleukin-17-Isoform F
IL17RA	Interleukin-17-Rezeptor Isoform-A
IL17RC	Interleukin-17-Rezeptor-Isoform-C
IL6	Interleukin 6

INF ³	Interferon Gamma
Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Lsg.	Lösung
MAPK1	„mitogen-activated protein kinase 1“
MCH	Haupthistokompatibilitätskomplex " <i>major histocompatibility complex</i> "
Mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Min	Minute
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP3	Matrix- Metalloproteinase 3
MMP14	Matrix- Metalloproteinase 14
MMP15	Matrix- Metalloproteinase 15
MMP17	Matrix- Metalloproteinase 17
MP	Makrophagen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	membranständige Matrix-Metalloproteinase
NCBI	" <i>National Center for Biotechnology Information</i> "
NF ^o B	" <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> "
Ng	Nanogramm
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomolar
pos.	Positiv
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (Housekeeping-Gen)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real- Time-Polymerasekettenreaktion
RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	" <i>receptor activator of NFkB ligand</i> "
Rcf	„ <i>relative centrifugal force</i> “
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	Siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
STABW	Standardabweichung
SYBR-Green	interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von DNA
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Th	T-Helferzelle
Th17-Zellen	T-Helferzellen Typ 17
Th1-Zellen	T-Helferzellen Typ 1
Th2-Zellen	T-Helferzellen Typ 2
TIMP	Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor " <i>tissue inhibitors of metalloproteases</i> "
TIMP3	Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor 3
TNF±	Tumornekrosefaktor alpha
UpM	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Wachstumskurve chondrogener Vorläuferzellen	37
Abb.2	Relative Zellvermehrung chondrogener Vorläuferzellen	38
Abb.3	Relative Zellvermehrung chondrogener Vorläuferzellen unter Stimulationsbedingungen mit 50ng/ml IL17	40
Abb.4	Vergleich des Teilungsverhaltens stimulierter und nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen	41
Abb.5	Das mRNA-Expressionsspektrum der chondrogenen Vorläuferzellen	43
Abb.6	IL6-PCR-Ergebnisse nach IL17-Konzentration	45
Abb.7	relative IL6-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	46
Abb.8	relative MMP3-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	48
Abb.9	relative MMP17-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	49
Abb.10	relative NFkB-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	50
Abb.11	IL6-Immunfluoreszenzbilder	53
Abb.12	MMP3-Immunfluoreszenzbilder	54
Abb.13	MMP3-Western-Blot	55
Abb.14	IL6-Western-Blot	56
Abb.15	MMP3-Western-Blot nach IL17-Stimulation	57
Abb.16	IL17-Antikörper blockt IL17-Wirkung auf die relative IL6-mRNA- Expression in chondrogenen Vorläuferzellen	59

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Verwendete Geräte	18
Tab.2	Verwendete Puffer und Lösungen	18
Tab.3	Verwendete Antikörper	20
Tab.4	Verwendete Medien	20
Tab.5	Verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	21
Tab.6	Primertabelle	28
Tab.7	Zellzahl chondrogener Vorläuferzellen nach Kulturzeit	37
Tab.8	Zellzahl chondrogener Vorläuferzellen nach Zeit und IL17-Konzentration	39
Tab.9	IL6-PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit zur IL17-Konzentration	44
Tab.10	relative MMP3-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	47
Tab.11	relative MMP14-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	47
Tab.12	relative MMP15-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	47
Tab.13	relative MMP17-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation	47
Tab.14	PCR-Ergebnisse des IL17-Antikörperversuchs	58

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	9
1.1	Einführung in die rheumatoide Arthritis und deren Pathogenese	9
1.2	Th17-Zellen und deren Rolle in der rheumatoiden Arthritis	11
1.3	Interleukin 17 und seine Rolle in der rheumatoiden Arthritis	12
1.4	Chondrogene Vorläuferzellen und deren Rolle in der rheumatoiden Arthritis	14
2	<u>Aufgabenstellung</u>	17
3	<u>Material und Methoden</u>	18
3.1	Materialien und Geräte	18
3.1.1	Wichtige Geräte	18
3.1.2	Puffer und Lösungen	18
3.1.3	Antikörper	20
3.1.4	Medien	20
3.1.5	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	21
3.2	Methoden	23
3.2.1	Präambel	23
3.2.2	Gewinnung des Knorpelgewebes	23
3.2.3	Zellisolation und Zellkultur der chondrogenen Vorläuferzellen	23
3.2.4	Zellgewinnung	24
3.2.5	IL17-Stimulation	24
3.2.6	IL17-Stimulationsinhibitionsversuch	24
3.3	mRNA-Nachweis mit quantitativer Real-Time-PCR	25
3.3.1	Allgemeines zum Verfahren der quantitativen Real-Time-PCR	25
3.3.2	Vorbereitende Maßnahmen für die quantitative Real-Time-PCR	26
3.3.3	RNA-Isolierung	26
3.3.4	Umschreibung von RNA in cDNA	27
3.3.5	Primererstellung	28
3.3.6	Primertabelle	28
3.3.7	Gradienten-PCR	29
3.3.8	Sequenzierung	30
3.3.9	Quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion	30
3.3.10	Statistik	31
3.4	Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz	32
3.4.1	Allgemeines zum Verfahren der Immunfluoreszenz an adhärenenten Zellen	32
3.4.2	Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz	33
3.5	Proteinnachweis mit Western Blot	34
3.5.1	Allgemeines zum Verfahren Western Blot	34
3.5.2	Durchführung Western Blot	34

4	<u>Ergebnisse</u>	36
4.0.1	Allgemeines zu den Ergebnissen.....	36
4.1	Untersuchung des Wachstumsverhaltens chondrogener Vorläuferzellen unter IL17-Stimulationsbedingungen	36
4.1.1	Teilungsverhalten chondrogener Vorläuferzellen.....	37
4.1.2	Teilungsverhalten chondrogener Vorläuferzellen unter IL17-Stimulationsbedingungen	39
4.1.3	Vergleich des Wachstumsverhaltens zwischen mit IL17 stimulierten und nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen.	41
4.2	Untersuchung der mRNA-Expression chondrogener Vorläuferzellen	42
4.2.1	Einfluss von IL17 auf chondrogene Vorläuferzellen und deren mRNA-Synthese.	44
4.2.2	Einfluss von IL17 auf den IL6-mRNA-Gehalt von chondrogenen Vorläuferzellen.	44
4.2.3	Einfluss von IL17 auf den mRNA-Gehalt von Matrix-Metalloproteinasen in chondrogenen Vorläuferzellen	47
4.2.4	Einfluss von IL17 auf den Transkriptionsfaktor NF ^o B-mRNA-Gehalt in chondrogenen Vorläuferzellen..	50
4.3	Immunfluoreszenz-Nachweis von IL6 und MMP3 in chondrogenen Vorläuferzellen..	52
4.4	Western-Blot-Nachweis von den Proteinen IL6 und MMP3 in chondrogenen Vorläuferzellen	55
4.4.1	Nachweis von MMP3 Proteinen auch nach der IL17-Stimulation mit dem Western Blot.	56
4.5	Hemmung des IL17-Effekts auf die IL6-mRNA-Synthese chondrogener Vorläuferzellen durch IL17-Antikörper	58
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
5	<u>Diskussion</u>	61
5.1	Einfluss von IL17 auf die Zellproliferation von chondrogenen Vorläuferzellen	61
5.2	Einfluss der chondrogenen Vorläuferzellen auf inflammatorische Prozesse in der rheumatoiden Arthritis	62
5.3	Einfluss von IL17 auf die Synthese von IL6 in chondrogenen Vorläuferzellen	63
5.4	Einfluss von IL17 auf die Synthese von MMP3 in chondrogenen Vorläuferzellen	65
5.5	Einfluss von IL17 auf die Synthese von membranständigen Matrix-Metalloproteinasen in chondrogenen Vorläuferzellen	67
5.6	Beteiligung von NF^o B im Signaltransduktionsweg von IL17	69
5.7	IL17-Antikörper blocken die IL6 induzierende Wirkung von IL17 auf chondrogene Vorläuferzellen	70
5.8	Klinische Relevanz	72
6	<u>Zusammenfassung</u>	74
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	75

1 Einleitung

1.1 Einführung in die rheumatoide Arthritis und deren Pathogenese

Die rheumatoide Arthritis ist die wohl häufigste chronisch entzündliche Gelenkserkrankung, deren progredienter Verlauf, vom Synovialgewebe ausgehend, zu Knorpel- und Knochenzerstörung führt. Fehlgesteuerte Immunzellen produzieren in unphysiologischer Weise entzündungsfördernde Botenstoffe, Zytokine, die über membranständige Rezeptoren krankheitsfördernde Entzündungsprozesse vorantreiben. Diese Zytokine bedingen die Umwandlung der Gelenksschleimhaut (Synovia) in ein geschwulstartiges Gewebe, den sogenannten Pannus, der wiederum die Gelenkszerstörung vorantreibt. Unter den fehlgeleiteten Zellen finden sich hauptsächlich Lymphozyten der spezifischen Immunantwort, wie B-Lymphozyten und T-Lymphozyten.

Die rheumatoide Arthritis tritt mit einer Häufigkeit von 0,5%-1% in der westeuropäischen Bevölkerung auf und wird in den meisten Fällen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr klinisch manifest (Symmons 2002). Sie ist damit die häufigste entzündliche Gelenkserkrankung der Welt. Im Zuge des Fortschreitens der Erkrankung kommt es zu erheblichen Funktionseinschränkungen der betroffenen Gelenke im alltäglichen Leben (Young et al. 2000). Die Mortalität der rheumatoiden Arthritis steigt nach 10jähriger Erkrankungsdauer im Vergleich zur nicht erkrankten Bevölkerung in Abhängigkeit der Erkrankungsaktivität an (Radovits et al. 2010).

Die Ursachen der rheumatoiden Arthritis bleiben zum Teil noch ungeklärt. Hinweise für genetische Ursachen sowie für ursächliche Umwelteinflüsse konnten bereits gefunden werden. So wird bei positiver Familienanamnese von einem 5-10fach erhöhtem Erkrankungsrisiko ausgegangen (Hemminki et al. 2009). Zwillingsstudien zeigten einen Einfluss der genetischen Risikofaktoren auf die Erkrankung von mehr als 50% (MacGregor et al. 2000). Führend als genetischer Risikofaktor gilt das HLA-DRB1-Allel des HLA-Komplexes „*human leucocyte antigen*“ (Balsa et al. 2010). Diese Komplexe, die auch unter dem Namen MHC II („*major histocompatibility complex II*“) bekannt sind, spielen eine zentrale Rolle in der Eigenerkennung des Immunsystems und präsentieren z.B. zelleigene Proteine auf der Zelloberfläche für Immunzellen der spezifischen Immunabwehr. Die Suche nach weiteren genetischen Faktoren für die Entstehung der rheumatoiden Arthritis z.B. in Form von Untersuchungen von Genpolymorphismen sind Gegenstand aktueller Forschung (Dorr et al. 2004; Orozco et al. 2010; van der Helm-van Mil et al. 2010). Neben den genetischen Risikofaktoren scheinen aber auch Umwelteinflüsse das Risiko für das Entstehen

der rheumatoiden Arthritis zu erhöhen. Dies wurde z.B. für das Zigarettenrauchen und den Alkoholkonsum bereits belegt (Liao et al. 2009).

Die klinischen Symptome der rheumatoiden Arthritis sind vielschichtig und äußern sich z.B. in entzündlich geschwollenen und schmerzenden Gelenken. Typischerweise beginnen die Symptome bevorzugt an den Grund- und Mittelgelenken der Finger, aber auch Fuß-, Knie-, Hüft- und Schultergelenke können beteiligt sein. Die rheumatoide Arthritis zeichnet sich neben der Polyarthritis (mehr als 3 betroffene Gelenke) vor allem durch das symmetrische Befallsmuster der erkrankten Gelenke aus (Bukhari et al. 2002). Neben der Symmetrie des Gelenksbefalls wird zudem das Symptom der Morgensteifigkeit bei einer Dauer von über 60 min als typisch für die rheumatoide Arthritis angesehen (Visser et al. 2002; van der Helm-van Mil et al. 2008). Diese Steifigkeit der Gelenke in den Morgenstunden lässt sich im Vergleich zur Arthrose nicht nach längeren Ruhepausen - im Sinne eines Anlaufschmerzes - reproduzieren.

Um die Diagnose zu objektivieren und vergleichbarer auch im Rahmen von klinischen Studien zu gestalten, wurden vom „*American College of Rheumatology*“ (ACR) und der „*European League Against Rheumatism*“ (EULAR) 2010 erneut Klassifikationskriterien zur Diagnosestellung festgelegt (Agarwal et al. 2008; Aletaha et al. 2010). In diese Klassifikationskriterien gehen Größe und Zahl der betroffenen Gelenke, serologische Marker wie der Rheumafaktor (RF) und Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPA), Blutsenkung (BSG) sowie C-reaktives Protein (CRP) und auch Dauer der Symptome ein.

Die Therapie der rheumatoiden Arthritis zielt auf die Verhinderung der Progression der Erkrankung ab und wird nun folgend auf Basis der EULAR-Empfehlungen erläutert (Smolen et al. 2010). In der medikamentösen Behandlung werden nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAR) und Glukokortikoide eingesetzt. Als sogenannte Basistherapeutika der rheumatoiden Arthritis gelten „*disease-modifying anti-rheumatic drugs*“ (DMARDs) mit dem am häufigsten eingesetzten Folsäureanalogon Methotrexat sowie den weiteren Wirkstoffen Sulfasalazin, Chloroquin, Leflunomid, Cyclosporin und Azathioprin (Smolen et al. 2010).

Als neue medikamentöse Gruppe gelten Wirkstoffe, die unter dem Namen Biologicals zusammengefasst werden. Sie wirken als Antikörper gegen spezifische Antigene, die in Form von Interleukinen oder deren Rezeptoren vorliegen. Zu diesen Antigenen zählen: Tumornekrosefaktor alpha (TNF \pm), Interleukin-1-(IL1)-Rezeptor und Interleukin-6-(IL6)-Rezeptor (Smolen et al. 2007). Trotz guter Therapieerfolge mit den neuen Anti-TNF \pm -Therapeutika wie Etanercept, Infliximab oder Adalimumab kommt es dennoch häufig zu

Therapieabbrüchen. Diese sind laut Du Pan zu über 50% auf ein Nichtansprechen der Therapie zurückzuführen (Du Pan et al. 2009). Darum ist es weiterhin notwendig, nach weiteren Therapiekonzepten zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis zu suchen.

Die pathologischen Grundlagen der Gelenksdestruktion in der rheumatoiden Arthritis beruhen auf Knorpeldegradierung sowie Knochenabbau, die durch das chronisch entzündliche Milieu in den betroffenen Gelenken vorangetrieben werden. Es wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass fibroblastenähnliche Synovialzellen (FLS) und synoviale Makrophagen (MP) das Fortschreiten der Entzündung vornehmlich durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie: $\text{TNF}\pm$, IL1, IL6 und durch die Synthese von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) unterstützen (Tchetverikov et al. 2003; Karouzakis et al. 2006). Eine entscheidende Rolle in diesem immunologischen Entzündungsablauf spielen die aus dem Thymus stammenden T-Lymphozyten. T-Lymphozyten sind vorzugweise an der spezifischen Immunantwort des Körpers beteiligt. Unter diesen T-Lymphozyten sind solche mit dem membranständigen Rezeptor CD4, die auch T-Helferzellen genannt werden, besonders hervorzuheben, da sie durch die Produktion von Zytokinen die Immunantwort des Körpers in der rheumatoiden Arthritis modulieren. Es konnte gezeigt werden, dass CD4 positive T-Lymphozyten (CD4^+ T-Zellen) durch von Synovialzellen produzierte Interleukine angelockt werden und sich daraufhin im rheumatoiden Synovialgewebe anlagern (Franz et al. 1998; Blaschke et al. 2003a). Es wird weiter vermutet, dass einer bestimmten Unterpopulation dieser CD4^+ T-Zellen eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung im rheumatischen Formenkreis durch Produktion von Interleukin 17 (IL17) zukommt (Park et al. 2005; Toh and Miossec 2007; van Hamburg et al. 2010). Die besondere Rolle dieser T-Lymphozytenreihe wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

1.2 Th17-Zellen und deren Rolle in der rheumatoiden Arthritis

T-Lymphozyten sind wichtige Zellen zur Regulation von Immunantworten und werden auch T-Helferzellen genannt. Durch Produktion spezieller Zytokine wirken sie auf ebenfalls an der Immunantwort beteiligte Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten ein. Schon länger bekannt sind zwei Subgruppen dieser CD4^+ T-Zellen: Die Gruppe der T-Helferzellen Typ 1 (Th1-Zellen), die Interferon γ ($\text{INF}\gamma$) produzieren und dadurch die zelluläre Immunität vorantreiben sowie die Gruppe der T-Helferzellen Typ 2 (Th2-Zellen), die Interleukin 4 (IL4), Interleukin 5 (IL5) und Interleukin 13 (IL13) produzieren und die

humorale Abwehr verstärken (Dong and Flavell 2000). Es zeigte sich weiter, dass es CD4+ Zellen gibt, die sich dadurch auszeichnen, dass sie kein INF³ und kein IL4, dafür aber IL17 produzieren. Diese Helferzellen wurden daher Th17-Zellen genannt (Park et al. 2005; Pene et al. 2008). Ein Zusammenhang dieser neuen Th17-Zellen mit Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis wird vermutet, da in der Synovialflüssigkeit dieser Patienten eine gehäufte Konzentration von Th17-Zellen und deren Zytokin IL17 zu beobachten war (Blaschke et al. 2003b; Shahrara et al. 2008; Moran et al. 2009). Dass diese hoch differenzierten Th17 Lymphozyten in chronisch entzündliches Gewebe von Patienten mit Psoriasis, Morbus Crohn, Asthma und rheumatoider Arthritis infiltrieren, unterstreicht zudem deren Beteiligung an Autoimmunprozessen (Pene et al. 2008). Im Mausmodell der rheumatoiden Arthritis, der „collagen induced arthritis“ (CIA), konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen durch eine Überexpression von IL17 die rheumatoide Arthritis deutlich stärker induzieren als die bislang verwendeten Th1-Zellen. Weiter führte eine Überexpression von IL17 im Mausmodell zu einer Exazerbation der rheumatoiden Arthritis (Lubberts 2008). Dies steht im Einklang mit neusten Erkenntnissen der Forschung, die zeigen konnten, dass Th17-Zellen deutlich potenter die Expression von MMPs, IL6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen induzieren als Th1-Zellen (van Hamburg et al. 2010). Es wird davon ausgegangen, dass Th1- und Th17-Zellen im Gleichgewicht zueinander stehen, und dass das jeweilige Milieu z.B. im entzündeten Gelenk für die jeweilige Differenzierung verantwortlich ist (Annunziato et al. 2008; Lubberts 2010). In diesem Zusammenhang stellte sich heraus, dass sich Th17-Zellen durch IL6 vermehrt differenzieren lassen (Kimura and Kishimoto 2010). Eben dieses Zytokin IL6 wird wiederum von Th17-Zellen über deren Zytokin IL17 induziert (van Hamburg et al. 2010). Den Th17-Zellen und deren Differenzierungsprozessen scheint daher eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen in der rheumatoiden Arthritis zuzukommen und sie stellen so ein vielversprechendes Ziel für neue Therapiekonzepte in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis dar (Lubberts 2008; Sarkar and Fox 2010; Steward-Tharp et al. 2010). Die Effekte der Th17-Zellen über deren Zytokin IL17 werden folgend näher vorgestellt.

1.3 Interleukin 17 und seine Rolle in der rheumatoiden Arthritis

IL17 ist ein inflammatorisches Zytokin, das als spezielles Transkript von aktivierten T-Zellen unter dem alten Namen CTLA-8 erstmals 1993 beschrieben wurde (Rouvier et al. 1993). Daraufhin wurden im Laufe der Zeit sechs menschliche Isoformen von IL17 (IL17A-F)

entdeckt (Aggarwal and Gurney 2002). Von diesen Isoformen teilen IL17A und IL17F die meisten Gemeinsamkeiten in ihrem molekularen Aufbau (Kolls and Lindén 2004). IL17 erhöht die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL6 und IL8 sowie von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Fossiez et al. 1996; Chabaud et al. 2000; Hwang et al. 2004) und stimuliert die Angiogenese im Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Ryu et al. 2006). Auch wird die Knorpeldegradation und Knochenresorption von Patienten mit rheumatoider Arthritis durch IL17 unterstützt (Kotake et al. 1999; Koshy et al. 2002) und die Synthese von Proteoglykanen und Kollagen im Chondrozyten durch IL17 gestört (Lubberts et al. 2000; Cai et al. 2001b; Pacquelet et al. 2002). Der Einfluss von IL17 auf das Gleichgewicht der MMPs und auf deren Inhibitoren, die „*tissue inhibitors of metalloproteases*“ (TIMPs), scheint ebenfalls dazu beizutragen, dass Knorpel in der rheumatoiden Arthritis zugrunde geht. So konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der Matrix-Metalloproteinasen MMP3, MMP8 und MMP9, welche als Marker für fortschreitende Gelenkszerstörung in der frühen rheumatoiden Arthritis gelten, in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis vermehrt vorzufinden waren (Yoshihara et al. 2000; Tchertverikov et al. 2003; Mamehara et al. 2010; Houseman et al. 2012). Es gibt Anhaltspunkte, dass an der Signalwirkung von IL17 auf die von ihm stimulierten Zellen der Transkriptionsfaktor „*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“ (NF κ B) beteiligt ist (Shalom-Barak et al. 1998; Georganas et al. 2000). Die genaue Wirkung von IL17 auf den Chondrozytenmetabolismus und die daraus resultierenden Veränderungen in der Knorpelmatrix sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung.

IL17-Isoformen wirken über einen membranständigen IL17-Rezeptor, der von Yao 1995 zum ersten Mal beschrieben wurde und von dem nun insgesamt 5 Isoformen (IL17RA-RE) bekannt sind (Yao et al. 1995; Kolls and Lindén 2004). Für die rheumatoide Arthritis sind insbesondere die beiden Rezeptoren IL17RA und IL17RC von Interesse, denn es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Rezeptoren, IL17RA und IL17RC, im Blut von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten vermehrt vorliegen (Zrioual et al. 2008). Ein Verlust der IL17RC-Rezeptoren führt dazu, dass neutrophile Granulozyten nicht mehr von Th17-Zellen über IL17 aktiviert werden können (Pelletier et al. 2010). Zudem sind diese beiden Rezeptoren IL17RA und IL17RC für die IL17-Stimulation von Synoviozyten zur Sekretion von IL6 notwendig (Zrioual et al. 2008). Wright fand an bronchialen Epithelzellen heraus, dass die IL17-Isoformen IL17A und IL17F über einen Rezeptorkomplex aus IL17RA und IL17RC wirken (Wright et al. 2008). Es ist somit anzunehmen, dass IL17 in vivo als

Heterodimer aus zwei seiner Isoformen über spezielle Rezeptorkomplexe wirkt. Die Wirkung von IL17 auf chondrogene Vorläuferzellen ist Gegenstand dieser Arbeit. Dass IL17 einen Einfluss auf eben diese chondrogenen Vorläuferzellen ausübt, wird vermutet, da diese Zellen die beiden IL17-Rezeptoren IL17RA und IL17RC exprimieren. Auf die vor kurzem entdeckten chondrogenen Vorläuferzellen und deren IL17-vermittelte Rolle in der rheumatoiden Arthritis soll folgend eingegangen werden.

1.4 Chondrogene Vorläuferzellen und deren Rolle in der rheumatoiden Arthritis

Seit langem bestand in der Forschung Übereinkunft darin, dass der adulte menschliche Knorpel nur aus bereits ausdifferenzierten Knorpelzellen bestehe und damit kein eigenes Regenerationspotential besitze. Dieses Konzept wurde jedoch in den letzten Jahren durch die Hypothese, dass Vorläuferpopulationen in der Oberfläche des Knorpels existieren, in Zweifel gezogen. So konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen mesenchymale oder chondrogene Vorläufer- bzw. Progenitorzellen in der Oberflächennzone von gesundem und krankem Knorpel nachweisen (Alsalameh et al. 2004; Dowthwaite 2004; Grogan et al. 2009; Koelling et al. 2009). Dies geschah über bestimmte Zellmarker wie Notch-1, Stro-1 und „*vascular cell adhesion molecule*“ (VCAM) und über typische Oberflächenmarker „*cluster of differentiation*“ (CD) wie CD29, CD44, CD73 und CD90, die als typisch für Stammzellen gelten (Koelling et al. 2009).

Aus Knorpelgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten nun ebenfalls chondrogene Vorläuferzellen mit Stammzellcharakter isoliert und charakterisiert werden. Diese Zellen ähneln sehr stark den bereits für die Osteoarthrose (Arthrose) entdeckten chondrogenen Vorläuferzellen, die auch „*chondrogenic progenitor cells*“ (CPCs) genannt werden (Koelling et al. 2009). Sie weisen die oben genannten Oberflächenmarker CDs auf, die typisch für chondrogene Stammzellen sind. Zudem ließen sich diese Zellen in Chondrozyten, Adipozyten und Osteozyten differenzieren, was ebenfalls ihren Stammzellcharakter unterstreicht. Chondrogene Vorläuferzellen migrieren in defektes Knorpelgewebe und sind in der Lage Knorpelmatrixproteine zu produzieren, daher wird vermutet, dass diesen Zellen eine besondere Rolle in der Knorpelregeneration zukommen könnte (Koelling and Miosge 2009).

Da auf chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis die IL17-Rezeptoren IL17RA und IL17RC nachgewiesen werden konnten, ist zu vermuten, dass IL17 über eben diese Rezeptoren eine Wirkung auf chondrogene Vorläuferzellen ausüben könnte.

So soll der Einfluss des im rheumatisch erkrankten Knie herrschenden Milieus auf die chondrogenen Vorläuferzellen untersucht werden. Dies wird durch die Stimulation der chondrogenen Vorläuferzellen durch das von TH17-Zellen produzierte IL17 simuliert. Wie die Reaktion dieser chondrogenen Vorläuferzellen auf die IL17-Stimulation ausfällt, ist noch unklar und soll mit dieser Arbeit erstmalig mittels bekannter Verfahren wie: quantitativer Real-Time-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz durch den Vergleich von stimulierten und nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen untersucht werden.

Ob chondrogene Vorläuferzellen proinflammatorische Zytokine wie IL6, IL1 und TNF \pm produzieren, soll in dieser Arbeit zunächst herausgefunden werden, um im Anschluss daran den Einfluss der IL17-Stimulation auf die chondrogenen Vorläuferzellen im Bezug auf ihre IL6-, IL1- und TNF \pm -Synthese zu untersuchen.

Es wird angenommen, dass die Synthese dieser Botenstoffe durch die Stimulation mit IL17 ansteigt, da bereits für Chondrozyten und Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden konnte, dass IL17 die Expression von IL6, IL8, IL1, TNF \pm in diesen Zellen erhöht (Shalom-Barak et al. 1998; Georganas et al. 2000; Hwang et al. 2004; Agarwal et al. 2008). Weiter soll die Expression bestimmter MMPs in den chondrogenen Vorläuferzellen untersucht werden. Dazu soll die Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3), die in der rheumatoiden Arthritis auch als prognostischer Marker gehäuft anzutreffen ist (Yoshihara et al. 2000; Mamehara et al. 2010; Bakker et al. 2012; Houseman et al. 2012), in den chondrogenen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Weiter soll dann ebenfalls die Wirkung der IL17-Stimulation auf die MMP3-Synthese untersucht werden. Auch hier konnte bereits für Chondrozyten und Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden, dass IL17 die Synthese der MMP3 erhöht (Shalom-Barak et al. 1998; Cai et al. 2001b; Koshy et al. 2002; Agarwal et al. 2010).

Für chondrogene Vorläuferzellen von Patienten mit Osteoarthritis konnte gezeigt werden, dass sie ein ausgeprägtes Migrationsvermögen besitzen (Koelling et al. 2009). Membranständige Matrix-Metalloproteinasen (MT-MMPs) könnten für diese Migrationsfähigkeit eine Erklärung bieten. Sie werden in der rheumatoiden Arthritis mit der Invasivität von Fibroblasten in die Synovia in Zusammenhang gebracht (Rutkauskaite et al. 2005; Miller et al. 2009). Für dendritische Zellen konnte zudem bereits gezeigt werden, dass MMP14 (MT-MMP1) an den Migrationsprozessen beteiligt ist (Yang et al. 2006). Es wäre interessant zu sehen, ob chondrogene Vorläuferzellen Mitglieder eben dieser membranständigen Matrix-Metalloproteinasen synthetisieren. Dies soll für die membranständigen Matrix-Metalloproteinasen MMP14, MMP15, und MMP17 untersucht

werden. So könnten eben diese membranständigen Matrix-Metalloproteinasen den Migrationscharakter der chondrogenen Vorläuferzellen erklären. Ob IL17 einen Einfluss auf die Synthese dieser membranständigen Matrix-Metalloproteinasen besitzt bleibt abzuwarten.

Ein neues Therapiekonzept in der rheumatoiden Arthritis, in dem mit IL17 Antikörpern versucht wird die IL17-Wirkung in der rheumatoiden Arthritis zu blocken, befindet sich aktuell in der ersten Phase klinischer Studien und gilt als vielversprechendes neues Ziel in der Rheumatoiden-Arthritis-Therapie (Genovese et al. 2010).

Ob sich die untersuchten IL17-Effekte auf die chondrogenen Vorläuferzellen durch IL17 Antikörper blocken ließen, soll in dieser Arbeit abschließend untersucht werden. So könnte zum einen gezeigt werden, dass der Effekt auf die chondrogenen Vorläuferzellen allein vom eingesetzten IL17 ausgeht und zum anderen würde das zuvor erwähnte Therapiekonzept als mögliche Alternative in der Therapie der rheumatoiden Arthritis weiter unterstützt.

Die so gewonnenen neuen Erkenntnisse über das Verhalten chondrogener Vorläuferzellen in IL17-reichem Milieu könnten zudem neue Strategien in der Bekämpfung der rheumatoiden Arthritis aufzeigen. In zukünftigen Untersuchungen könnten dann Th17-Zellen isoliert und in Co-Kultur mit den chondrogenen Vorläuferzellen gehalten werden, um den genauen Einfluss dieser Zellen auf die chondrogenen Vorläuferzellen zu untersuchen. Dazu könnte diese Arbeit Anhaltspunkte liefern, um die Wirkung der IL17-Stimulation genauer einzuschätzen zu können.

2 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist, ein besseres Verständnis der IL17-Wirkung auf chondrogene Vorläuferzellen zu erhalten, um deren Funktion in der rheumatoiden Arthritis genauer zu erfassen. Dazu soll das Proliferationsverhalten und die Syntheseaktivität der chondrogenen Vorläuferzellen unter normal und unter IL17-Stimulations-Bedingungen untersucht werden. Es wird vermutet, dass IL17 in chondrogenen Vorläuferzellen Einfluss auf die mRNA-Synthese von inflammatorischen Zytokinen wie IL6, sowie auf die MMPs (MMP3, MMP14, MMP15, MMP17) besitzt. Zudem soll die Synthese des Transkriptionsfaktors NFkB untersucht werden, um einen möglichen Zusammenhang von NFkB als Transkriptionsfaktor für die IL6-Synthese zu zeigen. Dazu sollen IL6, NFkB, MMP3, MMP14, MMP15, MMP17 zunächst in den Zellen nachgewiesen werden und anschließend der Einfluss der IL17-Stimulation auf deren Synthese untersucht werden. Dann sollen die Proteine MMP3 und IL6 in den chondrogenen Vorläuferzellen nachgewiesen werden, um eine Translation aus der zuvor bestimmten mRNA exemplarisch zu bestätigen. Zuletzt soll dann versucht werden, die IL17-Wirkung durch einen IL17-Antikörper zu blocken.

Zur Untersuchung des Teilungsverhaltens soll die Zellzahlentwicklung, der in Kultur gehaltenen chondrogenen Vorläuferzellen, mit und ohne Zusatz von IL17-Stimulations-Medium gemessen und verglichen werden. Weiter soll durch Zeit- und Konzentrationsreihen die optimale IL17-Konzentration für die Stimulationsversuche ermittelt werden. Dann sollen die Entzündungsmediatoren IL6, MMP3, MMP15, MMP14, MMP17, NFkB, TIMP3, MAPK1, ADAMTS-5, Aggrecan, IL1 und TNF \pm mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) in den chondrogenen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Weiterhin sollen dann in IL17-Stimulationsversuchen an chondrogenen Vorläuferzellen die Änderungen in der mRNA-Syntheserate eben dieser Entzündungsmediatoren verglichen werden. Dies soll ebenfalls mit dem Verfahren der qRT-PCR untersucht werden. Zur Bestätigung der Syntheseergebnisse sollen die Proteine MMP3 und IL6 durch Western Blot und durch Immunfluoreszenz in den chondrogenen Vorläuferzellen auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, um die Translation der mRNA-Sequenzen zu bestätigen. Zum Schluss soll ergänzend gezeigt werden, dass sich der IL17-Effekt auf die IL6-Synthese mit einem IL17-Antikörper hemmen lässt. Dies soll ebenfalls mit Hilfe der qRT-PCR im Vergleich von stimulierten und nicht stimulierten zu mit IL17-Antikörper geblockten stimulierten Kulturen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Wichtige Geräte

Tab.1 *Verwendete Geräte.*

Name	Hersteller
PCR Cycler	Mastercycler Realplex ² S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zellbank	Herasafe (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)
Röntgenkassette	Philips AMPLi 2 azuray (Philips, Amsterdam, Niederlande)
Western-Blot-Film	Amersham Hypergilm TM ECL (Amersham Biosciences, Amersham, UK)
Biophotometers	Nanodrop (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zellometer	Nexcelom Biosciences, Lawrence, USA
Nassblotkammer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge groß	Eppendorf Centrifuge 5810 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge klein	Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
UV-Licht Mikroskop	Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tab.2: *Verwendete Puffer und Lösungen.*

Eingesetzt:	Name:	Zusammensetzung:
Western Blot	SDS-Probenpuffer	0,3M Tris 9 % SDS 22,5% Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau

Western Blot	Polyacrylamid-Trenngel	1,4ml 1,5 M Trispuffer 55µl 10% SDS 5µl TEMED 2,78ml Acrylamid 1,62ml H ₂ O 0,25ml 10% Ammonium- peroxodisulfat
Western Blot	Polyacrylamid-Sammelgel	0,625ml 1,5 M Trispuffer 25µl 10% SDS 2,5µl TEMED 0,4ml Acrylamid 1,35ml H ₂ O 0,1ml 10% Ammonium peroxodisulfat
Western Blot	Laufpuffer 5 fach	0,25 M Tris 30,3 g 1,9 M Glycine 142,6 g 10% SDS 50ml pH 8,7 ad 1000 ml mit H ₂ O
Western Blot	Laufpuffer 1fach	Laufpuffer 5fach 1:5 verdünnt
Western Blot	Transferpuffer	25 mM Tris 6.05g 192 mM Glycine 28.8g 20% Methanol 400ml mit H ₂ O auf 2000ml auffüllen pH 8,3
Western Blot	Coomassie-brilliant-blue- Farblösung	0,1% Coomassie brilliant blue R 0,1g 50% Methanol 50 ml 7% Essigsäure 7ml ad auf 100 ml mit H ₂ O
Western Blot	Entfärber 1	50 % Methanol 50 ml 7 % Essigsäure 7 ml

		ad auf 100 ml mit H ₂ O
Western Blot	Entfärber 2	90 % Methanol 90 ml 10 % Essigsäure 10ml
Western Blot	Blocklösung	5% Milchpulver in TBS-T
Western Blot	TBS-T 10fach	200 mM Tris 24,2 g 1,5 M NaCl 87,6 g pH 7,4 mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Western Blot	TBS-T	TBS-T 100 ml 10xTBS 0,05 % Tween 20 0,5 g mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen

3.1.3 Antikörper

Tab.3: Verwendete Antikörper.

Eingesetzt:	Produktname:	Hersteller:
Western Blot Immunfluoreszenz	MMP3 antibody [4B7.3] Maus monoclonal	Abcam, Cambridge, UK (ab38907)
Western Blot Immunfluoreszenz	IL6 antibody Maus monoclonal	Abcam, Cambridge, UK (ab66231)
Western Blot Immunfluoreszenz	IgG Anti mouse polyclonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (A9917)
IL17-Stimulation	Recombinatn human IL-17A/F Heterodimer	R&D Systems, Minneapolis, USA (5194-IL)
IL17-Stimulations - Inhibitionsversuch	Anti-human IL-17 Antibody monoclonal	R&D Systems, Minneapolis, USA (MAB317)
Immunfluoreszenz	+Fluorescein-Labeld Affinity Purified Antibody To Mouse IgG+IgM (H+L)	KPL, Gaithersburg, USA (Catalog No. 02-18-09)

3.1.4 Medien

Tab.4: Verwendete Medien.

DMEM-Medium		DMEM + 20% FCS + Penicillin/Streptomycin
-------------	--	---

3.1.5 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Tab.5: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien.

Produktname	Hersteller
Syber-Green	Invitrogen, Carlsberg, USA # 11733-046
PBS	Sigma, Kawaskai, Japan (4417-100TAB)
DMEM	Gibco, Carlsberg, USA (Art. 21885)
TEMED	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. 2367.3)
Methanol	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. 4627.2)
Ethanol	Fura AppliChem, Darmstadt, Deutschland (EC-No: 2005786)
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, (71999)
Tris	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. 5429.3)
Glyzine	AppliChem, Darmstadt, Deutschland (A3707,1000)
10% Ammonium peroxodisulfat	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. At9592.2)
Acrylamid	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. 3029.2)
Bromphenolblau	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. T116.1)
10 % Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland A0662,1000)
5% Milchpulver	Roth, Hohenstein Emstthal, Deutschland (Art. T145.2)
ETC™Plus System	GE Healthcare Chalfont st. Giles, UK (RPN2132)
Kulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24 Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

25% HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland (A0658,1000)
bovines Serumalbumin	Sigma, Kawaskai, Japan (A9647-100G)
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland, (79216)
² -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (63689)
RNA Shredder Säule	Qiagen, Hilden, Deutschland (1011711)
RNAeasy Mini Säule	Qiagen, Hilden, Deutschland, (1011708)
RW1-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland, (1015763)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland, (205313)
genomic DNA Wipeout Buffer	aus QuantiTect Reverse Transcription Kit
Reverse Transkriptase	aus QuantiTect Reverse Transcription Kit
Primer Mix	aus QuantiTect Reverse Transcription Kit
HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland (A0658,1000)
FCS	Gibco, Carlsberg, USA (10270)
2-Mercaptoethanol	Fluka AppliChem, Darmstadt, Deutschland (63689)
PageRuler™	Fermentas (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) #SM0661
Proteinleiter Western Blot	Fermentas (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) (#SM0671)
Filme	Amersham Hypergilm™ECL (Amersham Biosciences, Amersham, UK)

3.2 Methoden

3.2.1 Präambel

Die Doktorarbeit entstand im Rahmen des Schwerpunktprogrammes der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG (SPP 1468) „*Osteoimmunology – Immunobone*“ mit dem Titel: „*Molecular mechanisms of Th17 cell effector function on cartilage and bone matrix destruction in rheumatoid arthritis (RA) and its modulation via osteopontin*“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. S. Blaschke, Prof. Dr. med N. Miosge und PD Dr. med. A.W. Beham.

3.2.2 Gewinnung des Knorpelgewebes

Krankes Knorpelgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde im Verlauf von Knieoperationen gewonnen. Besonderer Dank hierfür geht an Dr. med. Mai. Das Knorpelgewebe wurde direkt nach Entfernung in einer 1:1 PBS/DMEM-Lösung aufgenommen und sofort weiterverarbeitet. Alle Patienten entsprachen den „*American College of Rheumatology*“-Klassifikationskriterien für die rheumatoide Arthritis (Altman et al. 1986). Alle Patienten gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben und wurden über die Ziele dieser Studie aufgeklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt (Ethikantragsnummer: 05/12/09 mit dem Titel: „Molekulare Mechanismen der T-Helfer Zellentyp 17 (TH17) vermittelten Knorpel- und Knochendestruktion“).

3.2.3 Zellisolation und Zellkultur der chondrogenen Vorläuferzellen

Aus dem kranken Knorpelgewebe wurden Knorpelchips der Größe 8-15mm³ aus dem angrenzenden Randbereich des Knorpeldefekts unter sterilen Bedingungen präpariert. Diese Chips wurden für mindestens 10 Tage im DMEM-Medium (s. Medien 3.1.4) kultiviert und auswachsende Zellen unter Standard-Zellkulturbedingungen in Kultur gehalten.

Es folgte mindestens eine Zellpassage der so gewonnenen Zellen mit wöchentlich zweimaligem Mediumwechsel und Aufteilung auf mehrere Kulturflaschen, ehe die Zellen für die Versuche herangezogen wurden. Die Zellen wuchsen je nach Versuch entweder auf 75cm³, 25cm³ oder 9cm³ großen Kulturflaschen bzw. auf 6- oder 24-Wellplatten (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5).

3.2.4 Zellgewinnung

Nach zwei bis fünf Passagen und eventueller Stimulation mit IL17 wurden die Zellen nach Absaugung des Mediums mit PBS gewaschen und mechanisch abgelöst. Die PBS-Zelllösung wurde anschließend für 10min mit 300rcf zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes in 1ml PBS resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellzahl mit Hilfe des Zellometers (s. 3.1.1 Geräte 3.1.1) bestimmt. Nach erneutem 10 minütigen Zentrifugieren und Entfernung des Überstandes wurde das nun gewonnene Zellpellet entweder direkt im Versuch verwendet oder bei -80°C bis dahin gelagert.

3.2.5 IL17-Stimulation

Die Stimulation der Zellen mit IL17 erfolgte mit dem rekombinanten menschlichen IL17A/F Heterodimer der Firma R&D Systems (Catalog Nummer: 5194-IL).

Das IL17 wurde in 4 mM HCL unter Zusatz von 0,1% bovinem Serumalbumin aufgenommen und steril filtriert. Daraus ergab sich die Konzentration der IL17-Stammlösung von 100µg/ml. Aus dieser IL17-Stammlösung wurden die Zellen mit Konzentrationen von 10ng und 50ng pro ml des DMEM-Mediums (s. Medien 3.1.4) stimuliert. Das Medium wurde in den Stimulationsversuchen jeweils nach 24h gewechselt. Zum Vergleich wurden jeweils Kontrollen ohne IL17-Stimulation (0ng/ml) unter gleichen Bedingungen parallel durchgeführt.

Zur Ermittlung der Wachstumskurve der chondrogenen Vorläuferzellen unter IL17-Einfluss wurden je 10000 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und mit 0ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml IL17 stimuliert. Nach 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h wurden die Zellen dann mechanisch abgelöst und mit dem Zellometer (s. Geräte 3.1.1) gezählt. Für die qRT-PCR (s. 3.3) und den Western Blot (s. 3.5) wurden die Zellkulturen auf 75cm³ großen Kulturflaschen gezüchtet, bis die Kulturflaschen annähernd voll gewachsen waren und wurden dann für 48h mit IL17 (0ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml) stimuliert. Dann wurden die Zellpellets gewonnen (s. 3.2.4) und entweder direkt für den Western Blot eingesetzt oder nach RNA-Isolierung (s. 3.3.3) in cDNA umgeschrieben (s. 3.3.4), um dann in der qRT-PCR eingesetzt zu werden. Auch bei diesen Versuchen wurden jeweils nicht stimulierte Kontrollreihen parallel mitgeführt.

3.2.6 IL17-Stimulationsinhibitionsversuch

Hier erfolgte die Stimulation der Zellen wie in 3.2.5 beschrieben in 25cm³ großen Kulturflaschen mit zusätzlicher Zugabe eines Anti-human-IL17-Antikörpers (s. Antikörper

3.1.3). IL17 und Antikörper inkubierten über Nacht bei 4°, um eine vollständige Bindung zu gewährleisten und wurden dann dem Zellmedium zugefügt. Hierbei wurde IL17 in der Konzentration von 10ng/ml und der IL17-Antikörper in der Konzentration von 100µg/ml eingesetzt. Als negativ Kontrollen fungierten eine nicht stimulierte Zellkultur ohne IL17-Einfluss und eine Kultur mit Zugabe der IL17-Resuspensionslösung (4mM HCL mit 0,1% BSA). Als positive Kontrolle diente eine mit 10ng/ml IL17 stimulierte Kultur. Alle Zellmedien wurden nach 24h gewechselt und die Zellpellets nach 48h gewonnen (s. 3.2.4). Dann wurde nach RNA-Isolierung (s. 3.3.3) und Umschreibung in cDNA (s. 3.3.4) eine qRT-PCR mit dem Primer IL6 durchgeführt (s. 3.3.9).

3.3 mRNA-Nachweis mit quantitativer Real-Time-PCR

3.3.1 Allgemeines zum Verfahren der quantitativen Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) dient der Amplifikation von Nukleotidsequenzen eines zu untersuchenden Zielgens. Durch die Anzahl der so kopierten Nukleotidsequenzen, kann dann auf die Transkription und Expression des Zielgens in den untersuchten Zellreihen geschlossen werden. Die qRT-PCR wird mittels einer hitzestabilen Taq-Polymerase und einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) durchgeführt. Folgende Schritte laufen in einem PCR-Zyklus hintereinander ab.

1. Denaturierung: Die DNA wird bei 95°C in Einzelstränge denaturiert.
2. Annealing: Hier lagert sich der Primer, der den Startpunkt der PCR Amplifikation darstellt, an die DNA an. Die Temperatur wurde speziell für jeden Primer zuvor untersucht und ist in der Primertabelle mit aufgelistet (s. Primertabelle 3.3.6).
3. Synthetisierung: Hier werden bei 72°C die Komplementärstränge durch die Taq-Polymerase synthetisiert. Folgend kann sich das SYBR-Green an doppelsträngige DNA anlagern und die Fluoreszenz des gebundenen SYBR-Green gemessen werden.

Diese drei Schritte werden bis zu 40-mal wiederholt, wobei sich bei jedem Zyklus der Amplifikation die DNA theoretisch verdoppelt. Die Einlagerung des SYBR-Green an DNA kann dabei durch Amplifikation sichtbar gemacht werden. Die PCR-Maschine ist für einen bestimmten Fluoreszenzschwellenwert geeicht. Der Zyklus, bei dem dieser Schwellenwert überschritten wird, gibt den ct-Wert („*threshold cycle*“) an. Aufgrund der Proportionalität der Fluoreszenz zu der eingesetzten Anzahl der DNA-Moleküle kann dann mit dem ct-Wert indirekt auf den DNA-Gehalt des Zielgens geschlossen werden. Das heißt, je höher die Menge

an DNA-Molekülen in der Probe ist, desto früher wird der Schwellenwert (ct-Wert) erreicht. Ein kleiner ct-Wert weist also auf einen hohen DNA-Gehalt in der Probe hin. Ein großer ct-Wert deutet hingegen auf wenig DNA-Gehalt in der Probe hin. Durch Vergleich dieser ct-Werte im Verhältnis zu einem ebenfalls untersuchten Housekeeping-Gen kann dann eine Verhältniszahl zwischen der Kontrolle und der stimulierten Probe mit der von Pfaffl beschriebenen Methode (Pfaffl 2001) bestimmt werden. So kann dann der mRNA-Gehalt der zu untersuchenden Zellen ermittelt und untereinander verglichen werden.

3.3.2 Vorbereitende Maßnahmen für die quantitative Real-Time-PCR

Zur Durchführung einer qRT-PCR muss aus den in Zellkultur gewonnenen Zellen zuerst die RNA isoliert und diese dann in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, ehe dann die qRT-PCR durchgeführt werden kann.

Die in der qRT-PCR eingesetzten Primer sind entweder entworfen oder der Literatur entnommen worden. Dann wurden mit jedem Primer je eine Gradienten-PCR zur Ermittlung dessen Annealing-Temperatur durchgeführt, sowie das Produkt der PCR durch Sequenzierung bestätigt. Somit konnte sichergestellt werden, dass jeder Primer bei optimalen Bedingungen eingesetzt und auch das gewünschte Produkt amplifiziert wurde.

3.3.3 RNA-Isolierung

Die in Zellkultur stimulierten bzw. nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen (s. 3.2.5) wurden als Zellpellet gewonnen (s. 3.2.4) und weiterverarbeitet. Aus diesen Zellpellets, die je ca. 500.000 Zellen beinhalten, wurde dann, wie folgend beschrieben, die RNA isoliert.

Die Zellen wurden in 350µl RLT-Puffer (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) und 3,5µl β -Mercaptoethanol (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) resuspendiert und für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde dann auf der Qiagen-Shredder-Säule (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) für 2min mit 16000UpM zentrifugiert. Dem Durchfluss wurden dann 350µl 70%iges absolutes Ethanol zugegeben. Die nun erhaltenen 700µl wurden auf eine RNAeasy-Mini-Säule (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) pipettiert, kurz zentrifugiert und der Durchfluss dann verworfen. Die RNA bindet hier an eine Silicat-Membran und lässt sich dort gebunden reinigen. Die folgenden Waschpuffer wurden mit aufsteigendem Elektrolytgehalt in die Säule pipettiert. Zuerst wurde mit 700µl RW1-Puffer (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) und dann mit 500µl RPE-Puffer (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) gewaschen.

Beide Puffer wurden aufgetragen, durchzentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Nach den Waschsritten wurden die Säulen in ein neues Sammelröhrchen gegeben und diese 1min bei 14000UpM trocken zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein Biopur 1,5-ml-Eppendorfcup überführt. Direkt auf die Membran wurde 30µl RNase-freies H₂O pipettiert und für 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dies führte dazu, dass die RNA rehydratiert wurde und somit wieder frei vorlag. Dann wurde 1min bei 14000UpM zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss enthielt nun die isolierte RNA. Die Konzentration der RNA in der so gewonnenen RNA/H₂O Lösung wurde dann mit einem Biophotometer (s. wichtige Geräte 3.1.1) spektroskopisch gemessen. Hierbei wurden die RNA-Lösung bei einer Absorption von 260 und 280nm gemessen und deren RNA-Gehalt in ng/µl bestimmt.

3.3.4 Umschreibung von RNA in cDNA

Mit Hilfe des QuantiTect-Reverse-Transcription-Kit (s. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien 3.1.5) erfolgte die cDNA-Umschreibung aus der isolierten RNA (s. 3.3.3) wie folgt. Alle folgenden Reagenzien wie Wipeout, Buffer, Primer-Mix, Reverse Transkriptase und der Transkriptionspuffer sind diesem Kit entnommen.

Zunächst wurden 200ng RNA in 2µl genomic-DANN-Wipeout-Buffer aufgenommen und auf 14µl mit DNase freiem Wasser aufgefüllt. Es folgte dann eine Inkubation bei 42°C für 2min. In diesem Schritt können die, im Wipeout-Puffer enthaltenen DNAsen die in der Probe eventuell vorhandene genomische DNA eliminieren. Danach folgte die eigentliche Umschreibung mit folgendem Mastermix:

4µl RT-Transkriptionspuffer

1µl Primer-Mix

1µl Reverse Transkriptase

Die RNA/Puffer-Lösung wurde mit diesem Mastermix für 15min bei 42°C inkubiert. Hier wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Es folgte dann eine Inkubation bei 95°C für 2min. Die hohe Temperatur inaktiviert die Reverse Transkriptase und stoppte so die Reaktion. Zum Schluss wurde mit DNase freiem Wasser auf 200µl aufgefüllt, um die gewünschte Konzentration von 1ng/µl zu erhalten. Diese so gewonnenen cDNA-Stammlösungen wurden dann bei -20°C gelagert und später für die einzelnen qRT-PCR-Versuche verwendet.

3.3.5 Primererstellung

Die Primersequenzen (siehe Primertabelle 3.3.6) für die qRT-PCR-Reihen wurden mit Hilfe der Primer3 Internetseite ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/\(2012\)](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/(2012))) hergestellt oder aus der Literatur entnommen. So wurden die Sequenzen für IL6 und den MMPs: MMP3, MMP14, MMP 17 folgenden Publikation entnommen (Konttinen et al. 1999; Goransson et al. 2005). Alle weiteren Primersequenzen wurden selbst mit Hilfe der Primer3-Shareware ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/\(2012\)](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/(2012))) entworfen. Die Primer-Sequenzen wurden dann mit Hilfe der Datenbank des NCBI „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2012)) überprüft und konnten so noch einmal mit der Zielsequenz abgeglichen werden. Bei der Herstellung der Primer wurde darauf geachtet, dass die Primer eine maximale Länge von 18-22 Basen nicht überschreiten. Zudem sollte der Gehalt an Guanin und Cytosin möglichst um 50% liegen. Um auszuschließen, dass die Primer nicht auch an Nukleotidsequenzen anderer menschlicher Gene binden, wurden sie bei der Online-Datenbank von NCBI ebenfalls abgeglichen. Die spezifischen Primersequenzen wurden von Operon Biotechnologie GmbH (Operon Biotechnologie GmbH, Köln, Deutschland) synthetisiert. Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und mit Nuklease-freiem H₂O resuspendiert. Nach Verdünnung wurden die so gebauten Primer später als Primer-PCR-Mix aus forward und reverse Primer je in der Konzentration von 10pmol/μl in der Gradienten-PCR und der qRT-PCR eingesetzt.

3.3.6 Primertabelle

Tab.6: Die Primertabelle zeigt die in den qRT-PCR eingesetzten Primersequenzen mit deren Annealing-Temperaturen und deren Quellen.

Ziel-Gen	Forward Sequenz	Reverse Sequenz	Annealing -Temp.	Quelle
IL6	CAGCCCTGAGAAAGGAGACAT	AATCTGAGGTGCCCATGCTAC	63°C	Goranson et al. 2005
MMP3	CTCACAGACCTGACTCGGTT	CACGCCTGAAGGAAGAGATG	62°C	Konttinen et al.1999
MMP14	CAACACTGCCTACGAGAGGA	GTTCTACCTTCAGCTTCTGG	63°C	Konttinen et al.1999
MMP15	TGCCGCTACTGGCTTT	CAGACTGATGGGCTTGG	62°C	Eigendesign
MMP17	GACCTGTTTGAGTGGCTGT	ACGATCTGTGGTCGCTGGT	63°C	Konttinen et al.1999
NFκB	TCAATGGCTACACAGGACC	TCCCGCTTCTTCACACACT	62°C	Eigendesign
IL1	ATCAGTACCTCACGGCTGCT	CTTCATCTTGGGCAGTCACA	60°C	Eigendesign
TNF±	TCCTTCAGACACCTCAAC	GTAGGCCCCAGTGAGTTCTG	63	Eigendesign
MAPK	CCACCCATATCTGGAGCAGT	CAGTCCTCTGAGCCCTTGTC	59	Eigendesign
TIMP3	TGCCCTTCTCTCCAATACA	CTTCCTTCCCTCCCTCACTC	63	Eigendesign
Aggrecan	ACAGCTGGGGACAT	GTGGAATGCAGAGG	60	Eigendesign
ADAMTS-5	CAGCAGTGCAACCTGACAT	CAGATTCTCCCTTTCCAC	59	Eigendesign

3.3.7 Gradienten-PCR

Um für jeden Primer seine spezifische Annealing-Temperatur herauszufinden, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die Annealing-Temperatur entspricht der Temperatur, bei der sich der Primer am besten an die cDNA anlagert. Hierfür wurden 8 verschiedene Annealing-Temperaturen pro Primer getestet. Die verwendete cDNA wurde wie in 3.3.4 aus nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen gewonnen und in der Konzentration von 1ng/μl eingesetzt. Für jede Temperatur und jeden Primer wurde je ein Ansatz von 10μl folgendermaßen pro PCR-Cup pipettiert. Der dort benutzte Primer-PCR-Mix beinhaltet den forward und reverse Primer je in der Konzentration von 10pmol/μl.

Ansatz Gradienten-PCR:

cDNA	1 μl
Primer-PCR-Mix	2 μl
SYBR-Green	5 μl
Nuklease-freies Wasser	2 μl

PCR-Protokoll

Initiale Denaturierung	3min	95°C	
Denaturierung	20sek.	95°C	
Anlagerung (Annealing)	20sek.	Variabel	45 Zyklen
Verlängerung	20sek.	72°C	
Denaturierung	20sek.	95°C	
Schmelzkurve	20sek.	von 48°C in je 0,1°C Schritten bis 95°C	
Ende	20sek.	95°C	

Die Annealing-Temperatur und somit die beste Temperatur für die Primeranlagerung jedes einzelnen Primers wurde durch Auswertung der Schmelzkurve ermittelt. Die Schmelzkurve für die beste Annealing-Temperatur sollte eingipflig sein und den höchsten Extinktionswert aufweisen. Die so bestimmten Annealing-Temperaturen sind in der oben abgebildeten Primertabelle (s. 3.3.6) aufgeführt und alle qRT-PCR-Versuche wurden mit den jeweils passenden Temperaturen durchgeführt.

3.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde durchgeführt um zu bestätigen, dass der Primer das richtige Produkt amplifiziert hat. Die Sequenzierung wurde von den Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die durch die Sequenzierung entstandenen Nukleotidsequenzen wurden an uns übermittelt und konnten dann in der NCBI-Nukleotiddatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2012)) mit der Zielsequenz verglichen werden. So wurde sichergestellt, dass das PCR-Produkt mit der Nukleotidsequenz des Zielgens übereinstimmt. Alle von uns verwendeten Primer zeigten jeweils eindeutig eine am besten geeignete Annealing-Temperatur. Zudem bestätigten die Sequenzierungsergebnisse die zu erwartende cDNA-Sequenz der jeweiligen Primerpaare. Dann erst wurden die jeweiligen Primer in den Versuchen eingesetzt.

3.3.9 Quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde nach Durchführung der oben genannten Vorbereitungen mit der in 3.3.4 gewonnenen cDNA und mit den in 3.3.6 aufgeführten Primern durchgeführt. Alle cDNA-Proben, die in der qRT-PCR miteinander verglichen wurden, durchliefen je parallel unter gleichen Bedingungen die RNA-Isolation (s. 3.3.3) und cDNA-Umschreibung (s. 3.3.4).

Als Proben dienten eine nicht stimulierte chondrogene Vorläuferzellreihe als Kontrolle, eine mit 10ng/ml IL17 und eine mit 50ng/ml IL17 stimulierte Probe. Es wurden je drei Wells einer Probe in jedem Durchlauf pipettiert und die qRT-PCR an je drei unterschiedlichen Tagen wiederholt. Die Proben wurden wie folgt aufbereitet.

Protokoll:

Für den PCR Versuch wurde für jeden Primer ein Mastermix angesetzt.

Der dort verwendete Primer-PCR-Mix beinhaltet den jeweiligen forward und reversePrimer in der Konzentration von je 10pmol/ μ l.

	Pro Well	Mastermix (10x)
Primer-PCR-Mix	2 μ l	20 μ l
SYBR-Green Mix	5 μ l	50 μ l
Nuklease-freies Wasser	2 μ l	20 μ l

Der Mastermix für jeden Primer wurde danach in eine PCR-96-Well-Platte zu jeweils 9 μ l/Well pipettiert und jedem Cup 1 μ l cDNA zugefügt. Die Cups wurden mit Optical-Flat-

Caps verschlossen und die Platte dann kurz für 10sek. zentrifugiert, damit sichergestellt wurde, dass die gesamte Flüssigkeit samt cDNA sich unten im Cup abgesetzt hat.

Die qRT-PCR wurde dann mit Hilfe eines Mastercycler Realplex² S (s. wichtige Geräte 3.1.1) und folgendem Protokoll durchgeführt:

Protokoll:

Initiale Denaturierung	3min	95°C	
Denaturierung	20sek.	95°C	
Annealing	20sek.	59,60,62,63°C	40 Zyklen
		(Primer bedingt unterschiedlich)	
Verlängerung/Messpunkt	20sek.	72°C	
Denaturierung	20sek.	95°C	
Schmelzkurve	20sek.	aufsteigend um je 0,2°C bis 95°C	

Ende

Der PCR-Zyklus wurde 40-mal wiederholt und anhand der Schmelzkurven die Primerbindung kontrolliert. Dieser Versuch wurde für jeden Patienten und jeden Primer je dreimal als Triplet aus je drei identischen Proben an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die Daten dieser Versuche wurden dann wie folgt ausgewertet.

3.3.10 Statistik

Die aus den PCR-Reihen gewonnenen ct-Werte wurden in jedem Probentriplet untereinander verglichen und wichen < 0,5 ct-Punkte in der Standardabweichung (STABW) vom jeweiligen Mittelwert des PCR-Zyklus ab. Zudem wurden die Mittelwerte der ct-Werte der drei Versuchsläufe, die je an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, errechnet und miteinander verglichen und wiesen ebenfalls eine STWAB von < 0.5 ct-Punkten auf. So konnte sichergestellt werden, dass die Intratest- und Intertest-Variationsbreite der PCR-Versuche <1% beträgt.

Die Relativierung der PCR-Daten erfolgte gegenüber einem Housekeeping-Gen nach Pfaffl (Pfaffl 2001). Diesbezüglich konnten wir für das Gen für Peptidylprolyl-Isomerase-A (PPIA) zeigen, dass gleichbehandelte cDNA aus stimulierten und nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus drei Läufen den ct-Wert von 20,23 aufwiesen und darin untereinander nur mit 0,25 ct-Punkten in der STAWB abwichen. PPIA ist aufgrund dieser Stabilität der ct-Werte als Housekeeping-Gen ausgesucht worden, da es sich unabhängig von der IL17-Stimulation zeigte und zudem in den Patientenreihen nicht variierte. Die Effizienz E der Primer wurde durch eine Standardverdünnungsreihe exemplarisch mit dem MMP15-

Primer durchgeführt. Als cDNA wurden hier stimulierte chondrogene Vorläuferzellen verwendet. So wurde eine Effizienz von $E=1,89$ ermittelt. Die erhaltenen ct-Werte des Housekeeping-Gens sowie die Effizienz der Primer ($E=1,89$) gingen so in die Relativitätsrechnung nach Pfaffl ein (Pfaffl 2001).

$$\text{relative Ratio} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta\text{ctWert}_{\text{Zielgen}}(\text{Mittelwert}_{\text{Kontrolle}} - \text{Mittelwert}_{\text{Probe}})}}{E_{\text{Housekeeping Gen}}^{\Delta\text{ctWert}_{\text{Housekeeping Gen}}(\text{Mittelwert}_{\text{Kontrolle}} - \text{Mittelwert}_{\text{Probe}})}}$$

In der Arbeit werden zumeist Versuchsergebnisse von drei unterschiedlichen Patienten mit rheumatoider Arthritis verglichen. Um Aussagen aus den qRT-PCR-Versuchen über die Expressionsveränderungen treffen zu können, müssen die Ergebnisse zu einem gleichbleibenden Referenzwert in Relation gesetzt werden. Für diesen Referenzwert zieht man das Housekeeping-Gen heran, da es sowohl in allen Versuchsreihen als auch unter Stimulation einen stabilen ct-Wert aufweist. Somit kann einem qRT-PCR-Ergebnis in Relation zum Housekeeping-Gen mit der Berechnung nach Pfaffl ein relativer Wert zugeordnet werden. Dieser wurde für die Kontrolle zumeist mit 1 als 100 gleichgesetzt. Die stimulierte Probe ist somit stets als ein Vielfaches des Kontrollwertes angegeben. Zudem geht die Effizienz des Primers mit in die Berechnungen ein, der die Qualität und Verdopplungswahrscheinlichkeit in einem PCR-Zyklus widerspiegelt. Somit können relative mRNA-Expressionen berechnet und untereinander verglichen werden.

3.4 Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz

3.4.1 Allgemeines zum Verfahren der Immunfluoreszenz an adhärennten Zellen

Die lichtmikroskopische Immunfluoreszenz an adhärennten Zellen ist ein Verfahren mit dem Proteine mit Antikörpern in Zellen nachgewiesen werden können. Nach Bindung eines für das zu untersuchende Protein passenden primären Antikörper, wird dieser mit einem zweiten sekundären Antikörper gekoppelt. Dieser sekundäre Antikörper ist mit dem Fluoreszenzsubstrat-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, welches unter UV-Licht stetig angeregt wird und so konstant Lumineszenz abgibt. Diese Lumineszenz kann dann unter einem UV-Licht-Mikroskop sichtbar gemacht und per Foto dokumentiert werden. Als Kontrolle wurden alle Zellkerne zudem mit 426-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die kleine Furche von DNA anlagert und somit DNA reichen Regionen wie den Zellkern markiert. Der Vergleich von DAPI gefärbten Zellkernen mit der Fluoreszenz, der durch Antikörperkopplung gebundenen Proteine, lässt dann Rückschlüsse auf Verteilung der Proteine in den Zellen zu. Auf diese Weise können das Proteine in den Zellen auf nachgewiesen werden.

3.4.2 Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz

Für den Versuch wurden chondrogene Vorläuferzellen von 3 Patienten mit rheumatoider Arthritis in 24-Well-Platten ausgesät. Hierzu wurden 100000 Zellen in 24ml DMEM-Medium aufgenommen, kurz zentrifugiert und je 1ml in jedes der 24 Wells gegeben. Somit wurden in jedem Well gleichmäßig ca. 4000 Zellen ausgesät. Diese hefteten sich über die nächsten Tage an die Plastikoberfläche an. Dann konnte der eigentliche Versuch durchgeführt werden.

Durchführung:

Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es folgte dann die Fixierung der Zellen mit kaltem 70% abs. Ethanol aus der -20°C Kühltruhe für 5min. In diesem Schritt wurden die Zellen zudem für die Antikörper permeabel gemacht. Es wurde erneut mit PBS gewaschen und dann der primäre Antikörper (s. Antikörper 3.1.3), in der Konzentration 1:50 in 250µl gelöst, für 60min zu den Zellen gegeben. Nach erneutem waschen mit PBS folgte dann der sekundäre Antikörper (s. Antikörper 3.1.3) in der Konzentration von 1:100, der ebenfalls 60min zu den Zellen gegeben wurde. Erneut wurde mit PBS gewaschen und die Zellen dann mit DAPI in der Konzentration von 1:1000 für 5min gegengefärbt. Nach erneutem Waschen und Zugabe von 100µl PBS konnte die Lumineszenz der Zellen unter ultraviolettem Licht mit dem Mikroskop sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Aus Vergleichen der DAPI-gefärbten Zellkerne mit den fluoreszierenden Zellen, konnte dann auf die Verteilung der Proteine in der Zellkultur geschlossen werden. So zeigt jedes fluoreszierende Zytoplasma, welches einem DAPI gefärbten Zellkern zugeordnet werden kann, dass diese Zelle das zu untersuchende Protein enthält. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder mit den DAPI gefärbten Zellkernen des gleichen Ausschnittes helfen, die Zellkerne den Zelleibern zuzuordnen.

Als negative Kontrollen wurden jeweils Proben nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert, um sicherzustellen, dass dieser sekundäre Antikörper nicht an anderen Strukturen der Probe bindet. Hier sollten sich dann fluoreszenzfreie Zellplasmen zeigen bei weiterhin mit DAPI gefärbten sichtbaren Zellkernen.

3.5 Proteinnachweis mit Western Blot

3.5.1 Allgemeines zum Verfahren Western Blot

Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Immunreaktionen von Antikörpern an dem zu untersuchenden Protein. Nach Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine durch den Nass-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit Antikörpern und einem Detektionssystem auf einem Film sichtbar gemacht. Die Elektrophorese trennt die Proteine dadurch, dass das SDS die Ladungen der Aminosäuren blockt, nach Größe der Proteine auf. So entscheidet allein die Porengröße des Elektrophorese-Gels im Verhältnis zur Proteingröße über die mögliche Laufstrecke des Proteins im Gel. Die gleichzeitig mitlaufende Proteinleiter hilft die Proteingröße zuzuordnen. Bei der Übertragung auf eine PVDF-Membran mittels Ladungsgradienten, dem sogenannten Nass-Blot, werden die Proteine per Ladung aus dem Gel auf die PVDF-Membran gezogen, auf der dann die weiteren Versuche durchgeführt werden. Die eigentliche Immunreaktion geschieht dann mit Antikörperbindung an dem Zielprotein und anschließender Konjugation mit einem zweiten Antikörper. Der erste Antikörper bindet an das antikörperspezifische Protein. Der zweite Antikörper bindet an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Dann kann mit einem Detektionssystem der zweite Antikörper sichtbar gemacht werden. Denn das Detektionssystem setzt mit dem zweiten Antikörper ein Produkt frei, welches mit einem Film in der Dunkelkammer aufgefangen und somit sichtbar gemacht werden kann. Im Vergleich zur mitgeführten geeichten Proteinleiter kann dann zudem die Größe der Proteine abgeschätzt werden.

3.5.2 Durchführung Western Blot

Für den Western Blot wurden Zellpellets wie in 3.2.4 beschrieben aufbereitet. Diese wurden in SDS-Probenpuffer (s. 3.1.2 Puffer und Lösungen) resuspendiert und 5min bei 95°C erhitzt. Der Ansatz wurde so gewählt, dass 10µl 100000 Zellen entsprachen. Aufgetragen wurde je nach Antikörper 10µl, 20µl oder 30µl dieser Probenlösung.

Für die Elektrophorese (SDS-Page) wurde ein 15% Polyacrylamid-Trenngel (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) gegossen und mit 1ml 100% absolutem Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde nach Abgießen des Ethanols das Sammelgel (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) darüber gegossen und die Taschen mittels Kamm freigelassen. Nach erneuter Polymerisation und Entfernung des Kammes war das SDS-Gel für die Elektrophorese fertiggestellt. Das Gel wurde dann in eine mit Laufpuffer (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) gefüllten Elektrophoresekammer (Eigenbau der Labortechnik des Universitätsklinikums

Göttingen) plziert und die Proben sowie eine Proteinleiter (s. Verwendete Materialien 3.1.5) in den Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20-25mA. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

Es folgte dann der sogenannte Nass-Blot in dem die Proteine per Ladungsgradienten aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden dazu in einer Blot- Kammer (s. Geräte 3.1.1) in Transferpuffer (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) bei 350mA über 90min auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mit der Farblösung Coomassie-brilliant-blue-R (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) gefärbt und dokumentiert. Nach Entfärbung mit Entfärber 1 und Entfärber 2 (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) und Waschung mit TBS-T (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) wurde die Membran für mindestens 1h bei RT mit einer Blocklösung (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) geblockt. Hierdurch wurden unspezifische Proteinbindungen mit den Milchproteinen in der Blocklösung gebunden, so dass die folgenden Antikörper nicht unspezifisch binden konnten. Es folgte dann die Immunreaktion. Dazu wurden die primären Antikörper für die Proteine MMP3 und IL6 (s. Antikörper 3.1.3) in der Blocklösung (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) und in der jeweiligen Konzentration (MMP3 1:5000 und IL6 1:500) angesetzt. Mit dieser Lösung wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Es folgte dann nach fünfmaliger TBS-T-Waschung die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Hierzu wurden der sekundäre Anti-Maus-Antikörper (s. Antikörper 3.1.3) wie die primären Antikörper in Blocklösung mit einer Konzentration von 1:40000 angesetzt. Es folgte dann die Inkubation der PVDF-Membran mit dieser Antikörperlösung für mindestens 3h bei Raumtemperatur. In diesem Schritt bindet der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper. Folgend wurde erneut mit TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Detektion mit dem ECL™-Plus-System (s. Verwendete Materialien 3.1.5). Dazu wurde Reagenz-A und Reagenz-B des ECL™-Plus-Systems im Verhältnis 50:1 gemischt und auf die Membran aufgetragen. Die Membran wurde mit dieser Lösung 5 Minuten lang inkubiert und in Folie gelegt. Durch die Zugabe der ECL™-Plus-Mischung oxidiert das an den Zweitantikörper konjugierte Enzym die in der ECL™-Plus-Lösung enthaltenen Substrate, welche daraufhin lumineszieren. Das entstandene lumineszierende Produkt färbt so den in der Röntgenfilmkassette (s. Geräte 3.1.1) auf die Membran aufgelegten Film (s. Verwendete Materialien 3.1.5). Der Film wurde dann in der Röntgenfilmkassette für 5 - 30 min belichtet und in der Dunkelkammer entwickelt. Im Vergleich mit der Proteinleiter konnte dann auf die Größe des nachgewiesenen Proteins geschlossen werden. Dazu sollte sich die Bande für MMP3 im Bereich von 59kD und die Bande für IL6 im Bereich von 26kD darstellen.

4 Ergebnisse

4.0.1 Allgemeines zu den Ergebnissen.

Untersucht wurden chondrogene Vorläuferzellen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis, jeweils im Vergleich einer nicht stimulierten Zellkultur mit einer mit 10ng/ml oder einer mit 50ng/ml IL17 stimulierten Zellkultur. Dabei wurde mit allen Zellkulturen jeweils parallel verfahren und diese anschließend auf gleiche Art und Weise ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen zum Teil direkt die gewonnenen Ergebnisse der Versuche aber auch Mittelwerte aus den drei Patientenreihen bzw. der wiederholten Versuche. Die Mittelwerte sind dann jeweils mit ihrer Standardabweichung (STABW) aufgeführt. Alle Berechnungen der Signifikanz zwischen zwei Ergebnisreihen von nicht stimulierten und mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen wurden mit dem T-Test berechnet und werden jeweils als p-Wert angegeben. Das Signifikanzniveau für die Betrachtung von Ergebnissen ist für die gesamte Doktorarbeit bei $p < 0,05$ festgelegt. Ein p -Wert $< 0,05$ zeigt somit einen als signifikant gewerteten Unterschied zwischen Probe und Kontrolle in den Ergebnisreihen an. Die qRT-PCR-Ergebnisse sind zum Teil als ct-Werte, die den PCR-Zyklus widerspiegeln, bei dem ein bestimmter Schwellenwert und damit ein bestimmter cDNA-Gehalt überschritten wurde, dargestellt. Dabei bedeutet ein kleiner ct-Wert, dass sich ein hoher mRNA-Gehalt in der Probe befunden hat, der dann schon früh im PCR-Verlauf den besagten Schwellenwert überschreitet. Des Weiteren werden die qRT-PCR-Ergebnisse auch als relative Ratio, also als Verhältnisse von nicht stimulierten Kontrollen zu mit IL17 stimulierten Proben dargestellt. Dies wurde mit Hilfe der Gleichung nach Pfaffl (s. 3.3.10) errechnet. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz und des Western Blotes sind als exemplarische Fotos der Versuchsergebnisse veranschaulicht.

4.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens chondrogener Vorläuferzellen unter IL17-Stimulationsbedingungen

Um das Wachstumsverhalten von chondrogenen Vorläuferzellen zu untersuchen wurden diese Zellen auf 6-Well-Platten bei Standardbedingungen in Kultur gehalten. Nach jeweils 24h, 48h, 72h, 96h, 120h und 144h wurden die Kulturen gestoppt und die Zellzahl mit dem Zellometer gemessen. (s. 3.2.3 und 3.2.4). Parallel zu diesem Versuch wurden zudem chondrogene Vorläuferzellen täglich mit je 10ng/ml und 50ng/ml IL17 stimuliert und ebenso verfahren (s. 3.2.5). Die Versuchsreihen sind dann an drei Zellreihen chondrogener Vorläuferzellen von drei Patienten mit rheumatoider Arthritis wiederholt und bestätigt

worden. Es werden folgend meist Mittelwerte aus diesen drei Versuchsreihen gezeigt.

4.1.1 Teilungsverhalten chondrogener Vorläuferzellen.

Nicht stimulierte chondrogene Vorläuferzellen von drei Patienten mit rheumatoider Arthritis sind, wie in 4.1 beschrieben, untersucht worden und zeigten folgendes Teilungsverhalten:

Die Zellzahl der chondrogenen Vorläuferzellen stieg im Mittel der drei Patientenreihen mit zunehmender Zeit von zu Beginn nach 24h noch 1.124+/-508 bis zum Ende nach 144h auf 40.667+/-6.643 Zellen an. Das entspricht ca. einer Vervielfältigung um den Faktor 36 im Zeitraum von 120h. Die Zunahme der Zellzahl ist im Graph der Abb.1 beschreiben. Die jeweiligen gemessenen Zellzahlen der chondrogenen Vorläuferzellen der drei Versuchsreihen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Zeit	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Mittelwerte	STABW
24h	807	1.710	855	1.124	508
48h	1.290	2.190	1.490	1.657	473
72h	3.170	3.450	2.800	3.140	326
96h	2.500	9.230	7.690	6.473	3.526
120h	13.400	13.000	16.000	14.133	1.629
144h	46.200	42.500	33.300	40.667	6.643

Die **Tab. 7** zeigt die gemessenen Zellzahlen zur jeweiligen Zeit der Zellkultur von chondrogenen Vorläuferzellen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis und dessen Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Zellzahlen der einzelnen Zellreihen steigen kontinuierlich mit der Zeit der Zellkultur an und erreichen nach 144h Zellkultur eine mittlere Zellzahl von 40.667+/-6.643 Zellen. Verglichen mit der mittleren Zellzahl nach 24h bedeutet das eine Steigerung der Zellzahl um das 36fache innerhalb von 120h.

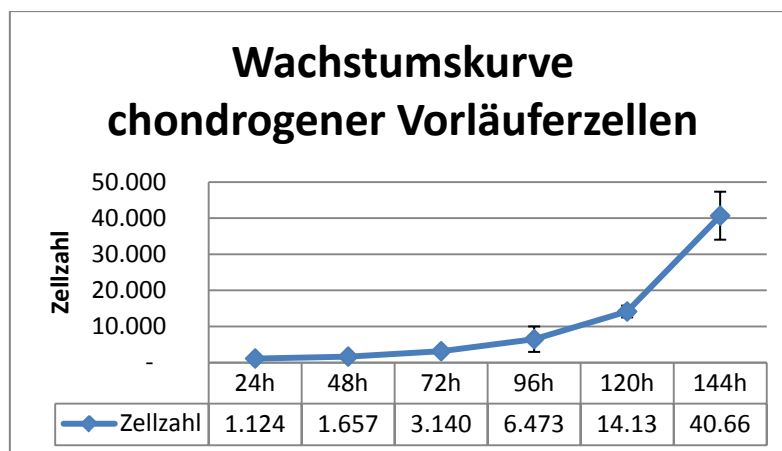


Abb.1 zeigt das Wachstumsverhalten chondrogener Vorläuferzellen als Mittelwerte aus drei Versuchsreihen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die Abb. stellt die Entwicklung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit der Zellkultur dar (Daten siehe Tab.7). Die kontinuierliche Zunahme der Zellzahl, deren Steigung kontinuierlich zunimmt, lässt auf einen exponentiellen Wachstumscharakter schließen.

Obwohl in jedem Well die gleiche Zellzahl ausgesät worden ist, hefteten sich nach 24h unterschiedlich viele Zellen jeder Patientenreihe auf der 6-Well-Platte an. Zudem hefteten sich auch im Vergleich der einzelnen Patientenreihe unterschiedlich viele Zellen an. Um diesen Faktor heraus zurechnen und um so die reine Zellvermehrung jeder Versuchsreihe miteinander vergleichen zu können, wurden im Folgenden die Zellzahlen in Relation zum jeweiligen Ausgangswert nach 24h gesetzt.

Nach Berechnung der Zellvermehrungsfaktoren erreichen die drei Versuchsreihen nach 144h im Mittel eine Zellvermehrung um den Faktor 40,35 \pm 16,24. Es zeigte sich weiter eine Zellvermehrung der chondrogenen Vorläuferzellen mit exponentiellem Charakter. Die Entwicklung der Zellvermehrung ist in Abb.2 als Mittel aus drei Versuchsreihen aufgeführt. Die Kurve veranschaulicht den exponentiellen Charakter der Zellvermehrung der chondrogenen Vorläuferzellen.

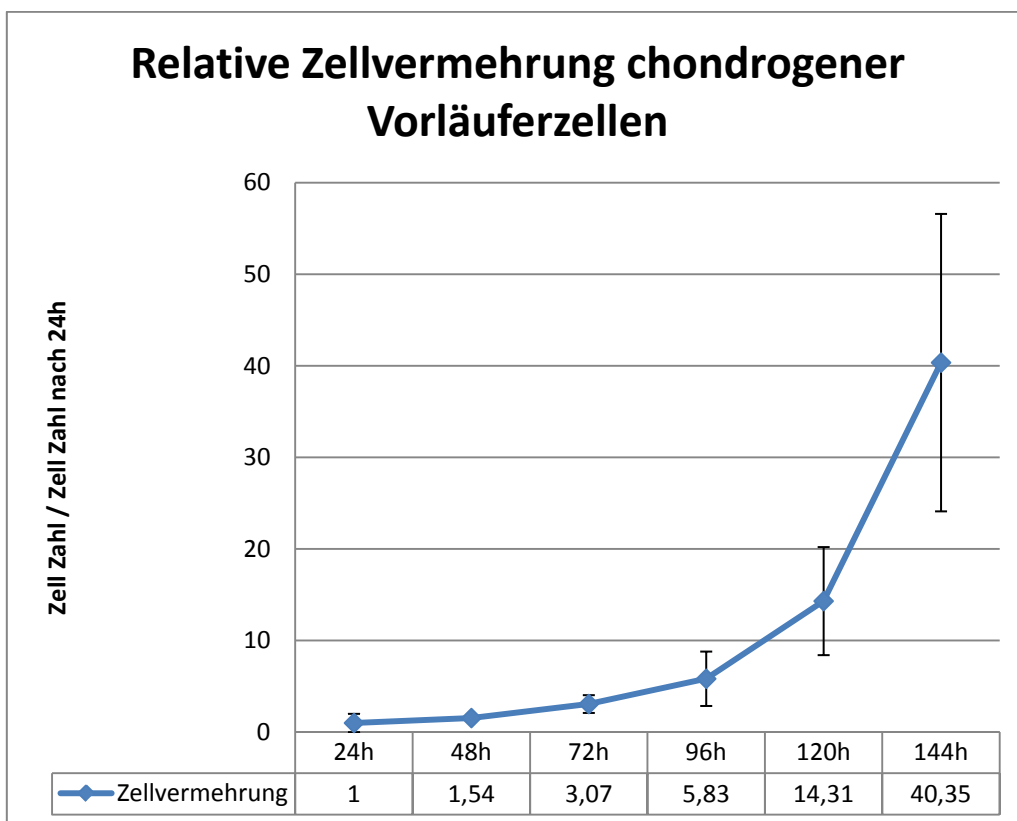


Abb.2 zeigt die Zellvermehrung der chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus drei Versuchsreihen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die Zellvermehrung ist als Quotient zum jeweiligen Wert zu Beginn der Zellkultur nach 24h dargestellt. Die Zellvermehrung steigt mit exponentiellem Charakter an und erreicht nach 144h eine Zellvermehrung um den Faktor 40,35 \pm 16,24. Die Tabelle unter dem Graphen gibt die errechneten Quotienten der Zellvermehrung wieder.

4.1.2 Teilungsverhalten chondrogener Vorläuferzellen unter IL17-Stimulationsbedingungen

Nach Untersuchung des Zellteilungsverhaltens der chondrogenen Vorläuferzellen, sollte nun untersucht werden, in wie weit die IL17-Stimulation Einfluss auf dieses Zellteilungsverhalten besitzt. Dazu wurden parallel zu den nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen zwei Zellreihen mit IL17 in den Konzentrationen 10ng/ml und 50ng/ml stimuliert und auf identische Art und Weise untersucht. Es wurden somit alle Zellreihen, stimulierte und nicht stimulierte, zur gleichen Zeit gestoppt und auf ihre Zellzahl hin ausgewertet. Das Teilungsverhalten mit IL17 stimulierter chondrogener Vorläuferzellen gestaltete sich wie folgt. Die Auswertung der Zellzahlen der Versuche sind folgend in der Tabelle 8 gezeigt.

Zeit	Kontrolle (0ng/ml)	10ng/ml IL17	50ng/ml IL17
24h	1.124 +/- 508	917 +/- 601	900 +/- 521
48h	1.657 +/- 473	1.294 +/- 531	972 +/- 293
72h	3.140 +/- 326	2.076 +/- 977	1.607 +/- 602
96h	6.473 +/- 3.526	4.370 +/- 3.394	4.393 +/- 2.825
120h	14.133 +/- 1.629	11.433 +/- 1.159	8.200 +/- 3.065
144h	40.667 +/- 6.643	32.133 +/- 4.924	22.833 +/- 9.176

Tab.8 zeigt die mittleren Zellzahlen der Zeit/Konzentrationsversuche von drei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Das Wachstumsverhalten der chondrogenen Vorläuferzellen mit und ohne IL17-Stimulation zeigt eine stetige Zunahme der Zellzahlen. Die Zellzahlen der stimulierten Zellreihen bleiben dabei stets hinter denen der nicht stimulierten Zellreihen zurück.

In der alleinigen Betrachtung der gemessenen Zellzahlen zeigte sich, dass die mit IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen in ihrem Teilungsverhalten eingeschränkt wurden. Dennoch steigen die Zellzahlen aller drei Versuchsreihen im Laufe der Zeit an, so dass dennoch eine Zellvermehrung unter IL17-Stimulation zu verzeichnen war. Ein exponentieller Charakter lässt sich in der Betrachtung der steigenden Zellzahlen ebenso für die mit IL17 stimulierten Zellreihen vermuten.

Auch in diesen Versuchen wurde die relative Zellvermehrung als Quotient zum jeweiligen Ausgangswert der Zellkultur nach 24h errechnet. Nach 144h erreichten die mit 10ng/ml IL17 stimulierten Zellen im Mittel eine relative Zellvermehrung von 43,51+/-20,30. Für die IL17-Stimulation mit 50ng/ml zeigte sich im Mittel eine relative Zellvermehrung um den Faktor 27,41+/-9,87. Die Zellvermehrungskurve für die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen ist im Mittel in der Abb.3 gezeigt.

Relative Zellvermehrung chondrogener Vorläuferzellen unter Stimulationsbedingungen mit 50ng/ml IL17

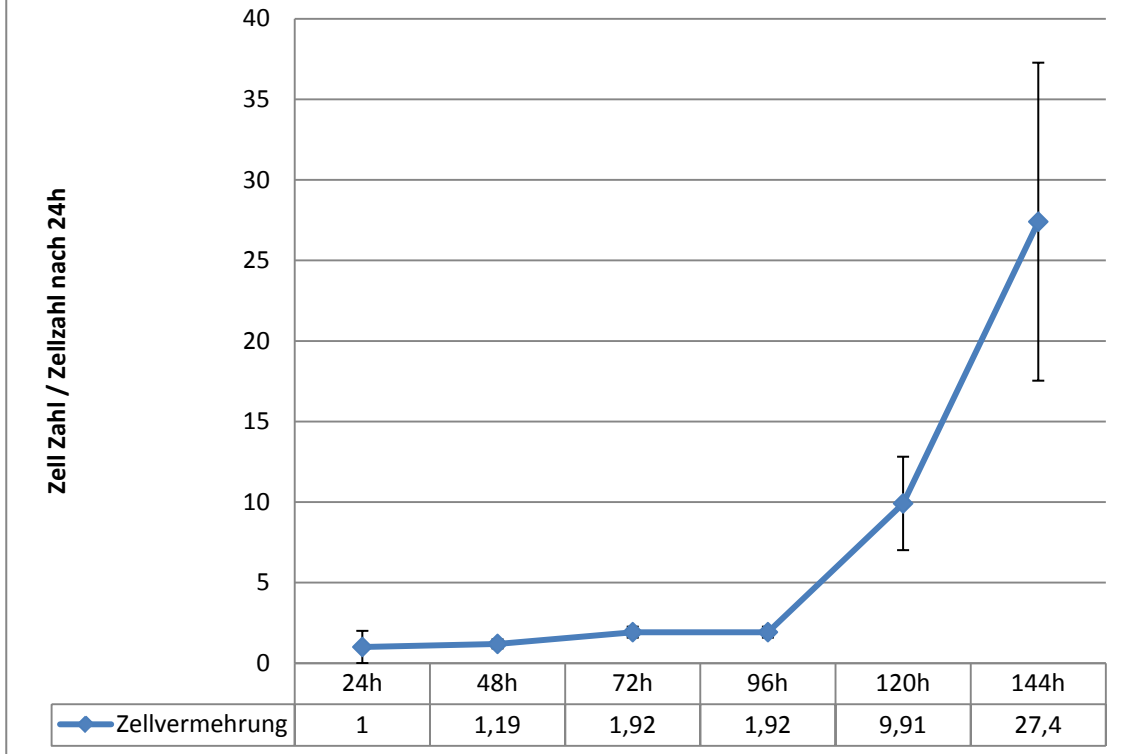


Abb.3 zeigt die Zellvermehrung der chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus drei Versuchsreihen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Stimulationsbedingungen mit 50ng/ml IL17. Die Zellvermehrung ist als Quotient zum jeweiligen Wert zu Beginn der Zellkultur nach 24h dargestellt. Die Tabelle unter dem Graphen gibt den Faktor der Zellvermehrung als Quotient aus der aktuellen Zellzahl durch die Zellzahl zu Beginn des Versuchs nach 24h wieder. Es zeigt sich eine unterdrückte Zellvermehrung zu Beginn der Zellkultur bis zum Zeitpunkt nach 96h. Dann stellt sich eine Zellvermehrung mit exponentiellem Charakter ein.

Es zeigte sich für die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen eine unterdrückte Zellvermehrung zu Beginn der Versuchsreihen nach 48h und 72h, die sich nach 96h langsam erholte und dann nach 120h deutlich anstieg. Die mit 50ng/ml IL17 stimulierten Zellen vermehrten sich so nach 144h im Mittel noch um das 27,41 \pm 9,87 Fache.

Die Zellvermehrung der stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen ist damit besonders in den ersten Stunden der Zellkultur unterdrückt worden und steigt dann, wie bereits für die nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen gezeigt, mit exponentiellem Charakter an. Die Zellvermehrung scheint somit gerade in den ersten Tagen durch IL17 beeinflusst zu sein. Dieser Einfluss scheint nach 120h nicht mehr oder nicht mehr in dem Maße wie zuvor zu bestehen.

4.1.3 Vergleich des Wachstumsverhaltens zwischen mit IL17 stimulierten und nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen.

Nach Auswertung des Wachstumsverhaltens von nicht stimulierten und den mit IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen sollte nun das Wachstumsverhalten beider Zellreihen miteinander verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass die Zellzahlen IL17-stimulierter-Zellreihen stets unterhalb der Zellzahlen nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen zurück blieben. Dabei lagen die Zahlenwerte der mit 50ng/ml IL17 stimulierten Zellreihen unterhalb der mit 10ng/ml IL17 stimulierten Zellreihen. Dieser Zusammenhang wird in Abb.4 verdeutlicht.

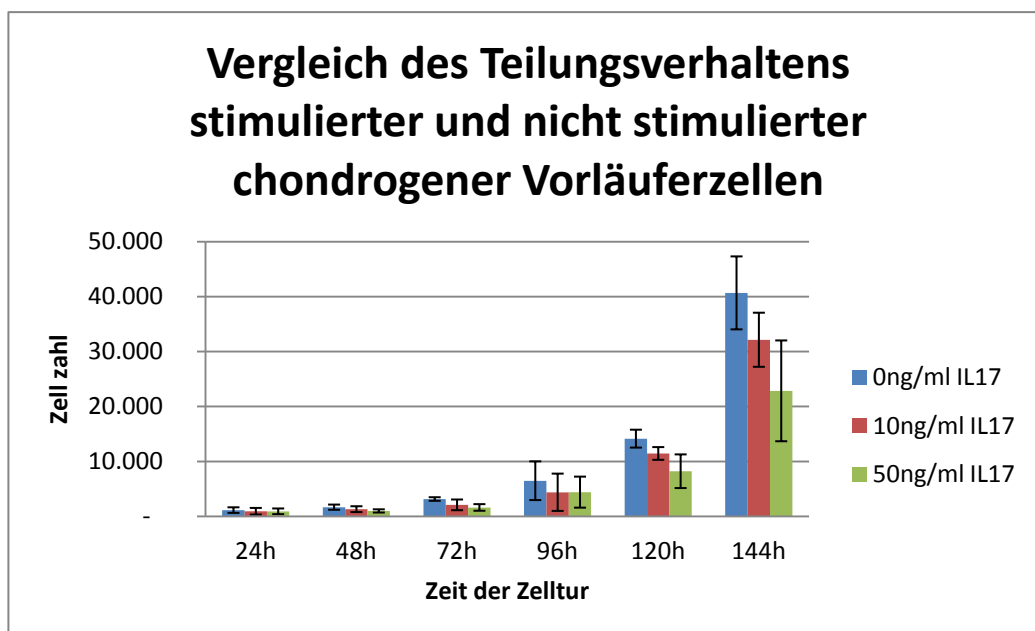


Abb.4 zeigt die Zellzahlen chondrogener Vorläuferzellen im Mittel dreier Versuchsreihen von drei Patienten mit rheumatoider Arthritis je nach eingesetzter IL17-Konzentration in Abhängigkeit der jeweiligen Zellkulturzeit. Die Zellzahlen der mit 10ng/ml und mit 50ng/ml IL17 stimulierten Zellreihen bleiben stets hinter denen der nicht stimulierten Zellen zurück.

Um die Zellvermehrung der drei Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können wurden im Folgenden die Zellzahlen in Relation zum jeweiligen Anfangswert nach 24h gesetzt. Daraus ergaben sich im Mittel der drei Versuchsreihen signifikante Abweichungen in der Zellvermehrung zwischen nicht stimulierten und mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen. Die Zellvermehrung der mit 10ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen wich hingegen nicht signifikant von der Vermehrung der nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen ab. Der Vergleich der nicht stimulierten mit den mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen zeigte einen signifikanten Unterschied der

Zellvermehrung nach 48h und 144h. Bei den anderen Versuchszeitpunkten konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden (72h:p<0,054, 96h:p<0,071 und 120h:p<0,102).

Nach 48h vervielfältigten sich die nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen um das 1,54±0,24 Fache, wohingegen die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen sich nur um das 1,18±0,28 Fache vermehrten (p<0,003). Nach 144h vervielfältigten sich die nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen um das 40,35±16,24 Fache, wohingegen die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen im gleichen Zeitraum sich nur um das 27,41±9,87 Fache vermehrten (p<0,05). Das bedeutet, chondrogene Vorläuferzellen werden durch die Anwesenheit von 50ng/ml IL17 signifikant in ihrer Zellvermehrung gehemmt. Dies scheint im Besonderen zu Anfang der Versuchsreihen nach 48h der Fall zu sein. Gleiches zeigte sich bereits in der Betrachtung des Teilungsverhaltens mit 50ng/ml IL17 stimulierter chondrogener Vorläuferzellen in Abb.3. Nach gezeigter Wirkung von IL17 auf das Teilungsverhalten der chondrogenen Vorläuferzellen sollte nun eine Wirkung auch auf die mRNA- und Proteinsynthese in den Zellen untersucht werden.

4.2 Untersuchung der mRNA-Expression chondrogener Vorläuferzellen

Zunächst galt es zu ermitteln, welche mRNA-Sequenzen von chondrogenen Vorläuferzellen überhaupt gebildet werden, um im Anschluß dann mögliche Veränderungen der mRNA-Konzentrationen durch die IL17-Stimulation zu untersuchen. Dazu wurden chondrogene Vorläuferzellen mit folgenden Primern (s. Primertabelle 3.3.6) auf die Expression folgender mRNA-Molekülen hin untersucht: IL6, NFkB, MMP3, MMP14, MMP15, MMP17, TIMP3, MAPK1, Aggrecan, ADAMTS-5, IL1 und TNF±. Dazu wurde aus chondrogenen Vorläuferzellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qRT-PCR untersucht (s. 3.3). Jeder qRT-PCR-Wert wurde in drei unabhängigen Läufen, an drei unterschiedlichen Tagen bestätigt und je an drei Patienten mit rheumatoider Arthritis wiederholt.

So konnte gezeigt werden, dass chondrogene Vorläuferzellen folgende mRNA-Sequenzen exprimieren: IL6, NFkB, MMP3, MMP14, MMP15, MMP17, MAPK1, IL1, Aggrecan, ADAMTS-5 und TIMP3. TNF± hingegen wird nicht von den chondrogenen Vorläuferzellen exprimiert. Abb.5 zeigt die mittleren ct-Werte der einzelnen PCR-Reihen und bestätigt somit deren mRNA-Expression in den chondrogenen Vorläuferzellen.

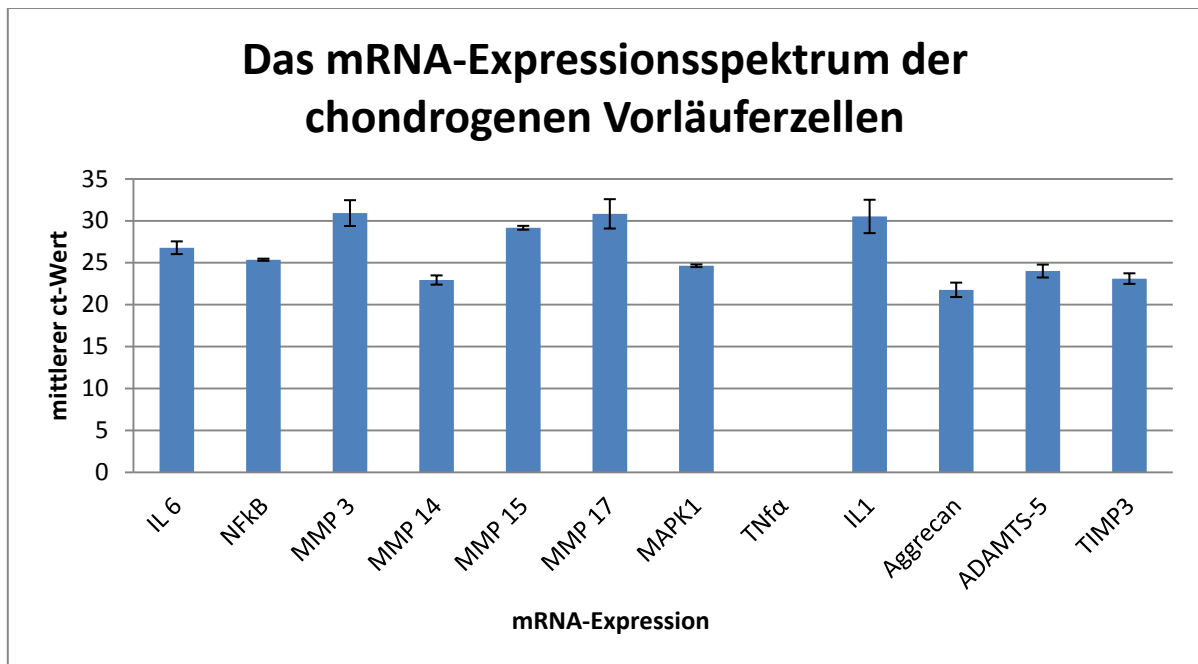


Abb.5 zeigt die ct-Wert Ergebnisse der qRT-PCR-Reihen von IL6, NFkB, MMP3, MMP14, MMP15, MMP17, MAPK1, TNFα, IL1, Aggrecan, ADAMTS-5 und TIMP3 nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen als Mittelwert aus je drei unabhängigen PCR-Läufen von je drei unterschiedlichen Patienten mit rheumatoider Arthritis. IL1 konnte nur an 2 von 3 Patienten valide bestimmt werden und ist somit nur als Mittel aus drei unabhängigen PCR-Läufen von 2 Patienten aufgeführt. Die Abb. zeigt das mRNA-Expressionspektrum der chondrogenen Vorläuferzellen anhand der jeweiligen ct-Werte. TNF±mRNA konnte in den chondrogenen Vorläuferzellen nicht nachgewiesen werden.

Dabei zeigten die qRT-PCR-Ergebnisse im Mittel folgende ct-Werte für die einzelnen eingesetzten Primer: IL6: 26,79±0,76, NFkB: 25,36±0,13, MMP3: 30,92±1,54, MMP14: 22,94±0,55, MMP15: 29,17±0,23, MMP17: 30,83±1,75, MAPK1: 24,64±0,16, IL1B: 30,52±1,99, Aggrecan: 21,77±0,86, ADAMTS-5: 24,01±0,77 und TIMP3: 32,11±0,63. IL1 konnte nur an zwei Patienten einwandfrei anhand konstanter PCR-Ergebnisse aus drei Läufen bestätigt werden. In den anderen Läufen wichen die einzelnen PCR-Ergebnisse zu stark voneinander ab, um einen validen mittleren ct-Wert zu erhalten. TNF± konnte als einziges mRNA-Molekül in keiner der drei Zellreihen von drei Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden.

4.2.1 Einfluss von IL17 auf chondrogene Vorläuferzellen und deren mRNA-Synthese.

Um den Einfluss von IL17 auf die chondrogenen Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden je 3 Zellreihen von drei Patienten mit rheumatoider Arthritis jeweils mit und ohne IL17-Stimulation parallel untersucht. Dazu wurde eine Zellkultur nicht und zwei Zellkulturen jeweils mit 10ng/ml IL17 und mit 50ng/ml IL17 stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 48h mit täglichem Wechsel des Stimulationsmediums. Eine Stimulationszeit von 48h wurde gewählt, da davon auszugehen ist, dass nach 48h die Stimulation bereits Einfluss auf die mRNA-Synthese genommen hat. Zudem sollte sich eben dieser Effekt dann auch schon auf die Proteinsynthese, die später untersucht wurde, ausgewirkt haben. Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigten signifikante Unterschiede in der Zellvermehrung nach 48h (s. 4.1.3). Dies sprach ebenfalls für die gewählte Versuchszeit der Stimulationsreihen. Nach der Zellkultur wurden aus den Zellen stimulierter und nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen dann jeweils parallel die RNA-Moleküle isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die qRT-PCR wurde dann parallel mit gleicher Menge cDNA durchgeführt und für die drei Patienten jeweils an drei Tagen unabhängig wiederholt. In die Ergebnisse gingen nur ct-Werte ein, die innerhalb und zwischen den drei unabhängigen Läufen mit weniger als 0,5 ct-Werte abwichen und somit vergleichbar gleiche mRNA-Konzentrationen in allen drei Läufen aufwiesen.

4.2.2 Einfluss von IL17 auf den IL6-mRNA-Gehalt von chondrogenen Vorläuferzellen.

Um den Einfluss von IL17 auf die mRNA-Synthese von IL6 zu untersuchen wurden chondrogene Vorläuferzellen Zellen parallel zu nicht stimulierten Kontrollen jeweils mit 10ng/ml IL17 und 50ng/ml IL17 für 48h stimuliert und anschließend mit dem Verfahren der qRT-PCR (s. 3.3) auf ihren IL6-mRNA-Gehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab.9 als ct-Werte der einzelnen Konzentrationen für drei Patienten mit rheumatoider Arthritis gezeigt.

Patient	0ng/ml IL17	10ng/ml IL7	50ng/ml IL17
Patient 1	27,47+/-0,31	24,29+/-0,05	23,12+/-0,33
Patient 2	25,97+/-0,44	24,54+/-0,23	23,68+/-0,1
Patient 3	26,92+/-0,24	25,18+/-0,26	23,13+/-0,24

Die **Tab.9** zeigt die mittleren ct-Werte der qRT-PCR Reihen mit dem IL6-Primer von mit 0ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen als Mittel aus je drei unabhängigen PCR-Läufen von je drei unterschiedlichen Patienten mit rheumatoider Arthritis. Es zeigt sich eine Abnahme der ct-Wertes mit steigender IL17-Konzentration.

Die Betrachtung der ct-Werte zeigte eine Abnahme der ct-Wert gestaffelt nach der eingesetzten IL17-Konzentration. Die ct-Werte der stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen lagen dabei jeweils unterhalb der nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen, wobei die mit 50ng/ml stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen jeweils unterhalb der mit 10ng/ml stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen lagen. Da ein kleiner ct-Wert auf einen höheren mRNA-Gehalt in den Zellen schließen lässt, folgt daraus eine Zunahme des mRNA-Gehaltes in den chondrogenen Vorläuferzellen mit zunehmender IL17-Konzentration. Die mittleren ct-Werte chondrogener Vorläuferzellen dreier Patienten für die IL17-Stimulationsreihen für IL6-mRNA sind in Abb.6 gezeigt.

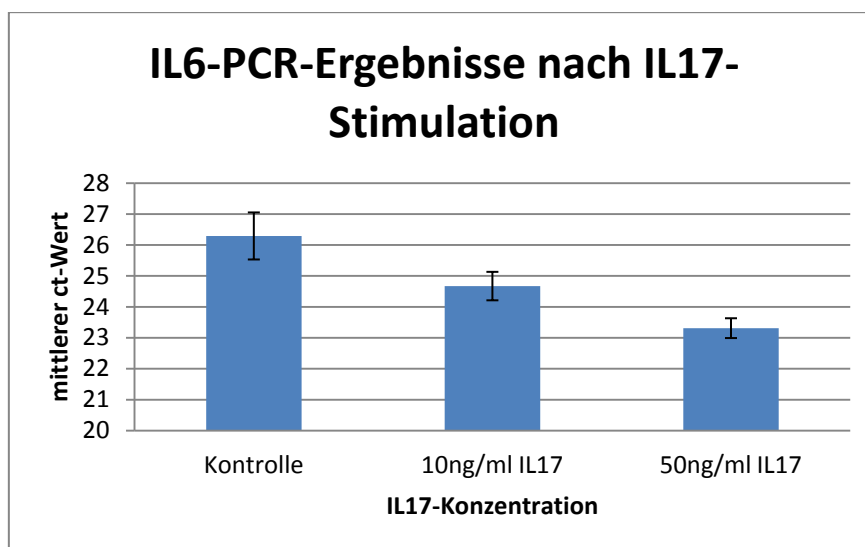


Abb.6 zeigt die mittleren ct-Werte der qRT-PCR-Reihen mit dem IL6-Primer von mit 0ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen als Mittel von je drei Patienten mit rheumatoider Arthritis aus je drei unabhängigen PCR-Läufen. Die Mittelwerte der nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellreihen weichen innerhalb der drei Patienten voneinander ab, wohingegen die ct-Werte für 10ng/ml IL 17 und 50ng/ml IL17 nicht signifikant zwischen den einzelnen Patientenreihen abweichen. Die IL17-Konzentration nimmt so direkt Einfluss auf den IL6-mRNA-Gehalt in chondrogenen Vorläuferzellen.

Die ct-Werte der qRT-PCR-Reihen mit dem IL6-Primer weichen im Mittel der drei Patientenreihen in den mit 0ng/ml IL17 stimulierten Zellreihen signifikant zwischen den einzelnen Patientengruppen ab (26,79+/-0,76). In den mit 10ng/ml IL17 und 50ng/ml IL17 stimulierten Zellreihen zeigte sich ein einheitlicher ct-Wert unabhängig von dem vorher bestimmten ct-Wert der nicht stimulierten Patientenreihen. Dies ergab im Mittel für die 10ng/ml IL17-Stimulation einen ct-Wert von 24,67+/-0,46 und für die 50ng/ml-IL17 Stimulation einen ct-Wert von 23,31+/-0,32. Da die IL6-ct-Werte in den Stimulationsversuchen für 10ng/ml IL17 und 50ng/ml IL17 in allen Standardabweichung

weniger als 0,5 ct-Werte untereinander abweichen, lässt sich bei parallel durchgeführten Versuchen sagen, dass in allen drei Patientenreihen nach der IL17 Stimulation die gleiche IL6-mRNA-Expression vorliegt. Das bedeutet, ausgehend von den unterschiedlichen IL6-mRNA-Expressionen vor der Stimulation, erreichen die mit 10ng/ml IL17 und die mit 50ng/ml IL17 stimulierten Zellen bei allen drei Patienten jeweils die selbe IL6-mRNA-Expression nach der IL7-Stimulation. Die IL17-Stimulation verschiebt somit die IL6-mRNA-Expression in beiden IL17-Konzentrationen auf eine bestimmte mRNA-Expression hin unabhängig von den jeweiligen patientenspezifischen Ausgangswerten.

Nach der Umrechnung nach Pfaffl (s. 3.3.10) konnte das Verhältnis der IL17-Stimulation als Verhältniszahl zur als 1 gesetzten nicht stimulierten Kontrollgruppe chondrogener Vorläuferzellen gezeigt werden. Diese Daten ergaben für die Stimulation mit 10ng/ml IL17 eine Steigerung der relativen IL6-mRNA-Expression um den Faktor von 5,84 \pm 4,31 verglichen mit nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen. Für die 50ng/ml IL17-Stimulation zeigte sich eine Steigerung der relativen IL6-mRNA- Expression auf das 15,42 \pm 9,90 Fache der ursprünglichen relativen IL6-mRNA- Expression der chondrogenen Vorläuferzellen. Die Mittelwerte dieser Verhältniszahlen der drei Patientenreihen sind für die jeweilige IL17 Konzentrationen in Abb.7 gezeigt.

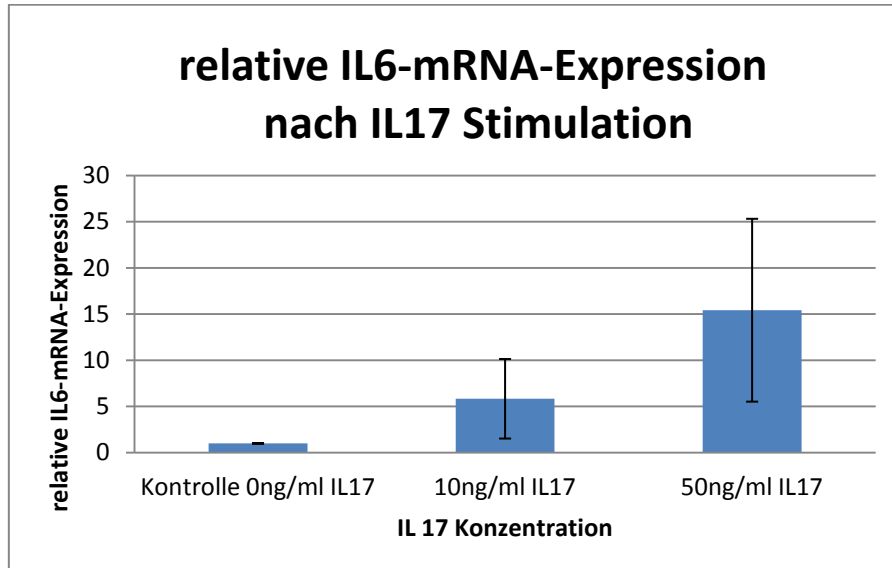


Abb.7 zeigt den Vergleich der relativen IL6-mRNA-Expressionen von nicht stimulierten zu mit 10ng/ml IL17 und zu mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus je drei unabhängigen PCR-Läufen von je drei Patienten mit rheumatoider Arthritis als relatives Verhältnis zur als 1 gesetzten relativen IL6-mRNA-Expression der nicht stimulierten Kontrollreihen, berechnet nach Pfaffl (s. 3.3.10).

Die Steigerung der relativen mRNA-Expression von IL6 in nicht stimulierten und stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen fiel mit $p < 0.069$ nicht signifikant aus. Die große Schwankung

der ct-Werte für IL6-mRNA der nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen der drei Patientenreihen führte zu einer erheblichen Abweichung der relativen IL6-mRNA-Expressionen untereinander.

Die ct-Wert-Ergebnisse lassen jedoch den Schluß zu, dass eine bestimmte IL17-Konzentration jeweils zu einer bestimmten IL6-mRNA-Konzentration in den chondrogenen Vorläuferzellen führt unabhängig von der anfänglichen IL6-mRNA-Konzentration in den nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen.

4.2.3 Einfluss von IL17 auf den mRNA-Gehalt von Matrix-Metalloproteinasen in chondrogenen Vorläuferzellen

Um den Einfluss von IL17 auf die mRNA-Synthese von Matrix-Metalloproteinasen zu untersuchen, wurden die Zellen parallel zu nicht stimulierten Kontrollen jeweils mit 10ng/ml und 50ng/ml IL17 für 48h stimuliert und anschließend mit der qRT-PCR, wie in (s. 3.3) gezeigt, auf ihren mRNA-Gehalt von MMP3, MMP14, MMP15 und MMP17 hin untersucht. Die ct-Werte wurden in je 3 unabhängigen Läufen für drei Patienten wiederholt und bestätigt und sind in Tab.10-13 als Vielfaches der als 1 gesetzten Kontrolle, berechnet nach Pfaffl, aufgeführt.

Tab.10:A relative MMP3-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation				Tab.11: relative MMP14-mRNA- Expression nach IL17-Stimulation			
	0ng/ml	10ng/ml	50ng/ml		0ng/ml	10ng/ml	50ng/ml
Patient	IL17	IL17	IL17	Patient	IL17	IL17	IL17
Patient 1	1	5,03	10,92	Patient 1	1	1,48	1,66
Patient 2	1	1,36	5,78	Patient 2	1	0,41	1,05
Patient 3	1	4,05	8,08	Patient 3	1	1	1,34
Tab.12:C relative MMP15-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation				Tab.13: relative MMP17-mRNA-Expression nach IL17-Stimulation			
	0ng/ml	10ng/ml	50ng/ml		0ng/ml	10ng/ml	50ng/ml
Patient	IL17	IL17	IL17	Patient	IL17	IL17	IL17
Patient 1	1	1,76	1,08	Patient 1	1	2,7	1,91
Patient 2	1	0,74	1,3	Patient 2	1	0,62	1,34
Patient 3	1	1,17	1,88	Patient 3	1	1,17	1,67

Die **Tab10-13** zeigen die Ergebnisse der qRT-PCR-Reihen chondrogener Vorläuferzellen für die MMP3-, MMP14-, MMP15- und MMP17-mRNA-Expression als Mittel aus je drei unabhängigen PCR-Läufen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis als relatives Verhältnis zur als 1 gesetzten relativen MMP-mRNA-Expression der nicht stimulierten Kontrollreihen, berechnet nach Pfaffl (s. 3.3.10).

Hier zeigten sich für die einzelnen mRNA-Sequenzen der jeweils eingesetzten Primer: MMP3, MMP14, MMP15 und MMP17 folgende Ergebnisse:

Für MMP3 zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen mRNA-Expression durch die Stimulation von 50ng/ml IL17 ($p < 0,002$). Die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen erreichten im Mittel eine um den Faktor $8,26 \pm 2,57$ ($p < 0,002$) höhere relative mRNA-Expression als in den parallel durchgeführten Kontrollen nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen. Dies zeigt so eine Steigerung der relativen MMP3-mRNA-Expression um 826% durch die IL17-Stimulation mit 50ng/ml IL17. Die Stimulation chondrogener Vorläuferzellen mit nur 10ng/ml IL17 zeigte eine Steigerung der relativen MMP3-mRNA-Expression um den Faktor $3,48 \pm 1,9$ ($p < 0,08$). Hier konnten keine signifikanten Änderungen der relativen MMP3-mRNA-Expressionen verglichen mit den nicht stimulierten Kontrollgruppen chondrogener Vorläuferzellen gezeigt werden. Das Verhalten der chondrogenen Vorläuferzellen auf die jeweilige IL17-Konzentration ist in Abb.8 für die beiden IL17-Konzentrationen 10ng/ml und 50ng/ml dargestellt.

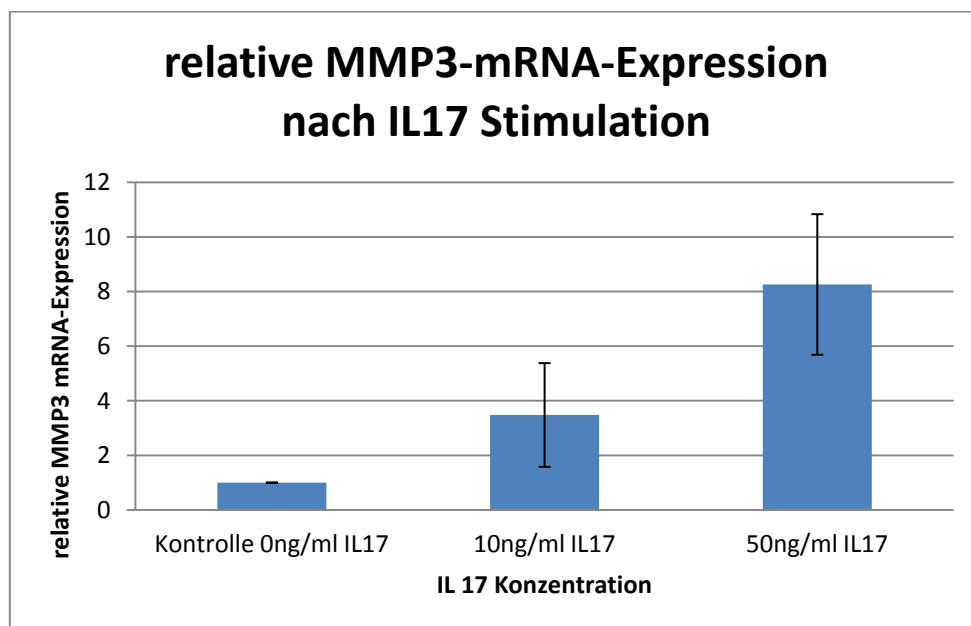


Abb.8 zeigt den Vergleich der relativen MMP3-mRNA-Expressionen von nicht stimulierten zu mit 10ng/ml und 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus drei unabhängigen PCR-Läufen von je drei Patienten mit rheumatoider Arthritis als relatives Verhältnis zu der als 1 gesetzten mRNA-Expression der Kontrollreihen berechnet nach Pfaffl. Die relative mRNA-Expression der mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen zeigt eine signifikante um das $8,26 \pm 2,57$ Fache ($p < 0,002$) höhere relative MMP3-mRNA-Expression. Die mit 10ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen erreichten mit der Steigerung der MMP3-mRNA-Expression um das $3,48 \pm 1,9$ Fache ($p < 0,08$) jedoch keine signifikante Expressionsänderung.

Für MMP17 zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen mRNA-Expression durch die Stimulation mit 50ng/ml IL17. Die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen erreichten im Mittel aus drei unabhängigen Versuchsläufen dreier Patienten mit rheumatoider Arthritis einen um den Faktor $1,64 \pm 0,29$ ($p < 0,002$) erhöhte relative MMP17-mRNA-Expression. Somit scheint die IL17-Stimulation mit 50ng/ml IL17 die MMP17-mRNA-Expression in den chondrogenen Vorläuferzellen um 64% zu steigern. Dieser Zusammenhang ist in Abb.9 veranschaulicht.

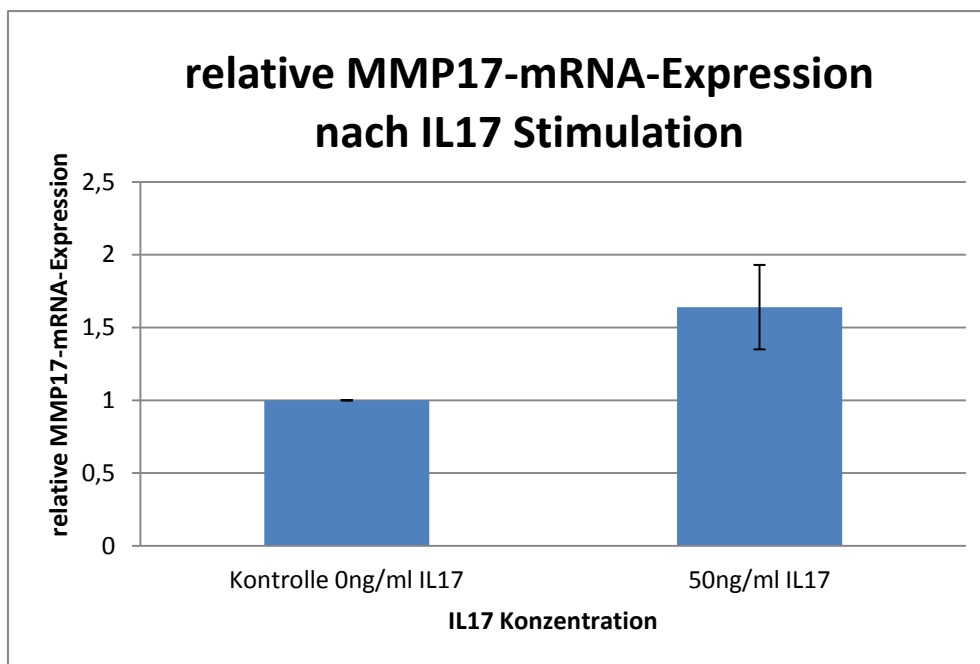


Abb.9 zeigt den Vergleich der relativen MMP17-mRNA-Expressionen von nicht stimulierten zu mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus drei unabhängigen PCR-Läufen von je drei Patienten mit rheumatoider Arthritis als Verhältnis zu der als 1 gesetzten mRNA-Expression der Kontrollreihen, berechnet nach Pfaffl. Die IL17-Stimulation der chondrogenen Vorläuferzellen mit 50ng/ml IL17 erhöht die relative MMP17-mRNA-Expression in den Zellen signifikant um das $1,64 \pm 0,29$ Fache ($p < 0,002$).

Für mit 10ng/ml IL17 stimulierte chondrogene Vorläuferzellen zeigte sich eine Erhöhung der relativen MMP17-mRNA-Expression auf das $1,55 \pm 1,06$ Fache ($p < 0,23$). Hier konnte keine signifikante Erhöhung der relativen MMP17-mRNA-Expression gezeigt werden. Die Erhöhungen der relativen mRNA-Expressionen von MMP14 und MMP15 nach Stimulation mit 50ng/ml IL17 zeigten mit Steigerungen um das $1,35 \pm 0,31$ Fache ($p < 0,10$) für MMP14 und das $1,42 \pm 0,41$ Fache ($p < 0,10$) für MM15 keine signifikanten Änderungen der relativen mRNA-Expressionen. Die Stimulation hatte somit keine signifikant nachweisbaren Auswirkungen auf die relativen mRNA-Expressionen dieser Matrix-Metalloproteinasen.

Zusammenfassend lässt sich über den Einfluss der IL17-Stimulation auf die relativen mRNA-Expressionen der vier untersuchten Matrix-Metalloproteinasen MMP3, MMP14, MMP15 und MMP17 sagen, dass die IL17-Stimulation die relativen mRNA-Expressionen von MMP3 und von MMP17 in den chondrogenen Vorläuferzellen signifikant erhöht. Die relativen mRNA-Expressionen von MMP14 und von MMP15 werden jedoch von der IL17-Stimulation nicht signifikant beeinflusst. Somit scheint IL17 das Verhältnis innerhalb der verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen hin zu mehr MMP3 und MMP17 zu verschieben.

4.2.4 Einfluss von IL17 auf den Transkriptionsfaktor NF κ B-mRNA-Gehalt in chondrogenen Vorläuferzellen

Um den Einfluss von IL17 auf die mRNA-Synthese des Transkriptionsfaktors NF κ B zu untersuchen, wurden die Zellen parallel zu nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen je mit 10ng/ml und 50ng/ml IL17 stimuliert und anschließend mit der qRT-PCR (s.3.3.8) auf ihren mRNA-Gehalt hin untersucht. Auch diese Versuchsreihe wurde an drei Patienten je dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Dann wurden die qRT-PCR-Ergebnisse nach Pfaffl in relative mRNA-Expression im Vergleich zur als 1 gesetzten Konzentration nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen umgerechnet. Diese Ergebnisse sind in Abb.10 abgebildet.

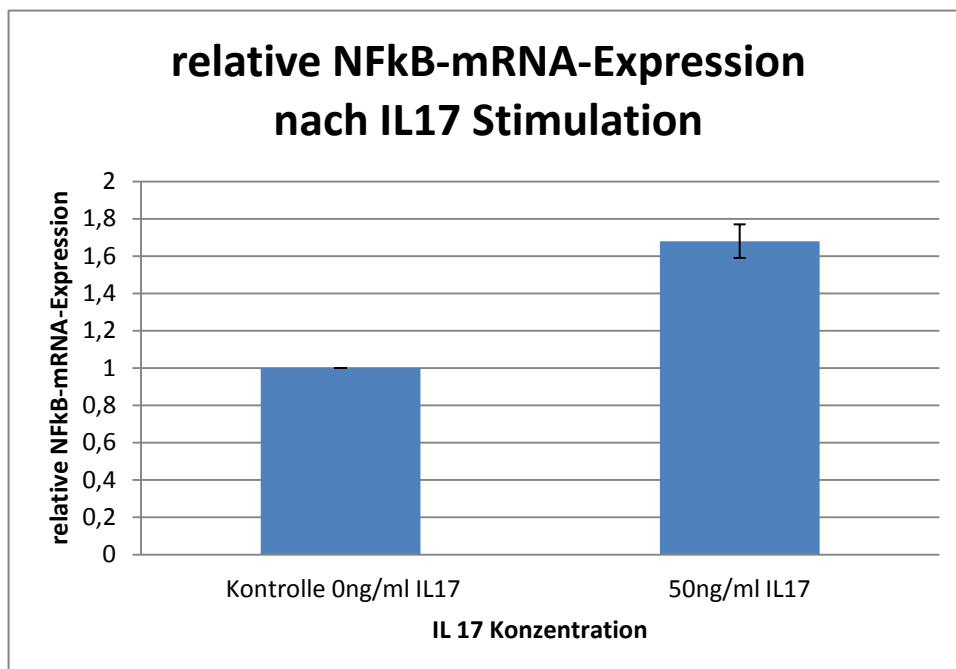


Abb.10 zeigt den Vergleich der qRT-PCR-Ergebnisse für NF κ B von nicht stimulierten zu mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen im Mittel aus drei unabhängigen PCR-Läufen von je drei Patienten mit rheumatoider Arthritis als mRNA-Verhältnis zur als 1 gesetzten mRNA-Expression der Kontrollreihen berechnet nach Pfaffl. Die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen zeigten eine signifikante Steigerung der relativen NF κ B-mRNA-Expression um das 1,68 \pm 0,08 ($p < 0,003$) Fache.

Die relative NF κ B-mRNA-Expression stieg nach der Stimulation von 50ng/ml IL17 im Verhältnis zu den nicht stimulierten Kontrollen im Mittel um den Faktor von 1,68 \pm 0,08 ($p < 0,003$) signifikant an. Somit steigerte 50ng/ml IL17 die relative mRNA-Expression von NF κ B um 68%. Die Stimulation mit 10ng/ml IL17 zeigte eine Steigerung der relative NF κ B-mRNA-Expression um das 1,38 \pm 0,81 Fache ($p < 0,26$), welche nicht signifikant ausfiel und hier nicht gezeigt wird. IL17 vermag somit die relative mRNA-Expression von NF κ B in den chondrogenen Vorläuferzellen signifikant zu erhöhen bei adäquaten Stimulationskonzentrationen.

4.3 Immunfluoreszenz-Nachweis von IL6 und MMP3 in chondrogenen Vorläuferzellen

Nach Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse zeigte sich, dass die chondrogenen Vorläuferzellen die folgenden mRNA-Moleküle synthetisieren: IL6, NFkB, IL1, MAPK1, TIMP3, Aggrecan, ADAMTS5, MMP14, MMP15, MMP17 und MMP3. Zudem wurde gezeigt, dass IL17 steigernden Einfluss auf die mRNA-Konzentration von IL6, NFkB, MMP3 und MMP17 besitzt. Es galt nun zu zeigen, dass auch die jeweiligen Proteinmoleküle in den chondrogenen Vorläuferzellen vorzufinden sind. Dazu sollten, stellvertretend für die oben aufgeführten Moleküle, die Proteine IL6 und MMP3 in den chondrogenen Vorläuferzellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Das Verfahren der Immunfluoreszenz wird in 3.4 beschrieben. Die Versuche wurden jeweils unabhängig für drei Patienten mit rheumatoider Arthritis wiederholt und zeigten dieselben Ergebnisse. In allen drei Versuchsläufen konnten in den chondrogenen Vorläuferzellen die Proteine IL6 und MMP3 nachgewiesen werden. Die jeweiligen Kontrollen ohne den primären Antikörper fielen jeweils negativ aus. Die Versuchsergebnisse eines Versuchs für IL6 und MMP3 sind in den Abb.11 und 12 aufgeführt. Die Bilder sind mit Vergrößerungen von 1:20 und 1:40 aufgenommen worden und zeigen jeweils das Immunfluoreszenzbild mit dem darunter liegenden DAPI-Kontrollbild. Die DAPI-Kontrollbilder zeigen die markierten Zellkerne aller im Ausschnitt liegenden Zellen. Der Vergleich der Zellkerne mit den jeweiligen Fluoreszenzbildern lässt jedem in der DAPI-Färbung markierten Zellkern jeweils eine mit IL6 bzw. MMP3 markierte fluoreszierende Zelle zuordnen. Dieses wird in der Überlagerung der beiden Bilder deutlich. In den Kontrollen kann den DAPI-markierten Zellkernen keine Immunfluoreszenz zugeordnet werden und sie fallen somit negativ aus. Somit konnte nachgewiesen werden, dass chondrogene Vorläuferzellen die Proteine IL6 und MMP3 synthetisieren.

Die Verbindung der Fluoreszenznachweise mit den PCR-Ergebnissen der jeweiligen mRNA-Sequenzen lässt den Schluß zu, dass chondrogene Vorläuferzellen die vorhandenen mRNA-Sequenzen von IL6 und von MMP3 auch in Proteine umschreiben. Die beobachteten Anstiege der mRNA-Konzentrationen in den qRT-PCR-Versuchen an IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen gehen daher hoch wahrscheinlich auch mit einer Erhöhung des jeweiligen Syntheseproduktes einher.

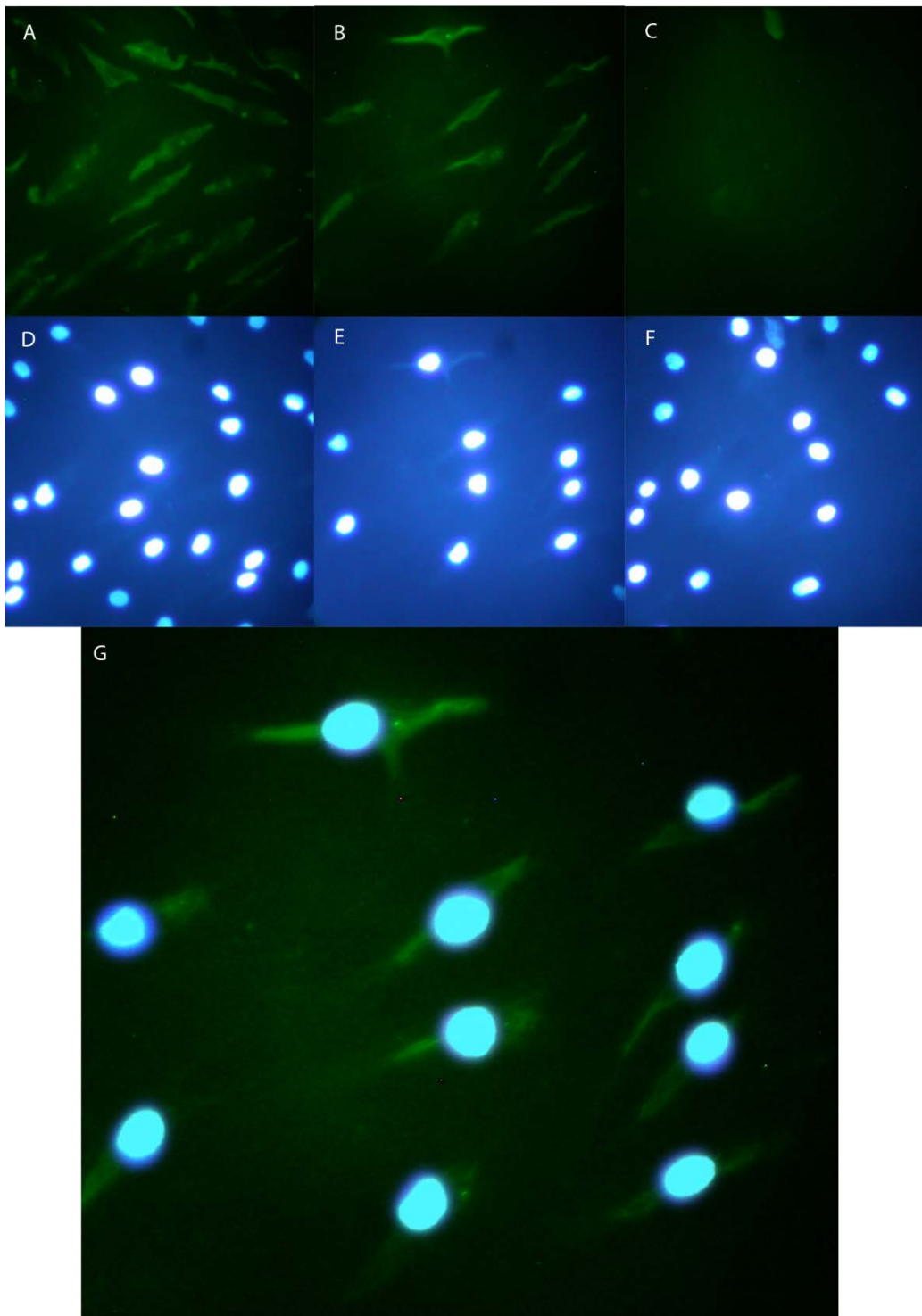


Abb.11 zeigt die Immunfluoreszenzbilder für mit IL6-Antikörpern markierten chondrogene Vorläuferzellen. Abb. A, B, und C zeigen die mit FITC markierten IL6-Proteine als Fluoreszenz in den Zellen. Abb. D, E und F zeigen jeweils die zu Abb. A, B und C passenden DAPI-gefärbten Kontrollbilder, die die Zellkerne aller Zellen des Ausschnittes zeigen. Abb. C und E zeigen die Kontrollen ohne den primären IL6-Antikörper. Hier zeigt sich keine Fluoreszenz, da kein primärer Antikörper gebunden hat. Die Bilder sind mit der Vergrößerungen 1:20 (A und D) und 1:40 (B, C, E, F und G) aufgenommen worden. Abb. G zeigt die Überlagerung der beiden Bilder. B und E, in dem jedem mit DAPI markiertem Zellkern jeweils eine Immunfluoreszenz zugeordnet werden kann und somit positiv gezeigt werden konnte, dass die chondrogene Vorläuferzelle das Protein IL6 enthalten.

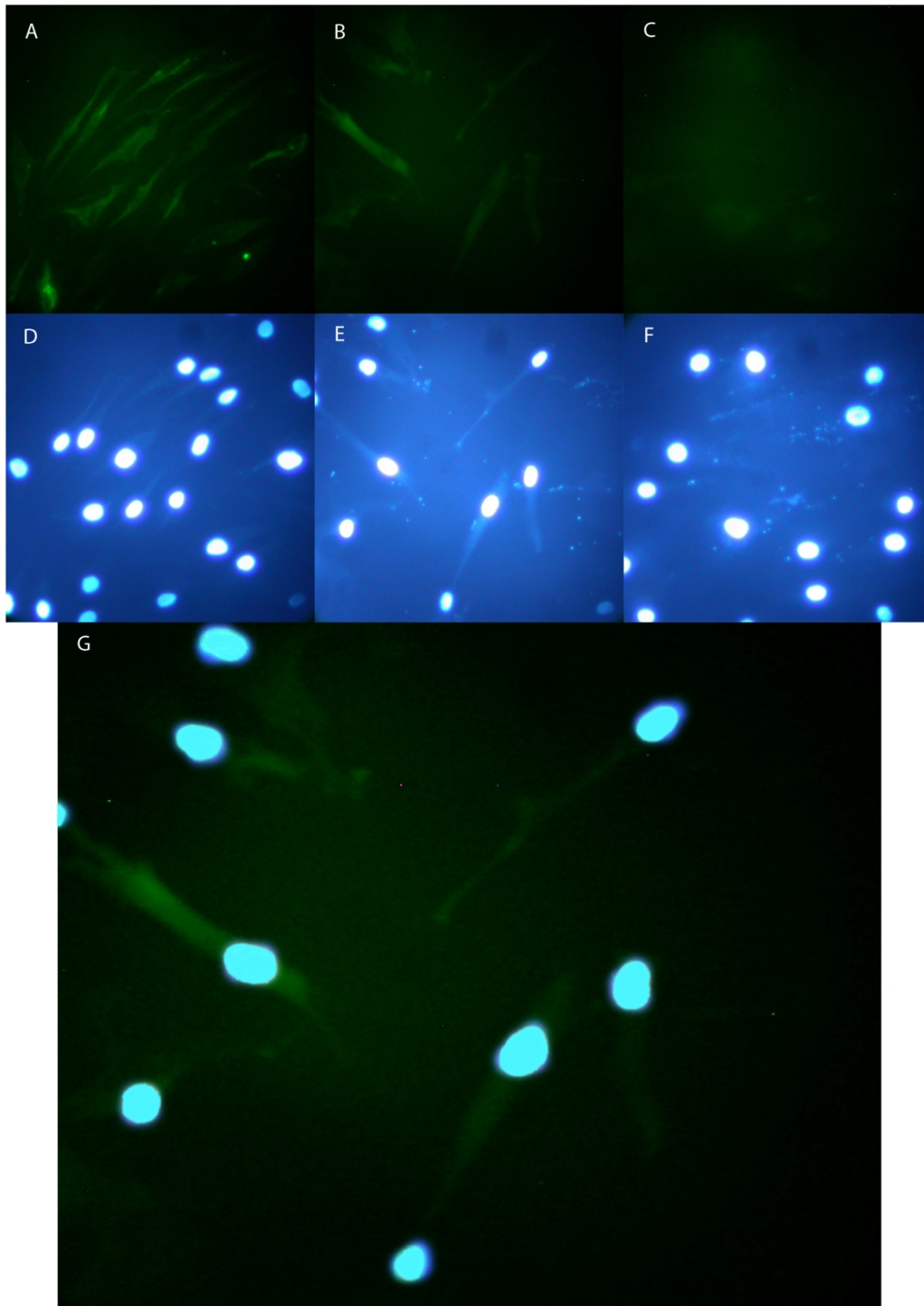


Abb.12 zeigen die Immunfluoreszenzbilder für mit MMP3- Antikörpern markierten chondrogene Vorläuferzellen. Abb. A, B, und C zeigen die mit FITC markierten MMP3-Proteine, als Fluoreszenz in den Zellen. Abb. D, E und F zeigen jeweils die zu Abb. A, B und C passenden DAPI-gefärbten Kontrollbilder, die die Zellkerne aller Zellen des Ausschnittes zeigen. Abb. C und E zeigen die Kontrollen ohne den primären MMP3-Antikörper. Hier zeigt sich keine Fluoreszenz, da kein primärer Antikörper gebunden hat. Die Bilder sind mit der Vergrößerungen 1:20 (A und D) und 1:40 (B, C, E, F und G) aufgenommen worden. Abb. G zeigt die Überlagerung der beiden Bilder. B und E, in dem jedem mit DAPI markiertem Zellkern jeweils eine Immunfluoreszenz zugeordnet werden kann und somit positiv gezeigt werden konnte, dass die chondrogene Vorläuferzelle das Protein MMP3 enthalten.

4.4 Western-Blot-Nachweis von den Proteinen IL6 und MMP3 in chondrogenen Vorläuferzellen

Es wurde schon in 4.2 gezeigt, dass chondrogene Vorläuferzellen die mRNA-Sequenzen von IL6 und von MMP3 produzieren. Zudem wurden in 4.3 mit der Immunfluoreszenz die Proteine IL6 und MMP3 in den Zellen nachgewiesen. Nun sollen diese Ergebnisse mit dem Verfahren Western Blot ein weiteres Mal auf Proteinebene bestätigt werden.

Vorversuche zeigten, dass für das MMP3-Protein jeweils 200.000 Zellen ausreichen, um mit einer Antikörperkonzentration von 1:5000 die MMP3-Proteine zu detektieren. Für das Protein IL6 wurden jeweils 450.000 Zellen benötigt und der Antikörper in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Der jeweilige sekundäre Antikörper wurde je mit einer Konzentration von 1:40.000 eingesetzt. Die Ergebnisse sind jeweils als Photographien der Proteinfärbungen und der entwickelten Blot-Bilder gezeigt.

Die Abb.13 und Abb.14 zeigen die Bindungen der MMP3 und IL6 Antikörper an das zu erwartende Protein MMP3 bzw. IL6 als schwarze Banden auf den entwickelten Western Blot Bildern. Zudem bestätigt der Vergleich mit der ebenfalls abgebildeten Proteinleiter die zu erwartende Größe für die Proteinbande. Der Vergleich mit der Proteinleiter zeigte für MMP3 die wie zu erwartende Größe von 59kD. Der Vergleich für IL6 bestätigte die zu erwartende Größe von 26kD. Das ebenfalls abgebildete Bild der Commassie-blue-Färbung dokumentiert die gelungene Übertragung der Proteine des jeweiligen Zelllysates auf die Membran.

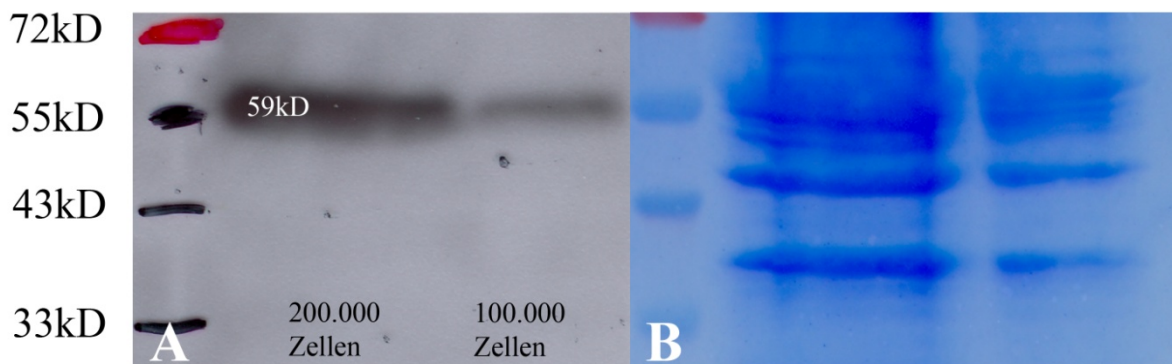


Abb.13 zeigt die mit dem human-Anti-MMP3-Antikörper entwickelten Western-Blot-Bilder (A) und die dazugehörige Proteinfärbung mit Commassie blue (B). Eingesetzt wurde ein Zelllysate aus 100.000 und 200.000 chondrogenen Vorläuferzellen. Der Vergleich mit der Proteinleiter bestätigt die Größe des markierten MMP3-Proteins von 59kD. Die dunkle Bande dokumentiert die Antikörperbindung und weist so das Protein MMP3 in den chondrogenen Vorläuferzellen positiv nach.

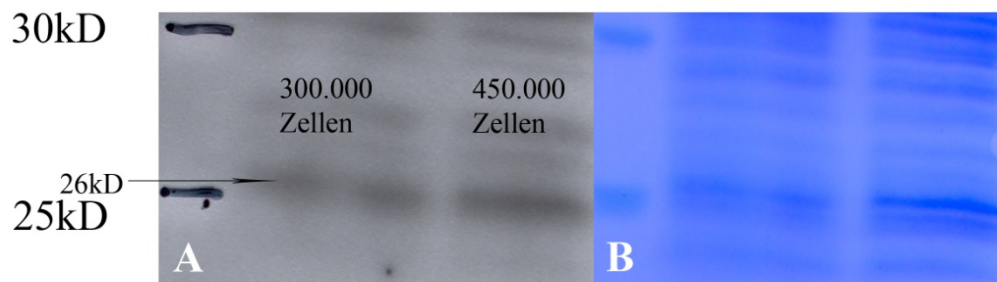


Abb.14 zeigt die mit dem human-Anti-IL6-Antikörper entwickelten Western-Blot-Bilder (A) und die dazugehörige Proteinfärbung mit Coomassie-blue (B). Eingesetzt wurde ein Zelllysate aus 300.000 und 450.000 chondrogenen Vorläuferzellen. Der Vergleich mit der Proteinleiter bestätigt die Größe des markierten IL6-Proteins von 26kD. Die dunkle Bande dokumentiert die Antikörperbindung und weist das Protein IL6 in den chondrogenen Vorläuferzellen positiv nach.

4.4.1 Nachweis von MMP3 Proteinen auch nach der IL17-Stimulation mit dem Western Blot.

Nach dem positiven Nachweis der Proteine IL6 und MMP3 in den chondrogenen Vorläuferzellen sollten nun stimulierte und nicht stimulierte chondrogene Vorläuferzellen mit dem gleichen Verfahren auf Unterschiede in den Konzentrationen im Hinblick auf die eingesetzte IL17-Stimulation untersucht werden. Hierzu bot sich das MMP3-Protein an, da für seine mRNA-Konzentration bereits gezeigt worden war, dass sie sich durch die Stimulation mit 50ng/ml IL17 auf das 8,26 Fache signifikant steigert (s. 4.2.3). Dazu wurden parallel zwei Zellreihen der chondrogenen Vorläuferzellen eines Patienten mit 0ng/ml und mit 50ng/ml stimuliert und je 200.000 Zellen für den Western Blot verwendet. Dann durchliefen beide Proben parallel den Versuchsablauf des Western Blotes. Das Ergebnis zeigt Abb.15.

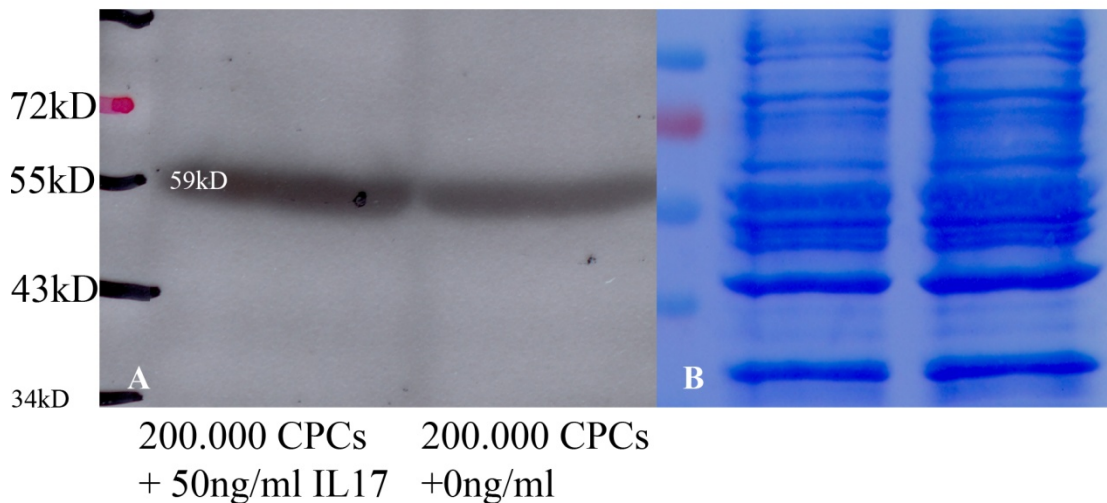


Abb.15 zeigt die mit dem Anti-MMP3-Antikörper entwickelten Bilder des Western Blotes (A) und die dazugehörige Proteinfärbung mit Coomassie-blue (B). Eingesetzt wurde ein Zelllysate aus 200.000 von mit 50ng/ml IL17 stimulierten (links) und von nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen (rechts). Im Vergleich der beiden Banden zeigt sich eine dunklere Bande und damit eine stärkere Bindung der MMP3-Antikörper für die mit 50ng/ml IL17 stimulierte Versuchsreihe (links). Die stärkere Bindung der MMP3-Antikörper auf der stimulierten Seite deutet bei gleicher Zellzahl auf mehr MMP3 Proteine im stimulierten Zelllysate hin. Somit scheinen die stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen mehr MMP3-Proteine zu enthalten als die nicht stimulierten Zellen. Hier kann jedoch keine Signifikanz angenommen werden, da es keinen Referenzbezug gibt. Es konnte jedoch erneut gezeigt werden, dass chondrogene Vorläuferzellen das Protein MMP3 unter Stimulation produzieren.

Das entwickelte Bild des Western Blotes zeigt eine dunklere Bande auf der Seite der mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen verglichen mit der Bande des nicht stimulierten Zelllysates. Die stärkere Bindung der MMP3-Antikörper auf der stimulierten Seite deutet bei gleicher eingesetzter Zellzahl auf mehr MMP3 Proteine im Zelllysate hin. Somit könnten die stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen mehr MMP3-Proteine enthalten als die nicht stimulierten Zellen. Hier kann allerdings keine Signifikanz angenommen werden, da es keinen Referenzbezug gibt. Es konnte jedoch erneut gezeigt werden, dass chondrogene Vorläuferzellen das Protein MMP3 unter Stimulation produzieren.

Bereits in den PCR-Ergebnissen für MMP3 (s. 4.2.3) zeigten sich signifikant erhöhte MMP3-mRNA-Konzentrationen in den chondrogenen Vorläuferzellen durch die Stimulation mit 50ng/ml IL17. Die Ergebnisse dieses Western-Blot-Versuches weisen nun zudem vermehrte Antikörperbindung für die mit 50ng/ml IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen auf. Da bereits gezeigt werden konnte, dass IL17 die mRNA-Konzentration in den chondrogenen Vorläuferzellen heraufsetzt, kann nun geschlossen werden, dass eben diese erhöhte mRNA-Konzentration auch zu einer Erhöhung der Proteinsynthese in diesen Zellen führt.

4.5 Hemmung des IL17-Effekts auf die IL6-mRNA-Synthese chondrogener Vorläuferzellen durch IL17-Antikörper

Zur Bestätigung, dass allein der Effekt von IL17 für die veränderten mRNA-Expressionen in den untersuchten Zellen verantwortlich ist (s. 4.2.2), sollte nun gezeigt werden, dass dieser IL17-Effekt mit einem IL17-Antikörper geblockt werden kann. Dazu wurden vier Versuchsreihen angelegt und mit der qRT-PCR untersucht. Als Kontrollen fungierten jeweils eine nicht stimulierte und eine mit 10ng/ml IL17 stimulierte chondrogene Vorläuferzellen.

Als Probe fungierte eine mit 10ng/ml IL17 stimulierte und mit 100µg/ml IL17-Antikörper versetzte Zellkultur chondrogener Vorläuferzellen. Außerdem wurde untersucht, ob das IL17-Suspensionsmedium, bestehend aus 4mM HCl und 0,1% bovinem Serumalbumin, in PBS gelöst, Einfluss auf den IL6-mRNA-Gehalt besitzt. Die Versuche wurden parallel durchgeführt und in drei unabhängigen PCR-Läufen bestätigt. Die Ergebnisse der qRT-PCR Versuche sind als ct-Werte in Tab.14 aufgeführt.

Primer	Kontrolle	Suspensionsmedium	10ng/ml IL17 +100µg/ml Anti-IL17	10ng/ml IL17
IL6	29,15+/-0,25	29,53+/-0,05	27,47+/-0,27	24,41+/-0,25
63°C				

Tab.14 zeigt die ct-Werte gemittelt aus drei unabhängigen Versuchsläufen eines Patienten mit rheumatoider Arthritis unter den jeweiligen Kulturbedingungen. Die ct-Werte der Zellkulturen, die mit IL17 und mit dem IL17-Antikörpern stimuliert wurden zeigen einen ct-Wert, der zwischen den mit IL17 stimulierten und den nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen liegt. Damit scheint der IL17-Antikörper die IL17-Wirkung auf die Zellen zum Teil zu blocken. Das Suspensionsmedium erreicht die gleichen ct-Werte wie die nicht stimulierte Kontrolle.

Die Kontrollreihe mit nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen und die mit der Suspensionslösung behandelten chondrogenen Vorläuferzellen lagen für die nicht stimulierte Zellreihe bei 29,15+/-0,25 und für die Suspensionslösung bei 29,53+/-0,05 auf einem annähernd gleichen Niveau und weichen nicht signifikant voneinander ab.

Die ct-Werte der stimulierten Zellen erreichten einen mittleren ct-Wert von 24,41+/-0,25, der in dem zuvor beobachteten Bereich der IL17-Stimulationsreihen für 10ng/ml liegt, und somit erneut die Ergebnisse der qRT-PCR (s. 4.2.2) bestätigt. Die mit 10ng/ml IL17 stimulierten und gleichzeitig mit dem IL17-Antikörper behandelten chondrogenen Vorläuferzellen erreichten einen ct-Wert von 27,47+/-0,27 und wurden auf ein Niveau zwischen der nicht stimulierten und der mit 10ng/ml IL17 stimulierten Versuchsreihe gesenkt.

Nach Umrechnung der ct-Werte in relative Verhältniszahlen zu der als 1 gesetzten Kontrollgruppe nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen nach Pfaffl, wird der Effekt der IL17 Antikörper deutlicher. Dies zeigt Abb.16.

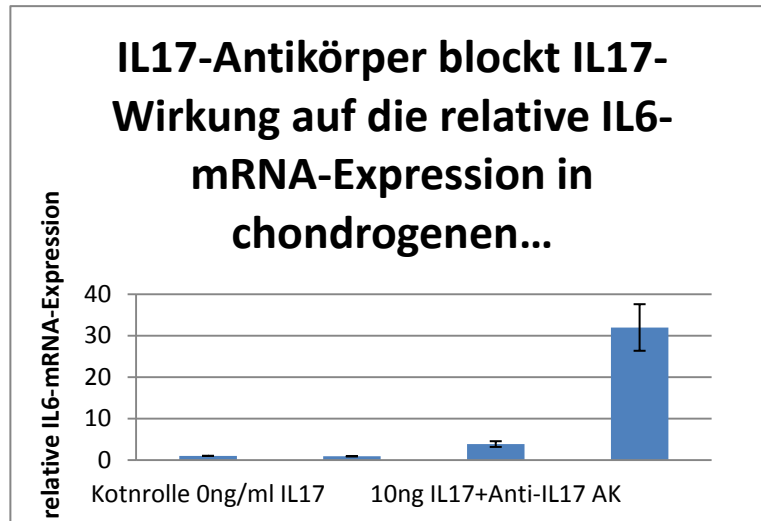


Abb.16 zeigt die IL6-mRNA-Expression der chondrogenen Vorläuferzellen in Relation zum Expression der nicht stimulierten Zellen. Die Daten sind gemittelt aus drei unabhängigen PCR-Läufen eines Patienten mit rheumatoider Arthritis. Es zeigt sich, dass 10ng/ml IL17 die IL6-mRNA-Konzentration um das 31,98+/-5,62 ($p<0,005$) Fache anheben kann. Der IL17-Antikörper kann diese Stimulationswirkung auf das 3,86+/-0,691 ($p<0,005$) Fache reduzieren und damit den IL17 Einfluss zum Teil blocken.

Hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen IL6-mRNA-Expression durch die Stimulation mit 10ng/ml IL17 um den Faktor 31,98+/-5,62 ($p<0,005$), verglichen mit dem Ausgangswert nicht stimulierter chondrogener Vorläuferzellen von einem Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die hier nun gezeigte Signifikanz ist in Abb7 und im Abschnitt 4.2.2 so nicht darstellbar, da in den Versuchen in 4.2.2 die Mittelwerte aus drei Patientenreihen und deren STABW in die Ergebnisdarstellung eingehen. Durch die starke Streuung der Ausgangswerte konnte dort keine Signifikanz angegeben werden. Die Blockung der IL17-Moleküle durch den IL17-Antikörper konnte die beschriebene relative Expressionssteigerung von IL6-mRNA-Molekülen um das 31,98+/-5,62 Fache signifikant auf das 3,86+/-0,691 ($p<0,005$) Fache reduzieren. Die alleinige Suspensionslösung ohne das sonst darin gelöste IL17, bestehend aus 4mM HCl und 0,1% bovinem Serumalbumin, erreichte annähernd das gleiche relative Expressionsniveau wie die nicht behandelte Kontrollgruppe aus den nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen und hatte somit nachweisbar keinen Einfluss auf die IL6-mRNA-Expression. Die Ergebnisse der Antikörperversuche gaben somit weitere Hinweise darauf, dass IL17 für die beobachteten Effekte verantwortlich ist.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1.) Die Wachstumskurven der chondrogenen Vorläuferzellen zeigen einen exponentiellen Verlauf. Die Stimulation der Zellen mit IL17 stören diesen exponentiellen Charakter nicht, wohl jedoch die Geschwindigkeit des Zellwachstums speziell in den Anfangszeiten der Zellkultur. Die mit IL17 stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen wachsen so signifikant langsamer, als die nicht stimulierten Zellen.
- 2.) In den qRT-PCR-Reihen konnte erstmals nachgewiesen werden, dass chondrogene Vorläuferzellen folgende mRNA-Sequenzen synthetisieren: IL6, MMP3, MMP14, MMP15, MMP17, NFkB, IL1, MAPK, Aggrecan, ADAMTS5 und TIMP3.
- 3.) TNF \pm konnte in den chondrogenen Vorläuferzellen nicht nachgewiesen werden.
- 4.) Vergleiche der relativen mRNA-Expressionen von mit IL17 stimulierten und nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen zeigen, dass nach der Stimulation signifikant mehr mRNA für MMP3 ($p < 0,002$), MMP17 ($p < 0,002$) und NFkB ($p < 0,003$) in den chondrogenen Vorläuferzellen vorliegt, als in den nicht stimulierten Kontrollen. Die relativen mRNA-Expressionen von MMP15 und von MMP14 weisen hingegen keine signifikanten Veränderungen durch die IL17-Stimulation auf.
- 5.) Es konnte somit in vitro gezeigt werden, dass IL17 einen Einfluss auf die chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis hin zu mehr MMP3, MMP17 und IL6 besitzt, was zur Veränderung des Milieus im Knie der Patienten mit rheumatoider Arthritis beitragen könnte. Die gleichzeitige signifikante Steigerung der relativen NFkB-mRNA-Expression lässt seine Beteiligung an den Signaltransduktionswegen von MMP3, MMP17 und IL6 vermuten.
- 6.) Für IL6 und MMP3 konnte exemplarisch mit der Immunfluoreszenz und dem Western Blot gezeigt werden, dass neben den mRNA-Sequenzen auch die jeweiligen Proteine in den Zellen synthetisiert werden.
- 7.) Die Western Blot Ergebnisse für MMP3 lassen im Vergleich von stimulierten zu nicht stimulierten chondrogenen Vorläuferzellen den Schluß zu, dass neben der mRNA von MMP3 auch das Protein in den Zellen nach der IL17-Stimulation vermehrt vorliegt.
- 8.) Ein IL17-Antikörper ist in der Lage den Stimulationseffekt von IL17 auf die relative IL6-mRNA-Expression zu blocken und bestätigt damit, dass allein IL17 für die beobachteten Veränderungen der relativen mRNA-Expressionen verantwortlich ist.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von IL17 auf die Zellproliferation von chondrogenen Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurde das Verhalten chondrogener Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis unter normal und IL17-Stimulationsbedingungen im Hinblick auf ihre Rolle in der rheumatischen Arthritis untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit IL17 das Wachstumsverhalten der untersuchten chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis signifikant zu verringern vermag (s. 4.1.3). Der exponentielle Wachstumscharakter der chondrogenen Vorläuferzellen konnte durch die IL17-Stimulation jedoch nicht dauerhaft verändert werden. Eine Unterdrückung des Wachstums zeigte sich lediglich in den ersten drei Tagen der Zellkultur (s. 4.1.3). Die Vermutung liegt nahe, dass IL17 die Zellproliferation nur zeitlich begrenzt beeinflusst. Dies kann möglicherweise durch einen erhöhten Stoffwechsel in den chondrogenen Vorläuferzellen nach IL17-Stimulation erklärt werden. Möglich wäre es auch, dass die Zellen den IL17-Rezeptor nach einigen Tagen der IL17-Stimulation aktiv herunter regulieren, als Reaktion auf die erhöhte Zytokineinwirkung. Die IL17-Wirkung auf die Zellen wäre dann im weiteren Verlauf verringert und die Zellproliferation könnte wieder in normalen Teilungszyklen ablaufen. Hinweise auf diesen Zusammenhang ergab eine siebentägige IL17-Stimulationsreihe, in der nur an jedem zweiten Tag das IL17-Stimulationsmedium gewechselt wurden. Die Auswertung nach sieben Tagen zeigte auf mRNA-Ebene in den stimulierten Zellen eine geringere IL17-Rezeptorkonzentration für IL17RC verglichen mit nicht stimulierten Zellen. Diese Ergebnisse konnten jedoch noch nicht eindeutig wiederholend bestätigt werden, so dass diese Daten hier nicht gezeigt werden. Der Zusammenhang der IL17-Wirkung auf das Proliferationsverhalten der in der rheumatoiden Arthritis lokal ansässigen Zellen ist so noch nicht ausreichend geklärt. Die Einwirkungen der IL17-Stimulation auf die Proliferationsabläufe der chondrogenen Vorläuferzellen auch von Patienten mit rheumatoider Arthritis bedarf so zukünftig noch weiterer Untersuchungen.

5.2 Einfluss der chondrogenen Vorläuferzellen auf inflammatorische Prozesse in der rheumatoiden Arthritis

In vorherigen Untersuchungen an Knorpelgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten chondrogene Vorläuferzellen mit Stammzellcharakter isoliert und charakterisiert werden. Diese Zellen ähneln sehr stark den bereits für die Osteoarthrose entdeckten chondrogenen Vorläuferzellen, die auch „*chondrocyte progenitor cells*“ genannt werden (Koelling et al. 2009). Sie weisen Oberflächenmarker in Form von CDs auf, die typisch für chondrogene Stammzellen sind. Die Möglichkeit zu ihrer Differenzierung in Chondrozyten, Adipozyten und auch Osteozyten deutet zusätzlich auf ihren Stammzellcharakter hin (Koelling et al. 2009). Noch nicht untersucht wurde, inwieweit chondrogene Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis inflammatorische Mediatoren wie IL6 und IL1, TNF \pm , NF κ B sowie die Matrix-Metalloproteinasen MMP3, MMP14, MMP15 und MMP17 synthetisieren und damit eventuell an der Erkrankung aktiv beteiligt sind. Die Synthese dieser oben genannten Mediatoren konnte in dieser Arbeit mit Ausnahme von TNF \pm in den chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis demonstriert werden und unterstreicht die mögliche Beteiligung der chondrogenen Vorläuferzellen an entzündlichen Prozessen in der rheumatoiden Arthritis (s. 4.2). So scheinen chondrogene Vorläuferzellen neben einer möglichen Regenerationsfunktion, des in der rheumatoiden Arthritis zerstörten Knorpelgewebes (Koelling and Miosge 2009), auch proinflammatorische Effekte durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie IL6 und IL1 einzunehmen. IL17 vermag die Synthese einiger proinflammatorischer Zytokine in den chondrogenen Vorläuferzellen zu erhöhen. Dies konnte z.B. für IL6, MMP3 und MMP17 gezeigt werden (s. 4.2.2, s. 4.2.3). MMP14 und MMP15 zeigten sich dabei von der IL17-Stimulation nicht signifikant beeinflusst (s. 4.2.3). IL17 scheint so durch unterschiedliche Wirkungen auf die jeweiligen MMPs das Verhältnis der Matrix-Metalloproteinasen in den chondrogenen Vorläuferzellen hin zu mehr MMP3 und MMP17 zu verschieben. Dies könnte im weiteren Verlauf wiederum den Auf- und Abbau der Knorpelmatrix verändern. Die Wirkung der IL17-Stimulation auf die jeweiligen Mediatoren in den chondrogenen Vorläuferzellen soll nun im Einzelnen erörtert werden.

5.3 Einfluss von IL17 auf die Synthese von IL6 in chondrogenen

Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von IL17 auf die Synthese von IL6 in chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht und es konnte zunächst gezeigt werden, dass chondrogene Vorläuferzellen IL6 synthetisieren (s. 4.2). Weiter zeigte sich, dass die IL17-Stimulation die Menge an IL6 in den chondrogenen Vorläuferzellen auf mRNA-Ebene erhöhte (s. 4.2.2). Das Protein IL6 konnte zudem auf Proteinebene in den Zellen nachgewiesen werden (s. 4.3, s. 4.4). Der Effekt der gesteigerten IL6-Produktion durch IL17-Stimulation in der rheumatoiden Arthritis wurde bereits für Chondrozyten, FLS „*fibroblast like cells*“ und Synoviozyten beobachtet (Shalom-Barak et al. 1998; Georganas et al. 2000; Hwang et al. 2004; Agarwal et al. 2008). So konnte nun gezeigt werden, dass chondrogene Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis auf IL17-Stimulation ähnlich wie Chondrozyten und synoviale Fibroblasten reagieren.

IL17 unterstützt den proinflammatorischen Effekt der chondrogenen Vorläuferzellen in der rheumatoiden Arthritis durch die erhöhte Produktion von IL6 (s. 4.2.2). Dabei korrelierte jede IL17-Konzentration je mit einer bestimmten IL6-mRNA-Konzentration in den chondrogenen Vorläuferzellen (s. 4.2.2). Da nun IL6 eine zentrale Rolle in der Differenzierung von T-Helferzellen hin zu Th17-Zellen einnimmt (Kimura and Kishimoto 2010), scheint IL17 über die erhöhte Synthese von IL6 die Differenzierung der Th17-Zellen und somit deren lokale Anreicherung im betroffenen Gelenk voranzutreiben. Die Th17-Zellen synthetisieren daraufhin wiederum vermehrt IL17. In diesem Zusammenhang scheint IL6 so die IL17 Synthese über eine positive Rückkopplung über eine erhöhte Th17-Zelldifferenzierung zu verstärken. Auf diese Weise ließe sich die beobachtete erhöhte Konzentration von Th17-Zellen im Gelenk von Patienten mit rheumatoider Arthritis verglichen mit ihrer Konzentration im Blut erklären (Shahrara et al. 2008). In Gelenk von Patienten mit rheumatoider Arthritis treffen die Th17-Zellen und deren Zytokin IL17 auf Zellen, die durch IL17 zur gesteigerten IL6-Synthese angeregt werden können. IL6 führt daraufhin zur gesteigerten Differenzierung von Th17-Zellen. Th17-Zellen scheinen auf ein bestimmtes Umgebungsmilieu angewiesen zu sein, um sich dort anzureichern. Dies scheint insbesondere in Autoimmunprozessen wie der rheumatoiden Arthritis der Fall zu sein. Auf gleiche Weise ließe sich die erhöhte IL17-Konzentration in der synovialen Flüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis verglichen mit deren jeweiliger Serumkonzentration im Blut erklären (Shahrara et al. 2008; Moran et al. 2009). Diese lokal proliferative Ansammlung von Th17-Zellen mit dessen

Hauptzytokin IL17 könnte zum Fortschreiten der Entzündung und der Gelenkszerstörung im Gelenk der Patienten mit rheumatoiden Arthritis beitragen.

IL6 scheint aber auch direkt an den entzündlichen und knorpelzerstörenden Prozessen in der rheumatoiden Arthritis beteiligt zu sein. Seine vermehrte Produktion in den chondrogenen Vorläuferzellen durch IL17-Stimulation (s. 4.2.2) könnte somit auch direkt Einfluss auf die Prozesse in der rheumatoiden Arthritis nehmen. In diesem Zusammenhang konnte für IL6-Knockout-Mäuse gezeigt werden, dass die Abwesenheit von IL6 komplett vor der „*collagen induced arthritis*“ (CIA), einem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis, schützt (Alonzi et al. 1998). Im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten erhöhte Konzentrationen von IL6 verglichen mit Werten der Osteoarthritis und mit Werten normaler Kontrollprobanden gemessen werden (Houssiau et al. 1988; Guerne et al. 1989; de Benedetti et al. 1991). Dies stärkt den engen Zusammenhang von IL6 mit dem Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis.

IL6 fördert die Osteoklastengnese durch die erhöhte Produktion des aktivierenden Rezeptorliganden für den NFκB-Rezeptor (RANKL) „*receptor activator of NFκB ligand*“, was dann zu einem vermehrten Knochenabbau führt (Nakashima et al. 2000). In diesem Zusammenhang konnte für die juvenile idiopathische Arthritis, einer kindlichen Frühform der rheumatoiden Arthritis, gezeigt werden, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Kinder negativ mit der im Serum vorhandenen IL6-Konzentration assoziiert ist (Souza et al. 2008). Zudem konnte 2010 von Milman gezeigt werden, dass die Plasmakonzentration von IL6 signifikant mit der klinischen Aktivität der rheumatoiden Arthritis korreliert (Milman et al. 2010). Aktuell wird IL6 zusammen mit ACPA sogar als möglicher Marker für das Fortschreiten der Knochendestruktion in der frühen rheumatoiden Arthritis vorgeschlagen (Saeki et al. 2012). Man geht heute davon aus, dass IL6 direkt an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt ist und damit das Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis erheblich vorantreibt. Neue Therapiekonzepte, die den IL6-Rezeptor über Antikörper blocken, haben aufgrund dieser Überlegungen Einzug in die Behandlung der rheumatoiden Arthritis gehalten (Woodrick and Ruderman 2010; Karsdal et al. 2012).

IL6 scheint direkt z.B. über die Anregung von Osteoklasten den Knochenabbau zu fördern und zudem auch indirekt die Entzündung über die Aufrechterhaltung der IL17-Konzentration, ausgelöst durch die erhöhte Th17-Zelldifferenzierung, im Gelenk voranzutreiben. Hieran sind unter anderem auch die chondrogenen Vorläuferzellen beteiligt. Die chondrogenen Vorläuferzellen sind dabei durch die Produktion von IL6 sowohl direkt als auch indirekt am Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis beteiligt. Dieser Effekt lässt sich durch die IL17-

Stimulation dieser Zellen in Richtung erhöhter IL6-Synthese weiter vorantreiben (s. 4.2.2).

So reagieren chondrogene Vorläuferzellen ähnlich wie andere an der rheumatoiden Arthritis beteiligte Zellen, wie Fibroblasten und Chondrozyten, im Hinblick auf die IL17-Stimulation. Dies wiederum steht im Einklang mit den erhobenen Ergebnissen der IL17-Wirkung in der rheumatoiden Arthritis (Koshy et al. 2002; Moran et al. 2009). Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass IL17 in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht vorliegt. Die IL17-Wirkung auf die dort ansässigen Zellen wie auch auf die in dieser Arbeit untersuchten chondrogenen Vorläuferzellen scheint eine zentrale Rolle im Fortschreiten der Entzündung in der rheumatoiden Arthritis zuzukommen (Shahrara et al. 2008; Moran et al. 2009). Ob diese Wirkung nun über einen Art Rückkopplung mit IL6 fortbesteht, oder ob eher die direkte Wirkung von IL6 auf die Knochensynthese zur Progression in der rheumatoiden Arthritis beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt und sollte weiterhin untersucht werden.

5.4 Einfluss von IL17 auf die Synthese von MMP3 in chondrogenen Vorläuferzellen

Chondrogene Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis synthetisieren die Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3). Dies konnte in der rheumatoiden Arthritis bereits für Chondrozyten und synoviale Fibroblasten gezeigt werden (Shalom-Barak et al. 1998; Cai et al. 2001a; Koshy et al. 2002; Agarwal et al. 2010). Weiter konnte dort gezeigt werden, dass die Syntheserate von MMP3 in den jeweiligen Zellen von Mediatormolekülen wie IL17 aber auch TLR-Liganden signifikant gesteigert werden kann (Agarwal et al. 2010). In diesem Zusammenhang konnte für chondrogene Vorläuferzellen demonstriert werden, dass IL17 die MMP3-Syntheserate auch in diesen Zellen signifikant erhöht (s. 4.2.3). Dies wurde zudem auf Proteinebene bestätigt (s. 4.3 und s. 4.4). Dies unterstreicht die in 5.3 bereits für IL6 gezeigten Ähnlichkeiten im Verhalten von chondrogenen Vorläuferzellen verglichen mit Chondrozyten und synovialen Fibroblasten. Beide Zelltypen reagierten auf die IL17-Stimulation mit einer gesteigerten MMP3-Synthese.

MMP3 und IL17 sind eng mit der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis verknüpft. So konnte für IL17-Knockout-Mäuse gezeigt werden, dass sie eine gestörte MMP3-Synthese aufweisen und so weniger MMP3 produzieren (Koenders et al. 2005). Untersuchungen der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigten signifikant höhere MMP3-Konzentrationen verglichen mit Patienten mit Osteoarthritis, einer ebenfalls auf

Knorpel- und Knochenabbau basierenden Gelenkserkrankung (Yoshihara et al. 2000). Dies unterstreicht den besonderen Bezug von MMP3 zur rheumatoiden Arthritis. Es konnte dann weiter gezeigt werden, dass die MMP3-Konzentration im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit dem Grad der Gelenkszerstörung in der frühen rheumatoiden Arthritis assoziiert ist (Yamanaka et al. 2000). MMP3 wurde daraufhin als möglicher zusätzlicher Marker für das Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis vor allem auf radiologischer Ebene vorgeschlagen und untersucht (Tchetverikov et al. 2003; Mamehara et al. 2010; Houseman et al. 2012).

Der enge Zusammenhang von MMP3 mit dem Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis wird zudem deutlich, wenn man die Funktionen und Substrate der MMP3, die früher auch Stromelysin-1 genannt wurde (Yoshihara et al. 2000; Visse and Nagase 2003; Koenders et al. 2005), untersucht. So konnte gezeigt werden, dass MMP3 in der Lage ist, andere MMPs zu aktivieren und die generelle Collagenaseaktivität im Knorpelgewebe heraufzusetzen (Murphy et al. 1987; Unemori et al. 1991). Die erhöhte Aktivität der MMPs, die als Schlüsselmediatoren für den Abbau von Knorpelmatrix gelten (Murphy and Lee 2005), vermag so den Knorpelabbau in der rheumatoiden Arthritis selbst direkt und indirekt über andere MMPs voranzutreiben. Zudem konnten spezifische Haplotypen für MMP3 gefunden werden, die mit dem radiologischen Bild der Gelenkszerstörung in der rheumatoiden Arthritis verbunden sind (Dorr et al. 2004). Haplotypen sind Variationen von Nukleotidsequenzen im menschlichen Genom auf denselben Chromosomen. Die Unterschiede dieser Nukleotidsequenzen scheinen die MMP3-Funktion beeinflussen zu können.

Diese Arbeit konnte die erhöhte MMP3-Synthese durch die IL17-Stimulation in den chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis belegen, wohingegen andere MMPs wie MMP14 und MMP15 nicht durch IL17 beeinflusst wurden (s. 4.2.3). MMPs stehen in ständigem Gleichgewicht untereinander und mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix (Mott and Werb 2004). Eine Erhöhung der MMP3-Konzentration durch die IL17-Stimulation verschiebt dieses Gleichgewicht somit in Richtung mehr MMP3-Aktivität. Diese erhöhte Aktivität löst ein Vielzahl von Reaktionen aus, die dann zur beobachteten Gelenkszerstörung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis führen (Yamanaka et al. 2000; Tchetverikov et al. 2003). In dieser Folgekette spielen neben den Chondrozyten und Fibroblasten nun auch die chondrogenen Vorläuferzellen als Produzenten von MMP3 eine besondere Rolle.

Vermutet wird in diesem Zusammenhang, dass chondrogene Vorläuferzellen allein gesehen keine knorpelzerstörende Wirkung in der rheumatoiden Arthritis besitzen, sondern dass diese

erst durch die erhöhte IL17-Konzentration in der Synovialflüssigkeit (Blaschke et al. 2003b; Shahrara et al. 2008; Moran et al. 2009) und durch das daraus resultierende Ungleichgewicht der Matrix-Metalloproteinasen daran beteiligt sind.

IL17 wird von lokal ansässigen Th17-Zellen produziert, die ebenfalls in einer erhöhten Konzentration im entzündeten Gelenk anzutreffen sind (Shahrara et al. 2008). Es kann vermutet werden, dass gerade diese Th17-Zellen über ihr Zytokine IL17 die Entzündung und die Knorpelzerstörung in der rheumatoiden Arthritis vorantreiben. In vielen Zellen, so wie auch in den chondrogenen Vorläuferzellen, kommt es daraufhin zu teils unterschiedlichen Effekten, die dann in ihrer Summe Entzündung und Knorpel- bzw. Knochenabbau auch über die MMP3-Wirkung in der rheumatoiden Arthritis vorantreiben. In diesem Zusammenhang scheinen also auch die chondrogenen Vorläuferzellen unter Anderem über ihre Produktion von MMP3 eine Rolle zu spielen.

5.5 Einfluss von IL17 auf die Synthese von membranständigen Matrix-Metalloproteinasen in chondrogenen Vorläuferzellen

Allgemein lässt sich zu membranständigen Matrix-Metalloproteinasen (MT-MMP) sagen, dass sie sich in zwei Gruppen unterteilen lassen: Den Typ 1 MT-MMPs zu denen MMP14 (MT1-MMP), MMP15 (MT2-MMP), MMP16 und MMP24 gehören und den Typ 2 MT-MMPs zu denen MMP17 (MT4-MMP) und MMP25 gehören. Sie unterscheiden sich durch eine Glycosylphosphatidylinositol-Gruppe (GPI), die nur in den Typ 2 MT-MMPs vorzufinden ist (Itoh et al. 1999). In den Versuchsreihen sind sowohl die Typ 1 MT-MMPs MMP14 und MMP15 als auch auf die Typ 2 MT-MMP MMP17 untersucht worden. Dabei konnte in dieser Arbeit zunächst demonstriert werden, dass chondrogene Vorläuferzellen die mRNA-Sequenzen der drei untersuchten MT-MMPs (MMP14, MMP15, MMP17) synthetisieren (s. 4.2.3).

Die MT-MMPs wurden in der Forschung zunächst in Verbindung zum Tumorgeschehen bei Brusttumorzellen und dessen Progression gebracht, wo sie die Invasionsfähigkeit der Metastasierung und die Angiogenese befähigen sollen (Chabottaux et al. 2006; Chabottaux et al. 2009). Aber auch in der rheumatoiden Arthritis wurden diese speziellen MT-MMPs bereits untersucht und deren Expression z.B. in synovialen Fibroblasten gezeigt, wo sie gegenüber nicht erkrankten Patienten deutlich erhöht vorzufinden waren (Pap et al. 2000; Rutkauskaite et al. 2005). So scheinen diese MT-MMPs auch an den Prozessen der rheumatoiden Arthritis beteiligt zu sein.

Dabei scheint MMP14 in der rheumatoiden Arthritis vor allem die Invasion von Zellen

voranzutreiben. MMP14 (MT1-MMP) gilt als wichtiger Unterstützer der synovialen Invasion in der rheumatoiden Arthritis (Miller et al. 2009). Die Reduktion der MMP14 Konzentration führt so zu reduzierter Invasivität der synovialen Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis (Rutkauskaitė et al. 2005). Außerdem ist MMP14 in der Migration von dendritischen Zellen involviert, einer ebenfalls am Entzündungsgeschehen in der rheumatoiden Arthritis beteiligten Zellgruppe (Yang et al. 2006). Weitere Anhaltspunkte, die MT-MMPs mit der rheumatoiden Arthritis in Verbindung bringen, ergaben sich bei der Betrachtung der Funktion von MMP17, einer ebenfalls in chondrogenen Vorläuferzellen nachgewiesenen MT-MMP (s. 4.2). MMP17 besitzt fibrinolytische Aktivität und vermag zudem die TNF \pm -Konvertase-Aktivität zu erhöhen (English et al. 2000). Somit kommt MMP17 über die Erhöhung der TNF \pm -Aktivität wohl auch eine direkte proinflammatorische Wirkung in der rheumatoiden Arthritis zu.

Die Tatsache, dass die drei MT-MMPs MMP14, MMP15 und MMP17 in chondrogenen Vorläuferzellen exprimiert werden (s. 4.2), könnte eine mögliche Erklärung dazu geben, warum chondrogene Vorläuferzellen eine so große Migrationsfähigkeit verglichen mit lokal ansässigen Chondrozyten besitzen (Koelling et al. 2009). Durch Expression von MT-MMPs könnten chondrogene Vorläuferzellen in die Lage versetzt werden, aus solidem Knorpelgewebe auszuwachsen und in krankes Knorpelgewebe zu migrieren, wo sie dann eventuell zur Knorpelregeneration beitragen (Koelling et al. 2009).

Die Expression von membranständigen MMPs bei anderen Zellen in der rheumatoiden Arthritis wie den Chondrozyten, den Fibroblasten oder den Makrophagen ist noch nicht untersucht worden. Solche Untersuchungen könnten, im Vergleich zu den in dieser Arbeit gewonnenen Daten aus chondrogenen Vorläuferzellen, den Zusammenhang der MT-MMPs mit der Migrationsfähigkeit von Zellen in der rheumatoiden Arthritis weiter aufklären.

Um einen möglichen Einfluss von IL17 auf die Expression von eben diesen MT-MMPs zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von IL17 auf die Synthese der MT-MMPs untersucht. Hier ergab die IL17-Stimulation eine signifikante Steigerung der MMP17-Synthese nicht jedoch der beiden anderen MT-MMPs MMP14 und MMP15 (s. 4.2.3). Ob IL17 einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von chondrogenen Vorläuferzellen besitzt ist so noch nicht endgültig geklärt, wohl jedoch, dass IL17 durch die erhöhte Expression von MMP17 direkt zum Fortschreiten der Entzündung und Knorpelzerstörung in der rheumatoiden Arthritis beiträgt. Denn zum einen ist MMP17 selbst befähigt durch die Verstärkung der TNF \pm -Wirkung in die Entzündungsprozesse einzugreifen (English et al. 2000) und zum anderen vermag MMP17 die Aggrecanase-1 (ADAMTS4) zusammen mit anderen Faktoren zu aktivieren (Gao et al. 2004). Es wird in diesem Zusammenhang

vermutet, dass ADAMTS4 und MMP17 (MT4-MMP) an der Aggrecanolyse im Knorpel beteiligt sind (Patwari et al. 2005). Aggrecan ist neben Proteoglykanen eines der wichtigsten Bausteine der Knorpelmatrix und wird ebenfalls von den chondrogenen Vorläuferzellen synthetisiert (s. 4.2). ADAMTS1 ADAMTS4 und ADAMMTS5 spalten Aggrecan an einer anderen Stelle als die MMPs (Nagase and Kashiwagi 2003), was die Notwendigkeit des Zusammenwirkens beider Enzymgruppen unterstreicht.

Die These, dass IL17 den Knorpelabbau in der rheumatoiden Arthritis durch Aggrecanolyse über MMPs wie z.B. MMP17 vorantreibt wird somit unterstützt (Cai et al. 2001b). Chondrogene Vorläuferzellen nehmen daran womöglich durch die Expression der membranständigen MMP17 teil, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (s. 4.2.3). Es ist zu vermuten, dass MT-MMPs für die Migrationsfähigkeit der chondrogenen Vorläuferzellen sorgen. Das unterschiedliche Ansprechen der einzelnen MT-MMP auf die IL17-Stimulation dieser Zellen unterstützt die Vermutung, dass IL17 nur auf Funktionsabläufe einiger MMPs einwirken kann. Insgesamt wird so das Aktivitätsverhältnis der MMPs durch IL17 verschoben. Diese These konnte hier anhand von MMP3, MMP14, MMP15 und MMP17 unterstützt werden. Denn nur MMP3 und MMP17 nicht jedoch MMP14 und MMP15 lassen sich durch die IL17-Stimulation in ihrer Synthese beeinflussen (s. 4.2.3). Die Untersuchung weiterer MMPs auf ihr Verhalten hinsichtlich der IL17-Stimulation könnte hier weiter vielversprechende Ergebnisse liefern.

5.6 Beteiligung von NF^o B im Signaltransduktionsweg von IL17

In dieser Arbeit konnte an chondrogenen Vorläuferzellen gezeigt werden, dass durch IL17-Stimulation die NF^o B-Konzentration in chondrogenen Vorläuferzellen signifikant ansteigt (s. 4.2.4). Es wird schon lange vermutet, dass NF^o B eine zentrale Rolle in der Modulation von entzündlichen Prozessen in der rheumatoiden Arthritis zukommt. Die Zahl der durch NFkB beeinflussten Gene, die Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, zelluläre Liganden und Adhäsionsmoleküle kodieren, wächst stetig an (Muller-Ladner et al. 2002). Viele dieser Gene, bei deren Translation NF^o B eine Rolle spielt, wie z.B. TNF[±] und IL1 spielen in der Pathologie der rheumatoiden Arthritis eine zentrale Rolle (Jue et al. 1999; Muller-Ladner et al. 2002). So konnte für Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden, dass NF^o B essentiell an der Expression von IL6 beteiligt ist (Georganas et al. 2000). Dies wurde erneut von Hwangs et al. bestätigt und zudem durch Blockung von NF^o B in den Zellen demonstriert, dass die durch IL17-Stimulation induzierte IL6-Expression auf NF^o B

angewiesen ist (Hwang et al. 2004). Der Zusammenhang der IL17-Stimulation und deren induzierte Gen-Expressionen über NF κ B konnte auch für Chondrozyten gezeigt werden (Shalom-Barak et al. 1998). In dieser Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass IL17 die NF κ B mRNA-Konzentration in den chondrogenen Vorläuferzellen signifikant erhöht (s. 4.2.4). Die IL17-Stimulation führte neben dem Anstieg der NF κ B-mRNA-Konzentration auch zu einem Anstieg der IL6-Konzentration in den chondrogenen Vorläuferzellen. Das lässt vermuten, dass IL17 über den Transkriptionsfaktor NF κ B die Erhöhung der IL6-Konzentration herbeiführt, denn es scheint klar, dass NF κ B als Transkriptionsfaktor von IL6 fungiert (Hwang et al. 2004). Dieser Zusammenhang ist jedoch wahrscheinlich auch von anderen Transkriptionsfaktoren abhängig und ist daher noch nicht abschließend geklärt, so dass weitere Versuche z.B. in Form von NF κ B-Inhibitionsversuchen, dieses weiterhin untersuchen könnten.

In der rheumatoiden Arthritis führt IL17 an chondrogenen Vorläuferzellen auch über die Erhöhung der NF κ B-Konzentration, die wiederum für die vermehrte Freisetzung vieler anderer proinflammatorischer Mediatoren in der rheumatoiden Arthritis verantwortlich ist, zu einem Fortschreiten der Erkrankung. Ob NF κ B auch einen Einfluss auf die Expression der MMP3 besitzt, kann ebenfalls vermutet werden, da beide Konzentrationen durch die IL17-Stimulation signifikant ansteigen. Hierfür finden sich jedoch noch keine Ergebnisse in der bisherigen Forschung.

5.7 IL17-Antikörper blocken die IL6 induzierende Wirkung von IL17 auf chondrogene Vorläuferzellen

Alle oben genannten Ergebnisse lassen eine zentrale Rolle von IL17 in der rheumatoiden Arthritis vermuten. IL17 steigerte in den chondrogenen Vorläuferzellen die Synthese von NF κ B, IL6, MMP3 und MMP17 (s. 4.2), die alle auf ihre Weise Einfluss auf das Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis nehmen. Teilweise drücken sich diese Effekte auch in Synergien mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF \pm aus (Van Bezooijen et al. 2002). Neue Einblicke in die T-Zell-Biologie stellen die Untergruppen der T-Helferzellen und deren Zytokine als mögliche zukünftige Therapieansatzpunkte zur Bekämpfung von autoimmun-entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, dar (Steward-Tharp et al. 2010). Unter diesen Zellen befinden sich unter anderem die Th17-Zellen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass über einen zukünftigen Therapieansatz mit dem Ziel der Blockung von IL17 in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis nachgedacht wird (Ivanov and Linden 2009; van den Berg and Miossec 2009; Sarkar and Fox 2010).

In dieser Arbeit konnte hierzu gezeigt werden, dass sich der induzierende Effekt von IL17 auf die IL6-Synthese in den chondrogenen Vorläuferzellen durch einen IL17-Antikörper signifikant hemmen lässt (s. 4.5). Da IL6 einen proinflammatorischen Einfluss auf die rheumatoide Arthritis nimmt (Alonzi et al. 1998; Nakashima et al. 2000; Souza et al. 2008), mag die Blockung von IL17 somit einen vielversprechenden Therapieansatz für diese Erkrankung darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese These jedenfalls.

Erste Ergebnisse einer klinischen Studie, in der bereits IL17-Antikörper zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wurden, lieferten bereits erste Erkenntnisse (Genovese et al. 2010). Ob IL17-Antikörper als Ersatzmedikation bei nicht ansprechender Anti-TNF \pm Therapie oder in Synergie mit Ihnen zukünftig in der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden können, bleibt jedoch noch abzuwarten. Es gilt, dies in den nächsten Jahren herauszufinden.

5.8 Klinische Relevanz

Diese Arbeit befasst sich anhand von Synthese- und IL17-Stimulationsversuchen mit den möglichen Wirkungen chondrogener Vorläuferzellen an der rheumatoiden Arthritis. Dabei konnten Hinweise auf eine mögliche proinflammatorische Wirkung von IL17 herausgestellt werden. Dies mag zunächst Konzepte in der Therapie der rheumatoiden Arthritis aufzeigen.

Die spezifische Therapie der rheumatoiden Arthritis besteht aktuell aus einer Basistherapie mit DMARD und deren wichtigsten Vertreter Methotrexat (MTX) und eventuellen Kombination mit einem Biological, das gegen proinflammatorische Zytokine wie IL1, IL6 oder TNF \pm gerichtet ist (Smolen et al. 2010). Ziel ist jeweils die Remission der Erkrankung zu erreichen.

Es hat sich dabei herausgestellt, dass eine frühzeitige intensiviertere Behandlung den größten langfristigen Erfolg zeigt. So sollte MTX schon zu Beginn einer gesicherten Erkrankung eingesetzt werden, wenn nötig in Kombination mit einem Glukokortikoid oder mit einem weiteren DMARD wie z.B. mit Leflunomid und Sulfasalazin. Als nächste Therapiestufe wird die Kombination von Methotrexat mit dem Biological TNF \pm -Antikörper empfohlen (Smolen et al. 2010). Da die TNF \pm -Antikörper Therapie in der rheumatoiden Arthritis bei vielen Patienten nicht ausreichend anspricht (Du Pan et al. 2009) ist nach neuen Ersatzpräparaten Ausschau gehalten worden. So fanden IL6-Rezeptor-Antikörper sowie CD20-Antikörper ihren Weg in die Therapie der rheumatoiden Arthritis.

IL17 scheint zukünftig nun ein weiteres vielversprechendes Angriffsziel in der rheumatoiden Arthritis darzustellen (Ivanov and Linden 2009; van den Berg and Miossec 2009; Sarkar and Fox 2010). So zeigten sich auch in Tierversuchen positive Therapieergebnisse mit der IL17-Antikörperbehandlung in einem Model der rheumatoiden Arthritis (Lubberts et al. 2004; Chao et al. 2010). Wegen der schon bekannten Wirkungen von IL17 auf die Zellen in der rheumatoiden Arthritis wurde dann dieses Therapiekonzept auf klinischen Studien übertragen. LY2439821, ein monoklonaler humanisierter IL17-Antikörper, zeigte in einer Phase-1-klinischen-Untersuchung, einer placebokontrollierten doppel-blind Studie, bereits erste Ergebnisse (Genovese et al. 2010). Diese Arbeit unterstützt ein solches Therapiekonzept, denn auch hier konnte gezeigt werden, dass IL17 in chondrogenen Vorläuferzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis inflammatorische Mediatoren zu verstärken vermag (s. 4.2). Außerdem konnte in vitro die Wirkung von IL17 auf die IL6-Synthese in chondrogene Vorläuferzellen durch IL17-Antikörper effektiv geblockt werden (s. 4.5).

So könnten die IL17-Antikörper, über die Unterdrückung der induzierten IL6-Synthese, die durch IL6 induzierte Th17-Zell Differenzierung ausschalten und so den Krankheitsverlauf in

der rheumatischen Arthritis schon im Ansatz hemmen. Der Einsatz von IL17-Antikörpern in der rheumatoiden Arthritis könnte somit eine Therapiealternative darstellen, die sich in den nächsten Jahren noch weiter unter Beweis stellen muss.

Da IL17 die Konzentration von IL6 und MMP3 erhöht, könnten diese Moleküle mögliche Marker für eine erfolgreiche IL17-Therapie darstellen. In der rheumatoiden Arthritis sind Markermoleküle wie Rheumafaktor und Antikörper gegen citrullinierte Proteine schon länger etabliert (Funovits et al. 2010; Mok et al. 2010). MMP3 scheint nun ebenfalls als Markermoleküle speziell für das radiologischen Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis zu stehen (Yamanaka et al. 2000; Mamehara et al. 2010; Houseman et al. 2012), so dass MMP3 in Zukunft, eventuell mit den alt bewährten Markern in der Therapieverlaufskontrolle Einsatz finden könnte. In dieser Arbeit konnte dazu gezeigt werden, dass auch die chondrogenen Vorläuferzellen der Patienten mit rheumatoider Arthritis diese Metalloproteinase MMP3 synthetisieren (s. 4.2). Die gewonnenen Zellen stammten von Patienten, deren Erkrankung bereits so weit fortgeschritten war, dass sie sich eine Knieersatzoperation unterziehen mussten. MMP3 hätte sich auch hier als Marker für starke Knochenschäden in der rheumatoiden Arthritis angeboten.

Chondrogene Vorläuferzellen vermögen in erkranktes Knorpelgewebe einzuwandern, um dort eventuell eine Knorpelregeneration auf niedrigem Niveau zu induzieren. Hinweise auf mögliche Mechanismen für diese Migrationsfähigkeit der chondrogenen Vorläuferzellen über die membranständigen MMPs, MMP14, MMP15 und MMP17, konnte durch diese Arbeit gewonnen werden. Könnte man diesen Effekt verstärken oder die Differenzierung eben dieser Zellen in intakte Chondrozyten induzieren, könnten diese Zellen Ziele kommender Therapiekonzepte darstellen.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte die Rolle der chondrogenen Vorläuferzellen in der rheumatoiden Arthritis. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass chondrogene Vorläuferzellen proinflammatorische Zytokine wie IL6, NF κ B und IL1 synthetisieren. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Matrix-Metalloproteinasen MMP3, MMP14, MMP15, MMP17 sowie Aggrecan, TIMP3, MAPK1 und ADAMTS-S-5 in diesen Zellen exprimiert werden. Dabei kommen den Mediatoren IL6, IL1 und MMP3 und somit auch den chondrogenen Vorläuferzellen proinflammatorische Wirkungen in der rheumatoiden Arthritis zu. Die membranständigen Matrix-Metalloproteinasen MMP14, MMP15 und MMP17 scheinen hingegen eher die Migration der chondrogenen Vorläuferzellen zu unterstützen.

Der Einfluss von IL17 auf die Expression dieser Mediatoren wurde untersucht und zeigte eine Steigerung der Syntheserate für IL6, MMP3 und MMP17 sowie für den Transkriptionsfaktor NF κ B. Außerdem vermag IL17 die generelle Zellproliferation der chondrogenen Vorläuferzellen im Besonderen in den ersten drei Tagen der Zellkultur zu stören. Somit wurde erneut gezeigt, dass IL17 in der Pathologie der rheumatoiden Arthritis eine zentrale proinflammatorische Wirkung zukommt. Hierbei scheinen nun auch die chondrogenen Vorläuferzellen besonders durch die Stimulation mit IL17 beteiligt zu sein. Antikörperversuche zur Blockung des IL17-Effekts auf chondrogene Vorläuferzellen zeigten einen verminderten Effekt der IL17-Stimulation auf die IL6-Synthese und unterstützen die Möglichkeit eines Einsatzes von IL17-Antikörpern in der Therapie der rheumatoiden Arthritis. Eventuell lassen sich zukünftig die chondrogenen Vorläuferzellen durch ihr mögliches Regenerationspotential in Therapiekonzepten der rheumatoiden Arthritis sowie der Behandlung von Knorpelschäden integrieren. Dies sollte Anlass zu weiterer Forschung auf diesem Gebiet sein.

7 Literaturverzeichnis

Agarwal, S., R. Misra and A. Aggarwal (2008): "Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases." J Rheumatol **35**(3): 515-519.

Agarwal, S., R. Misra and A. Aggarwal (2010): "Induction of metalloproteinases expression by TLR ligands in human fibroblast like synoviocytes from juvenile idiopathic arthritis patients." Indian J Med Res **131**: 771-779.

Aggarwal, S. and A. L. Gurney (2002): "IL-17: prototype member of an emerging cytokine family." J Leukoc Biol **71**(1): 1-8.

Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe and G. Hawker (2010): "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Arthritis Rheum **62**(9): 2569-2581.

Alonzi, T., E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli and G. Ciliberto (1998): "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis." J Exp Med **187**(4): 461-468.

Alsalameh, S., R. Amin, T. Gemba and M. Lotz (2004): "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." Arthritis Rheum **50**(5): 1522-1532.

Altman, R., E. Asch, D. Bloch, G. Bole, D. Borenstein, K. Brandt, W. Christy, T. D. Cooke, R. Greenwald, M. Hochberg and et al. (1986): "Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association." Arthritis Rheum **29**(8): 1039-1049.

Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi and S. Romagnani (2008): "The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation." Int Immunol **20**(11): 1361-1368.

Bakker, M. F., G. Cavet, J. W. Jacobs, J. W. Bijlsma, D. J. Haney, Y. Shen, L. K. Hesterberg, D. R. Smith, M. Centola, J. A. van Roon, F. P. Lafeber and P. M. Welsing (2012): "Performance of a multi-biomarker score measuring rheumatoid arthritis disease activity in the CAMERA tight control study." Ann Rheum Dis **71**(10): 1692-1697.

Balsa, A., A. Cabezón, G. Orozco, T. Cobo, E. Miranda-Carus, M. A. Lopez-Nevot, J. L. Vicario, E. Martín-Mola, J. Martín and D. Pascual-Salcedo (2010): "Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor." Arthritis Res Ther **12**(2): R62.

Blaschke, S., M. Koziolok, A. Schwarz, P. Benohr, P. Middel, G. Schwarz, K. M. Hummel and G. A. Müller (2003a): "Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis." J Rheumatol **30**(9): 1918-1927.

Blaschke, S., P. Middel, B. G. Dorner, V. Blaschke, K. M. Hummel, R. A. Kroczyk, K. Reich, P. Benohr, M. Koziolok and G. A. Müller (2003b): "Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotoxin and its functional role in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(7): 1858-1872.

Bukhari, M., M. Lunt, B. J. Harrison, D. G. Scott, D. P. Symmons and A. J. Silman (2002): "Erosions in inflammatory polyarthritis are symmetrical regardless of rheumatoid factor status: results from a primary care-based inception cohort of patients." Rheumatology (Oxford) **41**(3): 246-252.

Cai, H., M. E. Davis, G. R. Drummond and D. G. Harrison (2001a): "Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(10): 1571-1576.

Cai, L., J. P. Yin, M. A. Starovasnik, D. A. Hogue, K. J. Hillan, J. S. Mort and E. H. Filvaroff (2001b): "Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo." Cytokine **16**(1): 10-21.

Chabaud, M., P. Garnero, J. M. Dayer, P. A. Guerne, F. Fossiez and P. Miossec (2000): "Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis." Cytokine **12**(7): 1092-1099.

Chabottaux, V., S. Ricaud, L. Host, S. Blacher, A. Paye, M. Thiry, A. Garofalakis, C. Pestourie, K. Gombert, F. Bruyere, D. Lewandowsky, B. Tavitian, J. M. Foidart, F. Duconge and A. Noel (2009): "Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture." J Cell Mol Med **13**(9B): 4002-4013.

Chabottaux, V., N. E. Sounni, C. J. Pennington, W. R. English, F. van den Brule, S. Blacher, C. Gilles, C. Munaut, E. Maquoi, C. Lopez-Otin, G. Murphy, D. R. Edwards, J. M. Foidart and A. Noel (2006): "Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases." Cancer Res **66**(10): 5165-5172.

Chao, C. C., S. J. Chen, I. E. Adamopoulos, N. Davis, K. Hong, A. Vu, S. Kwan, L. Fayadat-Dilman, A. Asio and E. P. Bowman (2010): "Anti-IL-17A therapy protects against bone erosion in experimental models of rheumatoid arthritis." Autoimmunity **44**(3): 243-252.

de Benedetti, F., M. Massa, P. Robbioni, A. Ravelli, G. R. Burgio and A. Martini (1991): "Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **34**(9): 1158-1163.

Dong, C. and R. A. Flavell (2000): "Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses." Arthritis Res **2**(3): 179-188.

Dorr, S., N. Lechtenbohmer, R. Rau, G. Herborn, U. Wagner, B. Muller-Myhsok, I. Hansmann and G. Keyszer (2004): "Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **6**(3): R199-207.

Dowthwaite, G. P. (2004): "The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population." J Cell Sci **117**(6): 889-897.

Du Pan, S. M., S. Dehler, A. Ciurea, H. R. Ziswiler, C. Gabay and A. Finckh (2009): "Comparison of drug retention rates and causes of drug discontinuation between anti-tumor necrosis factor agents in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **61**(5): 560-568.

English, W. R., X. S. Puente, J. M. Freije, V. Knauper, A. Amour, A. Merryweather, C. Lopez-Otin and G. Murphy (2000): "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2." J Biol Chem **275**(19): 14046-14055.

Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau and S. Lebecque (1996): "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines." J Exp Med **183**(6): 2593-2603.

Franz, J. K., S. A. Kolb, K. M. Hummel, F. Lahrtz, M. Neidhart, W. K. Aicher, T. Pap, R. E. Gay, A. Fontana and S. Gay (1998): "Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **28**(9): 2661-2671.

Funovits, J., D. Aletaha, V. Bykerk, B. Combe, M. Dougados, P. Emery, D. Felson, G. Hawker, J. M. Hazes, T. Huizinga, J. Kay, T. K. Kvien, J. S. Smolen, D. Symmons, P. P. Tak and A. Silman (2010): "The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I." Ann Rheum Dis **69**(9): 1589-1595.

Gao, G., A. Plaas, V. P. Thompson, S. Jin, F. Zuo and J. D. Sandy (2004): "ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1." J Biol Chem **279**(11): 10042-10051.

Genovese, M. C., F. Van den Bosch, S. A. Roberson, S. Bojin, I. M. Biagini, P. Ryan and J. Sloan-Lancaster (2010): "LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study." Arthritis Rheum **62**(4): 929-939.

Georganas, C., H. Liu, H. Perlman, A. Hoffmann, B. Thimmapaya and R. M. Pope (2000): "Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun." J Immunol **165**(12): 7199-7206.

Goransson, M., E. Elias, A. Stahlberg, A. Olofsson, C. Andersson and P. Aman (2005): "Myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncogene induces C/EBP beta-mediated interleukin 6 expression." Int J Cancer **115**(4): 556-560.

Grogan, S. P., S. Miyaki, H. Asahara, D. D. D'Lima and M. K. Lotz (2009): "Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis." Arthritis Res Ther **11**(3): R85.

Guerne, P. A., B. L. Zuraw, J. H. Vaughan, D. A. Carson and M. Lotz (1989): "Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis." J Clin Invest **83**(2): 585-592.

Hemminki, K., X. Li, J. Sundquist and K. Sundquist (2009): "Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions." Arthritis Rheum **60**(3): 661-668.

Houseman, M., C. Potter, N. Marshall, R. Lakey, T. Cawston, I. Griffiths, S. Young-Min and J. D. Isaacs (2012): "Baseline serum MMP-3 levels in patients with Rheumatoid Arthritis are still independently predictive of radiographic progression in a longitudinal observational cohort at 8 years follow up." Arthritis Res Ther **14**(1): R30.

Houssiau, F. A., J. P. Devogelaer, J. Van Damme, C. N. de Deuxchaisnes and J. Van Snick (1988): "Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides." Arthritis Rheum **31**(6): 784-788.

Hwang, S. Y., J. Y. Kim, K. W. Kim, M. K. Park, Y. Moon, W. U. Kim and H. Y. Kim (2004): "IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways." Arthritis Res Ther **6**(2): R120-128.

Itoh, Y., M. Kajita, H. Kinoh, H. Mori, A. Okada and M. Seiki (1999): "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase." J Biol Chem **274**(48): 34260-34266.

Ivanov, S. and A. Linden (2009): "Interleukin-17 as a drug target in human disease." Trends Pharmacol Sci **30**(2): 95-103.

Jue, D. M., K. I. Jeon and J. Y. Jeong (1999): "Nuclear factor kappaB (NF-kappaB) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis." J Korean Med Sci **14**(3): 231-238.

Karouzakis, E., M. Neidhart, R. E. Gay and S. Gay (2006): "Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction." Immunol Lett **106**(1): 8-13.

Karsdal, M. A., G. Schett, P. Emery, O. Harari, I. Byrjalsen, A. Kenwright, A. C. Bay-Jensen and A. Platt (2012): "IL-6 Receptor Inhibition Positively Modulates Bone Balance in Rheumatoid Arthritis Patients with an Inadequate Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy: Biochemical Marker Analysis of Bone Metabolism in the Tocilizumab RADIATE Study (NCT00106522)." Semin Arthritis Rheum.

Kimura, A. and T. Kishimoto (2010): "IL-6: regulator of Treg/Th17 balance." Eur J Immunol **40**(7): 1830-1835.

Koelling, S., J. Kruegel, M. Irmer, J. R. Path, B. Sadowski, X. Miro and N. Miosge (2009): "Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis." Cell Stem Cell **4**(4): 324-335.

Koelling, S. and N. Miosge (2009): "Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis." Expert Opin Biol Ther **9**(11): 1399-1405.

Koenders, M. I., J. K. Kolls, B. Oppers-Walgreen, L. Van Den Bersselaar, L. A. B. Joosten, J. R. Schurr, P. Schwarzenberger, W. B. Van Den Berg and E. Lubberts (2005): "Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis." Arthritis Rheum **52**(10): 3239-3247.

Kolls, J. K. and A. Lindén (2004): "Interleukin-17 Family Members and Inflammation." Immunity **21**(4): 467-476.

Kontinen, Y. T., M. Ainola, H. Valleala, J. Ma, H. Ida, J. Mandelin, R. W. Kinne, S. Santavirta, T. Sorsa, C. Lopez-Otin and M. Takagi (1999): "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 **58**(11): 691-697.

Koshy, P. J., N. Henderson, C. Logan, P. F. Life, T. E. Cawston and A. D. Rowan (2002): "Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines." Ann Rheum Dis **61**(8): 704-713.

Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M. T. Gillespie, T. J. Martin and T. Suda (1999): "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest **103**(9): 1345-1352.

Liao, K. P., L. Alfredsson and E. W. Karlson (2009): "Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol **21**(3): 279-283.

Lubberts, E. (2008): "IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis?" Cytokine **41**(2): 84-91.

Lubberts, E. (2010): "Th17 cytokines and arthritis." Semin Immunopathol **32**(1): 43-53.

Lubberts, E., L. A. Joosten, F. A. van de Loo, L. A. van den Gersselaar and W. B. van den Berg (2000): "Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4." Arthritis Rheum **43**(6): 1300-1306.

Lubberts, E., M. I. Koenders, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, C. J. Coenen-de Roo, L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2004): "Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion." Arthritis Rheum **50**(2): 650-659.

MacGregor, A. J., H. Snieder, A. S. Rigby, M. Koskenvuo, J. Kaprio, K. Aho and A. J. Silman (2000): "Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins." Arthritis Rheum **43**(1): 30-37.

Mamehara, A., T. Sugimoto, D. Sugiyama, S. Morinobu, G. Tsuji, S. Kawano, A. Morinobu and S. Kumagai (2010): "Serum Matrix Metalloproteinase-3 as Predictor of Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis, Treated with Non-biological Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs." Kobe J Med Sci **56**(3): E98-E107.

Miller, M. C., H. B. Manning, A. Jain, L. Troeberg, J. Dudhia, D. Essex, A. Sandison, M. Seiki, J. Nanchahal, H. Nagase and Y. Itoh (2009): "Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **60**(3): 686-697.

Milman, N., J. Karsh and R. A. Booth (2010): "Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis." Clin Biochem **43**(16-17): 1309-1314.

Mok, C. C., L. S. Tam, T. H. Chan, G. K. Lee and E. K. Li (2010): "Management of rheumatoid arthritis: consensus recommendations from the Hong Kong Society of Rheumatology." Clin Rheumatol **30**(3): 303-312.

Moran, E. M., R. Mullan, J. McCormick, M. Connolly, O. Sullivan, O. Fitzgerald, B. Bresnihan, D. J. Veale and U. Fearon (2009): "Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies." Arthritis Res Ther **11**(4): R113.

Mott, J. D. and Z. Werb (2004): "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 558-564.

Muller-Ladner, U., R. E. Gay and S. Gay (2002): "Role of nuclear factor kappaB in synovial inflammation." Curr Rheumatol Rep **4**(3): 201-207.

Murphy, G., M. I. Cockett, P. E. Stephens, B. J. Smith and A. J. Docherty (1987): "Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes." Biochem J **248**(1): 265-268.

Murphy, G. and M. H. Lee (2005): "What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage?" Ann Rheum Dis **64 Suppl 4**: iv44-47.

Nagase, H. and M. Kashiwagi (2003): "Aggrecanases and cartilage matrix degradation." Arthritis Res Ther **5**(2): 94-103.

Nakashima, T., Y. Kobayashi, S. Yamasaki, A. Kawakami, K. Eguchi, H. Sasaki and H. Sakai (2000): "Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines." Biochem Biophys Res Commun **275**(3): 768-775.

Orozco, G., S. Eyre, A. Hinks, J. Bowes, A. W. Morgan, A. G. Wilson, P. Wordsworth, S. Steer, L. Hocking, W. Thomson, J. Worthington and A. Barton (2010): "Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **70**(3): 463-468.

Pacquelet, S., N. Presle, C. Boileau, H. Dumond, P. Netter, J. Martel-Pelletier, J. P. Pelletier, B. Terlain and J. Y. Jouzeau (2002): "Interleukin 17, a nitric oxide-producing cytokine with a peroxynitrite-independent inhibitory effect on proteoglycan synthesis." J Rheumatol **29**(12): 2602-2610.

Pap, T., Y. Shigeyama, S. Kuchen, J. K. Fernihough, B. Simmen, R. E. Gay, M. Billingham and S. Gay (2000): "Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(6): 1226-1232.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005): "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.

Patwari, P., G. Gao, J. H. Lee, A. J. Grodzinsky and J. D. Sandy (2005): "Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolysis in interleukin-1-treated bovine cartilage." Osteoarthritis Cartilage **13**(4): 269-277.

Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani and M. A. Cassatella (2010): "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." Blood **115**(2): 335-343.

Pene, J., S. Chevalier, L. Preisser, E. Venereau, M. H. Guilleux, S. Ghannam, J. P. Moles, Y. Danger, E. Ravon, S. Lesaux, H. Yssel and H. Gascan (2008): "Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes." J Immunol **180**(11): 7423-7430.

Pfaffl, M. W. (2001): "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Radovits, B. J., J. Fransen, S. Al Shamma, A. M. Eijsbouts, P. L. van Riel and R. F. Laan (2010): "Excess mortality emerges after 10 years in an inception cohort of early rheumatoid arthritis." Arthritis Care Res (Hoboken) **62**(3): 362-370.

Rouvier, E., M. F. Luciani, M. G. Mattei, F. Denizot and P. Golstein (1993): "CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene." J Immunol **150**(12): 5445-5456.

Rutkauskaite, E., D. Volkmer, Y. Shigeyama, J. Schedel, G. Pap, U. Muller-Ladner, I. Meinecke, D. Alexander, R. E. Gay, S. Drynda, W. Neumann, B. A. Michel, W. K. Aicher, S. Gay and T. Pap (2005): "Retroviral gene transfer of an antisense construct against membrane type 1 matrix metalloproteinase reduces the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **52**(7): 2010-2014.

Ryu, S., J. H. Lee and S. I. Kim (2006): "IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes." Clin Rheumatol **25**(1): 16-20.

Saeki, Y., E. Kudo-Tanaka, S. Ohshima, M. Matsushita, S. I. Tsuji, Y. I. Maeda, M. Yoshimura, A. Watanabe, Y. Katada, Y. Harada, K. Ichikawa, Y. Suenaga, Y. Ohta and S. Tohma (2012): "Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA)." Rheumatol Int: [Epub ahead of print].

Sarkar, S. and D. A. Fox (2010): "Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis." Rheum Dis Clin North Am **36**(2): 345-366.

Shahrara, S., Q. Huang, A. M. Mandelin and R. M. Pope (2008): "TH-17 cells in rheumatoid arthritis." Arthritis Research & Therapy **10**(4): R93.

Shalom-Barak, T., J. Quach and M. Lotz (1998): "Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB." J Biol Chem **273**(42): 27467-27473.

Smolen, J. S., D. Aletaha, M. Koeller, M. H. Weisman and P. Emery (2007): "New therapies for treatment of rheumatoid arthritis." Lancet **370**(9602): 1861-1874.

Smolen, J. S., R. Landewe, F. C. Breedveld, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, S. Gorter, R. Knevel, J. Nam, M. Schoels, D. Aletaha, M. Buch, L. Gossec, T. Huizinga, J. W. J. W. Bijlsma, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, C. Gabay, J. Gomez-Reino, M. Kouloumas, T. K. Kvien, E. Martin-Mola, I. McInnes, K. Pavelka, P. van Riel, M. Scholte, D. L. Scott, T. Sokka, G. Valesini, R. van Vollenhoven, K. L. Winthrop, J. Wong, A. Zink and D. van der Heijde (2010): "EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs." Annals of the Rheumatic Diseases **69**(6): 964-975.

Souza, L. S., S. H. Machado, C. V. Brenol, J. C. Brenol and R. M. Xavier (2008): "Growth velocity and interleukin 6 concentrations in juvenile idiopathic arthritis." J Rheumatol **35**(11): 2265-2271.

Steward-Tharp, S. M., Y. J. Song, R. M. Siegel and J. J. O'Shea (2010): "New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression." Ann N Y Acad Sci **1183**: 123-148.

Symmons, D. P. (2002): "Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome." Best Pract Res Clin Rheumatol **16**(5): 707-722.

Tchetverikov, I., L. R. Lard, J. DeGroot, N. Verzijl, J. M. TeKoppele, F. C. Breedveld, T. W. Huizinga and R. Hanemaaijer (2003): "Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62**(11): 1094-1099.

Toh, M. L. and P. Miossec (2007): "The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets." Curr Opin Rheumatol **19**(3): 284-288.

Unemori, E. N., M. J. Bair, E. A. Bauer and E. P. Amento (1991): "Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma." J Biol Chem **266**(34): 23477-23482.

Van Bezooijen, R. L., L. Van Der Wee-Pals, S. E. Papapoulos and C. W. Lowik (2002): "Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro." Ann Rheum Dis **61**(10): 870-876.

van den Berg, W. B. and P. Miossec (2009): "IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol **5**(10): 549-553.

van der Helm-van Mil, A. H., J. Detert, S. le Cessie, A. Filer, H. Bastian, G. R. Burmester, T. W. Huizinga and K. Raza (2008): "Validation of a prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: moving toward individualized treatment decision-making." Arthritis Rheum **58**(8): 2241-2247.

van der Helm-van Mil, A. H., R. E. Toes and T. W. Huizinga (2010): "Genetic variants in the prediction of rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **69**(9): 1694-1696.

van Hamburg, J. P., P. S. Asmawidjaja, N. Davelaar, A. M. Mus, E. M. Colin, J. M. Hazes, R. J. Dolhain and E. Lubberts (2010): "Th17 Cells, but Not Th1 Cells, From Patients With Early Rheumatoid Arthritis Are Potent Inducers of Matrix Metalloproteinases and Proinflammatory Cytokines Upon Synovial Fibroblast Interaction, Including Autocrine Interleukin-17A Production." Arthritis Rheum **63**(1): 73-83.

Visse, R. and H. Nagase (2003): "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.

Visser, H., S. le Cessie, K. Vos, F. C. Breedveld and J. M. Hazes (2002): "How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis." Arthritis Rheum **46**(2): 357-365.

Woodrick, R. and E. M. Ruderman (2010): "Anti-interleukin-6 therapy in rheumatoid arthritis." Bull NYU Hosp Jt Dis **68**(3): 211-217.

Wright, J. F., F. Bennett, B. Li, J. Brooks, D. P. Luxenberg, M. J. Whitters, K. N. Tomkinson, L. J. Fitz, N. M. Wolfman, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Chatterjee-Kishore and B. M. Carreno (2008): "The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex." J Immunol **181**(4): 2799-2805.

Yamanaka, H., Y. Matsuda, M. Tanaka, W. Sendo, H. Nakajima, A. Taniguchi and N. Kamatani (2000): "Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(4): 852-858.

Yang, M. X., X. Qu, B. H. Kong, Q. L. Lam, Q. Q. Shao, B. P. Deng, K. H. Ko and L. Lu (2006): "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in the migration of human monocyte-derived dendritic cells." Immunol Cell Biol **84**(6): 557-562.

Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen and M. K. Spriggs (1995): "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor." Immunity **3**(6): 811-821.

Yoshihara, Y., H. Nakamura, K. Obata, H. Yamada, T. Hayakawa, K. Fujikawa and Y. Okada (2000): "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis." Ann Rheum Dis **59**(6): 455-461.

Young, A., J. Dixey, N. Cox, P. Davies, J. Devlin, P. Emery, S. Gallivan, A. Gough, D. James, P. Prouse, P. Williams and J. Winfield (2000): "How does functional disability in early rheumatoid arthritis (RA) affect patients and their lives? Results of 5 years of follow-up in 732 patients from the Early RA Study (ERAS)." Rheumatology (Oxford) **39**(6): 603-611.

Zrioual, S., M. L. Toh, A. Tournadre, Y. Zhou, M. A. Cazalis, A. Pachot, V. Miossec and P. Miossec (2008): "IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood." J Immunol **180**(1): 655-663.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an die gesamte Immunobone Gruppe: Prof. S. Blaschke, Prof. N. Miosge, PD A.W. Beham und C. Breysach für stetigen Austausch und konstruktive Diskussionen rund um das Thema und die Herangehensweise meiner Arbeit.

Für die Möglichkeit, meine Versuche zu planen und durchzuführen, geht besonderer Dank an Prof. N. Miosge und seine Arbeitsgruppe, in dessen Labor ich die Versuche durchführen durfte. Es bestand stets die Möglichkeit des Informationsaustausches und der Diskussion, für die ich mich bei allen herzlich bedanke.

Ganz herzlichen Dank geht an C. Bode, die mir die Methoden der Arbeit im Labor näher brachte und mir bei Fragen und Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. med. Mai danke ich für die freundliche Bereitstellung der Knorpelproben für diese Arbeit.

Meinen Mitdoktoranden und Frau Sadowski danke ich für das herzliche Arbeitsklima und die wirklich immer gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 6. August 1985 wurde ich als erstes Kind von Norbert Johannleweling und Ursula Johannleweling, geborene Rose, in Münster geboren. Meine jüngere und einzige Schwester wurde am 12. August 1987 ebenfalls in Münster geboren.

Nach dem bald folgenden Umzug nach Bielefeld besuchte ich von 1992 bis 1996 die Grundschule Vilsendorf in Bielefeld. Es folgte dann der Wechsel auf die weiterführende Schule. So besuchte ich von 1996 bis 2005 das Gymnasium „Marienschule der Ursulinen“ in Bielefeld, an der ich 2005 die allgemeine Hochschulreife mit naturwissenschaftlichem Schwerpunkt ablegte.

Aufgrund von vielen gesammelten Erfahrungen mit dem Fach der Humanmedizin im Rahmen von Schulpraktika und Pflegepraktika, aber auch durch das allgemeine Interesse an Naturwissenschaften begann ich im Wintersemester 2005 mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Dort legte ich im August 2007 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum) erfolgreich ab.

Es folgte dann der klinische Teil meiner Ausbildung an der Universitätsmedizin Göttingen. Neben meiner klinischen Ausbildung begann ich 2010 mit den experimentellen Arbeiten für diese Doktorarbeit im Labor der Abteilung Prothetik von Prof. Dr. med. N. Miosge, die ich im Rahmen eines Freisemesters zum Abschluss bringen konnte. Die Doktorarbeit beinhaltete Grundlagenforschungen auf dem Gebiet der Knorpelvorläuferzellen in der rheumatoiden Arthritis.

Das Praktische Jahr absolvierte ich in den Fachrichtungen Chirurgie, Innere Medizin und Orthopädie am „Brüderkrankenhaus St. Josef Paderborn“, einem Lehrkrankenhaus der Universität Göttingen. In der Allgemein-, Unfall- und Thoraxchirurgie erhielt ich einen weiten Überblick über das chirurgische Arbeiten. Weiter konnte ich in der Abteilung von Prof. Dr. med. N. Lindner Einblicke in das ambulante und operative Behandeln orthopädischer Erkrankungen erlangen. Im Rahmen meines Tertials in der Inneren Medizin absolvierte ich einen 8-wöchigen Teil meines Praktischen Jahres in Brisbane Australien. Hier durfte ich in der Abteilung Rheumatologie des „Royal Brisbane and women’s hospital“ unter Dr. Paul Kubler nähere Einblicke in den Formenkreis der rheumatologischen Erkrankungen erlangen.

Das zweite Staatsexamen der Humanmedizin bzw. den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich im April 2012 erfolgreich ab und freue mich nun auf den Start in das Berufsleben.