

Katja Neugebauer

Untersuchung zur Rolle von
Syndecan-4 in der Zytokin- abhängigen
Knorpeldestruktion durch synoviale Fibroblasten
bei der Rheumatoiden Arthritis

2008

Biologie

Untersuchung zur Rolle von
Syndecan-4 in der Zytokin- abhängigen
Knorpeldestruktion durch synoviale Fibroblasten
bei der Rheumatoiden Arthritis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Katja Neugebauer
aus Pößneck

2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Bereich Molekulare Medizin des muskuloskelettalen Systems des Universitätsklinikums Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Pap unter der Mitbetreuung von Dr. Frank Echtermeyer angefertigt.

Die Betreuung der Arbeit erfolgte von Prof. Dr. B. Moerschbacher, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan:	Prof. Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. T. Pap
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. B. Moerschbacher
Tag der mündlichen Prüfung:	16.07.2008
Tag der Promotion:	18.07.2008

**„Am Anfang der Forschung steht das Staunen.
Plötzlich fällt einem etwas auf.“**

Wolfgang Wickler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Synoviale Fibroblasten	3
1.1.2 Die Rolle von Matrixmetalloproteinasen bei Rheumatoider Arthritis.....	5
1.1.3 Die Rolle von Zytokinen bei Rheumatoider Arthritis.....	7
1.1.4 TNF- abhängige Mausmodelle der chronisch destruktiven Arthritis.....	9
1.1.5 Signaltransduktion durch Mitogen- Aktivierte- Protein- Kinasen.....	11
1.2 Die Syndecan- Familie.....	13
1.2.1 Syndecan-4 als Mitglied der Syndecan- Familie	15
1.2.2 Syndecan-4 defiziente Mäuse.....	17
2 Zielstellung der Arbeit.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte.....	20
3.1.1.2 Vektoren.....	22
3.1.1.3 Primer.....	22
3.1.1.4 Antikörper.....	23
3.2 Methoden	25
3.2.1 Zellbiologische Methoden	25
3.2.1.1 Isolierung von primären Synovialfibroblasten aus humanem Synovialgewebe	25
3.2.1.2 Isolierung von primären Synovialfibroblasten aus Mäusen	26
3.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	26
3.2.1.4 Beschichten von Zellkulturschalen mit Fibronectin.....	27
3.2.1.5 Stimulation von Synovialfibroblasten mit TNF α und IL-1 α	27
3.2.1.6 Transfektion.....	27
3.2.1.7 Immunfluoreszenz	29
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	29
3.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen.....	29
3.2.2.2 Genotypisierung der Mäuse.....	30
3.2.2.3 Agarose- Gelelektrophorese und Extraktion von DNA- Fragmenten	31
3.2.2.4 Isolierung von Gesamt- RNA und Reverse Transkription.....	31
3.2.2.5 Konventionelle PCR	32
3.2.2.6 Klonierung von PCR- Fragmenten.....	32
3.2.2.7 Restriktion von PCR- Fragmenten und Sequenzierung.....	33
3.2.2.8 Quantitative <i>Real- time</i> PCR.....	33

3.2.2.9	Transformation kompetenter Bakterien.....	34
3.2.2.10	Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien (Minipräparation).....	35
3.2.2.11	Isolierung von Endotoxin- freier Plasmid- DNA aus Bakterien (Maxipräparation)	35
3.2.2.12	Photometrische Bestimmung der DNA- Konzentration.....	36
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	36
3.2.3.1	Extraktion von Gesamtprotein und Proteinbestimmung	36
3.2.3.2	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	37
3.2.3.3	Proteintransfer auf PVDF- Membranen.....	38
3.2.3.4	Western Blot.....	39
3.2.3.5	Strippen von PVDF- Membranen.....	40
3.2.3.6	MMP ELISA.....	40
3.2.3.7	Phospho- MAP Kinase Array	40
3.2.4	Histologische Methoden	41
3.2.4.1	Fixierung von Synovialgewebe	41
3.2.4.2	Präparation und Entkalkung von Mäusepfoten	41
3.2.4.3	Paraffineinbettung von Synovialgewebe und Mäusepfoten.....	41
3.2.4.4	Toluidin- Blau- Färbung von Paraffinschnitten	42
3.2.4.5	Morphometrische Analyse	42
3.2.4.6	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten	43
3.2.5	Durchflusszytometrie	44
3.2.6	Mausmodelle	45
3.2.7	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1.	Syndecan-4 Expression und seine Regulation durch TNFα.....	47
4.1.1	Expression von Syndecan-4 in rheumatoiden Synovialfibroblasten	48
4.1.2	Regulation von Syndecan-4 durch TNF α	50
4.2	Die Rolle von Syndecan-4 bei der IL-1 induzierten MMP Produktion.....	56
4.2.1	MMP Expression bei Rheumatoider Arthritis.....	56
4.2.2	Hemmung von Syndecan-4 mittels siRNA	57
4.2.3	Die Hemmung von Syndecan-4 mittels spezifischer siRNA vermindert die IL-1 induzierte MMP-1 und MMP-3 Produktion in RASFs	58
4.2.4	Die IL-1 vermittelte MMP-1 und MMP-3 Produktion kann in RASFs durch einen Syndecan-4 Antikörper gehemmt werden	59
4.3	Syndecan-4 und IL-1 induzieren die Aktivierung von MAP Kinasen.....	60
4.3.1	Identifizierung der IL-1 und Syndecan-4 abhängigen MAP Kinase Signalwege in RASF.....	61
4.3.2	Syndecan-4 reguliert die IL-1 induzierte Phosphorylierung von ERK1/2	62
4.3.3	Die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-4 ist essentiell für die IL-1 vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung.....	63
4.4	Das Fehlen von Syndecan-4 hemmt die TNF- induzierte Knorpelzerstörung <i>in vivo</i>	64
4.4.1	Klinische Daten der hTNFtg/Syndecan-4 ^{-/-} Mäuse	65
4.4.2	Syndecan-4 Defizienz in hTNFtg Mäusen schützt vor Knorpelzerstörung	67

5	Diskussion	71
5.1	Syndecan-4 Expression und seine Regulation durch TNFα	71
5.1.1	Krankheitsspezifische Hochregulation von Syndecan-4 in Rheumatoider Arthritis	71
5.1.2	TNF α reguliert die Expression von Syndecan-4 in humanen RASFs und in TNF- abhängigen Mausmodellen der destruktiven Arthritis.....	73
5.2	Syndecan-4 reguliert die IL-1 induzierte MMP-1 und MMP-3 Produktion und führt zur Aktivierung von ERK1/2.....	75
5.2.1	Einfluss von Syndecan-4 auf die IL-1 vermittelte MMP-1 und MMP-3 Produktion	75
5.2.2	Die Aktivierung von MAP Kinase Signalwegen durch Syndecan-4	76
5.3	Die Hemmung von Syndecan-4 reduziert die TNF- induzierte Knorpelzerstörung	78
6	Zusammenfassung.....	81
7	Literaturverzeichnis.....	83
	Danksagung.....	92
	Lebenslauf.....	94

Abkürzungsverzeichnis

-/-	homozygote Gendeletion
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EZM	Extrazellulärer Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme- linked immunosorbant assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Relative Erdbeschleunigung, Gramm
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glycerin-Aldyhyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	human, Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HPRT	Hypoxanthin- Phosphoribosyl- Transferase
HRP	Horse radish peroxidasis
IL-1 α	Interleukin-1 alpha
kDA	Kilodalton
mA	Milliampère
MAP Kinase	Mitogen aktivierte Protein Kinase
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
N	Anzahl

NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
OA	Osteoarthritis
OASFs	Osteoarthrotische Synovialfibroblasten
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCK α	Proteinkinase C α
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RASFs	Rheumatoide Synovialfibroblasten
s	Sekunde
SDS	Natriumdodezylsulfat
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TBS	Tris- gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N',N'- Tetramethyldiamin
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinase
TNF α	Tumor Necrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Tristetraprolin
V	Volt
vs.	versus
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/Gewicht

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten und folgenschwersten Gelenkerkrankungen. Weltweit sind etwa 1% der erwachsenen Bevölkerung betroffen, allerdings Frauen deutlich häufiger als Männer (Sweeney *et al.*, 2004). Sie beginnt in der Regel mit dem Befall der peripheren Gelenke und Sehnenscheiden, im Verlauf können auch verschiedene andere Organe, wie Herz, Lunge oder Leber, befallen werden. Die Knochendestruktionen führt zu klassischen Knopfloch- und Schwanenhals- Deformationen, der 90°/90° Deformität des Daumens sowie Gelenkspaltverschmälerungen (siehe Abbildung 1). Die progressive Gelenkzerstörung, maßgeblich für den Krankheitsverlauf, führt oft zur Invalidität und unterscheidet daher die Rheumatoide Arthritis von anderen Arthritiden. Sie besitzt somit eine große sozialökonomische Rolle (Firestein, 2003).



Abbildung 1: Radiographie der Hand eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

Dargestellt ist eine Hand eines Patienten mit fortgeschrittener Rheumatoider Arthritis und schweren Destruktionen der Gelenkarchitektur. Der Zeigefinger weist die typische Schwanenhals-Deformation auf. Die Sternchen (rechts) zeigen sich entwickelnde Knochenerosionen und Verschmälerungen der Gelenkspalten (Schett, 2007).

Die Rheumatoide Arthritis ist durch die Trias synoviale Hyperplasie, chronische Entzündung und pathologische Immunantwort gekennzeichnet. Allerdings sind die Ursachen bzw. die Mechanismen zur Entstehung der Rheumatoiden Arthritis noch nicht vollständig geklärt.

Eine Vielzahl von Studien zeigte, dass die Zellen der entzündeten Gelenkinnenhaut, dem Synovium, ein Netzwerk bilden, das aus stromalen Zellen, speziell synovialen Fibroblasten, und infiltrierenden, entzündlichen Zellen, wie Lymphozyten und Makrophagen, besteht. Das Zusammenspiel dieser Zelltypen im Gelenk führt zur Entwicklung einer chronisch- destruktiven Arthritis (Burmester *et al.*, 1997, Firestein, 2003). Diese schmerzhafte Gelenkentzündung wird klinisch als bilateral- symmetrische Arthritis, die hauptsächlich die Handgelenke befällt, beschrieben (Smith *et al.*, 2002).

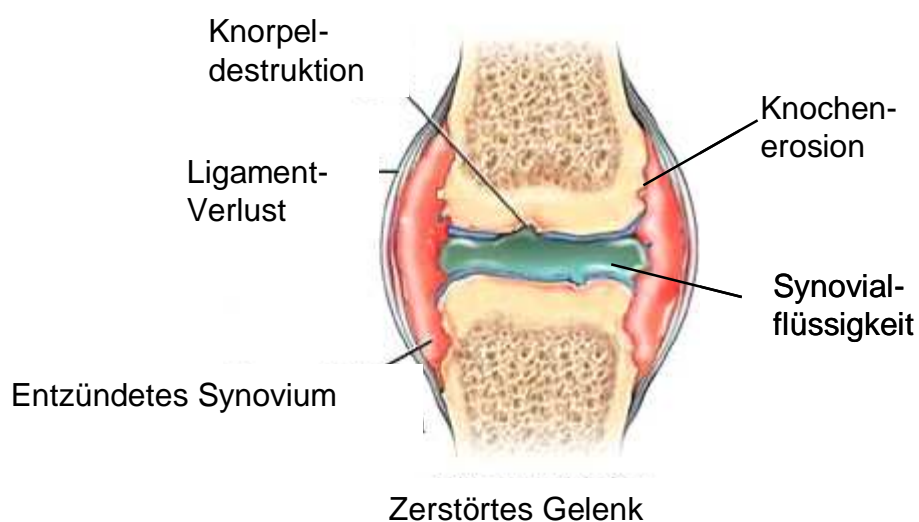


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines zerstörten Kniegelenks bei Rheumatoider Arthritis.

Das gezeigte Kniegelenk wird durch Ligamente umschlossen und dadurch geschützt. Unter den Ligamenten befindet sich das Synovium, welches die Synovialflüssigkeit produziert. Bei Rheumatoider Arthritis entzündet sich das Synovium, was zu Wärmeentwicklung, Rötung, Schwellung und Schmerzen führt. Im Krankheitsverlauf invadiert und zerstört das entzündete Synovium den Knorpel und Knochen der Gelenke. Es kommt zu einer Schwächung der umgebenden Muskeln und der Ligamente (modifiziert nach Nucleus Communications, Inc., www.revolutionhealth.com).

Abbildung 2 zeigt, den schematischen Aufbau eines Kniegelenks eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Das unter dem Bandapparat befindliche entzündete Synovium invadiert im Verlauf der Krankheit den Knorpel und den Knochen. Normalerweise besteht das gesunde Synovium aus einer Deckzellschicht, die aus 1 - 2 Zellschichten aufgebaut ist. Im Verlauf der Rheumatoiden Arthritis kommt es zu einer Hyperplasie der Zellschichten mit bis zu 10 Schichten oder mehr. Ungefähr zwei Drittel der Zellen aus der Deckzellschicht exprimieren typische Markerproteine, wie CD68 oder CD14, und können somit als Markophagen

identifiziert werden. Sie sind verantwortlich für die Sezernierung entzündlicher Faktoren im Synovium von RA-Patienten. Diese von Makrophagen gebildeten Zytokine, wie TNF α , aktivieren andere synoviale Zellen und können in hohen Mengen in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (Cutolo *et al.*, 1993).

Als Ursache für die Entstehung der Rheumatoiden Arthritis werden verschiedene Möglichkeiten, wie eine genetische Dispositionen, hormonelle Einflüsse und virale Infektionen, diskutiert. 50 - 80% der RA-Patienten exprimieren ganz bestimmte HLA (*Human leukocyte antigen*) Moleküle, was auf eine genetische Disposition deutet (Bongi *et al.*, 2004, Garavito *et al.*, 2004). Als mögliche Umwelteinflüsse, die zur Entstehung der Rheumatoiden Arthritis beitragen, werden virale Infektionen, wie mit dem Epstein-Barr Virus (Saal *et al.*, 1999) oder dem Parvovirus B19 (Cohen *et al.*, 1986), diskutiert.

1.1.1 Synoviale Fibroblasten

Neben Makrophagen und T-Zellen spielen Synoviale Fibroblasten der entzündeten Gelenkinnenhaut eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis, die sich durch die Hyperplasie des Synoviums, insbesondere der Deckzellschicht, die progressive Gelenkzerstörung und einer chronischen Entzündung zeigt (Qu *et al.*, 1994, Cunnane *et al.*, 1998, Buckley *et al.*, 2001). Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass sich Synoviale Fibroblasten von RA-Patienten (RASFs) von normalen Fibroblasten und Fibroblasten von Osteoarthrose-Patienten (OASFs) unterscheiden: Sie wurden erstmals von Fassbender *et al.* beschrieben (Fassbender, 1983). Die Merkmale der stabilen Aktivierung von RASFs können in Abwesenheit einer kontinuierlich entzündlichen Stimulation (z. B. durch Zytokine, wie TNF α) aufrechterhalten werden. Durch diese stabilen Veränderungen der Fibroblasten während der Ausbildung einer chronischen Entzündung im Synovium aus einer akuten, führt dies zu einem tumorähnlichen, aggressiv-invasiven Phänotyp. Daher werden die RASFs als „transformiert erscheinende Fibroblasten“, „tumor-like fibroblasts“ oder auch als „aktivierte Fibroblasten“ bezeichnet (Pap *et al.*, 2000a, Firestein, 1996). Die Ursache der stabilen Aktivierung der RASFs ist derzeit nicht geklärt, aber sie behalten ihr aggressives Potential bei und führen weiterhin zur Gelenkzerstörung, auch wenn die Immunreaktion bzw. die Entzündung behandelt werden. Als mögliche Erklärung kann eine „Fehldifferenzierung“ der proliferierenden

Synovialfibroblasten im entzündeten Synovium angenommen werden, die durch Interaktionen der RASFs mit Komponenten der knorpelspezifischen extrazellulären Matrix und eine dauerhafte Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine entsteht (Lafyatis *et al.*, 1989).

Die Morphologie von RASFs unterscheidet sich von anderen Fibroblasten. Sie sind spindelförmig und durch einen runden, großen, fahl aussehenden Zellkern mit prominenten Nukleoli charakterisiert (Huber *et al.*, 2006). RASFs, die aus einem pathologisch veränderten Gewebe isoliert wurden, behalten weiterhin die charakteristischen Reaktionsmuster bei, wie auf extrazelluläre Stimuli (z. B. auf Zytokine wie TNF α) zu reagieren, oder die Eigenschaft zum progressiven Abbau der extrazellulären Matrix (EZM). Ortständige Fibroblasten können durch TNF α und IL-1 α stimuliert werden und tragen gleichzeitig zum Wachstum und zur Invasivität des hyperplastischen rheumatoiden Synoviums bei (Arend *et al.*, 1995).

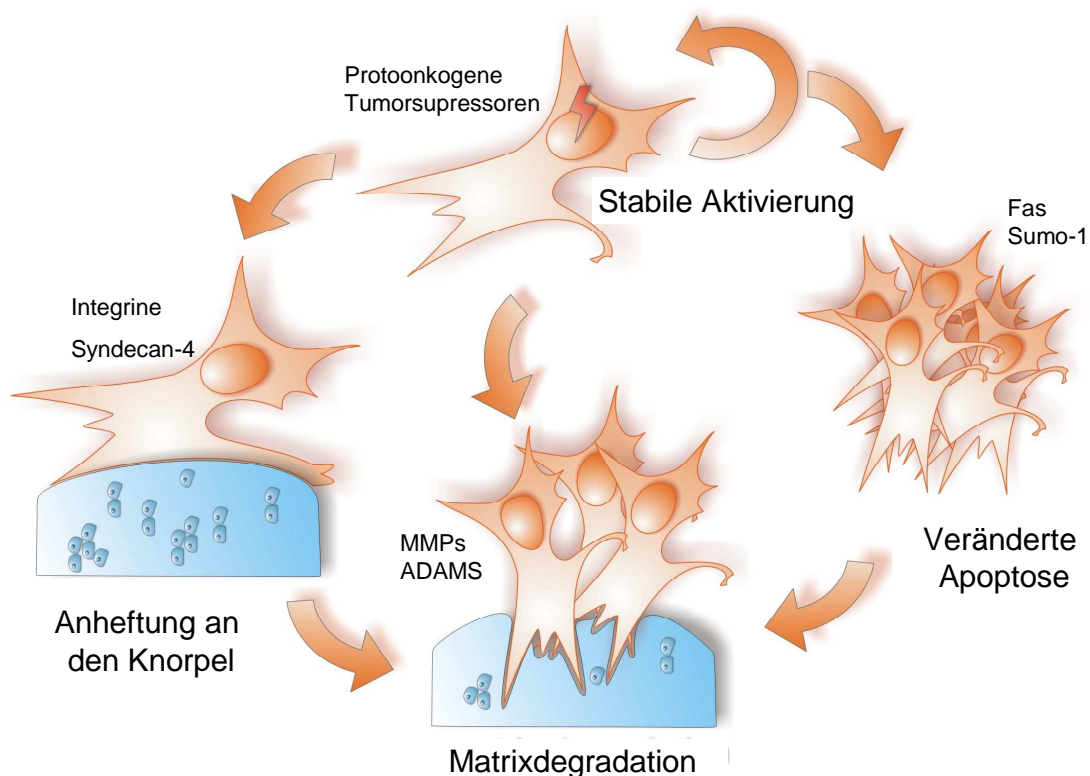


Abbildung 3: Eigenschaften stabil aktivierter rheumatoider Synovialfibroblasten.

Die stabil aktivierten RASFs weisen drei charakteristische Merkmale auf: 1. die Anheftung dieser Zellen über verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, wie β_1 -Integrine, Syndecan-4, an den artikulären Knorpel, 2. der Veränderung des programmierten Zelltods und 3. der vermehrten Produktion matrix-zerstörender Enzyme, wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (modifiziert nach Meinecke *et al.*, 2006).

Schematisch sind die drei wichtigsten Charakteristika stabil aktivierter RASFs in Abbildung 3 dargestellt: 1. die Fähigkeit sich über verschiedene Adhäsionsmoleküle (β_1 -Integrine, Syndecane, wie Syndecan-4) fest an die EZM des Knorpels zu heften, 2. ihre Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod, der Apoptose und 3. die verstärkte Produktion von matrixzerstörender Enzyme, wie MMPs oder Kathepsinen (Okura *et al.*, 1996, Pap *et al.*, 2000b).

1.1.2 Die Rolle von Matrixmetalloproteinasen bei Rheumatoider Arthritis

Zu der Gruppe der für die Rheumatoide Arthritis bedeutsamen matrixzerstörenden Enzyme zählen vor allem die Matrixmetalloproteinasen (Migita *et al.*, 1996). Diese Proteinasen sind bei physiologischen, wie der Embryogenese und Angiogenese, und pathologischen Prozessen, wie der Wundheilung oder Krebs, von zentraler Bedeutung.

Hauptsächlich besteht Knorpelgewebe aus den zwei Komponenten: Kollagenen und Proteoglykanen. Kollagenfasern sind für die Sicherung der Zug- und Reißfestigkeit des Knorpels verantwortlich und vermitteln die Fähigkeit verschiedenen Scherkräften zu widerstehen. Proteoglykane dagegen sind für die Festigkeit und die Belastbarkeit des Knorpelgewebes zuständig. Sie schützen zusammen mit Glykoproteinen fibrilläre Kollagene auch vor dem proteolytischen Abbau durch MMPs. Kommt es zum Abbau der Glykoproteine durch Plasmin, dann sind die fibrillären Kollagene für MMPs zugänglich (Montgomery *et al.*, 1993).

MMPs sind zinkabhängige Enzyme, die extrazellulär wirksam sind und sowohl Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes als auch der Bindegewebsmatrix abbauen können. Derzeit sind 25 MMPs in Vertebraten beschrieben, wobei 23 homolog zum Menschen sind (Sternlicht *et al.*, 2001). Unter physiologischen, aber auch unter pathologischen Bedingungen sind sie an der Proliferation, dem Gewebeumbau, der Tumordinvasion und -metastasierung, der Wundheilung und der Zerstörung des Bindegewebes bei Rheumatoider Arthritis beteiligt (Nagase *et al.*, 1999).

Strukturell sind MMPs aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Sie besitzen eine Pro-Domäne und eine katalytische

Domäne, die über eine variable Region mit einer Hämopexin- ähnlichen Domäne verbunden ist. Die Hämopexin- ähnliche Domäne ist für die Bindung von Substraten notwendig. Die katalytische Domäne dagegen beinhaltet im aktiven Zentrum eine für die Enzymaktivität wichtige Bindestelle für Zink- Ionen.

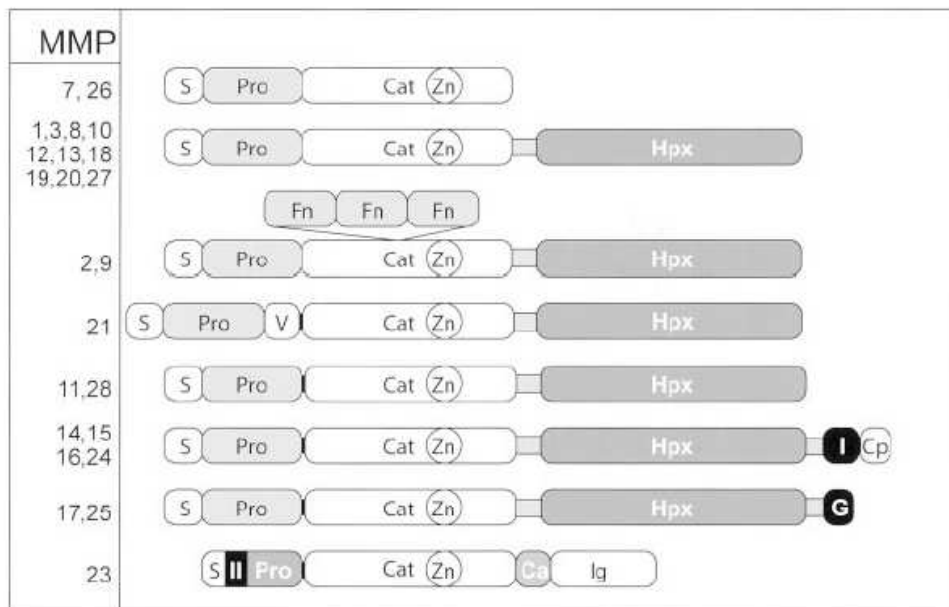


Abbildung 4: Struktur der MMP Domänen.

Die Organisation der MMP Domänen ist wie folgt angegeben: S, Signalpeptid-; Pro, Propeptid-; Cat, Katalytischen Domäne; Zn, Zink- Bindungsstelle; Hpx, Hämopexin-; FN, Fibronektin Domäne; V, Vitronektin; I und II, Typ I und II Transmembrane Domäne; Cp, zytoplasmatische Domäne (Visse *et al.*, 2003).

Synovialfibroblasten aus der Deckzellschicht des rheumatoiden Synoviums, sowie Chondrozyten und Makrophagen produzieren MMPs. Eine Erhöhung der MMP Genexpression bei Rheumatoider Arthritis wird durch die inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 über Rezeptor- spezifische Signaltransduktion induziert (Mengshol *et al.*, 2002). Zu den krankheitsrelevanten MMPs bei Rheumatoider Arthritis zählen unter anderem MMP-1 (Kollagenase-1) und MMP-3 (Stromelysin-1). MMP-1 ist als primäres Enzym für den Abbau von Typ II Kollagen, dem dominanten Kollagen im hyalinen Knorpel, verantwortlich und kann ebenfalls Aggrecan sowie anderer EZM- und nicht EZM- Moleküle verdauen. Fibroblasten, die MMP-1 produzieren, sind deutlich invasiver als OASFs oder avaskuläre Fibroblasten (Tolboom *et al.*, 2002, Rutkauskaite *et al.*, 2004). MMP-3 kann Matrixkomponenten des Knorpels, z. B. Proteoglykane, verdauen und eine Vielzahl von pro- MMPs aktivieren (Nah *et al.*, 2008).

Normalerweise wird die Aktivität von MMPs in Zellen durch eine irreversible Bindung von speziellen Gewebehemmern, den TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinase*), ausgeglichen. Die vier bekannten TIMPs (TIMP1, -2, -3 und -4) werden von Chondrozyten, synovialen Fibroblasten und Endothelzellen sowohl synthetisiert als auch sezerniert (Pap *et al.*, 2005). Die Expression der TIMPs wird während der Entwicklung und dem Gewebeumbau reguliert. Das molekulare Verhältnis zwischen TIMPs und MMPs spielt eine entscheidende Rolle in der Gelenkzerstörung. Bei Rheumatoider Arthritis überwiegen die MMPs, was folglich zu einer erhöhten Matrixdestruktion führt, die in einer Zerstörung der Gelenke resultiert (Firestein *et al.*, 1992).

1.1.3 Die Rolle von Zytokinen bei Rheumatoider Arthritis

Zytokine sind Botenstoffe, die eine wichtige Rolle bei Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen spielen. Sie sind Glykoproteine, die von einer Vielzahl von Zellen, wie Monozyten, gebildet werden. Sie besitzen eine geringe Halbwertszeit und zeigen vielfältige Wechselwirkungen.

Die wichtigen Zytokine bei der frühen Abwehr und der Entzündung sind der Tumor Nekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1). Sie sind am Prozess der Knorpelzerstörung und der Knochenerosion bei Rheumatoider Arthritis beteiligt (Feldmann *et al.*, 2001). Sie induzieren in Synovialfibroblasten die Kollagenaseproduktion, hemmen die Synthese von Proteoglykanen in artikulären Chondrozyten und stimulieren die Knochenresorption *in vitro* (Saklatvala *et al.*, 1986, Dayer, 1985, Dayer *et al.*, 1986, Bertolini *et al.*, 1986).

TNF α wurde 1985 erstmals beschrieben und als ein von Makrophagen abgeleiteter Induktor der Tumornekrose *in vitro* charakterisiert (Ghezzi *et al.*, 2005). TNF α übt unterschiedliche Effekte auf Wachstums-, Differenzierungs- und Entzündungsprozesse aus und nimmt in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis eine zentrale Rolle ein. In RASFs hemmt TNF α die Apoptose und induziert den Zelltod erst nach der Hemmung von NF- κ B (Liu *et al.*, 2003). Die Proteinproduktion kann durch Interferone, Interleukine, wie IL-2 und IL-18, induziert werden. TNF α interagiert mit den TNF- Rezeptoren benachbarter Zellen und kann durch das *TNF α - converting enzyme* (TACE) von der Zelloberfläche abgespalten werden. Das Ablösen von der Zelloberfläche scheint weniger wichtig für die biologische Funktion von TNF α zu sein. Es kann entweder zellgebunden

oder in löslicher Form an die TNF- Rezeptoren I und II binden. Die Trimerisierung des TNF- Rezeptors ist wichtig für die Ligandenbindung. Anschließend erfolgt die Signaltransduktion und die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege.

In verschiedenen Tiermodellen (siehe Kapitel 1.1.4) konnte die entzündliche Wirkung von TNF α *in vivo* gezeigt werden. Eine gesteigerte Produktion von TNF α führt dazu, dass Mäuse eine chronisch, destruktive, RA- ähnliche Arthritis entwickeln (Keffer *et al.*, 1991). Allerdings schützt die Behandlung von Mäusen, die ein TNF- abhängige Arthritis entwickeln, mit einem monoklonalen Antikörper gegen TNF α vor der Krankheitsentwicklung. Klinisch ist das Blockieren von TNF α bei verschiedenen immunvermittelten entzündlichen Krankheiten, wie Rheumatoider Arthritis und Psoriasis sowie Morbus Crohn, ebenso von großer Bedeutung (Feldmann *et al.*, 2001).

Interleukin-1 ist als inflammatorisch- wirkendes Zytokin ebenfalls zentral an der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis speziell an der Knorpeldestruktion beteiligt. Es wurde 1979 erstmals als Pyrogen- und Leukozyten aktivierender Faktor beschrieben, der T- und B- Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, Osteoblasten und Fibroblasten sowie Endothel- und Epithelzellen aktiviert. Eine durch IL-1 induzierte Entzündungsreaktion fördert das synoviale Zellwachstum und die Differenzierung von Osteoklasten (Iwakura, 2002). IL-1 weist zwei homologe Proteinstrukturen IL-1 α und IL-1 β auf, deren essentiellen Domänen sich ähneln und eine nahezu identische Funktion besitzen. IL-1 wird hauptsächlich von aktivierten Zellen, wie Monozyten, gebildet und seine Produktion kann schnell durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Interferone (α , β und γ), TNF α und IL-1 selbst induziert werden. Trotz einer unterschiedlichen Expression beider IL-1 Formen, zeigen sie eine identische Bindungskapazität an die beiden bekannten IL-1 Rezeptoren (IL-1RI und IL-1RII) (Moller *et al.*, 2006).

Im Tiermodell zeigten Zwerina *et al.* das Zusammenspiel der Zytokine TNF α und IL-1 α . IL-1 ist *in vivo* maßgeblich an der Zerstörung der Knorpelmatrix beteiligt. Dazu wurden IL-1 defizienten Mäuse mit hTNFtg Mäusen gekreuzt, die erhöhte Mengen an humanem TNF α produzieren und als Modell einer TNF α basierenden Rheumatoide Arthritis gelten. Obwohl IL-1^{-/-}/hTNFtg Mäuse eine starke Entzündungsreaktion aufwiesen, blieb der Gelenknorpel in diesen Tieren weitestgehend erhalten (Zwerina *et al.*, 2007).

1.1.4 TNF- abhängige Mausmodelle der chronisch destruktiven Arthritis

Zur Aufklärung der Mechanismen, die zu einer destruktiven Arthritis *in vivo* führen, wurden unterschiedliche Modelle entwickelt, die durch Induktion von Antigenen (Collagen- induzierte Arthritis), Überexpression von Genen oder Gendeletionen generiert wurden, sowie Modelle, die auf Serumtransfer beruhen (Muller-Ladner *et al.*, 2005). Derzeit werden zwei wichtige TNF- abhängige Mausmodelle zur Untersuchung der destruktiven Arthritis verwendet: Humane TNF transgene Mäuse und Tristetraprolin- defiziente (TTP^{-/-}) Mäuse.

Keffer *et al.* generierten Mäuse, die ein 3'- modifiziertes humanes TNF Genkonstrukt unter dem genetischen C57BL/6- Hintergrund tragen (hTNFtg) Diese Mäuse entwickeln eine chronisch destruktive RA- ähnliche Arthritis, da TNF α stark in der Gelenkentzündung und dem arthritischen Knochenverlust involviert ist (Keffer *et al.*, 1991).

In den hTNFtg Mäusen konnte die TNF α mRNA in Gelenken, Leber, Hirn, Niere, Milz, Lunge und Thymus nachgewiesen werden. TNF α wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert, z. B. von Makrophagen und Synovialfibroblasten. Primäre synoviale Fibroblasten von hTNFtg Mäusen produzieren selbst hohe Level an humanem TNF α und sind dauerhaft einer autokrinen TNF α Stimulation *in vitro* ausgesetzt. Die murinen TNF- Level sind vernachlässigbar. Nach der Geburt zeigen die hTNFtg Mäuse keine Unterschiede gegenüber Wildtyp Mäusen. Beginnend ab Woche 4 - 5 weisen die Tiere erste Einschränkungen in der Beweglichkeit der Hinterpfoten, Schwellungen der Sprunggelenke und einen progressiven Gewichtsverlust auf. hTNFtg Mäuse erreichen ein Lebensalter von durchschnittlich 12 - 14 Wochen. Werden diese transgenen Mäuse mit einem monoklonalen Antikörper gegen TNF α behandelt, so schützt dies vor der Entwicklung einer destruktiven Arthritis bis zur 10. Lebenswoche (Keffer *et al.*, 1991).

Ein weiteres TNF- abhängiges Modell der Rheumatoiden Arthritis stellt die Tristetraprolin- defiziente (TTP^{-/-}) Maus dar. TTP, als ein Mitglied der Zinkfinger- proteine ist auch als Nup475, TIS11 und GOS 24 bekannt (Varnum *et al.*, 1989, DuBois *et al.*, 1990) und gehört zu den weit verbreiteten Phosphoproteinen, die zwei oder mehr hoch konservierte Zinkfinger mit einem Cystein- Cystein- Cystein- Histidin Motiv besitzen. TTP gehört zu den RNA- bindenden Proteinen, welches

mit Adenosin- Uracil- (AU)- reichen Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region instabiler mRNAs interagieren. TTP bindet an die AU- reichen Elemente der TNF α (Carballo *et al.*, 1998), COX-2 (Sully *et al.*, 2004) GM-CSF und IL-3 mRNA (Raghavan *et al.*, 2001).

In adulten Mäusen ist TTP in Lunge, Darm, Lymphknoten, Milz und Thymus hoch exprimiert, schwächer dagegen im Fettgewebe, Leber und Niere und nur wenig in Muskel und Hirn (DuBois *et al.*, 1990, Lai *et al.*, 1990). Um die physiologische Rolle von TTP *in vivo* zu untersuchen, generierten Taylor *et al.* eine TTP^{-/-} Maus und beschrieben den Einfluss von TTP auf die Regulation der TNF α Expression (Taylor *et al.*, 1996a). Das Fehlen von TTP führt zu einem konstitutiv hohen Spiegel an murinem TNF α und somit zur Entwicklung einer chronisch-destruktiven Arthritis. Primäre Synovialfibroblasten von TTP^{-/-} Mäusen sind hohen Level von TNF α *in vivo* ausgesetzt, aber ähnlich wie humane RASFs produzieren sie selbst keine signifikanten Mengen an TNF α .

TTP defiziente Mäuse entwickeln sich nach der Geburt unauffällig gegenüber heterozygoten TTP bzw. Wildtyp Mäusen, allerdings kommt es ab Woche 8 nur noch zu einer geringen Erhöhung des Gewichts. Die Lebenserwartung der TTP^{-/-} Mäuse liegt durchschnittlich bei sieben Monaten. Sie entwickelten komplexe inflammatorische Syndrome wie fleckenartiger Haarausfall, Dermatitis, Kachexie, Konjunktivitis und Myelo-Hyperplasie, die von Hämatopoese, Autoimmunerkrankungen und Polyarthritits begleitet werden (Taylor *et al.*, 1996b). Dies scheint auf die erhöhte TNF α Expression zurückzuführen zu sein. Im Alter von sieben Monaten konnte histologisch gezeigt werden, dass sich in den Gelenken der Hinter- und Vorderpfoten das Synovium deutlich entzündete und verdickte. Ebenso konnten Erosionen des artikulären Knorpels und extensive Knochendestruktion gezeigt werden. In TTP^{-/-} Mäusen fehlt TTP als Regulator der TNF α mRNA Stabilität, was zu erhöhten Level von murinem TNF α führt, wobei TNF α hauptsächlich von Makrophagen produziert wird. Die Behandlung der TTP^{-/-} Mäuse ab Woche 10 mit einem Antikörper gegen TNF α verhinderte die Entwicklung nahezu aller klinischen Auffälligkeiten der TTP^{-/-} Mäuse (Sheehan *et al.*, 1989).

1.1.5 Signaltransduktion durch Mitogen- Aktivierte- Protein- Kinasen

In der destruktiven Arthritis stellen Mitogen- Aktivierte- Protein- Kinasen (MAP Kinasen) wichtige Moleküle der Signaltransduktion dar. Die MAP Kinasen werden durch extrazelluläre Stimuli über Kinase Kaskaden aktiviert und vermitteln extrazelluläre Signale in den Zellkern. MAP Kinasen beeinflussen verschiedene zelluläre Prozesse, wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose.

In Säugerzellen besteht die Familie der MAP Kinasen aus drei Hauptgruppen: JNK, ERK und p38. Die c-Jun N- terminal phosphorylierenden Kinasen (JNK 1, 2 und 3) kontrollieren die Expression von MMPs durch den Transkriptionsfaktor AP-1 und können auch weitere Transkriptionsfaktoren wie c-Myc aktivieren. Ebenfalls sind die JNK in der Induktion der Apoptose involviert (Vincenti *et al.*, 2002).

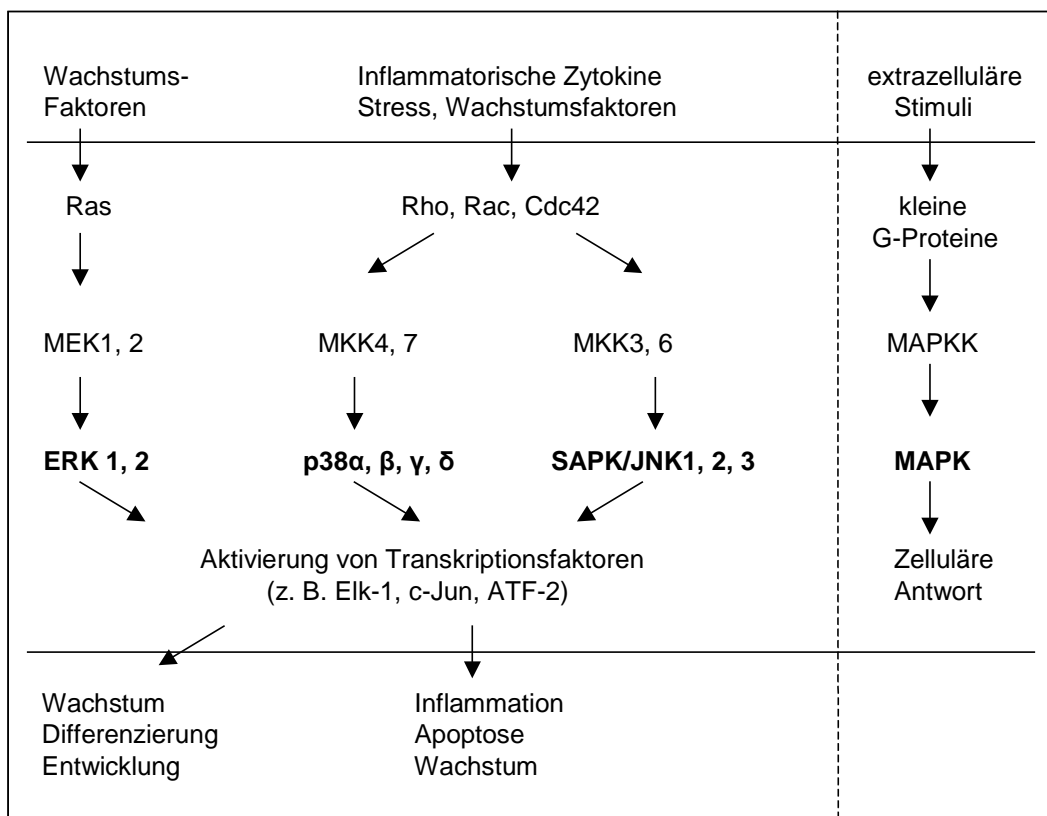


Abbildung 5: Vergleich von MAP Kinase Signalwegen.

Die Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, p38α, β, γ, δ und JNK1/2 erfolgt durch externe Stimuli, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren. Die Signalweiterleitung wird durch Mitglieder der Familie der kleinen G-Proteine über MAPK Kinasen (MAPKK) vermittelt und anschließend werden die MAP Kinasen (MAPK) aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung von zytoplasmatischen Proteinen sowie von Transkriptionsfaktoren (z. B. Elk-1, c-Jun oder ATF-2).

Die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK1 und 2) sind sowohl in die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion als auch durch die Signaltransduktion durch Adhäsionsmoleküle involviert (siehe Abbildung 5). Die p38 MAP Kinasen (p38 α , β , γ , δ) spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der inflammatorischen Zytokine, der Induktion von COX-2 und matrixzerstörender Enzyme, wie MMPs. Die Aktivierung der MAP Kinasen erfolgt durch die Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten. Diese Aktivierung wird durch die entsprechend übergeordneten MAP Kinase Kinase (MAPK Kinase) ausgelöst.

Die Aktivierung einzelner MAP Kinasen erfolgt durch externe Stimuli. So werden in Fibroblasten die ERK1/2 Kinasen besonders durch Wachstumsfaktoren, Serum und Phorbol ester, sowie in geringem Maße durch Zytokine wie IL-1 und TNF α , Wachstumsfaktoren der TGF- β - Familie und osmotischen Druck aktiviert (Chen *et al.*, 2001). Die JNK und p38 Kinasen werden im Gegensatz zu den ERK Kinasen hauptsächlich durch die Zytokine TNF α und IL-1 induziert. Alle aktivierten Kinasen können in den Zellkern translozieren und Transkriptionsfaktoren wie c-Jun oder ATF-2 durch Phosphorylierung aktivieren (Hazzalin *et al.*, 2002). Die Aktivierung verschiedener Proteine kann ebenso im Zytoplasma erfolgen. Die drei MAP Kinasen interagieren direkt oder indirekt mit Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, c-Jun oder ATF-2, um die Transkription verschiedener Gene zu aktivieren. Übergeordnete Komponenten der Signaltransduktion einschließlich der Familie der Rho- GTPasen (wie Rho, Rac und Cdc42) werden über verschiedene MAPKK Kinasen aktiviert und scheinen in der chronischen synovialen Entzündung involviert zu sein, da sowohl Rho als auch Ras die Proliferation synovialer Fibroblasten regulieren (Nakayamada *et al.*, 2005, Kitasato *et al.*, 2001).

1.2 Die Syndecan- Familie

Die Familie der Syndecane besteht in Säugetieren aus vier homologen Mitgliedern: Syndecan-1, -2, -3 und -4, während es in *Drosophila* nur ein Syndecan gibt. Syndecane besitzen eine Membrandurchspannende Domäne, die für die Lokalisation an der Zelloberfläche verantwortlich ist. Die verschiedenen Syndecane kommen auf nahezu allen Zelltypen vor, die einzelnen Mitglieder weisen aber unterschiedliche spezielle Expressionsmuster auf: Syndecan-1 ist hauptsächlich in Epithel- und mesenchymalem Gewebe, Syndecan-2 in Neuronalzellen, Fibroblasten und Epithelzellen, Syndecan-3 fast ausschließlich in neuronalen- und muskuloskelettalen Gewebe exprimiert (Wilcox-Adelman *et al.*, 2002a). Syndecan-4 wird zwar nur in geringem Maße exprimiert, ist aber in nahezu allen Zelltypen vorhanden (Kim *et al.*, 1994). Eine wichtige Rolle wird den Syndecanen sowohl bei der Embryonal- und Organentwicklung als auch in verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, wie der Wundheilung, der Tumorentwicklung und in Nierenerkrankungen, zugeschrieben. In zellulären Prozessen wie der Adhäsion, der Wanderung der Zellen, sowie der Differenzierung und Proliferation sind Syndecane involviert. Sie spielen für primäre Zelloberflächen- Rezeptoren eine wichtige Rolle als Ko- Rezeptor und sind an der Signalübertragung beteiligt.

Jedes Syndecan ist aus einem Core- Protein aufgebaut und besitzt eine kurze zytoplasmatische, eine hoch konservierte Membrandurchspannende und eine lange, extrazelluläre Domäne. Die zytoplasmatische Domäne unterteilt sich in zwei hoch konservierte Regionen (C1 und C2), die durch eine variable Region getrennt sind. Die Funktion dieser variablen Region ist weitgehend unbekannt, sie ist in allen vier Syndecanen unterschiedlich aufgebaut und trägt vermutlich dazu bei, dass die einzelnen Syndecane ihre spezifischen Eigenschaften ausbilden. Ein Modell (siehe Abbildung 6) zeigt die Domänenstruktur der Syndecane mit den gebundenen Glykosaminoglykan (GAG)- Ketten und möglichen Interaktionspartnern. An die extrazelluläre Domäne des Core- Proteins sind GAG- Ketten, deren Anzahl zwischen einzelnen Syndecanen variiert, kovalent gebunden. Die GAG- Ketten von Syndecan-4, sowie Syndecan-2 sind vom Heparansulfat Typ während Syndecan-1 und -3 auch Chondroitinsulfat Ketten tragen können. Über diese GAG- Ketten erfolgt die Interaktion mit einer Vielzahl von extrazellulären

Matrixkomponenten, wie z.B. Fibronectin, Vitronectin, Laminin und fibrilläre Kollagene. Die exakte Funktion ist derzeit unklar.

Syndecane können über die GAG- Ketten heparinbindenden Wachstumsfaktoren z. B. der FGF- und HGF- Familie an die Zelloberfläche binden, und dadurch deren Konzentration lokal zu erhöhen umso die Wirkung der gebundenen Wachstumsfaktoren zu modulieren vermag (Park *et al.*, 2000).

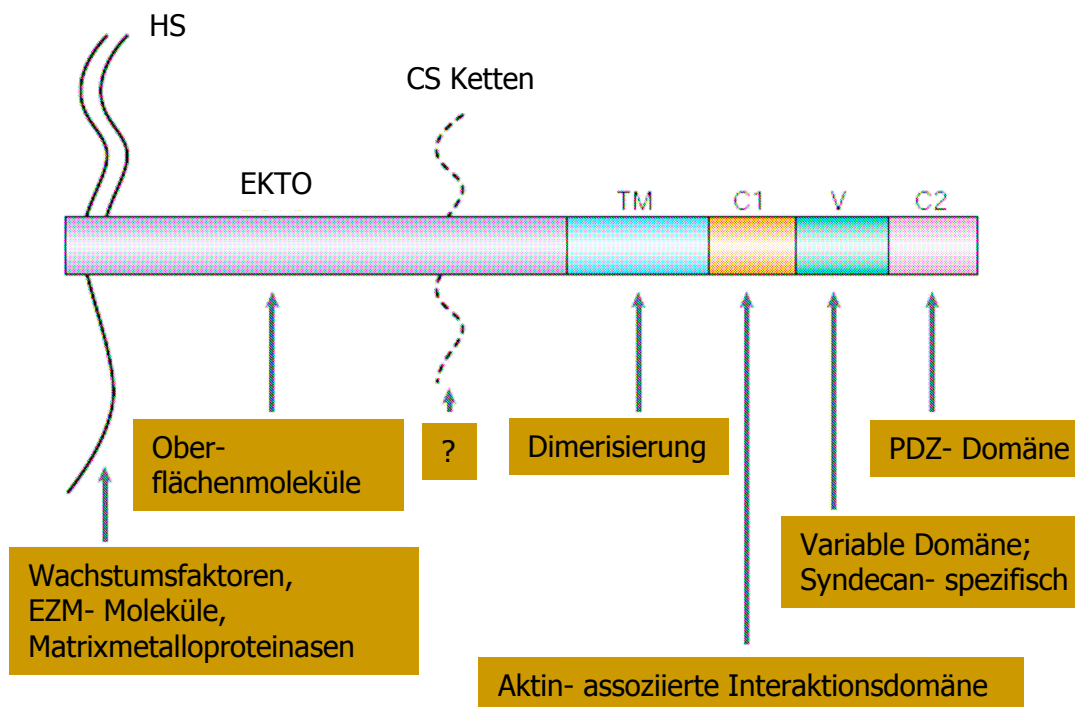


Abbildung 6: Core- Domänen Strukturen von Syndecan und mögliche Interaktionen.

Schematische Darstellung des Core- Proteins der Syndecane mit den Glykosaminoglykan Ketten. Die möglichen Interaktionspartner sind ebenso dargestellt (braun). HS, Heparansulfat; CS, Chondroitinsulfat; EKTO, Ektodomäne; TM, transmembrane Domäne; C1 und C2, konservierte Regionen und V, variable Region der zytoplasmatischen Domäne (Couchman *et al.*, 2002).

Die an der Zelloberfläche lokalisierten Syndecane können nahe der Zellmembran abgespalten werden, wodurch die lösliche extrazelluläre Domäne in die Zellzwischenräume diffundiert. Der als „*Shedding*“ bezeichnete Mechanismus kann durch die Aktivierung von Proteasen, wie Thrombin, Plasmin und MMPs, und verschiedenen Wachstumsfaktoren z. B. der EGF- Familie beschleunigt werden (Schmidt *et al.*, 2005, Julien *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der über extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK1 und 2) für

das EGF- induzierte *Shedding* der Syndecane notwendig ist, p38 MAP Kinasen aber nicht involviert sind (Fitzgerald *et al.*, 2000).

1.2.1 Syndecan-4 als Mitglied der Syndecan- Familie

Syndecan-4 ist ein pathologisch sehr interessantes Mitglied der Syndecan-Familie, da es in nahezu in allen Geweben exprimiert wird und die Expressionslevel unter basalen Bedingungen sehr gering sind. Erst bei entsprechenden pathologischen Veränderungen, wie Wundheilung, Nierenfibrose, Lipopolysaccharid- Exposition, kommt es zu einem starken Anstieg der Syndecan-4 Expression in unterschiedlichen Zielzellen. Derzeit sind die physiologischen Funktionen von Syndecan-4 nicht vollständig geklärt. Allerdings zeigen einige Studien, dass Syndecan-4 bei der Zell- Matrix Adhäsion, der Migration von Zellen sowie an Differenzierungs- und Proliferations- Prozessen beteiligt ist. (Rioux *et al.*, 2002).

Zusammen mit Integrinen, vor allem dem $\alpha_5\beta_1$ - Integrin, ist Syndecan-4 in der Signaltransduktion zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und der Bildung fokaler Kontakte, den Anheftungspunkten von Zellen mit der darunter liegenden Matrix, involviert (van der Flier *et al.*, 2001). Es ist derzeit das einzige Syndecan, dass in fokalen Kontakten nachgewiesen wurde. Die Interaktion von Syndecan-4 in fokalen Kontakten mit der extrazellulären Matrix wird nicht ausschließlich über die Heparansulfat- Ketten vermittelt. Echtermeyer *et al.* konnten zeigen, dass Syndecan-4, ohne angeheftete Heparansulfat- Ketten, in den fokalen Kontakten zu finden ist, es aber nicht zu einer Umstrukturierung des Aktin- Zytoskeletts kommt (Echtermeyer *et al.*, 1999). Wird Syndecan-4 jedoch ohne die variable zytoplasmatische Domäne in Zellen exprimiert, so wird die Bildung von fokalen Kontakten vermindert (Longley *et al.*, 1999). Bisher ist die Aufgabe von Syndecan-4 bei der Matrixorganisation unbekannt. Wir beobachteten jedoch auf elektronen- mikroskopischer Ebene eine Assoziation von Syndecan-4 mit Kollagen- Fibrillen, vor allem Kollagen IX, aus humanem Knorpel.

Der Einfluss von Syndecan-4 auf die Zelldifferenzierung während der Wundheilung wurde in noch unveröffentlichten Versuchen von F. Echtermeyer untersucht. Der Verlust von Syndecan-4 verhindert die TGF- β vermittelte Differenzierung von Fibroblasten zu *alpha-smooth muscle Aktin* (α -SMA) exprimierenden Myofibroblasten.

In verschiedenen *in vivo* Untersuchungen wurde die Expression von Syndecan-4 analysiert und es konnte gezeigt werden, dass sie unter pathologischen Vorgängen stark hoch reguliert ist, wie z. B. im betroffenen Herzgewebe nach einem Herzinfarkt, bei Nierenerkrankungen (IgA Nephropathie) und in Hautwunden (Zhang *et al.*, 1999, Kojima *et al.*, 2001).

F. Echtermeyer konnte in noch unveröffentlichten Studien zeigen, dass Syndecan-4 in der Knorpelzerstörung durch hypertrophe osteoarthritische Chondrozyten involviert ist, indem Syndecan-4 matrixzerstörende Enzyme wie die Aggrecanase ADAMTS-5 aktiviert, die für den Proteoglykanverlust im humanen OA- Knorpel wichtig ist.

Eine schematische Darstellung des Heparansulfat Proteoglykans Syndecan-4 ist in Abbildung 7 zu sehen. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, können Syndecane, wie auch Syndecan-4, über die vorhandenen GAG- Ketten zahlreiche Matrixliganden, wie Fibronectin, Laminin und fibrilläre Kollagene, binden.

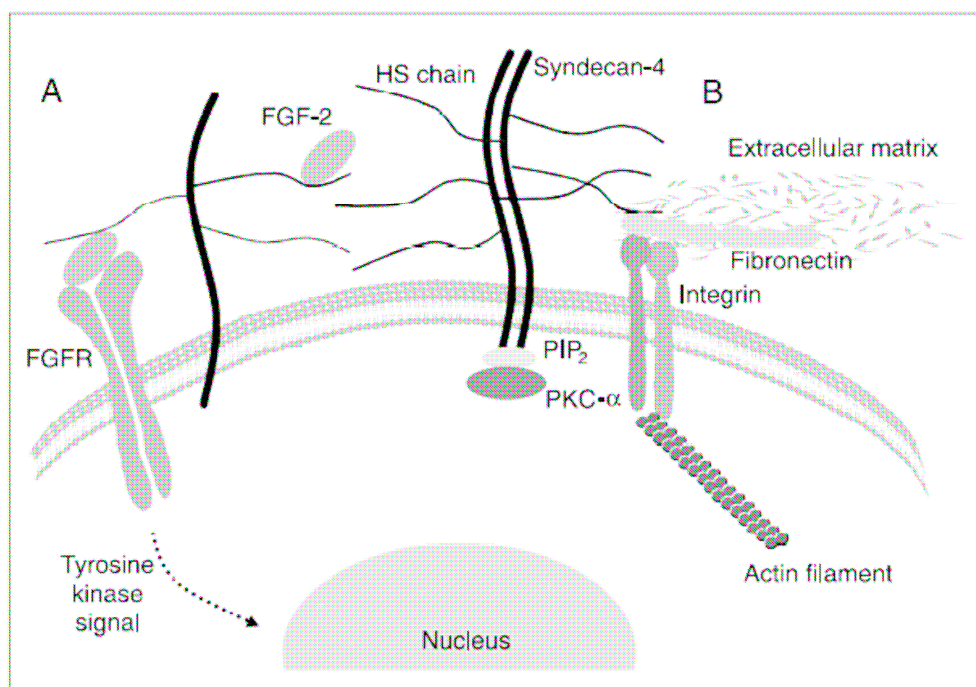


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Syndecan vermittelten Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren und deren Beteiligung an der Zelladhäsion.

A, Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Syndecane wird durch die Interaktion mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor reguliert. Das Schema zeigt, dass die Heparansulfat (HS)- Ketten die Dimerisation des *fibroblast growth factors* (FGF)-2 und anschließend die des FGF-Rezeptors (FGFR) vermitteln. B, Fokale Kontakte sind spezialisierte Membrankomplexe, in denen Integrine und Syndecane zusammen die Kommunikation zwischen Extrazellulärer Matrix und Zytoskelett vermitteln. Die Rekrutierung von Syndecan-4 in die fokalen Kontakte erfolgt durch die Aktivierung von Proteinkinase (PKC) α . PIP₂=Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat. (Lopes *et al.*, 2006).

Zusätzlich kann Syndecan-4 auch als ein alternativer Zelloberflächen- Rezeptor für verschiedene Wachstumsfaktoren, wie FGF-2 und HGF- β 1 und -2, und Interleukinen dienen. Durch die Heparansulfat- Ketten wird möglicherweise die Konzentration der entsprechenden Faktoren an der Zelloberfläche erhöht, was die Bindung an den jeweiligen primären Rezeptor erleichtern oder ermöglichen könnte (Bernfield *et al.*, 1999).

Derzeit werden die intrazellulären Signaltransduktionswege, die durch Syndecan-4 reguliert werden, von verschiedenen Gruppen erforscht. So konnte eine mögliche Vermittlung der Signaltransduktion von Syndecan-4 über das kleine G- Protein RhoA gezeigt werden. Das zur Familie der kleinen monomeren GTPasen gehörende RhoA, ist an der Signalübertragung von Zelloberflächen- Rezeptoren und dem Zytoskelett beteiligt (Midwood *et al.*, 2006). Erste Untersuchungen zeigten aber, dass Syndecan-4 bei der Modulation verschiedener Signaltransduktionswege, einschließlich der direkten Aktivierung von PKC α (Mostafavi-Pour *et al.*, 2003, Koo *et al.*, 2006), der Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) (Wilcox-Adelman *et al.*, 2002a) und der Regulation von Rac1 während der Signalweiterleitung durch Wachstumsfaktoren (Tkachenko *et al.*, 2006), involviert ist. Die variable Region scheint dafür verantwortlich zu sein, dass Syndecan-4 zusammen mit Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphat (PIP₂) Tetramere ausbilden und die PKC α z.B. in fokalen Kontakten aktivieren kann.

1.2.2 Syndecan-4 defiziente Mäuse

Um die Rolle von Syndecan-4 *in vivo* zu untersuchen, wurden Syndecan-4 defiziente Mäuse hergestellt (Ishiguro *et al.*, 2000, Echtermeyer *et al.*, 2001). Sie zeigen rein äußerlich keinen auffälligen Phänotyp. Sie sind vital und weisen ein normales Reproduktions- und Entwicklungsverhalten auf. Es ist allerdings bekannt, dass Syndecan-4 defiziente Mäuse Unterschiede bei der Heilung von Wunden gegenüber Wildtyp Mäusen aufweisen. Syndecan-4 ist in aktivierten dermalen Fibroblasten hochreguliert. Nach der Wundsetzung zeigen Syndecan-4 defiziente Mäuse eine verzögerte Wundheilung und eine fehlende Wundkontraktion zwischen dem dritten und sechsten Tag im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen. Die auf eine reduzierte Akkumulation von Granulationsgewebe an den Wundrändern bei Syndecan-4^{-/-} Mäusen zurückzuführen ist. Auf zellulärer Ebene konnte eine reduzierte Migrationsfähigkeit von Syndecan-4 defizienten

Fibroblasten nachgewiesen werden (Echtermeyer *et al.*, 2001). In einem Nierenhypertrophie Modell (Unilaterale Nephrektomie) konnte in Syndecan-4^{-/-} Mäusen eine vermehrte Deposition von Matrixmolekülen, vor allem Kollagen Typ I, in den Glomeruli der Niere und eine Veränderung der Struktur der glomerulären Basalmembran nachgewiesen werden (Cevikbas *et al.*, 2008).

In Syndecan-4^{-/-} Mäusen konnte durch Injektion von bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS) ein septischer Schock hervorgerufen werden, der zu einer auffällig hohen Sterblichkeitsrate führte. Bei den untersuchten Tieren überlebten 80% der Wildtyp Mäuse die Injektion von LPS, aber nur 20% der Syndecan-4 defizienten Mäuse. Dabei konnte in den Syndecan-4^{-/-} Mäusen ein erhöhter Spiegel des pro-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-1 festgestellt werden. Unklar bleibt, welche Rolle Syndecan-4 bei der Auslösung eines septischen Schocks spielt (Ishiguro *et al.*, 2001).

Die Vielzahl der gefundenen Phänomene in den Syndecan-4 defizienten Mäusen und der Erhöhung der Expression bei verschiedenen pathologischen Vorgängen, bestätigt die Annahme, dass Syndecan-4 vor allem während physiologischer Stresssituationen eine wichtige Rolle spielt (Ishiguro *et al.*, 2002, Wilcox-Adelman *et al.*, 2002b).

2 Zielstellung der Arbeit

Syndecane gehören zu der Familie der Heparansulfat- Proteoglykane. Sie können verschiedene Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln, gleichzeitig aber auch Wachstumsfaktoren binden und entsprechende Signalkaskaden initiieren.

Basierend auf Untersuchungen zur Aktivierung synovialer Zellen bei Rheumatoider Arthritis (RA) sowie zur Syndecan-4 vermittelten Signalübertragung in Fibroblasten soll in der vorliegenden Arbeit die Funktion von Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis untersucht werden. Syndecan-4, so eine Hypothese dieser Untersuchung, könnte als ein wichtiger Ko- Rezeptor bei der stabilen Aktivierung synovialer Fibroblasten fungieren. Weitere Ziele dieser Arbeit sind:

1. Untersuchungen zur Regulation der Syndecan-4 Expression durch inflammatorische Zytokine,
2. Analyse der Rolle von Syndecan-4 bei der Aktivierung von MAP Kinasen und der Produktion Matrix zerstörender Proteasen (MMPs),
3. Aufklärung der *in vivo* Funktion von Syndecan-4 bei der Knorpel- und Knochendestruktion in TNF α induzierten Mausmodellen der Rheumatoiden Arthritis.

Die gewonnenen Erkenntnisse über Mechanismen der stabilen Aktivierung von rheumatoiden Synovialfibroblasten sollen der Entwicklung neuer Ansätze zur Behandlung der Rheumatoider Arthritis dienen können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte

Allgemeine Reagenzien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma- Aldrich (München), Roche (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) in p. A.- bzw. Reinstqualität bezogen.

<u>10 x PBS:</u>	PBS- Pulver	95,5 g
	ad Aqua dest.	1 l
<u>10 x TBS (pH 7,5):</u>	Tris-Base	130 mM
	NaCl	1,5 M
<u>4% PFA (pH 7,4):</u>	Paraformaldehyd	20 g
	ad PBS	1 l
<u>DEPC- Wasser:</u>	Diethylpyrocarbonat	500 µl
	ad Aqua dest.	100 ml

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Antibiotikum / Antimykotikum (100 x)	PAA Laboratories, Cölbe
BSA	Serva, Heidelberg
DMEM (4,5 g / l Glukose)	PAA Laboratories, Cölbe
DMSO	Serva, Heidelberg
Dispase II	Roche, Mannheim
Fibronektin	Chemicon, Hofheim
FCS	Biochrom KG, Berlin
Interleukin-1 alpha	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt

Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMem I	Invitrogen, Karlsruhe
Paraplast Plus	Roth, Karlsruhe
Dulceccos's Phosphat gepufferte Saline	Invitrogen, Karlsruhe
PFA	Serva, Heidelberg
TAE (50 x)	Millipore, Schwalbach
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trypsin / EDTA (1 x)	PAA Laboratories, Cölbe
Tumornekrosefaktor alpha	Novitec, Freiburg
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
6- und 96- well Platten	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
15- und 50 ml Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
40 µm Nylon Zellsiebe	BD Biosciences, Heidelberg
0,45 µm Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
PVDF- Membran	Millipore, Schwalbach
Geräte	
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer cell	BioRad, München
Laser- Scan- Mikroskop, PCM 2000	Nikon, Dresden
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikroskop BX 51	Olympus, Hamburg
Nucleofektor	Amaza, Köln
iCycler	BioRad, München
Mastercycler® ep	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom RM 2145	Leica, Bensheim
1420 Multilabel Counter Victor ³	Perkin Elmer, Rodgau- Jügesheim
Genesys 10UV Photometer	Thermo Fischer, Dreieich
Infinity Dokumentationssystem Modell 1000	Peqlab, Erlangen
Entwicklermaschine Optimax TypTR	MS Laborgeräte, Wiesloch

3.1.1.2 Vektoren

pFLAG-CMV TM -2 Expressionsvektor	Sigma- Aldrich, München
pEF4/Myc-His	Invitrogen, Karlsruhe

Von Dr. Frank Echtermeyer der Medizinischen Hochschule Hannover wurden 2 Plasmide zur Verfügung gestellt, die basierend auf dem pEF4/Myc-His Vektor: 1. *Syn4 + ETZ*, kodiert die Sequenz für die extrazelluläre- (E), die transmembrane- (T) und die zytoplasmatische (Z) Domäne von Syndecan-4 und 2. *Syn4 + ET*, kodiert nur die transmembrane- und die extrazelluläre Domäne von Syndecan-4.

3.1.1.3 Primer

Die verwendeten Primer für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse und für die Klonierung wurden von der Firma metabion (Martinsried) als Lyophilisat bezogen, im entsprechenden Volumen in DEPC- Wasser rekonstituiert und jeweils auf eine Konzentration von 100 pmol / µl eingestellt. Die Oligonukleotide für die siRNA wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und mit DEPC- Wasser auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt.

Primer für Genotypisierung der verwendeten Mäuse

In Tabelle 1 sind die verwendeten Primer für die Genotypisierung der Mäuse aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Primer für die Genotypisierung.

Name des Gens	Sequenz
hTNFtg (300 bp)	<i>forward</i> 5'- taccctcctcctcagacacc -3' <i>reverse</i> 5'- gcccttcataatatcccca -3'
Syndecan-4 Wildtyp (196 bp)	<i>forward</i> 5'- gtgccactggataaccacatccc -3' <i>reverse</i> 5'- ctcagttctctcaaagatggtg -3'
Syndecan-4 Knockout (657 bp)	<i>forward</i> 5'- ttagggccgcaagaaaactatcc -3' <i>reverse</i> 5'- ggaacacggcggcatcag -3'
TTP Wildtyp (232 bp)	<i>forward</i> 5'- gagggccgaagctgctggctgggt -3' <i>reverse</i> 5'- ggtggcgattggcttggcgaag -3'
TTP Knockout (500 bp)	<i>forward</i> 5'- gagggccgacgatgctggctgggt -3' <i>reverse</i> 5'- ctgttggtcccagtcatagccg -3'

Primer für Klonierung und (*Real-time*) PCR

Für die gerichtete Klonierung von humanem TTP in den pFLAG-CMVTM-2 Vektor wurde bei der Herstellung der Primer eine *HindIII* (*forward* Primer) und eine *EcoRI*- Schnittstelle (*reverse* Primer) eingefügt. Diese sind unterstrichen und kursiv dargestellt. In Tabelle 2 sind die verwendeten Primer für die Klonierung und (*Real-time*) PCR angegeben.

Tabelle 2: Verwendete Primer für die Klonierung und (*Real-time*) PCR.

Name des Gens	Sequenz	
Human HPRT (198 bp)	<i>forward</i>	5'- cttgcttccttggtcaggcagt -3'
	<i>reverse</i>	5'- aacaacaatccgcccagggaac -3'
Human Syndecan-4 (201 bp)	<i>forward</i>	5'- cgggcaggaatctgatgacttga -3'
	<i>reverse</i>	5'- gcttcacgcgtagaactcattggt -3'
Human GAPDH (527 bp)	<i>forward</i>	5'- tccaccaccctgttgctgta -3'
	<i>reverse</i>	5'- tctgcaccaccaactgctt -3'
Human TTP (981 bp)	<i>forward</i>	5'- <u>aagctt</u> atggatctgactgccatctac -3'
	<i>reverse</i>	5'- <u>gaattc</u> tactcagaaacagagatgcgattgaag -3'
Maus Syndecan-4 (204 bp)	<i>forward</i>	5'- cccaagaactggaagagaatgaggt -3'
	<i>reverse</i>	5'- tacaccagcagcaggatcaggaaa -3'

siRNA Sequenzen

Die Sequenzen für die siRNA gegen humanes Syndecan-4 und die *nonsense* siRNA wurden von Rauch *et al.* beschrieben (Rauch *et al.*, 2005):

Human Syndecan-4 siRNA (*sense*) 5'- aaggccgatacttctccgag -3'
Nonsense siRNA (*scrambled*) 5'- aaggctctccggagcgatact -3'

3.1.1.4 Antikörper

Die angegebenen Antikörper wurden für ELISA (ELISA), Immunfluoreszenz (IF), FACS- Analyse (FACS), Western Blot (WB) und Immunhistochemie (IHC) verwendet. In Tabelle 3 und 4 sind die die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper angegeben.

Primärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper.

Spezifität	Typ	Verdünnung	Quelle
Anti- Syndecan-4	Monoklonal, Ratte	1:100 IHC	BD, Heidelberg
Anti- Syndecan-4	Monoklonal, Maus	1:1000 FACS 1:100 IF	Santa Cruz, Heidelberg
Anti- Syndecan-4	Polyklonal, Kaninchen	1:200 ELISA	Pineda, Berlin
Anti- α -Tubulin	Monoklonal, Maus	1:5000 WB	Sigma- Aldrich, München
Anti- β -Actin	Monoklonal, Maus	1:5000 WB	Sigma- Aldrich, München
Anti- ERK1/2	Polyklonal, Kaninchen	1:750 WB	NEB, Frankfurt
Anti- phospho- ERK1/2	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB	NEB, Frankfurt
Anti- p38	Polyklonal, Kaninchen	1:750 WB	NEB, Frankfurt
Anti- phospho-p38	Polyklonal, Kaninchen	1:500 WB	NEB, Frankfurt
Anti- MMP-1	Polyklonal, Kaninchen	1:100 IHC	Chemicon, Hofheim
Anti- MMP-3	Polyklonal, Kaninchen	1:100 IHC	Abcam, Cambridge

Sekundärantikörper

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper.

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Ziege Anti- Kaninchen IgG	Peroxidase	1:5000 WB	DakoCytomation Hamburg
Ziege Anti- Maus IgG	Peroxidase	1:5000 WB	DakoCytomation, Hamburg
Anti- Maus IgG	Biotin	1:100 IHC	Vector, Burlingame
Anti- Ziege IgG	Biotin	1:300 IHC	Vector, Burlingame
Anti- Hase IgG	Biotin	1:100 IHC	Vector, Burlingame
Anti- Ratte IgG	Biotin	1:250 IHC	Vector, Burlingame
Ziege Anti- Maus	Alexa Fluor 488	1:500 IF	Invitrogen, Karlsruhe
Esel Anti- Maus	FITC	1:1000 FACS	Dianova, Hamburg
Ziege Anti- Maus	FITC	1:1000 FACS	Dianova, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Kultivierung der Zellen wurde das Basismedium DMEM (4,5 g / l Glukose) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Antibiotikum / Antimykotikum und 1 x HEPES supplementiert. Die verwendeten Zellen wurden auf unterschiedlich große Zellkulturflaschen/-schalen oder Multiwellplatten bei 37°C im Brutschrank mit 5% Kohlendioxid und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei einer Konfluenz zwischen 90- und 100% wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 x Trypsin / EDTA- Lösung versetzt und für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 2 ml supplementiertem DMEM gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in supplementiertem DMEM aufgenommen und in entsprechender Verdünnung in neue Zellkulturflaschen überführt oder für die entsprechenden Versuche eingesetzt.

FCS- Hitzeinaktivierung: 25 min für 60°C

3.2.1.1 Isolierung von primären Synovialfibroblasten aus humanem Synovialgewebe

Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis oder Osteoarthrose wurde nach indizierten chirurgischen Eingriffen in der Orthopädischen Klinik des KMG Klinikums Kyritz und der Klinik für Rheumatologie im St. Josef- Stift Sendenhorst entnommen. Zur Isolierung der Synovialfibroblasten wurde das Gewebe in eine sterile Schale gegeben und mittels Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde es in 50 ml Röhrchen gegeben und mit der Dispase- Lösung für 2 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das grobe Gewebe entnommen und das Medium über einen 40 µm Filter gegeben um die schwebenden Gewebestücke zu entfernen. Die im Medium enthaltenen Fibroblasten wurden mittels Zentrifugation (1200 x g, 10 min) pelletiert, in supplementiertem DMEM aufgenommen und danach in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen Passage 3 und 9 eingesetzt.

<u>Dispase- Lösung:</u>	Dispase II	75 mg
	DMEM ohne Zusätze	50 ml

3.2.1.2 Isolierung von primären Synovialfibroblasten aus Mäusen

Die primären Synovialfibroblasten aus Mäusen wurden aus beiden Hinterpfoten eines Tieres gewonnen. Dazu wurden Haut, Sehnen und Muskel, sowie die Zehen unter sterilen Bedingungen entfernt, und anschließend der Fuß am Sprunggelenk vom Unterschenkel getrennt. Die präparierten Hinterpfoten wurden in ca. 3 mm große Stücke geschnitten. Der Verdau der Gewebestücke erfolgte entweder in einem mit ca. 10 ml 1 x Trypsin / EDTA- Lösung gefüllten 50 ml Röhrchen über 20 - 25 min schüttelnd bei 37°C, oder in 15 ml Dispase- Lösung (siehe 3.2.1.1) für 2 h schüttelnd bei 37°C, wobei das Gewebe alle 15 min stark gevortext wurde. Anschließend wurde das verdaute Gewebe über einen 40 µm Filter vom Synovialfibroblasten enthaltendem Medium getrennt. Nach dem Pelletieren der Zellen (1200 x g, 10 min) wurden diese in supplementiertem DMEM aufgenommen und in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt. Für die Experimente wurden die Zellen ab Passage 3 verwendet.

3.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen mit 1 x Trypsin / EDTA- Lösung abgelöst, in 15 ml- Röhrchen überführt und bei 1200 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen gegeben, bei -80°C tiefgefroren und nach 24 h in einen Stickstofftank überführt. Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 10 ml DMEM versetzt und, um das DMSO zu entfernen, für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in supplementiertem DMEM resuspendiert und in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt.

<u>Einfriermedium:</u>	DMSO	10% (v/v)
	FCS	90% (v/v)

3.2.1.4 Beschichten von Zellkulturschalen mit Fibronectin

Zur Beschichtung von Zellkulturschalen / -flaschen wurde die Fibronectin- Lösung auf den Boden der Zellkulturschalen gegeben, sodass dieser komplett bedeckt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellkulturschalen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 2% BSA (in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem einmaligen Waschen mit PBS wurden die entsprechenden Zellen auf die beschichteten Zellkulturschalen ausgesät oder bis zur Verwendung bei 4°C (Boden mit PBS bedeckt) gelagert.

<u>Fibronectin- Lösung:</u>	Fibronectin (1 mg / ml)	200 µl
	ad PBS, steril	20 ml

3.2.1.5 Stimulation von Synovialfibroblasten mit TNF α und IL-1 α

Um den Einfluss der Zytokine TNF α und IL-1 α auf die Synovialfibroblasten zu untersuchen, wurden diese für verschiedene proteinbiochemische Methoden auf mit Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. TNF α wurde, soweit nicht anders angegeben, in einer Endkonzentration von 100 ng / ml (gelöst in DMEM) und IL-1 α von 10 ng / ml (gelöst in 2% BSA in PBS) dem supplementierten DMEM zugesetzt. Nach Beendigung der versuchsabhängigen Inkubationszeiten wurden die Überstände für die ELISA abgenommen und bei -20°C aufbewahrt bzw. die Zellen für weiterführende Versuche entsprechend aufbereitet.

3.2.1.6 Transfektion

Lipofection von siRNA

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit einer Konfluenz von 90 - 95% auf den entsprechenden Zellkulturschalen ausgesät. Für die Transfektion wurde je nach Transfektionsansatz (siehe unten) *LipofectaminTM 2000* nach Angaben des Herstellers in serumreduzierten Medium OptiMem I gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin wurde die verwendete siRNA in den untenstehenden Volumina OptiMem I aufgenommen und zusammen mit dem Gemisch aus LipofectaminTM 2000 und OptiMem I für 20 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Vor der tropfenweisen Zugabe des siRNA- Gemisches auf die Zellen, wurden diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von OptiMem I bis zum Erreichen des angegebenen Endvolumens und die Inkubation der Zellen für 3 - 4 h bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit supplementiertem DMEM bis zur Verwendung kultiviert. Die *nonsense* siRNA wurde als Kontrolle mitgeführt.

6- well:

5 µl	Lipofectamin™ 2000	+ 245 µl OptiMem I
1 µl	siRNA (20 µM)	+ 249 µl OptiMem I
2 ml	Gesamtvolumen	

10 cm Schale:

30 µl	Lipofectamin™ 2000	+ 1470 µl OptiMem I
6 µl	siRNA (20 µM)	+ 1494 µl OptiMem I
10 ml	Gesamtvolumen	

Elektroporation von Plasmid- DNA

Da sich Synovialfibroblasten nur schlecht mit gängigen Methoden transfizieren lassen, erfolgte die Überexpression der Plasmid- DNA in synovialen Fibroblasten mit der Nucleofector®- Technologie der Firma amaxa (Köln). Dazu wurden die entsprechenden Zellen abgelöst (siehe 3.2.1) und gezählt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit 100 µl Elektroporations- Lösung und 3 - 5 µg Endotoxin- freier Plasmid- DNA (siehe 3.2.2.11) versetzt, gut resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Mit dem ausgewählten Transfektionsprogramm (hohe Transfektionsrate bzw. hohe Überlebensrate der Zellen) erfolgte die Elektroporation. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmten supplementiertem DMEM wurden die Zellen in eine entsprechende Zellkulturschale überführt. Für die Transfektion der primären, humanen Synovialfibroblasten wurde das *Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Kit* und für die primären, murinen Synovialfibroblasten das *Basic Nucleofection Kit for Primary Mammalian Fibroblasts* (amaxa, Köln) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

Elektroporations- Lösung:

Supplement	20 µl
Nucleofector™ Solution	90 µl

3.2.1.7 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Syndecan-4 in synovialen Fibroblasten wurden sterile runde Glasdeckgläschen in die Vertiefungen von 6- well Platten gegeben und 5×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (siehe 3.2.1) mit supplementiertem DMEM im Brutschrank bei 37°C. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur in PFA- Lösung (4% PFA, 0,1% Tween- 20 in PBS) fixiert. Um den pH- Wert auszugleichen wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10 min mit 0,1 M NH₄Cl inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur mit 1% BSA (in PBS) blockiert. Die Inkubation mit der primären Antikörper- Lösung erfolgte im Anschluss für 1 h bei 37°C. Die entsprechenden Antikörper wurden in Kapitel 3.1.1.4 beschrieben. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Zellen mit der fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper- Lösung (siehe 3.1.1.4) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mittels Propidiumiodid- Lösung für 10 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, die Deckgläschen mit *Fluoromount-G* (Biozol, Eching) auf Objektträger aufgebracht und getrocknet. Am konfokalen Laser- Mikroskop erfolgte die mikroskopische Auswertung mit der Software EZ 2000, Version 2.5.79.

Antikörper- Lösung: Primärer- bzw. sekundärer Antikörper wurde in 1% BSA in PBS verdünnt

Propidiumiodid- Lösung: 1 mg / ml Propidiumiodid, 1:5000 verdünnt in PBS

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse wurde die genomische DNA aus 3 - 5 mm der Schwanzspitze der entsprechenden Mäuse isoliert. Dazu wurde die Schwanzspitze in 250 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K (20 mg / ml, AppliChem, Darmstadt) bei 56°C unter ständigem Schütteln für 16 h lysiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *High Pure PCR Product*

Purification Kit (Roche, Mannheim). Die gewonnene genomische DNA wurde in 50 μ l RNase freiem Wasser von den verwendeten Säulen eluiert.

<u>Lysepuffer:</u>	Tris- Base, 1 M (pH 8,0)	25 ml
	EDTA, 0,25 M	50 ml
	NaCl, 5 M	10 ml
	Triton X-100	5 ml
	ad Aqua dest.	500 ml

<u>Proteinase K:</u>	Proteinase K	100 mg
	Aqua dest.	4,75 ml
	Tris- Base, 1 M (pH 8,0)	0,25 ml
	CaCl ₂ , 1 M	5 μ l

3.2.2.2 Genotypisierung der Mäuse

Die isolierte genomische DNA aus den Mäuseschwänzen wurde für die Genotypisierung der verschiedenen Mäusestämme eingesetzt (siehe 3.2.2.1). Das nachfolgende Pipettierschema wurde für alle PCRs zur Genotypisierung verwendet. Die eingesetzte *SAWAY-Taq-DNA-Polymerase* wurde von Peqlab (Erlangen) bezogen.

10 x PCR- Puffer (blau)	1,25 μ l
10 mM dNTP-Mix	0,25 μ l
<i>forward</i> Primer (10 pmol / μ l)	0,3 μ l
<i>reverse</i> Primer (10 pmol / μ l)	0,3 μ l
<i>Taq</i> - DNA- Polymerase	0,125 μ l
<u>DNA- Template</u>	<u>1 μl</u>
ad DEPC- Wasser	12,5 μ l

Die genomische DNA aller zu genotypisierenden Mäuse wurde mit dem folgenden Programm standardmäßig amplifiziert:

Initiale Denaturierung	95°C	10 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	58,5°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten DNA- Fragmente mittels Agarose- Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.3) aufgetrennt und der Genotyp hinsichtlich des Fragmentgrößenmusters überprüft.

3.2.2.3 Agarose- Gelelektrophorese und Extraktion von DNA- Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA- Fragmenten nach ihrer Größe, die bei der Genotypisierung von Mäusen und der Klonierung von Plasmid- DNA entstanden sind, wurde je nach Fragmentgröße ein 1 - 2%iges Agarosegel in 1 x TAE-Puffer hergestellt. Zur Visualisierung der Banden mit UV- Licht wurde dem Agarosegel 0,2 µg / ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandard wurde entweder der *Gene Ruler™ 100 bp* Marker (Fermentas, St. Leon - Rot) oder der *kilobase Marker* (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Die PCR- Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und anschließend in 1 x TAE- Puffer bei einer Spannung von 90 - 100 V für 30 - 40 min getrennt. Die Dokumentation erfolgte mit der Geldokumentations- einheit der Firma Peqlab (Erlangen). Gegebenenfalls wurden aus dem Agarosegel Plasmid- DNA oder PCR- Fragmente mit dem *NucleoSpin® Extract II* Kit von Macherey&Nagel (Düren) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

3.2.2.4 Isolierung von Gesamt- RNA und Reverse Transkription

Die Gesamt- RNA aus murinen und humanen Synovialfibroblasten wurde mit dem *RNeasy Kit* (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben gewonnen. Eluiert wurde die Gesamt- RNA mit 30 µl DEPC- Wasser. Anschließend wurde die Gesamt- RNA für 5 min bei 70°C inkubiert, sofort auf Eis gegeben und danach in komplementäre Einzelstrang- DNA (cDNA) mittels *MMLV- Reverse Transkriptase* (Invitrogen, Karlsruhe) umgeschrieben:

5 x Puffer	8 μ l
Random Hexamers (100 pmol / μ l)	2 μ l
1 mg / ml BSA	4 μ l
80 mM dNTP's	2 μ l
100 mM DTT	4 μ l
RNAse- Inhibitor	1 μ l
MMLV- Reverse Transkriptase	2 μ l
<u>Gesamt- RNA</u>	<u>15 μl</u>
ad DEPC- Wasser	40 μ l

Die Synthese der cDNA wurde für 2 h bei 37°C im Hei zblock durchgeführt.

3.2.2.5 Konventionelle PCR

Mit Hilfe der konventionellen PCR können definierte Gene *in vitro* amplifiziert werden. Dazu wurde die aus entsprechend behandelten Zellen gewonnene cDNA (siehe 3.2.2.4) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem unter 3.2.2.2 beschriebenen Reaktionsansatzes unter Verwendung des angegebenen Programms und der *Taq*-Polymerase.

3.2.2.6 Klonierung von PCR- Fragmenten

Für die Klonierung von humanem Tristetraprolin in den Vektor pFLAG-CMVTM-2 wurde mit den entsprechenden Primern das gewünschte Fragment mit der Größe von 981 bp aus der cDNA von Synovialfibroblasten amplifiziert. Dazu wurde die *Pfx- Polymerase* von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

10 x Pfx- Amplifikationspuffer	2,5 μ l
10 mM dNTP's	0,75 μ l
50 mM MgSO ₄	0,5 μ l
<i>forward</i> Primer (10 pmol / μ l)	0,75 μ l
<i>reverse</i> Primer (10 pmol / μ l)	0,75 μ l
Template cDNA	0,5 μ l
<u>Pfx- Polymerase</u>	<u>0,2 μl</u>
ad DEPC- Wasser	25 μ l

PCR- Programm zur Amplifikation:

Initiale Denaturierung	94°C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	59°C	1 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Nach der Agarose- Gelelektrophorese erfolgte die Extraktion der Fragmente (siehe 3.2.2.7) mit anschließender Restriktion. Die Ligation von PCR- Fragment und Vektor erfolgte im molaren Verhältnis von 5:1 mit der *T4- Ligase* von Invitrogen (Karlsruhe) entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2.2.7 Restriktion von PCR- Fragmenten und Sequenzierung

Die eingesetzten Restriktionsenzyme *EcoRI*, *BamHI* und *Hind III* wurden von der Firma NEB (Frankfurt / Main) bezogen. Zur Herstellung des Plasmids und zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation wurden die entsprechenden Enzyme eingesetzt. Mit dem entsprechenden Puffer wurde die Plasmid- DNA für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend elektrophoretisch im Agarosegel (siehe 3.2.2.3) aufgetrennt.

Die Sequenzierung des hergestellten Plasmids pFLAG-CMV-hTTP erfolgte durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten) mit den firmeneigenen Sequenzierungsprimern:

N-CMV-30 (5'-ATAACCCCGCCCCGTTG-3')

C-CMV-24 (5'-TTAGGACAAGGCTGGTGG-3').

3.2.2.8 Quantitative *Real- time* PCR

Zur Bestimmung der Expression bestimmter Gene wurde die cDNA (siehe 3.2.2.4) entsprechend vorbehandelter Zellen in der quantitativen *Real- time* PCR eingesetzt. Die Proben wurden entsprechend der Herstellerangaben mit dem *CyberGreen Kit* (Eppendorf, Hamburg) behandelt. Die Amplifikation erfolgte mit dem *Rotor- Gene cyclor RG-3000* (Corbett Life Sciece, Sydney) nach folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	20 s	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	30 s	
Elongation	72°C	45s	

Zur quantitativen Analyse der Daten wurden die mRNA-Level des entsprechenden Gens gegen die mRNA-Level des „housekeeping Gens“ HPRT normalisiert. Die Auswertung erfolgte nach „delta- delta CT Methode“.

3.2.2.9 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien der Stämme *Escherichia coli* TOP 10 F' (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. *Escherichia coli* XL10 Gold (Stratagene, Heidelberg) mit Plasmid- DNA wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 1 - 10 ng des zu transformierenden Plasmids gemischt und weiterhin für 30 min auf Eis gegeben. Anschließend wurden die Bakterien für 30 s bei 42°C im Heizblock inkubiert (Hitzeschock) und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB- Medium wurde der Bakterienansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd kultiviert und im Anschluss daran auf Agarplatten, welche mit dem Antibiotika Ampicillin (50 µg / ml) versetzt wurden, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. LB- Broth und LB- Agar wurden von der Firma USB (Staufen) bezogen.

<u>LB- Medium:</u>	LB- Broth	10 g
	ad Aqua dest.	500 ml
<u>Agarplatten:</u>	LB- Agar	8 g
	ad Aqua dest.	250 ml
	Autoklavieren	
	Ampicillin (Endkonzentration 50 µg / ml)	

Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien

Zur Kultivierung einzelner Bakterienklone wurde diese von der entsprechenden Agarplatte gepickt und in 100 - 200 ml mit Ampicillin (50 µg / ml) versetztem LB-

Medium bei 37°C über Nacht aerob kultiviert. Die transformierten Bakterien mit dem entsprechenden Insert wurden zur dauerhaften Lagerung mit 15% Glycerol bei -80°C in Kryoröhrchen aufbewahrt oder die Bakterienkultur wurde für die Plasmidisolierung verwendet (siehe 3.2.2.10 oder 3.2.2.11).

3.2.2.10 Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien (Minipräparation)

Zur Isolierung der entsprechenden Plasmid- DNA wurde das modifizierte Protokoll von Sambrook *et al.* verwendet (Sambrook *et al.*, 1974). Dazu wurden 5 ml Übernachtskultur zentrifugiert (18.000 x g, 1 min) und das Pellet in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl Puffer 2. Durch mehrmaliges Schwenken wurden beide Puffer gemischt und danach 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl Puffer 3 erfolgte die Lyse für 10 min auf Eis. Die anschließende Zentrifugation (18.000 x g, 10 min) diente zur Entfernung der ausgefällten Proteine und Zelltrümmer. Der Überstand wurde nachfolgend mit 1 ml Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (18.000 x g, 15 min). Das Pellet wurde durch Zugabe von jeweils 400 µl 70%igem Ethanol zweimal gewaschen. Nach dem Trocknen der Pellets wurde die Plasmid- DNA in 50 - 100 µl DEPC- Wasser aufgenommen.

<u>Puffer 1:</u>	Tris- Base (pH 8,0)	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse A	100 µg / ml
<u>Puffer 2:</u>	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
<u>Puffer 3:</u>	Kaliumacetat (pH 5,5)	3 M

3.2.2.11 Isolierung von Endotoxin- freier Plasmid- DNA aus Bakterien (Maxipräparation)

Aus 100 ml Übernachtskultur wurde mit dem *EndoFree Plasmid Isolation Kit* (Qiagen, Hilden) Endotoxin- freie Plasmid- DNA isoliert. Die Aufreinigung der DNA

erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach dem Trocknen der DNA wurde diese in 100 - 200 µl DEPC- Wasser aufgelöst.

3.2.2.12 Photometrische Bestimmung der DNA- Konzentration

Zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurden die Proben mit DEPC- Wasser verdünnt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260- und 280 nm gegen DEPC- Wasser als Leerwert gemessen. Durch die Bildung des Verhältnisses zwischen der optischen Dichte von 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der DNA (1,8 für reine DNA) ermittelt werden. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte von 1 bei 260 nm zugrunde gelegt, welche 50 µg / ml doppelsträngiger DNA entsprechen.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Extraktion von Gesamtprotein und Proteinbestimmung

$6 - 7 \times 10^5$ stimulierte und/oder transfizierte Synovialfibroblasten einer 10 cm Schale wurden nach Beendigung der entsprechenden Inkubationszeit auf Eis gegeben, 5 min mit eiskaltem PBS inkubiert und mittels Zellschaber vom Boden gelöst. Nach der Zentrifugation (10 min, 1200 x g) wurde das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch vortexen wurde der Lysevorgang verstärkt. Anschließend wurden die Zellreste durch zehninütige Zentrifugation bei 14.000 x g pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

<u>Lysepuffer:</u>	PMSF	1 mM
	Octylglykosid	50 mM
	MgCl ₂	1 mM

<u>Proteaseinhibitoren:</u>	Na ₃ VO ₄ (0,5 M)	4 µl
	Aprotinin (5 mg / ml)	4 µl
	PMSF (0,5 M)	2 µl
	Leupeptin (20 µg / ml)	4 µl
	NaF (0,5 M)	4 µl
	DTT (1 mM)	4 µl

Die Volumina sind für die Herstellung von 1 ml Lysepuffer angegeben.

Quantitative Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry mit dem *DC Protein Assay Kit* (Biorad, München) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Als Standard wurde eine BSA- Lösung definierter Konzentration (0 - 3 µg / ml) eingesetzt. Die Extinktion wurde anschließend photometrisch bei 750 nm bestimmt und anhand der BSA- Konzentrationen die Proteinkonzentration der Proben berechnet. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proben im Polyacrylamidgel (siehe 3.2.3.2) bzw. die Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

3.2.3.2 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese. Dazu wurde das *Mini PROTEAN*[®] 3 System der Firma Biorad (München) verwendet. Der Aufbau und die Durchführung erfolgten nach Herstellerangaben. Die verwendeten SDS- Gele wurden immer aus Trenn- und Sammelgel hergestellt. Für den Nachweis der Proteine wurden 20 µg des entsprechenden Lysats pro Spur geladen. Dazu wurden verwendeten Proben im Verhältnis 6:1 mit 6- fach konzentriertem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt, auf das Gel aufgetragen und anschließend bei konstanter Stromstärke von 30 mA elektrophoretisch getrennt. Als Größenstandard wurde der *Page Ruler*[™] *Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon - Rot) verwendet.

	<u>Sammelgel (4%):</u>	<u>Trenngel (10%):</u>
Aqua dest.	4,65 ml	7,9 ml
30% Acrylamid	1 ml	6,7 ml
Tris- Puffer	1,88 ml	5 ml
10% SDS (v/v)	75 µl	0,2 ml
10% APS (v/v)	37,5 µl	0,2 ml
TEMED	7,5 µl	8 µl

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf die Herstellung von zwei Polyacrylamidgelen. Für das Sammelgel wurde 1 M Tris- Puffer (pH 6,8) und für das Trenngel 1,5 M Tris- Puffer (pH 8,8) verwendet.

<u>6 x Probenpuffer:</u>	Tris- Base (pH 7,0)	15 mM
	DTT	15 mM
	SDS	0,5% (w/v)
	Glycerin	2,5% (v/v)
	Bromphenolblau	0,01% (w/v)
	ad Aqua dest.	50 ml
<u>Laufpuffer (pH 8,3):</u>	Tris- Base	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1% (w/v)

3.2.3.3 Proteintransfer auf PVDF- Membranen

Für den immunologischen Nachweis der elektrophoretisch aufgetrennter Proteine, wurden diese durch Elektrotransfer auf proteinbindende Membranen übertragen. Dazu wurde die PVDF- Membran der Firma Millipore (Schwalbach) für 1 min in Methanol äquilibriert und weitere 5 min in 1 x Blot- Puffer geschwenkt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte mittels Semi- Dry Blotsystem (Biorad, München) für 2 h bei konstanter Spannung von 10 V. Die Vollständigkeit des Proteinübertrags wurde auf der Membran mit *Ponceau S* (Sigma- Aldrich, München) kontrolliert. Anschließend wurde der Farbstoff mit 1 x Tris wieder entfernt.

<u>10 x Blot- Puffer:</u>	Tris- Base	480 mM
	Glycin	390 mM
	ad Aqua dest.	1 l

3.2.3.4 Western Blot

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die PVDF- Membran werden die freien Proteinbindungsstellen mit Blockierlösung abgesättigt. Dazu wird die Membran 1 h bei Raumtemperatur, oder alternativ über Nacht bei 4°C in Blockierlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/Tween für 10 min wurde die Membran für 1 - 2 h bei Raumtemperatur, oder bei 4°C über Nacht mit der entsprechenden primären Antikörper- Lösung inkubiert. Daran anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS/Tween gewaschen und für 30 min - 1 h mit der entsprechenden HRP- konjugierten sekundären Antikörper- Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal 10 min mit TBS/Tween) wurde die Membran für 1 min in ECL- Lösung (*ECLTM Western Blotting System*, GE Healthcare, Freiburg) entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Die feuchte Membran wurde anschließend in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Detektion der Proben erfolgte mittels *HyperfilmTM* (GE Healthcare, Freiburg) nach einer Expositionzeit zwischen 1 - 20 min in Abhängigkeit des erhaltenen Signals. Die Entwicklung des Röntgen- Films erfolgte in der Entwicklermaschine Optimax TypTR (MS Laborgeräte, Wiesloch). Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1,33n, National Institutes of Health (NIH), USA).

Blockierlösung: 2% BSA in TBS

TBS/Tween: 1 x TBS 500 ml
Tween- 20 500 µl

Antikörper- Lösung: Primärer- bzw. sekundärer Antikörper wurde in 1% BSA in TBS verdünnt

3.2.3.5 Strippen von PVDF- Membranen

Um die PVDF- Membran erneut mit einem anderen Antikörper zu inkubieren, musste der erste gebundene Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran für 20 min bei 55°C in Stripping- Puffer geschwenkt und anschließend dreimal für 10 min in TBS/Tween gewaschen. Nach einer Inkubation mit der Blockierlösung konnte die Membran mit einem weiteren primären Antikörper versetzt werden.

<u>Stripping- Puffer:</u>	Tris- Base (pH 6,8)	62,5 mM
	β- Merkapthoethanol	100 mM
	SDS	2% (v/v)

3.2.3.6 MMP ELISA

Zur Bestimmung der Produktion von humanem MMP-1 und MMP-3 nach Stimulation und/oder Transfektion von 2×10^5 Synovialfibroblasten im 6- well, wurden die entsprechenden Zellüberstände im *Human Pro- MMP-1 Quantikine ELISA Kit* und im *Human (total) MMP-3 Quantikine ELISA Kit* von R&D Systems (Wiesbaden- Nordenstadt) eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Für die Messung von murinem MMP-3 wurde der *Mouse MMP-3 (total) Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems, Wiesbaden - Nordenstädt) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Messung der Proben im ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm wurden die Ergebnisse anhand des mitgelieferten Standards quantifiziert.

3.2.3.7 Phospho- MAP Kinase Array

Um den Einfluss von Syndecan-4 auf die Aktivierung verschiedener humaner MAP Kinasen zu untersuchen, wurden Synovialfibroblasten auf Fibronectin kultiviert (siehe 3.2.1.4), mit entsprechender siRNA transfiziert und für 20 min mit IL-1 α (10 ng / ml) stimuliert. Im Anschluss wurden die Proben für die Verwendung im *Proteome ProfilerTM Human Phospho- MAPK Array* (R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt) aufbereitet, auf eine mit 21 verschiedenen phospho- Antikörpern punktuell beschichtete Membran gegeben und entsprechend der Hersteller-

angaben inkubiert. Die Auswertung der Intensitäten erfolgte, im Vergleich zu den internen Positivkontrollen auf der Membran, mit der Software ImageJ.

3.2.4 Histologische Methoden

3.2.4.1 Fixierung von Synovialgewebe

Das präparierte Synovialgewebe wurde mit PBS gewaschen und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal für 30 min mit PBS gewaschen und in Paraffin eingebettet (siehe 3.2.4.3).

3.2.4.2 Präparation und Entkalkung von Mäusepfoten

Um longitudinale Gewebeschnitte einer Hinterpfote einer Maus anzufertigen, wurde diese von Haut, Muskeln und Sehnen befreit und anschließend oberhalb des Sprunggelenks vom Unterschenkel getrennt. Nach dem Fixieren der Pfote in 4% PFA bei 4°C über Nacht wurde diese dreimal 30 min mit PBS gewaschen und anschließend in EDTA- Puffer für ca. 3 Wochen entkalkt. Der Puffer wurde alle 3 -5 Tage gewechselt und die fortschreitende Entkalkung mit Hilfe einer Kanüle getestet. Nach Erreichen des gewünschten Entkalkungsgrades wurde die Probe in Makro- Einbettkassetten (Roth, Karlsruhe) überführt und für 24 h in PBS gelagert.

<u>EDTA- Puffer:</u>	EDTA	10%
	ad PBS	1 l

3.2.4.3 Paraffineinbettung von Synovialgewebe und Mäusepfoten

Um Gewebeproben von RA- und OA- Patienten sowie die Mäusepfoten in Paraffin einbetten zu können, wurden sie jeweils für 24 h in 70-, 90-, 96- und 100%igem Ethanol entwässert. Der entsprechende Alkohol wurde zweimal täglich gewechselt. Zum Entfernen des Alkohols wurden die Präparate zuerst für 24 h in Zedernholzöl (Merck, Karlsruhe) bei Raumtemperatur und anschließend für 24 h in ein Gemisch aus je einem Teil Zederholzöl und Paraffin bei 48°C gegeben. Für jeweils weitere 12 h wurden die Proben in fünf verschiedene Paraffinbäder bei 60°C getaucht und anschließend achsengerecht in passende Blockformen

eingebettet, bei 4°C gehärtet und anschließend am Mikrotom (Leica) geschnitten oder bei Raumtemperatur gelagert.

Am Mikrotom wurden von den Paraffinblöcken, nach Kühlung bei 4°C, 5 µm dicke Serienschritte angefertigt und diese im 40°C warmen Wasserbad vereinzelt und entfaltet. Anschließend wurden die Präparate auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

3.2.4.4 Toluidin- Blau- Färbung von Paraffinschnitten

Für die Knorpelfärbung humaner und muriner Paraffinschnitte wurden diese dreimal für 5 min in Xylol inkubiert, in absteigender Alkoholreihe (jeweils 2 min in 100-, 96-, 80-, und 70%igem Ethanol) entwässert und anschließend für 5 min in Aqua dest. gegeben. Die Gewebeschnitte wurden für 15 - 25 s in 1 x Toluidin-Lösung gefärbt, danach kurz in Aqua dest. und in die Alkohole der aufsteigenden Alkoholreihe getaucht. Die Gewebeschnitte wurden für dreimal 5 min in Xylol gegeben und anschließend mit DPX eingedeckelt.

<u>10 x Toluidin- Lösung:</u>	Toluidin	1 g
	di- Natriumtetraborat	1 g
	ad Aqua dest.	100 ml
	2 x filtrieren	

3.2.4.5 Morphometrische Analyse

Die Toluidin- Blau- gefärbten Präparate (siehe 3.2.4.4) der Hinterpfoten der Mäuse wurden hinsichtlich der Knorpel- und Entzündungsfläche analysiert. Die Verhältnisse der untersuchten Parameter wurden prozentual zur Gesamtfläche des Präparats gesetzt. Zur Auswertung wurden die Mittelfußknochen mikroskopisch (10- fach Vergrößerung) aufgenommen und die Flächen mit der Software spot 4.6 (Diagnostic Instruments Inc., USA) analysiert.

3.2.4.6 Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten

Für die immunhistochemischen Färbungen von Proteinen wurden Paraffinschnitte von RA- und OA- Patienten, sowie Schnitte der Hinterpfoten von den verwendeten Mausmodellen dreimal für 5 min mit Xylol entparaffiniert und in absteigender Ethanolreihe (jeweils 2 min in 100-, 96-, 80- und 70%igem Ethanol) entwässert. Anschließend wurden die Präparate für 2 min in Aqua dest. und dreimal für 5 min in Tris- Puffer gegeben. Zur Demaskierung der zu detektierenden Antigene wurden die Präparate für 10 min bei 37°C mit 1 x Trypsin / EDTA behandelt, gefolgt von einem Waschschrift in Aqua dest. und in 1 x Tris- Puffer für jeweils 5 min. Im Anschluss daran wurden die Präparate mit einer wasserabweisenden *Pap Pen* (Kisker, Steinfurt) umrahmt und für 30 min mit 1,5% Ziegen- bzw. Pferdeserum (in Tris-Puffer) zum Blockieren der unspezifischen Antikörperbindungsstellen versetzt. Der Primärantikörper wurde in 1% Ziegen- bzw. Pferdeserum (in Tris- Puffer) in entsprechender Verdünnung angesetzt, auf die Proben gegeben und für 1 h bei 37°C oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dem Dekantieren des Antikörpers wurden die Präparate dreimal für 5 min mit Tris- Puffer gewaschen und für 30 min mit dem biotinyliertem sekundären Antikörper für 30 min versetzt. Nach dem dreimaligen Waschen in Tris- Puffer für jeweils 5 min wurden die Präparate entsprechend der Herstellerangaben mit dem *Alkaline Phosphatase ABC-A Kit* und dem *Vector Red Substance Kit* (Vector, Burlingame) behandelt. Um die Zellkerne zu färben, wurden die Präparate nach erneuten Spülen mit Leitungswasser für 1 min, diese in vorgewärmtes Methylgrün (Vector, Burlingame) gegeben und für 5 - 10 min bei 60°C inkubiert. Schließlich wurden die Präparate für 1 min in Aqua dest. gegeben, in Ethanol aufsteigender Alkoholreihe (70-, 80-, 96- und 100%) kurz getaucht und anschließend dreimal für 3 min in Xylol gegeben. Abschließend wurden die Präparate mit *DPX* (Merck, Darmstadt) eingedeckelt und über Nacht getrocknet. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch mit der Software Image Pro Plus Version 5.0.2.9. (Media Cybernetics, Inc, Bethesda, USA).

<u>10 x Tris- Puffer (pH 7,5):</u>	Tris- Base	9 g
	Tris- Säure	68,5 g
	NaCl	87,8 g
	ad Aqua dest.	1 l

<u>PBS- Puffer:</u>	Na ₂ HPO ₄	1,42 g
	NaCl	9 g
	ad Aqua dest.	1 l

3.2.5 Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen wurde die Methode der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS) verwendet. Um die Expression von Syndecan-4 auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurden jeweils 5×10^5 Synovialfibroblasten von RA- und OA-Patienten auf 10 cm Schalen kultiviert (siehe 3.2.1) und mit entsprechenden Zytokinen stimuliert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 5 ml eiskaltem PBS für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden gelöst, in ein 15 ml Tube überführt und durch Zentrifugation (10 min, 1200 x g, 4°C) pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml FACS- Puffer resuspendiert und mit 1 ml Blockier- Lösung (2% BSA in PBS) für 30 min auf Eis gegeben. Nach beendeter Zentrifugation (10 min, 1200 x g, 4°C) wurde das Zellpellet in der primären Antikörper- Lösung aufgenommen und für 1 h bei 4°C oder auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml FACS- Puffer gewaschen und mit der sekundären Antikörper- Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 1 h bei 4°C oder auf Eis. Nach dreimaligem Waschen wurde das Zellpellet in 200 ml Propidiumiodid- Lösung (1 µg / ml in FACS- Puffer) aufgenommen und im FACS- Calibur- Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Cellquest Pro[®].

<u>FACS- Puffer:</u>	1 x PBS	500 ml
	FCS	15 ml
	Natriumazid	50 mg

Antikörper- Lösung: Primärer- bzw. sekundärer Antikörper wurde in FACS- Puffer verdünnt

3.2.6 Mausmodelle

Für die durchgeführten Experimente wurden Syndecan-4^{-/-}, Wildtyp (C57Bl/6), hTNFtg und TTP^{-/-} Mäuse verwendet und entsprechend miteinander verpaart. Soweit nicht anders angegeben, wurden männliche hTNFtg Mäuse zur Zucht einmal wöchentlich mit 0,01 mg / 10 µl / g Maus Etanercept (Enbrel[®], Wyeth Pharma, Münster) bzw. 200 µl Infliximab (0,2 mg / ml) (Remicade[®], Centocor, Horsham) intraperitoneal gespritzt, da unbehandelte hTNFtg Männchen auf Grund ihrer fortschreitenden Erkrankung nur schwer Nachkommen zeugen können. Beide Medikamente sind TNFα-Inhibitoren und besitzen eine anti-inflammatorische Wirkung, wodurch eine Verlängerung der Lebensdauer und auch der Zucht erreicht werden kann.

Klinische Analyse der Mäuse

Die verwendeten Mäuse wurden nach der Genotypisierung (Woche 4/ 5) ein- bis zweimal wöchentlich gewogen und hinsichtlich ihrer Griffstärke und Schwellung der Pfoten analysiert. Die beiden Parameter wurden jeweils in 4 Unterpunkte eingeteilt: Griffstärke (0 bis -3; 0= normale Griffstärke im Vergleich zum Wildtyp, -1= reduziert, -2= schwer reduziert, -3= keine Griffstärke bestimmbar) und Schwellung (0 bis 3; 0= keine Schwellung im Vergleich zum Wildtyp, 1= milde Schwellung, 2= moderate Schwellung und beginnende Deformation, 3= Starke Schwellung und Deformation der Zehen und Knöchel). Aus den erhaltenen Ergebnissen der Hinter- und Vorderpfoten wurde pro Messtag der Mittelwert gebildet (*Zwerina et al., 2004*). Nach Beendigung eines Versuches wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Hinterpfoten für die Histologie (siehe 3.2.4.2) oder zur Isolierung synovialer Fibroblasten (siehe 3.2.1.2) verwendet.

3.2.7 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben, wurden bei allen Versuchen die Mittelwerte \pm SEM bestimmt. Da die Ergebnisse keiner Gauß'schen Normalverteilung folgen, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test angewendet. Mit dem Mann-Whitney U-Test wurden die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen mit $p < 0,05$ ermittelt. Zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Inc, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

Die Rolle des Heparansulfat Proteoglykans Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis ist derzeit noch unklar. Es wurde gezeigt, dass Syndecan-4 auch in Fibroblasten und anderen Zellen in einem gewebespezifischen Muster exprimiert wird (Tkachenko *et al.*, 2005). Welchen Einfluss Syndecan-4 auf die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis besitzt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Die zellbiologische Grundlage der Untersuchungen bilden dabei Synovialfibroblasten von RA-Patienten, die in Abbildung 8 dargestellt sind. Ihre spindelförmige Morphologie und die prominenten Nucleoli sind charakteristisch für die RASFs.

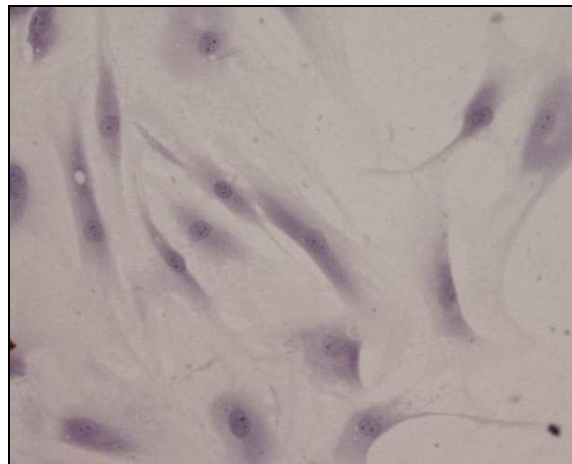


Abbildung 8: Die Morphologie von RASFs.

Die RASFs wurden aus dem Synovialgewebe herausgelöst und in DMEM mit 10% FCS kultiviert (hier in Passage 5). Die Hämatoxylinfärbung macht die Nucleoli im Zellkern sichtbar (Originalvergrößerung x 100).

4.1. Syndecan-4 Expression und seine Regulation durch TNF α

In dieser Arbeit wurden Gewebe und Synovialfibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis als Ausgangsmaterial für Untersuchungen hinsichtlich der Expression von Syndecan-4 genutzt. Weiterhin wurde die Regulation von Syndecan-4 durch das Zytokin TNF α in Synovialfibroblasten *in vitro* und in TNF-abhängigen Mausmodellen analysiert.

4.1.1 Expression von Syndecan-4 in rheumatoiden Synovialfibroblasten

Um die Rolle von Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis aufzuklären, wurde Synovialgewebe von RA- und OA- Patienten in Paraffin eingebettet, geschnitten, mit einem Antikörper gegen Syndecan-4 immunhistochemisch angefärbt und die Syndecan-4 Expression bzw. die Verteilung im Gewebe analysiert. Abbildung 9 zeigt eine erhöhte Expression von Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis in der Synovialmembran mit der stärksten Färbung an der äußeren Deckzellschicht („*lining layer*“), welche die Anheftung und die Degradation des artikulären Knorpels vermittelt. Im „*sublining*“, den tieferen Zellschichten, färbten sich vor allem perivaskuläre Zellen positiv für Syndecan-4. Dagegen konnte im Synovialgewebe von OA- Patienten nur eine geringe Anzahl von Syndecan-4 positiven Zellen gefunden werden.

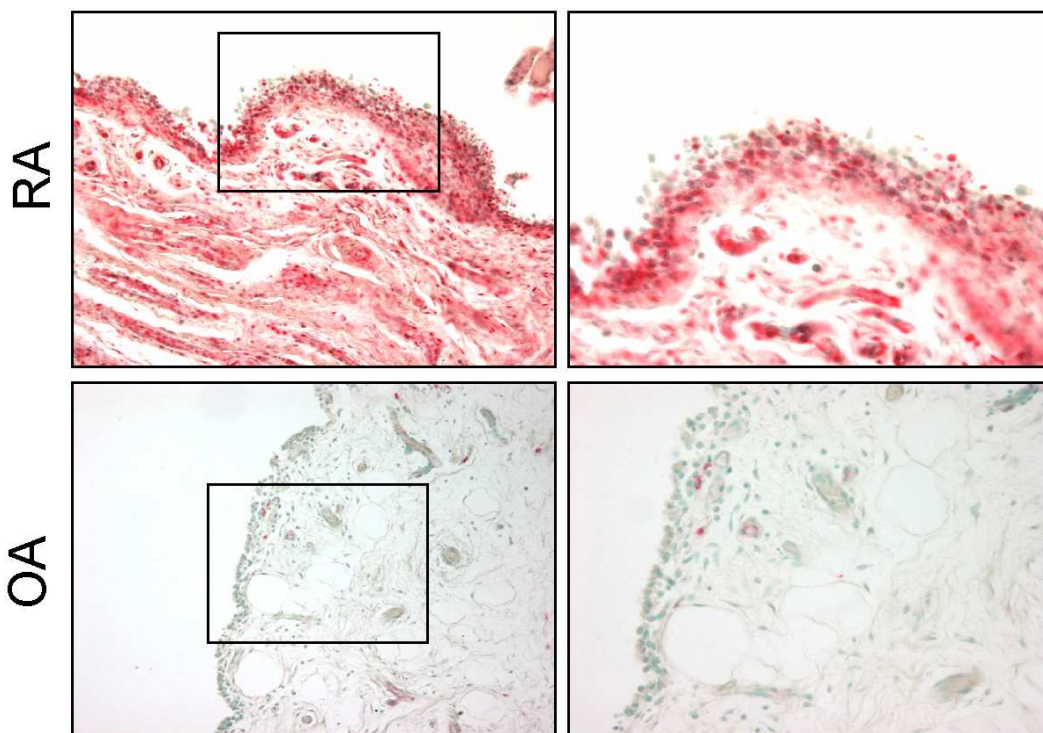


Abbildung 9: Syndecan-4 Expression in Paraffinschnitten von RA- und OA- Patienten.

Die Schnitte wurden mit einem monoklonalen Antikörper (Klon 5G9) gegen Syndecan-4 gefärbt. In der Deckzellschicht des untersuchten Synovialgewebes von Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte eine erhöhte Expression von Syndecan-4 (rot), verglichen mit OA-Patientengewebe, gefunden werden. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün gegen gefärbt (Originalvergrößerung: links x 100, rechts x 200).

Auf zellulärer Ebene (siehe Abbildung 10) wurde die Syndecan-4 Expression in primären Synovialfibroblasten von RA- und OA- Patienten immunzytochemisch untersucht. Das membranständige Syndecan-4 konnte an der Zelloberfläche der untersuchten Synovialfibroblasten lokalisiert werden, wobei Syndecan-4 in RASFs vergleichsweise signifikant höher exprimiert wird als in OASFs.

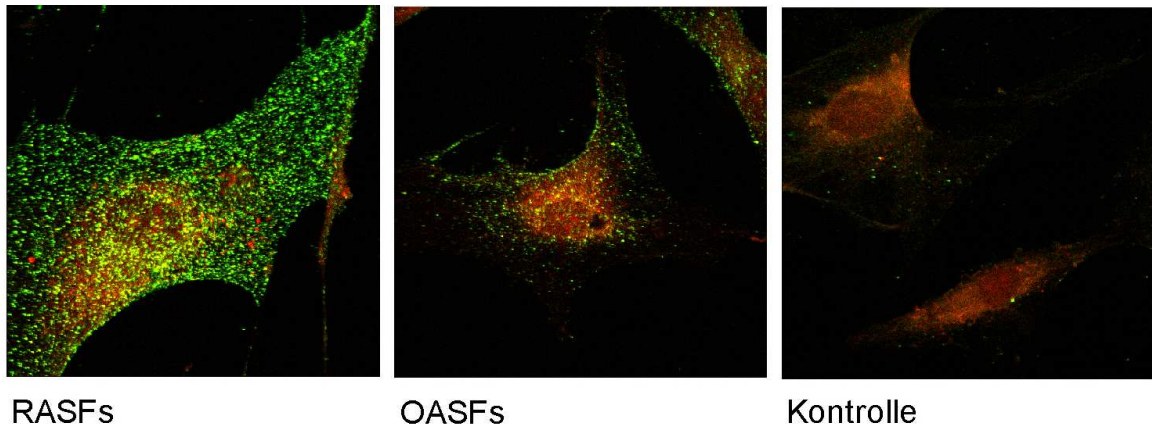


Abbildung 10: Syndecan-4 Expression in kultivierten RASFs und OASFs.

Synovialfibroblasten wurden mit einem monoklonalen Antikörper (Klon 5G9) gegen Syndecan-4 gefärbt. Verglichen mit OASFs, ist Syndecan-4 in RASFs an der Oberfläche stark (grün) exprimiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid (rot) gegen gefärbt. Als Negativkontrolle wurden RASFs nur mit dem Alex Fluor 488- markierten sekundären Antikörper und Propidiumiodid inkubiert.

Mittels quantitativer *Real-time* PCR wurden die mRNA Expression von Syndecan-4 in RASFs und OASFs ermittelt (siehe Abbildung 11). Es konnte gezeigt werden, dass RASFs um 4,5-fach erhöhte Level an Syndecan-4 aufweisen verglichen mit Synovialfibroblasten von Patienten mit Osteoarthritis. Analog der Daten zur mRNA Expression wurde die Syndecan-4 Expression auf der Oberfläche von RASFs und OASFs mittels FACS- Analyse untersucht. Es zeigte sich eine 1,5-fach erhöhte Oberflächenexpression nach der Quantifizierung von Syndecan-4 in RASFs gegenüber OASFs.

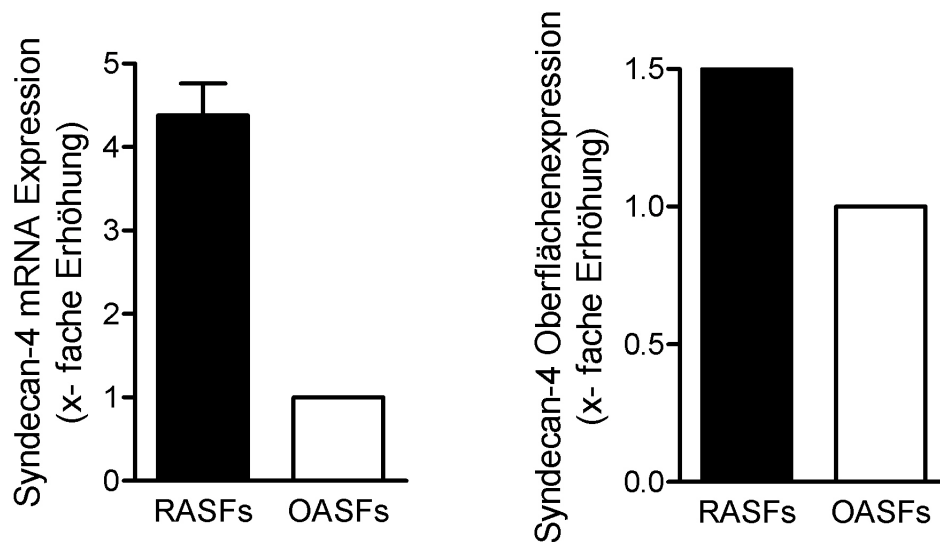


Abbildung 11: Nachweis der Syndecan-4 mRNA und Oberflächenexpression in Synovialfibroblasten.

In primären Synovialfibroblasten von RA- und OA-Patienten, die auf Fibronectin kultiviert wurden, wurde sowohl die Syndecan-4 mRNA Expression mittels quantitativer *Real-time* PCR (links) als auch die Oberflächenexpression von Syndecan-4 mittels FACS-Analyse bestimmt (rechts). Die Daten zur mRNA Expression wurden gegen HPRT abgeglichen und ebenso wie die Daten zur Oberflächenexpression gegen OASFs normalisiert.

4.1.2 Regulation von Syndecan-4 durch TNF α

Basierend auf den Daten zur Expression von Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis, kann davon ausgegangen werden, dass das entzündliche Milieu im rheumatoiden Synovium, durch die vermehrte Produktion an TNF α , zu einer starken und anhaltenden Hochregulation von Syndecan-4 in daraus isolierten synovialen Fibroblasten führt.

Primäre Synovialfibroblasten von RA-Patienten wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen an TNF α , als dem wichtigsten entzündlich wirkenden Zytokin bei Rheumatoider Arthritis, für 4 h inkubiert. Anschließend wurde mit quantitativer *Real-time* PCR die Expression der Syndecan-4 mRNA bestimmt. Wie in Abbildung 12 zu sehen erhöht sich die Syndecan-4 mRNA Expression gegenüber den unstimulierten RASF mit steigender TNF α Konzentration auf das bis zu 5-fache.

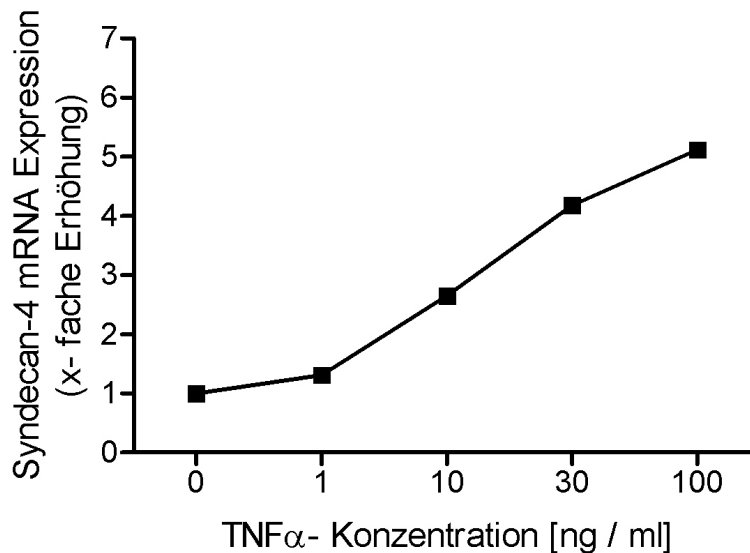


Abbildung 12: Syndecan-4 Induktion durch TNF α in RASFs.

Synovialfibroblasten wurden auf Fibronectin kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF α für 4 h stimuliert. Die Syndecan-4 mRNA Expression mittels quantitativer PCR bestimmt. Die Daten wurden gegen die unstimulierten RASFs normalisiert.

Werden primäre Synovialfibroblasten von RA- und OA- Patienten für 24 h mit TNF α stimuliert (siehe Abbildung 13), so konnte eine 17- fache Erhöhung der Syndecan-4 mRNA Expression gegenüber den nicht stimulierten OA- Fibroblasten gezeigt werden. Die basalen Werte von Syndecan-4 und die Level nach der Stimulation mit TNF α sind in den rheumatoiden Synovialfibroblasten signifikant höher. Eine signifikante Erhöhung (3,7- fach) der Syndecan-4 mRNA Expression wurde in RASFs gegenüber den unstimulierten RASFs bestimmt. Synoviale Fibroblasten von RA- Patienten exprimieren 4,4- fach mehr Syndecan-4 als OASFs. Eine Syndecan-4 Expression lässt sich auch in OASFs durch TNF α induzieren, die jedoch geringer (9- fach) ist.

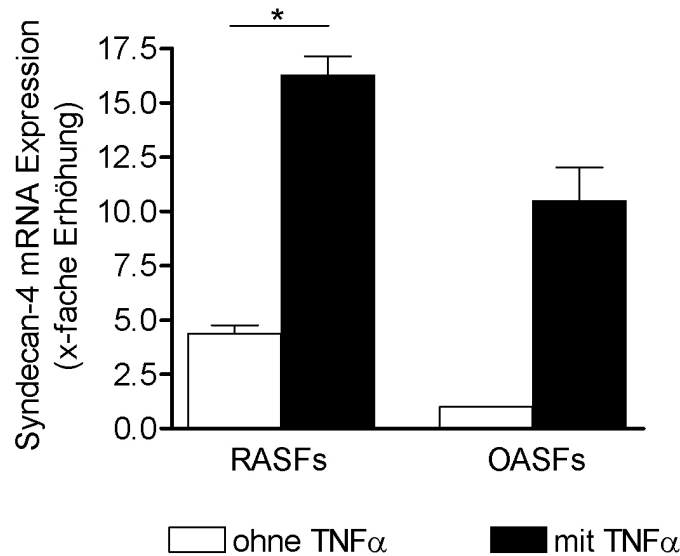


Abbildung 13: Syndecan-4 mRNA Expression nach Stimulation von RASFs und OASFs mit TNF α .

Primäre RASFs und OASFs wurden auf Fibronectin kultiviert und für 24 h mit 100 ng / ml TNF α stimuliert, die mRNA-Level mittels quantitativer *Real-time* PCR analysiert. Die Daten wurden gegen HPRT abgeglichen und gegen die unstimulierten OASFs normalisiert (*, $p < 0,05$, $n = 3$).

Demnach induziert TNF α sowohl in RASFs als auch in OASFs die Expression von Syndecan-4. Um die chronische Wirkung von TNF α mit seiner anhaltenden Hochregulation von Syndecan-4 in den Synovialfibroblasten zu untersuchen, wurden zwei Mausmodelle einer chronisch-destruktive Arthritis verwendet, wie in Kapitel 1,1.4 beschrieben. Abbildung 14 zeigt, Paraffinschnitte vom Mittelfuß der Hinterpfoten von Wildtyp, hTNFtg und TTP^{-/-}Mäuse, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen Syndecan-4 gefärbt wurden. In der Synovialmembran beider Mausmodelle konnte eine starke Expression von Syndecan-4 gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Paraffinschnitte von den Wildtyp Mäusen nur eine schwache Färbung von Syndecan-4 im Synovialgewebe.

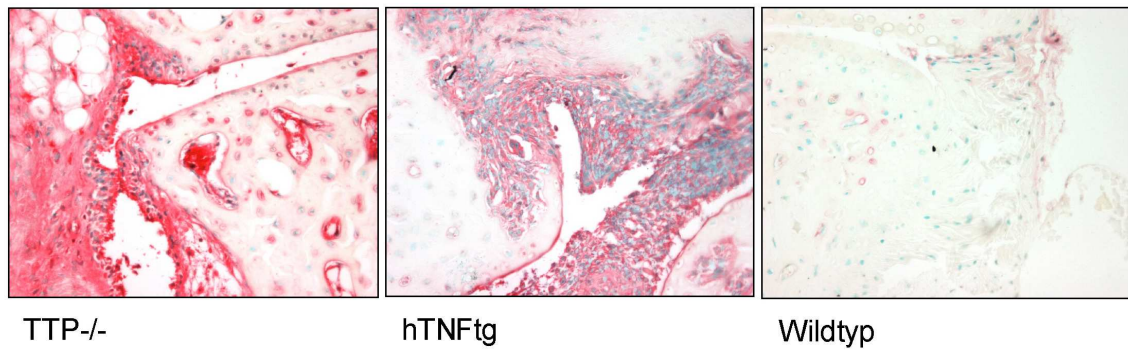


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von Syndecan-4 in Paraffinschnitten von Wildtyp, hTNFtg und TTP^{-/-} Mäusen.

Die Schnitte wurden von der Hinterpfote der Mäuse angefertigt und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Syndecan-4 (rot) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün gegen gefärbt (Originalvergrößerung: x 200).

Um herauszufinden, ob eine kontinuierliche Stimulation mit TNF α für die Hochregulation von Syndecan-4 in synovialen Fibroblasten notwendig ist, wurden diese aus den beiden TNF- abhängigen Mausmodellen (hTNFtg und TTP^{-/-}) isoliert und die Expression von Syndecan-4 mittels quantitativer *Real-time* PCR bestimmt (siehe Abbildung 15). Verglichen mit den Syndecan-4 Level der Synovialfibroblasten von Wildtyp Mäusen, wiesen die hTNFtg Mäuse eine 14,1-fache und die TTP^{-/-} Mäuse eine 19,8-fache Erhöhung der Level an Syndecan-4, gegenüber den Synovialfibroblasten der Wildtyp Mäuse auf.

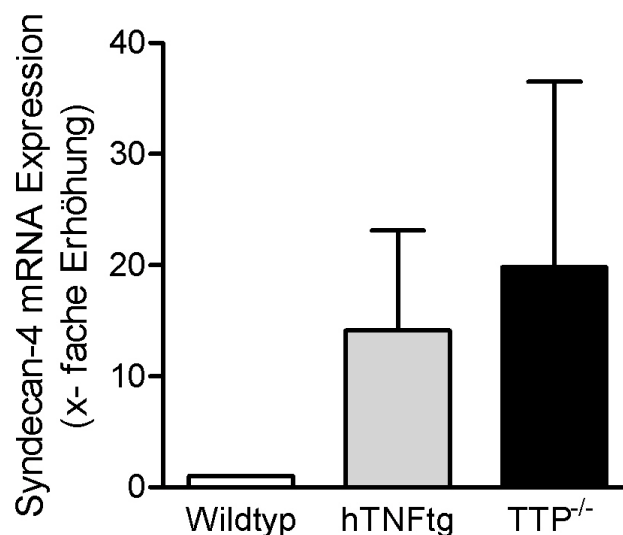


Abbildung 15: Syndecan-4 mRNA Expression von Wildtyp, hTNFtg und TTP^{-/-} Mäusen.

Mittels quantitativer *Real-time* PCR wurde die Syndecan-4 mRNA Expression in primären Synovialfibroblasten von hTNFtg und TTP^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, bestimmt. Die Daten wurden gegen HPRT abgeglichen und gegen die Syndecan-4 mRNA Expression der Wildtyp Mäuse normalisiert (n=4).

Werden hTNFtg Mäuse mit Enbrel[®], einem monoklonalen Antikörper gegen TNF α , über mehrere Wochen behandelt, so kann die Wirkung von TNF α auf die Gelenkzerstörung verzögert werden. Wie Abbildung 16 zeigt, können nur geringe Unterschiede in der Syndecan-4 Expression anhand von Paraffinschnitten gezeigt werden. Die mit Enbrel[®] behandelten hTNFtg Mäuse zeigen in Woche 10 eine deutlich geringere Zerstörung der Knochen- und Knorpelstrukturen und eine geringere Infiltration gegenüber hTNFtg Mäusen, die unbehandelt blieben.

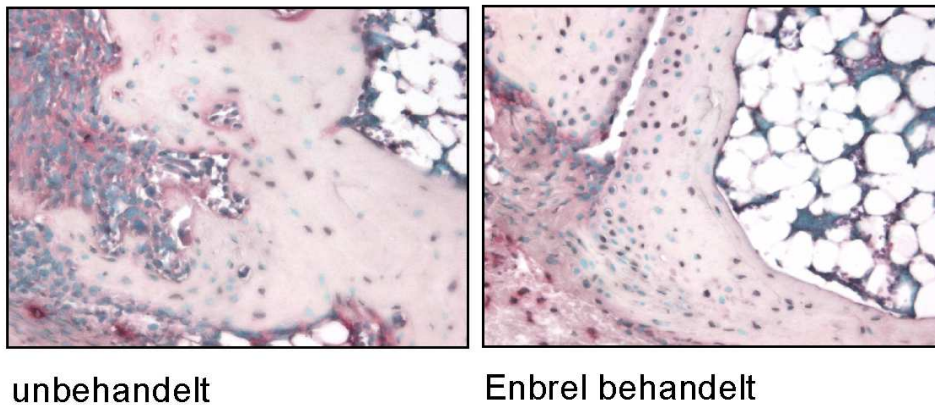


Abbildung 16: Reduktion der Knorpelzerstörung in hTNFtg Mäusen.

hTNFtg Mäuse wurden von der 4. bis zur 10. Woche einmal wöchentlich mit Enbrel[®] behandelt. Die in Paraffin eingebetteten Hinterpfoten wurden mit einem monoklonalen (Ratte Anti-Maus) Antikörper gegen Syndecan-4 (rot) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün gegen gefärbt (Originalvergrößerung: x 200).

Um den Einfluss von TTP auf die Syndecan-4 Expression in synovialen Fibroblasten zu ermitteln, wurde humanes TTP in den pFLAG-CMVTM-2 Vektor kloniert und anschließend in RASFs überexprimiert. Die quantitative Bestimmung (siehe Abbildung 17) ergab eine signifikante Erhöhung von humanem TTP in Synovialfibroblasten von RA- Patienten nach der Transfektion.

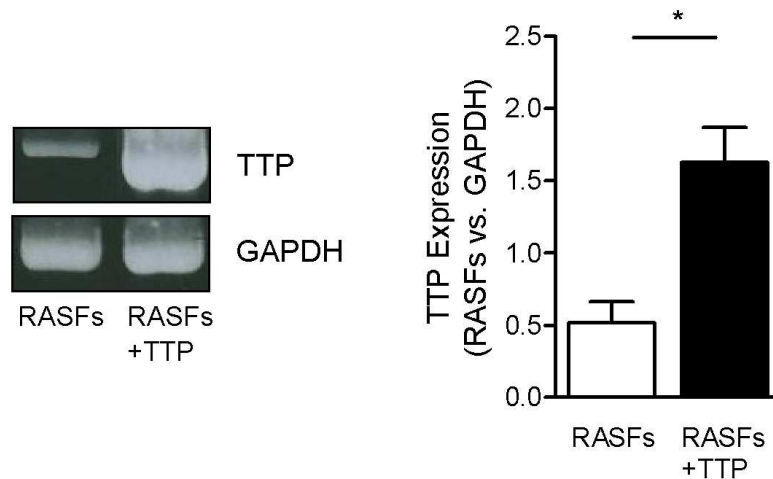


Abbildung 17: Überexpression von humanem TTP in Synovialfibroblasten von RA-Patienten.

Humanes TTP wurde in RASFs überexprimiert und die TTP- Expression mittels konventioneller PCR nachgewiesen. (repräsentatives Bild, links). Die Daten wurden gegen GAPDH abgeglichen und hinsichtlich der TTP Expression quantifiziert (rechts) (*; $p < 0,05$; $n=3$).

Nach der Überexpression von TTP in den RASFs wurde die Expression von Syndecan-4 mittels quantitativer *Real-time* PCR in diesen Zellen bestimmt (siehe Abbildung 18). Transfizierte RASFs zeigten keine Unterschiede in der Syndecan-4 mRNA Expression gegenüber untransfizierten RASFs. TTP scheint daher die Expression der Syndecan-4 mRNA nicht direkt zu beeinflussen. Vielmehr scheint die Hochregulation von Syndecan-4 in TTP defizienten Synovialfibroblasten direkt auf die Stimulation durch $TNF\alpha$ zurückzuführen zu sein.

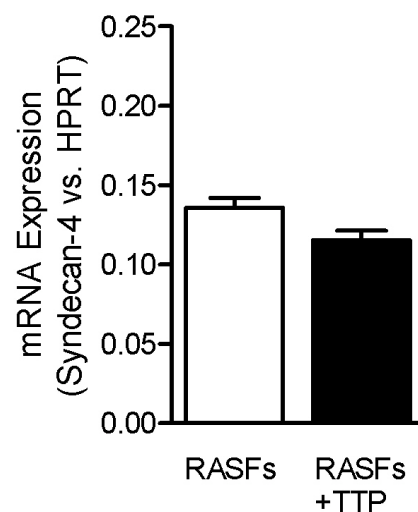


Abbildung 18: Syndecan-4 mRNA Expression nach TTP- Überexpression in RASFs.

Die Expression der Syndecan-4 mRNA nach Überexpression mit dem pFLAG-CMV-hTTP Vektor wurde mittels quantitativer *Real-time* PCR bestimmt und gegen HPRT abgeglichen ($n=3$).

Die gewonnenen Daten hinsichtlich der Expression und der Regulation von Syndecan-4, zeigen sowohl *in vivo* anhand der beiden analysierten Mausmodelle als auch *in vitro* in rheumatoiden Synovialfibroblasten, dass Syndecan-4 während der Rheumatoiden Arthritis induziert und durch TNF α reguliert wird.

4.2 Die Rolle von Syndecan-4 bei der IL-1 induzierten MMP Produktion

Die Daten zur Expression und der Regulation von Syndecan-4 durch TNF α führten zu den Fragen, in wieweit Syndecan-4 in die stabile Aktivierung von RASFs involviert ist und ob Syndecan-4 an dem aggressiv- invasiven Verhalten der RASFs beteiligt ist. Dazu wurden RASFs mit dem Zytokin IL-1 α stimuliert, da dies die Expression der Matrixzerstörenden Enzyme, wie Matrixmetalloproteinasen, reguliert und gleichzeitig den Knorpelabbau in der chronisch, destruktiven Arthritis vermittelt.

4.2.1 MMP Expression bei Rheumatoider Arthritis

Bei der Rheumatoiden Arthritis spielen Matrixmetalloproteinasen eine wichtige Rolle. Auf Paraffinschnitten von RA- und OA- Patienten wurden sowohl MMP-1 als auch MMP-3 mit einem polyklonalen Antikörper gefärbt. Abbildung 19 zeigt, dass MMP-1 in nahezu allen Zellen des untersuchten RA- Gewebes exprimiert wird, vor allem aber in Fibroblasten der Deckzellschicht. Bei OA wird MMP-1 deutlich geringer in der Deckzellschicht als in RA- Gewebe exprimiert, es kann aber auch in Blutgefäßen nachgewiesen werden. MMP-3 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie MMP-1. In Fibroblasten der Deckzellschicht von RA- Patienten zeigt sich eine starke Expression von MMP-3. Dagegen sind im OA- Gewebe nur wenige Zellen positiv für MMP-3 gefärbt. Zusammenfassend zeigt dies eine krankheitsspezifische Hochregulation der beiden untersuchten MMPs im rheumatoiden Synovium.

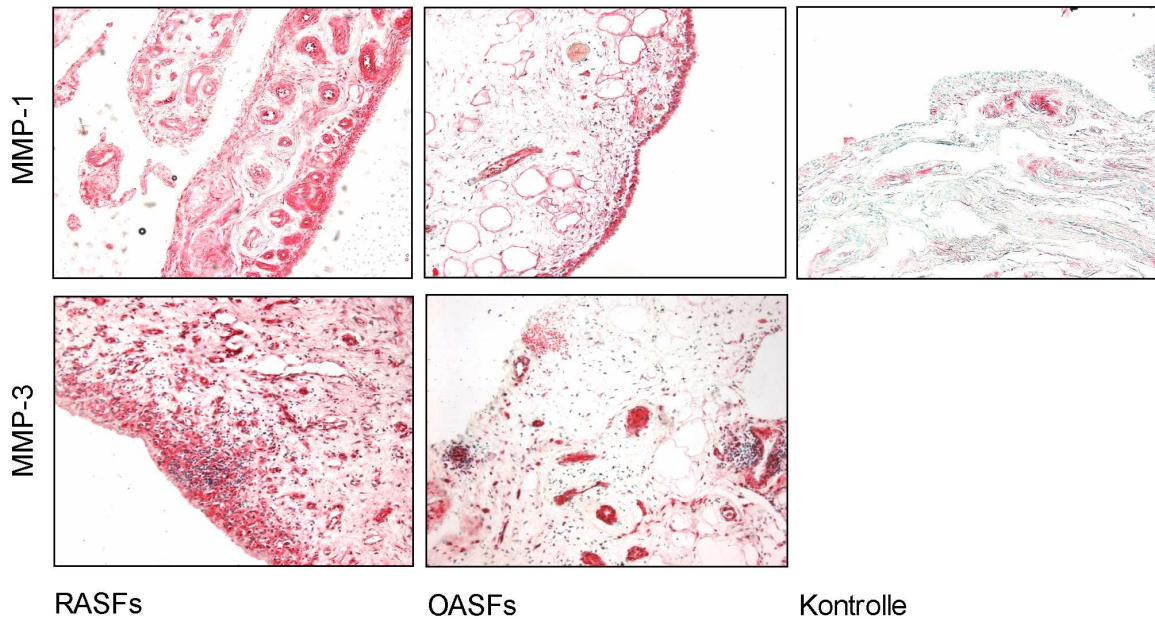


Abbildung 19: MMP-1 und MMP-3 Expression in Paraffinschnitten von RA- und OA-Patienten.

Die Gewebeschnitte wurden mit einem polyklonalen MMP-1 bzw. MMP-3 Antikörper und die Zellkerne mit Methylgrün gegen gefärbt. Als Negativkontrolle wurde Anti- Kaninchen IgG anstelle des primären Antikörpers verwendet (Originalvergrößerung x100).

4.2.2 Hemmung von Syndecan-4 mittels siRNA

Um den Einfluss von Syndecan-4 auf die MMP Produktion zu untersuchen, wurde zuerst siRNA gegen Syndecan-4 generiert und RASFs mittels Lipofection transfiziert. Die Hemmung der Expression von Syndecan-4 wurde mittels konventioneller PCR nachgewiesen und quantitativ analysiert. In Abbildung 20 oben ist der Nachweis einer Hemmung von Syndecan-4 mittels konventioneller PCR repräsentativ abgebildet. Nach 48 h konnte mittels siRNA eine signifikante Senkung der Syndecan-4 Expression um 56,7% erzielt werden. Darauf aufbauend wurde dies als experimentelle Grundlage für nachfolgende Versuche zur Analyse der MMP Produktion genutzt.

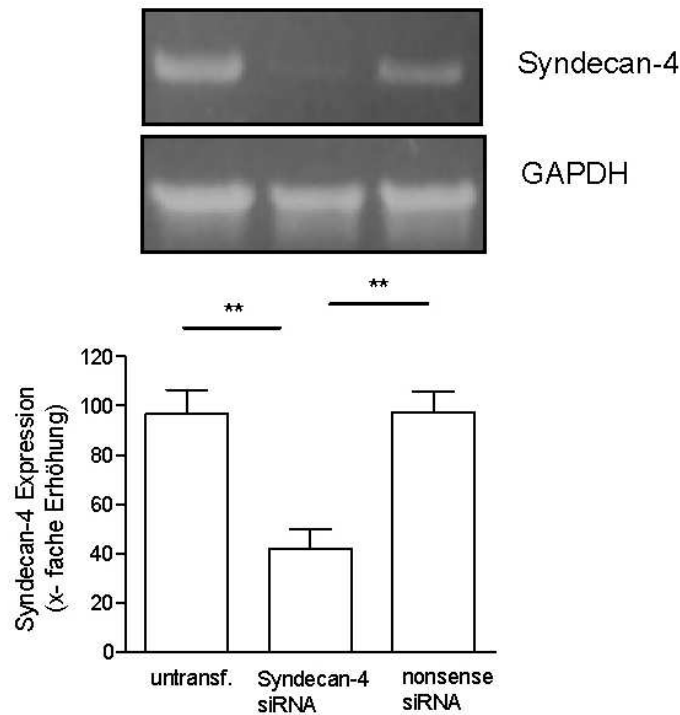


Abbildung 20: Hemmung von Syndecan-4 in RASFs.

Mit Hilfe der konventionellen PCR (repräsentatives Bild, oben) wurde die Expression von Syndecan-4 nach 48 h in RASFs bestimmt. Mittels Lipofection wurden die RASFs mit einer spezifischen siRNA sowohl gegen Syndecan-4 als auch mit einer *nonsense* siRNA transfiziert. Zur quantitativen Auswertung (unten) wurden die Daten gegen GAPDH abgeglichen (**; $p < 0,001$; $n=4$).

4.2.3 Die Hemmung von Syndecan-4 mittels spezifischer siRNA vermindert die IL-1 induzierte MMP-1 und MMP-3 Produktion in RASFs

Zu den wichtigsten MMPs bei Rheumatoider Arthritis gehören MMP-1 und MMP-3. Erfolgt in RASFs, die auf Fibronectin kultiviert wurden, eine Hemmung von Syndecan-4 mittels siRNA, so beeinträchtigt dies die IL-1 α stimulierte MMP Produktion. Werden untransfizierte RASFs (siehe Abbildung 21) mit IL-1 α über 24 h stimuliert, führt dies zu einer Erhöhung der MMP-1 Produktion um das 5,2-fache und der MMP-3 Produktion um das 21-fache. Wird dagegen Syndecan-4 durch siRNA gehemmt, so wird die IL-1 α induzierte MMP-1 Produktion um 37 % gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle gesenkt (nur 3,3-fache Erhöhung). Die Herunterregulierung von Syndecan-4 führt zu einer 57 % Reduktion der MMP-3 Produktion auf das 8,9-fache der nicht transfizierten Kontrolle.

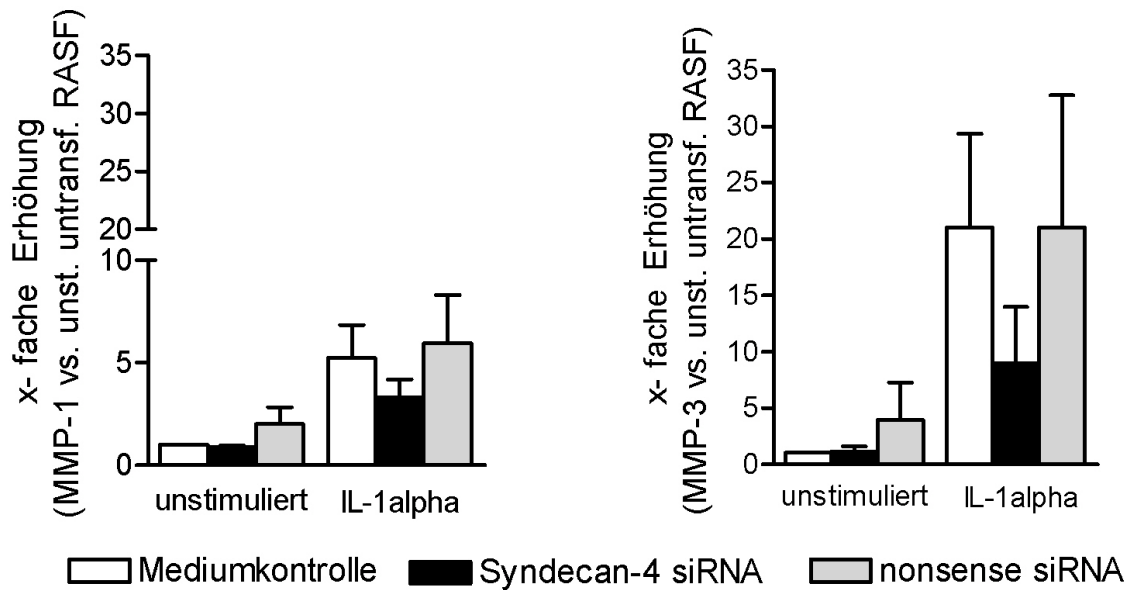


Abbildung 21: Hemmung der IL-1 vermittelten MMP-1 und MMP-3 Produktion durch siRNA gegen Syndecan-4.

Die Messung der MMP-1 (links) und der MMP-3 (rechts) Produktion erfolgte aus Zellüberständen. Auf Fibronektin kultivierte RASFs wurden mit siRNA gegen Syndecan-4 transfiziert und mit 10 ng/ml IL-1 α für 24 h stimuliert. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte über den entsprechend mitgelieferten MMP-Standard im ELISA Kit. Die Daten wurden gegen die untransfizierten, unstimulierten RASFs normalisiert (n=4).

4.2.4 Die IL-1 vermittelte MMP-1 und MMP-3 Produktion kann in RASFs durch einen Syndecan-4 Antikörper gehemmt werden

Da durch siRNA lediglich die Neusynthese von Syndecan-4 gehemmt wird, aber keinen Einfluss auf bestehendes Syndecan-4 hat, wurden die verwendeten RASFs in einem nachfolgenden Schritt mit einem blockierenden Antikörper gegen Syndecan-4 inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen den membranständigen Teil der extrazellulären Domäne von Syndecan-4 gerichtet. Zusätzlich wurden die RASFs für 24 h mit IL-1 α stimuliert, um zu analysieren, ob IL-1 und Syndecan-4 über verschiedene unabhängige Signale die Expression von MMPs induzieren oder, ob IL-1, wie andere Wachstumsfaktoren auch, direkt mit Syndecan-4 interagiert. Abbildung 22 zeigt, dass die Inkubation der RASFs mit dem blockierenden Antikörper zu einer Hemmung der IL-1 α vermittelten MMP-1 Produktion von 5,2 auf das 1,8-fache führt. Die MMP-3 Produktion wurde vom 21-fachen auf das 2,5-fache gesenkt.

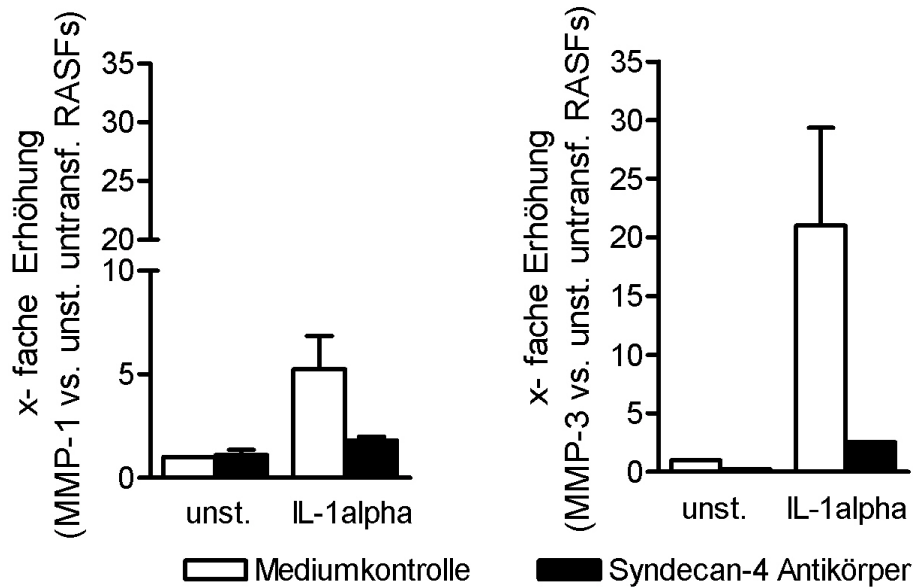


Abbildung 22: Hemmung der IL-1 vermittelten MMP-1 und MMP-3 Produktion durch einen blockierenden Syndecan-4 Antikörper.

Für die Messung der MMP-1 und MMP-3 Produktion wurden RASFs für 2 h mit dem blockierenden Syndecan-4 Antikörper vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 10 ng / ml IL-1 α stimuliert. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte über den entsprechend mitgelieferten MMP Standard im ELISA Kit. Die Werte sind gegen die untransfizierten, unstimulierten RASFs normalisiert (n=4).

4.3 Syndecan-4 und IL-1 induzieren die Aktivierung von MAP Kinasen

Anhand der gewonnenen Daten zur verminderten Produktion von MMPs nach der Hemmung von Syndecan-4, kann davon ausgegangen werden, dass Syndecan-4 für die IL-1 α vermittelte MMP Produktion in rheumatoiden Synovialfibroblasten benötigt wird.

Es ist bekannt, dass die MMP Expression hauptsächlich über eine IL-1 vermittelte Aktivierung der MAP Kinasen reguliert wird. Deshalb wurde mit einem humanen Phospho- MAP Kinase Array und mit Western Blot Technik die Rolle von Syndecan-4 bei der Aktivierung von MAP Kinase Signalwegen, als Antwort auf die Stimulation mit IL-1 α in RASFs untersucht.

4.3.1 Identifizierung der IL-1 und Syndecan-4 abhängigen MAP Kinase Signalwege in RASF

Zunächst wurde ein humaner MAP Kinase Array eingesetzt, um herauszufinden, welche MAP Kinase Signalwege über Syndecan-4 in der IL-1 vermittelten Signaltransduktion reguliert werden. Mit dem Array können 21 verschiedene phosphorylierte MAP Kinasen detektiert werden, darunter die drei Hauptfamilien der Mitogen Aktivierten Protein Kinasen, die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK1/2), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK1-3) und unterschiedliche p38 Isoformen (p38 α , - β , - γ , - δ), ebenso weitere intrazelluläre Kinasen wie Akt, GSK-3 und p70 S6 Kinasen. Nach der Durchführung des MAP Kinase Arrays konnten in den auf Fibronectin kultivierten RASFs die extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1 / ERK2 und die α - Isoform von p38 detektiert werden. Der stärkste Effekt auf die Stimulation mit IL-1 α wurde bei ERK1 und ERK2 gefunden. Schwächer ist die Aktivierung der p38 α MAP Kinase nach IL-1 Zugabe ausgeprägt. Andere MAP Kinasen scheinen nicht involviert zu sein. Die Hemmung von Syndecan-4 über spezifische siRNA beeinflusst in den RASFs den nicht IL-1 behandelten Basallevel an MAPK Aktivierung nur minimal (siehe Abbildung 23). Deutliche Unterschiede sieht man nach Stimulation mit IL-1 α . Ist Syndecan-4 mittels siRNA herunterreguliert, so wird die Phosphorylierung von ERK1 3,5- fach und von ERK2 sogar 4,5- fach vermindert, was dem Phosphorylierungsspiegel von ERK1/2 in nicht aktivierten mit *nonsense* siRNA transfizierten RASFs entspricht. Die Hemmung von Syndecan-4 verhindert nahezu komplett die IL-1 α induzierte Aktivierung von ERK1/2.

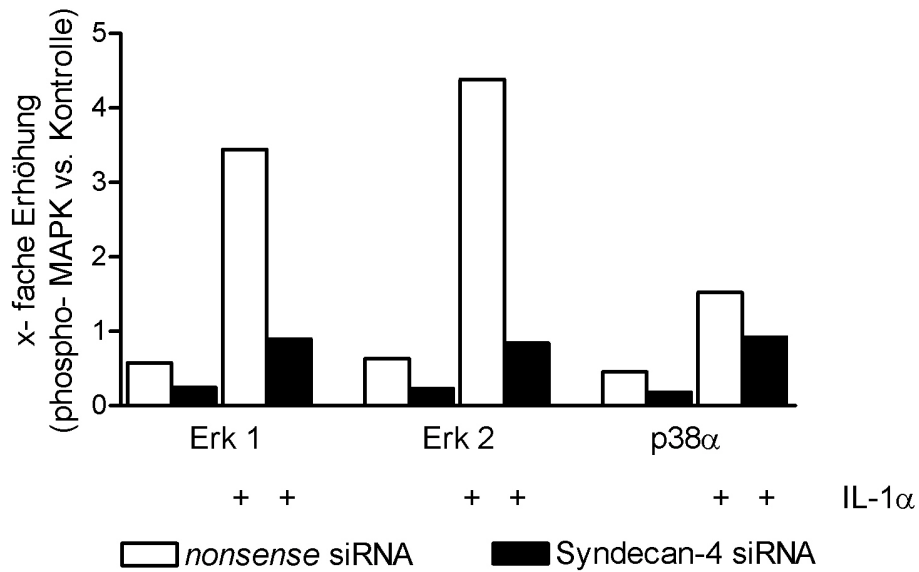


Abbildung 23: IL-1 induziertes MAP Kinase Signalling.

RASFs wurden auf Fibronectin kultiviert und nach der Transfektion mit der siRNA gegen Syndecan-4 und der *nonsense* siRNA für 20 min mit 10 ng / ml IL-1 α stimuliert. Die Daten wurden gegen die internen Positivkontrollen auf der Membran abgeglichen.

4.3.2 Syndecan-4 reguliert die IL-1 induzierte Phosphorylierung von ERK1/2

Die Ergebnisse des MAP Kinase Array, zur Syndecan-4 abhängigen IL-1 induzierten Aktivierung von ERK1/2, konnten im Western Blot bestätigt werden (siehe Abbildung 24). Die Quantifizierung der im Western Blot erhaltenen Signale, zeigte eine Verminderung der ERK1/2- Phosphorylierung nach der Hemmung von Syndecan-4 um das 1,9- fache im Vergleich zu den mit der *nonsense* siRNA transfizierten RASFs. Nach Stimulation der Synovialfibroblasten mit IL-1 α konnte eine Verminderung um das 5,3- fache erhalten werden. Unterschiede in der Phosphorylierung von p38 α konnten im Western Blot nicht detektiert werden.

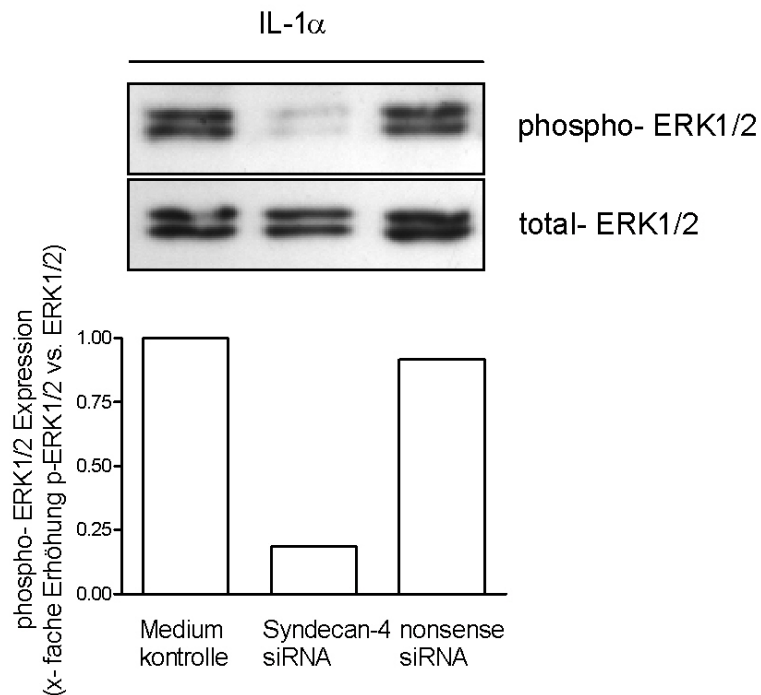


Abbildung 24: Hemmung der ERK1/2- Phosphorylierung durch Syndecan-4.

RASFs wurden auf Fibronektin kultiviert, mit Syndecan-4 oder *nonsense* siRNA transfiziert und für 20 min mit 10 ng / ml IL-1 α stimuliert. Es konnten die ERK1/2 Banden mit der Größe von 42 bzw. 44 kDa detektiert werden. Für die Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten für phosphoryliertes ERK1/2 gegen totales ERK1/2 abgeglichen und die Bandenintensität über die Fläche des Peaks berechnet.

4.3.3 Die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-4 ist essentiell für die IL-1 vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung

Um nachzuweisen, ob Syndecan-4 über seine zytoplasmatischen Domäne direkt an der IL-1 vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist und so ERK1/2 aktiviert, wurden zwei verschiedene Syndecan-4 Konstrukte in primäre Synovialfibroblasten von Syndecan-4^{-/-} Mäusen mit Hilfe der Nucleofector-Technologie transfiziert und durch den Promotor des Elongationsfaktors (EF-4) überexprimiert. Das Plasmid *Syn4 + ETZ* enthält die komplette Syndecan-4 Sequenz mit der extrazellulären, der transmembranen (T) und der zytoplasmatischen (Z) Domäne von Syndecan-4. Dagegen kodiert das Plasmid *Syn4 + ET* nur die extrazelluläre und die transmembrane Dömäne von Syndecan-4 und sollte nicht in der Lage sein Signale ins Zellinnere weiter zu leiten. Nach Stimulation mit IL-1 α konnte im Western Blot gezeigt werden (siehe Abbildung 25), dass die Überexpression des *Syn4 + ETZ* Plasmids zu einer 3,3- fachen Erhöhung der ERK1/2 Phosphorylierung gegenüber

Syndecan-4^{-/-} Fibroblasten führt. Überexpression des *Syn4 + ET* Konstruktes dagegen führt genauso wie der komplette Syndecan-4 Verlust in Syndecan-4^{-/-} Fibroblasten zu einem Ausbleiben der IL-1 α vermittelte Aktivierung von ERK1/2. Damit konnte gezeigt werden, dass in rheumatoiden Synovialfibroblasten die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-4 essentiell für die IL-1 α abhängigen Aktivierung von ERK1/2 ist.

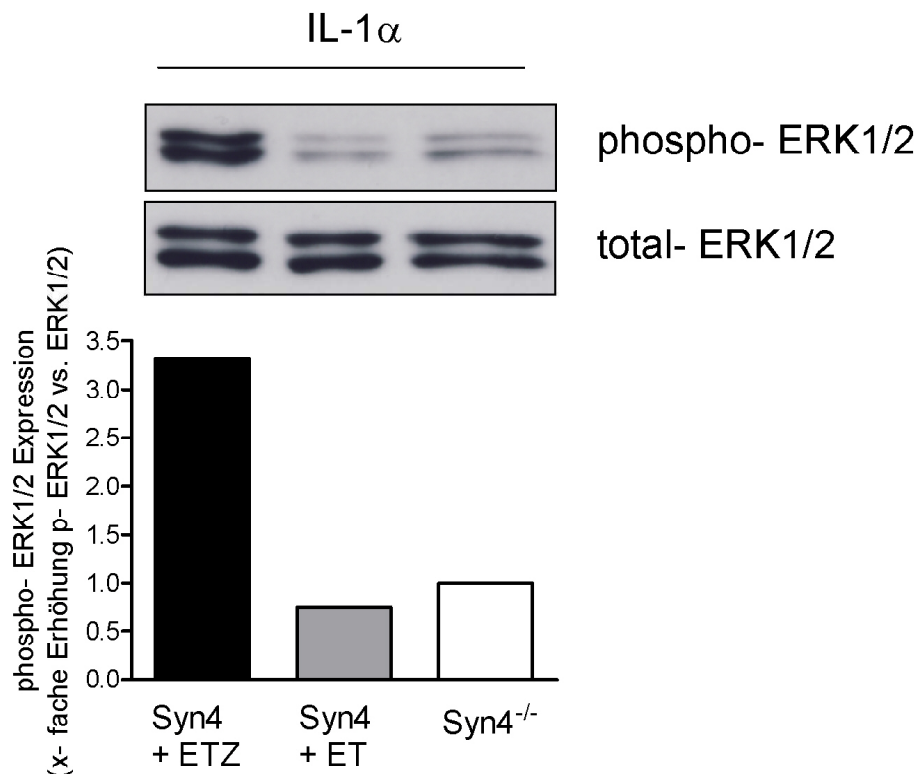


Abbildung 25: Die IL-1 vermittelte ERK1/2- Phosphorylierung durch Syndecan-4.

In Synovialfibroblasten von Syndecan-4^{-/-} Mäusen erfolgte die Überexpression zweier Plasmide mittels Nukleofektion. Die transfizierten Synovialfibroblasten wurden für 20 min mit 10 ng / ml IL-1 α stimuliert und im Western Blot die Phosphorylierung von ERK1/2 (42 bzw. 44 kDa) analysiert. Die Daten wurden gegen Syndecan-4^{-/-} Zellen normalisiert. *Syn4 + ETZ*, Syndecan-4 Sequenz, bestehend aus extrazellulärer (E)-, transmembraner (T) und zytoplasmatischer (Z) Domäne; *Syn4 + ET*, Syndecan-4 Sequenz, bestehend aus extrazellulärer- und transmembraner Domäne.

4.4 Das Fehlen von Syndecan-4 hemmt die TNF-induzierte Knorpelzerstörung *in vivo*

In dieser Arbeit konnte in rheumatoiden Synovialfibroblasten gezeigt werden, dass Syndecan-4 in die Regulation der IL-1 vermittelten Produktion von MMP-1 und MMP-3 durch die Aktivierung von ERK1/2 involviert ist. Daher stellte sich anschließend die Frage, ob das Fehlen von Syndecan-4 in der entzündlichen

destruktiven Arthritis *in vivo* vor Knorpelzerstörung schützt. Dazu wurden Syndecan-4 defiziente Mäuse mit hTNFtg Mäusen gekreuzt, da diese eine destruktive RA-ähnliche Arthritis mit fortschreitender Knorpelzerstörung entwickeln.

4.4.1 Klinische Daten der hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Beurteilung der hTNFtg Mäuse die klinischen Parameter, wie Gewicht, Schwellung der Pfoten und der Griffstärke, nach G. Schett bestimmt (Zwerina *et al.*, 2004). Daher wurden Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} und hTNFtg Mäusen hinsichtlich dieser Parameter untersucht. Die sichtbaren klinischen Symptome der destruktiven Arthritis, wie die Schwellung der Pfoten, fallen in den hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen deutlich reduzierter aus als in den hTNFtg Mäusen. Abbildung 26 zeigt die Hinterpfoten der vier analysierten Mausmodelle. Vergleichsweise entwickeln Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäuse keinen RA-ähnlichen Phänotyp.

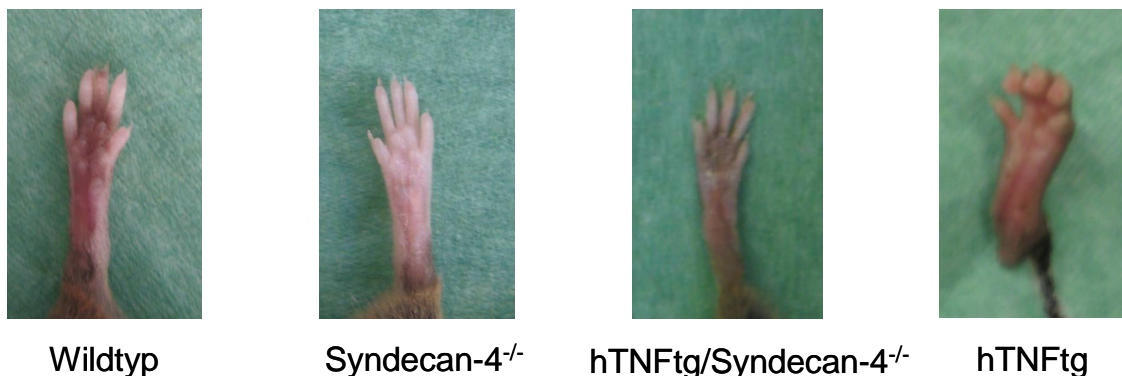


Abbildung 26: Hinterpfoten der analysierten Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} und hTNFtg Mäusen.

Die Mausepfoten wurden im Alter von 10 Wochen aufgenommen.

Ab Woche fünf konnten erste klinische Anzeichen der sich entwickelnden destruktiven Arthritis an den hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen, aber besonders an den hTNFtg Mäusen festgestellt werden. Hinsichtlich der Größe unterscheiden sich die hTNFtg/Syndecan-4 defizienten Mäuse nicht von den hTNFtg Mäusen. Wie in Abbildung 27 zu sehen, zeigte sich auch kein Unterschied im Gewichtsverlauf zwischen den hTNFtg und hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen im Zeitraum von sechs bis zehn Wochen.

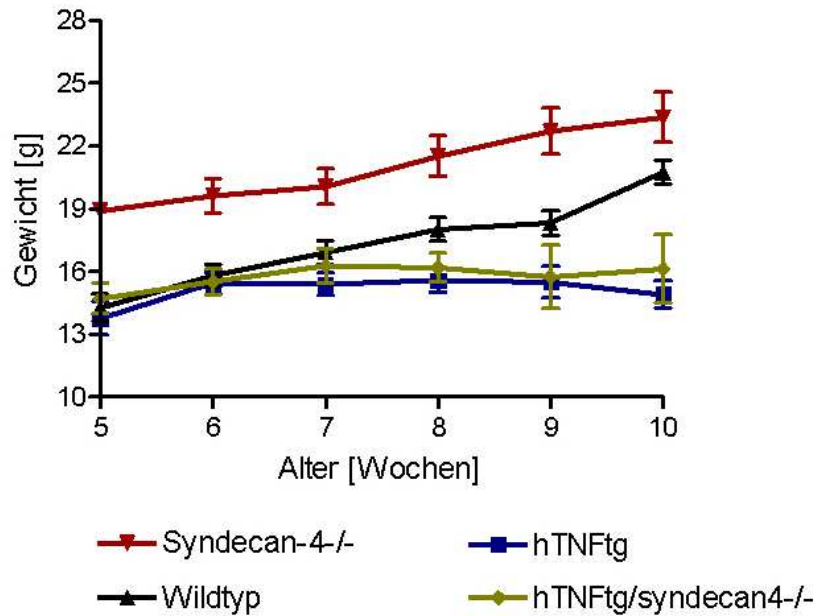


Abbildung 27: Gewichtsverlauf der untersuchten Mäuse.

Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg und hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse wurden, beginnend ab Woche 5, einmal wöchentlich gewogen.

hTNFtg Mäuse weisen gegenüber Wildtyp Mäusen beginnend ab Woche fünf äußerlich sicht- und messbare Unterschiede im Gewicht, der Schwellung der Pfoten und der Griffstärke auf, die sich bis Woche 10 ständig vergrößern (Abbildung 28). In hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen dagegen wurden eine signifikant reduzierte Schwellung der Pfoten und eine deutliche Verbesserung der Griffstärke im Vergleich zu hTNFtg Mäusen ermittelt. Dieser offensichtliche Unterschied in der Ausprägung der klinischen Symptome blieb über gesamten Zeitraum bestehen. Unbehandelt (ohne wöchentliche Behandlung mit einem Anti- TNF α Antikörper) versterben hTNFtg und hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse gleichermaßen zwischen der Woche 12 und 16. Syndecan-4 defiziente Mäuse allein weisen keine Entzündungsreaktionen im Gelenke auf und verhalten sich in Bezug auf die klinischen Parameter ebenso negativ wie Wildtyp Mäuse. Das Fehlen von Syndcan-4 in einem TNF- abhängigen Kontext schützt vor der Entwicklung von typischen rheumatoiden Parametern, die morphologisch auf eine Zerstörung der Gelenke zurückzuführen sind.

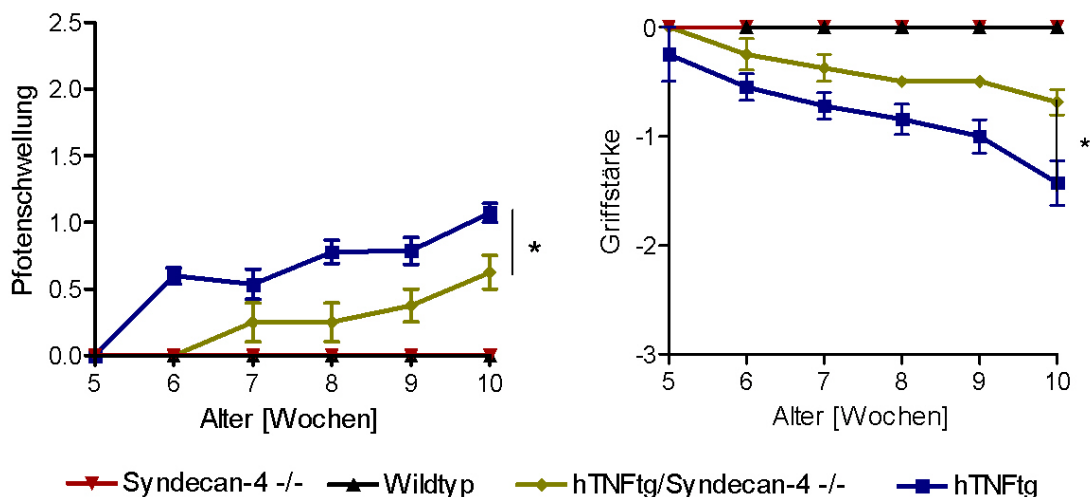


Abbildung 28: Klinisches Erscheinungsbild der hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse:

Die Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg und hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse wurden, beginnend ab Woche 5, einmal pro Woche hinsichtlich der Pfotenschwellung und der Griffstärke analysiert (*; p < 0,05, n = 5).

4.4.2 Syndecan-4 Defizienz in hTNFtg Mäusen schützt vor Knorpelzerstörung

Ob Syndecan-4 Verlust nicht nur die klinischen Parameter verbessert, sondern auch die Gelenkdestruktion beeinflusst wurde an Toluidin-Blau gefärbten Paraffinschnitten der Hinterpfote von acht Wochen alter Wildtyp-, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} und hTNFtg Mäuse im Detail auf morphologischer Ebene analysiert. Wie in Abbildung 29 zu sehen, zeigen nur hTNFtg Mäuse massive entzündliche Areale, die mit der Zerstörung der Knorpel einhergehen. Fehlt allerdings Syndecan-4 in den hTNFtg Mäusen so führt dies zu einer deutlichen Verbesserung der Gelenkdestruktionen. Auch in hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen treten entzündliche Areale auf, diese sind aber in ihrer Anzahl und in der Intensivität deutlich schwächer ausgeprägt, als in hTNFtg Mäusen. Eine Destruktion der Knorpelmatrix wird in hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} kaum detektiert und die allgemeine Gelenkmorphologie ist der von Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäusen gleich. Der Verlust von Syndecan-4 in einem TNF- abhängigen Milieu führt morphologisch zu einer offensichtlichen Verbesserung der Knorpelmatrix-Zerstörung und korreliert mit den klinischen Daten.

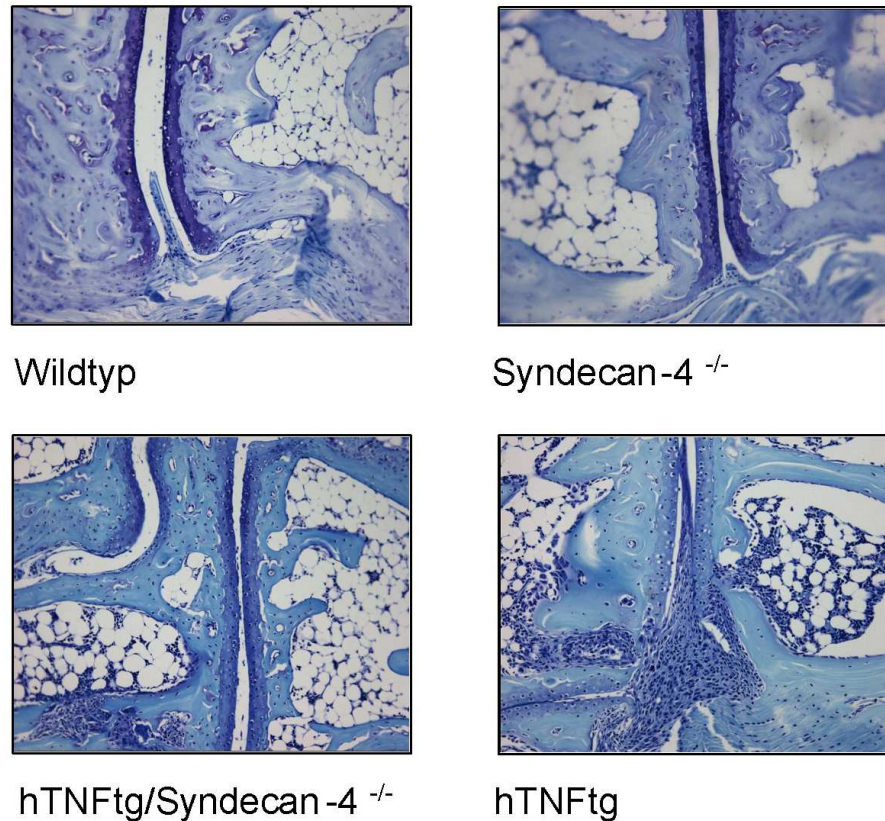


Abbildung 29: Toluidin- Blau gefärbte Paraffinschnitte von Mäusepfoten.

Die Paraffinschnitte der Hinterpfoten von 8 Wochen alten Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} und hTNFtg Mäusen wurden mit Toluidin-Blau gefärbt (Originalvergrößerung: x 100).

Um die Verbesserung der Gelenkzerstörung durch das Fehlen von Syndecan-4 in hTNFtg Mäusen quantitativ bestimmen zu können, wurden die Toluidin-Blau gefärbten Paraffinschnitte morphometrisch quantifiziert. Es wurden die Parameter Knorpelfläche und die Fläche der Entzündungsareale des hinteren Mittelfußes der entsprechenden acht Wochen alten Mäuse bestimmt. In den untersuchten Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäusen wurden weder Entzündungsareale noch zerstörte Knorpelflächen gefunden. Im Verhältnis zur Gesamtfläche des Mittelfußes besitzen Wildtyp Mäuse eine Knorpelfläche von ca. 4,9% und Syndecan-4^{-/-} Mäuse eine von 5,2%. hTNFtg Mäuse, die eine destruktive RA-ähnliche Arthritis mit fortschreitender Knorpelzerstörung entwickeln, weisen dazu eine deutlich reduzierte Knorpelfläche von nur 2,5% auf (siehe Abbildung 30, links). Die Auswertung der hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse zeigte, dass das Fehlen von Syndecan-4 zu einer signifikant geringeren Zerstörung der Knorpelfläche (4,4% vs. 2,5% in hTNFtg) führt. Mit 4,4% Knorpelfläche bewegen sich

hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse auf gleichem Niveau wie Wildtyp Mäuse mit 4,9%. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch nach Auswertung der entzündlichen Areale. hTNFtg Mäuse, deren Krankheitsbild durch eine Entzündung charakterisiert ist, weisen eine 18,5%ige Entzündungsfläche im Verhältnis zur Gesamtfläche auf (siehe Abbildung 30, rechts). Wird nun Syndecan-4 aus dem entzündlichen Umfeld der hTNFtg Mäuse entfernt, so reduzieren sich die entzündlichen Areale um 37,4% auf 6,9%. Syndecan-4^{-/-} und Wildtyp Mäuse dagegen weisen keine RA-spezifische Entzündungsflächen auf. Der Verlust von Syndecan-4 führt auch zu einer Verbesserung der kritischen Parameter einer destruktiven Arthritis, nämlich Entzündung und Invasion.

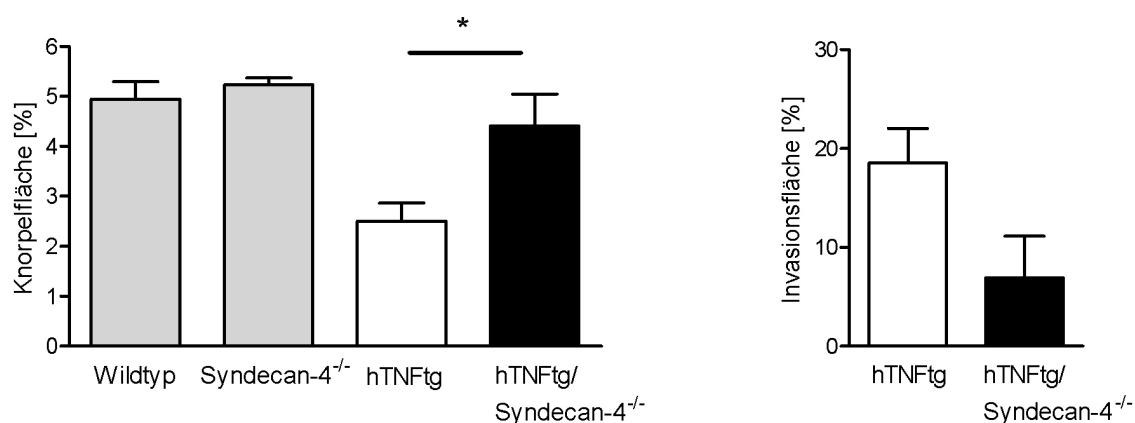


Abbildung 30: Morphometrische Auswertung der Mäusepfoten.

Die Toluidin-Blau gefärbten Hinterpfoten von 8 Wochen alten Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg und hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen wurden hinsichtlich der Knorpel- (links) und Invasionsfläche (rechts) ausgewertet (*; $p < 0,05$, $n = 4$).

Nachdem ein direkter Einfluss von Syndecan-4 auf die Produktion von MMPs in RASFs gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob der Verlust von Syndecan-4 auch im Tiermodell der Rheumatoiden Arthritis zu einer verminderten MMP-Synthese führt. Da vor allem MMP-3 für eine Zerstörung der Knorpelmatrix verantwortlich gemacht wird, wurden Paraffinschnitten der untersuchten Maus-Genotypen wurden sie abschließend mit einem polyklonalen MMP-3 Antikörper gefärbt. Im entzündeten Synovium der hTNFtg Mäuse findet sich MMP-3 hauptsächlich in Makrophagen und Synovialfibroblasten. In hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen zeigt sich in synovialen Fibroblasten eine auf die Basallevel von Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäusen reduzierte MMP-3 Expression. Die verminderte MMP-3 Expression korreliert in hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} mit der gegenüber hTNFtg

Mäusen deutlich reduzierten Invasion von Synovial-fibroblasten. MMP-3 wird neben Fibroblasten auch in Chondrozyten exprimiert, die vorzugsweise an den Knorpelrändern lokalisiert sind und MMP-3 für den ständigen, nicht pathologischen Matrixumbau benötigen. Die Anzahl der MMP-3 positiven Chondrozyten ist in hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen gegenüber Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäusen leicht erhöht (siehe Abbildung 31).

Der Verlust von Syndecan-4 reduziert in einem TNF- abhängigen Kontext nicht nur die Entzündung und die fortschreitende Knorpelzerstörung, sondern auch die MMP-3 Expression in Synovialen Fibroblasten.

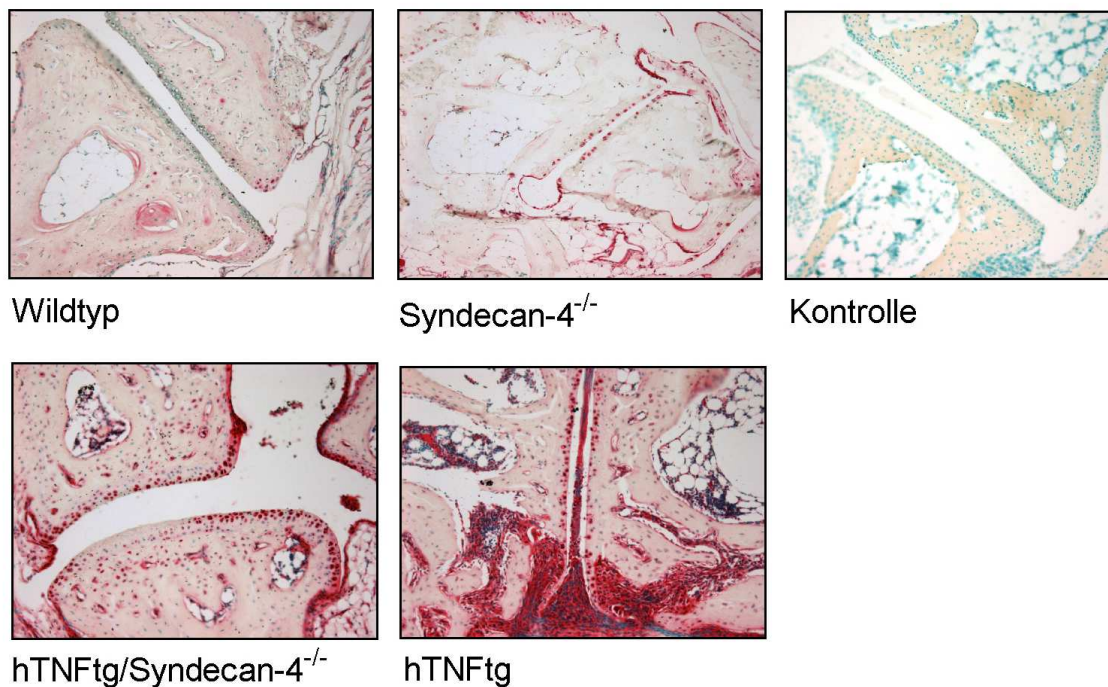


Abbildung 31: MMP-3 Färbung von Mäusepfoten.

Paraffinschnitte des Mittelfußes von Wildtyp, Syndecan-4^{-/-}, hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} und hTNFtg Mäusen wurden mit einem polyclonalen Antikörper gegen MMP-3 (rot) gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgt mit Methylgrün. Als Negativkontrolle wurde Anti- Kaninchen IgG anstelle des primären Antikörpers gefärbt (Originalvergrößerung x 100).

5 Diskussion

5.1 Syndecan-4 Expression und seine Regulation durch TNF α

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Heparansulfat Proteoglykans Syndecan-4 bei der Rheumatoiden Arthritis untersucht. Ausgangspunkt dieser Untersuchungen stellten Studien über die Rolle von Syndecan-4 in der Wundheilung (Echtermeyer *et al.*, 2001), der Artherogenese (Schmidt *et al.*, 2005), und der Nierenfibrose (Cevikbas *et al.*, 2008), sowie die zellspezifische Expression von Syndecan-4 in Fibroblasten dar (Tkachenko *et al.*, 2005). Die Funktion von Syndecan-4 bei der Rheumatoider Arthritis sowie das Expressionsmuster von Syndecan-4 in Synovialgewebe von RA- Patienten wurden bisher nicht untersucht.

5.1.1 Krankheitsspezifische Hochregulation von Syndecan-4 in Rheumatoider Arthritis

In der Synovialmembran von RA- Patienten, die durch eine chronische Entzündung gekennzeichnet ist, wurde histologisch eine deutlich erhöhte Expression von Syndecan-4 in der synovialen Deckzellschicht, dem „*lining*“ gefunden. Im Gegensatz dazu weist das „*lining*“ von OA- Patienten kaum eine Syndecan-4 Expression auf. In OA- Gewebeproben reagieren nur einige wenige perivaskuläre Zellen positiv für Syndecan-4. In den tieferen Schichten, dem „*sublining*“ ähnelte das Expressionsmuster von Syndecan-4 dem in OA- Gewebe. Die starke Expression von Syndecan-4 in synovialen Gewebe von RA- Patienten steht im Widerspruch zu Daten der Arbeitsgruppe von Patterson *et al.*, die keine erhöhte Expression von Syndecan-4 feststellen konnten (Patterson *et al.*, 2008). Wir gehen davon aus, dass diese Unterschiede auf die Verwendung unterschiedlicher Syndecan-4 Antikörper und unterschiedlicher Einbettungstechniken der Gewebe zurückzuführen ist. Während Patterson *et al.*, den 8G3 Antikörper auf Gefrierschnitten einsetzten, wurde in dieser Arbeit der 5G9 Antikörper auf Paraffinschnitten verwendet. Die Spezifität des 5G9 Antikörpers für die Detektion von Syndecan-4 in der Immunfluoreszenz, im Western Blot und Immunassay ist durch eine Reihe von Veröffentlichungen gut dokumentiert (Schmidt *et al.*, 2005, Mostafavi-Pour *et al.*, 2003). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit neben der Immunhistologie auch in der Immunfluoreszenz, im

Western Blot und in der FASC- Analyse die Spezifität des 5G9 Antikörpers für Syndecan-4 auch im Vergleich mit einem polyklonalen Antiserum gegen Syndecan-4 bestätigt werden.

Die Deckzellschicht im RA- Gewebe besteht sowohl aus einer Vielzahl von infiltrierenden, inflammatorischen Zellen als auch zu einem Drittel aus Fibroblasten (Salisbury *et al.*, 1987). Da die meisten Syndecan-4 positiven Zellen eine Fibroblasten- ähnliche Morphologie aufweisen, wurde die zelluläre Expression von Syndecan-4 in kultivierten primären Synovialfibroblasten von RA- und OA- Patienten vergleichsweise bestimmt. In der Immunfluoreszenz von RASFs konnte eine deutlich stärkere Lokalisation des membranständigen Syndecan-4 an der Zelloberfläche gegenüber Fibroblasten von OA- Patienten gezeigt werden.

Im Krankheitsverlauf kommt es sowohl bei der Osteoarthritis als auch bei der Rheumatoiden Arthritis jeweils zu einer Zerstörung der Gelenke. Die Osteoarthritis ist dabei durch einen Verschleiß des hyalinen Knorpels gekennzeichnet (Machner *et al.*, 2003), wobei das Hauptmerkmal bei Rheumatoider Arthritis eine Entzündung des Synoviums darstellt und es somit zu einer starken Expression pro- inflammatorischer Zytokine kommt. Eines der bedeutendsten Zytokine der Pathogenese von Rheumatoider Arthritis ist TNF α .

TNF α kann in gesunden Organismen gewöhnlich nicht nachgewiesen werden, aber unter entzündlichen und infektiösen Bedingungen, z. B. der Rheumatoiden Arthritis, gefunden werden (Robak *et al.*, 1998, Nurnberger *et al.*, 1995).

Mit steigender Konzentration an TNF α konnte eine Erhöhung der Syndecan-4 mRNA Expression in RASFs gefunden werden, wobei RASFs gegenüber nicht stimulierten OASFs eine 17- fach erhöhte Expression von Syndecan-4 zeigen. Auch in Synovialfibroblasten von OA- Patienten konnte die Syndecan-4 mRNA Expression gesteigert werden, jedoch nur um das 9- fache. Dies deutet darauf hin, dass in der Rheumatoiden Arthritis die Wirkung von TNF α auf die Expression von Syndecan-4 noch durch andere Faktoren begünstigt wird. Ein Zusammenhang zwischen TNF α und erhöhter Syndecan-4 Expression konnte auch schon in anderen Zellarten nachgewiesen werden.

Zhang *et al.* konnten zeigen, dass TNF α die Zellproliferation in Endothelzellen dosisabhängig stimuliert und es gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinexpression von Syndecan-4 im Western Blot führt (Zhang *et al.*, 2007). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Signaltransduktion durch

TNF α hauptsächlich den NF- κ B Signalweg aktiviert. In HeLa Zellen führt die Hemmung von NF- κ B durch eine spezifische siRNA auch zur Reduktion der TNF α abhängigen Expression von Syndecan-4 (Zhou *et al.*, 2003). Da die Promotorregion von Syndecan-4 eine NF- κ B Bindungsstelle aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass auch in Synovialfibroblasten die TNF- abhängige Aktivierung der Syndecan-4 Synthese über NF- κ B erfolgt (Smith, Jr. *et al.*, 2006).

5.1.2 TNF α reguliert die Expression von Syndecan-4 in humanen RASFs und in TNF- abhängigen Mausmodellen der destruktiven Arthritis

In der vorliegenden Arbeit konnte neben der krankheitsspezifischen Expression von Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis auch die Regulation von Syndecan-4 durch TNF α *in vitro* gezeigt werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zwei TNF- abhängige Mausmodelle zur Untersuchung der Regulation von Syndecan-4 bei einer chronisch RA- ähnlichen Arthritis *in vivo* verwendet.

Zum einen wurden hTNFtg Mäuse, deren Krankheitsbild durch die ubiquitäre Expression des humanen TNF α Transgens verursacht wird, und zum anderen TTP defiziente Mäuse, die durch das Fehlen von TTP eine Überproduktion von TNF α hauptsächlich in Makrophagen aufweisen, immunhistologisch hinsichtlich der Expression von Syndecan-4 untersucht (Keffer *et al.*, 1991, Taylor *et al.*, 1996a). Neben der massiven Knorpelzerstörung in den untersuchten Hinterpfoten beider Mausmodelle konnte eine deutlich erhöhte Syndecan-4 Expression im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen gefunden werden. Die höchste Expression für Syndecan-4 konnte in den invadierenden Zellen der Synovialmembran gezeigt werden. Ähnlich den Gewebeschnitten von RA- Patienten, weisen diese positiv gefärbten Zellen eine Fibroblasten- ähnliche Morphologie auf. Zur Bestimmung der Syndecan-4 mRNA Expression wurden primäre Synovialfibroblasten beider Mausmodelle isoliert und mit den Syndecan-4 mRNA Level von Wildtyp Mäusen verglichen. Synovialfibroblasten aus hTNFtg Mäusen wiesen eine 10,4- fache und aus TTP^{-/-} Mäuse sogar eine 20,2- fache Erhöhung der Syndecan-4 mRNA Expression gegenüber Wildtyp Mäusen auf. Beide Mausmodelle sind durch eine chronische Exposition mit TNF α charakterisiert, was zu einer anhaltend hohen Syndecan-4 Expression und folglich dem RA- ähnlichen Krankheitsbild der Tiere

führt. In den hTNFtg Mäusen wird das TNF α Transgen von allen Zellen, also auch synovialen Fibroblasten synthetisiert. Dagegen erfolgt in den TTP defizienten Mäusen die Überproduktion von TNF α nur in den Zellen, die regulär TNF α exprimieren, d. h. vor allem in Makrophagen.

TTP wurde mittels Nukleofektion in RASFs überexprimiert, da TTP für die Regulation der mRNA Stabilität von Proteinen mit AU- reichen Sequenzen, wie sie auch in der TNF α RNA vorhanden sind, in Zellen zuständig ist (Cao *et al.*, 2003). Wir haben in dieser Arbeit untersucht, ob TTP die Stabilität der Syndecan-4 mRNA beeinflusst und so zu einer TNF α unabhängigen Erhöhung der Syndecan-4 Expression führt. Zwischen RASFs, die mit humanem TTP transfiziert wurden und untransfizierten RASFs konnte keine unterschiedliche mRNA Expression gefunden werden, womit gezeigt wurde, dass TTP keinen Einfluss auf die Syndecan-4 mRNA Expression hat.

Verschiedene Untersuchungen zur Knochen- und Knorpeldestruktion zeigen, dass die Behandlung von hTNFtg Mäusen mit Anti- TNF α Antikörpern (Enbrel[®]) durch die Inhibierung des TNF- Effektes zu einer deutlichen Reduktion des RA- ähnlichen Krankheitsbildes führt (Klinkhoff, 2004, Mohler *et al.*, 1993). Wir haben deshalb untersucht, ob die Syndecan-4 Expression durch Enbrel[®] Behandlung beeinflusst wird. Obwohl wir nach Enbrel[®] Behandlung, wie in der Literatur beschrieben, eine deutliche Verbesserung der Knochen- und Knorpelmatrix gegenüber unbehandelten hTNFtg Mäusen nachweisen konnten (Keffer *et al.*, 1991, Shealy *et al.*, 2002), wird die Expression von Syndecan-4 in den hTNFtg Mäusen zwar reduziert, ist aber immer noch höher als in Wildtyp-Mäusen. Wir interpretieren diese Ergebnisse so, dass die erhöhte TNF α Exposition synovialer Fibroblasten bis zum Beginn der Enbrel[®] Behandlung in der vierten Woche nach der Geburt ausreicht, um synoviale Fibroblasten zu differenzieren und eine dann TNF α unabhängige Syndecan-4 Expression zu verursachen.

Zusammen mit den *in vitro* Daten zur Expression von Syndecan-4 bei Rheumatoider Arthritis, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass TNF α ein wichtiger Regulator der Syndecan-4 Expression in synovialen Fibroblasten darstellt und eine chronische Stimulation der Synovialfibroblasten durch TNF α ausreichend zu sein scheint, um die vorhandene Hochregulation von Syndecan-4 bei der Rheumatoiden Arthritis aufrecht zu erhalten.

5.2 Syndecan-4 reguliert die IL-1 induzierte MMP-1 und MMP-3 Produktion und führt zur Aktivierung von ERK1/2

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Regulation von TNF α auch der Einfluss von Syndecan-4 bei der stabilen Aktivierung von rheumatoiden Synovialfibroblasten als Beitrag zur Ausbildung des aggressiv- invasiven Phänotyps dieser Zellen erforscht. Basierend auf Analysen zur IL-1 vermittelten MMP-1 und MMP-3 Produktion in Synovialfibroblasten, wurde der derzeit nicht bekannte Einfluss von Syndecan-4 auf die Produktion dieser MMPs und die damit verbundene Rolle bei der Zerstörung von Knorpelstrukturen untersucht. Ebenso stand die Klärung der durch Syndecan-4 involvierten Signalwege im Vordergrund dieser Arbeit.

5.2.1 Einfluss von Syndecan-4 auf die IL-1 vermittelte MMP-1 und MMP-3 Produktion

Zu den wichtigsten MMPs bei Rheumatoider Arthritis gehören die Kollagenase-1 (MMP-1) und Stromelysin-1 (MMP-3), die bei der proteolytischen Degradation und dem Gewebeumbau der extrazellulären Matrix involviert sind (Rutkauskaite *et al.*, 2004, Kyburz *et al.*, 2003, Murphy *et al.*, 2002.). Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Synovialgewebe von RA- und OA- Patienten die krankheitsrelevante Expression von MMP-1 und MMP-3 untersucht. Für MMP-1 konnten wir eine ubiquitäre Verteilung in nahezu allen Zellen nachweisen. In RA- Gewebe konnte eine erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran dokumentiert werden. Diese gesteigerte MMP- Synthese wird hauptsächlich von Fibroblasten getragen, da Hembry *et al.* eine erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-3 in Fibroblasten der Deckzellschicht von RA- Patienten nachweisen konnten (Hembry *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu OA- Gewebe konnte eine krankheitsspezifische Hochregulation von MMP-1 und MMP-3 im Synovium von RA- Patienten gezeigt werden. Der Einfluss von Syndecan-4 auf die IL-1 vermittelte MMP Produktion wurde durch die Hemmung von Syndecan-4 mittels spezifischer siRNA, welche bei Rauch *et al.* beschrieben wurde, in RASFs untersucht (Rauch *et al.*, 2005). Die Transfektion der RASFs führte zu einer 56,7%igen Hemmung der Syndecan-4 Expression gegenüber Zellen, die mit *nonsense* siRNA transfiziert wurden. Daraufhin analysierten wir den Effekt der

verminderten Syndecan-4 Synthese auf die MMP-1 und MMP-3 Produktion in RASFs nach IL-1 α Stimulation. Wie in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben, konnten wir in dieser Arbeit eine gesteigerte MMP Produktion durch rheumatoide Synovialfibroblasten, besonders von MMP-3, nach Induktion mit IL-1 α zeigen, was mit Befunden anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt (Mengshol *et al.*, 2002). Die Hemmung von Syndecan-4 durch spezifische siRNA führte in RASFs zu einer deutlichen Reduktion der IL-1 α induzierten MMP Produktion gegenüber den untransfizierten Kontrollen. Diese Daten zur Hemmung der MMP Produktion konnte durch die Verwendung eines Antikörpers gegen Syndecan-4 nach IL-1 α Stimulation in RASFs bestätigt werden. So konnte die Produktion der krankheitsrelevanten MMPs auf nahezu basale Level gehemmt werden. Dieser Effekt zeigte sich am deutlichsten für MMP-3. Wir schlussfolgern daher, dass das Fehlen von Syndecan-4 und die damit verbundene verminderte IL-1 α induzierte MMP Produktion auch einen positiven Einfluss auf die Zerstörung der Knorpelstrukturen bei Rheumatoider Arthritis *in vivo* haben könnte.

5.2.2 Die Aktivierung von MAP Kinase Signalwegen durch Syndecan-4

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Produktion RA- relevanter MMPs über eine IL-1 vermittelte Aktivierung von MAP Kinasen reguliert wird. Wir haben daraufhin untersucht, welche MAP Kinasen in der IL-1 induzierten MMP-1 und MMP-3 Produktion in synovialen Fibroblasten involviert sind und ob die Hemmung von Syndecan-4 die Aktivierung der MAP Kinasen beeinflusst. Aufbauend auf den Daten zur Hemmung der MMP-1 und MMP-3 Produktion durch Syndecan-4 spezifische siRNA und Antikörper, wurde in einem der Einfluss von Syndecan-4 auf die IL-1 α induzierte Aktivierung von MAP Kinase Signalwegen in rheumatoiden Synovialfibroblasten untersucht. In einem humanen MAP Kinase Array mit 21 verschiedenen MAP Kinasen konnte der stärkste Effekt der Hemmung von Syndecan-4 auf die IL-1 vermittelte ERK1/2 Phosphorylierung und ein deutlich schwächerer auf p38 α MAP Kinase Phosphorylierung beobachtet werden. Die Hemmung von Syndecan-4 durch spezifische siRNA reduzierte die Basallevel dieser phosphorylierten MAP Kinasen ohne IL-1 α Stimulation nur minimal. Im Gegensatz dazu konnte die Aktivierung von ERK1/2 nach IL-1 α Stimulation bei gleichzeitigem Verlust von Syndecan-4 in RASFs gegenüber mit *nonsense* siRNA transfizierten RASFs nahezu komplett gehemmt werden. Die Hemmung der IL-1 α

induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 durch reduzierte Syndecan-4 Expression in RASFs konnte auch Western Blot bestätigt und quantifiziert werden. Eine ähnliche Kontrolle der ERK1/2 Phosphorylierung durch Syndecan-4 konnte zwar auch in anderen pathologischen Situation wie der systemischen Sklerose gezeigt werden (Chen *et al.*, 2008), eine Korrelation zwischen IL-1, Syndecan-4 und der ERK1/2 Phosphorylierung jedoch wurde erstmals in unseren Studien nachgewiesen.

Unabhängig von Syndecan-4 haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass die Phosphorylierung von p38 α bei der Rheumatoiden Arthritis und anderen chronischen Entzündungen durch IL-1 und TNF α induziert werden kann (Wang *et al.*, 1997). Ebenso wurde die p38 α induzierte Synthese der für die Knochen- und Knorpelzerstörung relevanten Proteinasen MMP-1 und MMP-3 bei Rheumatoider Arthritis in der Literatur beschrieben (Reunanen *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den Daten der Arbeitsgruppe von G. Schett konnten wir lediglich in einem phospho- MAP Kinase Array eine Aktivierung der α und δ Isoformen von p38 zeigen, im Western Blot allerdings nicht (Korb *et al.*, 2006). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede in der Expression und Aktivierung der MAP Kinasen liegt wahrscheinlich an der Verwendung von Gesamtgewebe das neben synovialen Fibroblasten auch Makrophagen und andere infiltrierende Zellen enthält, während wir die Versuche mit isolierten synovialen Fibroblasten durchgeführt haben.

Dass Syndecan-4 eine Rolle bei der Aktivierung von ERK1/2 und JNK nach Interaktion mit dem Chemokin *stromal cell- derived factor-1* (SDF-1/CXCL12) spielt, konnte von Valenzuela-Fernandez *et al.* und Charnaux *et al.* gezeigt werden (Charnaux *et al.*, 2005, Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2001). Die Zytokin abhängige Rolle von Syndecan-4 bei der Aktivierung von MAP Kinasen, insbesondere von ERK1/2 jedoch konnte aber noch nicht gezeigt werden.

Wir wollten als nächstes klären, ob Syndecan-4 als Ko- Rezeptor IL-1 dem IL-1-Rezeptor präsentiert, oder ob Syndecan-4 selbst für die Signalweiterleitung nach der Bindung von IL-1 verantwortlich ist. Da die zytoplasmatische Domäne essentiell für die Signaltransduktion ist (Tkachenko *et al.*, 2006, Whiteford *et al.*, 2007), wurde in Syndecan-4 defizienten Synovialfibroblasten das gesamte Syndecan-4 Protein oder eine Deletionsvariante ohne die zytoplasmatische Domäne exprimiert. Das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne führt ebenso wie

die Abwesenheit des gesamten Syndecan-4 in Syndecan-4^{-/-} Zellen zu einem Ausbleiben der ERK1/2 Aktivierung, während Überexpression des gesamten Syndecan-4 Proteins eine deutlich erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung bewirkt. Unsere Untersuchungen zur ERK1/2 Aktivierung zeigen deutlich, dass Syndecan-4 mit seiner zytoplasmatischen Domäne in synovialen Fibroblasten für diese IL-1 α vermittelte Signalweiterleitung zuständig ist.

5.3 Die Hemmung von Syndecan-4 reduziert die TNF- induzierte Knorpelzerstörung

Aufbauend auf den gewonnenen Daten, dass Syndecan-4 an der IL-1 vermittelten MMP-1 und MMP-3 Produktion beteiligt ist und dies *in vitro* zu einer Hemmung der Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 führt, wurde das Fehlen von Syndecan-4 als möglicher Schutz vor krankheitsbedingter Knorpelzerstörung *in vivo* untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Syndecan-4 aus dem entzündlichen Kontext der hTNFtg Mäuse durch Kreuzung dieser mit Syndecan-4 defizienten Mäusen entfernt (hTNFtg/Syndecan-4^{-/-}). Syndecan-4^{-/-} Mäuse weisen keinen Knorpel betreffenden Phänotyp auf (Echtermeyer *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu werden die hTNFtg Mäuse für Untersuchungen des RA- ähnlichen Phänotyps verwendet (Keffer *et al.*, 1991). Erstmals wurden klinische Parameter wie Griffstärke, die Schwellung der Pfoten sowie Gewicht und Größe der Mäuse zur Beurteilung krankheitsrelevanter Unterschiede zwischen verschiedenen TNF- abhängigen Mausmodellen in der Arbeitsgruppe von G. Schett beschrieben (Zwerina *et al.*, 2004).

hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäuse zeigen verglichen mit gleichaltrigen hTNFtg Mäusen eine deutlich reduziertere Ausprägung der klinischen Symptome. So zeigten sich bei gleicher Gewichtsentwicklung signifikante Unterschiede in der Schwellung der Pfoten und der Griffstärke. hTNFtg Mäuse zeigen starke RA- typische Deformationen gegenüber den hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen sowie den Syndecan-4 defizienten und Wildtyp Mäusen, die keinen Phänotyp aufweisen.

Im Krankheitsverlauf entwickelten hTNFtg Mäuse ausgeprägte klinische Symptome, die sich beginnend ab Woche fünf sicht- und messbar von den hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen unterschieden. Diese charakteristischen

Unterschiede blieben für den gesamten Zeitraum von 10 Wochen bestehen. Syndecan-4^{-/-} und Wildtyp Mäuse zeigten keine klinischen Auffälligkeiten, was darauf hinweist, dass das Fehlen von Syndecan-4 die klinischen RA-ähnlichen Symptome vermindert.

Hinweise auf die Knorpelbeschaffenheit wurden durch histologische Untersuchungen der Hinterpfoten der Mäuse erhalten. So zeigten hTNFtg Mäuse auf morphometrischer Ebene neben massiven Entzündungsarealen auch starke Zerstörungen der Knorpelstrukturen. Dagegen wurden nur einzelne entzündliche Areale bei hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen gefunden, deren Größe nicht mit hTNFtg Mäusen vergleichbar war. Das Fehlen von Syndecan-4 im entzündlichen Kontext der hTNFtg Mäuse führte dazu, dass kaum zerstörte Knorpel in den Gelenken gefunden wurden, und somit die Gelenkmorphologie denen der Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäuse ähnelte. Diese Korrelation zwischen den klinischen Auffälligkeiten und der Histologie der Mäuse konnte quantitativ durch die Auswertung der entzündlichen Areale und der Knorpelfläche bestätigt werden. Vergleichsweise ist die Knorpelfläche von hTNFtg Mäusen, deren fortschreitender Krankheitsverlauf zu einer Gelenkzerstörung führt, um ca. 50% reduzierter gegenüber der Knorpelfläche von Syndecan-4^{-/-} und Wildtyp Mäusen. Das Entfernen von Syndecan-4 aus dem entzündlichen Milieu der hTNFtg Mäuse hebt nahezu den gesamten Effekt der Knorpelzerstörung auf. Ebenso wurden weniger und deutlich schwächer ausgeprägte entzündliche Areale in den hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen gegenüber der hTNFtg Mäusen gefunden. Das Fehlen von Syndecan-4 reduziert daher deutlich die Invasion des Synoviums in den artikulären Knorpel und schützt ihn auch vor seiner Zerstörung.

Im Prozess der Knochen- und Knorpelzerstörung bei Rheumatoider Arthritis wurden erhöhte Spiegel an Matrixmetalloproteinasen, vor allem an MMP-3, gefunden (Kyburz *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde sowohl der Einfluss von Syndecan-4 auf die MMP Produktion in rheumatoiden Synovialfibroblasten als auch der Verlust von Syndecan-4 im TNF-abhängigen Mausmodell untersucht. Immunhistologisch wurde die Knochen- und Knorpelzerstörende Protease MMP-3 auf Paraffinschnitten der verwendeten Mäuse untersucht. Im Synovium von hTNFtg Mäusen konnte eine erhöhte Expression von MMP-3 in Makrophagen und Fibroblasten gefunden werden. Das Entfernen von Syndecan-4 aus dem TNF-Abhängigen Kontext führt zu einer Verminderung der MMP-3 Produktion auf

basale Level wie Wildtyp und Syndecan-4^{-/-} Mäuse sie aufweisen. Diese gewonnenen Daten zur reduzierten MMP-3 Produktion korrelieren mit der reduzierten Invasion synovialer Fibroblasten in den artikulären Knorpel.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Syndecan-4 in der Zytokin-abhängigen Knorpeldestruktion durch synoviale Fibroblasten bei der Rheumatoiden Arthritis untersucht. Zum ersten Mal konnten krankheitsspezifische Charakteristika von Syndecan-4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt und der damit verbundene Mechanismus der Zytokin-abhängigen Signaltransduktion aufgeklärt werden. Zusätzlich konnte eine Verstärkung der pro-inflammatorischen Signale durch Syndecan-4 bei der entzündlichen Knorpelzerstörung nachgewiesen werden.

- Das Heparansulfat Proteoglykan Syndecan-4 konnte erfolgreich im Gewebe und in synovialen Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis nachgewiesen und eine erhöhte Expression an der Zelloberfläche gezeigt werden. Sowohl die mRNA als auch die Protein Expression von Syndecan-4 zeigte sich stark erhöht gegenüber Proben von Osteoarthrose- Patienten.
- Die Expression von Syndecan-4 mRNA kann durch das entzündlich wirkende Zytokin TNF α in Synovialfibroblasten induziert werden.
- *In vivo* konnte die gesteigerte Syndecan-4 Expression an zwei TNF-abhängigen Mausmodellen der Rheumatoiden Arthritis (hTNFtg und TTP^{-/-}) immunhistochemisch gezeigt werden. Eine Reduktion der Syndecan-4 Expression hingegen wurde nach Behandlung von hTNFtg Mäusen mit Anti-TNF α Antikörpern erzielt. *In vitro* zeigten RASFs aus hTNFtg und TTP^{-/-} Mäusen sowohl einen deutlich erhöhten Protein als auch mRNA Spiegel von Syndecan-4 gegenüber Wildtyp Mäusen.
- Es konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass krankheitsspezifische MMPs (MMP-1 und MMP-3) bei der Rheumatoiden Arthritis hauptsächlich in der Synovialfibroblasten enthaltenden Deckzellschicht des entzündeten Synovialgewebes exprimiert werden.
- *In vitro* konnten RASFs durch das Zytokin IL-1 α zu einer vermehrten Produktion von MMP-1 und -3 angeregt werden. Dagegen führt die Hemmung von Syndecan-4 mit siRNA oder Antikörpern zu einer deutlichen Reduktion der IL-1 α abhängigen MMP-1 und MMP-3 Produktion.

-
- Mittels Array Technik konnte die gesteigerte MMP Produktion in RASF auf eine IL-1 α abhängige Aktivierung von MAP Kinasen, besonders ERK1/2, eingegrenzt und mittels Western Blot quantitativ bestätigt werden. Die Hemmung von Syndecan-4 mit siRNA oder Antikörpern reduziert die ERK1/2 Phosphorylierung nach IL-1 α Stimulation auf nahezu basale Level ohne Stimulation.
 - Erstmals konnte eine Weiterleitung des IL-1 α Signals über Syndecan-4 zur Phosphorylierung von ERK1/2 anhand der Expression zweier Syndecan-4 Konstrukte, mit bzw. ohne der zytoplasmatischen Domäne, in Syndecan-4 defizienten Zellen demonstriert werden.
 - *In vivo* bewirkt das Fehlen von Syndecan-4 eine signifikante Reduktion der klinischen RA- Parameter für Griffstärke und Schwellung der Pfoten nach Einkreuzung des TNF- Transgens in Syndecan-4 defiziente Mäuse (hTNFtg/Syndecan-4^{-/-}).
 - Abschließend konnte in den hTNFtg/Syndecan-4^{-/-} Mäusen beobachtet werden, dass die Abwesenheit von Syndecan-4 zu einer reduzierten Zerstörung von Knorpelgewebe im entzündlichen Kontext der hTNFtg Mäuse führt.

7 Literaturverzeichnis

- Arend W P, Dayer J M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; (38): 151-160.
- Bernfield M, Gotte M, Park P W, Reizes O, Fitzgerald M L, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; (68): 729-777.
- Bertolini D R, Nedwin G E, Bringman T S, Smith D D, Mundy G R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; (319): 516-518.
- Bongi S M, Porfirio B, Rombola G, Palasciano A, Beneforti E, Bianucci G. Shared-epitope HLA-DRB1 alleles and sex ratio in Italian patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2004; (71): 24-28.
- Buckley C D, Pilling D, Lord J M, Akbar A N, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001; (22): 199-204.
- Burmester G R, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne R W. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 1997; (40): 5-18.
- Cao H, Dzineku F, Blakeshear P J. Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor-alpha mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases. *Arch Biochem Biophys* 2003; (412): 106-120.
- Carballo E, Lai W S, Blakeshear P J. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 1998; (281): 1001-1005.
- Cevikbas F, Schaefer L, Uhlig P, Robenek H, Theilmeier G, Echtermeyer F, Bruckner P. Unilateral nephrectomy leads to up-regulation of syndecan-2- and TGF-beta-mediated glomerulosclerosis in syndecan-4 deficient male mice. *Matrix Biol* 2008; (27): 42-52.
- Charnaux N, Brule S, Hamon M, Chaigneau T, Saffar L, Prost C, Lievre N, Gattegno L. Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12. *FEBS J* 2005; (272): 1937-1951.
- Chen Y, Leask A, Abraham D J, Pala D, Shiwen X, Khan K, Liu S, Carter D E, Wilcox-Adelman S, Goetinck P, Denton C P, Black C M, Pitsillides A A, Sarraf C E, Eastwood M. Heparan sulfate-dependent ERK activation contributes to the overexpression of fibrotic proteins and enhanced contraction by scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008; (58): 577-585.

- Chen Z, Gibson T B, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb M H. MAP kinases. *Chem Rev* 2001; (101): 2449-2476.
- Cohen B J, Buckley M M, Clewley J P, Jones V E, Puttick A H, Jacoby R K. Human parvovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; (45): 832-838.
- Couchman J R, Vogt S, Lim S T, Lim Y, Oh E S, Prestwich G D, Theibert A, Lee W, Woods A. Regulation of inositol phospholipid binding and signaling through syndecan-4. *J Biol Chem* 2002; (277): 49296-49303.
- Cunnane G, Hummel K M, Muller-Ladner U, Gay R E, Gay S. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1998; (46): 1-7.
- Cutolo M, Sulli A, Barone A, Serio B, Accardo S. Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1993; (11): 331-339.
- Dayer J M. [Mechanisms of articular destruction in rheumatoid arthritis]. *Rev Med Brux* 1985; (6): 311-313.
- Dayer J M, Ricard-Blum S, Kaufmann M T, Herbage D. Type IX collagen is a potent inducer of PGE2 and interleukin 1 production by human monocyte macrophages. *FEBS Lett* 1986; (198): 208-212.
- DuBois R N, McLane M W, Ryder K, Lau L F, Nathans D. A growth factor-inducible nuclear protein with a novel cysteine/histidine repetitive sequence. *J Biol Chem* 1990; (265): 19185-19191.
- Echtermeyer F, Baciuc P C, Saoncella S, Ge Y, Goetinck P F. Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers 11. *J Cell Sci* 1999; (112 (Pt 20)): 3433-3441.
- Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* 2001; (107): R9-R14.
- Fassbender H G. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983; (3): 141-155.
- Feldmann M, Maini R N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001; (19): 163-196.
- Firestein G S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996; (39): 1781-1790.
- Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; (423): 356-361.
- Firestein G S, Paine M M. Stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 1992; (140): 1309-1314.

- Fitzgerald M L, Wang Z, Park P W, Murphy G, Bernfield M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 2000; (148): 811-824.
- Garavito G, Yunis E J, Egea E, Ramirez L A, Malagon C, Iglesias A, De La Cruz O F, Uribe O, Navarro E, Martinez P, Jaraquemada D. HLA-DRB1 alleles and HLA-DRB1 shared epitopes are markers for juvenile rheumatoid arthritis subgroups in Colombian mestizos. *Hum Immunol* 2004; (65): 359-365.
- Ghezzi P, Cerami A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Mol Biotechnol* 2005; (31): 239-244.
- Hazzalin C A, Mahadevan L C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; (3): 30-40.
- Hembry R M, Bagga M R, Reynolds J J, Hamblen D L. Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; (54): 25-32.
- Huber L C, Distler O, Tarter I, Gay R E, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; (45): 669-675.
- Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Nishimura M, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem* 2001; (276): 47483-47488.
- Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Tsuzuki S, Nakamura E, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J Biol Chem* 2000; (275): 5249-5252.
- Ishiguro K, Kojima T, Muramatsu T. Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconj J* 2002; (19): 315-318.
- Iwakura Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; (13): 341-355.
- Julien M A, Wang P, Haller C A, Wen J, Chaikof E L. Mechanical strain regulates syndecan-4 expression and shedding in smooth muscle cells through differential activation of MAP kinase signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; (292): C517-C525.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslari E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991; (10): 4025-4031.
- Kim C W, Goldberger O A, Gallo R L, Bernfield M. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell* 1994; (5): 797-805.

- Kitasato H, Noda M, Akahoshi T, Okamoto R, Koshino T, Murakami Y, Inoue M, Kawai S. Activated Ras modifies the proliferative response of rheumatoid synovial cells to TNF-alpha and TGF-alpha 1. *Inflamm Res* 2001; (50): 592-597.
- Klinkhoff A. Biological agents for rheumatoid arthritis: targeting both physical function and structural damage. *Drugs* 2004; (64): 1267-1283.
- Kojima T, Takagi A, Maeda M, Segawa T, Shimizu A, Yamamoto K, Matsushita T, Saito H. Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2001; (85): 793-799.
- Koo B K, Jung Y S, Shin J, Han I, Mortier E, Zimmermann P, Whiteford J R, Couchman J R, Oh E S, Lee W. Structural basis of syndecan-4 phosphorylation as a molecular switch to regulate signaling. *J Mol Biol* 2006; (355): 651-663.
- Korb A, Tohidast-Akrad M, Cetin E, Axmann R, Smolen J, Schett G. Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis 5. *Arthritis Rheum* 2006; (54): 2745-2756.
- Kyburz D, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Gay R E, Carson D A, Gay S. Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum* 2003; (48): 642-650.
- Lafyatis R, Thompson N L, Remmers E F, Flanders K C, Roche N S, Kim S J, Case J P, Sporn M B, Roberts A B, Wilder R L. Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol* 1989; (143): 1142-1148.
- Lai W S, Stumpo D J, Blackshear P J. Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *J Biol Chem* 1990; (265): 16556-16563.
- Liu H, Pope R M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 2003; (3): 317-322.
- Longley R L, Woods A, Fleetwood A, Cowling G J, Gallagher J T, Couchman J R. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci* 1999; (112 (Pt 20)): 3421-3431.
- Lopes C C, Dietrich C P, Nader H B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res* 2006; (39): 157-167.
- Machner A, Baier A, Wille A, Drynda S, Pap G, Drynda A, Mawrin C, Buhling F, Gay S, Neumann W, Pap T. Higher susceptibility to Fas ligand induced apoptosis and altered modulation of cell death by tumor necrosis factor-alpha in periarticular tenocytes from patients with knee joint osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2003; (5): R253-R261.

- Meinecke I, Pap T. Rheumatoide Arthritis - T-Zell- unabhängige Mechanismen. *Akt Rheumatol* 2006; 31: 41-47.
- Mengshol J A, Mix K S, Brinckerhoff C E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis Rheum* 2002; (46): 13-20.
- Midwood K S, Mao Y, Hsia H C, Valenick L V, Schwarzbauer J E. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2006; (11): 73-78.
- Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Ichinose Y, Tsukada T, Aoyagi T, Nakamura H, Nagataki S. TNF-alpha-mediated expression of membrane-type matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology* 1996; (89): 553-557.
- Mohler K M, Torrance D S, Smith C A, Goodwin R G, Stremmer K E, Fung V P, Madani H, Widmer M B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993; (151): 1548-1561.
- Moller B, Villiger P M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. *Springer Semin Immunopathol* 2006; (27): 391-408.
- Montgomery A M, Sabzevari H, Reisfeld R A. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1993; (1176): 265-268.
- Mostafavi-Pour Z, Askari J A, Parkinson S J, Parker P J, Ng T T, Humphries M J. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* 2003; (161): 155-167.
- Muller-Ladner U, Pap T, Gay R E, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005; (1): 102-110.
- Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002; (4 Suppl 3): S39-S49.
- Nagase H, Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Chung L, Bode W, Maskos K, Brew K. Engineering of selective TIMPs. *Ann N Y Acad Sci* 1999; (878): 1-11.
- Nah S S, Ha E, Mun S H, Won H J, Chung J H. Effects of melittin on the production of matrix metalloproteinase-1 and -3 in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes. *J Pharmacol Sci* 2008; (106): 162-166.
- Nakayamada S, Kurose H, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein Rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts
2. *Arthritis Res Ther* 2005; (7): R476-R484.

- Nurnberger W, Platonov A, Stannigel H, Beloborodov V B, Michelmann I, von K R, Burdach S, Gobel U. Definition of a new score for severity of generalized *Neisseria meningitidis* infection. *Eur J Pediatr* 1995; (154): 896-900.
- Okura T, Gong L, Kamitani T, Wada T, Okura I, Wei C F, Chang H M, Yeh E T. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 1996; (157): 4277-4281.
- Pap T, Meinecke I, Muller-Ladner U, Gay S. Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis* 2005; (64 Suppl 4): iv52-iv54.
- Pap T, Muller-Ladner U, Gay R E, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000a; (2): 361-367.
- Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernihough J K, Simmen B, Gay R E, Billingham M, Gay S. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000b; (43): 1226-1232.
- Park P W, Reizes O, Bernfield M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem* 2000; (275): 29923-29926.
- Patterson A M, Cartwright A, David G, Fitzgerald O, Bresnihan B, Ashton B A, Middleton J. Differential expression of syndecans and glypicans in chronically inflamed synovium. *Ann Rheum Dis* 2008; (67): 592-601.
- Qu Z, Garcia C H, O'Rourke L M, Planck S R, Kohli M, Rosenbaum J T. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 1994; (37): 212-220.
- Raghavan A, Robison R L, McNabb J, Miller C R, Williams D A, Bohjanen P R. HuA and tristetraproline are induced following T cell activation and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J Biol Chem* 2001; (276): 47958-47965.
- Rauch B H, Millette E, Kenagy R D, Daum G, Fischer J W, Clowes A W. Syndecan-4 is required for thrombin-induced migration and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005; (280): 17507-17511.
- Reunanen N, Li S P, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari V M. Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem* 2002; (277): 32360-32368.
- Rioux V, Landry R Y, Bensadoun A. Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4. *J Lipid Res* 2002; (43): 167-173.
- Robak T, Gladalska A, Stepień H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw* 1998; (9): 145-154.

- Rutkauskaite E, Zacharias W, Schedel J, Muller-Ladner U, Mawrin C, Seemayer C A, Alexander D, Gay R E, Aicher W K, Michel B A, Gay S, Pap T. Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts
4. *Arthritis Rheum* 2004; (50): 1448-1456.
- Saal J G, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, Koch S, Zacher J, Sell S, Einsele H, Muller C A. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum* 1999; (42): 1485-1496.
- Saklatvala J, Bird T. A common class of receptors for the two types of porcine interleukin-1 on articular chondrocytes. *Lymphokine Res* 1986; (5 Suppl 1): S99-104.
- Salisbury A K, Duke O, Poulter L W. Macrophage-like cells of the pannus area in rheumatoid arthritic joints. *Scand J Rheumatol* 1987; (16): 263-272.
- Sambrook J, Pollack R. Basic methodology for cell culture--cell transformation. *Methods Enzymol* 1974; (32): 583-592.
- Schett G. Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; (9 Suppl 1): S2.
- Schmidt A, Echtermeyer F, Alozie A, Brands K, Buddecke E. Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds. *J Biol Chem* 2005; (280): 34441-34446.
- Shealy D J, Wooley P H, Emmell E, Volk A, Rosenberg A, Treacy G, Wagner C L, Mayton L, Griswold D E, Song X Y. Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res* 2002; (4): R7.
- Sheehan K C, Ruddle N H, Schreiber R D. Generation and characterization of hamster monoclonal antibodies that neutralize murine tumor necrosis factors. *J Immunol* 1989; (142): 3884-3893.
- Smith J B, Haynes M K. Rheumatoid arthritis--a molecular understanding. *Ann Intern Med* 2002; (136): 908-922.
- Smith M F, Jr., Novotny J, Carl V S, Comeau L D. Helicobacter pylori and toll-like receptor agonists induce syndecan-4 expression in an NF-kappaB-dependent manner
3. *Glycobiology* 2006; (16): 221-229.
- Sternlicht M D, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; (17): 463-516.
- Sully G, Dean J L, Wait R, Rawlinson L, Santalucia T, Saklatvala J, Clark A R. Structural and functional dissection of a conserved destabilizing element of cyclo-oxygenase-2 mRNA: evidence against the involvement of AUF-1 [AU-rich element/poly(U)-binding/degradation factor-1], AUF-2, tristetraprolin, HuR (Hu antigen R) or FBP1 (far-upstream-sequence-element-binding protein 1). *Biochem J* 2004; (377): 629-639.

- Sweeney S E, Firestein G S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; (36): 372-378.
- Taylor G A, Carballo E, Lee D M, Lai W S, Thompson M J, Patel D D, Schenkman D I, Gilkeson G S, Broxmeyer H E, Haynes B F, Blakeshear P J. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraproline (TTP) deficiency. *Immunity* 1996a; (4): 445-454.
- Taylor G A, Thompson M J, Lai W S, Blakeshear P J. Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraproline, a potential zinc-finger transcription factor. *Mol Endocrinol* 1996b; (10): 140-146.
- Tkachenko E, Effenbein A, Tirziu D, Simons M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res* 2006; (98): 1398-1404.
- Tkachenko E, Rhodes J M, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 2005; (96): 488-500.
- Tolboom T C, Pieterman E, van der Laan W H, Toes R E, Huidekoper A L, Nelissen R G, Breedveld F C, Huizinga T W. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis* 2002; (61): 975-980.
- Valenzuela-Fernandez A, Palanche T, Amara A, Magerus A, Altmeyer R, Delaunay T, Virelizier J L, Baleux F, Galzi J L, Renzana-Seisdedos F. Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans 12. *J Biol Chem* 2001; (276): 26550-26558.
- van der F A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001; (305): 285-298.
- Varnum B C, Lim R W, Sukhatme V P, Herschman H R. Nucleotide sequence of a cDNA encoding TIS11, a message induced in Swiss 3T3 cells by the tumor promoter tetradecanoyl phorbol acetate. *Oncogene* 1989; (4): 119-120.
- Vincenti M P, Brinckerhoff C E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* 2002; (4): 157-164.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; (92): 827-839.
- Wang X S, Diener K, Manthey C L, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole C N, Chan-Hui P Y, Mantlo N, Lichenstein H S, Zukowski M, Yao Z. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase
10. *J Biol Chem* 1997; (272): 23668-23674.

- Whiteford J R, Behrends V, Kirby H, Kusche-Gullberg M, Muramatsu T, Couchman J R. Syndecans promote integrin-mediated adhesion of mesenchymal cells in two distinct pathways. *Exp Cell Res* 2007; (313): 3902-3913.
- Wilcox-Adelman S A, Denhez F, Goetinck P F. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 2002a; (277): 32970-32977.
- Wilcox-Adelman S A, Denhez F, Iwabuchi T, Saoncella S, Calautti E, Goetinck P F. Syndecan-4: dispensable or indispensable? *Glycoconj J* 2002b; (19): 305-313.
- Zhang B, Ouyang P, Chen Y, Lai W Y, Xie J G, Xu D L. [Tumor necrosis factor-alpha regulates the proliferation and syndecan-4 expression of human umbilical vein endothelial-like cells cultured in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007; (27): 496-498.
- Zhang Y, Pasparakis M, Kollias G, Simons M. Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. *J Biol Chem* 1999; (274): 14786-14790.
- Zhou A, Scoggin S, Gaynor R B, Williams N S. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 2003; (22): 2054-2064.
- Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, Dunstan C, Kollias G, Steiner G, Smolen J, Schett G. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 2004; (50): 277-290.
- Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Kronke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen J S, van den B W, Schett G. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; (104): 11742-11747.

Danksagung

Diese Seiten möchte ich nutzen, um allen Personen zu danken, die mich auf irgendeine Art und Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- ✿ Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Pap für die Bereitstellung und Betreuung eines wirklich interessanten Themas, der Möglichkeit, verschiedene Kongresse zu besuchen und die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes bei Prof. Dr. Christian Jorgensen in Montpellier. Vielen Dank für die persönliche Unterstützung, die manchmal nötige Diplomatie und die Übernahme des Gutachtens.

- ✿ Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Bruno Moerschbacher von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die persönliche Betreuung meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens recht herzlich bedanken.

- ✿ All meinen gegenwärtigen Arbeitskollegen aus Münster und ehemaligen Kollegen der „alten“ Arbeitsgruppe in Magdeburg gilt mein ganz besonderer Dank, da sie alle auf ihre eigene Weise, vor allem durch unzählige kleine und große Hilfestellungen jeglicher Art, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

- ✿ Mein größter Dank gilt Dr. Frank Echtermeyer, der mich während meiner Arbeit betreut und mit seiner Begeisterung angesteckt hat. Vielen Dank für die freundschaftliche und fortwährende Hilfsbereitschaft, die unermüdlichen Korrekturen von Abstracts, Postern und der vorliegenden Arbeit. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft! Ebenso möchte ich mich für die meist telefonische Unterstützung nach seinem Umzug nach Hannover auch bei seiner Frau, Dr. Christine Herzog, recht herzlich bedanken.

- ✿ Für das Interesse am Fortschreiten der Arbeit und die persönliche Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Andreas Hensel bedanken.

- ✿ Den „Unfallchirurgen“ danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für verschiedenartigste Hilfe, vor allem nach unserem Umzug nach Münster.

- ✿ Petra und Marita danke ich ganz herzlich sowohl für die sehr gute Betreuung meiner Mäuse als auch für die aufschlussreichen Kaffeepausen. Ebenso möchte ich mich für so einige schöne Treffen neben der Arbeit bedanken.

- ✿ All den lieben Menschen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, aber sie dennoch wissen, dass sie gemeint sind, möchte ich ebenfalls für Rat und Tat danken. Mein besonderer Dank dabei gilt Edita und Carsten für die Freundschaft und die meist telefonische Unterstützung vom ersten Tag meiner Promotion an und auch dafür, dass ihr zum Ende der Arbeit den Telefonhörer nicht aufgelegt habt.

- ✿ Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Karina sowie dem Rest meiner Familie für ihre Hilfe, den Rückhalt und ihre Geduld sowie ihre niemals endende Motivation bedanken.

✿ **Vielen Dank** ✿

Lebenslauf