

Biologie

**Die Rolle des
Four-and-a-half-LIM-only-Protein 2 (FHL2)
in der Gelenkzerstörung bei
Rheumatoider Arthritis**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Lars Henrik Meyer

aus Wolfenbüttel

2008

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Sachser /
Dekan des Fachbereichs Biologie

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Linke

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Pap

Tag der mündlichen Prüfung(en): *15.07.08*

Tag der Promotion: *18.07.08*

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	7
2	Einleitung	9
2.1	Aufbau und Struktur der rheumatoiden Synovia.....	10
2.2	Die Aktivierung rheumatoider Fibroblasten – der initiale Schritt zur Knorpelzerstörung.....	11
2.3	Metalloproteasen vermitteln die Degradation der Knorpelmatrix	12
2.4	Proinflammatorische Zytokine stimulieren die Synthese von Matrixmetalloproteasen.....	15
2.5	TNF α und IL-1 - die zentrale Zytokine in der Knorpeldestruktion	16
2.6	Das Adaptormolekül FHL2 - Aufbau, Expression und Lokalisation.....	17
2.7	FHL2 beeinflusst durch Bindung an seine Interaktionspartner deren Funktion	19
2.8	FHL2 - ein wichtiger Vermittler in der Wundheilung und Osteogenese	21
3	Fragestellung der Arbeit.....	23
4	Ergebnisse	25
4.1	Die Expression von FHL2 in synovialem Gewebe und Primärkulturen synovialer Fibroblasten von RA-Patienten.	25
4.1.1	Die Lokalisation und Expression von FHL2 in synovialem Gewebe	25
4.1.2	Die Expression von FHL2 in Primärzellkulturen synovialer Fibroblasten	26
4.2	Proinflammatorische Zytokine steuern die FHL2-Expression.....	28
4.2.1	Inflammatorische Zytokine hemmen die FHL2-Expression.....	28
4.2.2	TNF α induziert ein 20 kDa großes FHL2-Fragment.....	31
4.2.3	TGF β induziert die FHL2-Expression in RASF	34
4.3	Die FHL2-Expression im Verlauf der destruktiven Arthritis in der hTNFtg-Maus 36	
4.3.1	FHL2-Expression in synovialen Fibroblasten des hTNFtg-Mausmodells.....	36
4.3.2	Die FHL2-Expression im Verlauf der destruktiven Arthritis ist transient.....	37
4.3.3	Eine Hemmung der TNF α -Stimulation führt zu gesteigerter FHL2 Expression.	39
4.4	Die FHL2-Defizienz führt zu einer anhaltenden Aktivierung von p38-MAPK.....	43
4.4.1	FHL2 kolokalisiert mit phospho-p38-MAPK im Nukleus nach TNF α - Stimulation.....	43

4.4.2	FHL2-defiziente mesenchymale Stammzellen zeigen eine stabile p38-Aktivierung nach TNF α -Stimulation.....	46
4.5	FHL2 reguliert die MMP-13 Expression	47
4.5.1	FHL2 silencing mittels RNAi-Technologie	47
4.5.2	Die RNAi-vermittelte Hemmung der FHL2 Expression steigert die TNF α -induzierte Expression von MMP-1 und MMP-13	48
4.6	Die Überexpression von FHL2 unterbindet die TNF-induzierte MMP-13-Expression	51
4.7	Die Hemmung der FHL2-Expression führt zu einer deutlichen Steigerung der Invasivität rheumatoider Fibroblasten.....	53
4.7.1	Aufbau und Funktionsweisen des MATRI-Assays	53
4.7.2	Die Hemmung von FHL2 führt zu einer deutlichen Steigerung der Invasivität von RASF	55
4.8	FHL2-Defizienz führt zu einer deutlich gesteigerten Knorpel- und Knochendestruktion in der hTNFtg-Maus.	58
4.8.1	Die Generierung der hTNFtg-FHL2 ^{-/-} Maus	58
4.8.2	hTNFtg-FHL2-defiziente Mäuse zeigen klinisch eine deutlich gesteigerte Progression der destruktiven Arthritis.....	58
4.8.3	hTNFtg-FHL2-defiziente Mäuse zeigen umfangreichere und ausgeprägtere Gelenkerstörungen als hTNFtg-Mäuse	61
5	Diskussion	64
5.1	FHL2 zeigt im Verlauf der RA ein transientes Expressionsmuster	64
5.2	Proinflammatorische Zytokine hemmen die FHL2-Expression.....	66
5.3	FHL2 - ein wichtiger Regulator der MMP-13-Expression	68
5.4	Die umfassende Knochenzerstörung in der hTNFtg-FHL2 ^{-/-} -Maus – Ein Hinweis auf die Involvierung aktivierter Osteoklasten?	69
5.5	Schlussfolgerung	71
6	Material und Methoden:.....	72
6.1	Biologisches Material.....	72
6.1.1	Eukaryotische Zellen.....	72
6.1.2	Bakterienstämme	72
6.1.3	Plasmidvektoren und siRNAs	72
6.1.4	Primersequenzen	73

6.1.5	Antikörper	74
6.2	Chemikalien	75
6.3	Puffer und Lösungen	76
6.3.1	Sonstige Puffer und Lösungen	77
6.4	Bakterielle Kulturmedien	79
6.5	Kulturmedien und Zusätze für eukaryotische Zellen	79
6.6	Molekularbiologische Kits	79
6.7	Histologische Kits	79
6.8	Sonstige Reagenzien	79
6.9	Verbrauchsmaterialien	80
6.10	Geräte und Software	80
6.11	Methoden.....	81
6.11.1	Tiermodelle	81
6.11.2	Generierung der FHL2-/-hTNFtg Maus	81
6.11.3	Genotypisierung	81
6.11.4	Klinisches Scoring der Arthritisschäden in Mäusen	81
6.11.5	MicroCT-Imaging	82
6.11.6	DNA-Methoden.....	82
6.11.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	82
6.11.8	Protein-Methoden.....	85
6.11.9	Zellkultur-Methoden	87
6.11.10	Immunologische Methoden.....	89
6.11.11	Histologische Methoden.....	91
7	Literatur.....	93
8	Anhang	102
8.1	Die TNF α -vermittelte Hemmung der FHL2-Expression kann zwischen verschiedenen RASF variieren.....	102
9	Veröffentlichungen.....	103
10	Lebenslauf.....	104
11	Danksagung.....	105

1 Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung, die zu einer fortschreitenden Zerstörung der artikulären Knorpel- und Knochenstrukturen nahezu aller Gelenke führen kann. Neben einwandernden Immunzellen sind stabil-aktivierte synoviale Fibroblasten (RASf) in der Synovialmembran für die Initiation und das Vorantreiben der Knorpelzerstörung von entscheidender Bedeutung. Sie zeigen auch in Abwesenheit proinflammatorischer Stimuli einen aktivierten Phänotyp, der sich, neben morphologischen Charakteristika, vor allem in spezifischen, funktionalen Eigenschaften wie dem Anheften an die Knorpelmatrix und dem Sezernieren Matrix-degradierender Enzyme äußert und sie somit deutlich von nicht-aktivierten Fibroblasten unterscheidet. So vermitteln RASf durch das Anheften an die Knorpelmatrix sowie durch die erhöhte Sekretion Matrix-degradierender Enzyme wie Matrixmetalloproteasen (MMPs) die progressive Zerstörung der Knorpelstruktur in den entzündeten Gelenken. Obwohl die Faktoren, die diese persistierende Aktivierung bedingen, bis heute nicht vollständig verstanden sind, spielen proinflammatorische Zytokine wie der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) eine entscheidende Rolle in der Initiation und dem Verlauf der RA.

Im Zuge von Wundheilungsprozessen kommt es zu einer starken Induktion des Scaffolding- oder Adaptorproteins „Four-and-a-Half-LIM-only Protein 2“ (FHL2). Während es in gesunden Fibroblasten kaum exprimiert wird, steuert es in der dermalen Wundheilung die Organisation fokaler Adhäsionsstrukturen sowie die Matrixassemblierung und die Kontraktion des Granulationsgewebes. Verschiedene Studien zur Osteogenese zeigen darüber hinaus, dass FHL2 ein zentraler Faktor in Umbauprozessen des Knochengewebes ist, da es die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen Hypothesen zu, dass FHL2 eine zentrale Rolle in der mesenchymalen Wundheilung zukommt. Vor diesem Hintergrund sollte die Frage beantwortet werden, ob FHL2 auch in Transformationsprozessen synovialer Fibroblasten bei RA von Bedeutung ist.

Die hier vorgestellten Studien zeigen, dass FHL2 im humanen Synovialgewebe, speziell in der synovialen Deckzellschicht stark exprimiert wird, was auf die erhöhte FHL2-Expression in RASf zurückzuführen ist. Untersuchungen in einem TNF α -abhängigen Tiermodell bestätigen die gesteigerte FHL2-Expression in synovialen Fibroblasten *in vitro*, zeigen aber darüber hinaus, dass es im Krankheitsverlauf der destruktiven Arthritis zu einer transienten Induktion von FHL2 kommt, die sich besonders auf die frühen und primär inflammatorischen Krankheitsphasen beschränkt. Weiterführende *in vitro*-Studien beweisen eindrucksvoll, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 die FHL2-Expression hemmen, und dass

dies der Ausgangspunkt für die Zytokin-vermittelte Induktion Matrix-zerstörender Enzyme ist. Denn obwohl das Fehlen von FHL2 für sich keine Auswirkung auf das Verhalten der RASF zeigt, so vermittelt es doch eine persistierende Aktivierung des TNF α -induzierten p-38-MAPK-Signalwegs. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass die Hemmung von FHL2 zu einer deutlichen Steigerung der TNF α -induzierten MMP-13-Expression führt, in dessen Folge es zu einer deutlichen Zunahme im invasiven Verhalten der RASF kommt.

Im Kontrast dazu konnte in verschiedenen *in vivo*-Untersuchungen unterstrichen werden, dass eine therapeutische Blockierung von TNF α sowohl im RA-Patienten als auch im krankheitsrelevanten Tiermodell die FHL2-Expression induziert. Interessanterweise ist auch das in der Wundheilung wichtige, profibrotische Zytokin „transformation growth factor β “ (TGF β) ein starker Induktor der FHL2-Expression in kultivierten RASF. Ferner konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Überexpression von FHL2 die TNF α -vermittelte MMP-Induktion deutlich hemmt.

Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen lässt sich die Hypothese ableiten, dass das Auftreten einer transienten FHL2-Expression in der RA zeitlich mit dem Übergang der initialen Entzündungsreaktion in die Chronifizierung der RA zusammenfällt. In dieser Phase zeigen sich sowohl eine Unterdrückung der Wundheilung wie auch ein schnelles Fortschreiten der Knorpel- und Knochendestruktion, die letztendlich zum Funktionsverlust des betroffenen Gelenkes führt. Dies konnte in einem TNF α -abhängigen Tiermodell eindrucksvoll bestätigt werden, in dem die FHL2-Defizienz nicht nur zu einer schweren und umfassenden Zerstörung der Knorpel- und Knochenstrukturen in den distalen Gelenken führt. Vielmehr ist auch der Fortgang der Erkrankung stark beschleunigt, was die hier aufgestellte Hypothese unterstützt.

Diese Ergebnisse unterstreichen eine zentrale Funktion von FHL2 als anti-arthritischen Faktor und korrelieren darüber hinaus mit der Funktion von FHL2 in der dermalen Wundheilung. Diese Studien beschreiben FHL2 als einen zentralen Faktor in der Vermittlung mesenchymaler Heilungsprozesse und identifizieren einen neuen Kandidaten für weitere therapeutische Ansätze in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis.

2 Einleitung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine weltweit verbreitete, chronische Autoimmunkrankheit, die alle Gelenke betreffen kann. Sie artikuliert sich in einer Hyperplasie des synovialen Gewebes, hervorgerufen durch chronische Entzündung sowie einer pathologischen Immunantwort. Das Hauptmerkmal der RA ist allerdings eine progressive Zerstörung der Gelenkstrukturen, die in fortgeschrittenen Stadien zur vollständigen Zerstörung des Gelenks und somit zu Invalidität führt (Firestein, 2003, Gay et al., 1993) (vgl. auch Abb.: 1). Die RA ist eine der häufigsten und zugleich folgenschwersten Gelenkerkrankungen, die sich, im Hinblick auf die progressive Gelenkzerstörung, deutlich von anderen chronischen arthritischen Erkrankungen unterscheidet.

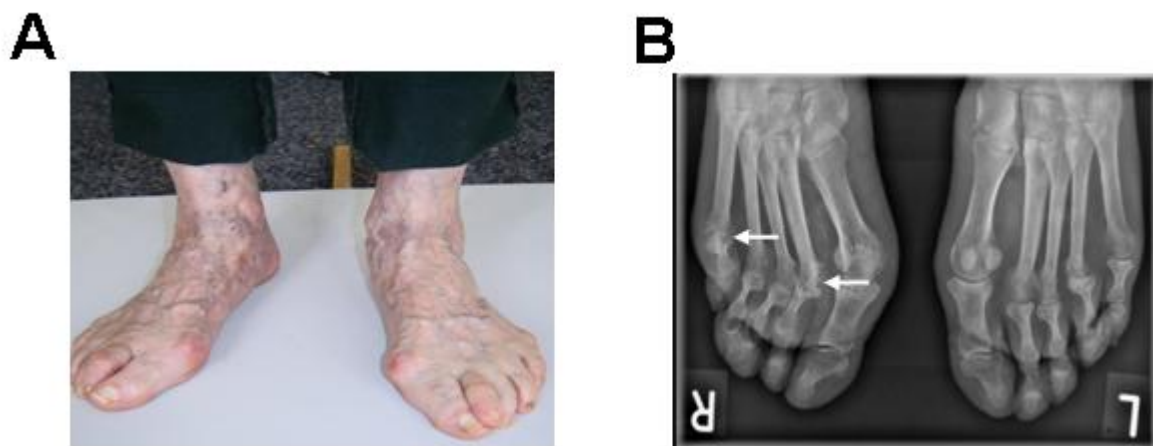


Abb. 1: Die progressive Zerstörung knorpeliger Gelenkstrukturen ist ein Hauptmerkmal der Rheumatoiden Arthritis: (A) Fotografie der Füße einer 73-jährigen RA-Patientin mit typisch-klinischem Bild. (B). Röntgenaufnahme der Füße derselben Patientin. Die Pfeile markieren zerstörte Gelenkstrukturen.

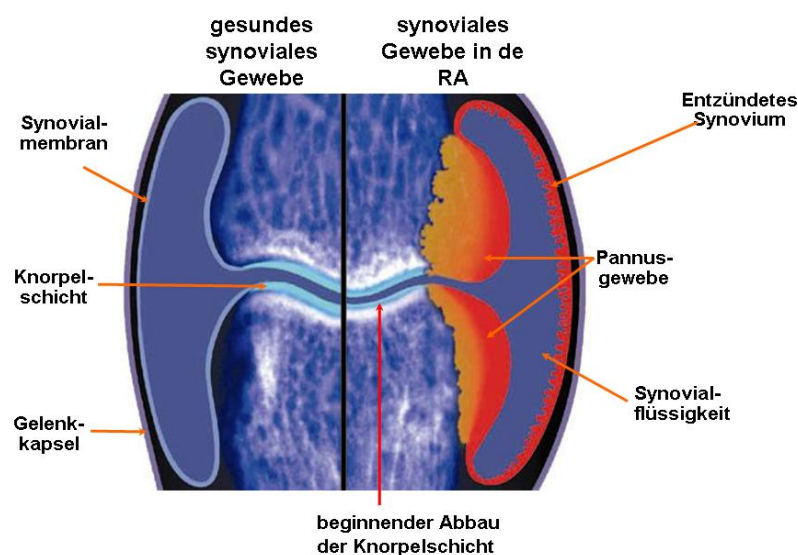
Unter sozioökonomischen Gesichtspunkten betrachtet gehört die RA zu den teuersten Krankheiten in den Industrienationen. So belaufen sich die Kosten für Diagnose, Behandlung und Rehabilitation, zusammen mit den verursachten Einkommensverlusten in den USA nach Berechnungen des National Health Interview Survey (USA) auf 8,74 Mrd. USD jährlich, was ungefähr 0,3% des Bruttoinlandsprodukts der USA entspricht (Ganten und Ruckpaul 2003).

In den letzten Jahren hat das Wissen über die molekularen Ursachen der RA enorm zugenommen. Dennoch lassen sich die einzelnen Ergebnisse nur unvollständig zu einem Gesamtbild zusammensetzen, so dass die Pathomechanismen der RA heute alles andere als verstanden sind.

2.1 Aufbau und Struktur der rheumatoiden Synovia

Der Ausgangsort der lokalen Gewebeerstörung ist die synoviale Deckzellschicht, das so genannte „Lining“ oder „Lining Layer“, welches die Gelenke umgibt und diese vor hohen Druckbelastungen schützt. Die synovialen Fibroblasten (SF) in der Deckzellschicht sezernieren die Synovialflüssigkeit in den Gelenkspalt und erhalten so die Homöostase der Lining-Struktur. Somit sind Fibroblasten die wichtigsten ortständigen Zellen im synovialen Lining.

Die äußeren Schichten der Synovia sind durch eine dichte extrazelluläre Matrix aus Kollagen-Typ II- Fasern umgeben, die den Gelenkspalt umlagert. Unter physiologischen Bedingungen herrscht hier eine Balance zwischen Proliferation und Apoptose der Zellen. Im Fall der Rheumatoiden Arthritis allerdings ist dieses Gleichgewicht verschoben. Hier kommt es durch gesteigerte Proliferation der Fibroblasten bei gleichzeitig gestörter Apoptose zu einer Hyperplasie des synovialen Gewebes (Qu et al., 1994; Mountz et al., 2001; Liu und Pope 2003). Begleitet wird dies durch das Einwandern inflammatorischer Zellen, wie T- und B-Lymphozyten und Makrophagen, was zur Folge hat, dass im Vergleich zum gesunden Gewebe die rheumatoide Synovia um mehr als das Doppelte anschwellen kann (vgl. Abb.:2). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer Hyperplasie oder Pannusbildung.



Aus: Feldmann, et al., 1996

Abb. 2.: Vergleich zwischen gesundem und arthritischen Synovialgewebe: Die Hauptcharakteristika der Rheumatoiden Arthritis (RA) sind die chronische Entzündungsreaktion in Folge derer es zur Hyperplasie des Synovialgewebes (Pannusgewebe) kommt, sowie progressiver Zerstörung knorpeliger Gelenkstrukturen. Aus Feldmann et al., 1996.

2.2 Die Aktivierung rheumatoider Fibroblasten – der initiale Schritt zur Knorpelzerstörung

In der Pathogenese der RA sind die rheumatoiden synovialen Fibroblasten (RASf) von entscheidender Bedeutung. Sie steuern maßgeblich die Gewebereaktionen (Buckley, 2001) und sind somit die treibende Kraft in der Initiation und Progression der RA (Meyer et al., 2006; Huber et al., 2005; Müller Ladner et al., 2005). In Bezug auf Morphologie und biologische Funktion unterscheiden sich RASf nicht nur von Fibroblasten in nicht-rheumatoiden Geweben, sondern interessanterweise auch von synovialen Fibroblasten (SF) in tieferen Schichten des Synoviums (Fassbender, 1998). So zeigt der aktivierte Fibroblast im Phasenkontrast eine runde Form und einen blass-grauen Kern (Lafatis et al., 1989). Das charakteristische funktionale Merkmal der RASf ist das Anheften der Zellen an den Gelenkknorpel, welches das Eindringen der RASf in die Knorpelmatrix ermöglicht und sogleich Ausgangspunkt für das invasive Verhalten der RASf bildet (Müller-Ladner et al., 2007; Meinecke et al., 2005) (Abb.: 3).

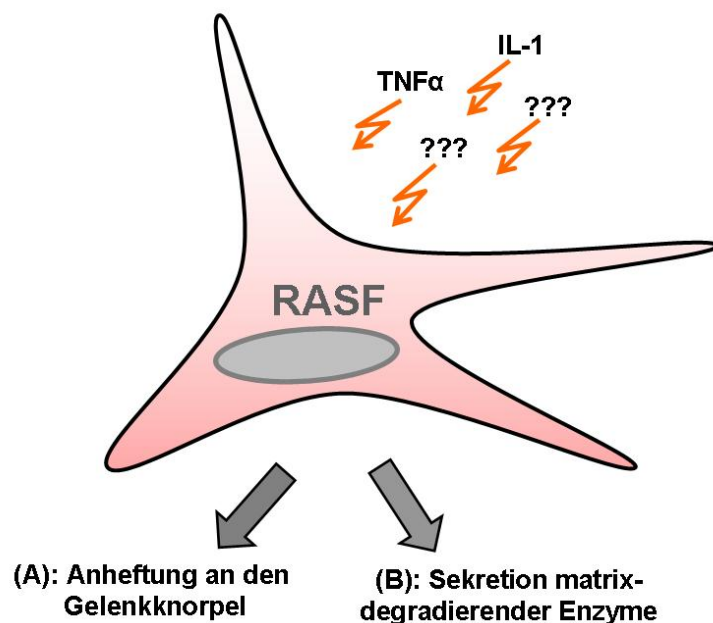


Abb. 3: In der Pathogenese sind RASf von entscheidender Bedeutung. Externe Stimuli führen zu einer stabilen Aktivierung des Fibroblasten, was sich in der vermehrten Anheftung und Sekretion matrix-degradierender Enzyme äußert.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das invasive Verhalten von RASF als Antwort auf externe Stimuli nicht temporär ist, sondern es hier vielmehr zu einer stabilen Aktivierung der RASF kommt, die sich in einem aggressiv-invasiven Phänotyp äußert (Pap et al., 2000b). Obwohl die histologischen Veränderungen im synovialen Gewebe und somit die Ausprägung der Krankheit von Patient zu Patient unterschiedlich stark in Erscheinung treten können (Pap, T et al., 2000c), spricht man sowohl von „transformiert erscheinenden Fibroblasten“ als auch „tumor-like fibroblasts“. Denn ähnlich wie Tumorzellen können auch aktivierte RASF invasiv in das umliegende Gewebe hineinwachsen (Müller-Ladner, et al., 1996). Die Mechanismen, die zur Aktivierung von RASF führen, sind derzeit weitgehend unklar und nicht allein auf die Wirkung inflammatorischer Zytokine zurückzuführen (Ospelt et al., 2004; Werner und Grose, 2003). Eine interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass der aktivierte Phänotyp sowie die invasiven Eigenschaften der RASF auch ohne fortdauernde Stimuli inflammatorischer Zellen erhalten bleiben (Pap et al., 2000b). Dies konnte in Studien mit Hilfe des „severe combined immune-deficient“ (SCID) Mausmodell gezeigt werden. Hier kam es nach Transplantationen von RASF und normalem humanen Knorpelgewebe in induzierte SCID-Mäuse zum Anheften und Einwandern der RASF an das Knorpelgewebe (Pap et al., 1998; Müller-Ladner, et al., 1996b).

2.3 Metalloproteasen vermitteln die Degradation der Knorpelmatrix

Der gesunde Gelenkknorpel besitzt eine komplexe extrazelluläre Matrix (extra cellular matrix = ECM), die im Wesentlichen aus Kollagen Typ-II, Typ IX und Typ XI sowie aus Aggrecanen und partiell sulfonierten Proteoglycanen zusammengesetzt ist, die sich zu einem stabilen Netzwerk ergänzen. Das Anheften der RASF an die ECM ist der entscheidende Schritt für die Invasion in das Knorpelgewebe und wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle, darunter auch Integrine, vermittelt (Müller-Ladner et al., 1996a). Integrine sind transmembrane Heterodimere, die sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen. Derzeit sind mehr als 24 verschiedene Integrine beschrieben, von denen viele als Rezeptoren für Kollagene dienen (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Brower et al., 1997). Integrine vermitteln allerdings nicht nur das Anheften an die ECM, sondern sind vielmehr auch an intrazellulären Signalwegen beteiligt (Calderwood, 2004; Yamada et al., 2003; Hynes 2002; van der Flier und Sonnenberg 2001; Liu et al., 2000). So aktivieren sie beispielsweise in Kooperation mit Zytokinrezeptoren die Ras-Raf-MEK-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinase ERK, die unter anderem die Zellproliferation anregt (Hughes et

al., 2002; Bouvard et al., 2001; Danen und Sonnenberg, 2000). Auch an der Aktivierung der „Überlebenssignalkaskade“ PI-3K-Akt sowie der stressinduzierten „c-Jun terminal kinase“ (JNK-Kinase) sind Integrine beteiligt (Ffrench-Constant und Colognato, 2004; Lin et al., 1997; Inoue et al., 1996). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass bestimmte Integrine auch auf RASF exprimiert werden (Rinaldi, 1997), wie beispielsweise $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ Integrine (El Gabalawy H, und Wilkens, J, 1993; Müller-Ladner et al., 1997; Pirilia et al., 2001). Hier unterstützen Integrine durch „Co-signaling“ mit dem „Platelet Derived Growth Factor“ (PDGF) die Proliferation der RASF (Remmers et al., 1991; Sarkissian und Lafyatis, 1999). Im Zusammenhang mit RA konnte gezeigt werden, dass das Blockieren der Integrine mittels spezifischer Antikörper die Invasivität synovialer Fibroblasten reduziert (Wang et al., 1997). Darüber hinaus zeigte sich, dass die Aktivierung von $\beta 1$ -Integrinen die Expression Matrix-zerstörender Proteasen induziert (Ravanti et al., 1999). Den RASF in der synovialen Deckzellschicht, die mit dem Gelenkknorpel in enger Verbindung stehen, kommt dabei eine entscheidende Rolle in der Synthese und Sekretion Matrix-degradierender Enzyme zu (Pap et al., 2000).

Die Matrixzerstörung sowie die progressive Zerstörung des Gelenkknorpels sind im Wesentlichen auf die Aktivität von Metalloproteasen (MMPs) und Kathepsinen zurückzuführen (Parks und Mecham; 1998; Müller-Ladner et al., 1996). Die MMPs fassen eine Familie von strukturell und funktional ähnlichen Proteinen zusammen, die sich in fünf Untergruppen einteilen lassen: Kollagenasen (z.B. MMP-1, MMP-3, MMP-10 MMP-11 und MMP-13), Gelatinasen (z.B. MMP-2 und MMP-9), Stromelysine (z.B. MMP-20) und Macrophage Metalloelastasen (z.B. MMP-12 und MMP-19) sowie eine Gruppe membranständiger Proteasen (z.B. MT1-MMP und MT6-MMP). Letztere werden dabei von Osteoklasten in großem Umfang synthetisiert (Nagase et al 1997; Pap et al., 2000d). RASF hingegen sind maßgeblich für die Synthese und Sekretion von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 bekannt (Mor et al., 2005). Die Synthese, Aktivierung, Inhibierung sowie Degradation der MMPs sind auf verschiedenen Ebenen reguliert und werden über verschiedene proinflammatorische Zytokine und Wachstumshormone gesteuert.

Auf der transkriptionalen Ebene ist das Activator Protein-1 (AP-1), welches auch für die Proliferation von RASF wichtig ist, von zentraler Bedeutung. So enthalten viele Promotoren von MMP-kodierenden Genen eine proximale Bindedomäne für AP-1 (Asahara et al., 1997; Pap et al., 2000). Darüber hinaus zeigen Studien an Kernextrakten, dass die AP-1-DNA-Bindeaktivität von AP-1 in RA-Patienten und im „collagen induced arthritis“ (CIA)-Mausmodell signifikant erhöht ist und eine signifikant erhöhte Expression der AP-1-

Komponenten Jun und Fos im RA-Gewebe zu finden ist (Han et al., 1998). AP-1 ist ein Heterodimer aus den Protoonkogenen c-jun und c-fos, die auch in RASF stark exprimiert werden (Kinne et al., 1995). AP-1 steuert sowohl die basale als auch die Zytokin-induzierte Expression von MMPs und ist maßgeblich für die hohe Induktion von Kollagenase 1 (MMP-1) und Kollagenase 3 (MMP-13) in bestimmten Zelltypen verantwortlich (Han et al., 2001). Neben AP-1-Bindestellen zeigen Promotorsequenzen verschiedener MMPs auch eine NF- κ B-Bindestelle. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass NF- κ B die Expression von MMP-1 und MMP-3 in dermalen Fibroblasten steuert (Bond et al., 1999) und darüber hinaus an der Regulation von MMP-1, 3 und 13 in humanen Fibroblasten und Chondro-Sarkomzellen beteiligt ist (Bonderson et al., 2000).

Auf der post-translationalen Ebene sind MMPs überwiegend über die Stabilität ihrer mRNA reguliert (Reunanen et al., 2002; Delany et al., 1992), die über so genannte Adenin/Uridinreiche Elemente (ARE) im 3'untranslatierten Bereich der mRNAs vermittelt wird. AREs steuern den mRNA-Abbau und somit die Hemmung der Proteinsynthese (Kotlyarov und Gaestel, 2002). Die Aktivierung der MMPs ist ein weiterer wichtiger Kontrollschritt. Sie werden nämlich als Pro-Enzyme synthetisiert und erst durch proteolytische Spaltung aktiviert, was auf vielfältige Art und Weise geschehen kann. So wird im Fall von MMP-2 und MMP-10 der Zugang zum Zink-Atom im aktiven Zentrum durch Zysteinreste versperrt, so dass die proteolytische Spaltung dieser Zysteinreste die MMPs aktiviert. Viele MMPs werden extrazellulär durch andere MMPs sowie MT-MMPs aktiviert. Die MT-MMP selbst sowie MMP-11 werden allerdings durch Furinproteasen schon intra-zellulär im Golgi-Apparat aktiviert. Dabei wird durch proteolytische Spaltung eine konservierte Polypeptidkette nahe der katalytischen Domäne abgetrennt (Pei et al., 1995).

Die Regulation der bereits aktivierten MMPs ist ein weiterer physiologischer Kontrollschritt, der über MMP-Inhibitoren vermittelt wird. Als wichtigste Vertreter sind hier das α 2-Makroglobulin und die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) zu nennen (van der Laan et al., 2003). Eine Besonderheit der MMP-Inhibierung kann in der Synovia beobachtet werden. Hier fungiert das α 2-Makroglobulin als unspezifischer MMP-Inhibitor, der auf Grund seiner Größe (759 kDa) nur in synovialen Flüssigkeiten lokalisiert ist und nicht in das Knorpelgewebe eindringen kann (Gomez et al., 1997). Im Gegensatz dazu sind TIMPs spezifische physiologische Inhibitoren. Die vier bisher charakterisierten TIMPs weisen eine ähnliche Proteinstruktur auf, werden aber von vier verschiedenen Genen kodiert (Brew et al., 2000). Die Expression der TIMPs wird durch verschiedene inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine stimuliert und findet in den gleichen Zelltypen statt, in denen auch

MMPs synthetisiert werden. So wird die TIMP1-Expression durch den „transformation growth factor TGF β oder Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13) induziert und ist in Synovialflüssigkeiten von Osteoarthrosepatienten zu finden. Hingegen wird TIMP-2 ausschließlich von Chondrozyten gebildet (Su et al 1999). TIMP-3 ist ECM-assoziiert und hemmt neben MMPs auch MT-MMPs (Su et al., 1999). Im gesunden Knorpelgewebe ist die Expression von TIMPs und MMPs balanciert. Unter den pathophysiologischen Bedingungen der RA hingegen übersteigt die MMP-Expression die der TIMP-Expression.

2.4 Proinflammatorische Zytokine stimulieren die Synthese von Matrixmetalloproteasen

Bei der Induktion der MMP-Synthese sind verschiedene inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine von großer Bedeutung. Der „tumor necrosis factor α “ (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) sind im Zusammenhang mit der Pathogenese der RA die wichtigsten Vertreter (Zwerina et al., 2005; Takemura et al., 2001; Chu et al., 1991).

TNF α wird überwiegend in Monozyten und Makrophagen gebildet und ist sowohl auf translationaler als auch auf posttranslationaler Ebene reguliert. Durch Bindung an die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 stimuliert TNF α verschiedene Signalkaskaden. So steuert TNF α durch Aktivierung von Caspase 3 und 8 spezifische Signalwege für Apoptose (Ohshima et al., 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass TNF α gleichzeitig den Phosphatidylinositide 3-Kinase (PI3K) - Akt-Kinase Signalweg aktiviert, und dass die Hemmung der PI3K zu einer verstärkten TNF α -induzierten Apoptose führt (Osaki et al., 2004; Liang und Slingerland, 2003; Reddy et al., 2000).

In der RA ist TNF α darüber hinaus das Hauptzytokin für die Induktion und Vermittlung der Knorpelzerstörung. So induziert TNF α über das „TNF receptor binding protein“ TRADD die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der neben pro-inflammatorischen Faktoren auch die MMP-Expression induziert (Hsu et al., 1996; Feldmann et al., 1996). Des Weiteren aktiviert TNF α mehrere MAP-Kinasen (Goertz, B. et al., 2005), zu denen sowohl die stressinduzierten JNK und p38 als auch die mitogene Kinase ERK 1/2 gehören. Diese Serin/Threonin-Kinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren des AP-1-Komplexes, c-jun und c-fos (Alberterts et al., 2002 4th-Edition). Sie sind daher von essentieller Bedeutung für die Vermittlung und Steuerung des inflammatorischen Prozesses. Interessanterweise zeigt sich in synovialen Makrophagen eine besonders starke Aktivierung von p38 MAPK, während

in RASF sowohl p38 als auch ERK aktiviert werden (Caballo und Blackshere 2001; Zhan M. et al., 2004).

Die genauen Zusammenhänge sowie der genaue molekulare Mechanismus, über den TNF α die Knorpelzerstörung in der RA steuert, sind bis heute noch nicht vollständig verstanden, jedoch führen hohe systemische TNF α -Spiegel zu einer chronisch destruktiven Arthritis. Dies konnte besonders eindrucksvoll in Studien mit der hTNF α -transgenen Maus (hTNFtg-Maus) gezeigt werden. Diese Maus hat konstitutiv hohe systemische TNF α -Spiegel und zeigt schon wenige Wochen nach der Geburt Anzeichen einer schweren, destruktiven Arthritis (Keffer et al., 1991).

2.5 TNF α und IL-1 - die zentrale Zytokine in der Knorpeldestruktion

Die Rolle von TNF α in der Pathogenese der RA wird zuweilen kontrovers diskutiert. So stellt sich die Frage, ob TNF α ein direkter Stimulus für die Inflammation und Knorpeldestruktion ist, oder ob es vielmehr eine Kaskade von inflammatorischen Faktoren und Zytokinen stimuliert, die in ihrem Zusammenspiel die inflammatorische Reaktion und Knorpelzerstörung steuern (Zwerina et al. 2007). Es ist bekannt, dass TNF α , neben verschiedenen MMPs, wie beispielsweise MMP-13, auch die Expression anderer RA-relevanter Zytokine induziert und der Hauptinduktor für IL-1 ist (Tetlow et al., 2001; Joosten et al., 1999). Die spezifische Hemmung von TNF α über Antikörper führt beispielsweise zu einer signifikanten Reduzierung der IL-1-Produktion in humanen RASF (Brennan et al., 1989). Über das Zusammenspiel von TNF α und IL-1 ist in der Literatur bisher wenig beschrieben worden (Carter et al., 1990). Neueste Studien von Zwerina und Kollegen zeigen jedoch, dass IL-1 für die Steuerung der Knorpelzerstörung essentiell ist. So zeigen IL-1-defiziente hTNFtg-Mäuse zwar weiterhin eine starke Inflammation, weisen aber keine Anzeichen einer Knorpelzerstörung auf (Zwerina et al., 2007). Diese Beobachtung wird durch Studien unterstrichen, in denen durch die Applikation von IL-1 in gesunde Gelenke von Kaninchen der Phänotyp einer destruktiven Arthritis hervorgerufen wird (Pettipher et al., 1996). Darüber hinaus stimuliert IL-1 die Sekretion von MMP-1 und MMP-3 (Jeong et al., 2004).

IL-1 wird von verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen aber auch RASF sekretiert (Dinarello et al., 1996). In RA ist IL-1 stark exprimiert (Feldmann et al., 1996) und interessanterweise führt die Überexpression von IL-1- zur Hemmung der TIMP-3-Synthese, welches die Aktivität von MMP-1 und MMP-3 inhibiert (Jeong et al., 2004).

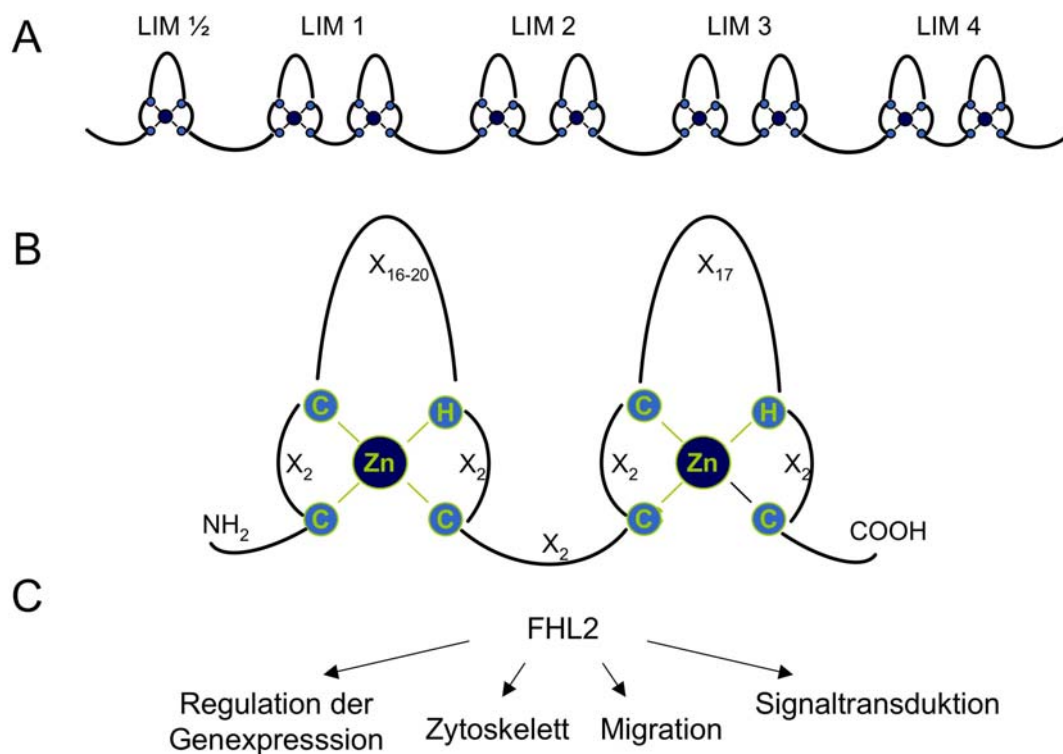
2.6 Das Adaptormolekül FHL2 - Aufbau, Expression und Lokalisation

Neben der Bindung von Zytokinen an spezifische Rezeptoren sind eine Fülle weiterer Adaptorproteine, Strukturproteine und Kinasen erforderlich, um einen extrazellulären Stimulus in den Nukleus zu leiten. Dazu werden sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus häufig große Proteinkomplexe gebildet. Solche Proteinkomplexe erfüllen im Wesentlichen zwei Funktionen: zum einen die rasche Weiterleitung des Signals, zum anderen initiieren sie den effektiven Transkriptionsstart bestimmter Gene.

Um eine optimale Funktion der Proteinkomplexe zu erreichen, ist ein korrekter Aufbau von entscheidender Bedeutung. Dies wird durch Adaptor-Proteine, die mit mehreren Proteinen gleichzeitig interagieren können, gewährleistet, die somit die Strukturen der Komplexe vermitteln.

Das Vier-und-einhalb-LIM-Domänen Protein FHL2 ist solch ein Adaptormolekül (Abb.: 4). Es gehört zu einer Familie von Proteinen, die LIM-Domänen als ein gemeinsames Merkmal ausweisen (Abb.: 4-A). LIM-Domänen bestehen aus einem doppelten Zinkfingermotiv, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln und in verschiedenen Zytoskelettproteinen sowie Transkriptionsfaktoren zu finden sind (Kosa et al., 1994; Michelsen et al., 1993). LIM-Proteine vermitteln den Aufbau großer Proteinkomplexe (Abb.: 4-B).

Derzeit sind sechs Mitglieder der FHL-Proteinfamilie beschrieben (FHL1-5 und ACT), die sich in ihrem Expressionsmuster stark unterscheiden. So werden FHL1-3 besonders im menschlichen Muskelgewebe exprimiert (Chu et al., 2000; Morgan und Madgwick, 1999), wohingegen FHL4 und ACT spezifisch im Hoden synthetisiert werden (Fimia et al., 1999; Morgan und Madgwick, 1999). Eine Ausnahme bildet das FHL5, welches bisher ausschließlich in Kiemen nachgewiesen werden konnte (Mistry et al., 2004).



⇒ physiologische Relevanz: Knochenbildung, Herz, Muskel und Plazenta

Abb. 4: Aufbau und Funktionen von FHL2: (A) Mit seinen viereinhalb LIM-Domänen vermittelt das 32 kDa große FHL2 Molekül Protein-Protein-Wechselwirkungen (B) Schematisierter Aufbau einer LIM-Domäne: das doppelte Zinkfingermotiv ist in verschiedenen Zytoskelettproteinen und Transkriptionsfaktoren zu finden (Zn: Zink, C: Cystein, H: Histidin, X: beliebige Aminosäure.) (C) FHL2 interagiert mit Membran-Rezeptormolekülen, zytosolischen Proteinen sowie Transkriptionsfaktoren.

FHL2 ist in intakten Tieren am stärksten im Herzmuskel exprimiert, wo es unter anderem mit der N2B-Region des Titins interagiert (Lange et al., 2002; Kong et al., 2001). Daneben konnte FHL2 auch in verschiedenen anderen Organen wie Gehirn, Leber und Lunge nachgewiesen werden (Tanahashi et al., 2000; vgl. auch Johannessen et al., 2006). Interessant ist allerdings, dass es zu einer Induktion der FHL2-Expression kommt, wenn ein Gewebeschaden entsteht oder Regenerationsprozesse stattfinden, obwohl FHL2 in den meisten Geweben nicht exprimiert wird (Bai et al.2005, Günther et al.,2005; Wixler et al., 2007).

Die geringe Größe des FHL2 von 32 kDa kann auch das Fehlen eines nuklearen Lokalisationssignals erklären, da es deutlich unter der für einen aktiven Kerntransport erforderlichen Größe von 50 kDa liegt. Die zelluläre Distribution von FHL2 kann über verschiedene Stimuli reguliert werden. So stimulieren beispielsweise Serumkomponenten und

Sphingosin-1-Phosphat die Translokation in den Kern über einen Rho GTPase/ROCK-abhängigen Signalweg (Morlon und Sassone-Corsi, 2003; Müller et al., 2002; Li et al., 2001; vgl. auch Johannessen et al., 2006).

Neben der Lokalisation ist auch die Expression von FHL2 durch verschiedene Stimuli kontrolliert. Die Zugabe von Serum führt über die Aktivierung von „serum response factors“ (SRF-Transkriptionsfaktoren) zu einer Steigerung der FHL2-Expression (Phillipar et al., 2004). Darüber hinaus stimuliert 17 β -Östradiol die Expression von FHL2 und es wird postuliert, dass das Aktivator Protein-1 (AP-1) in diesem Zusammenhang wichtig ist (Cosser et al., 2003; Moens et al., 1999; Morlon und Sassone-Corsi, 2003).

2.7 FHL2 beeinflusst durch Bindung an seine Interaktionspartner deren Funktion

Mit seinen viereinhalb LIM-Domänen kann FHL2 mit über 50 verschiedenen Proteinen interagieren. Dabei reicht die Vielfalt der Interaktionspartner von Transmembranrezeptoren über Strukturproteine, Enzyme, verschiedene Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren bis hin zu Spleißfaktoren und DNA-Reparaturproteinen (Johannessen et al., 2006).

In mehreren Studien der Arbeitsgruppe Wixler wurde FHL2, welches keine enzymatische Aktivität hat, als Interaktionspartner des zytosolischen Teils der Integrin α -Ketten identifiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass das 32 kDa große FHL2 mit dem zytologischen Teil verschiedener α -Integrin-Ketten wie α 3A-, α 3B-, α 7A- und α 7B-Untereinheiten (Samson et al., 2004; Wixler et al., 2000; Wixler et al., 1999), aber auch mit mehreren β -Untereinheiten interagiert (Samson et al., 2004; Wixler et al., 2000). Weiterführende Studien zeigten, dass FHL2 als Adaptor-Protein an der Assemblierung der fokalen Kontakte beteiligt ist und darüber hinaus mit der „focal adhesion kinase“ (FAK) interagiert (Park et al., 2008).

Die Funktionen, die FHL2 mit seinen Interaktionspartnern in den verschiedenen Zellkompartimenten ausübt, sind allerdings bislang weniger gut verstanden. So interagiert FHL2 mit verschiedenen Strukturproteinen des Zytoskeletts wie beispielsweise Aktin, Myosin, Titin und Vinkulin, was eine Funktion von FHL2 als Bestandteil des Zytoskeletts nahe legt (Coghill et al., 2003; El Mourabit et al., 2004; McGrath et al., 2006; Johannesson et al., 2006). Wie bereits beschrieben ist FHL2 aber auch in der Ausbildung der fokalen Zellkontakte involviert und interagiert dabei mit verschiedenen Integrinen und der FAK, einem Enzym, das auch die Migration, den Aufbau von fokalen Kontakten sowie die Matrixassemblierung kontrolliert (Ilic et al., 2004; Gabriel et al., 2004; Mitra et al., 2005, Sieg

et al., 2000). Ferner zeigt die phosphorylierte Form der MAP-Kinase ERK2, welche ebenfalls ein zentraler Bestandteil der fokalen Kontakte ist, eine hohe Bindungsaffinität zu FHL2 (Purcell et al., 2004). Die Interaktion zwischen FHL2 und ERK hat zur Folge, dass der Übertritt von ERK in den Zellkern verhindert wird, wodurch wiederum die ERK-abhängige Genexpression beeinflusst wird (Purcell et al., 2004). Die Funktion von FHL2 als Kofaktor der Transkription kann je nach Interaktionspartner und Zelltyp variieren, denn FHL2 kann sowohl als Aktivator als auch Repressor wirken (vgl. auch Johannessen et al., 2006). In der Aktivator-Funktion ist FHL2 zum Beispiel ein selektiver Interaktionspartner für den Androgenrezeptor (AR) und fungiert als Koaktivator für die Expression AR-spezifischer Gene (Müller et al., 2000). Bei der Interaktion mit dem „cAMP response element binding protein“ (CREB) wirkt FHL2 ebenfalls als ein Koaktivator in der CREB-vermittelten Expression von Zielgenen (Fimia et al., 2000; Johannessen et al., 2007). FHL2 bindet unmittelbar an β -Cathenin und agiert dabei als Korezeptor des β -Cathenin-Lef/Tcf-Transkriptionskomplexes (Labalette et al., 2004; Wei et al., 2003). In diesem Zusammenhang zeigt FHL2 allerdings Zelltyp-abhängig zwei Funktionen. Es hemmt die Lef/Tcf-gesteuerte Transkription in Myoblasten, aktiviert sie jedoch in Epithelzellen (Martin et al., 2002, Chen et al., 2003). Auch in Bezug auf den SRF-Transkriptionsfaktor zeigt FHL2 eine Zelltyp-abhängige Funktion. So wurde FHL2 in Muskelzellen ein inhibierender Effekt, in Hautfibroblasten hingegen ein aktivierender Effekt auf die SRF-Transkriptionsfaktoren zugeschrieben (Phillipar et al., 2006, Wixler et al., 2007).

Ein auch im Hinblick auf die RA interessanter Interaktionspartner von FHL2 sind die Proteine des AP-1 Komplexes, welche aus einem Heterodimer der Protoonkogene c-jun und c-fos aufgebaut ist und einen der zentralen Transkriptionsfaktoren in der MMP-Expression darstellt (Morlon und Sassone-Corsi, 2003; Martin et al., 2007). FHL2 hemmt die Transkriptionsaktivität des AP-1-Komplexes und unterstützt somit auch die maligne Proliferation von Brust- und Darmkrebszellen (Martin et al., 2007; Wang et al., 2007). Ferner führt eine FHL2-Defizienz zu einer gesteigerten Translokation von p65 in den Zellkern, sowie einer gesteigerten Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen (Bai et al., 2005), was eine hemmende Wirkung von FHL2 auf den NF- κ B-Signalweg unterstreicht.

2.8 FHL2 - ein wichtiger Vermittler in der Wundheilung und Osteogenese.

Die physiologische Bedeutung von FHL2 konnte durch die Generierung einer FHL2-defizienten Maus näher untersucht werden. So zeigen FHL2^{-/-}-Mäuse eine modifizierte Antwort auf die, durch β -adrenerge Stimulation, induzierte Hypertrophie des Herzmuskels sowie mit zunehmendem Alter eine Osteoporose (Chu et al., 2000b; Kong et al., 2001). Im Zusammenhang mit RA allerdings ist die Rolle von FHL2 in Inflammations- und Wundheilungsprozessen sowie während der Osteogenese besonders interessant. So konnten Wixler und Kollegen zeigen, dass die FHL2-Expression während Wundheilungsprozessen in dermalen Fibroblasten hochreguliert wird. Außerdem konnten sie darlegen, dass eine FHL2-Defizienz zu einer verminderten Expression von „ α -smooth muscle actin“ und p130CAS sowie einer ineffizienten Aktivierung von Rac führt. Ferner führt das Fehlen von FHL2 in mesenchymalen Zellen zu einem gestörten Aufbau von Aktin-Stressfasern sowie verminderter Assemblierung selektierter ECM-Proteine. In der Konsequenz ist die Migration von mesenchymalen Zellen, der Aufbau des granulären Bindegewebes sowie dessen Kontraktilität gestört, was sich in einer verzögerten kutanen Wundheilung äußert (Wixler et al., 2007; Park et al., 2008) Auch in der Osteogenese zeigt FHL2 einen weitreichenden Einfluss. FHL2 interagiert als Koaktivator mit dem „runx-related transkription factor 2“ (RUNX 2), einem der Hauptregulatoren der Osteoblastenaktivierung (Günter et al., 2005; Ducy et al., 1997). FHL2-defiziente Mäuse zeigen darüber hinaus eine verzögerte Osteoblastendifferenzierung, aus der eine verminderte Osteoblastenaktivität resultiert, die wiederum innerhalb weniger Monate zur Entwicklung einer Osteopenie führt (Günther et al., 2005). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von FHL2 zu einer gesteigerten Osteoblastogenese, einer erhöhten Adhäsion der Osteoblasten an bzw. Migration auf Matrixproteinen sowie zu einer erhöhten Matrixmineralisierung (Lai et al., 2006; Govoni et al., 2006).

Darüber hinaus ist FHL2 auch an elementaren Steuerungsvorgängen der Knochenresorption involviert. Die Knochenresorption wird über Osteoklasten vermittelt und durch „receptor activator of NF- κ B ligand“ (RANKL) induziert (Teitelbaum et al., 2000; Lacey et al., 1998). RANKL und sein korrespondierender Rezeptor RANK sind Mitglieder der TNF-Superfamilie und induzieren über eine Gruppe von TNF „receptor-associated factors“ (TRAFs) interzelluläre Signalkaskaden (Dougall et al., 1999; Bradley und Pober, 2001). TRAF6 ist ein Osteoklasten-spezifischer Vermittler der RANK-induzierten Osteoklastogenese (Cao et al., 1996; Ye et al., 1999). Im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen FHL2 und TRAF6 konnte nachgewiesen werden, dass FHL2 ausschließlich in aktivierten Osteoklasten exprimiert wird und durch Binden an TRAF6 die RANKL-induzierte Aktivierung von NF- κ B

unterdrückt. Somit übt FHL2 einen inhibierenden Effekt auf die Osteoklastenaktivität aus (Bai et al., 2005)

3 Fragestellung der Arbeit

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch verlaufende Autoimmunkrankheit, die, neben einer schweren Inflammation vor allem zu einer Zerstörung der distalen Gelenke führt. Durch fortwährend hohe Spiegel von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α und IL-1, werden Fibroblasten der Synovia aktiviert. Im Zuge dieser Aktivierung ändern diese rheumatoiden synovialen Fibroblasten (RASf) ihr Wachstumsverhalten, haften verstärkt an der Knorpelmatrix der Gelenke und sezernieren erhöhte Mengen von ECM-zerstörenden Enzymen wie Metalloproteasen (MMPs) und Kathepsinen. In ihrem Phänotyp und ihrer biologischen Aktivität ähneln diese RASf invasiv-wachsenden Tumorzellen, so dass man in diesem Zusammenhang auch von transformierten synovialen Fibroblasten spricht.

Eine der zentralen Fragen der RA-Pathogenese ist, wie diese Aktivierung der RASf sowie die Expression von knorpelzerstörenden MMPs induziert wird. Obwohl die zentrale Rolle des TNF α hier gut dokumentiert ist, sind die molekularen Mechanismen der TNF α -induzierten Aktivierung von MMPs jedoch weitgehend unklar.

Das „scaffolding-Protein“ FHL2 wird während der Wundheilung in dermalen Fibroblasten durch Zytokine wie TGF β oder Sphingolipide hochreguliert, eine FHL2-Defizienz hingegen führt in diesem Zusammenhang zu Wundheilungsstörungen. FHL2 interagiert mit Integrinen und verschiedenen Proteinen der Wachstumsfaktor-induzierten Signalwege sowie mit Transkriptionsfaktoren im Nukleus. FHL2 pendelt zwischen Zellmembran und Nukleus und überträgt so extrazelluläre Signale an die Gen-Expressionsmaschinerie im Kern. FHL2 interagiert mit Proteinen des AP-1 Transkriptionsfaktorkomplexes, der auch die Expression verschiedener MMPs steuert. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass FHL2 für die Regulation der Osteogenese von zentraler Bedeutung ist, denn es aktiviert die Osteoblastendifferenzierung und hemmt die TRAF6-vermittelte Aktivierung von Osteoklasten. Folgerichtig entwickeln FHL2-defiziente Mäuse eine Osteopenie.

Aufgrund der zentralen Rolle von FHL2 in der Osteogenese und in Wundheilungsprozessen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die pathologische Relevanz von FHL2 in der Rheumatoiden Arthritis untersucht werden. In diesem Zusammenhang standen vier zentrale Fragestellungen im Mittelpunkt:

1. Wie gestaltet sich die Expression von FHL2 während der RA im humanen Synovialgewebe sowie in Primärzellkulturen isolierter synovialer Fibroblasten?
2. Welchen Einfluss haben inflammatorische Zytokine auf die Expression von FHL2 in den genannten Modellen?

3. Welche Aufgabe übernimmt FHL2 in der RA im Hinblick auf die zentralen Prozesse der Matrixdegradation?
4. Lässt sich eine pathologische Relevanz von FHL2 in RA am Beispiel eines Tiermodells *in vivo* verifizieren?

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression von FHL2 in synovialem Gewebe und Primärkulturen synovialer Fibroblasten von RA-Patienten.

4.1.1 Die Lokalisation und Expression von FHL2 in synovialem Gewebe

Als erster Schritt sollte die Expression von FHL2 im rheumatoiden (RA) bzw. osteoarthritischen (OA) Gewebe analysiert werden. Dafür wurden Paraffinschnitte von synovialem Gewebe von jeweils zehn verschiedenen RA- bzw. OA-Patienten mit Hilfe der FHL2-spezifischen Antikörper F4B2 immunhistologisch gefärbt. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, zeigt sich im Vergleich zum OA-Patienten eine deutlich stärkere FHL2-Färbung im RA-Gewebe. Besonders auffällig ist hier, dass die Expression im Bereich der synovialen Deckzellschicht viel ausgeprägter ist als in tieferen Schichten der RA-Synovia. Im Vergleich dazu ist die Färbung im OA-Gewebe insgesamt schwächer ausgeprägt und beschränkt sich auf einen äußerst schmalen Rand in der Deckzellschicht sowie auf Blutgefäße, die das Synovialgewebe durchziehen (Abb.: 5).



Abb. 5: Im Synovium von RA-Patienten ist die FHL2-Expression stark erhöht. Paraffinschnitte von synovialem Gewebe aus insgesamt zehn RA- und OA-Patienten wurden mit den anti-FHL2-Antikörpern F4B2 immunhistologisch angefärbt (Abbildung zeigt repräsentative Färbungen) Die Zellkerne wurden mit Metylgrün gegengefärbt. Im Vergleich zum OA-Gewebe ist die prominente Färbung im RA-Gewebe, die mit der FHL2-Expression korreliert, sehr deutlich zu erkennen. Die Negativ-Kontrolle mit einem Isotyp-Antikörper unterstreicht die Spezifität der anti-FHL2 Färbung.

Diese Beobachtungen sind besonders interessant, da gezeigt werden konnte, dass aktivierte RASF in der Deckzellschicht, dem Lining, lokalisiert sind (Fassbender et al., 1998; Lafyatis et al., 1989) und von hier aus nach ihrer Aktivierung an der Knorpelmatrix anheften. Auf diese Weise vermitteln sie die Degradation der Knorpelmatrix (Müller-Ladner 1997; Müller-Ladner 1996). Die deutlich stärkere FHL2-Expression in inflammatorischem synovialen Gewebe korreliert darüber hinaus mit dem FHL2-Expressionsmuster während kutanen Wundheilung (Wixler et al., 2007). Hier kommt es nach Gewebeschädigungen zu einer signifikant erhöhten Expression von FHL2 in dermalen Fibroblasten.

Um zu untersuchen, ob die FHL2-Expression im Synovialgewebe *in vivo* durch die fortdauernde Stimulation von proinflammatorischer Zytokinen hochreguliert ist oder die FHL2-Überexpression auch ein Charakteristikum stabil aktivierter synovialer Fibroblasten ist, wurde die Expression von FHL2 in isolierten RASF analysiert.

4.1.2 Die Expression von FHL2 in Primärzellkulturen synovialer Fibroblasten

Um die FHL2-Expression in RASF bzw. OASF vergleichend analysieren zu können, wurden synoviale Fibroblasten von jeweils vier verschiedenen RA- und OA-Patienten isoliert und über vier Passagen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend im Westernblot und qRT-PCR analysiert. Zudem wurde die Proteinexpression im relativen Vergleich zur β -Aktin-Expression quantifiziert.

Auf Proteinebene ist die FHL2-Expression in RASF im Vergleich zu OASF auf das 2,23-fache erhöht (Abb.: 6-A). Für die Untersuchung der FHL2-Expression auf transkriptionaler Ebene wurden primäre synoviale Fibroblasten von vier verschiedenen RA- bzw. OA-Patienten in der qRT-PCR analysiert. Hier zeigte sich eine auf das 2,42-fache erhöhte FHL2-mRNA-Menge in RASF relativ zur Expression in OASF (Abb.:6-B). Diese Analysen unterstreichen die Beobachtungen aus der Histologie und belegen darüber hinaus, dass die FHL2-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hochreguliert ist. Analog zur Histologie konnte interessanterweise in den Westernblot-Analysen beobachtet werden, dass die FHL2-Expression in RASF verschiedener Patienten deutlich variiert, aber die FHL2-Expression im Vergleich zu OA-Patienten generell stark erhöht ist (Abb.: 7).

Aus diesen Ergebnissen lassen sich vier Aussagen über das FHL2-Expressionsmuster in RA treffen. (1.) Im synovialen Gewebe von RA Patienten kommt es zu einer deutlich gesteigerten FHL2 Expression, welche besonders in der synovialen Deckzellschicht zu beobachten ist. Dabei kann (2.) die Stärke der FHL2-Expression in verschiedenen RA-Patienten variieren. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass die Ausprägung der Rheumatoiden Arthritis von

Patient zu Patient variieren kann (Pap et al., 2000). (3.) Die Überexpression von FHL2 im Synovium in den RASF ist auch während der *in vitro*-Kultivierung zu sehen und kann im Zusammenhang mit dem aktivierten Phänotyp der RASF stehen. (4.) Die Überexpression von FHL2 zeigt sich sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene sehr deutlich.

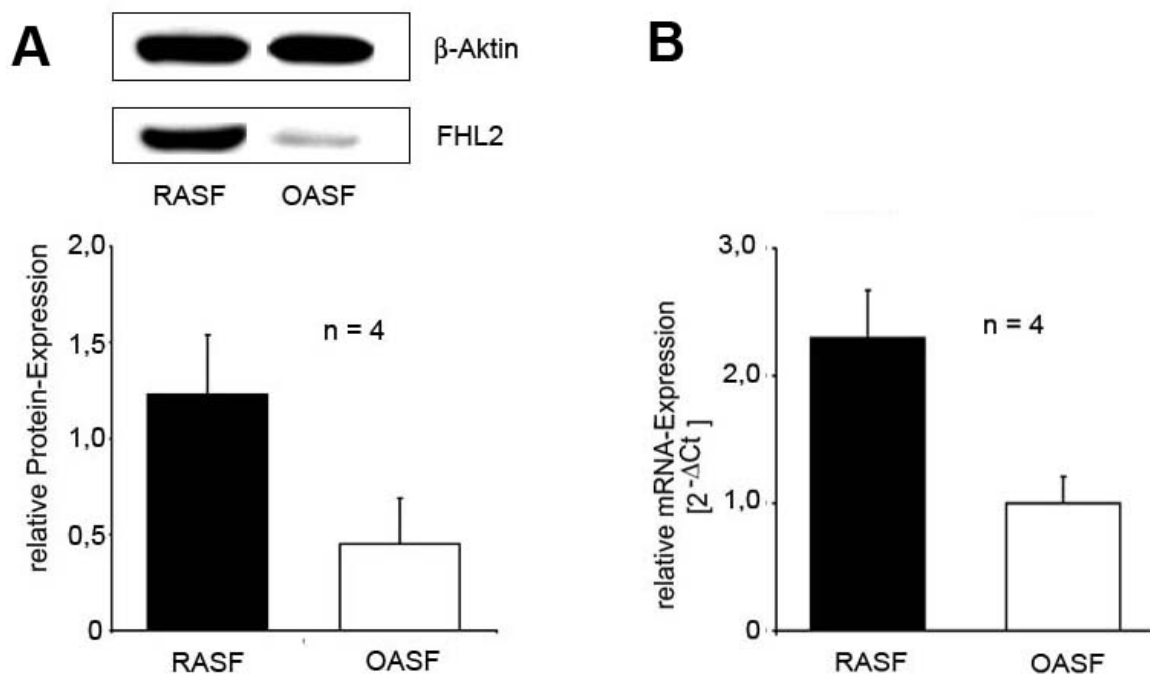


Abb. 6: Erhöhte FHL2-Expression in RASF auf transkriptionaler und Proteinebene. RASF von vier verschiedenen RA- und OA-Patienten wurden lysiert und analysiert. (A): Für den Nachweis der Expression auf Proteinebene wurden Gesamtzelllysate in einem 10%igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem monoklonalen anti-Maus-Antikörper F4B2 detektiert. Die Proteinexpression wurde im relativen Vergleich zur β -Aktin-Expression quantifiziert. (B): Die Expression auf transkriptionaler Ebene wurde in der qRT-PCR bestimmt. Die relative Expression wurde nach 40 Amplifikationszyklen mit der von GAPDH verglichen

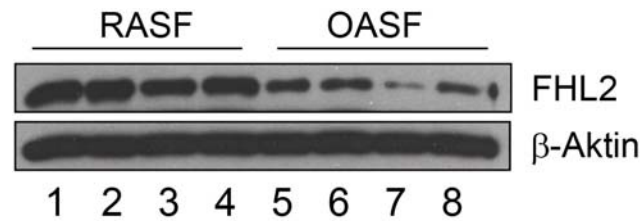


Abb. 7: Die FHL2-Expression variiert zwischen verschiedenen RA-Patienten. Gesamtzelllysate verschiedener RA und OA-Patienten (jeweils $n = 4$) wurden in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörper F4B2 detektiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (Spur 1-4 = RASF; Spur 5-8 = OASF)

4.2 Proinflammatorische Zytokine steuern die FHL2-Expression

Die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 sind zentrale Zytokine in der RA. Sie sind Mediatoren der chronischen Inflammation, aktivieren synoviale Fibroblasten und stimulieren die Expression von MMPs (Takemura et al., 2001; Zwerina et al., 2007). Im Zusammenhang mit der erhöhten FHL2-Expression im RA-Gewebe stellt sich nun die Frage, ob $\text{TNF}\alpha$ bzw. IL-1 diese Hochregulation induzieren.

4.2.1 Inflammatorische Zytokine hemmen die FHL2-Expression

Um den Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 auf die FHL2-Expression zu untersuchen, wurden RASF unter Standardbedingungen kultiviert und über insgesamt 72 Stunden mit rekombinantem, humanen $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) bzw. rekombinantem humanen IL-1 β (100 ng/ml) stimuliert. Nach jeweils 24 Stunden wurde ein Teil der Zellen lysiert und die FHL2-Expression mittels Westernblot bzw. qRT-PCR analysiert. Abbildung 8-A zeigt einen repräsentativen Versuch, der belegt, dass die Stimulation der RASF mit $\text{TNF}\alpha$ überraschenderweise eine hemmende Wirkung auf die FHL2-Expression auf mRNA-Ebene in RASF hat. So nimmt die relative Expression von FHL2 bereits 24 Stunden nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ um 50 % ab. Gegensatz zu unstimulierten Zellen zeigt sich nach 48 Stunden eine Abnahme um 60 % und nach 72 Stunden eine Abnahme der FHL2-Expression um 70 %. In den unstimulierten Zellen zeigt sich keine Reduktion der FHL2 Expression. In den Westernblot-Analysen (Abb.: 8-B) ist zu erkennen, dass die FHL2-Menge nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation bereits nach 24 Stunden abnimmt. Diese Abnahme in der Proteinmenge setzt sich mit weiterführender Stimulation deutlich fort, so dass nach 72 Stunden kaum noch FHL2-Protein im Westernblot nachgewiesen werden konnte.

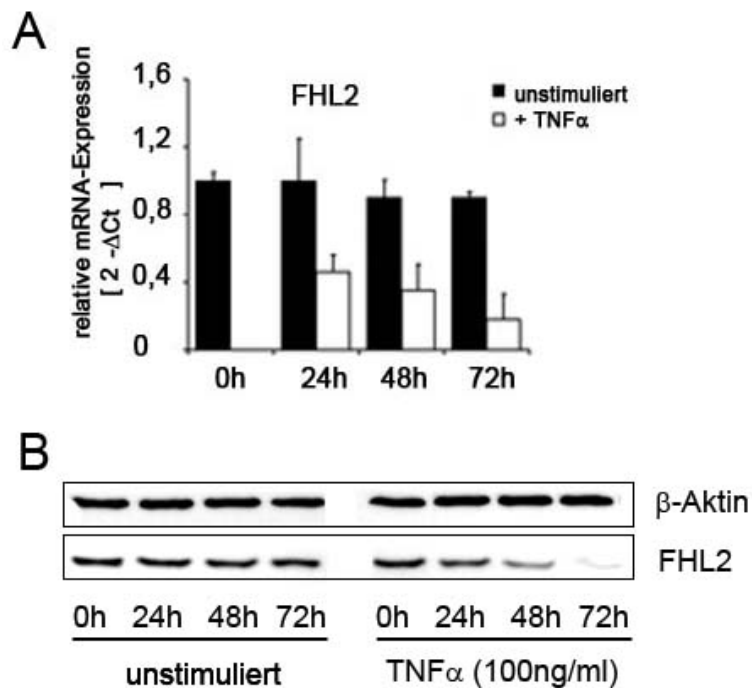


Abb. 8: TNF α hemmt die FHL2-Expression. RASF wurden mit TNF α (100 ng/ml) über insgesamt 72 Stunden stimuliert und die Expression von FHL2 nach 0, 24, 48 und 72 Stunden analysiert. (A) qRT-PCR: Die Expression auf transkriptionaler Ebene wurde mittels qRT-PCR im relativen Vergleich zur GAPDH-Expression analysiert. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der FHL2-Expression mit fortdauernder TNF α -Stimulation. (B) Westernblot-Analyse: Gesamtzelllysate der stimulierten bzw. unstimulierten RASF wurden in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörper F4B2 detektiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Auch auf Proteinebene zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme des FHL2 bei fortdauernder TNF α -Stimulation.

Die Stimulation von RASF mit IL-1 zeigt einen ähnlichen, allerdings nicht so stark ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die FHL2-Expression. Nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 nimmt die FHL2-Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen um 30% ab. Nach 48 Stunden beträgt die FHL2 Menge noch 50% und nach 72 Stunden nur noch 20% der Expression in nicht-stimulierten Zellen (Abb.: 9-A und -B).

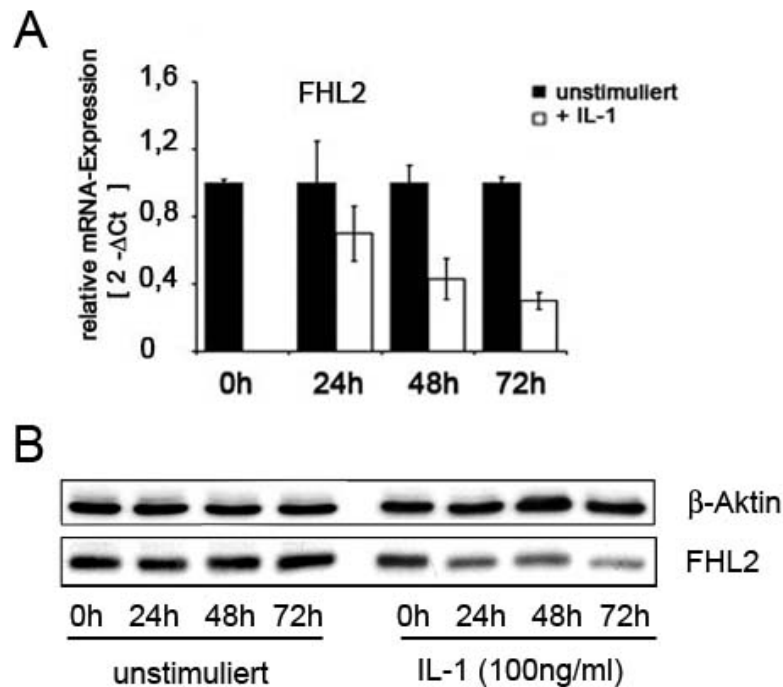


Abb. 9: Auch IL-1 inhibiert die FHL2-Expression. RASF wurden mit IL-1 (100 ng/ml) über insgesamt 72 Stunden stimuliert und die FHL2 Expression nach 0, 24, 48 und 72 Stunden analysiert. (A) pRT-PCR: Die FHL2 Expression auf transkriptionaler Ebene wurde mittels qRT-PCR im relativen Vergleich zur GAPDH-Expression analysiert. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der FHL2-Expression auf mRNA-Ebene bei fortdauernder IL-1-Stimulation. (B) Westernblot-Analyse: Gesamtzelllysate der stimulierten bzw. unstimulierten RASF wurden in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörper F4B2 detektiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Auch auf Proteinebene ist die IL-1-induzierte Hemmung von FHL2 zu beobachten.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass proinflammatorische Zytokine die Expression von FHL2 sowohl auf mRNA- als auch in der Proteinebene hemmen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den eingangs gezeigten histologischen Analysen. Eine weitere und in diesem Kontext sehr interessante und wichtige Beobachtung ist, dass die Hemmung der FHL2 Expression durch TNF α sowohl auf der mRNA-Ebene, als auch auf der Proteinebene in den

verschiedenen RASF variiert (Anhang 8.1: Abb.: A1). Dies kann, wie auch schon an anderer Stelle beschrieben, auf die von Patient zu Patient variierende Ausprägung der RA zurückgeführt werden (Pap et al., 2000) was sich darüber hinaus auch auf die funktionalen Eigenschaften der RASF auswirken kann.

4.2.2 TNF α induziert ein 20 kDa großes FHL2-Fragment

Die Westernblot-Analysen der TNF α -stimulierten RASF zeigten noch ein weiteres Ergebnis. Bei der Detektion von FHL2 mit einem N-terminal gerichteten FHL2-Antikörper (F4B2) zeigte sich nach der Stimulation mit TNF α eine weitere distinkte Proteinbande von ca. 20 kDa. Diese Bande nimmt bereits nach 24-stündiger TNF α -Stimulation deutlich zu, während die 32 kDa-Proteinbande, die dem monomeren FHL2-Protein entspricht, abnimmt (Abb.: 10). Überraschend ist in dieser Hinsicht, dass, je deutlicher der hemmende Effekt von TNF α auf das FHL2-Protein zu sehen ist, desto stärker sich die Zunahme der, von dem mAB F4B2 detektierten, 20 kDa Bande zeigte. Genauer gesagt, je deutlicher die Abnahme der endogenen FHL2-Bande, desto stärker die Zunahme des N-terminalen Peptids. Um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um eine Abspaltung des C-terminalen Bereichs handelt, wurde das FHL2-Protein mit einem C-terminal gerichteten FHL2-spezifischen Antikörper, der die dritte LIM-Domäne erkennt, detektiert. Überraschenderweise konnte dieses 20 kDa-Fragment hier nicht nachgewiesen werden, was eine N-terminale Herkunft des Fragments unterstützt (Abb.: 10). Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem 20 kDa-Fragment möglicherweise um eine Splicing-Variante des FHL2 handelt, wurden RASF von verschiedenen RA-Patienten unter Standardbedingungen kultiviert und über 24 Stunden mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA überführt, um die Expression einer möglichen Splicing-Variante nachzuweisen. In der anschließenden PCR wurden FHL2-spezifische Primer eingesetzt, die es ermöglichten, die FHL2-mRNA-Sequenz partiell zu amplifizieren. Abbildung 11 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Fragmente in einem Agarose-Gel. Deutlich zu erkennen sind die amplifizierten Fragmente jeder einzelnen LIM-Domäne, die sowohl in den TNF α -stimulierten, als auch in unstimulierten RASF gleichsam nachgewiesen werden konnten. Die Analyse zeigt zum einen, dass kein zusätzliches Fragment amplifiziert wurde und zum anderen, dass auch in den stimulierten RASF kein Fragment fehlt, was einen Hinweis auf eine Splicingvariante geben könnte.

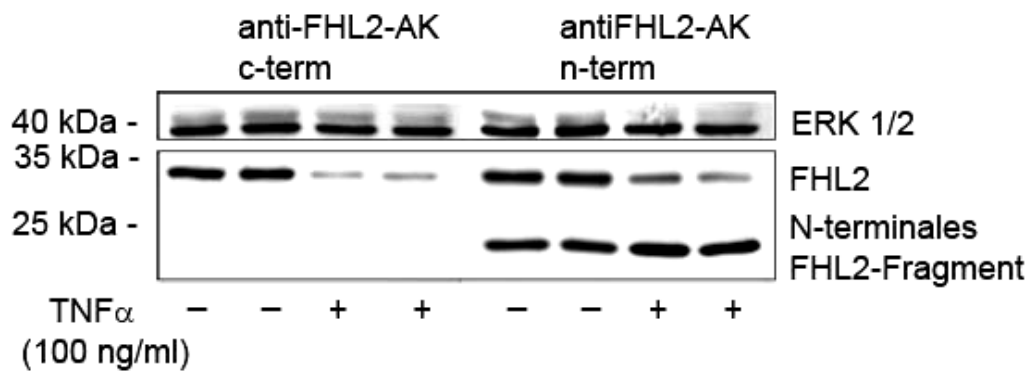


Abb. 10: Nach TNF α -Stimulation entsteht ein N-terminales Fragment. RASF (n = 2) wurden für insgesamt 48 Stunden in DMEM mit 10 % FKS kultiviert und mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden in Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Gesamtzelllysate in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörper (C-term; linke Seite) bzw. F4B2 (N-term; rechte Seite) detektiert. ERK1/2 wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Westernblot-Analyse der Zelllysate zeigt, dass es zu einer TNF α -induzierten Abnahme des 32 kDa FHL2-Monomers kommt. Die TNF α -induzierte Zunahme der 20 KDa-Fragmente kann allerdings nur mit dem N-terminalgerichteten Antikörper detektiert werden.

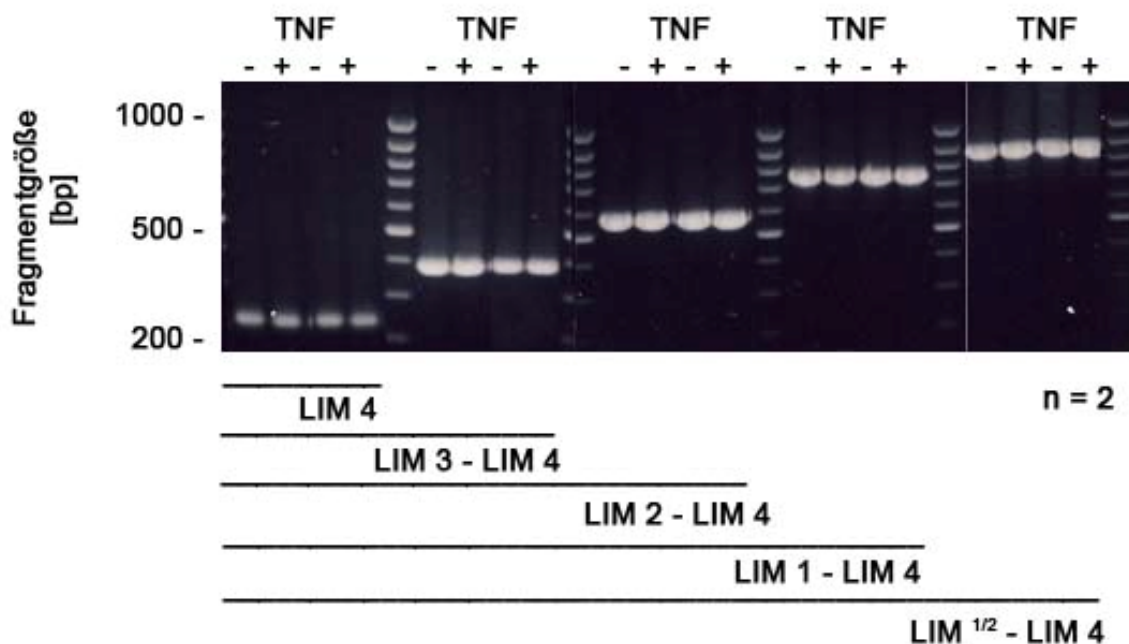


Abb.: 11: Die Analyse der FHL2 mRNA zeigt keinen Hinweis auf mögliche Splicing-Varianten des Gens. PCR-Analysen: RASF von zwei verschiedenen RA-Patienten wurden isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in RLT-Puffer aufgeschlossen, die Gesamt-mRNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die Sequenzen wurden mit spezifischen Primern in der PCR amplifiziert und in einem 1,5% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Aus dieser Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass es sich hier um ein N-terminales FHL2-Fragment handelt, welches sich als eine distinkte Bande im Westernblot detektieren lässt. Dies wiederum stützt die Vermutung, dass es sich um eine Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren von FHL2 handeln könnte. Diese These wird auch durch die PCR-Analysen unterstützt, in denen sich keine alternativen „Splicingvarianten“ von FHL2 mRNA nachweisen ließen (Abb.: 11). Genauen Aufschluss könnte hier allerdings nur eine „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation“ (MALDI)-Analyse geben. Dennoch ist diese Beobachtung für das Verständnis der Funktion von FHL2 in TNF α -induzierten Signalwegen sehr wichtig und wird in dieser Arbeit noch an anderer Stelle ausführlicher diskutiert

4.2.3 TGF β induziert die FHL2-Expression in RASF

Die Beobachtung, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 die Hemmung der FHL2-Expression induzieren, ist überraschend und wirft die Frage auf, was zur Expressionszunahme des FHL2 während der RA führt. Möglicherweise sind es profibrotische Zytokine, die die Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten fördern. In dermalen Fibroblasten ist im Zuge der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten während der Wundheilungsprozesse eine transient gesteigerte FHL2-Expression zu beobachten (Wixler et al., 2007). In Studien zu Heilungsprozessen des Knorpelgewebes während der Osteoarthritis wurde TGF β als zentrales Zytokin identifiziert, welches den Aufbau der ECM stimulieren kann (Blaney et al., 2006). Es ist seit längerem bekannt, dass TGF β die Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglycanen, den wesentlichen Komponenten der cartilaginären ECM, stimuliert (Glansbeek et al., 1998). Gleichzeitig wird die Expression verschiedener matrix-degradierender Enzyme gehemmt (Edwards et al., 1987). Darüber hinaus haben Experimente mit induzierter Arthritis in Mäusen gezeigt, dass die Applikation von TGF β den Verlust des Proteoglykans und somit die Degradation der ECM verhindert (Glansbeek et al., 1998).

Basierend auf diesen Studien ergab sich die Hypothese, dass TGF β ein möglicher Kandidat sein kann, der Heilungsprozesse induziert, in deren Verlauf es auch zu einem Anstieg der FHL2-Expression kommt. Zur Verifikation dieser Hypothese wurden Primärkulturen von RASF (1×10^6 Zellen/ 6 cm-Schale) über einen Zeitraum von 72 Stunden mit TGF β (50 ng/ml) stimuliert. Nach jeweils 24 Stunden wurde ein Teil der Zellen lysiert und die FHL2-Expression mittels Westernblot bzw. qRT-PCR ausgewertet. Die Westernblot-Analyse zeigte eine kontinuierliche Zunahme der FHL2-Expression während der TGF β Stimulation über 72 Stunden. Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchungen in der qRT-PCR unterstützt, die nach 72 Stunden eine Zunahme der FHL2-mRNA-Menge auf das vierfache zeigen (Abb.: 12-A und -B). So konnte im Rahmen dieser Experimente nachgewiesen werden, dass TGF β über den Aufbau der ECM (Blaney et al., 2006) hinaus auch die Expression von FHL2 induzieren kann.

Zusammenfassend lassen sich aus den beschriebenen Experimenten folgende Schlussfolgerungen ableiten: (1.) Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 haben einen deutlich hemmenden Effekt auf die FHL2-Expression in RASF. (2.) TNF α induziert möglicherweise die N-terminale Spaltung des FHL2-Proteins. (3.) TGF β hingegen ist ein starker Induktor der FHL2-Expression.

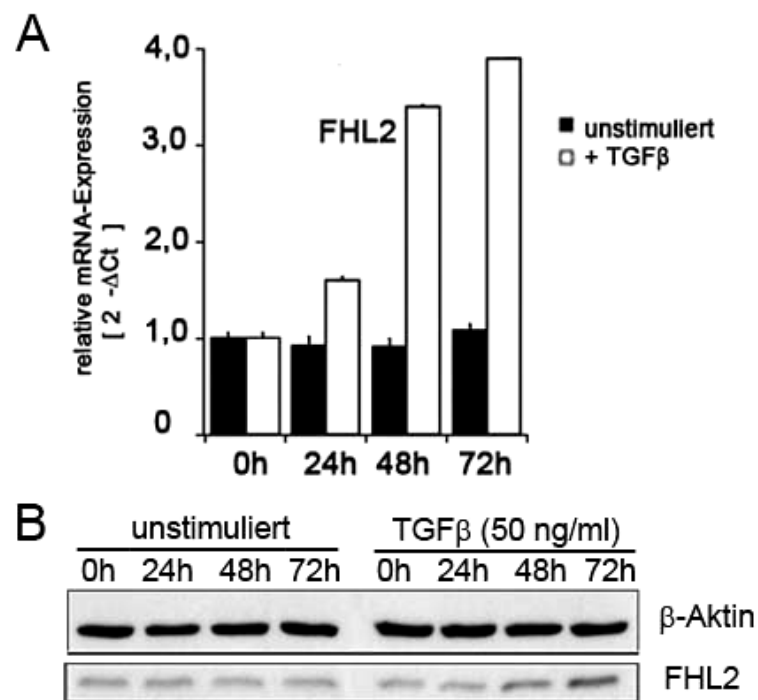


Abb. 12: TGFβ induziert die FHL2-Expression. RASF wurden mit TGFβ (50 ng/ml) in DMEM-Medium mit 10% FKS über insgesamt 72 Stunden stimuliert. (A): qRT-PCR: RASF wurden in RLT-Puffer aufgeschlossen, die Gesamt-mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative Expression von FHL2 wurde im Vergleich zur GAPDH-Expression analysiert. Im Vergleich zu unstimulierten RASF zeigt sich eine deutliche Zunahme der FHL2 mRNA-Menge nach Stimulation mit TGFβ (B): Westernblot-Analyse: RASF wurden in Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Gesamtzelllysate in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die FHL2 Expression wurde mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörper F4B2 detektiert. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Analysen auf Proteinebene zeigen ebenfalls eine Zunahme der FHL2-Expression nach Stimulation mit TGFβ.

4.3 Die FHL2-Expression im Verlauf der destruktiven Arthritis in der hTNFtg-Maus

Die Suppression von FHL2 in RASF nach Stimulation mit TNF α und IL-1 war unerwartet und zugleich überraschend, da sie im Widerspruch zu unseren Expressionsdaten im RA synovialen Gewebe steht. Um in diesem Zusammenhang die Frage nach der FHL2-Expression im Krankheitsverlauf untersuchen zu können, wurde das hTNFtg-Maus-Modell zur Hilfe genommen.

Das von Keffer und Kollegen entwickelte hTNFtg-Mausmodell basiert auf einem 3'-modifizierten humanen TNF α -Genkonstrukt, welches in die Keimzellen einer Wildtyp-Mauslinie eingebracht wurde. Da die für die Regulation des hTNF-Gens wichtige 3'-Sequenz fehlt, kommt es zu einer starken Zunahme der Expression des hTNF-Gens. Die hTNFtg-Maus zeigt ein dereguliertes Muster der hTNF-Gen-Expression in allen somatischen Zellen. In Folge dessen kommt es bereits wenige Wochen nach der Geburt zur Ausbildung einer chronischen inflammatorischen Polyarthritits (Keffer et al., 1991). Die hTNFtg-Maus entwickelt schon vier Wochen nach der Geburt erste inflammatorische Reaktionen, in deren Folge es zu einer starken, entzündungsbedingten Schwellung an den vorderen Extremitäten kommt. In der sechsten Woche lassen sich bereits erste histologische Anzeichen einer Knorpeldestruktion in den distalen Gelenken manifestieren, die sich in den folgenden Wochen deutlich und sehr umfangreich ausprägen. Mit fortschreitendem Alter der Mäuse kommt es dann zu einer zunehmenden Immobilität, die mit der Ausprägung schwerer Knorpeldestruktionen einhergeht. Nach ungefähr 16 Wochen sinkt die Überlebensrate dieser Mäuse signifikant ab und es zeigt sich eine vollständige Zerstörung der Gelenke. Aufgrund des kurzen Lebenszyklus sowie der stabilen systemischen TNF α -Spiegel bietet dieser Modellorganismus die Möglichkeit, spezifische Fragestellungen im Verlauf der RA beispielhaft zu untersuchen.

4.3.1 FHL2-Expression in synovialen Fibroblasten des hTNFtg-Mausmodells

Da hTNFtg-Mäuse systemisch erhöhte TNF α -Spiegel aufweisen, sollte untersucht werden, ob die FHL2-Expression auch in synovialen Fibroblasten dieser Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöht ist. Dafür wurden synoviale Fibroblasten aus den Knie- und Fußgelenken von zwei verschiedenen hTNFtg bzw. Wildtyp-Mäusen isoliert und in Kultur genommen. Die FHL2-Expression wurde im Westernblot analysiert.

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass synoviale Fibroblasten der hTNFtg-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ca. 2,3 fach höhere FHL2-Mengen exprimieren.

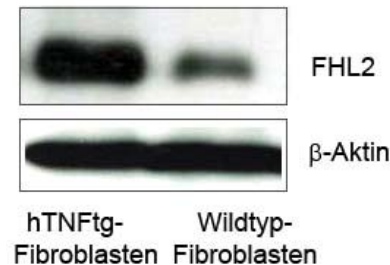


Abb. 13: Die FHL2-Expression ist in synovialen Fibroblasten der hTNFtg-Maus erhöht. Synoviale Fibroblasten aus hTNFtg-Mäusen bzw. Wildtyp-Mäusen wurden isoliert und in DMEM mit 10 % FKS kultiviert. Gesamtystrate dieser Zellen wurden in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem anti-FHL2-Antikörper F2B4 detektiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Westernblot-Analyse zeigt eine deutliche Erhöhung der FHL2-Proteinmenge in synovialen Fibroblasten der hTNFtg-Maus im Vergleich zu Fibroblasten der Wildtypmäusen.

4.3.2 Die FHL2-Expression im Verlauf der destruktiven Arthritis ist transient

Mit der freundlichen Unterstützung von Birgit Niederreiter (im Labor von Prof. Dr. Kurt Redlich an der Universitätsklinik für Innere Medizin Abt. Rheumatologie unter der Leitung von Prof. Dr. Josef Smolen, Wien/ Österreich) war es mir möglich die FHL2-Expression im Verlauf der destruktiven Arthritis in der hTNFtg-Maus zu analysieren. Dafür wurden Paraffinschnitte von Sprunggelenken von jeweils vier Tieren im Alter von 2-, 4-, 6-, 8-, 10-, 12-, und 14-Wochen mit FHL2-spezifischen Antikörpern gefärbt und von mir quantitativ analysiert. Die Auswertung der histologischen Färbungen zeigte, dass die FHL2-Expression bis zur 6. Woche postnatal deutlich zunimmt und hier ein Maximum erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist die FHL2-Expression im Vergleich zum Wildtyp auf mehr als das Siebenfache erhöht (Abb.: 14). Nach der sechsten Lebenswoche nimmt die sie stark ab, bleibt dann aber bis zur 14. Woche auf einem stabilen Level. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist die FHL2-Expression in den hTNFtg-Mäusen zu diesem Zeitpunkt immer noch deutlich erhöht, und eine ausgeprägte klinische Symptomatik sowie deutliche Gelenkdestruktionen in histologischen Analysen sind zu erkennen.

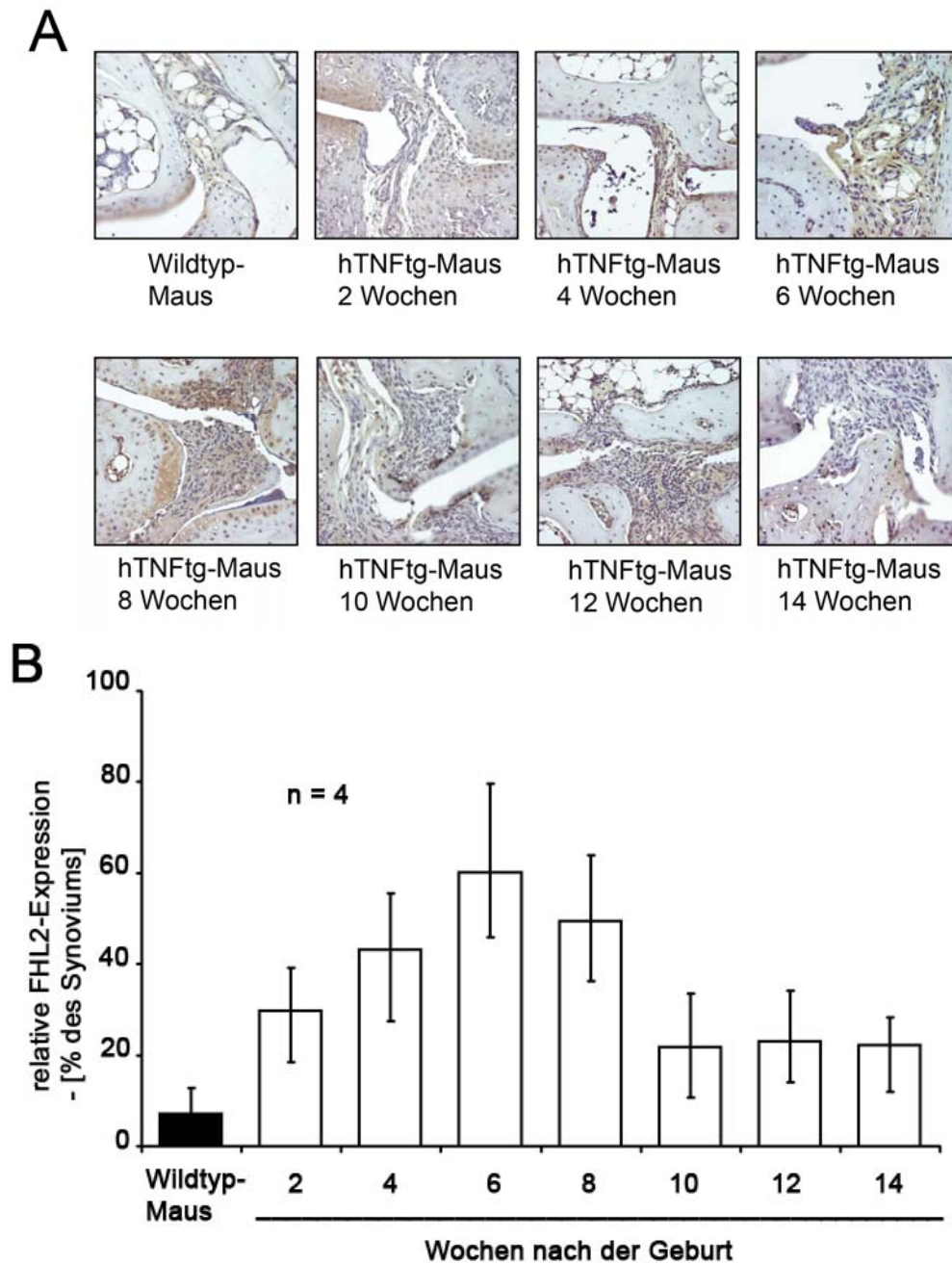


Abb. 14: Transiente FHL2-Expression in der hTNFtg-Maus. (A): Immunhistologische Färbung: Paraffinschnitte der Sprunggelenke von jeweils 4 hTNFtg- und Wildtyp-Mäusen wurden mit einem polyklonalen anti-FHL2-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün gegengefärbt (repräsentative Bilder der Färbungen). (B): Quantifizierung: Die prozentuale Färbung des Synoviums in den Sprunggelenken wurde in jeweils vier hTNFtg-Mäusen in verschiedenen Altersstufen bestimmt. Die Quantifizierung der FHL2-spezifischen Färbung im synovialen Gewebe zeigt eine deutliche Zunahme der FHL2-spezifischen Färbung von der zweiten bis zur sechsten Woche. In der achten Woche nimmt die Färbung deutlich ab und bleibt von der zehnten bis zur 14. Woche gleichmäßig ausgeprägt, im Vergleich zum Wildtyp-Maus allerdings deutlich erhöht.

Die gesteigerte FHL2-Expression im Synovium ist also im Verlauf einer TNF α -induzierten destruktiven Arthritis transient, wobei das Expressions-Maximum deutlich vor einer klinischen Manifestation der Krankheit erreicht wird. Letzteres korreliert mit Beobachtungen in Wundheilungsprozessen. Hier kommt es in dermalen Fibroblasten und Myoblasten nach Gewebeschädigungen zu einer signifikanten Zunahme der FHL2-Expression, die ebenfalls transient ist und zur Heilung der Wunde beiträgt (Wixler et al., 2007). Auch in der RA kommt es zu Wundheilungsprozessen, die allerdings in den fortgeschrittenen und zunehmend chronifizierten Stadien der RA unterbunden werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine chronische Exposition der RASF zu proinflammatorischen Zytokinen die FHL2-Expression hemmt und den Heilungsprozess somit blockiert.

4.3.3 Eine Hemmung der TNF α -Stimulation führt zu gesteigerter FHL2 Expression.

Die vorangegangenen Studien haben herausgestellt, dass es in frühen inflammatorischen Stadien zu einer deutlichen Induktion der FHL2-Expression kommt, die jedoch im Fortgang der Chronifizierungsprozesse sowie durch lang anhaltende Exposition proinflammatorischer Zytokine gehemmt wird.

Die Hypothese, dass FHL2 einen anti-arthritischen bzw. heilungsunterstützenden Effekt hat, legt die Vermutung nahe, dass eine anti-TNF α -Behandlung nicht nur die synoviale Inflammation verbessern sowie das Fortschreiten der RA unterbinden würde, sondern vielmehr auch die Induktion von FHL2 stimuliert. Die Blockierung des TNF α -Signalwegs mit Hilfe von TNF α -Rezeptor-Analoga bzw. TNF α -Antikörper, die das TNF α binden, sind derzeit die effektivsten Therapieansätze in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie RA. Auch in der hTNFtg-Maus führt die Applikation eines anti-hTNF Antikörpers zu einer vollständigen Unterdrückung der destruktiven Arthritis. (Keffler et al., 1991). In verschiedenen Therapieversuchen, sowohl in der Arbeitsgruppe von Kurt Redlich als auch in unserer eigenen Arbeitsgruppe, hat sich gezeigt, dass Infliximab (Remicade, Essex-Pharma), ein chimärer monoklonaler TNF α -spezifischer Antikörper, besonders wirksam in der Behandlung der destruktiven Arthritis in diesen Mäusen ist.

Um zu untersuchen, ob eine anti-TNF α -Behandlung die FHL2-Suppression aufhebt, wurden jeweils zwei hTNFtg-Mäuse im Alter von vier Wochen über einen Zeitraum von sieben Wochen hinweg zweimal wöchentlich intra-peritoneale mit Infliximab-Injektionen (100 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Anschließend wurden die Hinterpfoten dieser Mäuse präpariert, die FHL2-Expression auf immunhistologischer Ebene quantifiziert und mit der von unbehandelten hTNFtg-Mäusen verglichen (Die histologischen Färbungen wurden im Labor

von Prof. Dr. Kurt Redlich und Prof. Dr. Josef Smolen von Birgit Niederreiter in Wien durchgeführt und vom Dissertanten in Münster ausgewertet). Im Vergleich zu unbehandelten hTNFtg-Mäusen zeigte die Analyse der anti-TNF α -behandelten Tiere eine deutlich erhöhte FHL2-Expression in der synovialen Membran (Abb.: 15-A). Eine Quantifizierung der Expression, bezogen auf die Intensität der Färbung des Synoviums zeigt, dass die FHL2-Expression nach der anti-TNF α -Behandlung um das Doppelte anstieg (Abb.: 15-B).

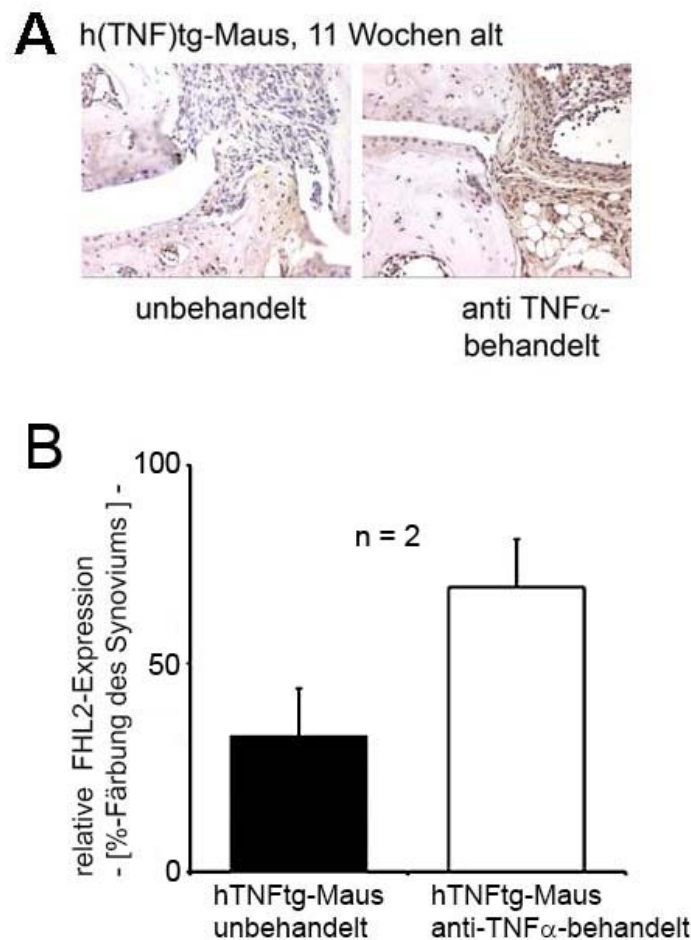


Abb. 15: Eine anti-TNF α -Behandlung induziert FHL2-Expression. hTNFtg-Mäuse (n = 2) wurden vier Wochen nach Geburt i.p. mit Infliximab (100 mg/kg) bzw. PBS über sieben Wochen hinweg behandelt. (A): immunhistologische Färbung: FHL2 wurde in Paraffinschnitten von Sprunggelenken von jeweils zwei 11-Wochen alten hTNFtg-Mäusen mit einem polyklonalen anti-FHL2-Antikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün gegengefärbt. (B): Quantifizierung: Die prozentuale Färbung des Synoviums in den Sprunggelenken wurde in jeweils 2 hTNFtg-Mäusen bestimmt.

Mit Bezug auf diese Ergebnisse stellte sich nun die Frage, ob eine anti-TNF α -Therapie in RA-Patienten einen ähnlichen Effekt zeigen würde. Mit der freundlichen Unterstützung von Prof. Dr. Paul-Peter Tak und Prof. Dr. Dominique Baeten (Academic Medical Centre Amsterdam /Niederlande), die Gefrierschnitte von RA-Patienten zur Verfügung stellten, ergab sich die Möglichkeit, die FHL2-Expression an arthroskopischer Biopsien von insgesamt acht RA-Patienten vor und vier Wochen nach anti-TNF α -Behandlung zu analysieren und zu quantifizieren. Die Auswertung der histologischen Färbungen bestätigte den in hTNFtg-Mäusen zuvor beobachteten Trend. Auch hier führte die vierwöchige anti-TNF α -Behandlung zu einer deutlichen Induktion von FHL2 (Abb.: 16-A).

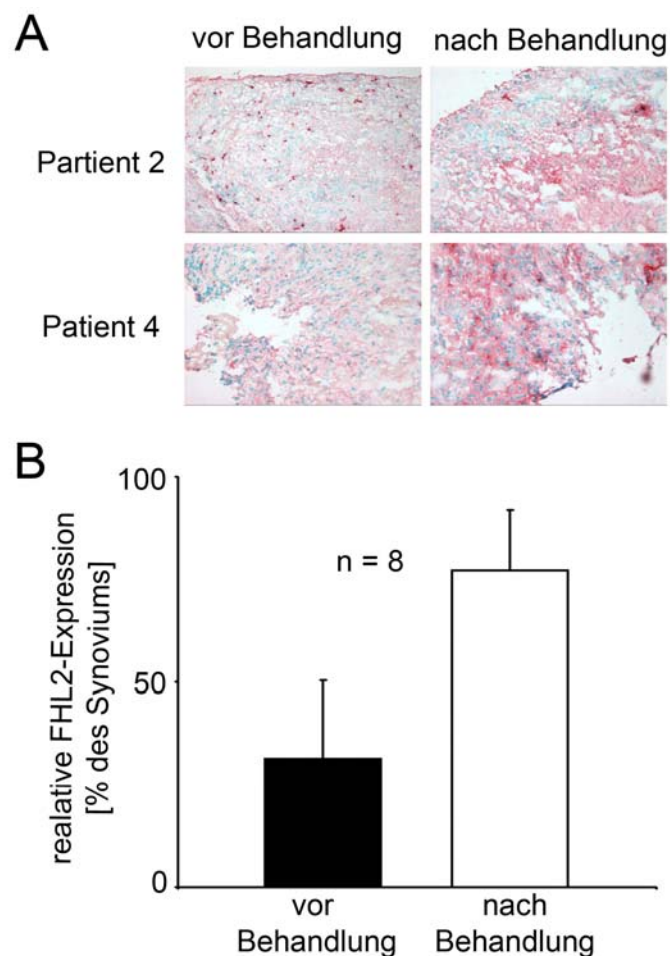


Abb. 16: Eine anti-TNF α -Behandlung induziert FHL2-Expression auch in RA-Patienten. RA-Patienten (n = 8) wurden vor bzw. vier Wochen nach anti-TNF α -Behandlung biopsiert. (A): Immunhistologische Färbung: FHL2 wurde in Gefrierschnitten von synovialen Gewebe dieser Patienten vor und nach der anti-TNF α -Behandlung mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörpern F2B4 detektiert, die Zellkerne wurden mit Metylgrün gegengefärbt. (B): Quantifizierung der relativen FHL2-spezifischen Färbung: Die Bestimmung basiert auf der prozentualen Färbung der Gesamtfläche vor und nach der Behandlung.

Im Vergleich zu den Beobachtungen in der hTNFtg-Maus zeigte sich in der quantitativen Analyse der Biopsien der RA Patienten jedoch eine große Streuung. Von acht analysierten Patienten hat einer nicht mit FHL2-Induktion auf die anti-TNF α -Behandlung reagiert, wohingegen alle anderen Patienten eine Induktion auf das 1,5- bis 10-fache zeigten (Abb.: 16-B). Dieser Unterschied zu der Maus lässt sich womöglich dadurch erklären, dass die hTNFtg-Maus den gleichen Genotyp sowie einen nahezu konstanten systemischen TNF α -Level haben, wohingegen die systemische Konzentration in den genetisch heterogenen RA-Patienten je nach Stadium der RA deutlich variieren kann (Pap et al., 2000).

4.4 Die FHL2-Defizienz führt zu einer anhaltenden Aktivierung von p38-MAPK

Die genauen Zusammenhänge der Signalwege, über die TNF α die Knorpeldestruktion vermittelt, sind bis heute nicht vollständig verstanden. Es gilt jedoch als gesichert, dass TNF α ein zentraler Aktivator von MAP-Kinasen ist und ferner, dass im RA-Synovium alle drei MAP-Kinasen aktiviert sind (Sundarrajan et al., 2003). Im Zusammenhang mit RA wird des weiteren p38-MAPK eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der TNF α -Stimulation in mesenchymalen Zellen zugesprochen (Suzuki et al., 2000). Am Beispiel des hTNFtg-Maus-Modells konnte ferner gezeigt werden, dass die Blockierung von TNF α durch spezifische Antikörper die Aktivierung von p38-MAPK, aber auch ERK, in der synovialen Membran signifikant reduziert (Goertz et al., 2005; vgl. auch Meyer and Pap, 2005). Zudem unterstreichen Studien in menschlichen Chondrozyten, dass die p38-MAPK ausschlaggebend für die Aktivierung von MMP-13 ist (Mengshol et al., 2000).

4.4.1 FHL2 kolokalisiert mit phospho-p38-MAPK im Nukleus nach TNF α -Stimulation

Die wichtige Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellt, ist, was mit FHL2 kurz nach der Stimulation von RASF mit TNF α passiert. Zur Beantwortung dieser Frage wurden RASF in 24-Loch-Schalen auf Deckgläschen ausplattiert und in Standardmedium für ca. zwölf Stunden kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit TNF α (100ng/ml) stimuliert. Nach jeweils 0, 60 und 120 Minuten wurden die stimulierten RASF mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und das FHL2-Protein und das Phospho-p38-MAPK mit spezifischen Antikörpern und mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert. (vgl. auch Meyer et al., 2008 in Revision).

In unstimulierten RASF ist FHL2 in peripher gelegenen fokalen Kontakten lokalisiert. Die Stimulation mit TNF α führt bereits nach 60 Minuten zu einer fast vollständigen Translokation des FHL2 in den Nukleus (Abb.: 17). Interessant ist, dass zu diesem Zeitpunkt das FHL2 kaum mit den fokalen Kontakten assoziiert ist. Nach 120 Minuten TNF α -Stimulation ist überraschenderweise kaum FHL2-Protein im Zellkern zu finden. Vielmehr ist wieder eine verstärkte Lokalisation in den fokalen Kontakten sowie eine diffuse Verteilung des FHL2 im Zytosol zu beobachten. Eine Gegenfärbung auf die phosphorylierte Form des Proteins p38 (p-p38) zeigt, dass dieses Protein in unstimulierten RASF ebenfalls mit den fokalen Kontakten assoziiert ist und zu einer TNF α -induzierten Translokation von Phospho-p38 in den Nukleus kommt. Parallel zu den Beobachtungen bei FHL2 ist auch das phosphorylierte p38 nach 120 Minuten TNF α -Stimulation im Nukleus nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse sind

überaus interessant und weisen darauf hin, dass TNF α die Translokation von FHL2 in den Nukleus steuert und es ferner zu einer Kolokalisation von FHL2 mit der phosphorylierten Form von p38 im Nukleus kommt. Hier wurde erstmals gezeigt, dass TNF α einen direkten Einfluss auf die Translokation von FHL2 aus den fokalen Kontakten in den Nukleus hat. Die Kolokalisation von FHL2 mit Phospho-p38 im Nukleus gibt darüber hinaus erste Hinweise auf eine mögliche Verbindung zwischen FHL2 und der TNF α -induzierten Transkription RA-relevanter Gene, wie beispielsweise MMPs.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach TNF α -Stimulation FHL2 mit phosphoryliertem pP38-MAPK in den Nukleus migriert und unterstreichen gleichzeitig eine regulatorische Funktion von FHL2 im p38-MAPK-Signalweg. Ferner legt dies auch die Vermutung nahe, dass FHL2 in diesem Zusammenhang eine Rolle in der Expression von MMPs spielen könnte, was im Folgenden untersucht werden soll.

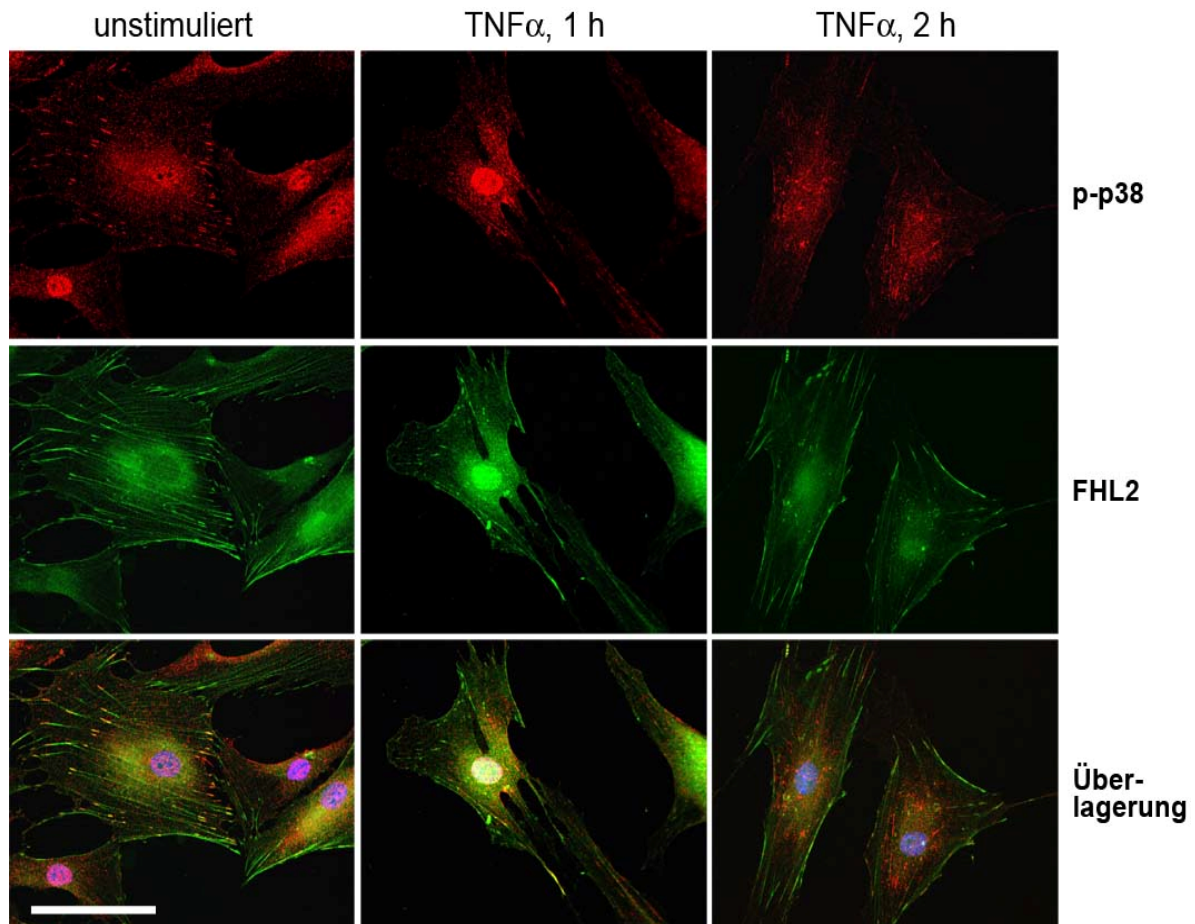


Abb.: 17: TNF α induziert die Translokation von FHL2 in den Nukleus. RASF wurden auf Deckgläschen ausplattiert und in Vollmedium inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert und nach 0, 1 und 2 Stunden fixiert. Alle Zellen wurden für die Immunfluoreszenz permeabilisiert und gegen Phospho-p38 (rot) und FHL2 (grün) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI dargestellt. Im Vergleich zu unstimulierten RASF (oben links) zeigt sich nach 1h eine deutliche Zunahme von p-p38 MAKP im Nukleus (rote Färbung, oben Mitte), die bereits 2 Stunden nach der Simulation wieder abnimmt (oben rechts). In unstimulierten Zellen ist FHL2 (grüne Färbung Mitte links) im Zytosol mit den fokalen Kontakten assoziiert. Bereits 1h nach der TNF α -Stimulation ist nahezu das gesamte FHL2 im Nukleus zu finden (Mitte). Zwei Stunden nach der Stimulation zeigt sich nur noch eine schwache FHL2-Färbung im Kern, wohingegen die Färbung in den fokalen Kontakten wieder zunimmt (Mitte, rechts). In der Überlagerung (rot und grün) zeigt sich deutlich, dass beide Proteine in den fokalen Kontakten assoziiert sind (unten links) und es nach einstündiger TNF α -Stimulation zu einer Kolokalisation im Kern kommt (unten Mitte). Nach zweisündiger TNF α -Stimulation ist diese Kolokalisation kaum noch nachweisbar und es zeigt sich eine Zunahme der Färbung an den fokalen Kontakten (unten, rechts).

4.4.2 FHL2-defiziente mesenchymale Stammzellen zeigen eine stabile p38-Aktivierung nach TNF α -Stimulation

Die Beobachtung, dass TNF α nicht nur die Aktivierung von p38-MAPK, sondern auch die gemeinsame Translokation von p38-MAPK und FHL2 in den Nukleus induziert, wo es mit p38-MAPK kolokalisiert, ist neu und gleichsam unerwartet. Diese Entdeckung wirft die Frage nach einer möglichen Beteiligung von FHL2 an der TNF α -induzierten Aktivierung des p38-MAPK- Signalweges auf.

Um dies zu untersuchen wurden murine, FHL2-defiziente, mesenchymale Stammzellen bzw. Wildtyp-Stammzellen über einen Zeitraum von insgesamt 20 Minuten mit TNF α (10 ng/ml) stimuliert, anschließend lysiert und im Westernblot analysiert (Mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Viktor Wixler). Die Auswertung zeigte, dass es in den FHL2-defizienten mesenchymalen Stammzellen nach TNF α -Stimulation zu einer anhaltenden Phosphorylierung von p38-MAPK sowie Substrat MAPKAP kinase 2, dem direkten Substrat von p38, kommt. In Wildtyp-Zellen hingegen konnte nur eine kurzfristige Aktivierung der p38-MAPK beobachtet werden (Abb.: 18). Im Vergleich zu Wildtypzellen zeigen die FHL2-defizienten mesenchymalen Stammzellen (MSC) allerdings keine Unterschiede in der TNF α -induzierten Aktivierung der NF- κ B-, PI-3K-Akt-, ERK1/2- und JNK-Signalwege (Meyer et al., 2008 in Revision).

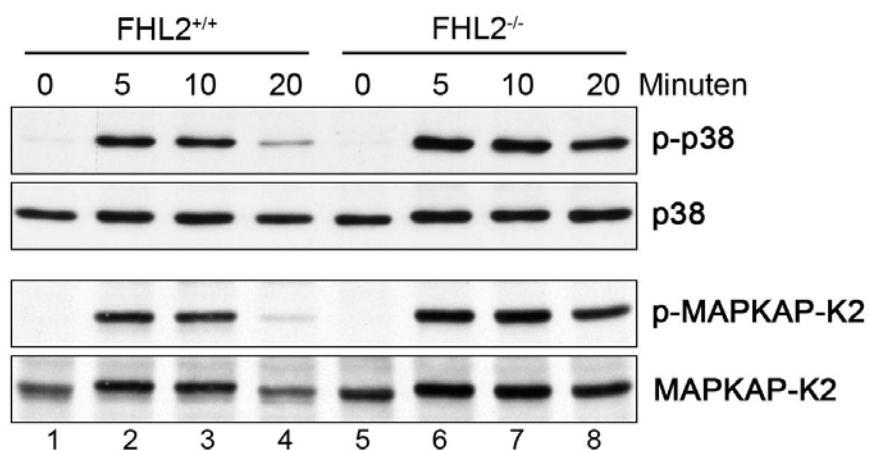


Abb.18: FHL2-defiziente Zellen zeigen eine stabile p38-Aktivierung nach TNF α -Stimulation. Mesenchymale Stammzellen aus FHL2^{+/+} und FHL2^{-/-} Mäusen wurden über Nacht in Medium mit 5% FKS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit TNF α (10 ng/ml) stimuliert und nach 0, 5, 10 oder 20 Minuten in Lyse-Puffer aufgeschlossen. Die Gesamtlysate wurden in einem 10% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern im Westernblot analysiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse zum einen beweisen, dass TNF α die Translokation von FHL2 in den Nukleus induziert, wo es zur Kollokalisierung mit p-p38 kommt. Zum anderen zeigen die Ergebnisse darüber hinaus, dass FHL2 an der Steuerung der p38-Phosphorylierung beteiligt ist und unterstreichen eine direkte Beteiligung von FHL2 am p38-MAPK-Signalweg.

4.5 FHL2 reguliert die MMP-13 Expression

4.5.1 FHL2 silencing mittels RNAi-Technologie

Um die Funktion von FHL2 in RASF experimentell erarbeiten zu können, wurde ein Protokoll etabliert, um die FHL2-Expression mittels RNAi-Technologie zu hemmen. Für weitere Funktionsstudien mussten dabei zwei entscheidende Ziele erreicht werden. Zum einen muss der RNAi-Effekt auf die FHL2-Expression so stark sein, dass mindestens 70% der FHL2-Expression gehemmt wird. Zum anderen soll die Hemmung der Expression über mehrere Tage anhalten.

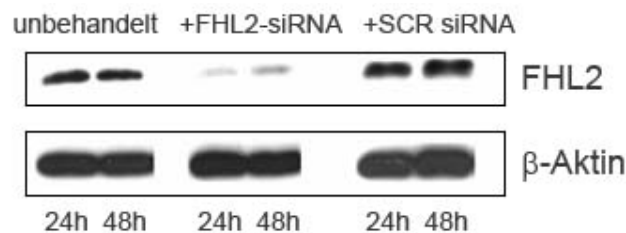


Abb.: 19: RNAi-vermittelte Hemmung der FHL2 Expression: RASF wurden mit FHL2-spezifischer bzw. gescrambeleter (SCR)-siRNA für 24 Stunden transfiziert. Die Zellen wurden dann für weitere 48 Stunden (insgesamt 72 Stunden) in DMEM und 10% FKS inkubiert, alle 24 Stunden wurde ein Teil der RASF in Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Gesamtllysate in einem 10% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das FHL2-Protein in der Westernblot-Analyse mit dem monoklonalen anti-FHL2-Antikörper F2B4 detektiert.

Zu diesem Zweck wurden 7×10^5 RASF 24 Stunden vor der Transfektion in 6 cm-Schalen ausplattiert und mit FHL2-spezifischen siRNA (5 mM) transfiziert. Zur Analyse der Expression wurden alle 24 Stunden die Zellen jeweils einer Schale entnommen, lysiert und der Gesamtzellextrakt mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. In der anschließenden Westernblot-Analyse wurde die FHL2-Expression ausgewertet (Abb.: 19). Die Ergebnisse dieser Vorversuche zeigen, dass mit Hilfe einer FHL2-spezifischen siRNA die FHL2-Expression um 70-85% gehemmt werden kann und diese Hemmung über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden aufrecht erhalten werden kann.

4.5.2 Die RNAi-vermittelte Hemmung der FHL2 Expression steigert die TNF α -induzierte Expression von MMP-1 und MMP-13

Durch die RNAi-vermittelte Hemmung der FHL2-Expression war es nun möglich, die Funktion von FHL2 in RASF näher zu untersuchen. Die bisher beschriebenen Studien zeigen, dass die RA-relevanten inflammatorischen Zytokine, TNF α und IL-1, die FHL2-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in RASF hemmen. Darüber hinaus verläuft die FHL2-Expression in der Pathogenese einer TNF-induzierten destruktiven Arthritis transient. TNF α wird mit der Induktion des aggressiven Verhaltens der RASF in Verbindung gebracht (Takemura et al., 2001). Ferner ist bereits gut dokumentiert, dass IL-1 und TNF α die MMP-Expression in RASF initiieren und somit die Matrixdegradation während der RA einleiten (Feldmann et al., 1996, Müller-Ladner et al., 1996). Des Weiteren ist FHL2 als Kofaktor in der Transkription beschrieben, der die Expression verschiedener Gene steuert. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es in TNF α -abhängiger Weise zusammen mit phosphoryliertem p38 in den Kern wandert. Daher stellte sich nun die Frage, ob FHL2 einen Einfluss auf die Expression von RA-relevanten MMPs hat. Dieser Frage sollte mit Hilfe von FHL2-Silencing und simultaner Zytokin-Stimulation in RASF nachgegangen werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Suspension von RASF (3×10^6 Zellen/ 10cm-Schale) in insgesamt vier Petrischalen ausplattiert. Der erste Teil der RASF diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Die RASF in der zweiten Schale wurden über 24 Stunden mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert. Die RASF in der dritten und vierten Schale wurden gemäß dem etablierten Protokoll mit FHL2-siRNA transfiziert und die vierte Schale im Folgenden mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen lysiert und die FHL2-Expression sowohl im Westernblot als auch in der qRT-PCR bestimmt.

Die Analyse der FHL2-Expression in der qRT-PCR zeigte eine TNF α -induzierte Reduktion der FHL2-Expression um 70% im Vergleich zu Kontroll-RASF (Abb.: 20-A). Auch die eingesetzte siRNA reduzierte die FHL2-Expression um mehr als 70% im Vergleich zur unbehandelten RASF, wobei eine zusätzliche TNF α -Stimulation hier keinen weiteren Effekt zeigte. Die Expressionsanalyse im Westernblot bestätigte die in der qRT-PCR gewonnenen Daten und zeigte ebenfalls eine deutlich verringerte FHL2-Expression in TNF α -stimulierten Zellen (Abb. 20-A). Auch in den RNAi-gehemmten RASF war nur noch eine sehr schwache FHL2-Proteinbande zu detektieren. Gleiches war auch nach der TNF α -Stimulation der RNAi-gehemmten RASF zu beobachten.

Nachdem in den jeweiligen Ansätzen der gewünschte Effekt auf die FHL2-Expression nachgewiesen wurde, war die Basis für die Analyse der MMP-Expression gelegt. Dabei sollte sich primär auf die Expression der für die RA wesentlichen Metalloproteinasen konzentriert werden. Aus diesem Grund wurden die entscheidenden MMPs MMP-1, MMP-3 und MMP-13, mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. Im Vergleich zu den Kontroll-RASF zeigte sich bei der Analyse der MMP-1- und MMP-3-Induktion wie erwartet ein TNF α -induzierter Anstieg der Expression auf das Dreifache (Abb.: 20-B und -C). Im Vergleich dazu zeigte die RNAi-vermittelte Hemmung der FHL2-Expression keinerlei Auswirkungen auf diese MMPs. Die TNF α -induzierte MMP-1- und MMP-3-Expression nach RNAi-vermittelter FHL2-Hemmung überstieg jedoch die basale Expression in unbehandelten RASF auf mehr als das Dreifache und fiel im Fall von MMP-1 damit um 25% höher aus als die TNF α -induzierte Expression in ungesilenceten RASF (Abb.: 20-B).

Die Expression von MMP-13, einem der zentralen MMPs, die während der RA durch TNF α induziert werden, wurde analog zu MMP-1 und MMP-3 durch die verminderte Expression von FHL2 kaum beeinflusst (Abb.: 20-D). Die Kombination aus FHL2-Silencing und TNF α -Stimulation führte jedoch zu einer Steigerung der mRNA-Menge von MMP-13 im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf mehr als das Zehnfache sowie um das Sechsfache im Vergleich zu FHL2-exprimierenden und TNF α -stimulierten RASF (Abb.: 20-D). Auch Westernblot-Analysen des pro MMP-13-Enzyms bestätigten die hohe TNF α -vermittelte Induktion des Proteins nach FHL2-Silencing (Abb.: 20-E). Diese Experimente zeigen eindeutig, dass FHL2 ein negativer Regulator der MMP-Expression, speziell der MMP-13-Induktion, darstellt und ein Fehlen von FHL2 die TNF α -induzierte MMP-Expression deutlich steigert.

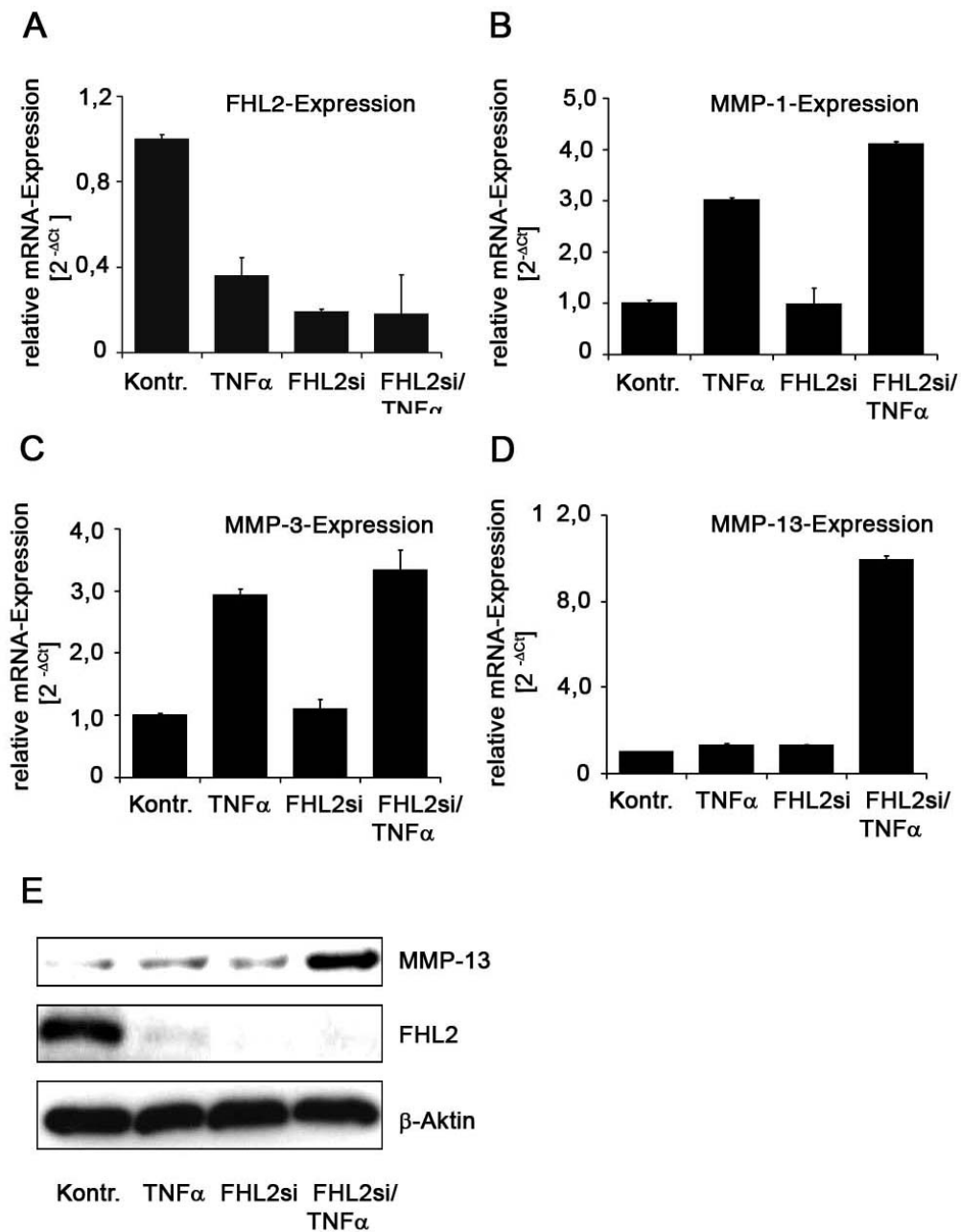


Abb. 20: Die RNAi-vermittelte Hemmung von FHL2 steigert die TNF α -induzierte MMP-13-Expression signifikant.(A-D): qRT-PCR: Die relative mRNA-Expression wurde mit spezifischen Primern im relativen Vergleich zur GAPDH-Expression ermittelt. (E): Westernblot-Analysen: Gesamtllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinexpression mit spezifischen Antikörpern detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abnahme der Proteinexpression nach TNF α -Stimulation bzw. Silencing ist deutlich zu erkennen. FHL2-silencing steigert die TNF α -induzierte MMP-13-Expression auch auf Proteinebene deutlich.

4.6 Die Überexpression von FHL2 unterbindet die TNF-induzierte MMP-13-Expression

Die beschriebenen Experimente stützen die Hypothese, dass FHL2 eine Repression der MMP-Expression, speziell der MMP-13-Expression, vermittelt. Um diese Hypothese zu verifizieren wurden RASF mit einer humanen FHL2-Sequenz transfiziert. In diesem Plasmid steht die FHL2-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors, so dass die Expression nicht durch TNF α negativ beeinflusst werden kann. Darüber hinaus besitzt das rekombinante FHL2 eine N-terminal gelegene myc-Sequenz (myc-tag). Für die Überexpression des exogenen FHL2 wurden RASF mit Hilfe des AMAXA-Transfektionssystems transfiziert. Die Transfektion wurde gemäß den Angaben des AMAXA-Protokolls für primäre Fibroblasten (NHDF-Nucleofactor Kit) durchgeführt. Mit Hilfe des AMAXA-Verfahrens wird das Plasmid durch Elektroporation in die RASF gebracht. Somit erreicht diese Transfektionmethode in Bezug auf RASF eine Transfektionseffizienz zwischen 60 und 75 %.

Die Transfektion wurde sowohl mit dem pCMV-FHL2 als auch mit dem entsprechenden Leer-Vektor (pCMV-leer) durchgeführt. Die in Suspension transfizierten Zellen wurden ausplattiert und 24 Stunden danach mit TNF α (100 ng/ml) für weitere 24 stimuliert und anschließend im Westernblot bzw. qRT-PCR analysiert.

Bereits 24 Stunden nach der Transfektion zeigte sich, im Vergleich zu den Kontroll-RASF, in den pCMV-FHL2-transfizierten RASF eine Zunahme der FHL2-Expression auf mehr als das Sechsfache, was sich sowohl in der qRT-PCR als auch im Westernblot bestätigen ließ (Abb.: 21-A und -B). Des Weiteren konnte auch bestätigt werden, dass die TNF α -Stimulation keinen Einfluss auf das rekombinant-exprimierte myc-FHL2 hatte. Die Abnahme des myc-FHL2 nach 48 h ist dadurch zu erklären, dass die FHL2-Überexpression auf einer Transfektion mit einem Plasmid basiert, welches im Zuge von Zellteilungsprozessen verloren wird. Das endogen-exprimierte FHL2 in diesen Zellen hingegen reagierte wie erwartet mit der Abnahme des Proteins. Letzteres zeigte sich auch in den pCMV-Leer-transfizierten RASF (Abb.: 21-A und B). Wie erwartet zeigte sich auf transkriptionaler Ebene in diesen RASF auch die TNF α -induzierte Expression von MMP-13. In den pCMV-FHL2-transfizierten RASF konnte jedoch keine Zunahme der MMP-13-Expression nach der Stimulation mit TNF α detektiert werden (Abb.: 21-A). Das bedeutet, dass die Überexpression von FHL2 tatsächlich die TNF α -vermittelte Induktion von MMP-13 verhindert. Diese Daten liefern ein weiteres starkes Indiz für einen möglichen anti-rheumatischen Effekt von FHL2.

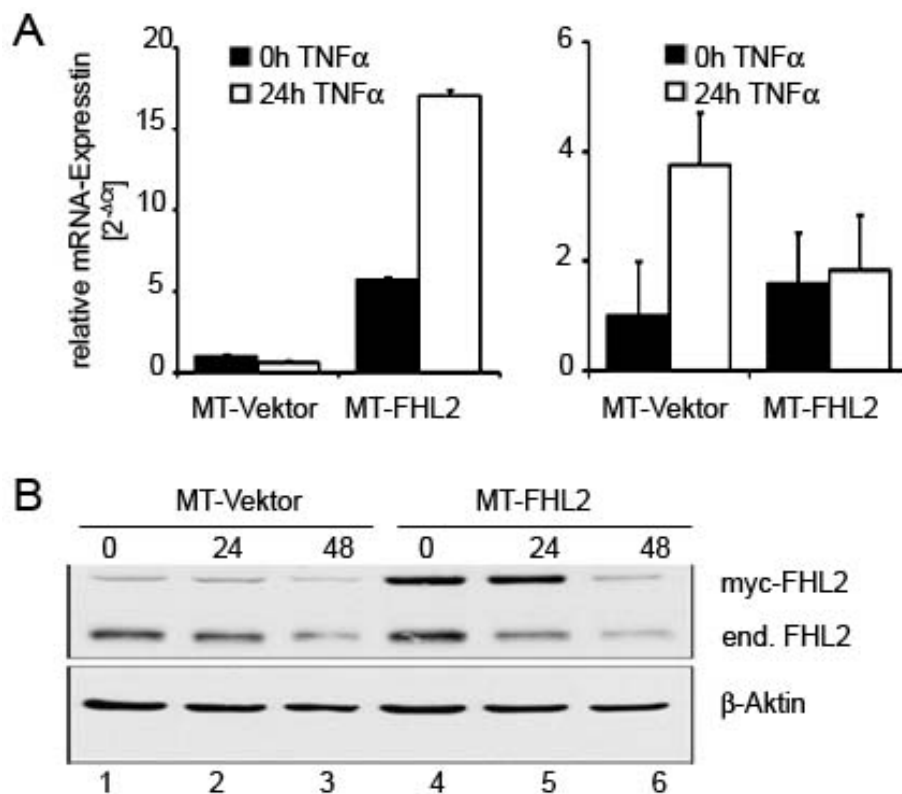


Abb.: 21: Die FHL2-Überexpression unterbindet die TNF α -induzierte MMP-13-Expression. RASF wurden mit dem pCMV-FHL2- bzw. pCMV-leer-Plasmid transfiziert und im Anschluss mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert. (A). qRT-PCR. Vor bzw. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Zellen in RLT-Puffer aufgeschlossen und die Expression relativ zur GAPDH-Expression analysiert. RECHTS: Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der FHL2-Expression bereits zum Zeitpunkt „0“. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Stimulation mit TNF α die Exogene FHL2-Expression nicht beeinträchtigt. LINKS: Es kommt zu einer TNF α -induzierten MMP-13-Expression in den MT-Vektor-transfizierten RASF. Im Gegensatz dazu zeigt sich kein Anstieg der MMP-13-Expression in den MT-FHL2-transfizierten Zellen nach TNF α -Stimulation (B). Westernblot-Analyse: RASF wurden lysiert und Gesamtllysate in einem 10 % Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Protein wurde im Westernblot mit dem FHL2-spezifischen Antikörper F2B4 detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Expressionsstudien belegen, dass erst eine Hemmung von FHL2 die TNF α -vermittelte Induktion von MMP-13 in vollem Umfang ermöglicht. Ferner führt die Überexpression von FHL2 zu einer kompletten Hemmung der TNF α -induzierte MMP-13-Expression. Diese Studien stehen im Kontext mit dem bisher beschriebenen Einfluss von proinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen auf die FHL2-Expression und unterstreichen darüber hinaus eine zentrale regulatorische Beteiligung in der Zytokin-vermittelten MMP-Expression in RASF.

4.7 Die Hemmung der FHL2-Expression führt zu einer deutlichen Steigerung der Invasivität rheumatoider Fibroblasten

Die fortschreitende Knorpelzerstörung während der RA ist primär auf das invasive Verhalten stabil aktivierter RASF zurückzuführen. Die Invasivität selbst wird dabei durch die Fähigkeit der RASF vermittelt, fest an die Knorpelmatrix zu binden und große Mengen matrixdegradierender Enzyme zu sezernieren (Pap et al., 2000, Müller-Ladner et al., 1996, Müller-Ladner et al., 1997). Im Rahmen der vorgestellten Studien wurde der direkte Zusammenhang zwischen der Zytokin-vermittelten Hemmung der FHL2-Expression und der Induktion der MMP-Expression bereits hergestellt. So ist zu beobachten, dass (1.) proinflammatorische Zytokine die FHL2-Expression hemmen und (2.) erst eine Hemmung von FHL2 die maximale Induktion der Kollagenase MMP-13 ermöglicht. Darüber hinaus inhibiert (3.) die FHL2-Überexpression die TNF α -induzierte MMP-13-Expression. Die umfangreichen Kontrollmechanismen der MMP-Expression und –Aktivierung wurden bereits an anderer Stelle ausführlich erörtert. Danach korreliert eine gesteigerte MMP-Expression nicht unbedingt mit der gesteigerten Aktivität der MMPs, was das invasive Verhalten der RASF positiv beeinflusst. Die Frage, ob das Fehlen von FHL2, welches, wie bereits gezeigt, zu einer gesteigerten TNF α -induzierten MMP-13-Expression führt, darüber hinaus auch das invasive Verhalten der RASF steuert, ist der zentrale Gegenstand der folgenden Invasionsstudien.

4.7.1 Aufbau und Funktionsweisen des MATRI-Assays

In der Literatur sind derzeit unterschiedliche Methoden beschrieben, mit denen sich das invasive Verhalten von Zellen messen lässt. Sehr weit verbreitet ist in diesem Zusammenhang die Verwendung der Boyden-Kammer. Dieses System beruht darauf, dass invasive Zellen eine so genannte „basement membrane“ durchdringen, die auf einen Polycarbonatfilter aufgebracht ist. Die relative Invasivität wird dabei durch histologische Färbung der durchgewanderten Zellen auf der Unterseite der Membran gezählt (Albini et al., 1987). Allerdings hat diese Methode deutliche Nachteile, da nicht alle durchgewanderten Zellen histologisch gefärbt und somit erfasst werden können.

Eine andere Variante der Invasivitätsmessung ist der so genannte „Trans Epithelia Electrical Resistens“ (TEER)-Assay (Zak et al., 2000; Ludwig et al., 2002). Diese elektrophysiologische Methode misst die zeitaufgelöste Invasivität als direkte Funktion des Zusammenbruchs des elektrischen Widerstands einer Zellschicht (Monolayers). Der zentrale Bestandteil des TEER-

Assays ist ein Monolayer aus „Mardin-Darby canine kidney“ C7-Zellen (MDCK-C7-Zellen) (Zak et al., 2000), die auf der semipermeablen Membran eines Filtereinsatzes in einer 6-Loch-Platte kultiviert werden. Ein konfluenter MDCK-Monolayer ist auf Grund seiner Struktur und der Beschaffenheit seiner „Tight Junctions“ in der Lage, einen elektrischen Widerstand von bis zu 5.500 Ohm/ cm^2 zu generieren. Invasive Zellen, die auf diesem Monolayer ausgesät werden, sezernieren Matrix-zerstörende Enzyme und wandern in den MDCK-Zelllayer ein, was einen Zusammenbruch des elektrischen Widerstands zur Folge hat.

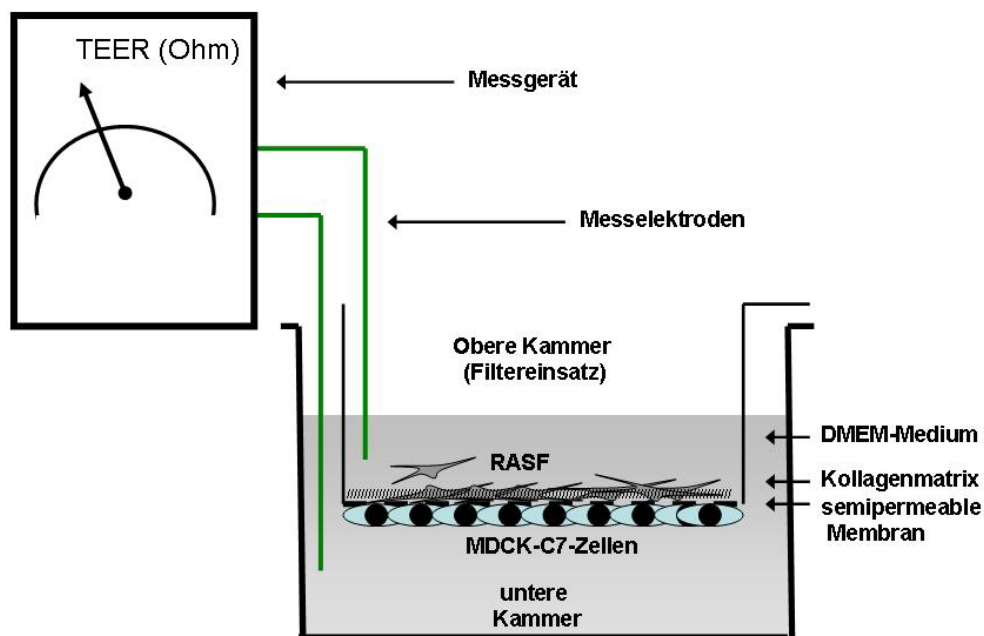


Abb.: 22: Aufbau des Matri-Assays: Der Matri-Assay basiert auf einer Ionen-undurchlässigen MDCK-Zellschicht, die die Ausbildung eines transepithelialen Widerstandes (TEER) zwischen der oberen und der unteren Kammer ermöglicht. RASF, die in die obere Kammer ausgesät werden, zerstören die Kollagenmatrix und permeabilisieren die MDCK-Zellschicht, was den Zusammenbruch des TEERs unmittelbar zu Folge hat.

Im Zusammenhang mit FHL2 sollte primär die MMP-vermittelte Degradation der Knorpelmatrix untersucht werden. Daher wurde der TEER-Assay an diese Fragestellung adaptiert, indem der MDCK-C7-Monolayer auf der Unterseite der Membran des Filtereinsatzes aufgebracht wurde und die Oberseite mit einer künstlichen Matrix aus Kollagen Typ I, dem Hauptsubstrat von MMP-13, beschichtet wurde (vgl. Abb.: 22). Der so entwickelte MATRI-Assay erfüllt nun zwei für die Analyse der RASF-Invasivität essentielle Bedingungen. Zum einen kann die Invasivität der RASF zeitnah und im Verlauf gemessen werden, zum anderen ermöglicht das Aufbringen der künstlichen Kollagenmatrix, dass die gemessene Invasivität auf das spezifische Wirken von Collagenasen wie MMP-1 und MMP-13 zurückzuführen ist.

4.7.2 Die Hemmung von FHL2 führt zu einer deutlichen Steigerung der Invasivität von RASF

Um zu untersuchen, ob die durch FHL2-Hemmung gesteigerte TNF α -induzierte MMP-13-Expression auch Auswirkungen auf die Invasivität der RASF zeigt, wurden RASF mit FHL2-spezifischer siRNA transfiziert und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert, bevor sie am folgenden Tag im Matri-Assay eingesetzt wurden. Parallel dazu wurde der Matri-Assay, wie in den Methoden beschrieben, vorbereitet und, nachdem der MDCK-C7-Monolayer in den einzelnen Kavitäten einen Widerstand zwischen 3500 und 4000 Ohm/cm² aufgebaut hatte, die RASF in die entsprechenden Kavitäten ausgesät. Als Positivkontrolle wurden hoch invasive, humane A7-Melanomzellen in gleicher Zellzahl ausgesät. Im Anschluss wurde der elektrische Widerstand über einen Zeitraum von sieben Tagen, jeweils zweimal täglich, gemessen. Für die Auswertung wurden die transepithelialen Widerstände der verschiedenen Kavitäten zum Zeitpunkt „0“ als Ausgangswert (100 %) zu Grunde gelegt. Die Stärke der Invasivität wird dabei ausgedrückt als die Halbwertszeit der TEER ($t^{1/2}$). Wie erwartet haben die hochinvasiven A7-Zellen den TEER bereits nach 48 Stunden vollständig durchbrochen (Abb.: 23). Auch die unbehandelten RASF zeigen erwartungsgemäß ein invasives Verhalten. Nach 120 Stunden Inkubation auf Kollagen-beschichteten Filtereinsätzen zeigte sich hier ein deutlicher Zusammenbruch der TEER. Im Gegensatz dazu permeabilisierten die TNF α -stimulierten RASF den MDCK-Zelllayer bereits nach 80 Stunden. Dass die RNAi-vermittelte Hemmung des FHL2 im Vergleich zu unbehandelten RASF keinen deutlichen Unterschied in der Invasivität hatte, war nicht überraschend, da es im Einklang mit den Ergebnissen der MMP-Expression steht. Allerdings steigert die RNAi-vermittelte FHL2-Hemmung die Invasivität TNF α -stimulierter RASF sehr stark. So fällt der

transepitheliale Widerstand bei diesen Zellen schon nach 60 Stunden unter den 50 %-Wert ab (Abb.: 23). Wenige Stunden später ist der transepitheliale Widerstand in diesen Messungen komplett zusammengebrochen. Somit zeigen FHL2-gesilencete RASF nach TNF α -Induktion ein ähnlich starkes invasives Verhalten wie die sehr tumorigenen und metastasierenden A7-Melanomzellen.

Aus diesen Studien lässt sich Folgendes ableiten: (1.) Die Hemmung von FHL2 führt zu einer sehr deutlichen Zunahme des invasiven Verhaltens TNF α -stimulierter RASF im Matri-Assay. (2.) Diese Zunahme korreliert mit der stark gesteigerten MMP-13-Expression in diesen Zellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle des FHL2 in der Hemmung der MMP-Expression und darüber hinaus den deutlichen Einfluss von FHL2 auf das invasive Verhalten der RASF *in vitro*.

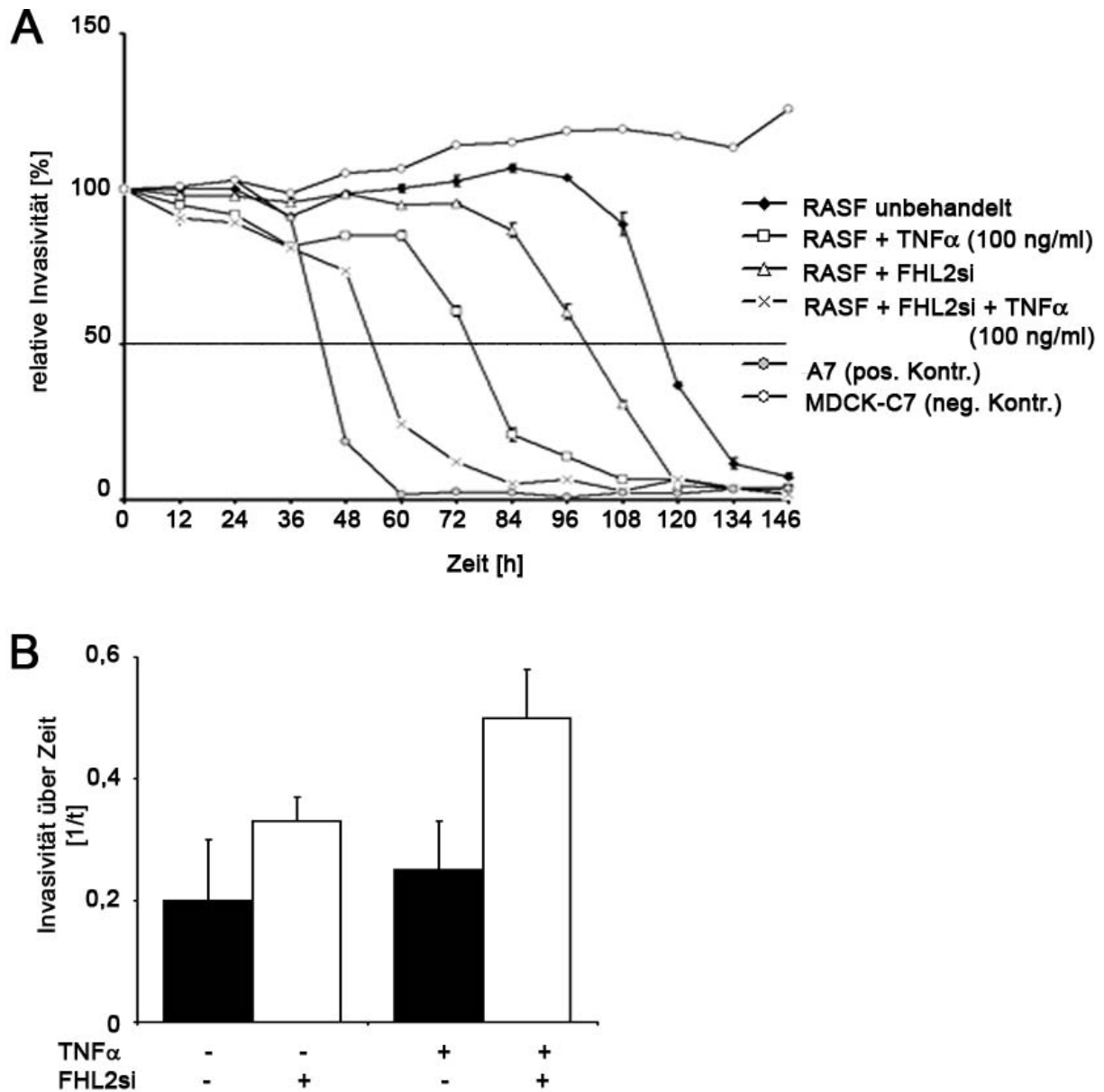


Abb.: 23: Die FHL2-Hemmung steigert die TNF α -induzierte Invasivität der RASF. Die Invasivität der RASF wurde durch Messung des TEER zweimal täglich bestimmt. Humane A7-Melanomzellen bzw. MDCK-C7-Zellen dienten als Kontrolle. (A) : Graphische Auftragung des relativen transepithelialen Resistenz in Prozent im Vergleich zum Ausgangswert (Zeitpunkt = 0) im jeweiligen Ansatz. Im Vergleich zu unstimulierten bzw. TNF α -stimulierten RASF ist die Zunahme den Invasiven Verhaltens der FHL2si-behandelten RASF nach TNF α -Stimulation deutlich zu erkennen (Kreuz) (B): Darstellung der Invasivität relativ zur Zeit. Auch hier zeigt sich die deutliche Zunahme der Invasivität FHL2si-behandelter RASF nach Stimulation mit TNF α .

4.8 FHL2-Defizienz führt zu einer deutlich gesteigerten Knorpel- und Knochendestruktion in der hTNFtg-Maus.

4.8.1 Die Generierung der hTNFtg-FHL2^{-/-}Maus

Um der Frage nachzugehen, welche Rolle das FHL2-Protein *in vivo* im Verlauf der RA hat, wurde die FHL2^{-/-} hTNFtg-Maus generiert. Dafür wurden männliche hTNFtg-Mäuse mit weiblichen FHL2-KO-Mäusen verpaart. Die daraus hervorgegangenen hTNFtg-FHL2^{+/-}-Hybride waren lebensfähig und zeigten kurz nach der Geburt keine sichtbaren Unterschiede zu FHL2^{-/-}Mäusen, entwickelten aber den typischen Phänotyp einer hTNFtg-Maus. Analog zu den hTNFtg-Mäusen wurden die hTNFtg-positiven Tiere mit wöchentlichen Infliximab-Injektionen i.p. behandelt. Ca. 6 Wochen nach der Geburt und mit Erreichen der Geschlechtsreife wurden männliche Hybride mit weiblichen FHL2^{-/-}-Mäusen verpaart. Aus diesen Verpaarungen entstand die hTNFtg-FHL2^{-/-}Maus, die die Grundlage der *folgenden in vivo*-Analysen bildete

4.8.2 hTNFtg-FHL2-defiziente Mäuse zeigen klinisch eine deutlich gesteigerte Progression der destruktiven Arthritis

Um den Krankheitsverlauf anhand klinischer Parameter studieren zu können und um eine Aussage über Unterschiede in der Krankheitsentwicklung treffen zu können, wurden die Gewichtsentwicklung sowie die Griffstärke der vorderen und hinteren Extremitäten wöchentlich gemessen. Dazu wurden die Mäuse in vier Gruppen eingeteilt: FHL2^{+/+}-Mäuse (n= 5), FHL2^{-/-}-Mäuse (n= 5), hTNFtg-Mäuse (n= 4) sowie hTNFtg-FHL2^{-/-}Mäuse (n= 4). Abbildung 24-A zeigt die vier analysierten Maustypen im direkten Größenvergleich. Wie erwartet zeigen sowohl Wildtyp- als auch FHL2^{-/-}Mäuse keine Anzeichen einer krankhaften Veränderung der Extremitäten (Abb.: 24 -B). Die durch die fortschreitende destruktive Arthritis bedingte Deformation der Extremitäten ist bei der hTNFtg-Maus bereits zu erkennen. Im direkten Vergleich dazu zeigt die hTNFtg-FHL2^{-/-} Maus im gleichen Alter allerdings deutlich ausgeprägtere Deformationen aller vier Extremitäten (Abb.: 24-B).

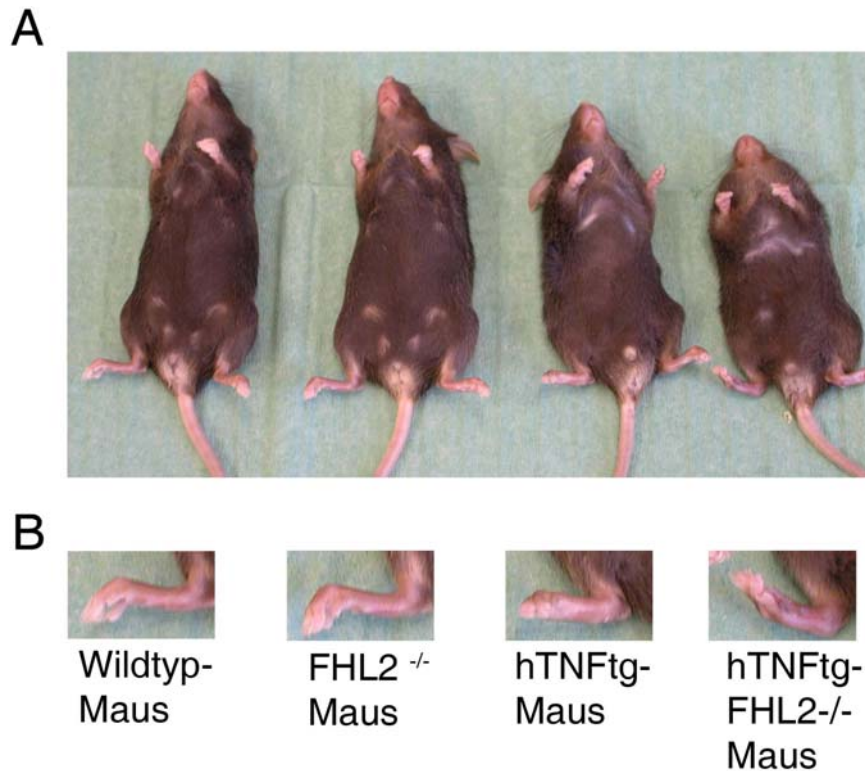


Abb.: 24: Die analysierten Maustypen im direkten Vergleich: (A) Fotografie der vier analysierten Maustypen im Vergleich. Die hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus (re.) unterscheidet sich auch in Bezug auf die Körpergröße deutlich von den drei anderen Maustypen (B) Fotografien der jeweils rechten hinteren Extremität der vier Maustypen. Die hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus zeigt schwere Deformationen der Extremität die deutlich prägnanter sind als im Vergleich zur hTNFtg-Maus (2. v.re.).

In Bezug auf die gemessenen Parameter Gewichtsentwicklung und Griffstärke unterschieden sich FHL2-defiziente Mäuse nicht vom Wildtyp. So ist in beiden Gruppen eine deutliche Gewichtszunahme über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg zu messen und die Griffstärke blieb konstant. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl hTNFtg- als auch hTNFtg-FHL2^{-/-}-Mäuse im gleichen Zeitraum einen deutlichen Gewichtsverlust (Abb.: 25-A). Dieser Gewichtsverlust ist allerdings bei den hTNFtg-FHL2^{-/-}-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt, so dass sich dieser Maustyp bereits wenige Wochen nach der Geburt in Bezug auf Größe und Gewicht nicht nur von Wildtyp- oder FHL2^{-/-}-Mäusen, sondern auch von den hTNFtg-Mäusen deutlich unterschied. So lag das Durchschnittsgewicht der Gesamten Gruppe in der zehnten Lebenswoche bei 9,7 g. Eine gesunde Wildtyp-Maus hat in diesem Alter hingegen gewöhnlich ein Gewicht von ca. 21 g erreicht (Abb.: 25-A). In Bezug auf die Griffstärke war zu beobachten, dass die hTNFtg-FHL2^{-/-}-Mäuse bereits in der sechsten Lebenswoche kaum noch Greifbewegungen verrichten konnten. Nach der neunten Lebenswoche konnten diese

Tiere weder die vorderen noch die hinteren Extremitäten gebrauchen, und eine Greifbewegung war ab diesem Stadium unmöglich. Im Kontext zu dem deutlichen Verlust der Griffstärke steht auch die steigende Immobilität der hTNFtg-FHL2^{-/-}Mäuse (nicht gezeigt), was auf eine deutlich aggressivere Progression der RA hinweist (Abb.: 25-B). Darüber hinaus kam es bei den hTNFtg-FHL2^{-/-}Mäusen zu einer deutlich höheren Sterblichkeit bzw. kamen Tötungen der Tiere aus ethischen Gründen häufiger vor.

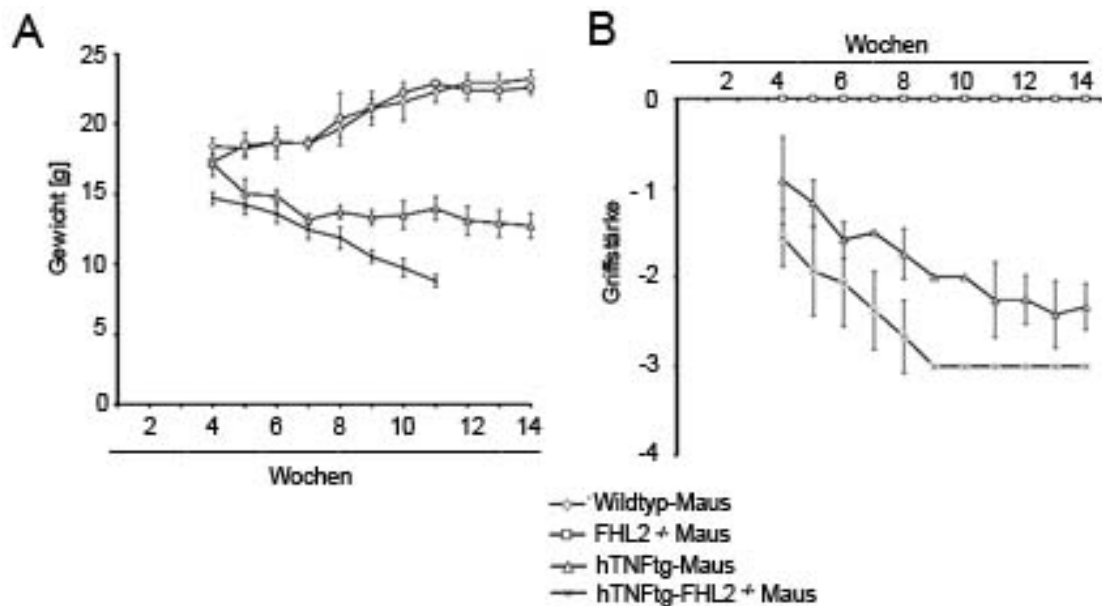


Abb.: 25: Die hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus zeigt klinische Hinweise auf eine deutlich geseigerte Progression der destruktiven Arthritis. (A). Messung des Körpergewichts. hTNFtg-FHL2^{-/-}Mäuse zeigen schon 4 Wochen nach der Geburt ein geringeres Gewicht. Im Vergleich zur hTNFtg-Maus kommt es innerhalb von 10 Wochen zu deutlichen Gewichtsverlusten. (B) Bestimmung der Griffstärke: Die hTNFtg-FHL2^{-/-}Maus zeigt in den ersten acht Wochen einen deutlichen Verlust der Griffstärke, die sich im weiteren Verlauf bis zur kompletten Immobilität steigert.

4.8.3 hTNFtg-FHL2-defiziente Mäuse zeigen umfangreichere und ausgeprägtere Gelenkzerstörungen als hTNFtg-Mäuse

Da die Gewichtsentwicklung sowie die Entwicklung der Griffstärke und die stark reduzierte Lebensspanne der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zur hTNFtg-Maus auf einen deutlich aggressiveren Verlauf der destruktiven Arthritis hinweisen, wurde nachfolgend analysiert, ob die hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus auch in der Ausprägung der Knorpeldestruktion Unterschiede zeigt. Zu diesem Zweck wurden 11 Wochen alte Mäuse aus jeder Gruppe getötet, die Sprunggelenke isoliert, entkalkt und in Paraffin gebettet.

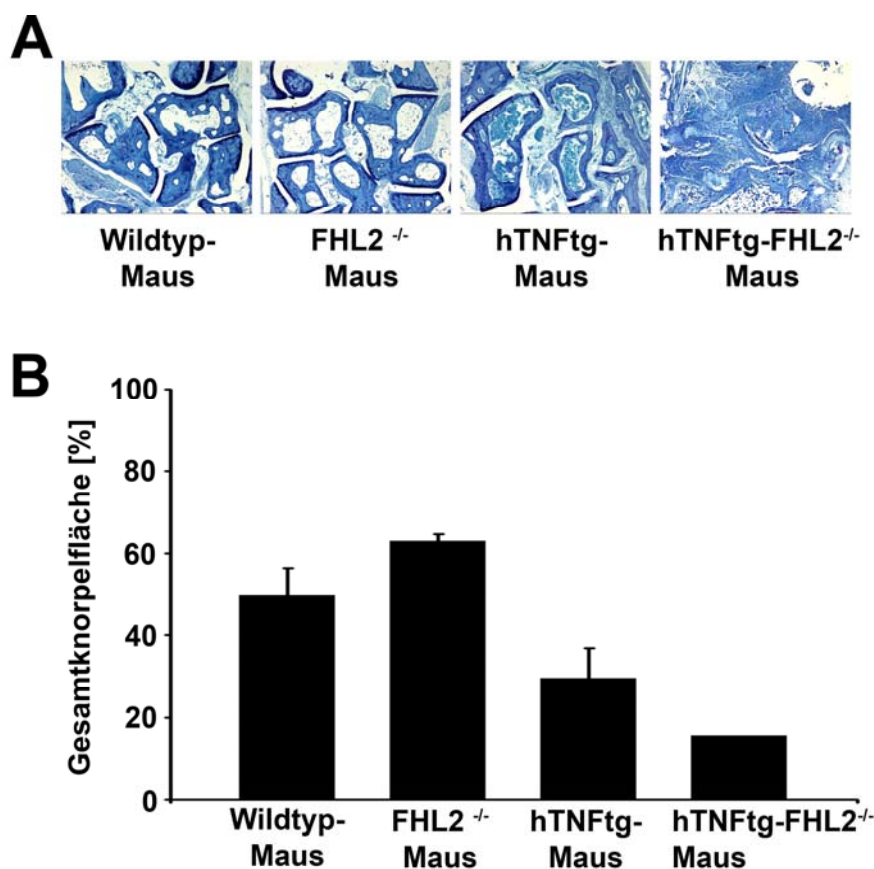


Abb. 26: hTNFtg-FHL2^{-/-}-Mäuse zeigen eine größere und umfassende Ausprägung der Knorpeldestruktion. (A): Histologie: Tuloidinblau-gefärbte Paraffinschnitte der Sprunggelenke aus den vier beschriebenen Maustypen. Das im Vergleich zu hTNFtg-Maus bereits weit fortgeschrittene Stadium der Knochen- und Knorpeldestruktionen in den Sprunggelenken der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus deutlich zu erkennen (B): Quantitative Auswertung: Prozentuale Bestimmung der nachweisbaren Gesamtknorpelfläche. Die messbare Gesamtknorpelfläche der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus entspricht zu diesem Zeitpunkt 30 % Fläche in gleichaltrigen Wildtypmäusen.

Histologische Analysen an Tuloidinblau-gefärbten Paraffinschnitten dieser Sprunggelenke (die Sprunggelenke wurden von mir präpariert und geschnitten und von Katja Neugenauer und Dr. Adelheid Korb-Pap gefärbt und quantifiziert), zeigen einen hohen Grad der Knochenerosion in der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus, der nicht nur im Vergleich zu FHL2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen, sondern auch im direkten Vergleich zu hTNFtg-Mäusen in seiner Ausprägung unerwartet stark ist (Abb.: 26). So sind in Sprunggelenken der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus kaum oder nur noch in Fragmenten intakte Knorpelfläche zu sehen. Dies zeigt auch die Quantifizierung der Knochenoberflächen aller vier Gruppen zu diesem Zeitpunkt. So entspricht die messbare Knorpeloberfläche in den Sprunggelenken der hTNFtg-FHL2^{-/-} Maus nur noch einem Drittel der Knorpelfläche, die in Wildtypmäusen zu finden ist. Ein Vergleich mit der hTNFtg-Maus zeigt, dass die vorhandene Knorpelfläche der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus nur 60% der der hTNFtg-Maus entspricht. Um das Ausmaß der destruktiven Arthritis in der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus weiter zu analysieren, wurden 13,5 Wochen alte Mäuse aus jeder Gruppe getötet, die hinteren Extremitäten isoliert, die Knochen von Fell, Bindegewebe und Sehnen frei präpariert und an der Universität von Southampton ausgewertet. Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Neil Smith und Dr. Andrew Moffat wurden die Sprunggelenke dieser Tiere in einem speziellen Micro-Computertomographen (μ CT) analysiert. Zur Rekonstruktion des Tomogramms wurden 1600 Röntgenaufnahmen bei einer Expositionszeit von 2 Sekunden während 360°-Rotationen aufgenommen. Ein vollständiges CT-Image setzt sich aus 1600 einzelner Röntgenaufnahmen zusammen, die zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt wurden.

Wie in Abbildung 27 zu erkennen, unterscheiden sich die Sprunggelenke von FHL2^{-/-}-Mäusen visuell nicht von Sprunggelenken der Wildtyp-Mäuse gleichen Alters (Abb.: 27-A). Der für die FHL2^{-/-}-Maus beschriebene osteoporotische Phänotyp ist hier noch nicht zu erkennen, was auf das geringe Lebensalter der hier betrachteten Mäuse zurückzuführen ist. Wie erwartet zeigen die CT-Aufnahmen der hTNFtg-Maus zum gleichen Zeitpunkt eine deutliche Knochendestruktion im Bereich des unteren und oberen Sprunggelenks. Hier sind nahezu alle Knochen des Sprunggelenks von der Destruktion betroffen (Abb.: 27-A). Darüber hinaus zeigt der distale Gelenkkopf ebenfalls Spuren einer Knochenzerstörung. Im Vergleich dazu zeigt die hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus ein sehr starkes Ausmaß der Knorpelzerstörung sowohl in den Sprunggelenken als auch in den Metatarsalia (Abb.: 27-A und -B). So sind große Teile des oberen Sprunggelenks komplett zerstört. Ebenso ist eine deutliche Destruktion des distalen Tibiakopfes zu erkennen. Das untere Sprunggelenk ist von der Destruktion ebenfalls stark betroffen, so dass nur noch einzelne Fragmente nachgewiesen werden konnten (Abb.: 27-A).

Das im Rahmen dieser Studien unerwartet schwere und umfassende Ausmaß der Knorpel- und Knochenzerstörung korreliert sowohl mit dem beschriebenen regulatorischen Effekt von FHL2 auf die MMP-13-Expression als auch mit dem Expressionsmuster in RA- bzw. hTNFtg-Gewebe und unterstreicht somit die Funktion von FHL2 als kritischen Regulator in der Progression der Knorpel- und Knochenzerstörung in der RA.

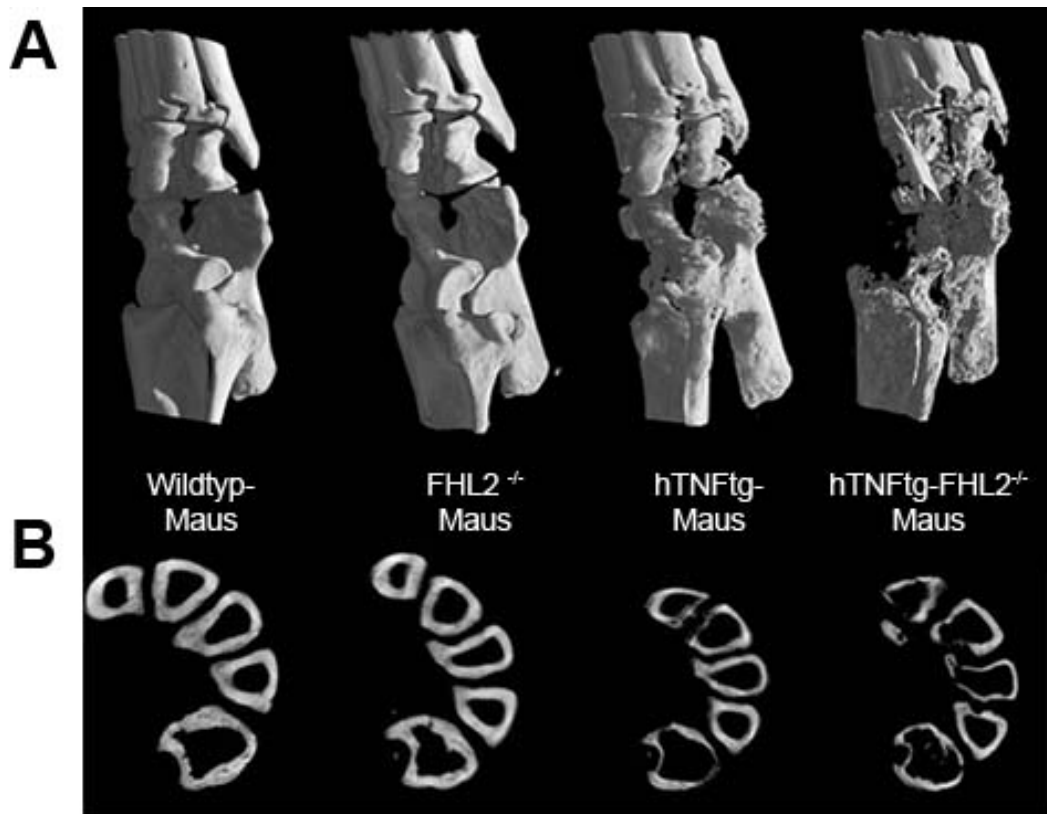


Abb.27: Umfassende Destruktionen in den Knochen der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus (A): Mikro-CT-Aufnahmen der Sprunggelenke aller vier beschriebenen Maus-Typen. Die umfassenden Knochenzerstörungen im Bereich des Sprunggelenks der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Mäuse sind deutlich zu erkennen. **(B):** Mikro-CT-Aufnahmen der Querschnitte der Metatarsalen dieser Tiere. Die Aufnahmen zeigen den Querschnitt der Metatarsalen. Die deutliche Zunahme der Knochenzerstörung bei der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus im Vergleich zur hTNFtg-Maus sind auch in den Metatarsalen deutlich zu beobachten.

5 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse haben eine zentrale Funktion von FHL2 als negativen Regulator der MMP-13-Expression in der RA beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass in initialen Phasen der Knorpeldegradation die Expression von FHL2 im Synovialgewebe stark induziert ist. In Folge einer zunehmenden Chronifizierung und eines pathologisch erhöhten Spiegels proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 kommt es allerdings zu einer umfassenden Inhibition der FHL2-Expression. Obwohl die Hemmung von FHL2 allein keine Auswirkung auf das invasive Verhalten von RASF zeigte, führte sie jedoch zu einer sehr prägnanten Steigerung der TNF α -induzierten Expression von MMP-13. In Folge dessen wurde auch ein deutlich gesteigertes invasives Verhalten der RASF beobachtet. Diese *in vitro* gewonnenen Einblicke in die Funktion des FHL2 Proteins im Verlauf der RA wurden durch vergleichende Studien im Tiermodell gestützt. In der Tat führte die FHL2-Defizienz zu einem sehr umfangreichen Ausmaß und beschleunigtem Verlauf der Knorpel- und Knochenzerstörung in der TNF α -vermittelten destruktiven Arthritis. Eine therapeutische anti-TNF α -Behandlung, die eine signifikante Hemmung der RA zur Folge hat, induzierte wiederum eine erhöhte Expression von FHL2 im Synovialgewebe, was sowohl in RA-Patienten als auch im TNF α -abhängigen RA- Mausmodell beobachtet werden konnte. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines rekombinanten FHL2 in RA-Zellen eine Inhibition der TNF α -induzierten MMP-13-Expression vermittelt. Diese Beobachtungen unterstreichen somit die entscheidende Rolle von FHL2 in der Hemmung der Induktion von knorpelzerstörenden MMPs.

5.1 FHL2 zeigt im Verlauf der RA ein transientes Expressionsmuster

Für die Pathogenese der RA sind aktivierte RASF, die besonders in der synovialen Deckzellschicht lokalisiert sind (Fassbender et al., 1998), entscheidend. Sie vermitteln dort das Anheften an sowie die Degradation von Knorpelmatrix (Müller-Ladner et al., 2007; Meyer et al., 2006; Pap et al., 2000). Vergleichende histologische Analysen des Synovialgewebes von RA- und OA- Patienten zeigten, dass es, im Gegensatz zur Situation im osteoarthritischen Synovium während der Rheumatoiden Arthritis zu einer generell erhöhten FHL2-Expression im Synovium kommt. Diese Expression ist vor allem in der synovialen Deckzellschicht sehr ausgeprägt. Weitere Untersuchungen konnten diese erhöhte FHL2-Expression den aktivierten RASF zuordnen, was sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachzuweisen war. Sehr aufschlussreich ist in diesem Zusammenhang, dass

erhöhte FHL2-Spiegel auch in synovialen Fibroblasten, die *in vitro* für mehrere Passagen und in Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine kultiviert wurden, beibehalten wurden. Diese Beobachtung ist interessant, da RASF aus der Deckzellschicht des rheumatoiden Synoviums stabil aktiviert sind und auch ohne externe Stimuli ihren aggressiv-invasiven Phänotyp beibehalten (Pap et al., 2000). Somit lässt sich die FHL2-Expression im RA-synovialen Gewebe direkt als eine bedeutende Eigenschaft der aktivierten RASF beschreiben. Longitudinalstudien der destruktiven Arthritis in der hTNFtg-Maus zeigen allerdings, dass die erhöhte Expression von FHL2 im synovialen Gewebe transient war. Im Vergleich zum nicht-arthritischen Synovium nimmt die FHL2-Expression in frühen inflammatorischen Stadien und mit Beginn der Knorpeldestruktion in der hTNFtg-Maus stark zu. In Folge der zunehmenden Chronifizierung der destruktiven Arthritis kommt es jedoch zu einer deutlichen Abnahme der FHL2-Expression, welche allerdings nicht bis auf das basale Niveau, des nicht-rheumatoiden Synoviums absinkt. Diese Beobachtung, der transienten Expression von FHL2, ist für das Verständnis der Regulation und der Funktion des FHL2 von zentraler Bedeutung. An dieser Stelle lassen sich eindeutige Parallelen zum Expressionsmuster während der Wundheilung ziehen. In Fibroblasten der Haut ist die FHL2-Expression im Zuge der Wundheilung stark erhöht. Das Protein moduliert hier in Integrin abhängiger Weise die Aktivierung von FAK (focal adhesion kinase) und ERK-Kinasen und unterstützt somit die Regulation fokaler Adhäsionsstrukturen sowie die Matrixassemblierung. Ferner wandert FHL2, stimuliert durch die in die Wunde hinein sekretierten proinflammatorischen Zytokine, in den Zellkern. Hier induziert es, als Ko-Transkriptionsfaktor in Kooperation mit SRF (serum response factor), die Expression von „ α -smooth muscle actin“ und steuert somit die Kontraktilität des granulären Wundgewebes (Wixler et al., 2007, Park et al., 2008; Wang et al., 2006; Hinz et al., 2003; Hinz et al., 2001). In Folge dessen führt die FHL2-Defizienz zu schweren Defekten in der Matrixdeposition sowie der Kontraktilität und des migratorischen Verhaltens mesenchymaler Zellen der Haut, was in umfassenden Wundheilungsstörungen resultiert. Auch im Kontext des chronischen Verlaufs der RA, die in Analogie als „nicht heilende Wunde“ bezeichnet werden kann, wird das FHL2-Protein in synovialen Fibroblasten hochreguliert. Immer wenn eine Wunde entsteht, kommt es zu einer Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Krieg, et al., 2007; Werner et al., 2007; Wynn 2007). Aktivierte Myofibroblasten sezernieren große Mengen von Matrixproteinen, bilden das granuläre Gewebe und sorgen für deren Kontraktilität. Aus diesem Zusammenhang lässt sich die Hypothese ableiten, dass, analog zu dermalen Gewebeschädigungen, FHL2 im Zuge des „Wundheilungsprogramms“ in der Anfangsphase der RA hochreguliert wird. Im Falle der RA gewinnen die inflammatorischen

Prozesse jedoch die Überhand, was zur Hemmung der Wundheilungsprozesse und zum Fortschreiten der Matrixdegradation führt. Im Verlauf der zunehmenden Chronifizierung wird darüber hinaus auch die Expression des FHL2-Proteins gehemmt, ein wichtiger Schritt für die Induktion der MMPs, wie in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte. Somit scheint diese Inhibierung von FHL2 im Gegensatz zu Heilungs- und Regenerationsprozessen zu stehen und begünstigt das Fortschreiten der RA. Diese Theorie lässt sich mit der Beobachtung untermauern, dass eine anti-TNF α -Behandlung (Ghezzi und Cerami 2005) sowohl von RA-Patienten als auch von hTNFtg-Mäusen, die unter der destruktiven Arthritis leiden, nicht nur das Fortschreiten der Krankheit hemmt, sondern auch gleichzeitig die FHL2-Expression induziert.

5.2 Proinflammatorische Zytokine hemmen die FHL2-Expression

Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 sind die zentralen Vermittler inflammatorischer und degradativer Prozesse in RA (Takemura et al., 2001, Zwerina et al., 2007). Obgleich das genaue molekulare Wirken der beiden Zytokine nicht vollständig verstanden ist und zum Teil noch kontrovers diskutiert wird (Zwerina et al., 2007), so sind doch beide Zytokine maßgeblich an der Induktion der RA-relevanten Metalloproteasen MMP-1, MMP-3 und MMP-13 beteiligt (Dreyer et al., 2001; Jeong et al., 2004). In diesem Zusammenhang zeigen unsere Studien, dass sowohl TNF α als auch IL-1 die Expression von FHL2 auf transkriptionaler und translatorischer Ebene hemmen. Ferner ist deutlich zu beobachten, dass die Hemmung von FHL2 in allen unseren Versuchen der Induktion der Expression von MMP-1 oder MMP-13 vorausging. Und mehr noch: eine Überexpression von rekombinantem FHL2-Protein in RASF blockierte sehr effektiv die TNF α -induzierte Expression von MMP-13 in RASF. Die Zytokin-vermittelte Hemmung des FHL2 ist nicht nur RA-spezifisch, sondern scheint vielmehr allgemein gültig zu sein, da aktuellste Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Joos ebenfalls eine IL-1-induzierte Hemmung der FHL2-Expression auch in Chondrozyten oosthritischer Patienten zeigen (Joos et al., 2008). Die durch proinflammatorische Zytokine induzierte Hemmung der FHL2-Expression könnte darüber hinaus eine mögliche Erklärung für die transiente Expression im Verlauf der destruktiven Arthritis in der hTNFtg-Maus sein, da dieses Tiermodell chronische und konstitutiv hohe TNF α -Spiegel aufweist (Keffler et al., 1991).

Es gilt als allgemein bekannt, dass TNF α die MAP-Kinasen p38-MAPK und ERK aktiviert (Suzuki et al., 2000; Goertz et al., 2005, vgl. auch Meyer und Pap, 2005). Dabei ist die

Aktivierung der p38-MAPK ausschlaggebend für die MMP-13-Induktion (Mengshol et al., 2000). Die Analyse einer möglichen Rolle von FHL2 in der TNF α induzierten Aktivierung des p38-Signalweges lieferte überraschenderweise auch erste Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen p38-MAPK und FHL2. So zeigten sie zum einen, dass FHL2 zusammen mit pp38 in einer TNF α -abhängigen Weise in den Nukleus migriert, wo es dann mit p38-MAPK kolokalisiert zu finden ist. Zum anderen demonstrieren die hier gezeigten Experimente eindeutig, dass es, im Vergleich zu Wildtypzellen, in FHL2-defizienten Stammzellen zu einer persistierenden Aktivierung von p38-MAPK nach TNF α -Stimulation kommt. Dies setzt voraus, dass FHL2 selbst einen hemmenden Effekt auf die TNF α -induzierte Aktivierung der p38-Kinase hat. Der genaue Mechanismus der Modulation des p38 Signalweges durch FHL2 muss an dieser Stelle ungeklärt bleiben. Ferner konnten in diesem Zusammenhang noch keine Antworten darauf gefunden werden, warum FHL2 in den Nukleus wandert und ob es dort als Kofaktor der Transkription zusammen mit den durch p-p38 aktivierten Transkriptionsfaktoren agiert. Auch die Frage, ob FHL2 direkt an der Induktion der MMPs beteiligt ist, ist zur Zeit noch unklar. Unsere Beobachtungen werden jedoch von Studien von Joos und Kollegen weitgehend unterstützt. Diese konnten unsere Ergebnisse bestätigen und zeigen, dass die IL-1-vermittelte Hemmung von FHL2 auch in anderen Zelltypen stattfinden kann. Zum anderen zeigten sie eindeutig, dass eine spezifische Hemmung der p38-MAPK die IL-1-vermittelte Hemmung aufhebt und eine Induktion von FHL2 vermittelt. Die Frage, ob die hier beobachteten Effekte der FHL2-vermittelten Hemmung des MMP-13 auf den Eigenschaften der AP-1 Transkriptionsfaktoren jun und fos beruhen, bleibt zu untersuchen. Allerdings ist die AP-1 vermittelte Induktion der MMP-13-Expression über MAPK Signalwege in der Literatur bestens beschrieben. Darüber hinaus konnte auch die Interaktion von FHL2 mit AP-1 bereits nachgewiesen werden (Morlon und Sassone-Corsi, 2003).

Die zentrale Aufgabe des Adaptor-Proteins FHL2 ist es, als eine Art „Gerüst“ den Aufbau und die Ausbildung großer Proteinkomplexe zu vermitteln (Kadrmas and Beckerle, 2004; vgl. auch Johanessen et al., 2006). In diesem Zusammenhang lässt die Beobachtung, dass TNF α neben der Expressionshemmung möglicherweise auch die N-terminale Spaltung von FHL2 induziert, verschiedene Hypothesen zu. So würde die N-terminale Abspaltung eines 20 kDa-großen Proteinfragments, welches in etwa der halben und den ersten beiden LIM-Domänen entspricht, auch die Möglichkeiten zur Ausbildung bestimmter Proteinkomplexe einzuschränken, so dass nur bestimmte Proteinkomplexe aufgebaut werden könnten (vgl. auch Wixler et al., 2000). An dieser Stelle lässt sich die Hypothese aufstellen, dass TNF α die

Spaltung von FHL2 induziert und es zu einer Modulation von FHL2 kommt. Dies beeinflusst wiederum die Interaktion von FHL2 mit transkriptions-relevanten Proteinen, was wiederum die Transkription bestimmter Gene reguliert. In der Tat wurde gezeigt, dass zur Induktion von β -Catenin-vermittelten Genen alle vier Lim-Domänen des FHL2 notwendig sind (Labalette et al., 2004), jedoch zur Induktion der AR-gesteuerten Gene die LIM-Domänen drei und vier ausreichend sind (Müller et al, 2000). Zum gegebenen Zeitpunkt konnte allerdings keine Aussage über eine mögliche Funktion des 20 kDa-FHL2-Fragments gemacht werden. So muss diese Frage an dieser Stelle unbeantwortet bleiben und zum Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

5.3 FHL2 - ein wichtiger Regulator der MMP-13-Expression

Im Kontext der TNF α bzw. IL-1-vermittelten Hemmung der FHL2-Expression ergab sich die Frage nach der funktionellen Relevanz von FHL2 während der RA. Die zentrale Rolle von p38-MAPK in der Regulation von FHL2 wurde bereits an anderer Stelle erläutert (diese Arbeit und Joos et al., 2008). In den hier beschriebenen Studien konnte neben der Kollokalisierung von FHL2 mit p38-MAPK auch der Beweis geführt werden, dass FHL2-defiziente Zellen eine länger anhaltende TNF α -induzierte p38-MAPK-Aktivierung zeigen. Diese Beobachtung ist umso spannender, da p38-MAPK auch die Expression von MMP-13 induziert (Mengshol et al 2000). In diesem Zusammenhang beweisen die Stimulationskinetiken in RASF, dass es erst nach der TNF α -vermittelten Hemmung von FHL2 zu einer vollständigen Induktion der MMP-13-Expression kommt. Wichtig dabei ist, dass das Fehlen von FHL2 allein keine MMP-13-Expression induziert. Vielmehr zeigen unsere RNAi-Studien, dass erst das Ausschalten von FHL2 die TNF α -induzierte MMP-13-Expression erhöht, was sich direkt auf ein deutlich gesteigertes aggressiv-invasives Verhalten der RASF auswirkt. Dies unterstreichen zum einen die Analysen im MATRI-Assay, zum anderen auch die schnell fortschreitende und umfassende Knorpeldegradation in der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus. Im Kontrast dazu unterbindet eine konstitutive Überexpression von exogenem FHL2 die TNF α -induzierte MMP-13-Expression vollständig. Daher erscheint es in dieser Hinsicht auch schlüssig, dass die FHL2-Expression über TGF- β stimuliert werden kann und darüber hinaus die TNF α -induzierte Hemmung die FHL2-Expression aufhebt. TGF β kann nicht nur die Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglycanen und damit den Aufbau der ECM stimulieren (Blaney et al., 2006; Glansbeek et al., 1998; Sarkissian et al., 1996), vielmehr ist TGF β auch ein Gegenspieler der IL-1 vermittelten Matrixdegradation (Hui et al.,

2000). Dies deckt sich auch mit der Funktion von FHL2 in Wundheilungsprozessen (Wixler et al., 2007). Aus diesem Kontext ergibt sich die Hypothese, dass das FHL2 ein elementarer Faktor in der Vermittlung von Heilungsprozessen nach umfangreichen Gewebeschädigungen ist. Somit unterstreichen unsere Studien eine zentrale, regulatorische Funktion des FHL2 in der MMP-13-Synthese und einen direkten Einfluss auf die Invasivität der RASF.

5.4 Die umfassende Knochenzerstörung in der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus – Ein Hinweis auf die Involvierung aktivierter Osteoklasten?

Die bis hierher diskutierten Ergebnisse unterstreichen eine zentrale Funktion von FHL2 in der Inhibierung der MMP-vermittelten Knorpeldestruktion sowie der Vermittlung von Heilungsprozessen in der chronischen inflammatorischen Arthritis. In diesem Kontext bezog sich die vorliegende Arbeit primär auf destruktive Prozesse, die die Knorpelstrukturen und die Knorpelmatrix betreffen. Die histologischen Analysen der Sprunggelenke und die Auswertung der μ CT-Aufnahmen der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus zeigen, dass die FHL2-Defizienz bei einem gleichzeitig konstitutiv erhöhten TNF α -Spiegel zu einer deutlichen Progression der destruktiven Arthritis führt. Zum anderen ist zu erkennen, dass sich das umfassende und schwere Ausmaß der Knorpel- und Knochenzerstörung nicht allein durch eine stark gesteigerte MMP-Expression erklären lässt. Die physiologische Bedeutung von FHL2 in der Osteogenese wurde bereits einleitend erläutert. FHL2 interagiert als Koaktivator mit dem „runt-related transkription factor 2“ (RUNX 2), einem der Hauptregulatoren der Osteoblastenaktivierung (Ducy et al., 1997). Im Tiermodell konnte darüber hinaus die FHL2-Defizienz mit einer verzögerten Osteoblastendifferenzierung sowie einer verminderten Osteoblastenaktivität in Verbindung gebracht werden, was die Ausbildung einer Osteopenie in diesen Tieren unterstützt (Günther et al., 2005). Darüber hinaus ist FHL2 auch an den elementaren Steuerungsvorgängen der Knochenresorption beteiligt. Dieser primär durch Osteoklasten vermittelte Prozess wird über den RANKL-RANK-Signalweg induziert (Teitelbaum et al., 2000; Lacey et al., 1998), was unter anderem eine intrazelluläre Stimulation der TRAFs zur Folge hat (Dougall et al., 1999; Lam et al., 2001; Bradley und Pober, 2001). Der RANK-Rezeptor gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren (Cheng et al., 2003 Review). TRAF6 ist in diesem Zusammenhang ein Osteoklasten-spezifischer Vermittler der RANK-induzierten Osteoklastogenese (Cao et al., 1996; Ye et al., 1999), der darüber hinaus ein Interaktionspartner von FHL2 ist (Bai et al., 2005). Hier konnte ferner nachgewiesen werden, dass FHL2 zum einen ausschließlich in aktivierten Osteoklasten

exprimiert wird, und dass zum anderen durch die Bindung von FHL2 an TRAF6 die RANKL-induzierte Aktivierung von NFκB unterdrückt wird. In Folge dessen kommt es zu einer Hemmung der Osteoklasten. Diese Beobachtungen liefern einen möglichen Erklärungsansatz für die umfangreichen Knochendestruktionen in der hTNFtg-FHL2^{-/-}-Maus. Denn neben der gesteigerten MMP-vermittelten Matrixdegradation unterstützt die FHL2-Defizienz sowohl eine Verlagerung des Osteoblasten-Osteoklasten-Verhältnisses zu Gunsten der knochenresorbierenden Osteoklasten, als auch die persistente Aktivität der Osteoklasten, was den Abbau von Knochenstrukturen beschleunigt. Diese Theorie könnte eine Erklärung für die umfassenden Knochenzerstörungen in den Sprunggelenken, aber auch in den Metatarsalen, liefern

5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der hier dargestellten Arbeit lassen darauf schließen, dass FHL2 einen deutlichen anti-arthritischen Effekt zeigt. Die Expression von FHL2 im synovialen Gewebe ist im Verlauf der RA transient. Es wird in frühen, vorwiegend inflammatorischen Phasen und im Zuge von Wundheilungsprozessen hochreguliert und erst nach der Senkung des FHL2-Proteinspiegels, kommt es zur Expression von Matrix-zerstörenden Proteasen und als Folge dessen zu einem Fortschreiten der Knorpel- und Knochendestruktion (Abb.: 28). Dies lässt die Hypothese zu, dass das Verhältnis der proinflammatorischen ($\text{TNF}\alpha$ und IL-1) zu den profibrotischen Zytokinen ($\text{TGF}\beta$) entscheidend ist, ob es zu einer Heilung der „rheumatoiden Wunde“ kommt, oder ob die RA in die chronische Phase übergeht. Die Menge des FHL2-Proteins in synovialen Fibroblasten ist an dieser Stelle entscheidend für die Richtung, in die sich die Entzündung in den Gelenken entwickelt.

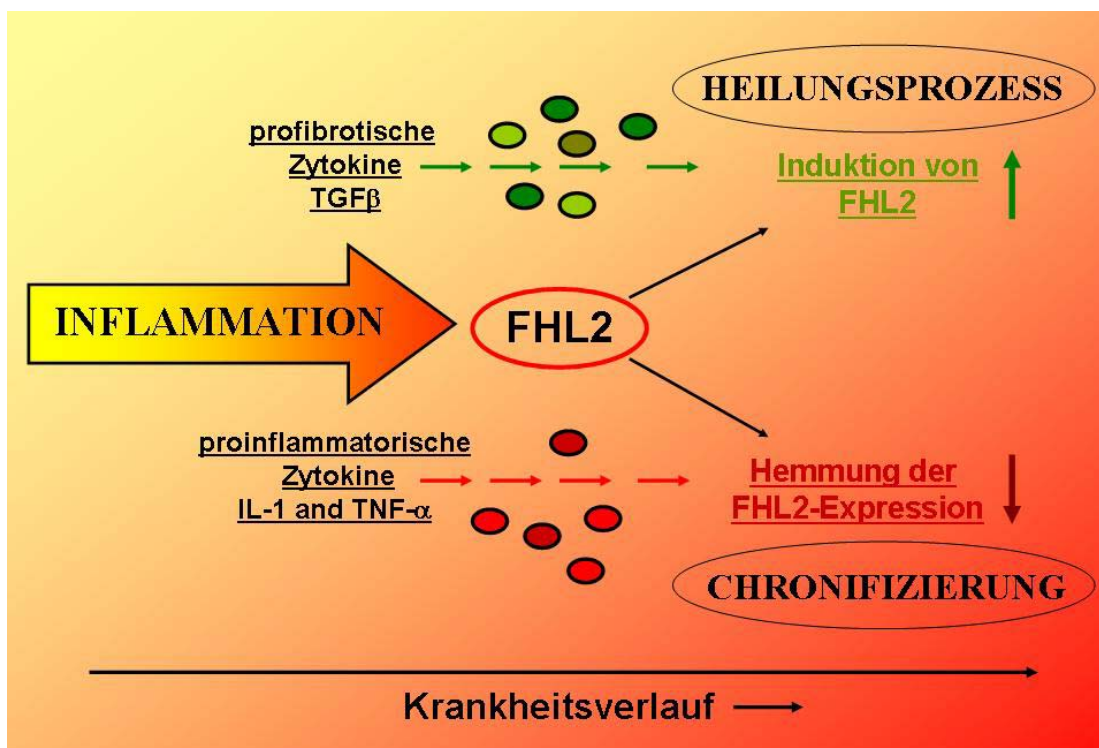


Abb.28: FHL2 – zwischen Wundheilung und Chronifizierung: Das Verhältnis von proinflammatorischen zu profibrotischen Zytokinen ist entscheidend für den Krankheitsverlauf. Proinflammatorische Zytokine inhibieren FHL2 und es kommt zu einer zunehmenden Chronifizierung der Knorpel- und Knochenzerstörung. Profibrotische Zytokine induzieren die FHL2-Expression und leiten somit Wundheilungsprozesse ein.

6 Material und Methoden:

6.1 Biologisches Material

6.1.1 Eukaryotische Zellen

- RASF: Primärkultur synovialer Fibroblasten aus Gewebeproben von Patienten mit der Diagnose der Rheumatoider Arthritis
- OASF: Primärkultur synovialer Fibroblasten aus Gewebeproben von Patienten mit der Diagnose der Osteoarthritis.
- MDCK-C7-Zellen: Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen. Epithelzelllinie aus dem Sammelrohr der Hundeniere mit C7-Plasmid subkloniert (Zak et al, 2000)
- Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von FHL2-defizienten und Wildtypmäusen
- A7: Maligne humane Melanoma-Zelllinie, stabil transfiziert mit dem „Actin Binding Protein“ (Cunningham et al., 1992)

6.1.2 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5 α : für Klonierungen/Vermehrung von Plasmid-DNA (Grant et al., 1990). Genotyp: F^- *endA1 hsdR17 (r_m⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 α^- recA1 gyrA96 relA1 deoR D(lacZYA-argF)-U169 α 80dlacZ α M15*
- *Escherichia coli* BL21: zur rekombinanten Expression eukaryotischer Proteine (Studier et al., 1990). Genotyp: F^- *ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)*

6.1.3 Plasmidvektoren und siRNAs

Plasmidvektoren

- pCS2+MT: eukaryotischer Expressionsvektor für die Expression von 5x/6x myc-markierten Proteinen (Wixler et al., 2000)

siRNAs

FHL2 r(CCC GUU GCG UCA AGU CUA A) dTdT (Hs_FHL2_2HP siRNA)

SCR r(UUA GAC UUG ACG CAA CGG G)dAdG-3'

Die verwendeten siRNAs wurden von Qiagen/Hilden bezogen

6.1.4 Primersequenzen

Primer für Genotypisierungen der FHL2^{-/-}-Maus:

FHL2 1560: 5'-AAG ATG GAT TGC ACG CAG GTT-3'
 FHL2 1561: 5'- ATC ACG GGT AGC CAA CGC TAT- 3'
 FHL2 1647: 5'-TGA CTA AAC GTT TGA CTG C - 3'
 FHL2 1648: 5'- ATG GGT GTT CCA CAC TCC TC- 3'

Primer für die Genotypisierung der hTNFtg-Maus:

hTNFtg sense: 5'-TAC CCC CTC CTT CAG ACA CC - 3'
 hTNFtg anti-sense: 5'- GCC CTT CAT AAT ATC CCC CA -3'

Primer für qRT-PCR:

FHL2 sense: 5'-CCA GGA GTC AAA ATG ACT GAG CG-3'
 FHL2 anti-sense: 5'-CAG GGT CTC AAA GCA CAC CAC -3'
 MMP-1 sense: 5'-GAC AGA AAG AGA CAG GAG AC-3'
 MMP-1 anti-sense: 5'-GAG TTA TCC CTT GCC TAT CC-3'
 MMP-3 sense: 5'-GAA GAG AAA TTC CAT GGA GCC AGG-3'
 MMP-3 anti-sense: 5'- AGA AAT AAA AGA ACC CAA ATT CTT CAA AAA CA-3'
 MMP-13 sense: 5'- GAC TTC ATC TTC ATC TTC AG-3'
 MMP-13 anti-sense: 5'- AGA GTC TTG CCT GTA TCC TC-3'

Primer zur spezifischen Amplifikation einzelner LIM-Domänen des FHL2

LIM1/2-up: 5'-CCA GGA GTC AAA ATG ACT GAG CG-3'
 LIM-1-up: 5'-CAG GGT CTC AAA GCA CAC CAC- 3'
 LIM-1-down: 5' CTC GTT GGA ATA GCA GTC TG-3'
 LIM2-up: 5'-TCA TCC AAG TGC CAG GAA TG-3'
 LIM2-down: 5'- TTG TTT CTC ATA GCA GGG CAC-3'
 LIM3-up: 5'-CAT GCC ATG CAGTGC GTT CAG TG-3'
 LIM3-down: 5'-CAA GTC ACA GAA GCA GTT CAG-3'
 LIM4-up: 5'-TAT GCC AAG AAG TGT GCT GGG TGC-3'
 LIM4-down: 5'- GAT GTC GGC TTC TTC AAG CG-3'

6.1.5 Antikörper

primäre Antikörper

- | | | | |
|-----------------------|-----|-----------|-------------------------------------|
| • anti-FHL2 | mAb | Maus | Klon F4B2-B11 (Samson et al., 2004) |
| • anti- β Aktin | mAb | Maus | Cell Signaling Danvers/ USA |
| • anti-phospho-p38 | pAb | Kaninchen | Cell Signaling Danvers/ USA |
| • anti-MMP-13 | pAb | Kaninchen | Chemicon/ USA |

sekundäre Antikörper

für Westernblots

- | | | | | |
|------------------|-----|--|---------|---------|
| anti-Maus | IgG | | Dianova | Hamburg |
| • anti-Kaninchen | IgG | | Dianova | Hamburg |

für Immunhistologie

- | | | | |
|----------------|-----|-----------------|------------------------|
| anti-Maus | IgG | Biotin-gelabelt | Linaris GmbH Wertheim- |
| anti-Kaninchen | IgG | Biotin-gelabelt | Linaris GmbH Wertheim |
| anti-Ziege | IgG | Biotin-gelabelt | Linaris GmbH Wertheim |
| anti-Pferd | IgG | Biotin-gelabelt | Linaris GmbH Wertheim |

für Immunfluoreszenz

- | | | | | |
|----------------|-----|-----|---------|---------|
| anti-Maus | IgG | Cy3 | Dianova | Hamburg |
| anti-Kaninchen | IgG | Cy2 | Dianova | Hamburg |

6.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem, Darmstadt
- Merck KGaA, Darmstadt
- Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
- Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Novitec GmbH, Freiburg
- R&D-Systems GmbH,
- AMAXA GmbH, Köln
- GibCo GmbH, Karlsruhe
- Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- BioRad GmbH, München
- INAMED, Fremont/ USA
- PAA Laboratories GmbH, Engelsbach
- BioChrom GmbH, Berlin
- Serva GmbH, Heidelberg

6.3 Puffer und Lösungen

Triton-Lysepuffer

Tris/HCl pH 7.5	50	mM
NaCl	150	mM
MgCl ₂	10	mM
Triton-X 100	1	%
Glyzerin	10	%
Aprotinin	5	µg/mL
Leupeptin	5	µg/mL
Natrium-Orthovanadat	1	mM
Phenylmethylsulfonylchlorid (PMSF)	1	mM

ECL-Lösung

Tris/HCl pH 8.5	100	mM
Luminol	2,5	mM
p-Cumarsäure	0,45	mM
H ₂ O ₂	0,01	%

Entfärbelösung für Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gele

Eisessig	10	%
Methanol	40	%

4x Lämmli-Probenpuffer

Tris/HCl pH 6.8	200	mM
β-Mercaptoethanol	1,4	M
Glyzerin	40	%
Sodiumdodecoelsulfat (SDS)	10	%
Bromphenolblau	0,1	%
EDTA	4	mM

Laufpuffer für SDS-PAGE

Tris	25	mM
Glyzin	250	mM
SDS	0,1	%

Ponceau S-Reagenz

Ponceau S	0,2	%
Trichloressigsäure TCA	3	%
Strippingpuffer für Westernblot Membranen		
Tris/HCl pH 6.8	62,5	mM
β-Mercaptoethanol	100	mM
Sodiumdodecoelsulfat (SDS)	2	%
Tris Buffered Saline + Tween-(TBST) - Puffer		
Tris/HCl pH 7.5	50	mM
NaCl	150	mM
Triton-X 100	0,2	%
Transferpuffer für Westernblots		
Tris	25	mM
Glyzin	192	mM
Methanol	10	%

6.3.1 Sonstige Puffer und Lösungen**6x DNA-Auftragspuffer**

Brilliant Blue	0,5	%
Glyzerin	50	%
in TAE-Puffer		

Einfriermedium für eukaryotische Zellen

D-MEM-high Glucose	80	%
FCS	10	%
DMSO	10	%

Genotypisierungspuffer 1 (Lyse-Puffer)

Tris/HCl pH 8,5	100	mM
EDTA (mit NaOH) pH 8,0	5	mM
NaCl	200	mM
SDS	0,2	%

Genotypisierungspuffer 2 (Proteinase K)

Proteinase K	100	mg
Tris-HCl pH 8,0	(1M-Stock)	250 μ l
CaCl ₂	(1M-Stock)	5,0 μ l
H ₂ O	4,75	ml
alliquotiert zu 500 μ l, gelagert bei -20°C		

Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
KH ₂ PO ₄	1,4	mM
Na ₂ HPO ₄	4,3	mM

TAE Puffer

Tris	40	mM
Natriumacetat	3	mM
EDTA	1	mM

10x Toluidin-Lösung

Toluidin	1	g
di-Natriumtetraborat	1	g
ad dest. H ₂ O	100	ml
abschließend zweimal filtrieren		

6.4 Bakterielle Kulturmedien

- LB-Broth (Sigma Aldrich, Karlsruhe) 20 g/L
- LB Agar (Sigma Aldrich, Karlsruhe) 35 g/L

Bei Selektionsmedien wurde 100mg/mL Ampicillin zugegeben.

6.5 Kulturmedien und Zusätze für eukaryotische Zellen

- D-MEM high Glucose (+ GlutaMAX): PAA Laboratories GmbH , Engelsbach
MEM high Glucose, PAA Laboratories GmbH, Engelsbach
- Fötales Kälberserum: Biochrom GmbH, Berlin
- Trypsin-EDTA: PAA Laboratories GmbH, Karlsruhe
- Transformal Growth Faktor-beta (TGF- β), R&D-Systems GmbH, Wiesbaden-Engelstedt
- Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF α), Novitec, Freiburg
- IL-1 β , TGF- β , R&D-Systems GmbH, Wiesbaden-Engelstedt

6.6 Molekularbiologische Kits

- BCA Protein Assay Reagent: Pierce, Bonn
- Bradford Protein Assay Reagent: Bio-Rad, München
- Plasmid-Mini-Kit: Qiagen, Hilden
- RNAeasy Kit: Qiagen, Hilden
- First-Strand cDNA Synthese Kit: Fermentas, St. Leon Roth
- Fast StartSYBR Green I Kit: Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
- AMAXA-NHDF Nucleofactor Kit. AMAXA GmbH, Köln

6.7 Histologische Kits

Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, über Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen

6.8 Sonstige Reagenzien

- 100 bp-DNA-Leiter: Fermentas, St.Leon-Rot
- Prestained Protein Marker: Sigma Aldrich, Karlsruhe
- Acrylamid/Bisacrylamid Lösung „Gel 30“: AppliChem, Darmstadt

- HiPerFect- Transfektionsreagenz: Qiagen, Hilden: Roche, Mannheim
- Desoxyribonucleotide: Fermentas, St.Leon-Roth.
- Oligonukleotide: Fermentas: St.Leon-Roth.
- Glutathion-Sepharose: Amersham Biosciences, Uppsala

6.9 Verbrauchsmaterialien

- Röntgenfilme: Hyperfilm: Amersham Biosciences, Uppsala/ Schweden
Cronex 5: Agfa, Köln
- Gel Blotting Papier: Schleicher & Schuell, Dassel
- Nitrozellulosemembran Protran : Schleicher & Schuell, Dassel
- Zellkulturschalen: Falcon-BD Bioscience USA; Greiner bio-one, Solingen; Nunc GmbH& Co KG, Wiesbaden; TPP AG, Trasadingen/ Schweiz

6.10 Geräte und Software

- Agarose-Gelelektrophoreseapparaturen: Bio-Rad, München
- Acrylamid-Gelelektrophoreseapparaturen: Bio-Rad, München
- CO₂-Begasungsbrutschrank für Zellkultur: Thermo Forma CO₂-Inkubator-
ThermoScientific, Frankfurt
- ELISA Reader: Victor 3, Perkin Elmer, Massasschusetts/ USA
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit Apotome: Zeiss, Göttingen
Kamera AxioCam MRm: Zeiss, Göttingen
Auswertungssoftware AxioVision: Zeiss, Göttingen
Software für die Quantifizierung von Fluoreszenz-Intensitäten: SlideBook 4.1,
Intelligent Imaging Innovations GmbH, Göttingen
- Geldokumentationsanlage: Transiluminator, PecLab
Software:
- Inversmikroskop Axiovert 40 C: Zeiss, Göttingen
- PCR: iCycler, BioRad, München
- Photometer BioPhotometer: Eppendorf, Hamburg
- Röntgenfilm-Entwicklermaschine Curix 60: Agfa, Köln
- STX-2-Elektrode: World Precision Instruments-Europe, Berlin
- Westernblot: Transblot, Semi Dry Transfer Cell, BioRad, München

6.11 Methoden

6.11.1 Tiermodelle

Die in Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente wurden mit Zustimmung der Ethikkommission und unter Beachtung der Leitlinien im Umgang mit Versuchstieren des Universitätsklinikums Münster durchgeführt.

Es wurden folgende Mausstämme verwendet:

hTNFtg-Maus (Stamm Tg197; genetischer Hintergrund C57BL6)

FHL2^{-/-}-Maus (genetischer Hintergrund C57BL/6)

FHL2^{+/+}-Maus (genetischer Hintergrund C57BL/6)

6.11.2 Generierung der FHL2^{-/-}-hTNFtg Maus

Zur Generierung der FHL2^{-/-}-hTNFtg Maus wurden heterozygote hTNFtg-Mäuse (Stamm Tg 197; genetischer Hintergrund C57/BL6) mit homozygoten FHL2^{-/-} Mäusen (genetischer Hintergrund C57/BL6) verpaart. Die Entstandenen F1-Hybriden wurden dann mit FHL2^{-/-} Mäusen verpaart.

6.11.3 Genotypisierung

Zu Überprüfung des genetischen Hintergrunds wurden alle Mäuse entsprechend genotypisiert. Dazu wurde die genomische DNA aus Schwanzspitzen gewonnen und mit Proteinase K (Genotypisierungspuffer 2 / 20µl) in 500 µl Genotypisierungspuffer bei 55 °C über Nacht verdaut. Die Lysate wurden bei 10000 upm zentrifugiert um Haare und Gewebereste zu pellettieren. Die genomische DNA aus den Überständen wurden mit dem High Pure PCR-Purification Kit (Roche Diagnostics/ Mannheim) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR-Analyse:

6.11.4 Klinisches Scoring der Arthritisschäden in Mäusen

Die Bestimmung der klinischen Stadien der Arthritis-Erkrankung, sowie Körpergewichtsmessung wurde in allen Mäusen wöchentlich ab dem Alter von vier Wochen nach Zwerina et al. 2007 durchgeführt. Die Griffstärke wurde über das Festhalten der Mäuse an einem Gitter mit definiertem Querstrebenabstand an alle vier Pfoten bestimmt und auf

einer Scala von 0 bis -3 dokumentiert. (0 = normale Griffstärke; -1 = leicht reduzierte Griffstärke; -2 stark reduzierte Griffstärke; -3 = keine messbare Griffstärke).

6.11.5 MicroCT-Imaging

Zur Bestimmung der Knochenzerstörung in den Sprunggelenken der Mäuse wurden diese in einem Röntgen Computer Tomograph (XTec BenchTop CT160Xi (X-Tec Group Ltd/, Großbritannien) analysiert. Die generierte molybdän-basierende Röntgenstrahlung, welche durch die zu analysierende Probe Transmittiert wird und von einem CMOS-Detector mit einer Auflösung von 1200x 1200 Pixeln detektiert. Zur Rekonstruktion des Tomogramms wurden 1600 Röntgenaufnahmen bei einer Expositionszeit von 2 Sekunden während 360°-Rotationen mit aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit der CT Pro Client-Software (X-Tec Group Ltd./ Großbritannien) ausgewertet und mit VG Studio Max (Volume Graphics GmbH/ Frankfurt) visualisiert. Es wurden tomographische Aufnahmen von FHL2^{-+/+}; FHL2^{-/-}, FHL2^{+/+}hTNFtg und FHL2^{-/-}hTNFtg-Mäusen analysiert.

6.11.6 DNA-Methoden

6.11.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um Plasmid-DNA von höherer Reinheit und in präparativem Maßstab zu gewinnen, wurden „Plasmid-Miniprep-“ (2 mL Bakterienkultur) und „Midipräp-Kits“ (50 mL Bakterienkultur) benutzt. Die DNA wurde über alkalische Lyse und eine Anionenaustauschmatrix nach Angaben der Hersteller gereinigt.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose (1-2%) in TAE-Puffer ausgekocht. Diese Lösung wurde auf ca. 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (0,5 µg/mL), in eine Gelform (Biometra, Göttingen) gegossen und ein Kamm eingesetzt. Das erkaltete und somit polymerisierte Gel wurde in eine Gellaufkammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Darüber hinaus wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (90 Volt). Die DNA-Banden wurden anschließend unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und photographiert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewandt (Mullis et al., 1986). Für Klonierungen wurde wegen ihrer „Korrekturlese-Aktivität („proofreading“)-Aktivität die Expand High Fidelity Taq-Polymerase verwendet, bei konventionellen PCRs dagegen rekombinant hergestellte Taq-Polymerase. Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Matrizen DNA	variabel
Primer 1 und 2	je 30 pmol
10x Puffer 2 für HiFi Taq (mit MgCl ₂)	5 µL
dNTPs	200 µM
Taq-Polymerase	0,75 µL
Wasser	ad 50 µL

Das PCR-Programm wurde je nach Länge des PCR-Produktes und nach der Schmelztemperatur der Primer gestaltet:

94°C	5 min (Denaturierung der DNA)	
94°C	45 s	
53-58°C	30 s (Primeranlagerung)	} 30 Zyklen
72°C	45 bis 90 s (Polymerase)	
72°C	5 min	

Um die Menge und Größe des PCR-Produkts zu überprüfen, wurden anschließend 15 µL des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt, die Banden unter Ultraviolett-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

Quantitative Real Time _Polymerase Kettenreaktion (qRT- PCR)

Zur quantitativen Bestimmung von Ribonucleinsäuren wurde die mRNA aus stimulierten bzw. unstimulierten Zellen mit dem RNAeasy-Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit dem „First-Strand cDNA-Synthese Kit von Fermentas gemäß dem Herstellerangaben wobei jeweils 1 bis 1,5 µg Gesamt RNA für die reverse Transkription eingesetzt wurden. Die quantitative „real-time“ RT-PCR wurde mit der „Light Cycler“-Technologie (Stratagene/ USA) und dem Fast Start Cyber Green I Kit (Stratagene/ USA) für Amplifikation und Detektion durchgeführt. In allen Assays wurde die Amplifikation mit einem standardisiertem Programm durchgeführt:

95°C	10 min (Denaturierung der DNA)	
95°C	30 s	
60°C	60 s (Primeranlagerung)	} 40 Zyklen
72°C	60 s (Polymerase)	

Schmelzpunktanalyse in 0,1 °C Schritten

Die Reaktion wurde in 96-Loch-Platten durchgeführt, wobei in jedes 5,4 µl cDNA und 6,6 µl Cyber Green Master Mix (Stratagene) gegeben wurde. Zu internen Kontrolle und als Referenz wurde die Amplifikation des Gen der GAPDH verwendet.

Transformation chemisch kompetenter Bakterienstämme mit Plasmid-DNA Verdau, Ligation und Transformation

Die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde in chemisch kompetenten *E. coli* Bakterienstämmen durchgeführt. Für die Transformation wurde die Menge der entsprechenden Plamid-DNA mit 100 µL einer Suspension von Hitzeschock kompetenten Bakterien gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte bei 42°C der Hitzeschock für 45 Sekunden, bei dem die DNS aufgenommen wird. Die Bakterien wurden zunächst für eine Stunde in LB-Medium ohne Ampicillin (100 µg/ml) Antibiotikum bei 37°C geschüttelt und dann auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienklone gepickt und in 4 mL LB-Medium mit Antibiotikum über 12 Stunden kultiviert. Aus diesen Vorkulturen wurden dann in 150ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt und über 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Die Kulturen wurden dann abzentrifugiert und die amplifizierte Plasmid-DNS isoliert.

Herstellung Hitzeschock kompetenter E. coli Bakterien nach Inoue et al., 1990:

Zunächst wurden Bakterien der *E. coli* Stämme DH5α oder BL21 auf LB-Platten ausgestrichen. Ein einzelner Klon wurde dann in 5 mL LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert und 2 mL der Kultur in 250 mL Medium überführt. Dieser Ansatz wurde bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend zehn Minuten auf Eis gestellt, abzentrifugiert (3000 rpm, zehn Minuten) und in 40 mL vorgekühltem TB-Puffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, jedoch mit nur 10 mL TB-Puffer. Schließlich wurde tropfenweise unter Schwenken DMSO bis zu einer Konzentration von 7% zugegeben. Die Bakterien wurden für zehn Minuten auf Eis inkubiert und in Aliquots aufgeteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

6.11.8 Protein-Methoden

Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen

Je nach Experiment wurden, Triton-Lysepuffer mit 1mM Natriumvanadat, 1 mM PMSF und 5 µg/ml Leupeptin und 5 µg/ml Aportinin zur Herstellung von Ganzzelllysaten verwendet. Die Zellen wurden entweder direkt auf der Kulturschale oder in Suspension mit PBS gewaschen, auf Eis überführt und mit 70- 150 µl Lysepuffer versetzt (z.B. 150 µL pro 6 cm Kulturschale). Die Lyse wurde unter mehrmaligem Schwenken auf Eis durchgeführt. Nach 20 Minuten wurden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (4°C, 10 Minuten, 14000 rpm.) und der Überstand verworfen. 1 µL des Lysats wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Nanodrop-Systems (PeqLab) verwendet. Als Standard wurden unterschiedliche Konzentrationen von BSA, gelöst im jeweiligen Lysepuffer, verwendet.

Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zelllysate oder (ko-)präzipitierte Proteine wurden durch vertikale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Zunächst wurden die Gele zwischen zwei Glasplatten gegossen (Bio-Rad Apparatur). Das eigentliche Trenngel wurde nach der Polymerisation mit dem Sammelgel, in dem Probenaschen mit einem Kamm ausgespart wurden, überschichtet. Die Gellösungen für ein Gel von 1 mm Dicke setzten sich folgendermaßen zusammen:

Trenngel	7,5%	10%	12,5%
30% Acryl/Bisacryl-Mix (37,5 : 1)	2,5 mL	3,3 mL	4,2 mL
1M Tris/HCl pH 8.9	3,7 mL	3,7 mL	3,7 mL
H ₂ O	3,6 mL	2,8 mL	2,0 mL
20% SDS	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	2 µL	2 µL	2 µL
10% APS	100 µL	100 µL	100 µL

Sammelgel	4,3%
30% Acryl/Bisacryl-Mix (37,5 : 1)	715 μ L
1M Tris/HCl pH 6.8	890 μ L
H ₂ O	3,32 mL
20% SDS	25 μ L
TEMED	5 μ L
10% APS	50 μ L

Die Proteinproben wurden 1:4 mit 4x Lämmli-Probenpuffer gemischt und für zwei Minuten bei 95°C aufgeköcht. Der Probenpuffer enthielt β -Mercaptoethanol, um Disulfidbrücken zu reduzieren und Natriumdodecylsulfat (SDS), um die Proteine zu denaturieren. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Gellaufkammer eingespannt und der Laufpuffer zugegeben. Nach dem Beladen wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe bei 110 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Spur wurde zum Vergleich mit einem Marker mit Proteinen bekannter Größe beladen. Die Gele wurden für Westernblot Analysen weiterverwendet.

6.11.9 Zellkultur-Methoden

Allgemeine Kultivierung verschiedener Zelllinien

Die verwendeten Säuger-Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Einwegkulturflaschen kultiviert. Alle Zellen wurden regelmäßig vor oder bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens aufgesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal in PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA benetzt (1 mL pro 75 cm² Schale). Nach etwa zwei bis fünf Minuten bei 37°C hatten die Zellen sich abgelöst und wurden in neuem serumhaltigem Medium aufgenommen und davon, je nach Proliferationskapazität der Zelllinie, zwei bis zwanzig Prozent zurück in die Schale gegeben und mit entsprechendem Kulturmedium versehen.

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
Primärzellen humaner synovialer Fibroblasten	D-MEM high Glucose	10% FCS, Pen/Strep
Primärzellen muriner Synovialer Fibroblasten	D-MEM high Glucose	10% FCS, Pen/Strep
Mesenchymale Knochenmark-stammzellen	60% D-MEM low Glucose, 40% MCDB 201	2% FCS, Pen/Strep, 1x Insulin Transferrin, 1x Linoleic acid-albumin, 10 nM Dexamethasone, 0,1 mM Ascorbic acid, 5 ng/ mL PDGF, 10 ng/mL EGF
MDCK-C7-Zellen	MEM-Medium	10%FCS, Pen/Strep
A7	MEM-Medium	10%FCS, Pen/Strep

Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Um Zellen langfristig aufzubewahren, wurden Alliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin-EDTA abgelöst und bei 1200 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in Einfriermedium resuspendiert (4 mL für eine 10 cm Schale) und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden über Nacht in Styroporboxen langsam auf -70°C gekühlt und dann in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Die so eingefrorenen Zellen wurden zum Auftauen in ein 37°C Wasserbad gestellt und anschließend in einen zehnfachen Überschuss Kulturmedium pipettiert. Um das DMSO zu entfernen, wurde die Suspension zentrifugiert (1200 rpm, fünf Minuten) und die Zellen im jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde stets das Medium gewechselt.

Isolierung synovialer Fibroblasten aus humanem und murinen Gewebe

Zur Gewinnung einer Primärzellkultur synovialer Fibroblasten wurde synoviales Gewebe zerkleinert und mit DMEM-Medium ohne Zusätze gespült um Reste von Blut und Fettgewebe zu entfernen. Das Gewebe wurde dann in Dispase (0,5mg/ 20 ml) in DMEM Medium ohne Zusätze aufgenommen und 60 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde dann durch eine "Filter-Cartridge" (Falcon) gegeben um größere Gewebestücke abzutrennen. Das Filtrat wurde 10 Minuten bei 1500 upm. zentrifugiert und die pelettierten Zellen in DMEM-Medium mit Zusätzen aufgenommen und in eine Zellkulturschale gegeben. Nach etwas 48 Stunden wurde das Medium gewechselt. Bevor die Primärzellen einen konfluenten Zustand erreicht haben, wurden sie im Verhältnis 1:2 gesplittet.

FHL2 knock down mit Hilfe von siRNA

Zur Unterdrückung der Zellulären FHL2-Expression wurden Fibroblasten mit „small interfering RNA (siRNA) behandelt. Die Transfektion von Fibroblasten mit FHL2-spezifische siRNA (Gen Bank accession number NM_001039492- Qiagen, Köln) erfolgte mit dem HiPerFect-Transfektion Kit (Qiagen, Köln) gemäß Herstellerangaben (5 nm siRNA). Nach zwölf Stunden wurde das Medium gewechselt und gegebenenfalls die Zellen mit Zytokinen stimuliert. Als Kontrolle wurde so genannte „gescrambelte" siRNA (5 nM siRNA) als Kontrolle eingesetzt.

Transfektion synovialer Fibroblasten mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von Expressionsplasmiden in Primärzellen mit dem AMAXA-System und dem NHDF-Nucleofector Kit (AMAXA, Köln) erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Für jeden Transfektionsansatz wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für zwölf Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen gegebenenfalls mit Zytokinen stimuliert.

Matri-Assay

Zur Messung der Invasivität von Zellen wurde ein Zell-basierter Assay eingesetzt, bei dem die Invasivität von Zellen als direkte Funktion des Zusammenbruchs eines Zell-elektrischen Widerstands gemessen wird (Zak et al., 2000; Schneider et al., 2002). Der Assay basiert auf einem Zellmonolayer aus MDCK-C7 Epithelzellen, die einen hohen elektrischen Widerstand generieren. Zuerst wurde auf der Innenseite eines Filtereinsatzes (4,2 cm² Oberfläche; 0,4µm Porengröße; 20µm Membrandicke; Falcon, Heidelberg) eine Typ-II-Kollagenschicht aufgebracht (100µl Kollergenschicht = 75 µl Purecol INSAMED USA, 15 µl Bicarbonat, 10 µl 10x DMEN) und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde eine Zellschicht aus MDCK-C7-Zellen auf die reverse Seite des Filtereinsatzes ausgebracht und die Filtereinsätze für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank kultiviert. Abschließend wurden die Filtereinsätze in eine 6-Lock Platte (Falcon) gegeben und mit jeweils 2,5 ml MEM bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und der elektrische Widerstand wird mit einer STX-2-Elektrode (WPI-Europe, Berlin) gemessen. Nachdem die MDCK-C7-Zellschicht einen elektrischen Widerstand von 4000 Ω erreicht hatte wurden synoviale Fibroblasten auf die Typ-II-Kollagenschicht ausgesät. Die maligne Melanoma-Zelllinie A7 wurde als Positivkontrolle sowie MDCK-C7 als Negativkontrolle eingesetzt. Der Widerstand wurde im Abstand von 12 Stunden gemessen.

6.11.10 Immunologische Methoden

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Zellen in 6-Loch Platten auf säurebehandelten, sterilen Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurde dafür mit 20 µg/mL Fibronectin beschichtet. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 2% PFA/PBS für 15 Minuten fixiert. Die fixierten Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und, mit Ausnahme der ECM-Färbungen, die Zellmembran mit 0,2% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Präparate für 20

Minuten mit 1% BSA/PBS behandelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterbinden. Anschließend wurden die Deckgläschen mit ca. 20 µL Erstantikörperlösung (Verdünnung je nach Antikörper 1:50 oder 1:200) bedeckt und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (zweimal mit PBS, einmal mit 0,1% BSA/PBS) wurde die Zweitantikörperlösung (Bsp. Cy3 = 1:800) mit fluorochrommarkierten Antikörpern, und gegebenenfalls DAPI auf die Präparate gegeben und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Deckgläser dreimal in PBS und einmal in Wasser gewaschen, mit dem Einbettungsmittel Elvanol überschichtet und mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt. Zum Aushärten des Elvanols wurden die Präparate 15 Minuten bei 60°C getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert. Die Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert).

Westernblot (Immunblot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte in einer Nassblotkammer (BioRad) bzw. einer Semidry Blotkammer (BioRad) mit Transferpuffer (6.4.3) bei 400 mA (Tank-Blot-System) für eine Stunde bzw. 0,8 mA/cm² (Semidry-Transfer) für 75 Minuten. Die Membran wurde kurz in Ponceau S-Reagenz gefärbt und in PBST-Puffer leicht entfärbt, so dass die übertragenen Proteine gut zu erkennen waren. Die Membran wurde in TBST-Puffer entfärbt und ü.N. in 2% BSA-Pulver in TBST blockiert. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in einer TBST-Verdünnung des jeweiligen Erstantikörpers geschwenkt, zweimal für fünf Minuten in TBST gewaschen und 30 Minuten mit dem an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper in TBST inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal 10 Minuten in TBST gewaschen und schließlich eine Minute in ECL-Reagenz geschwenkt, welches das Substrat für die Peroxidase enthält. Die Lumineszenz der Proteinbanden wurde als Schwärzung auf den aufgelegten Röntgenfilmen nachgewiesen. Sollte der Blot mit mehreren Antikörpern analysiert werden, wurden die Antikörper der ersten Färbung nach der Filmentwicklung entfernt. Dazu wurde die Membran eine halbe Stunde bei 60°C in Stripping Puffer geschwenkt, eine Stunde in Wasser bzw. TBST gewaschen und schließlich für eine Stunde in 3% Magermilchpulver in TBST blockiert.

6.11.11 Histologische Methoden

Einbetten von Geweben in Paraffin

Zur histologischen Analyse wurden menschliches Synovialgewebe, sowie der unteren Extremität von Mäusen der beschriebenen Stämme in Paraffin eingebettet. Dazu wurden, je nach Größe, die Gewebestücke in 4% Paraformaldehyd (in PBS) über Nacht bei 4 °C fixiert und für 24 Stunden in Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) bei Raumtemperatur inkubiert. Knöchernes Gewebe wurde in 20% EDTA-Lösung entkalkt, bevor die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%; 90%; 96% und 100% Ethanol) entwässert wurden. Die Gewebestücke wurden dann in Zedernholzöl für mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie in ein Zedernholzöl-Paraffin-Gemisch bei 48 °C gegeben wurden. Anschließend wurden die Präparate in reines Paraffin überführt und für drei Tage bei 60 °C inkubiert, wobei das Paraffin mehrmals gewechselt wurde. Abschließend wurden die Präparate in Paraffinblöcke gegossen und bei 4 °C gelagert.

Immunhistologische Färbung von Geweben

Für Immunhistologische Färbungen wurden verschiedene Paraffinschnitte von OA und RA-Patienten bzw. Hinterpfoten der FHL2^{+/+}, FHL2^{-/-}, FHL2^{+/+}hTNFtg und FHL2^{-/-}hTNFtg Maus mit einer Schichtdicke von 5 µm verwendet.

Die Gewebeschnitte wurden dreimal in Xylol sowie einer absteigenden Alkoholreihe (100%; 96%; 80% 70%) rehydriert, bevor sie in Aqua dest. bzw. TBS überführt wurden. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte 10 Minuten bei 37 °C mit 1% Trypsin/EDTA inkubiert. Nach dem Spülen der Präparate in PBS wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer überführt um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurden die Schnitte mit 1,5 %igem Pferdeserum (in TBS) beträufelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären Antikörper wurde gemäß Herstellerangaben in 1%igem Pferdeserum (in TBS) verdünnt und die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal mit TBS gespült bevor sie mit den sekundären, biotingegebenen Antikörpern, die ebenfalls nach Herstellerangaben in 1 %igen Pferdeserum verdünnt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Für die Farbreaktion wurde das Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories/ USA) gemäß Herstellerangaben verwendet. Zuletzt wurden die Schnitte in Metyl-Grün (Vector Laboratories/ USA) für drei Minuten bei 60 °C gegengefärbt, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 100% Ethanol) und Xylol

entwässert wurden. Abschließend wurden die Schnitte mit DPX (Merck/ Darmstadt) haltbar gemacht.

Toluidin-Blau Färbung von Paraffin-gefärbten Gewebeschnitten

Für das spezifische Anfärben von Knorpelgewebe in humanen und murinen Paraffinschnitten, wurden die Schnitte jeweils dreimal jeweils fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100-, 96-, 80-, und 70 %igen Ethanol) jeweils zwei Minuten rehydriert und im Anschluss fünf Minuten in destilliertem Wasser gespült. Die Gewebeschnitte wurden dann, je nach umfang des Knorpelgewebes, für 15- 25 Sekunden in 1x Toluidin-Lösung gefärbt und kurz danach in destilliertem Wasser gespült. Die Schnitte wurden dann in der Aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und dreimal je fünf Minuten in Xylol gegeben und zum Abschluss mit DPX eingedeckelt.

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.

7 Literatur

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science 4. Edition
- Asahara, H., Fujisawa, K., Kobata, T., et al.** (1997): Direct evidence of high DNA-binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* **40**: 912-918.
- Bai S, Kitaura H, Zhao H, Chen J, Muller JM, Schule R, et al.** (2005): FHL2 inhibits the activated osteoclast in a TRAF6-dependent manner. *J Clin Invest* **115**(10):2742-2751.
- Barros, J. C. and Marshall, C. J.** (2005): Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **118**, 1663-71.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23
- Blaney Davidson, E., Vitters, E., van den Berg W.B., van der Kraan, P.M.** (2006): TGF β -induced cartilage repair is maintained but fibrosis is blocked in the presence of Smad7. *Arthritis Res Ther* **8**:R 65.
- Bond M, Baker AH & Newby AC** (1999): Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(2): 561-567.
- Bondeson J, Brennan F, Foxwell B & Feldmann M.** (2000): Effective adenoviral transfer of IkappaBalpha into human fibroblasts and chondrosarcoma cells reveals that the induction of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines is nuclear factor-kappaB dependent. *J Rheumatol* **27**(9): 2078-2089.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A. and Fassler, R.** (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res* **89**, 211-23.
- Bradley, J.R., Pober, J.S.** (2001): Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **20**(44):6482-91.
- Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. and Feldmann, M.** (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*. **2**(8657):244-7.
- Brenner, K. A., Corbett, S. A. and Schwarzbauer, J. E.** (2000). Regulation of fibronectin matrix assembly by activated Ras in transformed cells. *Oncogene* **19**, 3156-63.
- Brew, K., Dinakarpanthian, D., and Nagase, H.** (2000): Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 267-283.
- Brower, D. L., Brower, S. M., Hayward, D. C. and Ball, E. E.** (1997). Molecular evolution of integrins: genes encoding integrin beta subunits from a coral and a sponge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9182-7.
- Brown, P.D.** (2000): Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert Opin Invest Drugs* **9**: 2167-2177.
- Bruder, J. T., Heidecker, G. and Rapp, U. R.** (1992). Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev* **6**, 545-56.
- Buckley, C.D., Pilling, D., Lord, J.M., Akbar, A.N., Scheel-Toellner, D., Salmon, M.,** (2001): Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* **22**(4):199-204.
- Calderwood, D. A.** (2004). Integrin activation. *J Cell Sci* **117**, 657-66.
- Canault, M., Tellier, E., Bonardo, B., Mas, E., Aumailley, M., Juhan-Vague, I., Nalbone, G. and Peiretti, F.** (2006). FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. *J Cell Physiol* **208**, 363-72.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V.** (1996): TRAF6 is signal transducer for interleukin-1. *Nature*. **383**(6599):443-6.
- Carballo and Blackshear** (2001): Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood* **98**(8):2389-95.
- Carter, A., Merchav, S., Silvian-Draxler, I., Tatarsky, I.** (1990): The role of interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in human multiple myeloma. *Br J Haematol* **74** (4): 424-31
- Chang, F., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. and McCubrey, J. A.** (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* **22**, 469-80.
- Chen, D., Xu, W., Bales, E., Colmenares, C., Conacci-Sorrell, M., Ishii, S., Stavnezer, E., Campisi, J., Fisher, D.E., Ben-Ze'ev, A. and Medrano, E.E.** (2003):SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res.* **63** (20):6626-34.
- Chu, C.Q., Field, M., Feldmann, M. and Maini, R.N.** (1991): Localization of tumour necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **34**: 1125-1132
- Chu, P. H., Bardwell, W. M., Gu, Y., Ross, J., Jr. and Chen, J.** (2000a): FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function. *Mol Cell Biol* **20**, 7460-2.

- Chu, P. H., Ruiz-Lozano, P., Zhou, Q., Cai, C. and Chen, J.** (2000b): Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech Dev* **95**, 259-65.
- Coghill, I. D., Brown, S., Cottle, D. L., McGrath, M. J., Robinson, P. A., Nandurkar, H. H., Dyson, J. M. and Mitchell, C. A.** (2003): FHL3 is an actin-binding protein that regulates alpha-actinin-mediated actin bundling: FHL3 localizes to actin stress fibers and enhances cell spreading and stress fiber disassembly. *J Biol Chem* **278**, 24139-52.
- Coser, K. R., Chesnes, J., Hur, J., Ray, S., Isselbacher, K. J. and Shioda, T.** (2003): Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13994-9.
- Crocker, S. J., Pagenstecher, A. and Campbell, I. L.** (2004): The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* **75**, 1-11.
- Danen, E. H. and Sonnenberg, A.** (2003): Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* **201**, 632-41.
- Delany, A.M., Brinckerhoff, C.E.** (1992): Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts. *J Cell Biochem.* **50**(4):400-10.
- Dinareello, C.A.** (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87** (6) : 2095ff.
- Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J. and Schuh, J.** (1999): RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.***13**(18):2412-24.
- Drynda A, Quax PH, Neumann M, van der Laan WH, Pap G, Drynda S, et al.** (2005): Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 reverses the inhibitory effects of TNF-alpha on Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* **174**(10):6524-6531.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G.** (1997): *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**(5):747-54.
- Edwards, G. M., Wilford, F. H., Liu, X., Hennighausen, L., Djiane, J. and Streuli, C. H.** (1998). Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **273**, 9495-5000.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P und Heath, J.K.** (1987): Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* **6**: 1899-1904.
- El Gabalawy, H. and Wilkins, J.**(1993): Beta 1 (CD29) integrin expression in rheumatoid synovial membranes: An immunohistologic study of distribution patterns. *J Rheumatol* **20**, 231-237.
- El Mourabit, H., Muller, S., Tunggal, L., Paulsson, M. and Aumailley, M.** (2004): Analysis of the adaptor function of the LIM domain-containing protein FHL2 using an affinity chromatography approach. *J Cell Biochem* **92**, 612-25.
- Fassbender** (1998): What destroys the joint in rheumatoid arthritis? *Arch Orthop Trauma Surg* **117** (1-2): 2-7.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N.** (1996): Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **14**: 397-440.
- Ffrench-Constant, C. and Colognato, H.** (2004): Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* **14**, 678-86.
- Fimia, G. M., De Cesare, D. and Sassone-Corsi, P.** (2000): A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol* **20**, 8613-22.
- Fincham, V. J., James, M., Frame, M. C. and Winder, S. J.** (2000): Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J* **19**, 2911-23.
- Firestein, G.S.** (2003): Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**: 356-361.
- Firestein, G.S.,** (1996): Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.* **39**(11):1781-1790.
- Gabriel, B., Mildenerger, S., Weisser, C. W., Metzger, E., Gitsch, G., Schule, R. and Muller, J. M.** (2004): Focal adhesion kinase interacts with the transcriptional coactivator FHL2 and both are overexpressed in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* **24**, 921-7.
- Ganten, D. und Ruckpaul, K. (Hrsg.)** (2003): *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen.* Springer Verlag 1. Aufl. : 256
- Gay, S., Gay, R.E. and , Koopman, W.J.** (1993): Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis.***52** (1):S39-47.
- Ghezzi, P. and Cerami, A.** (2005): Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Mol Biotechnol* **31**(3): 239-244.
- Giancotti, F. G.** (2003): A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* **4**, 149-51.
- Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E.** (1999): Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.

- Glansbeek, H.L., van Beuningen, H.M., Vitters, E.L., van der Kraan, P.M. and van den Berg, W.B.** (1998): Stimulation of Articular Cartilage Repair in Established Arthritis by Local Administration of Transforming Growth Factor beta into Murine Knee Joints. *Lab Invest* **78**:133-142.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U.P.** (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Europ J Cell Biol* **74**: 111-122.
- Görtz, B., Hayer, S., Tuerck, B., Zwerina, J., Smolen, J.S. and Schett, G.** (2005): Tumour necrosis factor activates the mitogen-activated protein kinases p38alpha and ERK in the synovial membrane in vivo. *Arthritis Res Ther* **7**(5):R1140-7.
- Govoni, K. E., Baylink, D. J., Chen, J. and Mohan, S.** (2006): Disruption of four-and-a-half LIM 2 decreases bone mineral content and bone mineral density in femur and tibia bones of female mice. *Calcif Tissue Int* **79**, 112-7.
- Greenwald, R.A.** (1999): Thirty-six years in the clinic without an MMP inhibitor. What hath collagenase wrought? *Ann N Y Acad Sci* **878**: 413-419.
- Gunther, T., Poli, C., Muller, J.M., Catala-Lehnen, P., Schinke, T., Yin, N., et al.** (2005): Fhl2 deficiency results in osteopenia due to decreased activity of osteoblasts. *Embo J* **24**(17):3049-56.
- Han, Z., Boyle, D.L., Chang, L., et al.** (2001): c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* **108**(1): 73-81.
- Han, Z., Boyle, D.L., Manning, A.M. and Firestein, G.S.** (1998): AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* **28**(4): 197-208.
- Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L., Armes, L.G., Sommer, A., Eisenberg, S.P., Thompson, R.C.** (1990): Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343** (6256):336-40.
- Hasunuma, T., Kayagaki, N., Asahara, H. et al.** (1997): Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **40**(1): 80-86.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. and Chaponnier, C.** (2001): Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* **12**, 2730-41.
- Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B. and Chaponnier, C.** (2003): Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* **14**, 2508-19.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V.** (1996): TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**(2): 299-308.
- Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D.** (2004): MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619-28.
- Huber, L. C. et al.** (2006): Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 669-75.
- Hughes, P. E., Oertli, B., Hansen, M., Chou, F. L., Willumsen, B. M. and Ginsberg, M. H.** (2002): Suppression of integrin activation by activated Ras or Raf does not correlate with bulk activation of ERK MAP kinase. *Mol Biol Cell* **13**, 2256-65.
- Hughes, P. E., Renshaw, M. W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V. M., Schwartz, M. A. and Ginsberg, M. H.** (1997): Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* **88**, 521-30.
- Hui, W., Rowan, A.D., Cawston, T.** (2000): Transforming growth factor beta1 blocks the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage stimulated by oncostatin M in combination with IL-1alpha. *Cytokine* **12**(6):765-9.
- Hynes, R. O.** (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.
- Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Aragaki, J., Tanaka, Y., Imamura, J., Imamura, T., Ohta, M., Ijichi, H., Tateishi, K. et al.** (2004): Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. *Cancer Res* **64**, 3428-35.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M. and Yamamoto, T.** (1995): Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **377**, 539-44.
- Ilic, D., Kanazawa, S., Furuta, Y., Yamamoto, T. and Aizawa, S.** (1996): Impairment of mobility in endodermal cells by FAK deficiency. *Exp Cell Res* **222**, 298-303.
- Ilic, D., Kovacic, B., Johkura, K., Schlaepfer, D. D., Tomasevic, N., Han, Q., Kim, J. B., Howerton, K., Baumbusch, C., Ogiwara, N. et al.** (2004): FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci* **117**, 177-87.
- Inoue, H., Yamashita, A. and Hakura, A.** (1996): Adhesion-dependency of serum-induced p42/44 MAP kinase activation is released by retroviral oncogenes *Virology* **225**: 223-226.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.

- Jackson CJ, Arkell J and Nguyen M.** (1998): Rheumatoid synovial endothelial cells secrete decreased levels of tissue inhibitor of MMP (TIMP1). *Ann Rheum Dis* **57**(3):158-161.
- Jeong, J.G., Kim JM, Cho H, Hahn W, Yu SS, Kim S.** (2004): Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res* **324**(1):3-7.
- Johannessen, M., Moller, S., Hansen, T., Moens, U. and Van Ghelue, M.** (2006): The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci* **63**, 268-84.
- Johannessen, M. and Moens, U.** (2007): Multisite phosphorylation of the cAMP response element binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Front Biosci.* **12**:1814-32. Review
- Joos, H., Albrecht, W., Laufer, S., Reichel, H. and Brenner, R.E.** (2008): IL-1beta regulates FHL2 and other cytoskeleton-related genes in human chondrocytes. *Mol Med* **14** (3-4):150-9.
- Joosten, L.A., Helsen, M.M., Saxne, T. et al.** (1999): IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* **163**(9): 5049-5055.
- Kadrmaz, J.L., Beckerle, M.C.** (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus., *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**(11):920-31.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H. et al.** (1991) : Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;**10**(13): 4025-4031.
- Kinne, R.W., Boehm, S., Iftner, T. et al.** (1995): Synovial fibroblast-like cells strongly express jun-B and C-fos proto-oncogenes in rheumatoid- and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1995;**101**: 121-125.
- Kleiber, K., Strebhardt, K. and Martin, B. T.** (2007): The biological relevance of FHL2 in tumour cells and its role as a putative cancer target. *Anticancer Res* **27**, 55-61.
- Kong, Y., Shelton, J. M., Rothermel, B., Li, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S.** (2001): Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation. *Circulation* **103**, 2731-8.
- Kosa, J. L., Michelsen, J. W., Louis, H. A., Olsen, J. I., Davis, D. R., Beckerle, M. C. and Winge, D. R.** (1994): Common metal ion coordination in LIM domain proteins. *Biochemistry* **33**, 468-77.
- Kotlyarov A and Gaestel M.** (2002): Is MK2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) the key for understanding post-transcriptional regulation of gene expression? *Biochem Soc Trans* **30**: 959-963.
- Krieg, T., Abraham, D. und Lafyatis, R.** (2007): Fibrosis in connective tissue disease: the role of he myofibroblast and fibroblast-epithelia cell interactions. *Arthritis Res Ther* **9** (2): 4
- Labalette, C., Renard, C. A., Neuveut, C., Buendia, M. A. and Wei, Y.** (2004): Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin. *Mol Cell Biol* **24**, 10689-702.
- Lacy, D.L., Timms E, Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W.J.** (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* **93**(2):165-76.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- 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. and Wilder, R.L** (1989): 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.* **143**(4):1142-8.
- Lai, C. F., Bai, S., Uthgenannt, B. A., Halstead, L. R., McLoughlin, P., Schafer, B. W., Chu, P. H., Chen, J., Otey, C. A., Cao, X. et al.** (2006): Four and half lim protein 2 (FHL2) stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* **21**, 17-28.
- Lakkakorpi, P. T., Nakamura, I., Young, M., Lipfert, L., Rodan, G. A. and Duong, L. T.** (2001): Abnormal localisation and hyperclustering of (alpha)(V)(beta)(3) integrins and associated proteins in Src-deficient or tyrphostin A9-treated osteoclasts. *J Cell Sci* **114**, 149-160.
- Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B. W., Perriard, J. C. and Ehler, E.** (2002). Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* **115**, 4925-36.
- Lavrovskii, V. A. and Razvorotnev, V. A.** (1976): A chamber for determination of the
- Li, H. Y., Kotaka, M., Kostin, S., Lee, S. M., Kok, L. D., Chan, K. K., Tsui, S. K., Schaper, J., Zimmermann, R., Lee, C. Y. et al.** (2001a): Translocation of a human focal adhesion LIM-only protein, FHL2, during myofibrillogenesis and identification of LIM2 as the principal determinants of FHL2 focal adhesion localization. *Cell Motil Cytoskeleton* **48**, 11-23.
- Li, H. Y., Ng, E. K., Lee, S. M., Kotaka, M., Tsui, S. K., Lee, C. Y., Fung, K. P. and Waye, M. M.** (2001b): Protein-protein interaction of FHL3 with FHL2 and visualization of their interaction by green fluorescent proteins (GFP) two-fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET). *J Cell Biochem* **80**, 293-303.
- Liang, J. and Slingerland, J. M.** (2003): Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* **2**, 339-45.

- Lin, TH. Chen, Q. Howe, A. und Juliano, R.L.** (1997): Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. *JBiolChem* **272**:8849-8852.
- Liu, H., and Pope, R.M.** (2003): The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* **3**(3): 317-322.
- Liu, S., Calderwood, D. A. and Ginsberg, M. H.** (2000): Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3563-71.
- Ludwig, T. et al.** (2002): The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F319-27.
- Martin, B.T., Kleiber, K., Wixler, V., Raab, M., Zimmer, B., Kaufmann, M. and Strebhardt, K.** (2007): FHL2 regulates cell cycle-dependent and doxorubicin-induced p21Cip1/Waf1 expression in breast cancer cells. *Cell Cycle*.**6** (14):1779-88.
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., Behrens, J., von der Mark, K., Starzinski-Powitz, A. and Wixler, V.** (2002): The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol* **159**, 113-22.
- McGrath, M. J., Cottle, D. L., Nguyen, M. A., Dyson, J. M., Coghill, I. D., Robinson, P. A., Holdsworth, M., Cowling, B. S., Hardeman, E. C., Mitchell, C. A. et al.** (2006): Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem* **281**, 7666-83.
- Meinecke, I., Cinski, A., Baier, A., Peters, M.A., Dankbar, B., Wille, A., et al.** (2007): Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(12):5073-8.
- Meinecke, I., Rutkauskaite, E., Gay, S. and Pap, T.** (2005): The role of synovial fibroblasts in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des.* **11** (5):563-8.
- Mengshol, J.A., Vincenti, M.P., Coon, C.I., Barchowsky, A., Brinckerhoff, C.E.** (2000): Interleukin-1 induction of collagenase 3(matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38 c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* **108**: 181-183.
- Meyer, L.H., Neugebauer, K., Wixler, V., Echtermeyer, F. and Pap, T.** (2008): Interaction of synovial fibroblasts with the extracellular matrix – a key to the Pathogenesis of RA?. Submitted to *Current Rheumatology Reviews*.
- Meyer, L.H., Franssen, L. and Pap T.** (2006):The role of mesenchymal cells in the pathophysiology of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **20** (5) 969-981.
- Meyer, L.H., Pap, T.** (2005): MAPK signalling in rheumatoid joint destruction: can we unravel the puzzle? *Arthritis Res Ther* **7**(5):177-8.
- Michelsen, J. W., Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C. and Winge, D. R.** (1993): The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4404-8.
- Mistry, A. C., Kato, A., Tran, Y. H., Honda, S., Tsukada, T., Takei, Y. and Hirose, S.** (2004): FHL5, a novel actin-binding protein, is highly expressed in eel gill pillar cells and responds to wall tension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1141-54.
- Mitra, S. K. and Schlaepfer, D. D.** (2006): Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.*
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D.** (2005): Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.
- Moens, U., Van Ghelue, M., Johansen, B. and Seternes, O. M.** (1999): Concerted expression of BK virus large T- and small t-antigens strongly enhances oestrogen receptor-mediated transcription. *J Gen Virol* **80** (Pt 3), 585-94.
- Mor, A., Abramson, S.B., Pillinger, M.H.** (2005): The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol* **115** (2): 118-128.
- Morgan, M. J. and Madgwick, A. J.** (1999a): The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 251-5.
- Morgan, M. J. and Madgwick, A. J.** (1999b): The LIM proteins FHL1 and FHL3 are expressed differently in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 245-50.
- Morlon, A. and Sassone-Corsi, P.** (2003): The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3977-82.
- Mountz, J.D., Hsu, H.C., Matsuki, Y. and Zhang, H.G.** (2001): Apoptosis and rheumatoid arthritis: Past, present, and future directions. *Curr Rheumatol Rep* **3**(1): 70-78.
- Mulherin, D., Fitzgerald, O. and Bresnihan, B.** (1996): Clinical improvement and radiological deterioration in rheumatoid arthritis: evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ. *Br J Rheumatol* **1996**;35(12): 1263-1268.
- Müller, J.M., Metzger, E., Greschik, H., Bosserhoff, A.K., Mercep, L., Buettner, R., et al.** (2002): The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *Embo J* **21**(4):736-48.

- Müller, J. M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R. and Schule, R. (2000): FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *Embo J* **19**, 359-69.
- Müller-Ladner, U., Ospelt, C., Gay, S., Distler, O. and Pap, T. (2007): Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* **9** (6):223.
- Müller-Ladner, U., Pap, T., Gay, R. E., Neidhart, M. and Gay, S. (2005): Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **1**, 102-10.
- Müller-Ladner, U., Elices, M.J., Kriegsmann, J. et al. (1997): Alternatively spliced CS-1 fibronectin isoform and its receptor VLA-4 in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Rheumatol* **24**: 1873-1880.
- Müller-Ladner, U., Elices, M.J., Kriegsmann, J. et al. (1997): Alternatively spliced CS-1 fibronectin isoforms and its receptor VLA-4 in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *J Rheumatol* **24**: 1873-1880.
- Müller-Ladner, U., Gay, R.E. and Gay, S. (1996): Cysteine proteinases in arthritis and inflammation. *Perspect Drug Discovery Design* **6**: 87-98.
- Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B.N. et al. (1996): Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* **149**(5): 1607-1615.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** Pt 1, 263-73.
- Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. (1999): Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-4.
- Nagase, H. (1997): Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* **378**: 151-160.
- Nakajima, T., Aono, H., Hasunuma, T. et al. (1995): Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* **38**(4): 485-491.
- Nakano, K., Okada, Y., Saito, K. and Tanaka, Y. (2004): Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **50**(8):2450-8.
- Nanki, T., Hayashida, K., El-Gabalawy, H.S. et al. (2000): Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* **165**(11): 6590-6598.
- Ohshima, S., Mima, T., Sasai, M. et al. (2000): Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) interferes with Fas-mediated apoptotic cell death on rheumatoid arthritis (RA) synovial cells: a possible mechanism of rheumatoid synovial hyperplasia and a clinical benefit of anti-TNF-alpha therapy for RA. *Cytokine* **12**(3): 281-288.
- Osaki, M., Kase, S., Adachi, K. et al. (2004): Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**(1): 8-14.
- Ospelt, C., Neidhart, M., Gay, R.E. and Gay, S. (2004): Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* **9**: 2323-2334.
- Palao, G., Santiago, B., Galindo, M. et al. (2004): Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum* **50**(9): 2803-2810.
- Pap, T., Meinecke, I., Müller-Ladner, U. and Gay, S. (2005): Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis* **64** (4) 52-4. Review. No abstract available.
- Pap, T., Aupperle, K.R., Gay, S., Firestein, G.S. and Gay, R.E. (2001): Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum* **44**(3):676-81.
- Pap, T., Franz, J.K., Hummel, K.M., Jeisy, E., Gay, R. and Gay, S. (2000a): Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res* **2**(1):59-64.
- Pap, T., Müller-Ladner, U., Gay, R.E. and Gay, S. (2000b): Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**: 361-367
- Pap, T., Müller-Ladner, U., Gay, R.E. and Gay, S. (2000c): Gene therapy in rheumatoid arthritis: how to target joint destruction? *Arthritis Research* **21**(1):5-9.
- Pap, T., Shigeyama, Y., Kuchen, S. et al. (2000d): Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rheumatoid arthritis (RA). *Arthritis Rheum* **43**: 1226-1232.
- Pap, T., Müller-Ladner, U., Hummel, K.M., Gay, R.E. and Gay, S. (1998): Studies in the SCID mouse model. In: Evans C, Robbins P, editors. *Gene Therapy in Inflammatory Diseases*. Basel, Switzerland: BirkenhNuser.

- Park, J., Gelse, K., Frank, S., von der Mark, K., Aigner, T. and Schneider, H.** (2006): Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J Gene Med* **8**, 112-25.
- Park, J., Will, C., Martin, B., Gullotti, L., Friedrichs, N., Buettner, R., Schneider, H., Ludwig, S. and Wixler, V.** (2007): Deficiency in the LIM-only protein FHL2 impairs assembly of extracellular matrix proteins. submitted.
- Parks, W.C. and Mecham, R.P.** (1998): Matrix metalloproteinases. San Diego, Academic Press.
- Pei, D. and Weiss, S.J.** (1995): Furin-dependent intracellular activation of human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375**: 244-247.
- Pettipher, E.R., Higgs, G.A., Henderson, B.**(1986): Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**(22):8749-53.
- Philippar, U., Schrott, G., Dieterich, C., Muller, J. M., Galgoczy, P., Engel, F. B., Keating, M. T., Gertler, F., Schule, R., Vingron, M. et al.** (2004). The SRF target gene *Fhl2* antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Mol Cell* **16**, 867-80.
- Pierer, M., Muller-Ladner, U., Pap, T., Neidhart, M., Gay, R.E. and Gay, S.** (2003): The SCID mouse model: novel therapeutic targets lessons from gene transfer. *Springer Seminars in Immunopathology* **25**(1):65-78.
- Pirila, L., Aho, H., Roivainen, A. et al.** (2001): Identification of alpha6beta1 integrin positive cells in synovial lining layer as type B synoviocytes. *J Rheumatol* **28**: 478-484.
- Purcell, N. H., Darwis, D., Bueno, O. F., Muller, J. M., Schule, R. and Molkentin, J. D.** (2004): Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 1081-95.
- Qu, Z., Garcia, C.H., O'Rourke, L.M. et al.** (1994) : 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* **37**(2): 212-220.
- Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C. and Kahari, V.M.** (1999): Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**: 2446-2455.
- Reddy, S.A.G., Huang, J.H. and Liao, W.S.L** (2000): Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* **164**(3): 1355-1363.
- Remmers, E.F., Sano, H., Lafyatis, R., Case, J.P., Kulkumian, G.K., Hla, T., et al.** (1991) : Production of platelet derived growth factor B chain (PDGF-B/c-sis) mRNA and immunoreactive PDGF B-like polypeptide by rheumatoid synovium: coexpression with heparin binding acidic fibroblast growth factor-1. *J Rheumatol* **18**(1):7-13.
- Remmers, E.F., Sano, H., Wilder, R.L.** (1991): Platelet-derived growth factors and heparin-binding (fibroblast) growth factors in the synovial tissue pathology of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* **21**(3):191-9.
- Reunanen, N., Li, S., Ahonen, M. et al.** (2002): Activation of p38 α MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem* **277**(35): 32360-32368.
- Rinaldi, N., Schwarz, E.M., Weis, D. et al.** (1997): Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis* **56**: 45-51.
- Rutkauskaite, E., Volkmer, D., Shigeyama, Y., Schedel, J., Pap, G., Muller-Ladner, U., et al.** (2005): Retroviral gene transfer of an antisense construct against membrane type 1 matrix metalloproteinase reduces the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **52**(7):2010-4.
- Samson, T., Smyth, N., Janetzky, S., Wendler, O., Muller, J. M., Schule, R., von der Mark, H., von der Mark, K. and Wixler, V.** (2004): The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor. *J Biol Chem* **279**, 28641-52.
- Sarkissian, M., and Lafyatis, R.** (1999): Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* **162**: 1772-1779.
- Sarkissian, M. und , R.** (1998): Transforming growth factor-beta and platelet derived growth factor regulation of fibrillar fibronectin matrix formation by synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* **25** (4): 613-22
- Scholl, F. A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C. and Schaefer, B. W.** (2000): DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J Cell Biol* **151**, 495-506.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R. and Schlaepfer, D. D.** (1999): Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* **112** (Pt 16), 2677-91.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H. and Schlaepfer, D. D.** (2000): FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* **2**, 249-56.
- Stilo, R., Leonardi, A., Formisano, L., Jeso, B., Vito, P. and Liguroro D.**(2002): TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **521**(1-3):165-9.

- Su, S., Grover, J., Roughley, P.J. et al. (1999): Expression of the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheum Int* **18**: 183-191.
- Suzuki, M., Tetsuka, T., Yoshida, S., Watanabe, N., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T. (2000): The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- α - or IL-1 β -stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett* **465**: 23-27.
- Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A. et al. (2001): T cell Activation in Rheumatoid Synovium Is B Cell Dependent. *J Immunol* **167**: 4710-4718.
- Takemura, Y., Fukuo, K., Yasuda, O. et al. (2004) : Fas signaling induces Akt activation and upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Hypertension* **43**(4): 880-884.
- Tanahashi, H. and Tabira, T. (2000): Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Hum Mol Genet* **9**, 2281-9.
- Teitelbaum, S.L. (2000): Bone resorption by osteoclasts. *Science*. **289**:1504-1508.
- Tetlow, L.C., Adlam, D.J. und Woolley, D.E.(2001): Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: association with degenerative changes. *Arthritis Res.* **44**: 585-594.
- van Beuningen, H.M., Arntz, D.J. Woolley, D.E. (2001): In vivo Effects of interleukine-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum* **34**: 606-615.
- van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001): Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-98.
- van der Laan, W.H., Quax, P.H., Seemayer, C.A., Huisman, L.G., Pieterman, E., Grimbergen, J.M., et al. (2003): Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther* **10**:234-242.
- Venter, J. C. Adams, M. D. Myers, E. W. Li, P. W. Mural, R. J. Sutton, G. G. Smith, H. O. Yandell, M. Evans, C. A. Holt, R. A. et al. (2001): The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51.
- Wakisaka, S., Suzuki, N., Takeba, Y. et al. (1998): Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* **114**(1): 119-128.
- Wang, J., Yang, Y., Xia, H.H., Gu, Q., Lin, M.C., Jiang, B., Peng, Y., Li, G., An, X., Zhang, Y., Zhuang, Z., Zhang, Z., Kung, H.F. and Wong, B.C. (2007): Suppression of FHL2 expression induces cell differentiation and inhibits gastric and colon carcinogenesis. *Gastroenterology*. **132**(3):1066-76.
- Wang, J., Zohar, R. and McCulloch, C. A. (2006): Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res* **312**, 205-14.
- Wang, J., Su, M., Fan, J., Seth, A. and McCulloch, C. A. (2002): Transcriptional regulation of a contractile gene by mechanical forces applied through integrins in osteoblasts. *J Biol Chem* **277**, 22889-95.
- Wang, A.Z., Wang, J.C., Fisher, G.W. and Diamond, H.S. (1997): Interleukin-1 β -stimulated invasion of articular cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by antibodies to specific integrin receptors and by collagenase inhibitors. *Arthritis Rheum* **40**: 1298-1307.
- Wei, Y., Renard, C. A., Labalette, C., Wu, Y., Levy, L., Neuveut, C., Prieur, X., Flajolet, M., Prigent, S. and Buendia, M. A. (2003): Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin. *J Biol Chem* **278**, 5188-94.
- Werner, S. and Grose, R. (2003): Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* **83**: 835-870.
- Werner, S., Krieg, T. and Smola, H. (2007): Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* **127**, 998-1008.
- Wixler, V., Hirner, S., Muller, J.M., Gullotti, L., Will, C., Kirfel, J., et al. (2007): Deficiency in the LIM-only protein Fhl2 impairs skin wound healing. *J Cell Biol* **177**(1):163-72.
- Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aumailley, M., Sonnenberg, A. and Paulsson, M. (2000): The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem* **275**, 33669-78.
- Wixler, V., Laplantine, E., Geerts, D., Sonnenberg, A., Petersohn, D., Eckes, B., Paulsson, M. and Aumailley, M. (1999): Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *FEBS Lett* **445**, 351-5.
- Wynn, T.A. (2007): Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative disease. *J Clin Invest* **117**: 524-529.
- Yamada, K.M., Pankov, R., Cukierman, E. (2003): Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res* **36**(8):959-66.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., Reed, J.C. and Bredesen, D.E. (1999): TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem*. **274**(42):30202-8.

- Zak, J., Schneider, S.W., Eue, I., Ludwig, T., Oberleithner, H.** (2000): High-resistance MDCK-C7 monolayers used for measuring invasive potency of tumour cells. *Pflugers Arch.* **440**(1):179-83.
- Zeng, L., Si, X., Yu, W. P., Le, H. T., Ng, K. P., Teng, R. M., Ryan, K., Wang, D. Z.,** (2003): PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol.* **160**(1):137-46.
- Zhan, M., Zhao, H. and Han, Z. C.** (2004): Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol* **19**, 973-83.
- Zwerina, J., Redlich, K., Schett, G. and Smolen, J.S.** (2005): Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 2005;**1051**: 716-729.
- Zwerina, J., Redlich, K., Polzer, K., Joosten, L., Kronke, G. and Distler, J., et al.** (2007): TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28):11742-7.

8 Anhang

8.1 Die TNF α -vermittelte Hemmung der FHL2-Expression kann zwischen verschiedenen RASF variieren

Im Zusammenhang mit den TNF α -Stimulationskinetiken konnte gezeigt werden, dass TNF α , die FHL2-Expression auf sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene hemmt. Eine in diesem Kontext sehr interessante und wichtige Beobachtung ist, dass die Hemmung der FHL2 Expression durch TNF α sowohl auf der mRNA-Ebene, als auch auf der Proteinebene in den verschiedenen RASF variiert (vgl. Abb.: A1-A und -B)

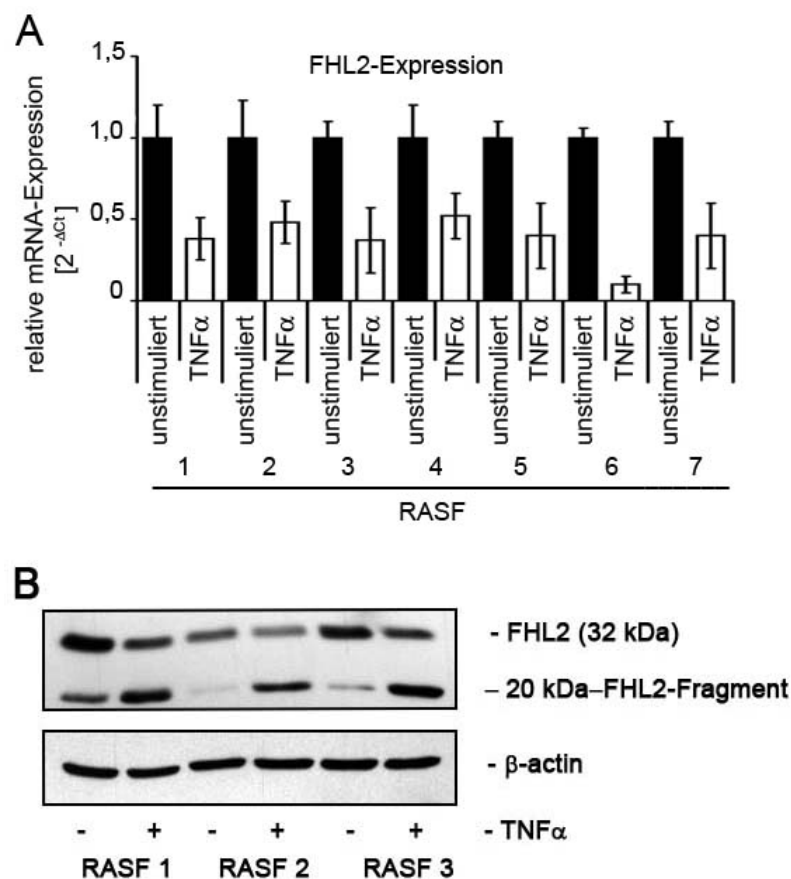


Abb. A1: Die TNF α -induzierte Hemmung von FHL2 kann in verschiedenen RASF variieren. qRT-PCR: RASF von insgesamt sieben verschiedenen Patienten wurden isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert. (A) qRT-PCR: Die FHL2-Expression wurde mittels FHL2-spezifischer Primer relativ zur GAPDH-Expression bestimmt. Die Auswertung zeigt, dass die TNF α -vermittelte Hemmung zwischen verschiedenen RASF deutlich variieren kann. (B) Westernblot-Analyse: RASF wurden lysiert und die Gesamtzelllysate elektrophoretisch aufgetrennt und FHL2 mit dem spezifischen Antikörper F2B4 detektiert.

9 Veröffentlichungen

Originalartikel:

Meyer, L.H., Smith, N., Will, C., Neugebauer, K., Krob, A., Wunrau, C., Schnaeker, E.M., Ludwig, S., Kollias, G., Bassel-Duby, R., Moffat, A., Beaten, D., Niederreiter, B., Redlich, K., Wixler, V. and Pap, T. (2008): FHL2 regulates the resolution of tissue damage in chronic inflammatory arthritis. in Revision

Übersichtsartikel:

Meyer, L.H., Neugebauer, K., Wixler, V., Echtermeyer, F. and Pap, T. (2008): Interaction of synovial fibroblasts with the extracellular matrix – a key to the Pathogenesis of RA? Eingereicht bei Current rheumatology Reviews

Meyer, L.H., Franssen, L., Pap, T. (2006): The role of mesenchymal cells in the pathophysiology of inflammatory arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol. **20** (5) 969-981.

Meyer LH, Pap T. (2005): MAPK signalling in rheumatoid joint destruction: can we unravel the puzzle? Arthritis Res Ther **7**(5):177-8.

Posterpräsentationen und Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen:

Lars Henrik Meyer¹, Katja Neugebauer¹, Eva- Maria Schnäker², Berno Dankbar¹, Christina Wunrau¹, Noreen Pundt¹, Viktor Wixler³ and Thomas Pap¹

The four and a half LIM only protein 2 (FHL2) is involved in the stable activation of rheumatoid arthritis fibroblasts through regulating MMP-13 expression and invasive behaviour. European Workshop of Rheumatism Research –Toulouse, France 2008. (Vortrag)

Lars Henrik Meyer¹, Katja Neugebauer¹, Eva- Maria Schnäker², Berno Dankbar¹, Christina Wunrau¹, Noreen Pundt¹, Viktor Wixler³ and Thomas Pap¹: The Four and a Half Lim Only Protein 2 (FHL2) is Involved in Balancing MMP-13 Expression and in Invasive Behaviour of RASF. Jahreskongress der American College of Rheumatology. Boston/ USA 2007. (Posterpräsentation)

10 Lebenslauf

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die mich in diesem Projekt sowie dem Anfertigen dieser Arbeit so tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Pap, der mich in den letzten drei Jahren kontinuierlich und sehr tatkräftig unterstützt hat und mir die Tür zu einem der für mich spannendsten Forschungsgebiete geöffnet hat.

Die Mitbetreuung dieser Arbeit durch PD Dr. Viktor Wixler war für mich ein besonders glücklicher Umstand, den sein starkes Engagement und die ausgezeichnete Betreuung in den vergangenen drei Jahren, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. In den unzähligen Gesprächen und Erklärungen hat Viktor Wixler mein wissenschaftliches Denken entscheidend geprägt.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Linke richten, der sich freundlicherweise als Erstgutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Berenike Maier, für die Bereitschaft, sich als Prüferin zur Verfügung zu stellen.

Meine Zeit in Münster wird mir Dank der außergewöhnlich netten, hilfsbereiten und offenen Kollegen, die mich in den drei Jahren begleitet haben, in sehr guter Erinnerung bleiben. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei Dr. Eva-Maria Schnäker für Ihre freundschaftliche Unterstützung in der ganzen Zeit. Auf die Hilfe und Unterstützung von Katja Neugebauer konnte ich mich auch zu ungewöhnlichen Tageszeiten immer verlassen, wofür ich ihr an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

Natürlich bleiben auch immer viele Personen unerwähnt, die mir geholfen, mir Mut gegeben haben oder mir einfach nur zu Seite gestanden haben. Bei allen denen möchte ich mich hiermit ganz herzlich bedanken.