

Aus der
Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum
Leiter der Rheumatologie: Prof. Dr. med. Matthias Schneider

***Die Expression und funktionelle Rolle von GranzymB in
polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bei der
Rheumatoiden Arthritis***

Dissertation

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin*

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Bianca Bartsch

2011

*Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan: Prof. Dr. med. J. Windolf

Referent: Prof. Dr. med. M. Schneider

Koreferent: Prof. Dr. med. C. Specker

*Meinen Eltern
und
meiner Oma*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
Rheumatoide Arthritis	
1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.2. Diagnostik	2
Tab.1 ACR Kriterien	3
1.3. Therapie	4
1.4. Pathogenese	5
1.5. Granzyme B bei der Pathogenese der RA	11
Abb.1 Tertiärstruktur von GrB als Ribbon Plot	13
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Patienten und Probandenkollektiv	16
Tab. 2 Charakterisierung der Patienten mit RA	17
3.2 DAS28 und Krankheitsaktivität	17
3.3 Gelenkspunktion und Aufbereitung der Synovialflüssigkeit	18
3.4 FACS®-Analysen	19
Tab.3 Antikörperliste für FACScan®	20
Abb.2 Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im FACScan®	22
3.5 GrB Hemmung mit Brefeldin A und Cytochalasin B	23
3.6 Stimulationsversuche mit Zytokinen	23
Tab.4 Zytokinliste	24
3.7 Kultivierung der PMN	24
3.8 Isolation CD15+ PMN mittels MACS und Polymorphprep® Gradient	25
3.9 RT-PCR für Granzym B in PMN der Synovia	26
3.10 Konfokale Laser Mikroskopie	26
3.11 ELISA	27
3.12 Statistik	28

4 Ergebnisteil

4.1 Nachweis von GranzymB in synovialen PMN ex vivo	29
4.1.1. GrB RNA in synovialen PMN	
Abb.3 Gelelektrophorese der PCR Produkte	29
4.1.2. Nachweis synthetisierten GrB in synovialen PMN mittels Konfokaler Lasermikroskopie	
Abb.4a CD66b+ PMN in der Konfokalen Laser Mikroskopie	31
Abb.4b GrB+ PMN in der Konfokalen Laser Mikroskopie	31
Abb.4c IgG-Isotypenkontrolle an PMN	31
4.1.3. FACScan® - GrB Expression in synovialen PMN	
Abb.5 Dot Plot : CD15+/GrB+ synoviale PMN	32
4.2 Extrazelluläre GrB Expression auf synovialen PMN	32
4.3 Lösliches GrB in der Synovialflüssigkeit und im Serum	33
4.4 Vergleich RA Patienten / Kontrollgruppe	33
Abb.6a Whiskers Plot : Darstellung der intra- und extrazellulären GrB Expression synovialer PMN von RA- Patienten und der Kontrollgruppe	33
Abb.6b Wiskers Plot : lösliches GrB's in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten und der Kontrollgruppe	33
4.5 GrB-Expression von Vollblut PMN	35
Abb.7 Whiskers Plot: Vergleichende Darstellung der GrB Expression in Vollblut PMN zwischen RA-Patienten und der Kontrollgruppe	35
Abb.8a Histogramm Plot: GrB Expression in VB PMN von RA Patienten	36
Abb.8b Histogramm Plot: GrB Expression in synovialen PMN von RA Patienten	36
4.6 Koinzidenz zwischen GrB und Klinischen Parametern der RA	37
Abb.9 CCP Gehalt in der SF bei RA Patienten und der Kontrollguppe	37
Tab.5 CCP Status im Serum, in der SF, Erosivität und DAS28 der RA Patienten	38
Abb.10a Vier-Felder Tafel: Korrelation zwischen CCP Status und extrazellulären GrB Gehalt in der SF	39
Abb.10b Vier-Felder Tafel: Korrelation zwischen DAS28 und PMN Anzahl in der SF	40

Tab.6: prozentuale PMN-Anzahl in Synovia, DAS28 und CRP bei der RA Patientengruppe	40
4.7 Kinetik GrB in nativen PMN	40
Abb.11a Kinetik von GrB an unstimulierten isolierten PMN	
Abb.11b Hemmung des intrazellulären GrB Transports durch Cytochalasin B und Brefeldin A	42
4.8 Zytokinstimulation an Vollblut PMN	42
Tab.7a GrB+ PMN nach TNF α Stimulation	43
Tab.7b GrB+ PMN nach IL-15 Stimulation	43
Abb.12 GrB Expression von PMN nach IL-15 Stimulation	44
Abb.13 GrB im Überstand nach Stimulation mit IL-15 und TNF α	45
Abb.14 Stimulation von Vollblut PMN mit Zytokinen & Remicade	45
5 Diskussion	46
6 Zusammenfassung und Ausblick	57
7 Literaturverzeichnis	59
8 Anhang	73
8.1 Antikörper/Zytokinliste	
8.2 Materialliste	
8.3 Neue Klassifikations- und Diagnosekriterien der RA; ACR 2009	
8.4 Dokumentationsbogen Gelenkpunktionen	
<i>Danksagung</i>	
<i>Lebenslauf</i>	

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
APC	Antigenpräsentierende Zellen
B-Zellen	B-Lymphozyten
CD	Cluster of differentiation
CCP	cyclische citrullinierte Peptide
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CRP	C-reaktives Protein
DAS	Disease Activity Score
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	disease modifying antirheumatic drugs
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EULAR	European League against rheumatism
FL	Fluoreszenz
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GrB	Granzym B
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODF	Osteroklasten Differentiation Faktor
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
SD	Standardabweichung
SF	Synovialflüssigkeit
SLC	synovial lining cells
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-Zellen	T-Lymphozyten
Th-Zellen	T-Helferzellen
VB	Vollblut

1 Einleitung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten rheumatischen Erkrankungen. Wie viele rheumatische Erkrankungen verläuft auch die RA chronisch und begleitet die Betroffenen ein Leben lang. Der progressive Charakter der Erkrankung verursacht, neben dem persönlichen Leid der Betroffenen, jährlich hohe direkte und indirekte Gesundheitskosten (Merkesdal S, et al 2002). Trotz neuer medikamentöser Behandlungsoptionen sprechen bei ungefähr 30-50% der Patienten die Therapien nur unzulänglich oder gar nicht an (Koczan et al. 2008). Vor diesem Hintergrund erscheint die Notwendigkeit erweiterter und neuer Therapiekonzepte evident.

Die Ursachen der RA sind bis heute noch nicht gänzlich aufgeklärt. Die Hoffnung, durch ein detaillierteres Verständnis der komplexen Pathogenese der RA neue therapeutische Angriffsziele zu identifizieren, stellt die rheumatologische Grundlagenforschung vor eine große Herausforderung. Einer dieser neuen Ansatzpunkte ist z.B. die Rolle des angeborenen Immunsystems mit seinen Protagonisten, den Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN), bei der Genese der RA. In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der Serinprotease GranzymB (GrB), synthetisiert von neutrophilen Granulozyten, bei der Pathogenese der RA untersucht werden.

Rheumatoide Arthritis

1.1 Definition und Epidemiologie

Die RA gehört zum Formenkreis der entzündlich-rheumatischen Systemerkrankungen, sie manifestiert sich im klinischen Vollstadium als eine symmetrische Polyarthritits mit schmerzhaften, geschwollenen und in ihrer Beweglichkeit eingeschränkten Gelenken. Betroffen sind neben den kleinen Hand- und/ oder Fußgelenken häufig auch die größeren Gelenke, wie Schultern und Knie. Im Verlauf der Krankheit entwickeln sich – insbesondere ohne adäquate Behandlung – erosiv-destruierende Knorpel- und Knochenveränderungen, die über zunehmende Funktionsein-

schränkungen bis hin zur Invalidität und Behinderung führen können (Lee et al., 2001). Patienten mit einer unzureichend behandelten, schweren RA haben auch eine um etwa 5 - 10 Jahre verkürzte Lebenserwartung (Symmons et al., 2002).

Wie bei allen chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen kann es bei der RA neben dem Gelenkbefall fakultativ auch zu extraartikulären Manifestationen wie z.B. Tendovaginitis, Bursitis, Hautvaskulitiden, Rheumaknoten oder Perikarditis kommen (Kazis et al., 1990; Snow et al. 2005). Die RA verläuft chronisch progredient mit intermittierenden Schüben, häufig sind extraartikuläre Symptome mit einer akuten Exazerbation assoziiert (Schneider et al, 2005).

Die Prävalenz der RA liegt weltweit zwischen 0,3-1 %. In Deutschland leiden ca. 800.000 Menschen an dieser rheumatischen Gelenkentzündung (Alamanos et al. 2005). Die RA ist damit die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung aus dem rheumatologischen Formenkreis. Das typische Manifestationsalter liegt zwischen dem 3. und 5. Lebensjahrzehnt, wobei Frauen 2-3 Mal häufiger als Männer betroffen sind (Symmons et al., 2002). Als genetischer Prognoseparameter gilt das HLA-DR4-Allel, dessen Nachweis mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Calin et al., 1989).

1.2 Diagnostik

Im Hinblick auf die Verhinderung von frühzeitigen Funktionseinschränkungen durch die RA ist eine rasche Diagnosestellung von besonderer Bedeutung (Schneider et al.,2007). Die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 berücksichtigen folgende Befunde (Arnett et. al., 1988):

Symptome	
Morgensteifigkeit	> 1 Std. länger als 6 Wochen
Arthritis in > 3 Gelenkregionen;	> 6 Wochen
Arthritis an Hand- oder Fingergelenken; <i>mind. eine Hand-Metacarpophalangeal (MCP) - oder proximales Interphalangealgelenk (PIP)</i>	> 6 Wochen
Symmetrische Arthritis	> 6 Wochen
Subkutane Rheumaknoten	
Rheumafaktornachweis	
Radiologische Veränderungen; <i>Standard dorsovolare Aufnahme von Hand und Handgelenk</i>	

Tab. 1 ACR Kriterien zur Klassifikation der Rheumatoiden Arthritis Arnett et al., 1988

Bei Vorliegen von mindestens 4 der 7 Kriterien gilt die Diagnose als gesichert.

Die ACR-Kriterien wurden allerdings in erster Linie für Studienzwecke entwickelt und sind mittlerweile über 20 Jahre alt (1987). Für die Diagnose einer frühen RA sind diese „Summationskriterien“ unzureichend. Die aktuelle Leitlinie der DGRh (2007) empfiehlt für die frühe Diagnose der RA andere Kriterien (Schneider et al., 2007). Dieser Tatsache tragen auch die aktuellen Klassifikationskriterien des EULAR (The European League against Rheumatism) und ACR Rechnung, die 2009 erstmalig vorgestellt wurden (Vortrag ACR 2009 in Philadelphia : Julia Funovitis et al.; Grafik siehe Anhang). Neben dem klinisch-symptomatischen Bild stehen für die Diagnose einer RA laborchemische und bildgebende Untersuchungen zur Verfügung. C-reaktives Protein (CRP) und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) sind beides serologische Parameter zur Einschätzung der Entzündungsreaktion (Schneider et al., 2007). Deutlich spezifischere Laborbefunde liefert die Bestimmung von Rheumafaktoren (RF) und Antikörpern gegen cyclische citrullinierte Peptide (CCP) (Übersicht bei Feist et al, 2007). IgM-RF fallen, je nach Krankheitsstadium und Studienpopulation, in 65-80% der RA-Patienten positiv aus und korrelieren mit der Schwere der Erkrankung. Patienten, seropositiv für RF, haben ein Risiko für einen aggressiveren Krankheitsverlauf, extraartikuläre Komplikationen und eine schlechtere Prognose (van Zeben et al., 1992). Hochspezifisch für die RA ist der Nachweis von Antikörpern gegen cyclisch citrullierte Peptide (CCP-AK). Im Gegensatz zum RF, der altersabhängig bei bis zu 15% der

Normalbevölkerung vorkommt, sind CCP-Antikörper nur bei 0,4% gesunder Menschen nachweisbar (Symmons et al., 2006). Mit einer Spezifität von 96% sind CCP-Antikörper dem Rheumafaktor mit einer Spezifität von 85% überlegen. Die Sensitivitäten sind ähnlich und betragen jeweils etwa 65 - 75%. CCP-Antikörper finden sich auch bei der rheumafaktornegativen RA und sind häufig schon Jahre vor Ausbruch der Erkrankung nachweisbar (Übersicht bei Feist et al., 2007). Sie eignen sich daher besonders gut zur Frühdiagnose einer RA. Bezüglich des prognostischen Potentials korreliert der Nachweis von CCP-Antikörpern bei RA-Patienten häufiger mit radiologischen Veränderungen und einem progredienten Verlauf (Iking-Konert C et al. 2007).

Neue Antikörper gegen eine Variante des Vimentins, mutiertes und citrulliniertes Vimentin (MCV), sind seit 2007 der Diagnostik verfügbar. Bei annähernd gleicher Spezifität haben sich Anti-MCV-AK in ersten Studien als sensitiver gegenüber CCP-AK erwiesen (Sghiri et al., 2008; Innala et al., 2008).

1.3 Therapie

Zur symptomatischen Therapie der RA werden NSARs (Nicht-Steroidale-Antirheumatika) eingesetzt. Es besteht heute kein Zweifel mehr an der Notwendigkeit einer Behandlung der RA mit einem sogenannten Basistherapeutikum (DMARD: Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug). Häufig werden DMARD's mit oralen und / oder intraartikulären Kortikosteroiden kombiniert. Am häufigsten wird in Deutschland das Medikament Methotrexat (MTX) als DMARD eingesetzt, aber auch Leflunomid (Arava®), Sulfasalazin oder Hydroxychloroquin kommen als Monotherapie oder in Kombination mit MTX regelmässig zum Einsatz. Nur durch den effektiven und frühen Einsatz dieser DMARDs kann die Progression der RA erfolgreich aufgehalten und so die Langzeitprognose der Erkrankung verbessert werden (Smolen et al., 2005; Wollenhaupt et al., 2006.). Bei 10–25% der Patienten kommt es zu einer jahrelangen Vollremission (Smolen et al., 2003). Patienten, die unzureichend auf die DMARD-Therapie ansprechen, profitieren vom Einsatz der so genannten „Biologicals“. Diese neueren Therapeutika sind monoklonale Antikörper

gegen Zytokine (Zytokininhibitoren) oder gegen Oberflächenmarker. $\text{TNF}\alpha$ Blocker werden mit der höchsten Frequenz eingesetzt (Smolen et al., 2007). Biologicals der zweiten Generation sind der CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein) Inhibitor Abatacept (ABA), der die Aktivierung von T-Zellen durch die Blockade des kostimulatorischen Signals über CD28 auf T-Zellen verhindert (Genovese et al., 2005). Daneben ist der Antikörper gegen CD20 auf B-Lymphozyten Rituximab (RTX) für die Behandlung der RA seit etwa 3 Jahren (Cohen et. al, 2006) und der IL-6 Rezeptor-Antagonist Tocilizumab (TZC) seit Januar 2009 in Deutschland zugelassen (www.emea.europa.eu). Sie werden momentan als Alternative für Patienten eingesetzt, die unzureichend auf die DMARD (TCZ) und / oder $\text{TNF}\alpha$ Antagonisten (TCZ, RTX und ABA) ansprechen.

Weitere Zytokininhibitoren gegen IL-15 (Baslund et al., 2005), IL-17 oder IL-18 befinden sich in Erforschung am Mausmodell oder in klinischen Studien (Übersicht bei Smolen, 2007).

1.4. Pathogenese

Die Pathogenese der RA ist trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig geklärt. Ursächlich für die RA, als chronisch-entzündliche Erkrankung, wird eine fehlgesteuerte Aktivierung der Immunantwort angenommen. Dieser möglicherweise durch Infektionen, Autoimmunreaktionen oder allergische Reaktionen ausgelöste Prozess führt zusammen mit einer genetischen Prädisposition (HLA-DR4) zu einer sich selbst unterhaltenden destruktiven Entzündung (Iking-Konert et al., 2005; Geiler G., 1996).

Zusammengefasst ist für die RA das Zusammenspiel aus folgenden Punkten pathognomisch: 1. pathologische Immunreaktion, 2. chronische Entzündung und 3. synoviale Hyperplasie mit Pannusbildung (Geiler G., 1996).

Dies soll in den folgenden Abschnitten ausführlich dargestellt werden.

1.4.1 Pathologische Immunreaktion

Obwohl die RA zu den „Autoimmunerkrankungen“ gezählt wird, sind für die Erkrankung bisher keine krankheitsauslösende Autoantigene identifiziert worden. Der Großteil der Untersuchungen zur Pathogenese der RA der letzten Jahrzehnte konzentrierte sich auf Mechanismen des adaptiven Immunsystems („adaptive immunity“), unter anderem der T- und B-Lymphozyten (Lundy et al., 2007; Magalhães R et al., 2002). Der Nachweis von charakteristischen Autoantikörpern, wie RF, CCP- oder MCV-Antikörpern, ist nicht nur ein wichtiges Diagnose- und Prognosekriterium (Sghiri et al., 2008), sondern auch eines der wesentlichen Argumente für einen immunologischen Pathomechanismus.

Nach neueren Ergebnissen könnte neben dem adaptiven Immunsystem auch das angeborene Immunsystem („innate immunity“) mit seinen Protagonisten den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (polymorphonuclear neutrophils; PMN) eine bedeutende Rolle bei der Genese der RA spielen (Parsonage et al., 2008). So hat sich in jüngster Zeit die Vorstellung eines zweistufigen Modells durchgesetzt, nach dem sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem an der Entstehung der RA beteiligt sind (Ebringer and Wilson, 2000; Firestein et al., 2003; Müller-Ladner et al., 2005; Jaen O et al., 2008).

In welcher Weise beide „Systeme“ ätiologisch an Krankheitsentstehung und -verlauf beteiligt sind, ist vorerst ungeklärt. Sicherlich ist die Interaktion beider „Systeme“ auf zellulärer- und Zytokinebene von entscheidender Bedeutung und die Rolle der PMN als Initiatoren und Regulatoren von wissenschaftlichem Interesse (Keyszer et al., 1994; Ospelt et al., 2004; Beauvillain C et al, 2007).

1.4.2 Chronische Entzündung

Die Entzündungsreaktion manifestiert sich in Angioneogenese, Gewebsödemen, erhöhter Kapillardurchlässigkeit und der Rekrutierung von polymorphkernigen Granulozyten in der akuten Phase. PMN machen im entzündeten Gelenk bei der RA den größten Anteil aller immunkompetenten

Zellen aus. Cytofluorimetrisch konnten im Schnitt über 85% der Zellen als PMN charakterisiert werden. T-Zellen machen die zweitgrößte Population aus (5-30%) und bis zu 5% sind als Monozyten und oder B-Lymphozyten zu identifizierten (Iking-Konert et al., 2005).

Klassischerweise stellen PMN die typischen Zellen der s.g. „first-line defense“ beim Eindringen eines fremden Agens oder pathogener Keime dar. Sie werden der s.g. „innate immunity“ zugeordnet. Neben ihrer freien Beweglichkeit haben PMN ausgeprägte phagozytierende Eigenschaften. Sie besitzen einen hohen Gehalt an Granula, welche Enzyme und Proteine enthalten und bei der Abwehr von Bakterien, bei pathologischen Zuständen aber auch bei der Gewebeschädigung, beteiligt sind.

Nach der Phagozytose pathogener Antigene wird im Regelfall die Apoptose der PMN induziert. Durch einwandernde Makrophagen/Monozyten werden physiologischerweise die apoptotischen PMN phagozytiert. Die akute Entzündung limitiert sich somit physiologischerweise selbst (Sendo F et al., 1996).

Das Wissen über das funktionelle Spektrum der PMN hat sich in den letzten Jahren aber deutlich erweitert (Beauvillain et al., 2007; Culshaw et al, 2008; Wagner et al., 2008).

PMN sind bei pathologischen Zuständen *in vivo* oder unter geeigneten Bedingungen *in vitro* zur *de novo* Proteinbiosynthese befähigt und können sich so ihrer konstitutiven Apoptose entziehen (Savill, J 1997; Iking-Konert et al., 2001). Die so veränderten PMN können proinflammatorische und cytotoxische Proteine freisetzen und tragen damit potentiell zur Perpetuierung und Chronifizierung der Entzündung bei (Wagner C. et al, 2000). PMN gelten somit als potentiell wichtige Protagonisten der chronischen und in der Folge destruktiven Entzündung (Mayadas et al., 2005). In der Synovialis konnten Veränderungen der PMN-Population gegenüber Zellen des peripheren Blutes gezeigt werden. Es wurde eine deutliche Aufregulierung der aktivitätsassoziierten Oberflächenrezeptoren CD14, CD16, CD18 und CD64 gezeigt (Iking-Konert C et al. 2002). Im Gegensatz dazu ging CD62L als Ausdruck der Aktivierung verloren. Daneben erwerben PMN neue Rezeptoren wie z.B. MHC Klasse II (Major histocompatibility complex) und CD83, die normalerweise nur von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden (Edwards et al., 1997;

Iking-Konert et al., 2001). Diese Rezeptoren werden teilweise *de novo* synthetisiert, was als Hinweis auf ein „escape from apoptosis“, d.h. ein verlängertes Überleben zu werten ist. Daneben erwerben PMN durch diese Differenzierung möglicherweise neue immunologische Funktion, wie z.B. eine Aktivierung von T-Zellen durch Antigenpräsentation (Iking-Konert et al., 2005).

Charakteristisch für alle chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist die Aktivierung der PMN in der akuten Phase, welcher dann eine fortschreitende Aktivierung von T-Lymphozyten folgt (Übersicht bei Edwards et al. 1997). Im Rahmen der Chronifizierung kommt es offensichtlich zu einer andauernden Aktivierung und Persistenz der Granulozytenpopulation. Ob- und in welcher Art und Weise diese „veränderten“ PMN bei der RA mit den klassischen Zellen der „adaptive“ immunity“ wie T- und/oder B-Lymphozyten kommunizieren, ist Gegenstand aktueller Forschung. T-Lymphozyten spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende regulatorische Rolle (Radsak et al. 2000; Komai-Koma et al. 2004; Parsonage et al., 2008). Im entzündeten Gelenk kommt es zur lokalen Aktivierung, Proliferation und Differenzierung vorwiegend TH-1 (CD4+) und regulatorischer T-Zellen. Die Präsenz von Memory T-Lymphozyten spricht für eine vorangegangene Antigenexposition (Ponchel et al.; 2002). Die genauen Mechanismen der T-Lymphozyten Aktivierung sind noch nicht ausreichend geklärt, es wird angenommen, dass bestimmte Konditionen im synovialen Gewebe einem veränderten Pool periphere T-Lymphozyten rekrutieren, die dann als proinflammatorische Zellen agieren (Weyand et al. 1999).

CD8+ Zellen sind in eher geringer Zahl präsent, die CD4:CD8 Ratio ist im Synovium im Vergleich zum peripheren Blut erhöht (Weyand et al. 1999). Die Therapieerfolge bei der RA durch eine T-Zell Inhibition, wie zum Beispiel durch das zugelassene Medikament Abatacept unterstreicht die mögliche ätiopathologische Bedeutung dieser Zellen (Genovese et al., 2005).

2.4.3. Zytokine

Der „Cross-Talk“ zwischen den unterschiedlichen Zellen, respektive den PMN und T-Zellen im Mikromilieu des entzündeten Gelenks, erfolgt unter anderem über Zytokine. Nicht erst seit dem durchschlagenden therapeutischen Erfolg der Zytokininhibitoren, wie den $\text{TNF}\alpha$ -Blockern (Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab und Golimumab), dem Interleukin (IL)-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra oder dem IL-6 Rezeptor-Antagonisten Tocilizumab, gilt die pathophysiologische Rolle dieser verschiedenen Zytokine als gesichert (Review: Robak T et al., 1997; Brennan et al., 2008). Hierbei steht sowohl die Herkunft als auch der Angriffspunkt der unterschiedlichen Zytokine im Fokus.

$\text{TNF}\alpha$, IL-1 oder IL-6 sind als entscheidend für die Pathologie der RA etabliert (Brennan et al., 2008). Die genaue Bedeutung und zelluläre Wirkungsweise jüngst bei der RA identifizierter Zytokine wie $\text{INF}\gamma$, IL-15, IL-17, IL-18 ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Pierer et al., 2003). Inflammatorische Zellen werden durch die Aktivität von $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-18 in das blande Synovium rekrutiert. Im Synovium findet eine Retention von Zellen, z.B. PMN über die Inhibition ihrer Apoptose, insbesondere durch $\text{TNF}\alpha$, statt. Getriggert durch $\text{INF}\gamma$, IL-15 und $\text{TNF}\alpha$ werden T-Zellen aktiviert und organisiert. Die Kommunikation erfolgt sowohl auto- als auch parakrin. Diese semiautonomen Prozesse im Gelenk resultieren in einer invasiv, proliferierenden Antwort der Synovialis.

$\text{TNF}\alpha$ ist bei der RA für den primären Entzündungsvorgang verantwortlich. Hauptsächliche Pathogenitätsfaktoren des Zytokins sind die Stimulation der Fibroblastenproliferation, die gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 und die Induktion der GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Zudem stimuliert $\text{TNF}\alpha$ die Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen (Brennan et al., 1992, Bläss et al. 2001).

IL-2 und $\text{INF}\gamma$ sind charakteristische Zytokine aktivierter T-Zellen. Im rheumatischen Gewebe finden sie sich in eher geringer Quantität (Firestein,

1997). $\text{IFN}\gamma$, genau wie $\text{TNF}\alpha$, ist einer der stärksten bekannten Stimulatoren von PMN und führt neben einem verlängerten Überleben der PMN zu einer Raufregulierung von MHC Klasse II und CD83 Molekülen in vitro auf PMN, triggert somit deren morphologische Differentierung zu „dendritic like cells“ (Iking-Konert et al., 2005).

IL-15 wird sowohl von Makrophagen als auch von T-Zellen produziert. IL-15 aktiviert T- Zellen bei der RA, wahrscheinlich via Zell-Zell-Kontakt (McInnes et al., 1997). Über autokrine Mechanismen führt IL-15 zur lokal erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$. IL-15 RNA wurde vor allem bei der frühen RA in der Synovialis identifiziert und korreliert mit der Akute-Phase-Antwort (Kotake et al., 1997). IL-15 soll die Osteoklastenformation inhibieren (Chabaud et al., 2001) und eine erhöhte Monozytenaktivierung triggern (Kirkham et al., 2006). In vitro konnte gezeigt werden, dass IL-17 als Stimulator der IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ Produktion wirkt. Zudem reguliert IL-17 die Granulozytenhomöostase und spielt eine Rolle bei der Kollagen- destruktion (Stamp et al., 2004).

Sicherlich sind noch nicht alle Effekte dieser Zytokine bekannt oder gar verstanden, dennoch haben sich die Kenntnisse über die Wirkung der pathophysiologisch relevanten Zytokinen bei der RA in den letzten Jahren stetig erweitert. Bei der RA liegt zusammenfassend offenbar ein Übergewicht proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-2 und IL-15, vor. Die therapeutische Hemmung dieser proinflammatorischen Zytokine, als frühen Eingriff in die pathogenetischen Mechanismen der RA, liegt nahe.

2.4.3 Synoviale Hyperplasie

Durch oben beschriebene Prozesse ist bei der RA die Synovialis der befallenen Gelenke entzündlich verändert, verdickt und von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen infiltriert. Die proliferierte Synovialis (das sogenannte Pannusgewebe) ist an der Gelenksknorpeloberfläche adhären und greift die Knorpel- und Knochenstrukturen an (Firestein, 1997; und 2003). Pannusgewebe ist an der Gelenksknorpeloberfläche adhären.

Die Zellen produzieren Proteinase, welche die Degradation und Destruktion des Knorpels induzieren (Ishikawa et al., 1996; Müller-Ladner et al. 1998). Multinukleäre Zellen, die phänotypisch als Osteoklasten identifiziert wurden, fanden sich am Pannus-Knochen-Übergang in knochenresorbierenden Lakunen (Gravallese et al., 1998, Müller-Ladner et al., 2005). Im peripheren Blut induzieren CD4⁺-ODF⁺ (Osteoklasten Differentiation Faktor) T-Zellen die Entwicklung/Umwandlung mononucleärer Zellen zu Osteoklasten (Kotake et al., 2001). Welche Zellen die Osteoklastengnese im entzündlich veränderten Gelenk triggern, wird kontrovers diskutiert. Synoviale T-Zellen könnten im Gelenk der RA Patienten ähnlich wie im Blut diese Funktion übernehmen.

Die synoviale Intima besteht aus Synovialozyten (synovial lining cells, SLC). Elektronenmikroskopisch kann man zwei unterschiedliche SLC Populationen charakterisieren, Typ-A und Typ-B Synoviozyten (Yamanishi et Firestein, 2001). Typ-A Synovialozyten sind makrophagenähnlich und entstammen der monozytären Zellreihe. Typ B Synovialozyten ähneln Fibroblasten und produzieren synoviale Proteine der Extrazellulärmatrix, wie Collagen, Fibronectin (Seemayer et. al. 2001) Lubricin und Hyaluronsäure. Bei der chronischen RA überwiegt die erhöhte Zellzahl an Typ A Synovialozyten (Makrophagen). Im frühen Krankheitsstadium (Early RA) dominieren die Typ B Synoviozyten (Athanasou et Quinn, 1991).

1.5 Granzym B bei der Pathogenese der RA

Trotz des heute besseren Verständnisses der komplexen Pathogenese der RA bleiben die genauen immunologischen Mechanismen von der akuten Entzündungsreaktion über die Entstehung der pathologischen Synovia hin zur finalen Destruktion von Knorpel und Knochen offen. Nach neueren Ergebnissen könnte auch das angeborene Immunsystem, insbesondere die PMN, eine bedeutende Rolle bei der Auslösung der RA spielen. Die peripheren PMN werden, wie oben beschrieben im Laufe der Pathogenese der RA in das Gelenk rekrutiert und bilden dort die quantitativ größte Zellpopulation. Sie sind in Konglomeraten an der Knorpel-Pannus-Grenze identifiziert worden und könnten hier, unter

anderem durch die Freisetzung von Proteasen, zur Chondro- und Osteodestruktion beitragen. Bei der RA gehört die proteolytische Zerstörung des Gelenknorpels und des Knochens zu den typischen Krankheits- und Prognosekriterien. Die Knorpelzerstörung wird hauptsächlich durch Matrix Metalloproteasen, Kollagenasen, Glykosidasen, Aggrecanasen und Serinproteasen induziert (Ronday et al. 2001; Demasi et al., 2004; Diarra et al. 2007; Thomas M et al., 2006).

Zu den in der Pathogenese der RA bedeutsamen Serinproteasen gehören Granzyme. Granzyme sind neutrale Serinproteasen. Beim Menschen wurden bisher fünf verschiedene Granzyme und zwar Granzym A, B, H, M und K charakterisiert, die je nach ihrer Substratspezifität in drei verschiedene Subfamilien unterteilt werden (Smyth et al., 1995; Trapani, 2001). Der strukturelle Aufbau sowie die Funktionalität von Granzym A und B standen bisher im Fokus der Forschung. Über Granzym H, K und M ist erst wenig bekannt.

Granzyme werden als sogenannte Zymogene, inaktivierte Enzymvorstufen, synthetisiert und in Granula gespeichert (Pinkoski et al., 1996; Wagner et al.; 2008). Ihre enzymatische Aktivität erhalten sie erst nach Abspaltung des N-terminalen Dipeptids durch die Dipeptidyl-peptidase I (DPPI) auch Cathepsin C genannt (McGuire et al., 1993). Cathepsin C wird konstitutiv in Lysosomen exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Granzym Funktion. DPPI-defiziente Mäuse zeigen keine oder nur sehr geringe Granzymaktivitäten (Trapani et al.; 2001).

Typischerweise wird Granzym B (GrB) von zytotoxischen Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen produziert (Trapani et al., 2001). In jüngster Zeit konnte GrB *in vitro* auch in Zellen der myeloischen Zelllinie, in CD34+ Stammzellen und PMN nachgewiesen werden (Wagner et al.; 2004 und 2008). GrB wird in den primären „dense-core type I“- Granula (Trapani et al., 2001; Wagner et al., 2008) gespeichert. In PMN konnte die Protease aber auch in den sekundären Granula nachgewiesen werden (Wagner et al.; 2008).

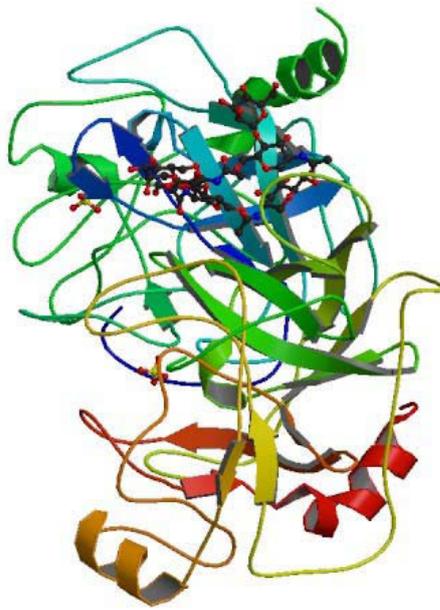


Abb. 1 Der Ribbon Plot zeigt die Tertiärstruktur von humanen GrB. GrB zählt zur Gruppe der trypsin-ähnlichen Serinproteasen und ist auf dem humanen Chromosom 14q11.2 kodiert. Die GrB ist in zwei sechs-strängige β -Blätter gefaltet, welche über drei trans-Domän Segmente verknüpft sind. Weitere Elemente der Sekundärstruktur sind die helikale Schleife zwischen Ala 56 und Cys 58 sowie die lange C-terminale Helix (siehe Pfeil) von Phe 234 zu Arg 244. Die dreidimensionale Struktur von GrB ist generell ähnlich der Sekundär- und Tertiärstruktur anderer Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, erhält jedoch eine funktionelle Spezifität durch die Aspartat-Aktivität mit der Fähigkeit Asparaginsäure zu spalten.

Abbildung aus: Estebanez-Perpina, E., Fuentes-Prior, P., Belorgey, D., Braun, M., Kiefersauer, R., Maskos, K., Huber, R., Rubin, H., Bode, W.: Crystal Structure of the Caspase Activator Human Granzyme B, a Proteinase Highly Specific for an Asp-P1 Residue *Biol.Chem.* 381 pp. 1203 (2000) Image courtesy of Protein Data Bank

Die funktionellen Eigenschaften des Enzyms sind vielfältig. GrB besitzt als einziges Granzym Aspartat-Aktivität und somit die Fähigkeit Asparaginsäure zu spalten. GrB erkennt Sequenz-Motive an der Oberfläche zytosolischer Proenzyme, s.g. Procaspasen. Diese Vorläufermoleküle werden durch selektiven Schnitt in der Nähe eines negativ geladenen Asparaginsäurerestes in eine funktionell aktive Caspase umgewandelt. Caspasen sind der intrazelluläre Motor des programmierten Zelltodes (Smyth; 1995). In seiner apoptose-induzierenden Funktion ist das Enzym zahlreich beschrieben (Smyth, 1995; Trapani, 2001). Die GrB vermittelte Apoptose wird sowohl über die direkte Aktivierung einer Caspasen Kaskade (casp 3,6,7,8,9,10) als auch über Mitochondrien und Cytochrom C vermittelt (Pinkoski et al., 1996).

Aktivierte CTL degranulieren, nachdem sie eine enge zelluläre Bindung mit der Zielzelle eingegangen sind. GrB bindet vermutlich an

hochspezifische Rezeptoren der Zielzelle, den s.g. Mannose-6-phosphate-Receptor pathway (Motyka B et al., 2000). Das Protein wird über Endozytose aufgenommen und in Vesikeln (coated vesicle) gespeichert. Die Freisetzung des vesikulären GrB geschieht im Zusammenspiel mit dem porenformenden Protein Perforin. Perforin liegt im Zytoplasma der Zelle vor und induziert durch die Bildung von Poren in die GrB Vesikel die Freisetzung des GrB in das Zytoplasma der Zielzelle.

Eine Rolle bei der Gelenkentzündung und -destruktion der RA wird GrB durch die proteolytischen Aktivität und extrazelluläre Wirkungsweise zugeschrieben. An der Knorpel/Pannus-Grenze konnten Neutrophilienpopulationen in Konglomeraten identifiziert werden (Lees et al., 1994). Auch die Zahl der GrB+ Zellen im Synovialgewebe, speziell auch im Pannusgewebe, ist signifikant erhöht (Tak et al., 1999; Roday et al., 2001; Smeets et al., 2001).

Vergleiche zwischen Patienten mit RA und Patienten mit reaktiver Arthritis oder Osteoarthritis zeigten erhöhte Konzentrationen von GrB in der Synovialflüssigkeit. (Tak et al., 1999). Zur Identität der GrB+ Zellen wurde jedoch keine Aussage getroffen (Roday et al., 2001), oder man ging von CTL aus, ohne diese jedoch, z.B. durch Oberflächenmarker, eindeutig zu identifizieren (Tak et al., 1999).

Die Fähigkeit zum Schneiden intra- und extrazellulärer Substrate legt eine Rolle des GrB's bei der Knorpel- und Gelenkdegradation der RA nahe. Inwiefern GrB+ Zellen an der Zerstörung der extrazellulären Matrix beteiligt sind, bleibt im Detail noch ungeklärt. Vermutlich ist ihnen dies über verschiedene Wege wie z.B. Zell-Zell-Interaktionen, zytokinvermittelte Stimulation von matrixzerstörenden Synoviozyten und/oder lokale Produktion matrixzerstörender Enzyme (GrB) möglich (Roday et al., 2001).

Granzyme eignen sich somit als potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung neuartiger Medikamente, um eine Fehlregulation des Immunsystems und die hierbei beobachteten Schäden durch GrB+ Zellen zu verhindern. Derartige Inhibitoren könnten bei Autoimmunkrankheiten wie der RA praktische Anwendung finden.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist zu prüfen, ob GrB in synovialen PMN von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) ex vivo nachweisbar ist. Bisher gibt es keine Untersuchungen zu GrB in PMN in vivo. Darüber hinaus soll die GrB-Expression und der Gehalt an GrB in synovialen PMN mit den Zellen im peripheren Blut der Patienten und mit klinisch/serologischen Aktivitätsparametern verglichen werden. Dieser Vergleich soll zu einer genaueren Vorstellung über Regulation und Funktionalität der Protease im Milieu des entzündeten Gelenks bei der RA führen. In in vitro Versuchen soll außerdem die Regulierbarkeit von GrB in PMN durch proinflammatorische Zytokine (u.a. TNF) untersucht werden. Durch diese Untersuchungen, soll am Beispiel der Protease GrB die morphologische und funktionelle Veränderung neutrophiler Granulozyten bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen untersucht werden um deren Rolle bei der Pathogenese der RA besser zu verstehen.

3. Material und Methoden

Methoden

3.1. Patienten- und Probandenkollektiv

Das Kollektiv setzt sich aus 19 RA–Patienten der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf und der Rheumatologie des Klinikums Essen Süd zusammen. In der Kontrollgruppe (n=11) befinden sich Patienten mit primär nicht-erosiven Arthritiden wie Gichtarthropathien (n=2), HLAB27-assoziierten Spondylarthritiden und Oligoarthritis (n=6) Psoriasisarthritiden (n=2) sowie eine Patientin mit einem Morbus Crohn. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf und der Universität Heidelberg genehmigt.

Für die Versuche mit Vollblut rekrutierten wir gesunde, freiwillige Probanden.

Die Patienten wurden vor der Punktion bzw. Blutentnahmen aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis. Die Indikation zur Gelenkpunktion wurde bei unklarer Genese des Krankheitsbildes der Arthritis aus diagnostischen oder, bei bekannter Grunderkrankung, aus therapeutischen Gründen gestellt. Eine alleinige Punktion nur auf Grund der Studie wurde in keinem Falle durchgeführt. Parallel zu der Gelenkpunktion erfolgte bei einigen Patienten eine venöse Blutentnahme in EDTA-Röhrchen. Die Anzahl der Patienten für die einzelnen Untersuchungen variierte. Die genaue Dokumentation wird in den entsprechenden Abschnitten im Ergebnisteil und/oder den Abbildungen gezeigt.

Bei jedem Patienten wurde mittels eines standardisierten Dokumentationsbogens (siehe Anhang) die Begleiterkrankungen, die Entzündungsparameter, der Antikörperstatus (Rheumafaktor und CCP), falls nötig die mikrobiologische Untersuchung sowie die aktuellen medikamentöse Therapie erfasst. Bei den RA-Patienten bestimmten wir zur Aktivitätsbeurteilung den „disease activity score“ DAS28 (siehe unten).

3.1.1 RA Patienten Gruppe

Das mittlere Alter in der RA-Patientengruppe lag bei 65,5 Jahren. In der Gruppe der RA-Patienten waren 15/19 CCP positiv und 13/19 laut konventionellem Röntgen der Hände und Füße erosiv. Die Krankheitsaktivität gemessen am DAS28 (siehe unten) war bei einem Patienten als gering, bei sechs Patienten als „mittel“ und bei zwölf Patienten als „hoch“ einzustufen (siehe unten und Tab.2). Vier Patienten waren zum Zeitpunkt der Gelenkpunktion medikamentös unbehandelt. Die weiteren Therapien sind der Tabelle zu entnehmen.

Patient	Alter	DAS28	CRP [mg/dl]	RF	CCP [U/ml]	erosiv?	Therapie [in mg]
1	64	2,7	0,5	neg	<5	pos	Pred10
2	70	3,9	0,4	pos	1,5	neg	MTX20/Pred7,5
3	73	4,2	0,5	neg	2	pos	CSA100/Pred10
4	70	4,5	2,4	pos	1,6	neg	MTX20/Pred7,5
5	60	4,6	2,2	pos	23,5	no data	no data
6	69	4,9	0,1	pos	442	pos	MTX15/Lef10/Pred5
7	32	4,9	0,5	neg	>100	neg	unbehandelt
8	83	5,2	1,0	pos	pos	neg	MTX15/Pred 10
9	69	5,2	0,5	pos	pos	pos	ETN 50/MTX10/Pred10
10	55	5,6	2,0	pos	>200	pos	MTX15/Pred 5
11	72	5,6	4,8	pos	pos	pos	no data
12	77	5,8	1,0	pos	>200	pos	Tau 20/SSZ/Pred7,5
13	56	5,9	5,9	pos	24	pos	Pred 7,5
14	90	6,0	0,4	pos	>200	pos	MTX15/Pred7,5
15	53	6,3	2,3	pos	pos	neg	Tau20/Pred7,5
16	43	6,3	3,9	neg	>100	neg	unbehandelt
17	73	6,6	7,2	pos	2	pos	unbehandelt
18	70	7,0	8,6	pos	>200	pos	MTX15/Pred15
19	66	8,4	31,1	pos	pos	pos	MTX20/Pred12

Tab. 2 In der Tabelle ist das Profil der 19 RA-Patienten der Studienkohorte dargestellt. Gezeigt werden Alter, krankheitsassoziierte Parameter (DAS28, CRP, RF, CCP), die Erosivität (untersucht an konventionellen Röntgenaufnahmen der Hände und Füße in 2 Ebenen) sowie die aktuelle RA-Therapie. Die nicht durchgezogenen Linien in der Tabelle trennen die Kohorte entsprechend ihrer Krankheitsaktivität (gemessen am DAS28). Die Grenzen entsprechen dabei den Definitionen der RA in geringe (< 3,2), mittlere (3,2 – 5,1) und hohe (> 5,1) Krankheitsaktivität (s.u.). Pred: Prednisolon; MTX: Methotrexat; CSA: Cyclosporin; Lef: Leflunomid; ETN: Eterncept; Tau: Tauredon (Goldsalz), Aza: Azathioprin; SSZ: Sulfasalazin;

3.2. DAS28 und Krankheitsaktivität

Das Standardinstrument zur Beurteilung der Krankheitsaktivität und ihres Verlaufs ist der sogenannte „Disease activity score“ (DAS) (disease

activity=Krankheitsaktivität; score=Punktzahl/Auswertung). Hierbei gehen klinische Parameter wie die Anzahl schmerzhafter, geschwollener Gelenke, laborchemisch die BSG/CRP sowie die Gesamtbeurteilung zur Krankheitsaktivität durch den Patienten ein. Das so ermittelte Ergebnis wird mit einer Punktzahl zwischen 0-10 beschrieben. Es existieren verschiedene Varianten des DAS. Der Unterschied besteht in der von der EULAR festgelegten, standardisierten Anzahl der zu berücksichtigenden Gelenke. Standardmäßig wird der DAS28 (28 Gelenke, siehe Anhang) benutzt. Die folgende Tabelle zeigt die Beurteilung der Krankheitsaktivität entsprechend dem gemessenen DAS-Wert:

- Werte zwischen 0-3,2 entspricht einer fehlenden bis geringen - Krankheitsaktivität
- Werte zwischen 3,2 und 5.1 entspricht einer mittleren Krankheitsaktivität
- Werte oberhalb von 5,1 entsprechen eine hohen Krankheitsaktivität

Schwere Verlaufsformen der RA sind in der Regel durch eine hohe Krankheitsaktivität gekennzeichnet. Eine hohe Aktivität des Entzündungsgeschehens ist aber, insbesondere bei schubförmigen Verläufen, nicht immer gleichbedeutend mit dem Ausmaß der Erkrankung bei chronischem Krankheitsgeschehen. In diesem Fall kann der DAS28 - Wert eher einer Momentaufnahme entsprechen. Mit erfolgreicher Behandlung des Schubes sollte der Wert erwartungsgemäß sinken. Ein Wert unter 2,6 signalisiert das Erreichen einer klinischen Remission, d.h. Symptombefreiheit bis hin zu einem Stillstand der Erkrankung. Zur weiteren Beurteilung der Krankheitsaktivität eignen sich die Bildgebung mit der Erfassung der radiologischen Progression, Laboruntersuchungen der Akute-Phase-Reaktion und Anämie.

3.3 Gelenkpunktion, Verarbeitung und Aufbereitung der Synovialflüssigkeit

Bei den Punktionen handelte es sich in der Regel um Kniegelenks- und in zwei Fällen um Schultergelenkspunktion. Die Gelenkpunktion wurde unter sterilen Bedingungen und nach schriftlicher Aufklärung der Patienten durchgeführt.

Um eine Koagulation zu vermeiden, wurden die frischen Gelenkpunktate steril in heparinisierte Röhrchen überführt.

Die Synovialflüssigkeit wurde 10 min. bei 3200 rpm zentrifugiert, die zellfreien Überstände abgenommen, aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. Das Zellpellet wurde in 10 ml Facspuffer + Venimmun® (1%) resuspendiert, um nach einem einmaligen Waschvorgang den Zellgehalt zu bestimmen. Der Zusatz von Venimmun® (humanes IgG) diente zur Reduktion der unspezifischen Bindung der Antikörper während der Färbung über die Fc-Rezeptoren an PMN.

3.4. FACS-Analysen (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

3.4.1 Färbung der synovialen PMN - Markierung von Oberflächenmolekülen

Zur phänotypischen Charakterisierung der PMN wurden Antikörper gegen Oberflächenrezeptoren CD15, CD11b und CD64 (siehe Tab. 3) benutzt. Die GrB Expression auf der Zelloberfläche der Granulozyten wurde mit drei unterschiedlichen Anti-GrB Antikörpern (siehe Tabelle) bestimmt. Für die extrazellulären Färbungen wurden je 100 μl der Zellsuspension 20 min. lichtgeschützt mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die eingesetzten Mengen, die Hersteller und die Klone sind der unten stehenden Tabelle zu entnehmen.

Es folgten zwei Waschschritte mit je 3 ml FACS-Puffer+ 1% Venimmun©. Zentrifugiert wurde jeweils 5 min mit 1700 rpm bei Raumtemperatur.

Antikörper	Hersteller/ Klon	Menge [µl]
GranzymB FITC	abcam/B18.1	2
GranzymB unmarkiert	Chemicon Australia/2C5-F5	4
GranzymB FITC	Kamiya Biomedical Company/MC-223	5
CD15 PE	BioLegend/HI98	10
CD66b FITC	Immunotech/80H3	5
CD11b FITC	Biozol/ICRF44	10
CD64 PE	AbD Serotec/10.1	10
Kontrollen		
Simultest $\gamma 1/\gamma 2$ a	Becton Dickinson/Kat.Nr 342409	5
Anti-IgG2a unmarkiert	Sigma /	5
Anti-mouse IgG whole molekule	Sigma/F2012	5
Zweitantikörper		
Anti-mouse IgG1 FITC	Immunotech/	5

Tab.3 Die Tabelle zeigt eine Auflistung der für die FACS Färbung verwendeten Antikörper und der entsprechenden Kontrollen. Zu jedem Antikörper ist der Hersteller, der Klon sowie die verwendete Menge angegeben.

3.4.2. Permeabilisierung und intrazelluläre Färbung der Zellen

Der intrazelluläre GrB Gehalt der PMN wurde über die Färbung der Zellen mit den gleichen Anti-GrB Antikörpern (siehe Tab.3) bestimmt. Damit der Antikörper an dem intrazellulär liegenden Protein binden kann, wurden die Zellen zunächst mit jeweils 100µl Fix&Perm® Lösung A pro 100µl Zellsuspension permeabilisiert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit folgten zwei Waschschrte mit 3 ml FACS Puffer+ Venimmun©, unter oben beschriebenen Bedingungen. Anschließend wurden die jeweiligen Antikörper (siehe Tabelle) zusammen mit je 100µl Fix&Perm® Lösung B 20 min. lichtgeschützt inkubiert, um die Antikörperbindung zu fixieren. Es folgten zwei Waschschrte mit 3 ml FACS-Puffer+ 1% Venimmun© entsprechend der oben beschriebenen Angaben. Einzelne Antikörper (siehe Tabelle) waren nicht direkt fluoreszenzmarkiert verfügbar. In diesen Fällen wurde eine indirekte Färbung durchgeführt. Der unmarkierte Primärantikörper wird wie oben beschrieben inkubiert, anschließend wird der isotypenspezifischen Zweitantikörper, in diesem Fall Anti-mouse IgG FITC (1:50 verdünnt mit FACS-Puffer), hinzugegeben. Die Zweitmar-

kierung erfolgte jeweils nach zweimaligem Waschen. Die Inkubationszeiten und Puffermengen entsprechen denen der direkten Färbungen.

3.4.4. GrB Färbung im Vollblut

Parallel zu der Färbung der Synovialzellen wurde heparinisertes Vollblut der Patienten untersucht, um die GrB Expression der peripheren Vollblut (VB) PMN vergleichend zu der synovialen Population zu beurteilen. Analog zu den Färbungen der synovialen Zellen wurden auch die Vollblut (VB) PMN sowohl intra- als auch extrazellulär mit dem GrB-Antikörper gefärbt. Zur Lyse der Erythrozyten wurde zunächst 100µl Blut mit 2ml FACS Lysing Solution® (10 min; 1:10 Verdünnung mit Aqua dest.) inkubiert. Es folgen zwei Waschschrte mit je 3ml Cellwash®. Für die extrazelluläre Färbung wurden nun die entsprechenden Antikörper (die Mengen sind aus der obigen Tabelle zu entnehmen) hinzu pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgen zwei Waschschrte mit je 3 ml Cellwash. Bei der intrazellulären Färbung wurden die Zellen nach dem Lyseschritt 10 min mit FACSPERM® (1:10 Verdünnung mit Aqua dest.) inkubiert, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Es folgte ein Waschschrte mit 3ml Saponin Puffer. Danach wurden die Antikörper in den jeweiligen Mengen (siehe Tabelle) hinzu pipettiert, entsprechend der extrazellulären Färbung 15 min inkubiert und daraufhin zwei Mal gewaschen. Die Waschungen bei den intrazellulären erfolgten mit jeweils 3ml Saponin Puffer um die Zellen permeabel zu halten. Die Proben wurden nach jedem Waschschrte mit 1700rpm zentrifugiert. Alle Vollblutansätze (auch die verschiedenen, unten beschriebenen Zytokinstimulationsversuche) wurden mit EDTA-Blut durchgeführt.

3.4.5. Fixierung der gefärbten Zellen

Die gefärbten Zellen wurden abschließend mit 400µl Cytofix© (1:4) verdünnt in FACS-Puffer) (PBS ,1% BSA, 0,1% NaN₃) fixiert.

Durchflußzytometrie

Die fixierten Zellen befinden sich in Suspension mit Cytofix® (siehe unten) als Trägerlösung. Ein fokussierter 488 nm Laserstrahl erzeugt Streulicht- und Fluoreszenzsignale.

Die Streulichtsignale zeigen die Zelleigenschaften an. Die Intensität des Vorwärtstreulichts (FSC) ist abhängig von der Größe und Oberflächenstruktur der Zelle. Das Seitwärtstreulicht (SSC) ist sensitiv für ihre Granularität.

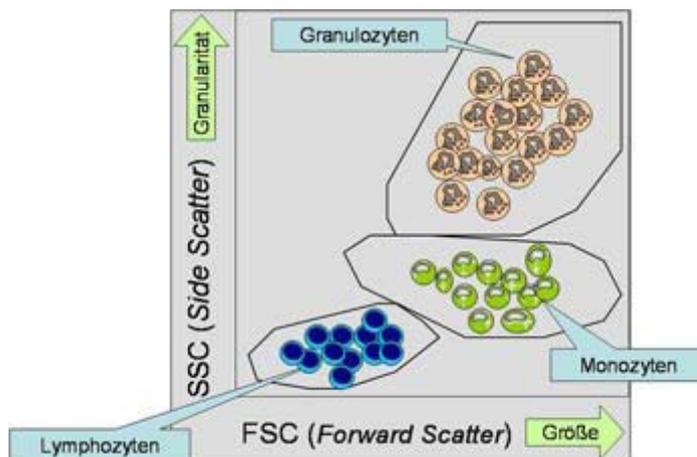


Abb. 2 Die Leukozyten werden mittels FACS nach ihrer Größe (Seitwärtsstreuung SSC) und nach ihrer Granularität (Vorwärtstreulicht FSC) getrennt. Entsprechend finden sich die Granulozyten mit ihren zahlreichen Granula und als größte der drei Zellpopulationen im äußeren oberen Quadranten des Dot Plots. Die Lymphozytenpopulation haben kaum Granularität. Die Monozyten sind von ihrer Größe her ähnlich den PMN, tragen jedoch weniger Granula.

Da es uns auf die Charakterisierung der Granulozytenpopulation ankam, gateten wir die Zellen entsprechend in den SSC/FSC Kanälen.

Für die Fluoreszenzmarkierung wurden die Zellen auf $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt. Die benutzten Antikörper sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzen, Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün) oder Phycoerythrin (PE, rot) markiert.

Anhand der gebundenen Antikörper wurde die intra- und extrazelluläre GrB Expression der PMN mit verschiedenen Anti-GrB Antikörpern beurteilt. Zusätzlich wurden granulozytenspezifische Oberflächenantigene zur Funktionsbeschreibung und genaueren Typisierung der Population bestimmt. Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil positiv gateted

Zellen. Dieser Wert wird in „%positive PMN“ angegeben. Die Messung und Analyse der gefärbten Zellen erfolgte in einem FACS-Sort® mit CellCept 3.3® als Software (beides BecktonDickinson)

3.5. GrB Hemmung mit Brefeldin A (BFA) und Cytochalasin B

Zum Verständnis des spontanen kinetischen Verhaltens von GrB in den PMN *in vitro* führten wir Hemmversuche mit den Proteininhibitoren Cytochalasin B und Brefeldin A durch. Wir setzten 10µmol und 30µmol Cytochalasin B und 20 µmol Brefeldin A ein. Cytochalasin B ist ein Pilzgift, das die Polymerisation des Aktins unterbindet und damit den cytoplasmatischen Transport über Mikrofilamente verhindert. Brefeldin A ist ebenfalls ein Pilzmetabolit und verhindert über den Zerfall des Golgi-Apparates den anterograden Proteintransport und führt somit zu einer Proteinakkumulation im Endoplasmatischen Retikulum. (Übersichtsarbeit: Hunziker et al., 1992) Beide Proteininhibitoren fanden in anderen Arbeitsgruppen bereits als GrB Inhibitoren Verwendung.

3.6. Stimulationsversuche mit Zytokinen

Um die Regulation der Protease GrB in den PMN zu analysieren, wurden Stimulationsversuche mit pathophysiologisch relevanten Zytokinen (siehe Einleitung) in folgenden Medien durchgeführt:

1. frisch punktierte native Synovialflüssigkeit,
2. Vollblut gesunder Probanden und
3. isolierte PMN beider Kompartimente.

Zusätzlich wurde die Wirkung von Infliximab (Handelsname REMICADE®) auf die GrB Expression der PMN untersucht. Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNF α und für die Therapie der RA zugelassen. Infliximab wurde nach Inkubation mit dem Zytokin zu unterschiedlichen Zeitpunkten (sofort, nach 4 Stunden, nach 14 Stunden, nach 20 Stunden) zu dem Ansatz hinzugegeben.

Das Probenmaterial wurde steril mit den jeweiligen Zytokinmengen (siehe Tabelle) stimuliert und im Brutschrank bei 37° unter CO₂ Zufuhr inkubiert. Die Stimulationszeiten betragen 4 und/oder 24 Stunden.. Mengen und

Konzentrationen sind aus folgender Tabelle zu entnehmen und beziehen sich auf jeweils 100µl Material. Als Kontrolle nutzen wir native, unstimulierte Proben des jeweiligen Materials.

Zytokin/Antikörper	Menge pro 100µl Ansatz	Hersteller/Katalog No.
TNF α	2µl (1:10 verdünnt)	Cell Sciences/CRT100A
INF γ	2µl (1:10 verdünnt)	Cell Sciences Inc./CRI000A
IL-2	2µl (1:10 verdünnt)	Invitrogen/ PHC0026
IL-15	2 µl	R&D Systems/247-IL
IL-17	2µl	Sigma-Aldrich/MFCD0194096
Infliximab(Remicade)	5µl (1:10 verdünnt)	CentocorINC., Vertrieb ESSEX PHARMA GMBH

Tab.4 In der Tabelle sind die für die Stimulationsversuche verwendeten Zytokine und der TNF α Antikörper Infliximab aufgelistet. Es sind jeweils die verwendeten Mengen und der Hersteller (inklusive Katalog Nr.) angegeben.

Die Vollblutstimulation wurde in 6-Well Platten durchgeführt. Für die frische Synovialflüssigkeit stellte sich die Stimulation in FACS Röhrchen als überlegen heraus.

Nach abgelaufener Stimulationszeit wurden die Proben resuspendiert und die wandadhärenten Zellen vorsichtig gelöst. Nachdem die Proben abzentrifugiert waren, konnten die Überstände jeweils abgenommen und bei -20°C eingefroren werden. Das Zellpellet wurde gewaschen, die Zellen gezählt und auf $1 \cdot 10^6$ Zellen für die GrB Färbung eingestellt.

3.7 Kultivierung der PMN

Die Zellen wurden zur Stimulation bei 37°C und 6% CO $_2$ -Begasung im Brutschrank inkubiert. Die isolierten PMN wurden auf $1 \cdot 10^6$ Zellen in AIM V® Medium mit 2,5% autologem Serum kultiviert. Das Serum ist bei 56°C 30 min hitzestabilisiert worden.

3.8 Isolation CD15+ PMN mittels MACS und Polymorphprep® Gradient

Um die isolierten Veränderungen in der GrB Expression der Granulozyten durch die Zytokinstimulation zu untersuchen, wurden die Zellen über eine Gradienten mit Polymorphprep® isoliert und in einigen Fällen noch zusätzlich über die MACS Säule mit anti-CD15 Microbeads® aufgereinigt. Für die Messung wurde den Patienten Vollblut in Natrium-Heparin Lösung

(Beckton Dickinson, Heidelberg) abgenommen. Die Isolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Für die Isolierung der CD15 positiven PMN's überschichteten wir die Proben mit Polymorphprep® für Granulozyten nach Angaben des Herstellers (die Hersteller sind in der Tabelle im Anhang angegeben). Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 1600 rpm ohne Bremse konnte der Granulozytenring mit Pipette abgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt werden. Die Zellen wurden mit 15ml MACS-Puffer (500ml PBS +2,5g BSA + 0,3722g EDTA) aufgefüllt und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen war, folgten zwei weitere Waschschrte mit 4ml Puffer bei 1500 rpm. Das Pellet wurde dann in 40ml MACS-Puffer resuspendiert und in 5ml Facs-Puffer überführt und Zellen+Lösungen bei 8°C kühl gehalten. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 300g und 8° C wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 80µl MACS-Puffer resuspendiert.

Magnetic Cell Sorting (MACS)

Um eine optimale Bindung an die MACS-Säule zu gewährleisten, sollte die Zellzahl zwischen $1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^7$ betragen. Das Pellet wurde in 80µl MACS-Puffer resuspendiert, mit 20µl Anti-CD15 MicroBeads® versetzt und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml MACS-Puffer gewaschen (Zentrifuge 300g, 10 min), der Überstand abpipettiert und das Pellet in 500µl Puffer aufgenommen.

Die CD15-Granulozyten werden mit magnetischer Anti-CD15 Microbeads® Zell Separation (autoMACS) isoliert (nach Angaben des Herstellers Miltenyi Biotech).

3.9. RT-PCR für GranzymB im PMN der Synovia

Die komplette zelluläre PMN RNA wurde mittels High Pure RNA Isolation Kit von Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) isoliert. Für die Reverse Transkription (RT) nutzten wir das SuperScript Preamplification System (Life Technologies, Gibco BRL, Gettysburg, PA). Für die GrB PCR wurde folgender Ansatz hergestellt: 5ul RNA , 10pmol dNTP wurden zugegeben, 25 pmol des respektiven Primers und 1U Taq

DNA-Polymerase in 2 mM MgCl₂. Nach der Ausgangsdenaturierung bei 94° für 5 min folgten 10 Zyklen (94°C 30 sec, 66°C 30 sec, 73° 30 sec) und 25 Zyklen (94° 1 min, 63° 1 min, 73° 1 min) der Replikation. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 73° beendet. Folgende Primer wurden eingesetzt: GrB Strang: 5´TGC AGG AAG ATC GAA AGT GCG 3´, Komplementärstrang: 5´GAG GCA TGC CAT TGT TTC GTC 3´. Amplifiziert mit einem 824-bp Fragment. Die Primer wurden von ARK Scientific Biosystems (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert. Die PCR Produkte wurden in einer 1,5% Agarose Gelelektrophorese mit Sybrgreen (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) getrennt. Als Größenmarker wurden Molekül Weight Markers III und IV (Boeringer Mannheim) und als „housekeeping gene“ Glycerinaldehyd-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt. Die Banden wurden mittels FLA 2000 Scanner (Fuji, Tokyo, Japan) quantifiziert und mit Image-Gauge-Software, Version 3.0, ausgewertet.

3.10 Konfokale Laser Mikroskopie

Isolierte PMN (3×10^5) wurden in 500µl FACS Puffer resuspendiert, über Cytospin (700 rpm/5 min) auf PolyPrep® slides (Sigma) zentrifugiert und 30 Sekunden mit eiskaltem Ethanol fixiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, inkubierten wir die Zellen 30 min mit 100µl PBS (0,5% Serum, 0,1% Sodium Azid) bei Raumtemperatur. Wir benutzten Anti-GrB, Anti-CD66b und mouse IgG als Isotypenkontrolle jeweils 1:50 verdünnt. Als sekundären Antikörper verwendeten wir den FITC-konjugierten antimouse IgG Antikörper. Die Slides wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert und nach dem Waschen mit Dako mounting medium (Dako, Carpinteria, CA) fixiert. Die Slides wurden dann mit konfokaler Laser Mikroskopie (Leica microscope DM RBE, Leica laser system TCS NT; Leica, Bensheim, Germany) und unter Windows NT ausgewertet.

3.11 ELISA

3.11.1 GranzymeB ELISA

Neben der Messung des zellulären GrB Gehalts wurde die Präsenz des Proteins in den flüssigen Phasen unseres Probenmaterials quantitativ bestimmt. Das GranzymeB Kit® von Diaclone® funktioniert als Sandwich Elisa. Der monoklonale Antikörper, spezifisch gegen Granzym, B ist an eine feste Phase, die Microtiterstreifen in den Wells, gebunden. Da es sich um einen Einschritt-Elisa handelt, wurden das Probenmaterial und die Standardreihenproben simultan mit dem biotinyierten Detektionsantikörper in die Wells pipettiert. Die Inkubationszeiten und Waschvorgänge erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Farbintensität wurde bei 450 nm bestimmt und ist direkt proportional mit der GrB Konzentration in den Proben. Sie wurde qualitativ anhand der Eichkurve bestimmt. Der Elisa wurde als Doppelansatz für jede Probe durchgeführt.

3.11.2 Qunanta Lite TM CCP3 IgG ELISA

Der verwendete Elisa ist ein semiquantitativer, enzymgebundener Immunosorbensassay zum Nachweis von IgG Anti-CCP3 (Citruilisches Citrullin Peptid-Antigen der 3. Generation). Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die optische Dichte (OD) wird bei 450nm detektiert. Werte <20 Units gelten als negativ, Werte > 60 Units als stark positiv.

3.11.3 COMP® Elisa Enzyme Immunoassay AnaMar Medical®

COMP® ELISA ist ein Festphase-Enzyme-Immunoassay zur Bestimmung der Cartilage Oligometric Matrix Proteines (COMP) in Humanserum. COMP wird beim krankhaften Abbau von Gelenkknorpel in die Gelenkflüssigkeit abgegeben (REF 24,25). Erhöhte Werte sind unter Berücksichtigung klinischer Befunde und Laborbefunden eine Hilfe bei der Identifizierung voranschreitender erosiver Arthritiden.

Der Elisa basiert auf der Direkt-Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale Antikörper gegen verschiedene Antigen-Determinanten des COMP Moleküls gerichtet sind. Das Elisa-Kit von AnaMar Medical ist für

COMP Bestimmungen im Serum konzipiert. Wir wollten die COMP Menge in der SF unserer Probanden messen. Es wurden hierzu jeweils 25µl, 1:10 mit Probenpuffer verdünnte, sterile SF als Doppelansätze eingesetzt. Der Messbereich des ELISAs liegt bei 4-32 U/L. Die Anwendung erfolgte ansonsten nach Angaben des Herstellers. Wir detektierten COMP Levels > 1000 U/l wobei die Kontrollen mit 5 und 11 U/L im Regelbereich lagen.

3.12 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur statistischen Auswertung der nativen Messungen wurde der Mann-Whitney-Test für nonparametrische, unverbundene, nicht-normalverteilte Stichproben verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $p < 0,05$ festgelegt.

Die Koinzidenz der unterschiedlichen klinischen Parameter mit der GrB Expression oder dem GrB Gehalt wurde mit dem Chi square Test in Vierfeldertafeln ermittelt. Der Grenzwert für Parameter wurde entsprechend den Mittelwerten ± 1 SD der jeweiligen Vergleichsgruppe gesetzt.

Mann-Whitney-Test

Der Mann-Whitney-Test ("Mann-Whitney-U-Test" oder kurz "U-Test") ist ein parameterfreier statistischer Test. Der Test ist ein Homogenitätstest und dient zur Überprüfung der signifikanten Übereinstimmung zweier unabhängiger Stichprobenverteilungen. Es wird überprüft, ob die Verteilungen von $F_1(x)$ und $F_2(x)$ bis auf eine Konstante gleich sind. Bei zwei Stichproben gilt: Stichprobe A mit n_1 Werten und Stichprobe B mit n_2 Werten. Man vergleicht jeden Wert der Stichprobe A mit jedem Wert der Stichprobe B. Es gibt also $n_1 \cdot n_2$ Vergleiche. Die Nullhypothese $H(0)$ besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt.

Material

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper und Zytokine zeigt Tabelle 1 im Anhang. Eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien zeigt Tabelle 2 im Anhang.

4 Ergebnisteil

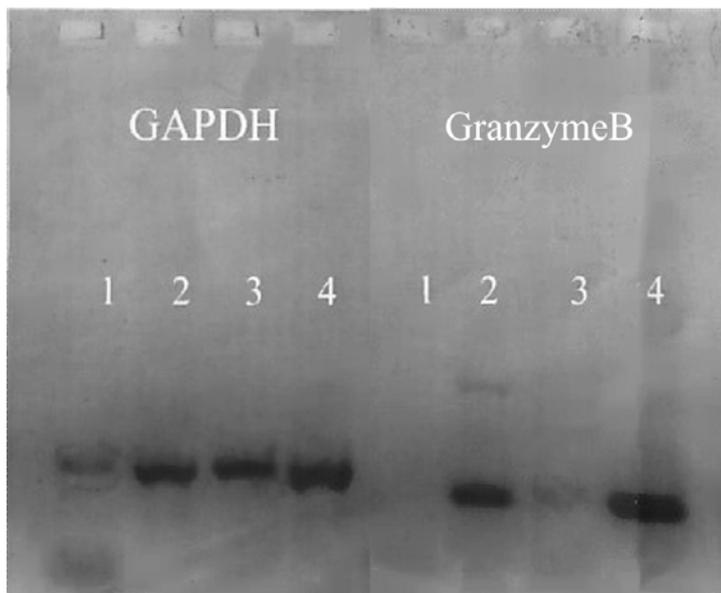
4.1. Nachweis von GranzymeB in synovialen PMN ex vivo

4.1.1 GrB RNA in synovialen PMN

Der Nachweis von GrB in PMN der frisch punktierten Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA wurde nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt. Zunächst sollte GrB auf genomischer Ebene in PMN nachgewiesen werden. Mittels RT-PCR wurde die Transkription der spezifischen GrB RNA in den synovialen PMN gezeigt (n=4). PMN der Synovialflüssigkeit von Patienten mit entzündlichen Arthritiden (RA, Oligoarthritis) transkribieren GrB spezifische mRNA (Abb.3) und sind folglich zur Biosynthese der Protease fähig. Es waren quantitative Unterschiede in der Menge transkribierter GrB RNA zwischen zwei Patienten mit aktiver RA zu sehen (Abb.3).

Von den beiden RA Patienten war ein Patient zum Zeitpunkt der Gelenkspunktion medikamentös unbehandelt und noch nicht erosiv mit einem DAS28 von 6,3.

Der zweite RA Patient mit quantitativ weniger GrB RNA war vor der Punktion trotz DMARD Therapie klinisch aktiv (DAS28 6,6) und im konventionellen Röntgen der Hand- und Fußgelenke waren erosive Veränderungen nachgewiesen



Patient 1: HLA B27+ Oligoarthritis, 2: undifferenzierte Oligoarthritis aktive RA, 4: aktive RA

Abb.3 Die Gelelektrophorese der PCR Produkte zeigt die Transkription der spezifischen GrB RNA von isolierten PMN im Vergleich zu GAPDH als „housekeeping gene“. Drei von vier Patienten mit entzündlichen Arthritiden (2,3,4) transkribieren GrB mRNA, wobei es quantitative Unterschiede gibt. Patient 3 transkribiert zum Zeitpunkt der PMN Isolierung deutlich geringere Mengen als Patient 4 (beides aktive RA). Bei Patient 3 fielen die Erstmanifestation und gleichzeitige Erstdiagnose der RA zeitlich mit der Gelenkspunktion zusammen. Dementsprechend war der Patient zum Zeitpunkt der Punktion unbehandelt. Bei Patient 4 war der Krankheitsverlauf bereits erosiv fortgeschritten und der Patient war bereits medikamentös auf eine Kombinationstherapie aus DMARD und Cortison eingestellt.

4.1.2 Nachweis synthetisierten GrB in synovialen PMN mittels Konfokaler Lasermikroskopie

Mittels Konfokaler Lasermikroskopie wurde GrB in CD15 isolierten (MACS®) synovialen PMN von Patienten mit aktiver RA (n=3/3) nachgewiesen (Abb.4a-c). Die PMN wurden außerdem mit dem granulozytenspezifischen CD66b Antikörper gefärbt (Abb.4a). Vergleichend zu dem oberflächlich bindenden CD66b Antikörper, akkumuliert GrB im Zytoplasma der PMN (Abb.4b Pfeil). Zudem zeigte sich neben der erwarteten intrazellulären GrB eine zellmembranassoziierte Fluoreszenzverstärkung (Abb.4b Pfeil).

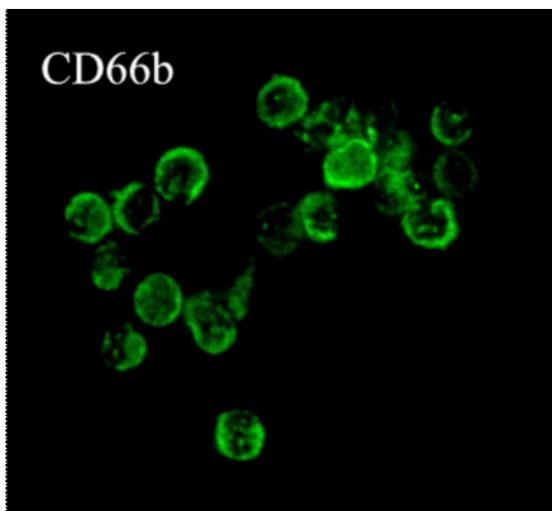


Abb.4a zeigt isolierte synoviale, anti-CD66b markierte PMN eines RA Patienten in der Konfokalen Lasermikroskopie. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mit Cy3-konjugiertem anti mouse-IgG Sekundärantikörper. Das Fluoreszenzmuster verdeutlicht die oberflächliche Bindung des Anti-CD66b Antikörpers auf der Zelloberfläche der synovialen PMN.

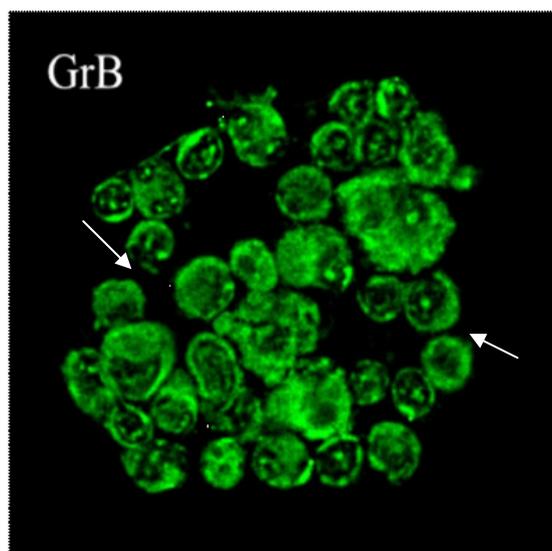


Abb.4b zeigt die isolierten synovialen PMN des RA-Patienten aus Abb.4a. Die Zellen wurden Anti-GrB und sekundär mit Cy3-konjugiertem antimouse IgG gefärbt. Es zeigt sich, neben der zytoplasmatischen Akkumulation, bei einigen PMN eine Zellmembran assoziierte Fluoreszenzverstärkung (siehe Pfeile).



Abb.4c zeigt die Fluoreszenzfärbung der PMN mit der IgG Isotypenkontrolle und Cy3-konjugiertem antimouse IgG als Sekundärantikörper.

4.1.3. FACScan® - GrB Expression in synovialen PMN

Zur Verifizierung und genaueren Quantifizierung zytoplasmatischen GrB's in synovialen PMN wurden die Zellen Fluoreszenz gefärbt und im FACS® gemessen.

Die quantitativ größte Zellpopulation in der Synovialis machen mit durchschnittlich 59 % Granulozyten aus. PMN von Patienten mit aktiver RA (n=19) und Patienten mit anderen Arthritiden (non-RA-Patienten) als Kontrollgruppe (n=10) wurden mit Anti-GrB Antikörper gefärbt. Der Nachweis des Proteins konnte mit drei verschiedenen GrB Antikörpern geführt werden.

Synoviale PMN von Patienten mit aktiver RA exprimieren intrazellulär GrB (Abb.5). Im Mittel waren in der intrazellulären Färbung 62,4% der PMN bei der RA Gruppe GrB+ (SD +/- 36,1%). In der Kontrollgruppe der non-RA Patienten lag die Anzahl GrB+ PMN im Mittel bei 90,4 % (SD +/- 2,79 %).

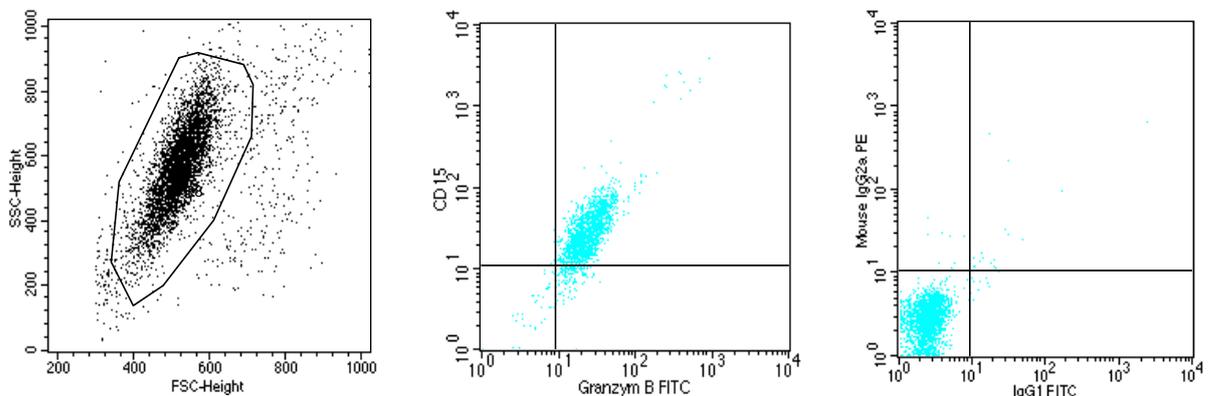


Abb.5 zeigt in dem Gate die synoviale PMN Population eines RA-Patienten. In dem Dot Plot in der Mitte ist die Doppelfärbung der PMN mit dem Anti-CD15 PE-markierten Oberflächenmarker und einem Anti-GrB FITC-markierten Antikörper nach intrazellulärer Färbung dargestellt. CD15+/GrB+ PMN machen die größte Population in der Synovialis von RA Patienten aus. Die rechte Abbildung zeigt die entsprechende Isotypen Negativkontrolle.

4.2 Extrazelluläre GrB Expression auf synovialen PMN

GrB wird von synovialen PMN, neben der intrazellulären Präsenz, ebenfalls in geringen Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert.(Abb. 6a). In der RA Gruppe (n=8) waren im Mittel 3,2% der PMN (SD +/- 3,02), bei der Kontrollgruppe 2,9% (SD +/- 1,1%) GrB positiv.

Die synovialen PMN wurden zusätzlich mit dem Oberflächenmarker Anti-CD66b gefärbt. Es zeigte sich, dass nicht die gesamte CD66+ PMN Population GrB auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

4.3 GrB in Überständen der Synovialflüssigkeit und im Serum

Nachdem die zelluläre Expression GrB's bei synovialen PMN in verschiedenen Methoden beschrieben werden konnte, sollte lösliches GrB in der Synovialflüssigkeit der Patienten nachgewiesen werden.

Lösliches GrB wurde im Elisa in den Überständen der Gelenkpunktate quantifiziert. Bei den RA Patienten (n=16) fanden sich mit durchschnittlich 355,19 pg/ml (SD +/- 275,5) signifikant größere Mengen lösliches GrB in den Überständen als bei der Kontrollgruppe (n=9) (143,09 pg/ml; SD +/- 190,2) (Abb. 6b). Als negativ gelten Werte < MW (Kontrollgruppe) + 2x StW. Vergleichend wurde zusätzlich der Gehalt an löslichem GrB in den Serumüberständen der RA-Patienten gemessen. Im Serum der Patienten konnte kein lösliches GrB gemessen werden (ELISA Grenzwert: 39pg/ml).

4.4. Vergleich RA Patienten / Kontrollgruppe

Vergleicht man beide Kohorten in ihrem zellulären- und synovial gelösten GrB Muster miteinander, finden sich signifikante Unterschiede in der intrazellulären GrB Expression und in den löslichen GrB Mengen in den Überständen der Punktate.

In der RA Gruppe war die Anzahl GrB+ PMN in der intrazellulären Färbung im Mittel signifikant geringer als bei den Patienten der Kontrollgruppe (62,4 +/- 36,1% vs. 90,4 +/- 2,8 % positive PMN; p=0,029) (Abb. 6a).

Unterschiede in der Proteinexpression auf der Zelloberfläche der synovialen PMN konnten zwischen beiden Gruppen nicht festgestellt werden (3,2 +/- 3,02% vs. 2,9 +/- 1,1%; p>0,05) (Abb.6a).

Lösliches GrB liegt bei der RA-Patientengruppe in signifikant größeren Mengen in der SF vor als bei den Patienten der Kontrollgruppe (394 +/- 275,2 pg/ml vs. 141 +/- 190,5 pg/ml; p=0,045).

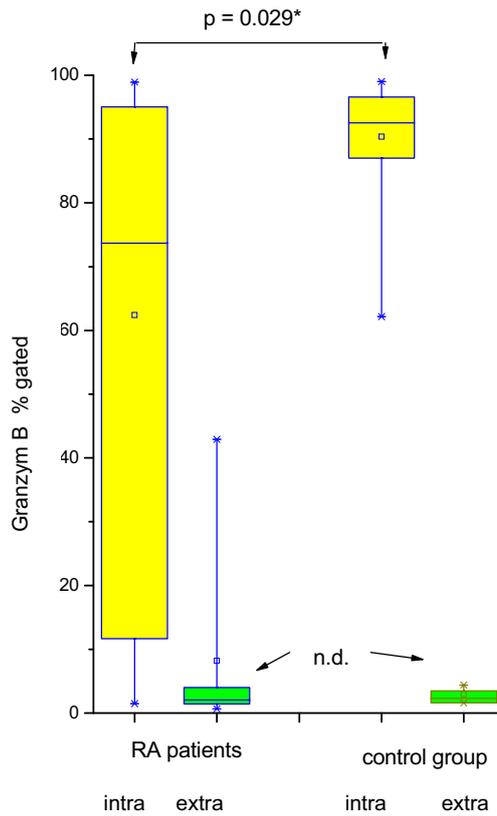


Abb.6a zeigt vergleichend die prozentuale Anzahl synovialer GrB+ PMN der RA-Patienten und der Kontrollgruppe im Whiskers Plot. Die Mittelwerte sind als Punkte dargestellt. Die horizontale Linie bildet den Median ab. Die Boxen repräsentieren 50% der Werte. Bei der intrazellulären (intra) Färbung mit dem FITC markierten Anti-GrB AK fanden sich signifikant ($p=0,029$) weniger GrB+ PMN in der RA-Patientengruppe als in der Kontrollgruppe ($62,4 \pm 36,1\%$ vs. $90,4 \pm 2,8\%$ positive PMN; $p = 0,029$). Der Anteil GrB+ Zellen nach Anti-GrB Oberflächenfärbung (extra), zeigte in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

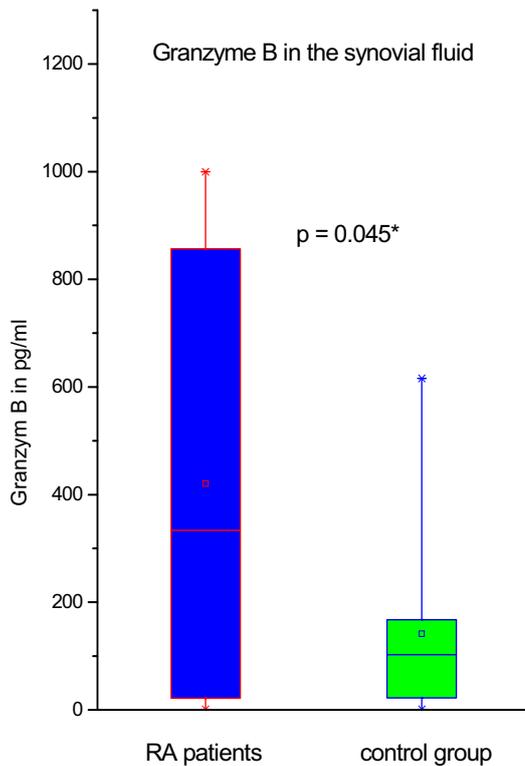


Abb.6b zeigt die Konzentration löslichen GrB's. In diesem Whiskers Plot ist auf der y-Achse die Menge GrB in pg/ml aufgetragen. Es wurden signifikant ($p=0,045$) höhere Mengen GrB in den Überständen der Gelenkpunktate der RA-Patienten als bei der Kontrollgruppe mit non-erosiven Arthritiden gefunden. In der RA Patientengruppe ($n=16$) fanden sich im Mittel mit $394 \pm 275,2$ pg/ml, gegen $141 \pm 190,5$ pg/ml lösliches GrB in der Kontrollgruppe ($n=9$).

4.5 GrB-Expression von Vollblut PMN

Im Vergleich zu der synovialen PMN Population sollte das GrB Muster von peripheren PMN aus dem Vollblut (VB) beschrieben werden. VB PMN der RA-Patienten, der Kontrollgruppe und gesunder Probanden wurden intra- und extrazellulär Fluoreszenz gefärbt und im FACS gemessen. Gelöstes GrB bestimmten wir im Serum ebenfalls mittels Elisa.

Im VB der RA Patientengruppe (n=12) waren 62,3 % (SD +/- 34,8 %) PMN in der intrazellulären Färbung GrB+ (Abb.7). Der Befund ist äquivalent zu den Ergebnissen der synovialen PMN Populationen (62,3% GrB+).

Bei der Kontrollgruppe (n=3) war die Anzahl GrB+ PMN mit 91,5% (SD +/- 4,6%) signifikant (p=0,01) höher als bei den RA-Patienten (Abb.7).

Bei den gesunden Probanden (n=3) waren im Mittel 96.21% VB PMN GrB+ (SD +/- 4,0%).

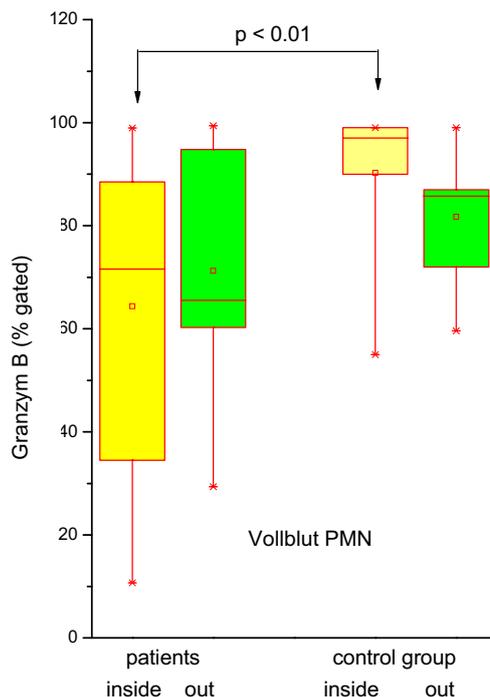


Abb.7 zeigt vergleichend die unterschiedliche GrB Expression von VB PMN in den beiden Kohorten, RA-Patienten gegen Kontrollgruppe, im Whiskers Plot. Dargestellt sind die Mittelwerte als Punkte und der jeweilige Median als horizontale Linie. Die Boxen repräsentieren 50% der Werte. In der RA Patientengruppe waren in der intrazellulären Färbung signifikant ($p < 0,01$) weniger PMN GrB+ als bei der Kontrollgruppe (Median 67,7% SD +/- 35,4% vs. 72,7% SD +/- 18,5%). Keine signifikanten Unterschiede waren dagegen in der oberflächlichen GrB Expression zwischen beiden Gruppen zu erkennen.

Im Gegensatz zu der synovialen Population (im Mittel 3,0% GrB+ synoviale PMN; siehe oben), exprimierten Vollblut PMN (n=10) signifikante ($p < 0,01$) Mengen GrB auf ihrer Zelloberfläche. In der RA-Patientengruppe (n=8) waren im Mittel 67,7% (SD +/- 35,4%) der PMN GrB+. Bei der Kontrollgruppe (n=2) lag die Anzahl GrB+ PMN bei 72,7% (SD +/- 18,5%).

VB PMN exprimieren GrB in analogen Mengen zu ihrem intrazellulären Gehalt auf der Zelloberfläche (Abb. 8a).

Anders als in den Überständen der Kniepunktate wurde mittels Elisa kein lösliches GrB im Serum gefunden (n=10).

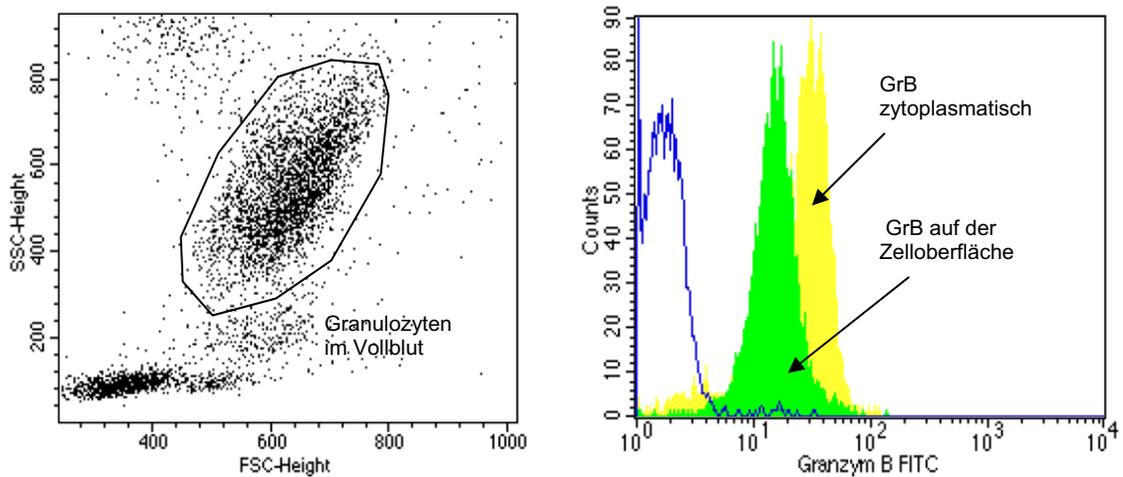


Abb.8a zeigt Vollblut PMN eines RA-Patienten. Dargestellt sind der intrazelluläre GrB Gehalt und die GrB Expression auf der Zelloberfläche. Das Histogramm zeigt in den beiden Peaks die Anzahl GrB+ PMN in einer intra- (gelber Peak) und einer extrazellulären (grüner Peak) Färbung. Der blaue Peak stellt die Negativkontrolle dar. Beide Peaks zeigen eine ähnliche Anzahl GrB+ PMN. In diesem Beispiel waren in der intrazellulären Färbung 64,9 % und extrazellulär 60,4 % der getageten PMN GrB+.

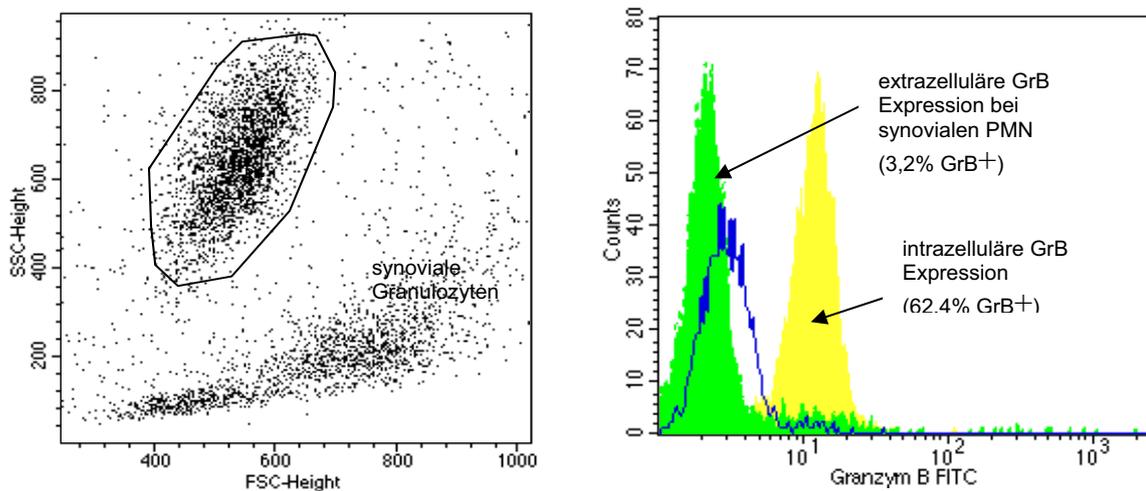


Abb.8b zeigt vergleichend zu den VB PMN in Abb.8a die GrB Expression synovialer PMN. Im Histogramm Plot zeigt der grüne Peak GrB+ PMN nach extrazellulärer Färbung und der gelbe Peak die gleichen Zellen nach intrazellulärer Anti-GrB Färbung. Der blaue Peak zeigt die Negativkontrolle. Es waren hier 62,4 % der getageten PMN GrB+. Auf den Zelloberflächen wurde GrB nur bei 3,2 % der Zellen nachgewiesen (Peil) .

4.6 Koinzidenz zwischen GrB und Klinischen Parametern der RA

Im folgenden Abschnitt wurde die GrB Expression der PMN mit unterschiedlichen klinischen Parametern bei den RA Patienten korreliert. Es sollte somit eine mögliche funktionelle Verknüpfung zwischen der GrB Expression der Granulozyten und dem Krankheitsverlauf bzw. der Progression der RA hergestellt werden.

GrB und Cyclisches Citrullin Peptid (CCP)

Der Nachweis von CCP ist für die frühe Diagnosestellung der RA und als Prognosemarker für einen erosiven Krankheitsverlaufs etabliert. Im IgG Anti-CCP3 Elisa wurde der CCP3 Gehalt (Cyclisches Citrullin Peptid der 3. Generation) in den Überständen der Gelenkpunkttate der RA-Patienten und der Kontrollgruppe gemessen. Bei den RA Patienten (n=12) lag der mittlere CCP3 Gehalt bei 801,91 U/l (SD +/- 691,75), verglichen mit 46,97 U/l (SD +/- 48,03) bei der Kontrollguppe (n=6). Bei 6 von 12 Patienten gingen hohe CCP Werte (siehe Definition im Material/Methodenteil 3.2) mit einem, im Vorfeld röntgenologisch nachgewiesen, erosiven Krankheitsverlauf einher.

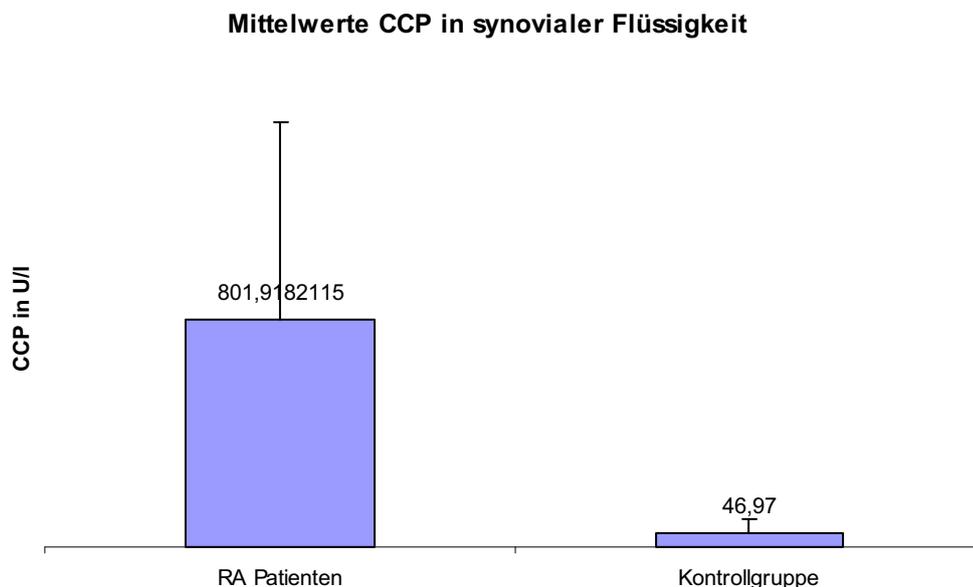


Abb. 9 zeigt vergleichend die mittleren CCP Mengen in der SF der RA-Patienten (n= 12) und der Kontrollgruppe (n=6) . Die Werte wurden mittels IgG Anti - CCP3 Elisa erhoben. Auf der y-Achse sind die CCP Mengen in U/l angegeben. Der CCP Gehalt war bei der RA-Patientengruppe (801,91 U/l SD +/- 691,75) signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (46,97 U/l SD +/- 48,03).

Der CCP Status im Serum korreliert bei allen RA Patienten (n=12) mit dem CCP Status in der SF. In der SF wurden Werte >143,03 U/l (MW: Kontrollgruppe + 2 x SD) als CCP positiv definiert. Im Serum gelten in der Laboratoriumsdiagnostik der Uniklinik Düsseldorf Werte von < 5 U/ml als CCP negativ. Es waren 8/12 Patienten sowohl im Serum als auch in der SF CCP positiv. 4 der 12 Patienten waren entsprechend in beiden Kompartimenten CCP negativ. Der Serum CCP Status ging in 10/12 Fällen mit einem positiven bzw. negativen erosiven Krankheitsverlauf im konventionellen Röntgenbild der Hände und Füße einher. 1/12 Patienten (Nr.11) war trotz positiver CCP Werte im Serum und der Synovia im konventionellen Röntgenbild nicht erosiv.

Patientin Nr.3 ist bezüglich ihres Gelenkstatus aufgrund degenerativer Veränderungen und langjähriger Arthrose nicht isoliert auf die RA auswertbar.

	Patient	CCP (U/ml) (Serum)	CCP (U/l) (Synovia)	erosiv	DAS28
	1	<5	14,6	neg	3,9
	2	<5	18,4	neg	4,5
CCP neg Serum & CCP neg Synovia	3	<5	32,3	pos	2,7
	4	<5	135,8	pos	4,2
	5	>200	709,5	pos	8,4
	6	442	852,6	pos	4,9
	7	24	1018,95	pos	5,9
	8	>200	1130,7	pos	5,6
	9	>200	1492,9	pos	7,0
	10	>200	1602,7	pos	5,2
	11	>200	1651,35	neg	5,2
	12	>200	1734,9	pos	6,0

Tab.5 In der Tabelle sind der CCP Status im Serum und der Synovia, die Erosivität und der DAS28 von 12 RA-Patienten dargestellt. 4/12 Patienten waren sowohl im Serum als auch in der Synovia CCP-negativ. 7/12 hatten in beiden Kompartimenten einen positiven Status. *neg: negativ; pos: positiv*

Koindizenz zwischen CCP- und GrB Status in der SF

Der CCP3 Gehalt (ELISA) in der Synovialflüssigkeit korreliert mit dem des löslichen GrB's (ELISA) bei Patienten mit RA, Psoriasis Arthritis oder Oligoarthritis (n=16, p=0,01174; Chi² = 6,34921) (Abb.10a).

RA Patienten mit geringeren GrB Mengen haben einen signifikant geringeren CCP Gehalt in der Synovialflüssigkeit.

	GrB positiv	GrB negativ	Summe
CCP positiv	7	2	9
CCP negativ	1	6	7
Summe	8	8	n=16

Abb.10a Die Vier-Felder-Tafel zeigt die Korrelation zwischen den beiden unabhängigen Parametern GrB (Elisa) und CCP (Elisa) in der SF. GrB: positive > 44,61 pg/ml (MW Kontrollgruppe + (2x SD)) ; CCP: positive > 143, 03 U/l (MW Kontrollgruppe + (2x SD)); p = 0,00174; Chi² = 6,34921

Korrelation löslicher GrB Mengen und Granulozytenanzahl

Es konnte keine Korrelation löslicher GrB Mengen im Elisa mit den prozentualen PMN Zahlen (FACScan®) in den Gelenkpunktaten nachgewiesen werden.

Korrelation im GrB Gehalt und dem DAS28

Es konnte keine Korrelation zwischen GrB Gehalt im entzündlichen Gelenk und dem DAS28 bei der RA- Patientengruppe nachgewiesen werden.

Korrelation zwischen DAS28 und Neutrophilenzahlen im Gelenkpunktat

Die Anzahl der PMN im Gelenkpunktat geht signifikant (p=0,028 Chi² = 4,79) mit der Höhe des DAS28 einher. Gemessen an dem mittleren prozentualen PMN Gehalt von 55 % in dieser Kohorte (Tab.6), lagen 7/13 Patienten mit ihrem DAS28 Wert ebenfalls über dem Median (DAS28: 5,25) innerhalb der Kohorte. Der Median innerhalb der Studienkohorte war als Grenzwert zu definieren, da es sich bei den punktierten Patienten um eine bereits vorselektionierte Population handelt, deren Krankheitsaktivität mit der Indikation zur Gelenkpunktion höher ist als in einer willkürlich gebildeten RA-Patientengruppe.

Gemäß den Definitionskriterien der Krankheitsaktivität durch den DAS28 hatten 3/13 Patienten eine mittlere Krankheitsaktivität (3,2- 5,1). Diese Patienten lagen mit ihrer PMN Anzahl im Gelenk über dem Kohortendurchschnitt (Tab.6). Patient Nr.1 hatte mit einem DAS28 von 2,7 als einziger Proband eine mäßige Krankheitsaktivität und dementsprechend auch die geringste Anzahl PMN in der Synovia.

Patienten	PMN in Synovia (%)	DAS28	CRP [mg/dl]
1	5,9	2,70	0,5
2	64,5	3,9	0,4
3	68,1	4,50	2,4
4	81,1	4,90	0,11
5	14,5	5,16	1,04
6	15,7	5,20	0,46
7	80,13	5,60	4,8
8	80,13	5,60	2
9	84,2	5,90	5,9
10	76,5	6,00	0,4
11	70,8	6,6	7,2
12	69,8	7,0	8,6
13	88,02	8,4	31,1
	MW 54,8	Median 5,2	MW 5,8
	SD 30,9	SD 1,3	SD 8,9

Tab.6 In der Tabelle sind der prozentuale Anteil PMN in der synovialen Flüssigkeit, der DAS28 und das CRP von 13 RA-Patienten der Kohorte

	DAS28 <5,2	DAS28 >5,2	Summe
PMN <55%	3	0	3
PMN >55%	3	7	10
Summe	6	7	n=13

Abb.10b Die Vier-FelderTafel zeigt den signifikanten ($p=0,028$, $\chi^2 = 4,79$) Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität gemessen als DAS28 und der prozentualen Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Synovialis der RA-Patienten. Bei Patienten mit einer hohen Krankheitsaktivität findet sich eine überdurchschnittlich (MW in der Kohorte: 55%) hohe Anzahl PMN im Gelenk. Eine geringe bis mittlere Krankheitsaktivität ($DAS28 < 5,2$) geht mit einer niedrigeren PMN Anzahl einher.

4.7 Kinetik von GrB in nativen PMN

Um die Kinetik von GrB in PMN zu untersuchen, wurden die VB PMN gesunder Probanden ($n=8$) *ex vivo* zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Anti-GrB Antikörper gefärbt und mittels FACSan® gemessen.

Nach einer Stunde ($n=8$) zeigte sich bei allen Probanden eine Abnahme der intrazellulären GrB Expression zwischen 6 - 42%.

Auf der Zelloberfläche war nach einer Stunde ein spontaner „Shift“ von GrB zur Zelloberfläche zwischen 1-15,6% zu sehen (Abb. 11a).

Die Färbungen nach 4 und 24h ($n=5$) bestätigten den zuvor beschriebenen Trend. Die Daten werden nicht dargestellt.

Der „Shift“ von GrB aus dem Cytoplasma konnte durch die Inkubation der Zellen mit zwei verschiedenen als Proteininhibitoren wirkenden Pilzmetaboliten Brefeldin A (BFA) und Cytochalasin B bestätigt werden (n=6) (Abb.11b). Cytochalasin B verhindert durch die Inhibition des zytoplasmatischen Transport über Mikrofilamente (siehe Methodenteil) die Exozytose von GrB. Brefeldin A verursacht den Zerfall des Golgi-Apparates und führt somit zu einer Akkumulation von GrB im Zytoplasma der PMN (Abb.11b) (Übersichtsarbeit: Hunziker et al., 1992).

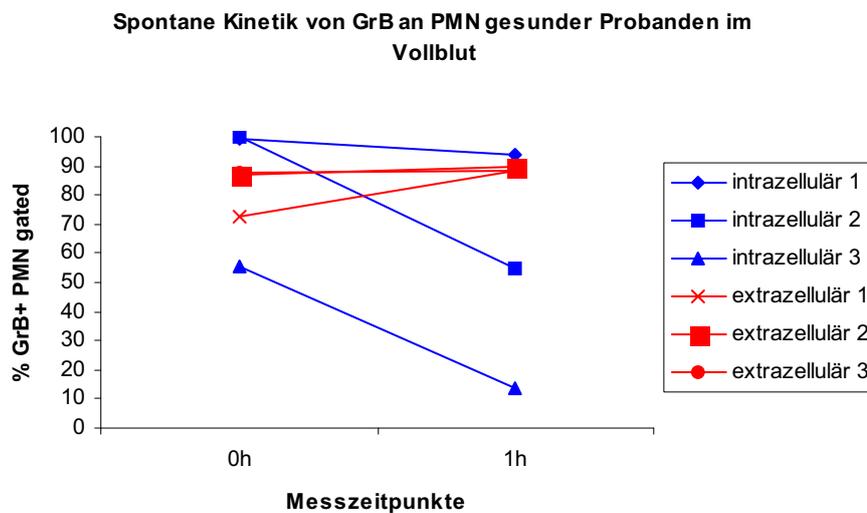


Abb.11a die Abbildung zeigt die Kinetik von GrB in unstimulierten VB PMN gesunder Probanden (n=3). Auf der y-Achse sind die, mittels FACScan® GrB+ gateden Zellen prozentual aufgetragen. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Messzeitpunkte dargestellt. T0 entspricht der sofortigen Färbung nach der Blutabnahme. Nach einer Stunde verlieren die Zellen spontan GrB. Dabei zeigte sich ein Verlust um 6-42%. Gleichzeitig ist ein Shift des Proteins auf die Zelloberfläche zu erkennen.

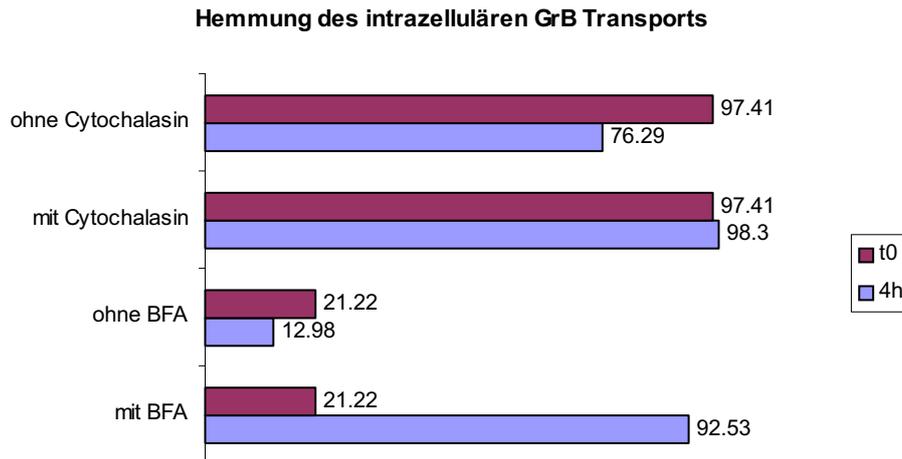


Abb.11b zeigt den Effekt der zwei Proteininhibitoren CytochalasinB und BrefeldinA (BFA) an Vollblut PMN *in vitro*. Durch den jeweiligen Inhibitor zeigt sich eine zytoplasmatische Akkumulation von GrB. Ohne Inhibitoren sieht man nach 4 Stunden wie oben beschrieben den spontanen Shifts von GrB aus der Zelle.

4.8 Zytokinstimulation an PMN

Nachdem die spontane Freisetzung von GrB aus den PMN sollte der Einfluss verschiedener Zytokine, die eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen (siehe Einleitung), auf die Freisetzung und Expression von GrB untersucht werden. Hierzu wurde Vollblut gesunder Probanden 4 und 24h mit $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-2, IL-15 und IL-17 stimuliert. Die Zellen wurden sowohl intra- als auch extrazellulär mit FITC markierten GrB-Antikörper gefärbt und die GrB+ PMN im FACS gemessen.

Nach 4stündiger Stimulation nahm der prozentuale Anteil intrazellulären GrB's in den PMN bei allen 5 Zytokinen ab. Die Stimulation mit IL-15 und $TNF\alpha$ zeigte die konstantesten Werte. Nach 4 stündiger Stimulation mit $TNF\alpha$ (n=10) war bei 8/10 Patienten eine Abnahme in der Anzahl der intrazellulären GrB+ PMN zu sehen.

Die Reduktion der GrB+ PMN lag nach 4 Stunden bei über der Hälfte der Probanden zwischen 1 und 10% (Tab.7a). Nach 24 Stunden Stimulation war bei über der Hälfte der Probanden eine Reduktion von >20% zu sehen.

Stimulation mit IL-15 führte bei 9/10 Probanden zu einer Reduktion der intrazellulären GrB Expression in den PMN im Mittel um 19% (Abb.12). Die Stimulation mit IL-15 zeigte nach 4 Stunden bei 6/10 der Probanden

eine >20%ige Reduktion des intrazellulären GrB Gehalts der PMN (Tab.7b). Im Vergleich zu der Stimulation mit TNF α erzeugt IL-15 offensichtlich eine schnellere Ausschüttung des Proteins aus dem Granulozyten.

Im Gegensatz zur intrazellulären Färbung zeigte sich auf der Zelloberfläche der PMN durch die Stimulation mit INF- γ , IL-2, IL-15 und IL-17 im Mittel nur eine minimale Veränderungen in der GrB Expression. Einzig die Stimulation mit TNF α reduzierte die Anzahl GrB+ PMN bei allen Probanden. Die Expression von GrB auf der Zelloberfläche war nach 4stündiger Stimulation mit TNF α (n=6) zwischen 15-50% reduziert.

GrB Expression in PMN (+TNFα)	keine Veränderung	1-10% Reduktion	10-20% Reduktion	20-50% Reduktion
4h (n=10)	2	5	1	2
24h (n=5)	0	1	1	3

Tab.7a Prozentuale Abnahme des zytoplasmatischen GrB's in PMN nach der Stimulation mit TNF α

GrB Expression in PMN (+IL-15)	keine Veränderung	1-10% Reduktion	10-20% Reduktion	20-50% Reduktion
4h (n=10)	1	1	2	6
24h (n=5)	1	0	3	1

Tab.7b Prozentuale Abnahme des zytoplasmatischen GrB's in PMN nach der Stimulation mit IL-15.

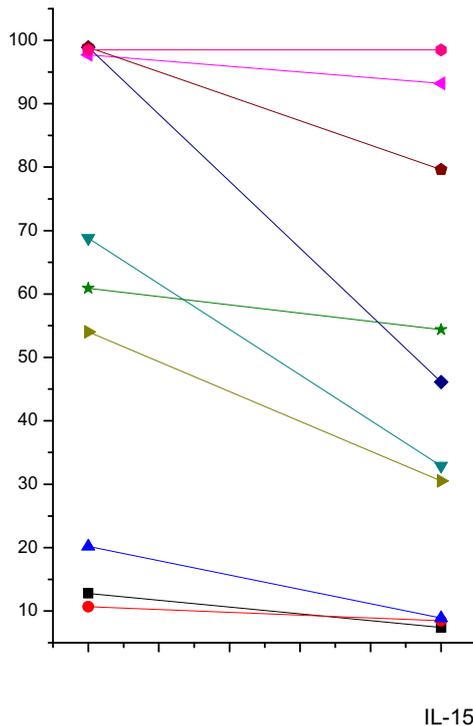


Abb.12 Das Diagramm zeigt die Abnahme des intrazellulären GrB Gehalts in Vollblut PMN nach 4 stündiger Stimulation mit IL-15. 9/10 Probanden zeigten eine Abnahme der GrB Mengen in den PMN. Im Mittel nahm die GrB Expression um 19% ab. Bei 6/10 der Probanden war eine >20%ige Reduktion GrB+ PMN zu sehen.

Ergänzend wurden die synovialen PMN aus den Gelenkpunktaten sowie die VB PMN der RA-Patienten mit PolymorphPrep® isoliert und mit $TNF\alpha$ (n=3) und IL-15 (n=3) über 24h stimuliert. Nach 24h Inkubation der synovialen PMN zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der GrB Expression der PMN.

Auf zellulärer Ebene war, wie oben beschrieben, kein Effekt mehr in der GrB Expression der vorstimulierten Granulozyten zu sehen. Folglich sollte die Protease in den Überständen der isolierten PMN messbar sein.

In den Überständen der isolierten, stimulierten synovialen Granulozyten wurde der Gehalt des löslichen GrB im Elisa bestimmt (n=3). Im Vergleich zu den Negativkontrollwerten der jeweils unstimulierten PMN fanden sich nach der Stimulation mit IL-15 12fach (Proband 1 Abb.13), 3fach (Proband 2 Abb.13) und 6fach (Proband 3 Abb.13) erhöhte Werte des löslichen GrB im Überstand (genaue Werte siehe Abb.12). Die Zunahme der GrB Mengen war nach Stimulation mit $TNF\alpha$ deutlich geringer als nach IL-15 Stimulation (Abb.12). IL-15 scheint folglich die zelluläre Exozytose der Protease GrB aus synovialen Granulozyten zu induzieren. Im Überstand findet sich nach zusätzlicher IL-15 Stimulation hingegen signifikant mehr GrB als *prä* Stimulation (siehe Abb.13)

Der $\text{TNF}\alpha$ Effekt lässt sich eindrücklich mit Remicade (Infliximab) als chimären $\text{TNF}\alpha$ Rezeptor Antagonisten inhibieren (Abb.14).

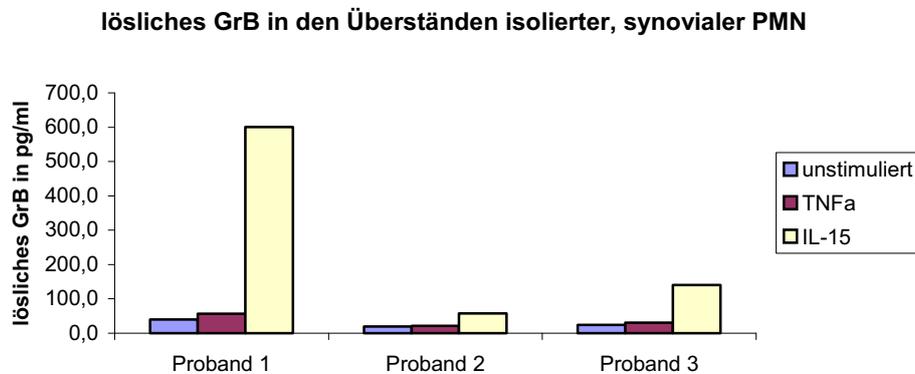


Abb.13 Das Balkendiagramm zeigt die Konzentrationen löslichen GrB's im Überstand stimulierter PMN. Die isolierten PMN wurden jeweils 4h mit IL-15 bzw. $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Im Vergleich zu den GrB Konzentrationen im Überstand der unstimulierten Zellen zeigte sich bei allen Probanden eine Zunahme der GrB Konzentration nach der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und IL-15 (Proband 1: unstimuliert (unst.) 40,3 pg/ml $\text{TNF}\alpha$ 56,4pg/ml, IL-15 600,4pg/ml; Proband 2: unst.: 19,2 pg/ml; $\text{TNF}\alpha$ 21,3 pg/ml; IL-15 58,1 pg/ml; Proband 3: unst.: 24,5: pg/ml, $\text{TNF}\alpha$: 30,4 pg/ml, IL-15: 140,7 pg/ml). Der prominenteste Effekt zeigte sich nach der IL-15 Stimulation.

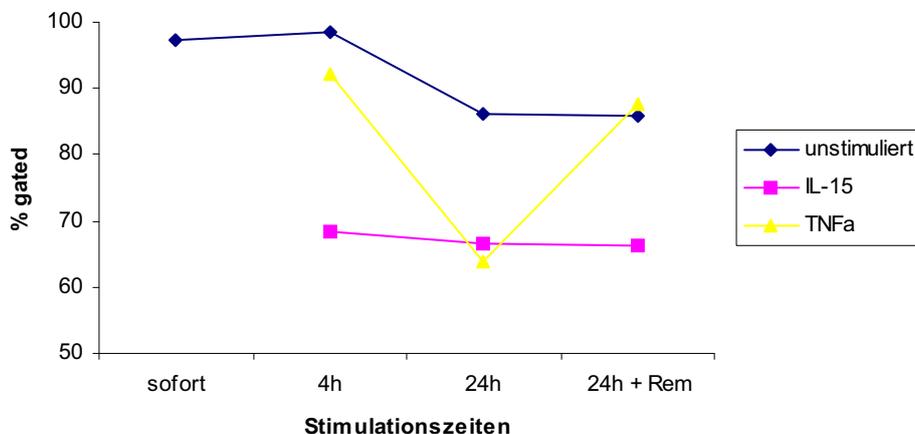


Abb.14 zeigt exemplarisch die Veränderungen der intrazellulären GrB Expression nach der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und IL-15 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte mit 4 und 24 h aufgetragen. Zu den stimulierten Ansätzen wurde zusätzlich Remicade gegeben und nach 24 Stunden der Effekt auf die GrB Expression gemessen (24h+Rem). Auf der y-Achse sind die prozentual im FACScan® gegateten PMN aufgetragen. Nach 4 Stunden zeigt sich eine spontane Abnahme der GrB+ PMN im unstimulierten Zustand. Die Abnahme der GrB Expression wird durch $\text{TNF}\alpha$ und deutlich stärker durch IL-15 verstärkt. Nach 24h ist durch IL-15 keine weitere Abnahme in der Anzahl GrB+ PMN zu erkennen. $\text{TNF}\alpha$ scheint nach 24h deutlicher zu wirken. Die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf die GrB Expression in PMN lässt sich durch den monoklonalen Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$, Remicade, inhibieren.

5 Diskussion

Trotz des besseren Verständnisses um die Pathogenese der RA bleibt eine der Hauptfragen, welche Mechanismen, Zellen und Enzyme in Kooperation zu der Knorpel- und Knochendestruktion führen. Neben den klassischen zytotoxischen Eigenschaften von GrB könnte die Serinprotease eine Rolle bei der Pathogenese der RA spielen. GrB kann über die Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen (s.u.) oder die Veränderungen von Zell-Zell-Interaktion die immunologische Homöostase verändern und über die Fähigkeit zur Spaltung von EZM zur Osteodestruktion beitragen.

Die Frage über die Synergetik zwischen GrB und immunkompetenten Zellen im Rahmen der autoimmunen Genese bei der RA bleiben jedoch im Detail bisher unverstanden. Eine der Hauptquellen von GrB bei der RA könnten PMN sein: PMN gelten zwar traditionell als Zellen der akuten Entzündungsreaktion, die Gruppe von Mohr et al. stellte aber bereits Ende der 70er Jahre die Hypothese auf, dass Granulozyten auch im erosiven Krankheitsverlauf bei der RA eine entscheidende Rolle spielen könnten (Mohr et Wessinghagen, 1978). In einer Arbeit von Wagner et al. wurde 2004 erstmals gezeigt, dass PMN GrB synthetisieren und konstitutiv exprimieren (Wagner et al. 2004). In derselben Arbeit wurde die funktionelle Aktivität von GrB aus PMN an einem Modell zur ADCC („antibody dependant cytoplasmatic cytotoxicity“) gezeigt. Da das Protein bisher vornehmlich in NK-Zellen und CTL beschrieben war, herrschte eine Kontroverse über die Expression von GrB in PMN (Martin et al., 2005; Metkar et Froelich, 2004). Neuere *in vitro* Arbeiten (Wagner et. al 2008) bewiesen jedoch die Präsenz von GrB in Zellen in der myeloischen Zelllinie oder in Monocyten-ähnlichen Dendritischen Zellen (Korthals et al. , 2007;; Wagner et. al., 2008). Bisher wurden keine *in vivo* Arbeiten über die Synthese/ Expression oder Funktion von GrB in Granulozyten publiziert.

Die Verknüpfung zwischen dem Potential von GrB, EZM zu zerstören, und der Tatsache, dass PMN in der Synovialflüssigkeit von RA- Patienten die größte Zellpopulation ausmachten, führten zu den Hauptfragestellungen dieser Arbeit:

1. Wird GrB auch von PMN *in vivo* bei Patienten mit RA exprimiert?
2. Welche funktionelle Rolle spielt GrB aus PMN bei der RA?
3. Wie wird GrB bei der RA in Granulozyten reguliert?

Im Rahmen dieser Arbeit gelang zum ersten Mal der Nachweis von GrB in PMN *ex vivo* bei Patienten mit entzündlichen Arthritiden. Sowohl die synovialen- (SF) als auch die Vollblut- (VB) PMN der RA-Patienten synthetisieren GrB.

Mittels RT-PCR gelang ebenfalls der Nachweis einer spezifischen GrB RNA in hoch aufgereinigten PMN aus der SF von Patienten mit aktiven Arthritiden. Unsere Ergebnisse der PCR zeigen quantitative Unterschiede an GrB-RNA bei Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsstadien. Dies könnte ein Indiz sein, dass die GrB-RNA in PMN nicht stetig, sondern in Abhängigkeit eines oder mehrerer Triggerfaktoren transkribiert wird. Welche Mechanismen als Promotorinduktoren in den PMN wirken, ist aktuell nicht sicher bekannt. Aus Arbeiten an CTL weiß man, dass das Transkriptionslevel der GrB mRNA (murines GrB) von dem Aktivierungsgrad der Zellen abhängt: 3 - 4 Tage nach Antigenstimulation waren mRNA Peaks in den CTL nachweisbar (Bleackley et al., 1997). Die Arbeit von Sedelies et al. zeigen eine Induktion von GrB bei CD4+ und CD8+ T-Zellen mit hohen intrazellulären Levels an, wenn sie mit IL-2 und/ oder Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert wurden (Sedelies et al., 2004). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigte sich der aktivitätsabhängige Effekt auf den GrB-RNA-Gehalt auch bei PMN: mit IFN γ stimulierte PMN transkribieren nach Aktivierung mehr GrB (Wagner et al. Blood 2004).

Neben dem Nachweis von GrB-RNA wurde das Protein mit konfokaler Lasermikroskopie intrazellulär in den Granula der synovialen PMN nachgewiesen. Zur Identifizierung wurden PMN mit dem für PMN spezifischen Antikörper CD66b gegengefärbt. Die konfokale Lasermikroskopie zeigte eine zytoplasmatische Akkumulation von GrB in CD15 isolierten synovialen PMN von Patienten mit aktiver RA. Dieses Ergebnis passt zu dem Befund, dass GrB als präformiertes Protein *in vitro* in PMN in sekundären und primären Granula gespeichert wird (Wagner et. al. 2008).

Mittels FACScan®-Analysen mit drei verschiedenen Anti-GrB-Antikörpern konnte in den synovialen Granulozyten GrB detektiert werden. Bei Patienten mit aktiver RA lag die durchschnittliche GrB Expression bei 62,4%. Bei der Kontrollgruppe der Patienten mit non-RA Arthritiden exprimierten im Mittel 90,4 % der PMN GrB im Zytoplasma ($p=0,029$).

Ähnliche Befunde wie bei den synovialen PMN fanden sich bei der Untersuchung von Vollblut PMN. In der Gruppe der RA-Patienten exprimierten im Durchschnitt 62,3 % der PMN GrB. Bei der Kontrollgruppe war die Anzahl GrB+ VB PMN mit 91,5% signifikant ($p=0,01$) höher als bei den RA-Patienten. Bei gesunden Probanden waren 96,2% der Vollblut PMN GrB+.

In der Zusammenschau lassen sich die Befunde dahingehend interpretieren, dass es bei Patienten mit einer aktiven RA zu einer vermehrten Ausschüttung der Protease aus den synovialen und Vollblut PMN kommt. Alternativ könnte die Synthese von GrB in den Granulozyten von RA Patienten geringer sein als bei Patienten der Kontrollgruppe/ gesunde Probanden. Die Ergebnisse der RT-PCR hatten gezeigt, dass die PMN nicht weniger GrB RNA synthetisieren. Es scheint folglich bei der RA einen Shift der Protease aus den Granula der PMN stattzufinden. Dieser Shift des granulär gespeicherten GrB's, entsprechend der „targeting by time“ Hypothese (Wagner et. al. 2008), konnte an nativen Vollblut PMN gezeigt werden und war mit den beiden Proteininhibitoren Cytochalasin B und Brefeldin A inhibierbar. Beide Inhibitoren verhindern auf unterschiedliche Weisen den cytoplasmatischen Proteintransport (siehe Methodenteil).

Bisher wurde eine Expression der Protease GrB auf der Zelloberfläche immunkompetenter Zellen noch nicht beschrieben. Die Färbung der PMN in der konfokalen Lasermikroskopie zeigte bei einigen PMN eine zellmembranassoziierte Fluoreszenzverstärkung. Zur Klärung der Frage ob es sich hierbei um ein Phänomen der Ausschleusung der Protease aus den intrazellulären Granula handelt oder GrB auf der Zelloberfläche adhärend ist, wurden PMN mittels FACScan® auf eine extrazelluläre GrB Expression untersucht. SF-PMN exprimieren keine signifikanten Mengen

GrB auf der Oberfläche. Färbungen an den Vollblut PMN der jeweiligen Patienten zeigte eine Expression von GrB auf PMN bei 66% der RA-Patienten und 73% Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse sind im Kontext der Ergebnissen des Elisa für lösliches Granzym in der SF und im Serum (s.u.) zu sehen. Im Vollblut wird GrB konstitutiv im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten exprimiert, jedoch ist kein lösliches GrB im Serum nachweisbar. Synoviale PMN der RA-Patienten zeigen keine GrB Expression auf der Oberfläche, hingegen finden sich deutliche Mengen löslichen GrB's in den Überständen der SF. Lösliches GrB in den Überständen der SF ist ein spezifischer Befund allein bei der RA-Patientengruppe.

Die Befunde deuten darauf hin, das im entzündeten Gelenk GrB aus den PMN in die SF ausgeschleust wird, während es an den PMN im Vollblut auf der Oberfläche adhärent ist. Die geringe gemessene Menge oberflächenadhärentes GrB bei den SF-PMN dokumentiert möglicherweise den Moment der Ausschleusung in die SF.

Welche Mechanismen an diesem Prozeß beteiligt sind, ist nicht gut untersucht und bekannt. Speziell bei den RA-Patienten stellt sich die Frage inwiefern das inflammatorische Milieu im Gelenk die Exozytose von GrB aus den PMN und die freisetzung in die SF triggert (siehe unten).

Die Präsenz von löslichem GrB bei Autoimmunerkrankungen, speziell auch bei der RA, wurde bereits von den Arbeitsgruppen Tak (1999) und Spaeny-Dekking (1998) et al. gezeigt. Tak et al. fanden ca. 10-fach erhöhte Mengen löslichen GrB's in der SF von RA Patienten im Vergleich zur SF von Patienten mit Osteoarthritiden oder reaktiven Arthritiden (Tak et. al 1999). Diese Ergebnisse korrespondieren mit den GrB Mengen in der SF des hier gemessenen Patientenkollektivs. Bei den RA-Patienten wurden signifikant höhere Konzentrationen löslichen GrB's in der SF gemessen als bei der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu der SF konnte im Plasma der RA-Patienten kein lösliches GrB nachgewiesen werden. Diese Resultate korrespondieren mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Bade et al. 2005, Spaeny-Dekking et.

al.,1998). Tak et al. fanden dagegen im Serum von RA-Patienten bis zu 15pg/ml GrB (Tak et. al 1999). Die Daten wurden in Abhängigkeit der Krankheitsstadien der Patienten interpretiert. Ein Vergleich mit dem Kollektiv dieser Arbeit ist auf Grund unterschiedlicher Testverfahren (verwendete Elisa Nachweisgrenze > 15pg/ml) nicht möglich.

In Zusammenschau deuten die bis hier diskutierten Daten auf einen vermehrten Shift des intrazellulären GrB aus SF-PMN in das entzündliche Milieu der Synovialis hin.

Durch andere Arbeitsgruppen wurden die erhöhten GrB Konzentrationen in der SF dagegen durch eine Akkumulation von CD8+ CTL im inflammatorischen Gelenk erklärt (Griffiths et. al., 1992, Young et al., 1992, Kummer et al., 1994, Kraan et al., 2004).

An unserem Patientenkollektiv wurden keine Daten zu T- oder NK-Zellen in der SF erhoben. Die FACS Analysen zeigten aber eine niedrige Gesamtlymphozytenzahl (bei 10/18 < 10% der Gesamtzellpopulation in der SF). Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist außerdem bekannt, dass die Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten in der SF von RA-Patienten gegenüber dem Vollblut oder Patienten mit bakteriellen Arthritiden vermindert ist (Iking-Konert et. al., 2005, Wagner et. al., 2000).

Die Messwerte der GrB Konzentration in der SF der jeweiligen Patienten war unabhängig von der Lymphozytenzahl in der SF. Es ist somit diskussionswürdig, ob die deutlich erhöhte Konzentration von GrB mit der lokal verminderten Anzahl der T-Zellen in Einklang steht. In einer Arbeit von Kummer (Kummer et al., 1994) wurden Zellen der SF von Patienten mit RA mit GrB-Antikörpern und klassischen T- und NK-Zell Markern (CD16, CD56, CD3, CD8) gefärbt. 75% der Zellen waren GrB+. Die Hälfte dieser GrB+ Zellen konnte allerdings phänotypisch nicht als Lymphozyten identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit, dass auch ortsständige PMN GrB produzieren und in die SF abgeben, nicht berücksichtigt. Dies scheint im Kontext der hier erhobenen Daten als Erklärung schlüssig.

Die bisher gezeigten Daten können einen sicheren Beweis, dass die erhöhten Konzentrationen löslichen GrB's tatsächlich von den synovialen

PMN freigesetzt werden, noch nicht liefern. Argumente für diese Hypothese sind aber:

Die Granulozyten machen die größte Zellpopulation in der SF des entzündeten Gelenkes aus. Diese PMN synthetisieren GrB. Im Vergleich zu den VB Granulozyten, lösen SF PMN GrB von ihrer Zelloberfläche und sezernieren GrB aus der Zelle nach außen. Es gelang aber keine signifikante Korrelation zwischen den SF-PMN Zahl und den synovialen GrB Konzentrationen. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die aktivierten PMN bei den Patienten am Pannus adhären waren, da PMN bei der aktiven RA an der Pannus-Knorpel Grenze akkumulieren (Lees et al., 1994).

Des Weiteren wurden in Stimulationsversuchen an isolierten SF-PMN und VB-PMN erhöhte Mengen GrB im Überstand nachgewiesen, im Sinne einer Freisetzung durch pro-inflammatorische Stimuli (Details siehe unten).

Die Pathomechanismen der destruierenden Prozesse im Gelenk sind vielschichtig. Das aktivierte Synovium zerstört Knorpelgewebe am Knorpel-Pannus Übergang. Hier führt sowohl die direkte Invasion synovialer Zellen als auch eine Freisetzung von Proteasen zur Degradation der Glycosaminoglykane, Proteoglykanen und des Kollagens. Die destruierenden Prozesse beginnen mit der Zerstörung von Proteoglykanen als Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Dies geschieht insbesondere während des frühen Entzündungsprozesses. Collagenabbauprodukte werden erst nach längerer Krankheitsdauer nachgewiesen (Marone et al. 1998).

Eine mögliche pathogenetische Rolle und ein degeneratives Potential bei der RA von Granzym aus NK-Zellen und CTL wurden bereits von mehreren Gruppen postuliert (Müller-Ladner et al., 1995; Tak et al., 1999; Goldbach-Mansky et al., 2004). Ältere Arbeiten von Tak et al. zeigten besonders bei der Früh-RA erhöhte GrB Level sowie eine Korrelation mit der Akut-Phase-Reaktion (Tak et al., 1994). Es wurde außerdem gezeigt, dass GrB Level in Korrelation mit der Erkrankungsdauer und der klinischen Erkrankungsaktivität stehen. Die von Tak et al. beschriebene Korrelation von Krankheitsaktivität (gemessen am DAS28) und GrB Levels (in der synovialen Flüssigkeit) konnten wir nicht bestätigen. Es zeigte sich jedoch, dass eine höhere Krankheitsaktivität

(DAS28) bei den Patienten mit einer höheren Anzahl PMN im Gelenkpunktat einhergeht.

Kim et al. beschrieben GrB in den sogenannten Linig Cells (Kim et al, 2007). Dies sind Typ A und Typ B Synoviozyten (siehe Einleitung), welche die Gelenkhöhle auskleiden und bei der RA pathologisch proliferieren und letztendlich zur Hyperplasie des Pannusgewebes führen und damit zur Osteodestruktion beitragen. In der Arbeit von Kim et al. wurden die GrB produzierenden Zellen hauptsächlich als Makrophagen (CD14+) beschrieben, welche den Typ A Synoviozyten entsprechen und typisch für eine längere Krankheitsdauer bei der RA sind. Nach den Ergebnissen aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe stellt sich die Frage, ob die beschriebenen GrB+ Zellen partiell nicht Makrophagen, sondern veränderte PMN sein könnten. Diese Überlegung beruht auf folgenden Tatsachen: PMN haben das Potential unter bestimmten Voraussetzungen *in vitro*, z.B. durch $\text{INF}\gamma$ -Stimulation, oder bei chronischen Entzündungen *in vivo*, morphologische und funktionelle Eigenschaften professionell Antigen präsentierender Zellen zu erwerben. PMN in der SF, nicht aber im Vollblut, von Patienten mit aktiver RA exprimieren Monozyten- und/oder Makrophagen-typische Oberflächenantigene, insbesondere CD14, CD80, CD86 und MHC Klasse II. Die so veränderten PMN könnten daher mit lokalen T-Lymphozyten interagieren (siehe unten). Wie auch die makrophagenähnlichen CD14+/GrB+ Synoviozyten werden PMN im Verlauf durch eine so genannte „escape from apoptosis“ im Gelenk persistent. Die PMN, die sich im Laufe der Erkrankung phänotypisch u.a. durch Erwerb von CD14 morphologisch verändern, erwerben dann möglicherweise die Fähigkeit, in den pathologischen Prozess einzugreifen und z.B. über die Sezernierung von GrB zur Osteodestruktion beizutragen.

In vitro wurde die Beteiligung von GrB bei entzündlichen Gewebsdestruktionen wie bei der RA bereits beschrieben (Buzza & Bird, 2006; Romeo et Andrate, 2008). Eines der bis dato bekannten extrazellulären Substrate von GrB bei der RA ist das Proteoglykan Aggrecan, ein Bestandteil der Knorpelmatrix. Aggrecane formen Aggregate, die Hyaluronsäure binden und zusammen mit Kollagen für die mechanischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich

sind (Lohmander et. al 1993). GrB spaltet desweiteren effektiv drei Proteine der Extrazellulärmatix (EZM): Vitronectin, Fibronectin und Laminin (Ronday et al., 2001; Buzza et. al 2005). Diese Proteine sorgen für die Interaktion zwischen Chondrozyten und der Matrix.

Im Falle von Vitronectin schneidet GrB hinter der AS Sequenz Arg-Lys-Asp, welche ein Teil der Integrin Bindungsstelle in Matrix Proteinen ist. Fragmente von Fibronectin und Aggrecan werden bei der RA in die SF abgegeben (Lohmander et al., 1993; Barilla and Carsons, 2000). Spezielle Fibronectin Fragmente induzieren die Neutrophilen Chemotaxis und die Aggrecanase Expression - spezielle Metalloproteinasen, die Aggrecan spalten - in Chondrozyten. Sie zerstören die Chondrozyten Zell-Adhäsion (Stanton et al., 2002; Buzza & Bird, 2006).

Resultatsrelativierend ist festzuhalten: Bei allen bisherigen in vitro Experimenten über die funktionellen Eigenschaften von GrB ist ausschließlich nicht-humanes, z.B. murines, GrB eingesetzt worden. Die Ergebnisse unterliegen somit der eingeschränkten Interspezies Übertragbarkeit. Zur Erweiterung des Gesagten sind zukünftig weiter gehende Studien mit spezifischem humanen GrB oder funktionell aktivierten GrB+ PMN notwendig.

Bei der RA gilt vor allem der Nachweis von Autoantikörpern i.S. der Rheumafaktoren und der CCP-Antikörper als eigenständiger Prädiktor für das Auftreten von Erosionen (Symmons 2002; van der Helm et. al 2006). An einer Studienkohorte von 257 RA-Patienten wurde gezeigt, dass GrB Levels bei RF+ Patienten höher waren als bei RF- Patienten GrB wurde als ein potentieller zusätzlicher Marker für frühe Erosionen postuliert (Goldbach-Mansky R et al., 2005).

Auch in unseren Kohorten korrelierten die löslichen GrB Level in der SF mit dem CCP-Gehalt sowohl im Serum als auch in der SF. Die Bedeutung von CCP in der SF ist bisher nicht gut definiert. CCP-Antikörper sind prädiktiv für einen erosiven Verlauf. Die in unseren Daten gezeigte signifikante Korrelation zwischen CCP und GrB unterstützt zusätzlich die potentielle Funktion als Prädiktor für einen erosiven Krankheitsverlauf.

Neben den hypothetischen Überlegungen zu den funktionellen Eigenschaften der Protease GrB im Rahmen der RA, wurde die Regulation von GrB in PMN unterschiedlicher Aktivitätszustände untersucht. Speziell bei den RA-Patienten stellt sich die Frage, welche Regulationsmechanismen im inflammatorischen Milieu des Gelenkes die Freisetzung von GrB aus den PMN in die SF steuert. Hierzu wurden zunächst Vollblut PMN gesunder Probanden mit verschiedenen bei der Pathogenese der RA etablierten pro-inflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, IL-2, IL-15 und IL-17 stimuliert.

Voruntersuchungen zur „spontanen“ Freisetzung ohne Stimulation von GrB in PMN *ex vivo* zeigen entsprechend der "targeting by time" Hypothese den Shift aus den intrazellulären Granula an die Zelloberfläche und in den Überstand (Wager et al., 2008). Nicht aktivierte bzw. unstimulierte PMN zeigen eine verminderte intrazelluläre GrB Expression in den PMN im FACS - im Vergleich zu den SF-PMN der untersuchten Patienten. Die Stimulation der Zellen führt mit den getesteten proinflammatorischen Zytokinen zu einer vermehrten Ausschüttung von GrB aus den intrazellulären Granula. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass entweder die *de novo* Synthese oder die Exocytose von GrB durch die proinflammatorischen Zytokine induziert wird. Die Stimulation mit IL-15 und $\text{TNF}\alpha$ zeigte hierbei die konstantesten Werte. Da IL-15 und $\text{TNF}\alpha$ bei der RA eine proinflammatorische Schlüsselrolle spielen (Kirkham et. al 2006, Brennan et. al. 2008), ist eine Aktivierung der PMN durch diese Zytokine mit einer konsekutiven Ausschüttung von GrB pathogenetisch bedeutsam. $\text{TNF}\alpha$ ist für PMN als einer der am stärksten wirksamen Induktoren für ein verlängertes Überleben („escape from Apoptosis“) und einer der stärksten Aktivatoren bei der Differenzierung von PMN gut charakterisiert (Iking-Konert et. al. 2001, Iking-Konert et. al 2005). Nach der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ zeigte sich eine zwischen 15 und 50% erhöhte Expression von GrB auf der Zelloberfläche der PMN. Dieser Effekt ließ sich durch die Ko-Inkubation mit Remicade® (Infliximab) als chimären $\text{TNF}\alpha$ -Blocker inhibieren. $\text{TNF}\alpha$ wird unter anderem von synovialen Makrophagen und Lymphozyten produziert. Bei der RA ist $\text{TNF}\alpha$ wesentlich am initialen Entzündungsprozess beteiligt. $\text{TNF}\alpha$ induziert u.a. die GM-CSF-Produktion Antigen-präsentierender Zellen. $\text{TNF}\alpha$ steuert desweiteren

proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6 und stimuliert so die Proliferation und die Differenzierung von T-Lymphozyten (Brennan et al. 1992). Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass $\text{TNF}\alpha$ und GrB in der Generierung autologer B-Zellen, welche als Plasmazellen vermehrt IgM-Rheumafaktoren produzieren, bei der RA eine synergistische Rolle spielen (Pinkoski et al., 1998; Tak et al. 1994). Die oben besprochenen Koinzidenz von RF und GrB bei Patienten mit RA sowie unsere eigenen Daten zur Korrelation von CCP-Antikörpern in der SF und dem GrB Gehalt lassen sich in dieselbe Richtung interpretieren.

Die Blockade von $\text{TNF}\alpha$ durch neutralisierende Antikörper oder Rezeptorfusionsproteine hat in den letzten Jahren maßgeblich zu einem therapeutischen Fortschritt bei der RA beigetragen. Ein weiteres mögliches Zielzytokin bei der Pathogenese der RA ist unter anderem IL-15. IL-15 wird als proinflammatorisches Zytokin von Makrophagen, synovialen Fibroblasten aber auch regulatorischen T-Zellen sezerniert (Kotake et al., 1997). Im entzündlichen Gelenk wirkt IL-15 über eine „Feedback-Schleife“ indem es die Produktion von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 in T-Zellen induziert (McInnes et al. 1997, Parsonage et al. 2008). Die T-Zellen induzieren wiederum die Produktion von IL-15 (auch IL-8 und IL-6) in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten. Da IL-15 zu einer lokal erhöhten Produktion von u.a. $\text{TNF}\alpha$ führt (Sibilia et al. 2005), war zu erwarten, dass die Stimulation mit IL-15 einen ähnlichen Effekt auf die GrB Expression hat. Stimuliert man Vollblut PMN gesunder Probanden mit IL-15, zeigt sich eine GrB Expression entsprechend des synovialen „RA-PMN-Typus“: Der intrazelluläre GrB Gehalt nimmt ab und auf der Zelloberfläche ist weniger GrB exprimiert. Im Überstand der stimulierten Zellen fanden sich dagegen höhere Konzentrationen löslichen GrB's.

In den Serumproben von RA-Patienten, der Kontrollgruppe und gesunden Probanden war initial kein lösliches GrB messbar. Die Freisetzung des löslichen GrB's aus der Zelle – aus Untersuchungen an CTL – erfolgt nach heutigem Kenntnisstand über unterschiedliche Mechanismen, welche im Detail allerdings noch nicht verstanden sind. IL-12 und $\text{TNF}\alpha$ wurden an CTL als Induktoren der zellulären Degranulation beschrieben (Lauw et al. 2000). Unsere Experimente identifizierten $\text{TNF}\alpha$ und IL-15 (IL-12 wurde von uns nicht untersucht) als potenzielle Induktoren für die Freisetzung von GrB aus

Granulozyten. IL-15 wurde besonders bei der frühen RA als proinflammatorisches Zytokin identifiziert und korreliert mit der Akute-Phase-Antwort (Kotake et al., 1997). Auch die GrB Levels korrelieren mit erhöhten Werten der Akute-Phase-Antwort (Tak et. al 1999). IL-15 könnte somit besonders im frühen Krankheitsstadium die Aktivierung der PMN und die Freisetzung von GrB induzieren.

Im entzündlichen Gelenk könnte die Interaktion der PMN mit den synovialen T-Zellen, welche lokal IL-15 produzieren, eine entscheidende Rolle spielen. Komai-Koma et al. beschrieben bereits 2004 die Bedeutung des Zytokins IL-15 in der Kommunikation zwischen „*innate-*“ und „*adaptive immunity*“ (Komai-Koma et al. 2004). Bei der Pathogenese der RA setzte sich in den letzten Jahren die Vorstellung eines zweistufigen Modells durch, in welchem „*innate-*“ und „*adaptive immunity*“ miteinander kommunizieren. Demnach sind sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem über die Interaktionen beider Systeme im Sinne eines „*cross-talks*“ auf zellulärer- und Zytokinebene von entscheidender Bedeutung. T-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Zytokine, wie z.B. IL-15, spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende regulatorische Rolle (Parsonage et. al, 2008). Die lokale Entzündungsreaktion im Gelenk führt zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung vorwiegend von T-Lymphozyten der TH-1 (CD4+) Reihe (Porchel et. al 2002). Die Präsenz von differenzierten CD4+ CD45ro+ Memory T-Lymphozyten spricht im weiteren Verlauf für eine vorangegangene Antigenexposition durch Antigen-präsentierende Zellen über HLA-Moleküle (Ponchel et al., 2002). Als Folge dieser Initialreaktion kommt es via Oberflächenmoleküle und von der T-Zelle freigesetzten Zytokinen zur B-Zell Proliferation, Antikörperbildung (RF, CCP) und auch Chemotaxis, Aktivierung und Differenzierung von PMN.

Eine Serie neuerer Arbeiten zeigt daneben die potentielle Rolle von CD4+ TH17 Zellen als Erweiterung des klassisch dichotomen Schemas der Th1/Th2 T-Lymphozyten (Parsonage et al., 2008). Th-17 Zellen könnten u.a. für die Rekrutierung der PMN Population aus dem Vollblut in das synoviale Gewebe verantwortlich sein (Ye et al., 2001). Des Weiteren produzieren Th-17

Zellen nach Stimulation mit IL-17 den neutrophilen Überlebensfaktor G-CSF und tragen somit zu einer verstärkten Granulopoese sowie der Aktivierung und Attraktion der PMN bei (Schwarzenberger et al. 2000). Außerdem induziert oder verstärkt IL-17 die Expression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren, wie u.a. IL-1, IL-6 und Matrixmetalloproteinasen. Das Zytokin IL-17 wurde u.a. auch als Induktor von Aggrecanase (s.o.) aus synovialen Fibroblasten identifiziert (Durigova M et al. 2008). Aggrecan ist ebenfalls ein Substrat für GrB (Ronday et al. 2001; Buzza et al., 2005; Buzza et Bird, 2006). Die Vermutung, dass IL-17 ebenfalls einen direkten aktivierenden Effekt auf die Freisetzung von GrB aus PMN hat, konnte durch unsere Ergebnisse nicht gezeigt werden. Aus der Stimulation der nativen VB-PMN mit IL-17 resultierten keine eindeutigen Veränderungen in der GrB Expression oder Freisetzung der Zellen. Das Zytokin IL-15 stimuliert, wie oben bereits beschrieben, innerhalb einer Feedback-Schleife die lokale Produktion von IL-17 aus synovialen Fibroblasten und die Aktivierung synovialer T-Zellen. Nach Zusammenschau der Vorarbeiten und der eigenen Ergebnisse könnte die Interaktion zwischen PMN und T-Zellen über IL-15 und IL-17 bei Regulierung von GrB in PMN im entzündlichen Gelenk eine Rolle spielen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte mit spezifischen Methoden die Expression von GrB in synovialen - und Vollblut PMN bei Patienten mit RA gezeigt werden. GrB wird im Vollblut ebenfalls auf der Zelloberfläche der PMN exprimiert. Bei den synovialen PMN konnte GrB nur in geringen Mengen auf der Zelloberfläche detektiert werden. In der synovialen Flüssigkeit von RA-Patienten sind signifikant höhere Konzentrationen löslichen GrB's messbar als bei Patienten mit Osteoarthrosen, Psoriasis-Arthritis oder SpA. Sowohl im Plasma gesunder Probanden als auch bei Patienten wurde kein lösliches GrB gemessen. PMN von Patienten mit RA produzieren GrB und setzen es, unter geeigneten Bedingungen, in die SF frei. Die Regulation der Synthese und Freisetzung von GrB findet wahrscheinlich über einen komplexen Zytokin-Crosstalk immunogener Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems statt. IL-15 und $TNF\alpha$ wurden in dieser Arbeit als potentielle Zytokine für die Stimulation und Aktivierung von Granulozyten und eine

Veränderung ihres GrB Profils identifiziert. Bei den pathologischen Prozessen der RA scheint die stetige interzelluläre Interaktion über Zytokine oder direkten Zell - Zell Kontakt zw. CD4+ T-Zellen und PMN für die Unterhaltung der chronischen Entzündung und die folgende Freisetzung matrixzerstörender Enzyme essentiell. In diesem Zusammenhang spielt GrB über die Spaltung von Knorpelbestandteilen wie z.B. Aggrecan und matrixstabilisierender Proteine eine Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich weiterführende Fragen zu GrB in PMN. Insbesondere die genaue Regulation und Aktivierung von GrB erfordert weitere Untersuchungen:

- Welche Mechanismen aktivieren die Protease GrB in den PMN?
- Welche pathogenetischen Faktoren beeinflussen die synovialen PMN bei der RA zu der Freisetzung von GrB in die SF?
- Wird GrB konstitutiv oder über spezifische Regulatoren freigesetzt oder sind die PMN bei der RA derart stimuliert und /oder verändert, dass sie GrB exprimieren aber nicht wieder autokrin aufnehmen können und GrB deswegen in löslicher Form wirken kann?
- Trägt GrB aus PMN in seiner extrazellulären Funktion direkt zu Früherosionen am Gelenkknorpel bei?

Die funktionelle und pathophysiologische Rolle von Granzymen bei Autoimmunerkrankungen, wie bei der RA, rückten in den letzten Jahren in den Fokus zahlreicher Arbeitsgruppen. Besonders die erweiterte Erkenntnis über Granzyme produzierende Zellen - über die klassischen CTL und NK-Zellen hinaus - bietet neue Ansatzpunkte zur besseren Charakterisierung der Protease. In dieser Arbeit konnte ein erstes Profil über GrB in PMN bei der RA erstellt werden. In Zukunft bietet z.B. der Gebrauch spezifischer GrB Inhibitoren weitere Möglichkeiten die Funktion von GrB bei Autoimmunerkrankungen zu eruieren. Granzyme könnten sich somit als potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung neuartiger Medikamente eignen, um eine Fehlregulation des Immunsystems und die hierbei beobachteten Schäden durch GrB+ Zellen zu verhindern.

7 Literaturverzeichnis

1. **Abeles AM**, Pillinger MH. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2006;64(1-2):20-4.
2. **Arnett**, Frank C., Steven M. Edworthy, Daniel A. Bloch, Dennis J. McShane, James F. Fries, Norman S. Cooper, Louis A. Healey, Stephen R. Kaplan, Matthew H. Liang, Harvinders S. Luthra, Thomas A. Medsger, Jr., John T. Sharp, Ronald L. Wilder, and Gene G. Hunder; The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria For the Classification of Rheumatoid Arthritis; *Arthritis and Rheumatism* Vol. 31; No.3 March 1988
3. **Aho K**, Palosuo T, Raunio V, Puska P, Aromaa A, Salonen JT. When does rheumatoid disease start? *Arthritis Rheum.* 1985;28:485–489.
4. **Alamanos Y**, Drosos AA (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4:130-136.
5. **Arnett FC**, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 88; 31:315-324.].
6. **Athanasou NA**, Quinn J. Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow derived cells. *Ann Rheum Dis.* 1991 May;50(5):311-5.
7. **Baslund B**, Tvede N, Danneskiold-Samsoe B, Larsson P, Panayi G, Petersen J, Petersen LJ, Beurskens FJ, Schuurman J, van de Winkel JG, Parren PW, Gracie JA, Jongbloed S, Liew FY, McInnes IB. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 2005 Sep;52(9):2686-92.
8. **Bade B**, Lohrmann J, ten Brinke A, Wolbink AM, Wolbink GJ, ten Berge IJ, Virchow JC Jr, Luttmann W, Hack CE. Detection of soluble human granzyme K in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 2005 Oct;35(10):2940-8.
9. **Barilla ML**, Carsons SE. Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2000 Feb;29(4):252-65.
10. **Bleackley RC** et Babichuk CK, Mutational Analysis of the murin Granzyme B Gene Promoter in Primary T Cells and a T Cell Clone. *Journal of Biological Chemistry* 1997 Jul 25; 272(30):18564-71.

11. **Beauvillain C**, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermontprez P, Barnaba V, Jeannin P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2965-73. Epub 2007 Jun 11
12. **Bläss S**, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. A new viewpoint of immunopathogenesis in rheumatoid arthritis and therapeutic consequences. *Z Rheumatol*. 2001 Feb; 60(1):1-16.
13. **Brennan FM**, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118: 3537-45.
14. **Bromley M**, Woolley DE. Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum* 1984, 27: 857-863.
15. **Bryant A**, Moore J. Rituximab and its potential for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Clin Risk Manag*. 2006 Jun;2(2):207-12.
16. **Burmester G**, Kamradt T, Cytokines and arthritis: is the Th1/Th2 paradigm useful for understanding pathogenesis? *J Rheumatol*. 1998 Jan;25(1):6-8.
17. **Buzza MS, Bird PI**. Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem*. 2006 Jul;387(7):827-37.
18. **Buzza MS**, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA, Froelich CJ, Nice EC, Bird PI. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):23549-58.
19. **Calin A**, Elswood J, Klouda PT. Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4. Susceptibility versus severity, a case-control study. *Arthritis Rheum*. 1989 Oct;32(10):1221-5.
20. **Chabaud M**, Lubberts E, Loosten L, Wim van den Berg et Pierre Miossec. IL-17 derived from juxtra-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001; 3:168.
21. **Cohen SB**, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, Keystone EC, Loveless JE, Burmester GR, Cravets MW, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2793–2806.

22. **Culshaw S**, Millington OR, Brewer JM, McInnes IB. Murine neutrophils present Class II restricted antigen. *Immunol Lett.* 2008 Jun 15;118(1):49-54.
23. **Cunnane G**, Hummel KM, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1998;46(1):1-7
24. **Demasi M**, Cleland, LG, Cook-Johnson, RJ, James, MJ, Effects of hypoxia on the expression and activity of cyclooxygenase 2 in fibroblast-like synoviocytes: interactions with monocyte-derived soluble mediators. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2441.
25. **Diarra D**, Stolina, M, Polzer, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007; 13:156
26. **Durigova M**, Roughley PJ, Mort JS. Mechanism of proteoglycan aggregate degradation in cartilage stimulated with oncostatin M. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008 Jan;16(1):98-104.
27. **Ebringer, A. and Wilson, C.** HLA molecules, bacteria and autoimmunity, *J Med Microbiol* 2000; 49 [4], pp.305-11.
28. **Edwards**, Hallet MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immun Today* 1997; 18:320-324
29. **Elliott MJ**, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1994 Oct 22;344(8930):1105-10.
30. **Emery P, Smolen J.** Issues in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1999 Apr 3;353(9159):1186.
31. **Erhardt CC**, Mumford, PA, Venables, PJW, Maini, RN. Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: An eight year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:7
32. **Feist E** et al. Autoantikörperprofile bei der rheumatoiden Arthritis, *Z Rheumatol* 2007 66: 212-218
33. **Firestein GS.** Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003 May 15; 423(6937):356-61.
34. **Firestein GS** Kelley, WN, Harris, ED Jr, Ruddy (Eds), WB Saunders., Pathogenesis of rheumatoid arthritis, In: *Textbook of Rheumatology*,

35. **Franklin EC**, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 1957;105:425–438.
36. **Froelich CJ**, Zhang X, Turbov J, Hudig D, Winkler U, Hanna WL. Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J Immunol.* 1993 Dec; 151(12):7161-71.
37. **Gravallese EM**, Goldring SR. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Oct;43(10):2143-51.
38. **Geiler G**. Pathology and progression of intra-articular inflammation in rheumatoid arthritis. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1996;80:46-57.
39. **Genovese MC**, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, Birbara C, Box J, Natarajan K, Nuamah I, Li T, Aranda R, Hagerty DT, Dougados M. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 2005 Sep 15;353(11):1114-23
40. **Goldbach-Mansky R**, Suson S, Wesley R, Hack CE, El-Gabalawy HS, Tak PP. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 May;64(5):715-21.
41. **Gorman CL**, Cope AP. Immune-mediated pathways in chronic inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol;* 2008 Apr;22(2):221-38.
42. **Hamel K**, Doodes P, Cao Y, Wang Y, Martinson J, Dunn R, Kehry MR, Farkas B, Finnegan A. Suppression of Proteoglycan-Induced Arthritis by Anti-CD20 B Cell Depletion Therapy Is Mediated by Reduction in Autoantibodies and CD4+ T Cell Reactivity. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4994-5003.
43. **Hansch A**, Stiehl P, Geiler G. Quantification of macrophages and granulocytes at the joint cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis] *Z Rheumatol.* 1996 Nov-Dec;55(6):401-9.
44. **Harris, E.D.** Clinical Features of Rheumatoid Arthritis, Ruddy, S.; Harris, E.D. and Sledge, C.B., Eds, *Kelley's Textbook of Rheumatology* 2, 2001 pp. 967-1000,
45. **Harris ED Jr**, DiBona, DR, Krane, SM. A mechanism for cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Trans Assoc Am Physicians* 1970; 83:267.
46. **Haworth O**, Hardie DL, Burman A, Rainger GE, Eksteen B, Adams DH, Salmon M, Nash GB, Buckley CD. A role for the integrin alpha6beta1 in

the differential distribution of CD4 and CD8 T-cell subsets within the rheumatoid synovium *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Sep;47(9):1329-34.

47. **Hofbauer LC**, Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44:253.
48. **Horiuchi K, Saito S**. Expression of granzyme B in human articular chondrocytes. *J Rheumatol*. 2003 Aug;30(8):1799-810.
49. **Hunziker, W**. Kurzer Übersichtsartikel zur Rolle von Brefeldin A und endocytotischen Wegen. 1992 *FEBS Lett*. 307, 93-96
50. **Iking-Konert C**, Cseko C, Wagner C, Stegmaier S, Andrassy K, Hansch GM. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med*. 2001 Aug;79(8):464-74
51. **Iking-Konert C**, Ostendorf B, Sander O, Jost M, Wagner C, Joosten L, Schneider M, Haensch M. Trans-Differentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells in the synovial fluid in Rheumatoid Arthritis: evidence for activation by T-cells. *Ann Rheum Dis*. 2005 Mar 18
52. **Iking-Konert C**, Wagner C, Deneffle B, Hug F, Schneider M, Andrassy K, Hansch GM. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol*. 2002 Dec;130(3):501-8.
53. **Innala L**, Kokkonen H, Eriksson C, Jidell E, Berglin E, Dahlqvist SR. Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides. *J Rheumatol*. 2008 Jun;35(6):1002-8.
54. **Ishikawa Hirata S**, Andoh Y, Kubo H, Nakagawa N, Nishibayashi Y, Mizuno K. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 1996;16(2):53-60.
55. **Jaen O**, Rullé S, Bessis N, Zago A, Boissier MC, Falgarone G. Dendritic cells modulated by innate immunity improve collagen-induced arthritis and induce regulatory T cells in vivo. *Immunology*. 2008 Aug 27.
56. **Kazis, LE**, Anderson, JJ, Meenan, RF. Health status as a predictor of mortality in rheumatoid arthritis : A five-year study. *J Rheumatol* 1990; 17:609

57. **Korthals M**, Safaian N, Ralf Kronenwett Dagmar Maihöfer, Matthias Schott, Claudia Papewalis, Elena Diaz Blanco, Meike Winter, Akos Czibere, Rainer Haas, Guido Kobbe Roland Fenk. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J Transl Med* 2007; 5: 46
58. **Keyszer GM**, Heer AH, Gay S. Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells*. 1994 Jan;12(1):75-86.
59. **Kim WJ**, Kim H, Suk K, Lee WH. Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2007 Jul 31;111(1):57-65.
60. Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ BW, Lassere, MN, Edmonds, JP, Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: A two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 2006; 54:1122
61. **Kobayashi** Scott D. ; VOYICH Jovanka M. ; BUHL Cassandra L. ; STAHL Robert M. ; DELEO Frank R. Voyich JM, Buhl CL et al. Global changes in gene expression by human PMN during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 6901-6906
62. **Komai-Koma**, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3029-34
63. **Kotake S**, Schumacher HR Jr, Yarboro CH, Arayssi TK, Pando JA, Kanik KS, Gourley MF, Klippel JH, Wilder RL. In vivo gene expression of type1 and type2 cytokines in synovial tissues from patients in early stages of rheumatoid, reactive, and undifferentiated arthritis. *Proc Assoc Am Physicians* 1997;109:286
64. **Koczan D**, Drynda S, Hecker M, Drynda A, Guthke R, Kekow J, Thiesen HJ. Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-TNF alpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(3):R50
65. **Kraan MC**, Haringman JJ, Weedon H, Barg EC, Smith MD, Ahern MJ, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. T cells, fibroblast-like synoviocytes, and granzyme B+ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004 May;63(5):483-8.
66. **Kummer JA**, Tak PP, Brinkman BM, van Tilborg AA, Kamp AM, Verweij CL, Daha MR, Meinders AE, Hack CE, Breedveld FC. Expression of gran A u B in synovial tissue from patients with RA and osteoarthritis *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Oct;73(1):88-95.

67. **Kurth J**, Perniok A, Schmitz R, Iking-Konert C, Chiorazzi N, Thompson KM, Winkler T, Rajewsky K, Kuppers R. Lack of deleterious somatic mutations in the CD95 gene of plasmablasts from systemic lupus erythematosus patients and autoantibody-producing cell lines. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3785-92.
68. **Larbre JP**, Moore AR, Da Silva JA, Iwamura H, Ioannou Y, Willoughby DA. Direkt degradation of articular cartilage by theumatoid synovial fluid:contribution of proteolytic enzymes; *J Rheumatol.* 1994 Oct;21(10):1796-801
69. **Lauw FN** Simpson AJ, Hack CE, Prins JM, Wolbink AM, van Deventer SJ, Chaowagul W, White NJ, van Der Poll T. Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. *J Infect Dis.* 2000 Jul;182(1):206-13.
70. **Lee, DM**, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; Sep 15;358(9285):903-11 358:903
71. **Lees, M**, Taylor, DJ, Woolley, DE. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not gelatinases A and B. *Eur J Biochem* 1994; 223:171.
72. **Lohmander LS**, Neame PJ, Sandy JD. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993 Sep;36(9):1214-22.
73. **Lundy SK**, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):202.
74. **Magalhães R**, Stiehl P, Morawietz L, Berek C, Krenn V. Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch.* 2002 Nov;441(5):415-27.
75. **Maini R**, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M, Lipsky P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet.* 1999 Dec 4;354(9194):1932-9.
76. **Mansson B**, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, Heinegård D, Saxne T. et al. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 1995: 1071-7

77. **Marone, G.** Mast cells in rheumatic disorders: mastermind or workhorse? *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16:245.
78. **Marti C,** M. Neidhart, T. Gerber, N. Hauser, B. A. Michel und H. J. Häuselmann
Cartilage Oligomerix Matrix Protein (COMP): Die Rolle eines kollagenen Knorpel-Matrix-Proteins als Marker der Krankheitsaktivität und Gelenkentzündung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose. *Z Rheumatol* 1999; 58:79-87
79. **Martin P.,** R. Wallich, J. Pardo, A. Müllbacher, M. Munder, M. Modolell and M. Simon, Quiescent and activated mouse granulocytes do not express granzyme A and granzyme B or perforin: similarities or differences with human polymorphonuclear leukocytes? *Blood* 106 (2005), pp. 2871–2878.
80. **Mayadas TN,** Cullere N. Neutrophil beta2 integrins: moderators o life or death decisions *Trends Immunology* 2005; 26(7): 388-395
81. **McGuire MJ,** Lipsky PE, Thiele DL. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2458-67.
82. **McInnes B.,** Bernard P. Leung, Roger D. Sturrock, Max Field' Foo Y. Liew, Leung, Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997;3:189
83. **Metkar SS and Froelich CJ,** Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood* 104 (2004), pp. 905–906.
84. **Mohr, W,** Wessinghage, D. The relationship between polymorphonuclear granulocytes and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 1978; 37:81.
85. **Motyka B,** Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell.* 2000 Oct 27;103(3):491-500.
86. **Müller-Ladner U,** Kriegsman J, Tschopp J, Gay RE, Gay S. Demonstration of granzym A and perforin RNA in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1995; 38(4):477-484
87. **Müller-Ladner U,** Gay RE, Gay S. Molecular biology of cartilage and bone destruction. *Curr Opin Rheumatol.* 1998 May;10(3):212-9.

88. **Müller-Ladner U**, Pap T. Pathogenesis of RA: more than just immune cells] *Z Rheumatol*. 2005 Sep;64(6):396-401
89. **Müller-Ladner U**. Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. *Curr Opin Rheumatol*. 1996 May;8(3):210-20
90. **Neidhart M**, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation ; *Br J Rheumatol* 1997 1151-60
91. **Ospelt C**, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci*. 2004 Sep 1;9:2323-34.
92. **Paimela L**, Palosuo T, Leirisalo-Repo M, Helve T, Aho K Prognostic value of quantitative measurement of rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis.*Br J Rheumatol*. 1995 Dec;34(12):1146-50.
93. **Parsonage G**, Filer A, Bik M, Hardie D, Lax S, Howlett K, Church LD, Raza K, Wong SH, Trebilcock E, Scheel-Toellner D, Salmon M, Lord JM, Buckley CD. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R47.
94. **Pierer M**, Müller-Ladner U, Pap T, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The SCID mouse model: novel therapeutic targets - lessons from gene transfer. *Springer Semin Immunopathol*. 2003 Aug;25(1):65-78.
95. **Pinkoski R.**, Ulrike Winkler, Dorothy Hudig, Chris Bleackley Binding of granzyme B in the nucleus of target cells. Recognition of an 80-kilodalton protein. *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):10225-9.
96. **Ponchel F**, Morgan AW, Bingham SJ, Quinn M, Buch M, Verburg RJ, Henwood J, Douglas SH, Masurel A, Conaghan P, Gesinde M, Taylor J, Markham AF, Emery P, van Laar JM, Isaacs JD. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood*. 2002 Dec 15;100
97. **Quayle JA**, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology*. 1997 Jun;91(2):266-73.
100. **Radsak M**, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*. 2000 Dec;101(4):521-30

101. **Radstake TR**, van Lieshout AW, van Riel PL, van den Berg WB, Adema GJ. Dendritic cells, Fc{gamma} receptors, and Toll-like receptors: potential allies in the battle against rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Nov;64(11):1532-8.
102. **Rantapaa-Dahlqvist S**, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2741–2749.
103. **Robak T**, Gladalska A. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Postepy Hig Med Dosw.* 1997;51(6):621-36.
104. **Romero V**, Andrade F, non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens* 71, pp. 409-416
105. **Ronday HK**, van der Laan WH, Tak PP, de Roos JA, Bank RA, TeKoppele JM, Froelich CJ, Hack CE, Hogendoorn PC, Breedveld FC, Verheijen JH. Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in RA; *Rheumatology (Oxford).* 2001 Jan;40(1):55-61
106. **Savill J**. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukocyte Biol* 1997; 61:375-380
107. **Schneider M**, Ostendorf B, Specker CH. Early diagnosis of rheumatoid arthritis; *Z. Rheumatol.* 64:516-523, 2005
108. **Schneider M.**, M. Lelgemann, H.-H. Abholz, R. Caratti, C. Flügge, H. Jäniche, R. Kunz, K. Krüger, S. Rehart, C. Specker, *Interdisziplinäre Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis, , 2. Überarbeitete Auflage, Steinkopff Verlag Darmstadt 2007*
109. **Schwarzenberger P**, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z: Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* 2000, 164: 4783-4789.
110. **Sedelies KA**, Sayers TJ, Edwards KM, Chen W, Pellicci DG, Godfrey DI, Trapani JA. Discordant regulation of granzyme H and granzyme B expression in human lymphocytes *J Biol Chem.* 2004 Jun 18;279(25):26581-7.
111. **Seemayer CA**, Distler O, Kuchen S, Müller-Ladner U, Michel BA, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Rheumatoid arthritis: new developments in the pathogenesis with special reference to synovial fibroblasts. *Z Rheumatol.* 2001 Oct;60(5):309-18.

112. **Seidel W**, Hecker M, Wagner U, Häntzschel H. Rheumatoid arthritis and cardiovascular complications. *Z Rheumatol.* 2006 Oct;65(6):482, 484-6.
113. **Sendo F**, Tsuchida H, Takeda. Regulation of neutrophil apoptosis – its biological significance in inflammation and the immune response *Hum Cell* 1996; 9: 215-222
114. **Sghiri R**, Bouajina E, Bargaoui D, Harzallah L, Fredj HB, Sammoud S, Ghedira I. Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2008 Nov;29(1):59-62.
115. **Sibilia J**, Sordet C, Mrabet D, Wachsmann D. Understanding rheumatoid arthritis,. *Rev Prat.* 2005 Dec 15;55(19):2134-42
116. **Smeets TJ**, Dolhain RJ, Breedveld FC, Tak PP. Analysis of the cellular infiltrates and expression of cytokines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *J Pathol.* 1998 Sep;186(1):75-81.
117. **Smeets TJ**, Kraan MC, Galjaard S, Youssef PP, Smith MD, Tak PP. Analysis of the cell infiltrate and expression of matrix metalloproteinases and granzyme B in paired synovial biopsy specimens from the cartilage-pannus junction in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2001 Jun;60(6):561-5.
118. **Smolen JS**, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1861-74.
119. **Smolen JS**, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, Woodworth T, Alten R; OPTION Investigators. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet.* 2008 Mar 22;371(9617):987-97.
120. **Smolen JS**, Aletaha D, Machold KP. Therapeutic strategies in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005 Feb;19(1):163-77.
121. **Smolen JS**, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis, *Nat Rev Drug Discov* 2003, pp.473-88.
122. **Smyth MJ**, Trapani JA. Granzymes exogenous proteinases that induce target cell apoptosis, *Immunol Today.* 1995 Apr;16(4):202-6.
123. **Snow M-H**, Mikuls T-R. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: the role of systemic inflammation and evolving strategies of prevention. *Curr-Opin-Rheumatol.* 2005. 17(3): 234-41

124. **Spaeny-Dekking EH**, Hanna WL, Wolbink AM, Wever PC, Kummer AJ, Swaak AJ, Middeldorp JM, Huisman HG, Froelich CJ, Hack CE. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3610-6.
125. **Stamp LKK**, Cleland, LG, James, MJ. Upregulation of synoviocyte COX-2 through interactions with T lymphocytes: role of interleukin 17 and tumor necrosis factor-alpha. *J Rheumatol* 2004; 31:1246
126. **Strunk J**, Lange U, Müller-Ladner U. Kuipers JG. Seropositive chronische Polyarthritits. *Rheumatoide Arthritis. Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130: 1761-1768 In: Zeidler H, Zacher J, Hiepe F (Hrsg.): *Interdisziplinäre klinische Rheumatologie.* Springer-Verlag 2001
127. **Symmons DP**, Silman AJ. Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:214.
128. **Symmons DP**: Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16:707-22.
129. **Tak PP**, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Breedveld FC, Froelich CJ, Hack CE. The levels of soluble granzym A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with RA, *Clin Exp Imm.* 1999; 116:366-370
130. **Tak PP**, Kummer JA, Hack CE, Daha MR, Smeets TJ, Erkelens GW, Meinders AE, Kluin PM, Breedveld FC. Granzyme-positive cytotoxic cells are increased in early rheumatoid synovial tissue *Arthritis Rheum.* 1994 Dec;37(12):1735-43. 1994 Dec
131. **Tak PP**, Analyzing synovial tissue samples. What can we learn about early rheumatoid arthritis, the heterogeneity of the disease, and the effects of treatment? *J-Rheumatol-Suppl.* (2005).; 72: 25-6
132. **Tarrant TK**, Patel DD. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 2006 13(1): 1-14
133. **Thomas R**, Turner M, Cope AP. High avidity autoreactive T cells with a low signalling capacity through the T-cell receptor: central to rheumatoid arthritis pathogenesis? *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):210.
134. **Thomas M**, Massimo Sabatini, Fabrice Bensaude, Benoit Mignard, Jean-Claude Ortuno, Isabelle Caron, Jean A. Boutin, Gilles Ferry, A microplate assay for the screening of ADAMTS-4 inhibitors. *Matrix Biol* 2006; 25:261

135. **Trapani JA.** Granzymes a family of lymphocyte granula serin proteases; *Genome Biology* 2 *Genome Biol.* 2001;2(12)
136. **van der Helm,** van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1117–1121.
137. **van Zeben D,** Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, van der Voort EA, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:1029–1035.
138. **Verhoef CM,** van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP. Interleukin 10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001 Sep;28(9):1960-6.
139. **Wagner C,** Heck D, Lautenschläger K, Iking-Konert C, Heppert V, Wentzensen A, Hänsch GM. T-Lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: Identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection. *Shock.* 2006; 25:241-246
140. **Wagner C,** Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood.* 2004 Feb 1;103(3):1099-104.
141. **Wagner C,** Pioch M, Meyer C, Iking-Konert C, Andrassy K, Hansch GM. Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin. *J Mol Med.* 2000;78(6):337-45.
142. **Wagner C,** Stegmaier S, Hänsch GM. Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haematopoietic stem cells in vitro. *Mol Immunol.* 2008 Mar;45(6):1761-6.
143. **Weyand CM,** Goronzy JJ. T-cell responses in rheumatoid arthritis: systemic abnormalities-local disease. *Curr Opin Rheumatol.* 1999 May;11(3):210-7
144. **Wipke BT,** Allen PM: Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001, 167: 1601-1608.
145. **Wolfe,** F, Mitchell, DM, Sibley, JT et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:481

146. **Wollenhaupt J**, Alten R, Burkhardt H, Edelmann E, Gromnica-Ihle E, Krause A, Krüger K, Manger B, Lorenz H, Müller-Ladner U, Nüsslein H, Pott HG, Tony H, Schneider M. Current therapeutic strategy for rheumatoid arthritis]MMW Fortschr Med. 2006 Oct 19;148(42):38-42
147. **Yamanishi Y**, Firestein GS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001 May;27(2):355-71.
148. **Ye P**, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P *et al.*: Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001, 194: 519-527.

8 Anhang

8.1. Tabelle 1 - Antikörper-und Zytokinliste

<u>Antikörper/Zytokine</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalog-Nr.</u>	<u>Clone</u>
Simultest Control γ 1/ γ 2a	Becton Dickinson	342409	
IgG2a unmarkiert	Chemicon International	60111895	DD1645
anti-mouse IgG1 FITC	Sigma	F 2012	
Granzym B FITC	Kamiya Biomedical Company	MC-223	B18.1
Granzym B FITC	Abcam	ab17929	B18.1
Granzyme B unmarkiert	Chemicon Australia	MAB3170	2C5-F5
CD11b FITC	Biozol	03258	ICRF44
CD15	BioLegend	301905	HI98
CD66b FITC	Immunotech	0166	80 H3
CD64PE	Serotec	0397A	10.1
Anti-CD15 MicroBeads	Miltenyi Biotecs	130046601	
Interferon- γ ultra pure, recombinant human	Cell Sciences		
TNF α , recombinant human	Cell Sciences		
Interleukin-2, recombinant human	R&D Systems		
Interleukin-15, recombinant human	R&D Systems		
Interleukin-17, recombinant human	Sigma-Aldrich		
Infliximab (Remicade®)	CENTOCOR INC., Vertrieb ESSEX PHARMA GMBH		

8.2 Tabelle 2 - Materialliste

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Aqua dest.	
Dulbecco's PBS (phosphate buffered saline)	Gibco, Paisley, GB
BSA (Bovine serum albumin)	SIGMA Steinheim, Germany
Natrium acid	SIGMA Steinheim, Germany
Cellwash	Becton Dickinson
AIM V® Medium	Invitrogen
Brefeldin A	SIGMA, Deutschland
Cytochalasin B Ready MMade Solution	SIGMA, Deutschland

FACS® Analysen

FACS Lysing Solution

Becton Dickinson

FACS Permeabilizing
Solution 2

BD Biosciences

FACS-Puffer

Fix&Perm® Cell
Permeabilization Kit
Venimmun® N
Cytofix bufferAN DER GRUB Bio
Research GmbH
Aventis Behring
BD PharMingen®
Heidelberg, Germany**Verdünnungen**1:10 mit Aqua
dest.1:10 mit FACS-
Puffer500ml PBS, 5g
BSA, 0,5g NaN₃1:4 mit FACS-
Puffer**Granulozytenisolation**

MACS®-Puffer

500ml PBS,
2,5g BSA,
0,3722g EDTA

Polymorphprep

Axis Shild PoC AS

ELISA Kits

Granzyme B Kit®

Diaclone®

COMP® Elisa Enzyme
Immunoassay

AnaMar Medical®

CCP3 IgG ELISA

Qunata Lite TM®

PCR

High Pure RNA

Roche Diagnostics,
Mannheim, Deutschland
Life Technologies, Gibco
BRL, Gettysburg, PA

Isolation Kit

SuperScript

Preamplification

System

PCR-dNTP Mix

Primer

Genaxxon Bioscience GmbH
ARK Scientific Biosystems
(Darmstadt, Deutschland)

Taq DNA-polymerase

GENTAUR BVBA –
BIOXYS, Bruessels

Agarose

Molecular Probes, Leiden,
NetherlandsGelelektrophorese mit
SybrgreenMolekül Weight
marker III

Boeringer Mannheim

Molekül Weight
marker IV

Boeringer Mannheim

FLA 2000 Scanner

Fuji, Tokyo, Japan

Image Gauge version
3.0 software

Konfokale

PolyPrep® slides

SIGMA, Deutschland

Dako mounting
medium

Dako, Carpinteria, CA

Leica microscope DM
RBE

Leica laser system TCS NT;
Leica, Bensheim, Germany

Software: Windows
NT

8.3 Neue Klassifikations- und Diagnosekriterien der RA; ACR 2009

Die neuen Klassifikations- und Diagnosekriterien der RA wurden auf dem ACR 2009 in Philadelphia erstmalig vorgestellt. Im April 2010 werden die neuen Kriterien akzeptiert und im Juli 2010 in Deutschland veröffentlicht.

Domain: Joint involvement	Domain: Serology	Domain: Duration of synovitis	Domain: Acute phase reactants
1 medium-large joint (0 points)	Not positive for either rheumatoid factor or anti-citrullinated protein antibody (0 points)	Less than 6 weeks (0 points)	Neither C-reactive protein nor erythrocyte sedimentation rate is abnormal (0 points)
2-10 medium-large joints (1 point)	At least one of these two tests are positive at low titer, defined as more than the upper limit of normal but not higher than three times the upper limit of normal (2 points)	6 weeks or longer (1 point)	Abnormal CRP or abnormal ESR (1 point)
1-3 small joints (2 points)	At least one test is positive at high titer, defined as more than three times the upper limit of normal (3 points)		
4-10 small joints (3 points)			
More than 10 small joints (5 points)			

Die Diagnose RA ist nach folgenden Kriterien bei Patienten mit einem Score von 6 oder mehr Punkten zu stellen

