Aus der Klinik für Rheumatologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor der Klinik: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

Expression von CXCL17 und Actin in der Media synovialer Gefäße Anwendungsbeispiel einer molekularen Lokalisationsdiagnostik an kryokonservierter Synovialis mittels *in-situ*-Hybridisierung/Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Long Tang Chieu (2023)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Vordenbäumen Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Peter Angerer Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Tang-Chieu L, Pauly T, Mucke J, Lowin T, Pongratz G, Schneider M, Vordenbäumen S. Expression von CXCL17 und Actin in der Media synovialer Gefäße: Anwendungsbeispiel einer molekularen Lokalisationsdiagnostik an kryokonservierter Synovialis mittels *in situ* Hybridisation/Immunfluoreszenz-Doppelfärbung. 45. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh). Stuttgart, 06.-09.09.2017. DocRA.08. German Medical Science GMS Publishing House, 2017.

Zusammenfassung

Als Chemokine bezeichnet man chemotaktische Zytokine. CXCL17 ist eines der zuletzt identifizierten und am wenigsten erforschten Chemokine. Bekannt sind chemotaktische Eigenschaften auf Monozyten und eine Induktion der Angiogenese. Vielen Chemokinen wird eine Bedeutung in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA) beigemessen (z. B. CXCL9, CXCL12, CCL13, CCL18). Zu CXCL17 liegen diesbezüglich noch keine Arbeiten vor.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur molekularen Lokalisationsdiagnostik der mRNA-Expression an Synovialis-Gefrierschnitten zu etablieren. Mithilfe einer in-situ-Hybridisierung (ISH) in Kombination mit einer Immunfluoreszenzgegenfärbung sollte der genaue Expressionsort von CXCL17 in der Synovialis bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Methode zur Detektion von alpha-Actin angewandt. Die Etablierungsarbeit war erfolgreich und ergab ein spezifisches Signal ohne signifikanten Hintergrund. Nach der Hybridisierung der Sonde und der Gegenfärbung ließ sich die CXCL17-mRNA eindeutig glatten Gefäßmuskelzellen in der Tunica media der Gefäßwand synovialer Arteriolen zuordnen, während sich keine Kolokalisation von CXCL17 in den anderen Schichten der Gefäßwand zeigte. Kontrollen wie z. B. die Hybridisierung gegen alpha-Actin, dessen Expressionsmuster bekannt ist, bestätigten die Spezifität der Untersuchung. Die Expression von CXCL17 in der Media legt eine aktive Beteiligung der Gefäße bei Entzündungsprozessen nahe. Möglicherweise ist CXCL17 Teil eines Signalwegs, über den Gefäßmuskelzellen in die Angiogenese bei entzündlichen Prozessen eingreifen. Da keine Publikationen zu CXCL17 in der RA vorliegen und die wenigen vorliegenden Informationen zum Chemokin teils widersprüchlich sind, muss die Funktion von CXCL17 in der Synovialis in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Summary

Chemokines are chemotactic cytokines. CXCL17 is one of the most recently identified and least researched chemokines. Known functional properties are chemotaxis of monocytes and induction of angiogenesis. Many chemokines are considered to be significant in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), e.g., CXCL9, CXCL12, CCL13, and CCL18. No research results on CXCL17 have yet been obtained in this regard, to the best of our knowledge.

The aim of this study was to establish a method for molecular localization diagnostics of mRNA expression on frozen synovial sections and to determine the exact expression site of CXCL17 in the synovium using in situ hybridization (ISH) combined with immunofluorescence counterstaining. This method was also used to detect alpha actin. The method establishment was successful and resulted in a specific signal without significant background. After probe hybridization and counterstaining, the CXCL17 mRNA could be clearly assigned to vascular smooth muscle cells in the tunica media of the vessel wall of synovial arterioles, whereas there was no colocalization of CXCL17 in the other layers of the vessel wall. Probes with a known cellular distribution of hybridization in the tissue like alpha actin provided a control for the specificity of the experiment. The expression of CXCL17 in the tunica media suggests an active vascular involvement in inflammatory processes. It is possible that CXCL17 is part of a signaling pathway by which vascular muscle cells interfere with angiogenesis in inflammatory processes. Since there are no publications on CXCL17 in RA and the findings on this chemokine are scarce and partially contradictory, the function of CXCL17 in the synovium needs to be investigated in further studies.

Abkürzungen

0	
°C	Grad Celsius
μ	
μ1	Mikroliter
μm	Mikrometer
Α	

A/H1N1..... Influenza-A-Virus H1N1 ACPA...... Antikörper gegen citrullinierte Peptide Aqua dest.*Aqua destillata*, destilliertes Wasser

B

BLAST basic local alignment search tool BSGBlutsenkungsgeschwindigkeit

С

CEACarcinoembryonic antigen, karzinoembryonales Antigen CRP.....C-reaktives Protein CXCL17...C-X-C motif chemokine ligand 17

D

dATPE	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNAse	Desoxyribonuklease
dpi	dots per inch, Punktdichte
dUTP	Desoxy-Uridin-5'-triphosphat

E

EDTA.....Ethylendiamintetraacetat ELR....Aminosäure-Triplett Glutamat-Leuzin-Arginin EZM.....extrazelluläre Matrix

F

FAKfokale Adhäsionskinase FITC.....Fluoresceinisothiocyanat FLS*Fibroblast-like synoviocytes*, fibroblastenartige Synoviozyten

G

gGramm GAPDHGlycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GPRG-Protein-gekoppelter Rezeptor GRO1 growth related oncogene peptide 1

H

HClSalzsäure HIF-1α Hypoxie-induzierter Faktor 1α
I
IL Interleukin IL-8 Interleukin 8 iNOS induzierbare NO-Synthase ISH <i>in-situ</i> -Hybridisierung
L
LPS Lipopolysaccharid
Μ
M Molar (mol/l) MCP-1 Monozyten-chemotaktisches Protein 1
MDSC.Myeloid-derived suppressor cells,
myeloide Suppressorzellen
migrationsinhibierender Faktor
minMinute(n)
mlMilliliter
MMPMatrixmetalloproteinasen
N
NBT/BCIP Nitrotetrazoliumblauchlorid/
Bromchlorindolylsulphat
NCBI. National Center for Biotechnology
Information
NIH National Institutes of Health NO Stickstoffmonoxid
O
OA Osteoarthrose
D
PBSPhosphate Buffed Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA Paraformaldehvd
pmol Pikomol
Poly-A Polyadenylic acid,
Polyadenylsäure
R
RA rheumatoide Arthritis RANKL <i>receptor activator of NF kappa B</i>
ligand
RF Rheumafaktor

TIMP tissue inhibitors of
metalloproteinases
$TNF-\alpha$ Tumornekrosefaktor- α
U
U Unit, Einheit für die biologische
Aktivität
V
VCC-1., VEGF co-regulated chemokine 1
VEGFVascular Endothelial Growth
Factor
VSMC vascular smooth muscle cells,
vaskuläre glatte Muskelzellen
vWFvon-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

1.	Ein	leitung		1
	1.1 A	natomi	sche und physiologische Grundlagen	1
	1.1.	1 Die	gesunde Synovialis	1
	1.1.	2 Gef	äßaufbau und vaskuläre glatte Muskelzellen	3
	1.1	3 Ang	jogenese	
	1.2 C	hemoki	ne	7
	1.2.	1 Eint	eilung und Expressionsorte der Chemokine	7
	1.2.2	2 CX	CL17 und CXCR8	9
	1.3 P	athophy	siologie der Gelenkzerstörung bei der rheumatoiden Arthritis	12
	1.3.	1 Klas	ssifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis	14
	1.3.2	2 Neo	angiogenese und Chemokine in der rheumatoiden Arthritis	14
	1.3.	3 Kar	diovaskuläre Komorbidität bei rheumatoider Arthritis	16
	1.4 in	<i>ı-situ-</i> H	ybridisierung (ISH)	17
	1.5 Ir	nmunfl	uoreszenz (IF)	18
	16 7	iele der	Arbeit	18
	1.0 2			10
2.	Mat	terial u	nd Methoden	19
	2.1 N	Iethodis	sches Vorgehen	19
	2.2 P	atienter	und Materialgewinnung	19
	22 E	iviorum	a des Gewehes und Permeshilisierung der Zellmembren	20
	2.3	1 Fixi	erungsprotokoll nach Janes et al. (2010)	20
	2.3.	2 Fixi	erungsprotokoll nach Kuchen et al. (2010)	21
	2.4 A	uswani	der Sonden	23
	2.4.	1 EIIII 7 Hor	ach markierter Oligonukleotid Sonden per 3' <i>tailing</i>	
	2.4.	$\frac{2}{4}$ 1 lef	Auflösung der Sonden	25
	2.	422	Herstellen der Reaktionslösung	20
	2	423	Terminale-Transferase-Reaktion	27
	2.4.	3 Spo	<i>t-Test</i> zur Überprüfung der <i>Labeling</i> -Effizienz	28
	2.	.4.3.1	Vorbereitung der Serienverdünnungen	28
	2.	.4.3.2	Auftragen und Detektion der Spots	28
	2.	.4.3.3	Auswertung des Spot-Tests	30
	2.5 E	ntwickl	ung einer <i>in-situ</i> -Hybridisierung mit nichtradioaktiv markierten Sonder	n 30
	2.5.	1 Vor	behandlung der Schnitte	30
	2.5.2	2 Präł	nybridisierung	31
	2.5.	3 Hyb	ridisierung der Gewebe-mRNA	32
	2.	.5.3.1	Einfach markierte Oligonukleotid-Sonden	32
	2.	.5.3.2	3'-getailte Oligonukleotid-Sonden	33
	2.5.4	4 Post	hybridisierungsbehandlung	34
	2.5.	5 Imn	unhistochemischer Nachweis der Sonden	34
	2.5.0	5 Kor	trollen	35
	2.	.3.6.1	Positivkontrollen	33
	2.	.3.0.2 5.6.2	Poproduziorhorkoit	30
	Ζ.			30

	2.6 Imn 2.6.1 2.6.2 2.6.3	Antikörper Herstellung der verwendeten Lösungen Etablierung der Immunhistochemie	36 37 37 38
	2.7 DOK		39
3.	Ergeb	nisse	40
	3.1 Son	den und Hybridisierungsparameter	40
	3.1.1	Proteinase-K-Konzentration	40
	3.1.2 3.1.3	Spot-Test	40 41
	3.1.4	Einfach markierte Sonden vs. 3'- <i>getailte</i> Sonden	41
	3.2 Imn	unfluoreszenz	43
	33 Fro	shnisse zur Protokollentwicklung der <i>in-situ-</i> Hybridisierung mit	
	Fluoresz	enzgegenfärbung	44
	3.4 Unt	ersuchungen zur Expression von Actin	46
	3.5 Unt	ersuchungen zur Expression von CXCL17	47
4.	Disku	ssion	49
4.	Disku 4.1 Disl	ssion	49 50
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung	49 50 50
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung	49 50 50 51
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen	49 50 51 52
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin	49 50 51 52 53
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4.1	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin hweis und Untersuchung der Expression von CXCL17 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der	49 50 51 52 53 53
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4 Nac 4.4.1 rheum	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin hweis und Untersuchung der Expression von CXCL17 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der atoiden Arthritis.	
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4.1 rheum 4.4.2 Entzür	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin hweis und Untersuchung der Expression von CXCL17 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der atoiden Arthritis Glatte Gefäßmuskelzellen und die mögliche Rolle von CXCL17 bei	
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4.1 rheum 4.4.2 Entzür 4.5 Zus	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin hweis und Untersuchung der Expression von CXCL17 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der atoiden Arthritis Glatte Gefäßmuskelzellen und die mögliche Rolle von CXCL17 bei adungsprozessen	
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4 Nac 4.4.1 rheum 4.4.2 Entzür 4.5 Zusa	ssion cussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin hweis und Untersuchung der Expression von CXCL17 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der atoiden Arthritis Glatte Gefäßmuskelzellen und die mögliche Rolle von CXCL17 bei adungsprozessen	
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4 Nac 4.4.1 rheum 4.4.2 Entzür 4.5 Zusz 4.6 Sch	ssion tussion der angewandten Methoden <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenzgegenfärbung itationen und methodische Einschränkungen hweis und Untersuchung der Expression von Actin hweis und Untersuchung der Expression von CXCL17 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der atoiden Arthritis Glatte Gefäßmuskelzellen und die mögliche Rolle von CXCL17 bei adungsprozessen ammenfassende Beurteilung der Ergebnisse und Ausblick ussfolgerungen	
4.	Disku 4.1 Disl 4.1.1 4.1.2 4.2 Lim 4.3 Nac 4.4 Nac 4.4 Nac 4.4.1 rheum 4.4.2 Entzür 4.5 Zusz 4.6 Sch Litera	ssion	

1. Einleitung

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

1.1.1 Die gesunde Synovialis

Die innere Begrenzung der Gelenkkapsel wird als Synovialis (syn. Gelenkschleimhaut, Gelenkinnenhaut, Synovium, Synovialmembran, *Membrana synovialis*) bezeichnet. Im gesunden Gelenk ist die Synovialis eine dünne Membran, die nicht die knorpeligen Gelenkflächen berührt und das Gelenk begrenzt. Hieran grenzt nach außen die Gelenkkapsel, deren Außenseite die aus Kollagenfasern bestehende *Membrana fibrosa* bildet. Nur sogenannte "echte" Gelenke (Diarthrosen) enthalten einen flüssigkeitsgefüllten Spalt. Die Synovialflüssigkeit (Synovia) ernährt zum einen den gefäßlosen Gelenkknorpel. Zum anderen verringert sie die Reibung im Gelenk und dämpft im Zusammenspiel mit dem Gelenkknorpel Stöße ab (1). Die Synovia ist eine klare visköse Flüssigkeit, die im Wesentlichen ein von der Synovialis abgeschiedenes Dialysat aus dem Blutplasma darstellt, jedoch zusätzlich Hyaluronsäuren (Schleimsubstanzen) und Lubricin enthält. Sie diffundiert kontinuierlich durch die Synovialmembran. Auf diese Weise werden Wasser und Proteine ersetzt (2). Die Synovialmembran kleidet die Gelenkhöhle aus und besteht aus zwei Schichten (Abb. 1):

- 1. einer lumenseitigen Deckzellschicht (Intima, lining layer)
- 2. einer darunterliegenden Subintima



Abb. 1: Aufbau Gelenk und Synovialis Sa = Typ-A-Synoviozyt, Sb = Typ-B-Synoviozyt, A = Arteriole, V = Venole, L = Lymphgefäß, F = Fibroblast, M = Makrophage. Modifiziert nach (3, 4).

Die synoviale Deckzellschicht besteht im gesunden Gelenk aus etwa ein bis drei Zellschichten synovialer Deckzellen (Synoviozyten), die sich in Typ-A- und Typ-B-Synoviozyten unterteilen lassen. Typ-A-Synoviozyten sind Makrophagen, die Zelltrümmer, tote Zellen und eingedrungene Mikroorganismen phagozytieren (5). Bei den synovialen Deckzellen des Typs B handelt es sich um fibroblastenartige Synoviozyten (*Fibroblastlike synoviocytes*, FLS). Diese sind wesentlich an der Instandhaltung und Reparatur der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt, um die durch ständige Bewegung und Belastung der Gelenke auftretenden kleineren Knorpelschäden zu beheben (6). Der kontinuierliche Umbau der Matrix resultiert aus einer durch die FLS kontrollierten Balance zwischen matrixabbauenden Enzymen (u. a. Matrixmetalloproteinasen, MMP), deren Inhibitoren (z. B. TIMP, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) und Matrixkomponenten. Dazu gehören z. B. Kollagen, Hyaluronsäure und Lubricin (7, 8).

Zur Innenseite hin geht die Deckzellschicht in die *Subintima* über. Sie grenzt an die *Membrana fibrosa* der Gelenkkapsel und ist eine relativ zellarme, matrixreiche Struktur mit Venolen, Arteriolen und Lymphgefäßen, die untereinander Anastomosen ausbilden (9). Über sie gelangen Moleküle und Zellen aus der Blutbahn am ehesten in die Deckzellschicht und in die Gelenkhöhle, was vermutlich von großer Bedeutung für die Ernährung des gefäßlosen Knorpels ist. Die *Subintima* enthält außerdem verstreut liegende Fibroblasten, Adipozyten und lockeres Bindegewebe. Im Gegensatz zu Epithelschichten besitzt die Deckzellschicht keine Basalmembran. Die zwei Schichten der Synovialis sind daher nicht klar voneinander getrennt (6).

Im gesunden Gelenk liegt ein anti-entzündliches, homöostatisches Milieu vor. Beispielhaft dafür sind die relativ hohen Konzentrationen am natürlichen IL1-Rezeptorantagonisten und an Osteoprotegerin, einem knochenprotektiven Inhibitor des *receptor activator of NF kappa B ligand* (RANKL), welcher wiederum für die Aktivierung von Osteoklasten und somit den Knochenabbau zuständig ist (5).

Zusammenfassend betrachtet sind die wichtigsten Funktionen der gesunden Synovialis die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix, die Gewährleistung der Gleitfähigkeit des Gelenks und die Ernährung.

1.1.2 Gefäßaufbau und vaskuläre glatte Muskelzellen

Größere Blutgefäße bestehen aus drei Schichten (Tunicae, Abb. 2):

- Intima (*Tunica intima*)
- Media (Tunica media)
- Adventitia (Tunica adventitia)



Abb. 2: Gefäßaufbau Modifiziert nach (10,11)

Die *Tunica intima*, die als innerste Schicht lumenseitig liegt, besteht aus Endothelzellen, die an einer Basalmembran haften. Sie ist glatt, nichtthrombogen und dient als Permeabilitätsbarriere. Über Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst die Intima außerdem Gerinnungs- und Entzündungsprozesse und reguliert die Angiogenese sowie den Gefäßtonus. Die mittlere Schicht der Gefäßwand, die Media, besteht hauptsächlich aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Die Muskelzellen stellen den Gefäßtonus her. Die Adventitia besteht aus längs angeordneten Fibroblasten und stellt den Übergang von der Gefäßwand zum lockeren perivaskulären Stützgewebe dar. Sowohl den glatten Muskelzellen der Gefäßwandmedia als auch den adventitiellen Fibroblasten wird eine Rolle bei entzündlichen Prozessen im Gefäß beigemessen (12, 13).

Die glatte Muskulatur verdankt ihren Namen der fehlenden Querstreifung bei lichtmikroskopischer Betrachtung. Die vaskulären glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) machen den Hauptbestandteil der *Tunica media* der Gefäßwände aus. Sie können die Gefäße dynamisch weiten oder verengen, indem sie sich als Reaktion auf vasoaktive Stimuli (z. B. NO) kontrahieren oder relaxieren. Die Grundlage hierfür bildet einerseits ihre mechanische Verbindung über Desmosomen, andererseits ihre elektrische Verbindung zu funktionellen Einheiten über *Gap junctions*. Über diese elektrische Verbindung können auch Impulse aus den Endothelzellen in der *Tunica intima* verarbeitet werden. Mit dieser Eigenschaft regulieren sie den Blutfluss, erhalten den Gefäßtonus und kontrollieren den Blutdruck (14).

VSMC weisen eine Bandbreite an Phänotypen auf. Während der Neubildung von Gefäßen in der Embryonalentwicklung, der Vaskulogenese, liegen die VSMC in einem entdifferenzierten synthetischen Phänotyp vor. Sie induzieren unter anderem die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Muskelzellen, indem sie verschiedene Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren sezernieren. So tragen sie maßgeblich zur Gefäßentwicklung bei (15). In reifen, gesunden Gefäßen liegen die VSMC größtenteils in einem differenzierten kontraktilen Phänotyp vor, der wenig sensitiv ist für Wachstumsfaktoren zur Migration und Proliferation. Sie exprimieren eine Reihe kontraktiler Markerproteine wie α-Actin, h1-Calponin und SM22 α (16, 17). Die Ausrichtung der intrazellulären Filamente verleiht dem kontraktilen Zelltyp sein typisches spindelförmiges Aussehen. Dieser sogenannte Phänotyp-Switch ist notwendig, damit die VSMC ihre Hauptfunktion, nämlich die Vasokonstriktion und dilatation, erfüllen können. Der Wechsel des Phänotyps ist jedoch nicht als statischer und endgültiger Prozess zu betrachten. Vielmehr sind die Begriffe "differenziert" und "entdifferenziert" bzw. "kontraktil" und "synthetisch" als zwei Enden eines breiten Spektrums an Phänotypen der VSMC zu verstehen. Die VSMC sind nicht ausdifferenziert, sondern können ihren Phänotyp abhängig von wechselnden Bedingungen ändern. Diese Fähigkeit bezeichnet man als phänotypische Plastizität.

Unter pathologischen Bedingungen können sich VSMC wieder entdifferenzieren, ihren synthetischen Phänotyp annehmen und verstärkt Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder MMP sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren (18). Im Gegensatz dazu sinkt die Expression der für differenzierte VSMC typischen Markerproteine (19).

Dies geschieht beispielsweise nach einer Schädigung der Intima, bei der die Endothelzellen, adhärierende Thrombozyten und inflammatorische Zellen Mediatoren wie Wachstumsfaktoren freisetzen. Diese leiten den Phänotypwechsel der VSMC ein (20). Infolgedessen können die glatten Gefäßmuskelzellen vermehrt proliferieren und migrieren. Synthetische (entdifferenzierte) VSMC haben generell einen geringeren Anteil an kontraktilen Proteinen, enthalten jedoch mehr synthetische Organellen wie das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien. Diese sind für das epitheloide Aussehen der synthetischen VSMC verantwortlich (21). Die phänotypische Plastizität der VSMC ist nicht nur entscheidend für physiologische Umbauvorgänge der Gefäßwand im Rahmen von Reparaturvorgängen, sondern auch für das vaskuläre Altern und altersbedingte Erkrankungen wie Atherosklerose (22).

Wie alle anderen Zellen unterliegen auch glatte Gefäßmuskelzellen einem Alterungsprozess, der zur Seneszenz führt. Seneszenz ist definiert als der irreversible Verlust der Zellteilungsfähigkeit. Dabei wird zwischen einer replikativen Seneszenz infolge einer Telomerverkürzung und einer Stress-induzierten vorzeitigen Seneszenz unterschieden. Zur replikativen Seneszenz kommt es nach vielen Zellteilungen. Sie ist ein charakteristisches Zeichen für zelluläres Altern. Die Stress-induzierte Seneszenz wird durch externe Stimuli wie Oxidantien und Strahlung getriggert, die die intrazelluläre Seneszenzkaskade vorzeitig auslösen. Vorzeitig seneszente Zellen erkennt man unter anderem daran, dass deren Telomere nicht verkürzt sind. Die Proliferation von VSMC führt somit langfristig zur Seneszenz. Die Phänotypveränderung, die Seneszenz wie auch der Zelltod von VSMC können Entzündungsreaktionen und die Rekrutierung von Monozyten auslösen (23).

1.1.3 Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt die Neubildung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen. Während bei der Vaskulogenese in der Embryonalentwicklung Blutgefäße aus Vorläuferzellen entstehen, wird das Blutgefäß bei der Angiogenese aus bereits differenzierten Endothelzellen gebildet (15).

Angiogene Faktoren, die von verschiedenen Zelltypen in der Synovialis freigesetzt oder exprimiert werden, aktivieren Endothelzellen. Dann beginnt ein mehrstufiger, stark regulierter Prozess, der das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren erfordert (24):

1. Freisetzung von Proteasen aus aktivierten Endothelzellen

- 2. Abbau der Basalmembran des bestehenden Gefäßes
- 3. Endothelzell-Proliferation und -Migration
- 4. Kapillaraussprossung (*capillary sprouting*) und Formation eines neuen Gefäßlumens
- 5. Synthetisierung einer neuen Basalmembran und Rekrutieren von Perizyten
- 6. Fusion des neuen Blutgefäßes und Umbau der Gefäßwand
- 7. Beginn des Blutflusses

Die aktivierten Endothelzellen produzieren proteolytische Enzyme, die die darunterliegende endotheliale Basalmembran abbauen. Dazu gehören die MMPs und Plasmin. Plasmin ist in der Lage, verschiedene Bestandteile der Basalmembran und der EZM wie etwa Fibrin, Fibronektin, Laminin und Proteoglykane abzubauen. Darüber hinaus kann Plasmin verschiedene MMPs aktivieren (25). MMPs sind eine Gruppe von mindestens 16 Enzymen, deren meiste Mitglieder lösliche sezernierte Enzyme sind. Für den Abbau der Basalmembran sind insbesondere die MMP 9 und MMP 2 von Bedeutung (26).

Der Abbau der EZM verursacht einen lokalen Anstieg von Wachstumsfaktoren und Peptidfragmenten wie z. B. Fibrin. Dies stimuliert die Endothelzellen, die in die zerstörte EZM einwandern und dort proliferieren. Ein essenzieller Gefäßwachstumsfaktor ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Er wird in verschiedenen Geweben wie z. B. Leber, Niere, Gehirn und Milz gebildet und liegt in sechs verschiedenen Isoformen vor (27). Der Verlust auch nur eines VEGF-Allels führt zum Embryonaltod, was die vitale Bedeutung dieses Faktors in der Entwicklung des Gefäßsystems demonstriert (28). Die VEGF-Aktivität wird über den Sauerstoffgehalt im Gefäß reguliert. Unter hypoxischen Bedingungen führt die Stimulation des Hypoxie-induzierten Faktors 1 α (HIF-1 α) zur Hochregulierung von VEGF. Dies führt wiederum zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und stimuliert den Abbau der EZM sowie die Proliferation und Migration von Endothelzellen. Unter Normoxie wird dagegen weniger VEGF exprimiert (27).

Nach der Kapillaraussprossung und der Ausbildung eines Lumens synthetisieren die Endothelzellen eine neue Basalmembran, was die Voraussetzung für ein neues intaktes Blutgefäß ist. Um die neue Struktur zu stabilisieren, werden glatte Muskelzellen und Perizyten rekrutiert. Ein weiterer Mechanismus zur Stabilisierung des Gefäßes ist die Interaktion des Wachstumsfaktors Angiopoetin-1 mit dem endothelialen Tyrosinkinase-Rezeptor Tie-2. Während VEGF vor allem zu Beginn der Gefäßneubildung dominiert, wirkt Angiopoetin-1 maßgeblich an der Schlussphase der Angiogenese mit. Es treibt die Reifung des Blutgefäßes voran und wirkt gefäßprotektiv, indem es die Durchlässigkeit der Gefäße absenkt und den Austritt von Plasma verhindert (29).

Die Angiogenese ist ein fundamentaler Prozess bei der Ausbildung mikrovaskulärer Netzwerke - nicht nur bei physiologischen Prozessen wie dem weiblichen Zyklus oder der Embryogenese, sondern auch unter pathologischen Bedingungen wie bei malignem Tumorwachstum (30).

1.2 Chemokine

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die sezerniert werden und anhand eines Gradienten die gezielte Migration von Immunzellen ins betroffene Gewebe initiieren und regulieren. Sie sind dadurch an der Homöostase des Immunsystems und an Entzündungsprozessen beteiligt (31). Die Gruppe der Chemokine zeichnet sich dadurch aus, dass sie als einzige Zytokine ihre biologischen Effekte durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR) mit sieben Transmembrandomänen vermitteln (32). Aufgrund der spezifischen Expression und der Zielzellspezifität sind Chemokine nicht nur als Entzündungs- und Immunmediatoren tätig, sondern auch für zahlreiche andere Prozesse wie die Organentwicklung, die Regulation der Angiogenese und pathophysiologische Abläufe von Bedeutung (33).

1.2.1 Einteilung und Expressionsorte der Chemokine

Chemokine sind kleine, sechs bis 14 kDa große, sekretorische Peptide mit 60 bis 130 Aminosäuren, die in der Regel vier Cysteine in ihrer Sequenz tragen. Eine Ausnahme stellt das Chemokin XCL1 dar, das nur zwei Cysteinreste enthält. Zur Jahrtausendwende schlugen Zlotnik und Yoshie eine einheitliche systematische Nomenklatur vor. Die Bezeichnung des Chemokins oder Rezeptors setzt sich zusammen aus dem Namen der Chemokin-Subfamilie, der Funktionsbezeichnung Ligand (L) oder Rezeptor (R) und der Nummerierung. Ausgehend von der Lage der ersten beiden N-terminalen Cysteine werden die Chemokine in C-, CC-, CXC- und CX₃C-Unterfamilien eingeteilt. Dabei steht C für Cysteinreste und X für dazwischenliegende andere Aminosäuren. Hinter dem systematischen Namen der Unterfamilie steht ein L für Ligand, gefolgt von einer Nummerierung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Systema	<u>itische und gängige Nam</u>	en der Chemokine und dei	ren Rezeptoren
Systematischer	Alternative Namen	Kategorie	Chemokinrezeptor
Name		-	_
CXC-Subfamilie			
CXCL1	GROa/MSA-a	Inflammatorisch, ELR ⁺	CXCR1. CXCR2
CXCL2	GROß/MSA-ß	Inflammatorisch, ELR ⁺	CXCR2
CXCL3	GROv/MSA-v	Inflammatorisch ELR ⁺	CXCR2
CXCL4	PF4	Inflammatorisch, ELR	CXCR3-B
CYCL5		Inflammatorisch ELR ⁺	CXCR2
CXCL5	CCP 2	Inflammatorisch, ELR ⁺	CYCP1 CYCP2
CXCL0	NAD 2	Inflammatorisch, ELR	CYCP2
CACL/		Inflammatorisch, ELR	CYCP1 CYCP2
CACLO	IL-0	Inflammatorisch, ELR	CYCD2
CXCL9			CACR5
CACLIU CNCL 11	IP-10	Inflammatorisch, ELR	CXCR3
CXCLII	I-TAC	Inflammatorisch, ELR	CXCR3, CXCR/
CXCL12	SDF-1	Homoostatisch, ELR	CXCR4, CXCR7
CXCL13	BLC, BCA-1	Homöostatisch, ELR	CXCR5, CXCR3
CXCL14	BRAK	Homöostatisch, ELR ⁻	unbekannt
CXCL15	unbekannt	Unbekannt, ELR ⁻	unbekannt
CXCL16	GCP-2	Inflammatorisch	CXCR6
CXCL17	VCC-1	Dual?, ELR ⁻	CXCR8
CC-Subfamilie			
CCL1	I-309	Inflammatorisch	CCR8
CCL2	MCP-1	Inflammatorisch	CCR2
CCL3	MIP-1a	Inflammatorisch	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1β	Inflammatorisch	CCR5
CCL5	RANTES	Inflammatorisch	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	Inflammatorisch	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	Inflammatorisch	CCR1, CCR2, CCR5
CCL11 Eotaxin		Dual	CCR3, CCR5
CCL13	MCP-4	Inflammatorisch	CCR1, CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	Inflammatorisch	CCR1, CCR3, CCR5
CCL15	HCC-2. Leukotactin-1	Inflammatorisch	CCR1, CCR3
CCL16	LEC HCC-4	Inflammatorisch	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 H4
CCL17	TARC	Dual	CCR4
CCL18	PARC DC-CK1	Homöostatisch	CCR3
CCL 19	FLC/MIP-38	Homöostatisch	CCR7
CCL 20	MIP-3a LARC	Dual	CCR6
CCL20 CCL21	SI C 6Ckine	Homöostatisch	CCB7
	MDC	Dual	CCP4
CCL22 CCL22	MDC MDIE 1	Inflammatorisch	CCP1
CCL25 CCL24	MDIE 2 Ectorin 2	Inflammatorisch	CCP2
CCL24 CCL25	MPIF-2, EOlaXIII-2	Hamäastatisah	CCR0
CCL25	TECK		CCR9
CCL26	Eotaxin-3	Inflammatorisch	CCP10
CCL2/	CTACK/ILC	Inflammatorisch	CCRI0
CCL28	MEC	Homoostatisch	CCR3, CCR10
C C-1 6 '''			
C-Subfamilie	Laurahatastin ATLAC	Dual	VCD 1
ACLI	Lympnotactin, ATAC,	Dual	AUKI
VCLA	SCM-10		VOD 1
AUL2	SCM-IP	Dual	AUKI
CX ₃ C-Subfamilie			CN/ACD 1
CX3CL1	Fractalkine	Dual	CX3CR1

Quelle: Modifiziert nach Zlotnik und Yoshie (31), erweitert nach Weinstein, Hernández-Ruiz, Burkhardt und Maravillas-Montero et al. (34–37). Die alternativen Namen und die korrespondierenden Chemokinrezeptoren erfüllen keinen Anspruch auf

Vollständigkeit.

Analog zu den Liganden werden die zu den einzelnen Gruppen gehörigen Rezeptoren mit R benannt und ebenfalls nummeriert (38). So handelt es sich zum Beispiel bei CXCL17 (*C-X-C motif chemokine ligand 17*) um das 17. Chemokin der CXC-Untergruppe und bei CCR1 um den ersten bekannten Rezeptor der CC-Untergruppe. Die Chemokinfamilie besteht aus 47 Liganden und 19 Rezeptoren. Die meisten Chemokine zählen zu den CXCund CC-Subfamilien. Die Chemokine der CXC-Gruppe lassen sich weiter nach dem Vorhandensein des ELR-Motivs unterteilen, das aus dem Aminosäure-Triplett Glutamat-Leucin-Arginin besteht. CXC-Chemokine mit ELR-Motiv in der N-terminalen Rezeptorbindungsstelle wie z. B. CXCL1, CXCL5, CXCL7 und CXCL8 wirken angiogen, während ELR-negativen CXC-Chemokinen wie etwa CXCL4, CXCL9 und CXCL10 eine antiangiogene Wirkung zugeschrieben wird (39, 40).

Darüber hinaus lassen sich Chemokine nach ihrem Expressionsmuster in inflammatorische, homöostatische und duale Chemokine einteilen. Inflammatorische Chemokine werden typischerweise bei entzündlichen oder infektiösen Ereignissen exprimiert und locken Immunzellen an den Ort des Geschehens. Dazu gehören die meisten Chemokine. Homöostatische Chemokine hingegen werden kontinuierlich und ohne besonderen Stimulus erzeugt. Duale Chemokine weisen Eigenschaften von inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen auf. Sie können in einigen Geweben homöostatisch exprimiert, aber ebenso in anderen Geweben durch inflammatorische Trigger hochreguliert werden (35).

Viele Chemokine werden sehr gewebespezifisch exprimiert. CCL27 wird beispielsweise ausschließlich in der Haut exprimiert und übt hautspezifische Funktionen aus (41, 42).

1.2.2 CXCL17 und CXCR8

CXCL17 ist das jüngst entdeckte und zugleich das am wenigsten erforschte CXC-Chemokin. Es wurde erstmals im Jahre 2006 von Pisabarro et al. als Makrophagen und Dendritische Zellen anziehendes Protein beschrieben (43). CXCL17 besteht aus 119 Aminosäuren mit einem Signalpeptid aus 22 Aminosäuren. Das CXCL17-codierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 19q13.2 (35). Bekannte Expressionsorte von CXCL17 sind die Mukosagewebe des oberen Verdauungstrakts, der Lunge und der weiblichen Geschlechtsorgane (34, 36, 43-45). Zu CXCL17 liegen vor allem Arbeiten in Zusammenhang mit Karzinomen, Infektionen und Entzündungsprozessen vor. Lee et al. konnten nachweisen, dass CXCL17 die Expression von pro-angiogenen Faktoren wie dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) durch Monozyten stimuliert. Damit bestätigten die Autoren die Hypothese von Weinstein et al., dass CXCL17 über seine angiogene Wirkung das Tumorwachstum begünstigt (34). Die Neoangiogenese ist von existentieller Bedeutung für Tumoren, da die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff per Diffusion nur bis zu einer Tumorgröße von etwa 2 mm³ ausreicht (46). Zell-kultur- und Tierversuche ergaben, dass ein Überschuss an CXCL17 die Proliferation von Tumorzellen fördert und die Gefäßdichte von Tumoren steigert (43, 47). So ist die Expression von CXCL17 in Kolonkarzinomzellen mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert (48). Guo et al. untersuchten dieses Phänomen an Brustkrebszellen und stellten fest, dass die CXCL17-Expression mit einem höheren Differenzierungsgrad und einer höheren Zellteilungsrate des Tumorgewebes assoziiert ist (49). CXCL17 gilt aufgrund seiner angiogenen Eigenschaften als potenzielles Onkogen bei vielen soliden Tumoren.

Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Rolle von CXCL17 bei entzündlichen Prozessen sind widersprüchlich. Wie bereits erwähnt, wird CXCL17 in der Mukosa zahlreicher Organe konstitutiv produziert. Es kann allerdings unter inflammatorischen Bedingungen auch in anderen Organen hochreguliert werden, die dieses Chemokin normalerweise nicht exprimieren (35, 36). Erkrankungen, bei denen eine Überexpression von CXCL17 beobachtet wurde, sind beispielsweise die idiopathische Lungenfibrose, einige aggressive Tumoren des Gastrointestinaltrakts, der Brust, der Lunge und des Endometriums sowie intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien des Pankreas (44, 45, 48, 50).

Die gesteigerte CXCL17-Expression könnte jedoch auch mit einer antiinflammatorischen Funktion zu tun haben. So unterdrückte CXCL17 in diversen *in-vitro*-Versuchen die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α/β und iNOS (induzierbare NO-Synthase) durch Makrophagen, die zuvor mit endotoxisch wirksamen Lipopolysacchariden (LPS) behandelt worden waren (43, 45). Darüber hinaus wurde in der Magenschleimhaut eine permanent hohe CXCL17-Expression nachgewiesen. Lee et al. vermuten daher, dass CXCL17 eine schützende, entzündungshemmende Funktion im Magen einnimmt, der permanent inflammatorischen Reizen wie der Magenflora, der Magensäure und Nahrungsbestandteilen ausgesetzt ist (45). Außerdem besitzt CXCL17 antimikrobielle Eigenschaften. So konnten Burkhardt et al. nachweisen, dass das Chemokin über eine Zellpermeabilisierung antibakteriell wirkt und das Überleben von Pilzen signifikant senkt (50). Aufgrund der bekannten Eigenschaften wird CXCL17 zu den dualen Chemokinen gezählt, die sowohl unter homöostatischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert werden (35, 36). Welche Funktion CXCL17 genau bei Entzündungsprozessen innehat, ist nicht abschließend geklärt und scheint vom Organ und vom jeweiligen pathogenen Prozess abzuhängen.

Erst vor kurzem wurde ein möglicher Zusammenhang von CXCL17 mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises entdeckt. Hernández-Ruiz et al. untersuchten den Speichel und die Tränenflüssigkeit von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom und stellten stark erhöhte CXCL17-Spiegel in beiden Körperflüssigkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Sie vermuten daher eine Beteiligung des Proteins an der Pathophysiologie dieser Er-krankung (51).

Maravillas-Montero et al. untersuchten die Wirkung von CXCL17 auf humane Monozyten der Zelllinie *Tohoku Hospital Pediatrics-1* (THP-1) aus dem Blut von Leukämiepatienten und schlussfolgerten, dass CXCL17 über die Interaktion mit dem Rezeptor CXCR8 (GPR35) chemotaktisch auf Monozyten wirkt (37). Es handelt sich dabei um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der 1998 von O'Dowd et al. entdeckt wurde (52). CXCR8 wurde in zahlreichen Organen und Geweben nachgewiesen, darunter in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt, in der Milz, in der Skelettmuskulatur, im Uterus und im Spinalgang-lion (53, 54).

CXCR8 wird von Makrophagen exprimiert und ist wie CXCL17 vor allem im Mukosagewebe in hohen Konzentrationen vorhanden (55). Die CXCL17-CXCR8-Achse wird daher als bedeutender Mechanismus in der Makrophagen-Chemotaxis in der Mukosa betrachtet (36, 37). So wurde bei entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts Kynurensäure, ein natürlicher Rezeptoragonist von CXCR8, nachgewiesen. CXCR8 wird aufgrund der Untersuchungen mit Kynurensäure eine modulierende Rolle bei Entzündungsprozessen zugeschrieben. (53, 56, 57). Eine genomweite Assoziationsstudie, bei der Krankheiten mit Merkmalen des Genoms assoziiert werden, ergab zudem einen Zusammenhang zwischen CXCR8 und chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa und der primär sklerosierenden Cholangitis (58).

Hinsichtlich der intrazellulären Signaltransduktion fanden Liu et al. heraus, dass CXCL17 über den Src-/FAK-Signalweg chemotaktisch auf THP-1-Zellen wirkt (59). Die fokale Adhäsionskinase (FAK) und der Steroidrezeptor-Coaktivator Src (*steroid receptor coacti*- *vator*) sind intrazelluläre Tyrosinkinasen, die miteinander interagieren, um diverse Zellantworten zu vermitteln. Die Stimulation durch CXCL17 verursacht eine Tyrosinphosphorylierung von Src in THP-1-Zellen, wodurch Src an FAK bindet und dort wiederum eine Tyrosinphosphorylierung triggert. Diesem Komplex wird eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation, der Apoptoseresistenz von Tumorzellen und der Metastasierung von Tumoren beigemessen (60).

Bezüglich der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis liegen noch keine Untersuchungen zu CXCL17 oder CXCR8 vor.

1.3 Pathophysiologie der Gelenkzerstörung bei der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA, auch bekannt als chronische Polyarthritis) ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung mit unklarer Ursache. Das Krankheitsbild der RA wurde erstmals von A. J. Landré-Beauvais in seiner Dissertation im Jahr 1800 beschrieben. Der heute gebräuchliche Terminus ,Rheumatoide Arthritis' wurde von dem Briten Sir Alfred B. Garrod 1853 eingeführt (61).

Die RA ist durch eine Proliferation der Synovialis mit Nachweis intrasynovialer Entzündungszellen und Gefäßexpansion gekennzeichnet. Zu den charakteristischen Eigenschaften der Synovitis gehören (62, 63):

- 1. die Hyperplasie der Deckzellschicht,
- 2. die Neo-Angiogenese,
- die Einwanderung von Immunzellen, u. a. CD4- und CD8-positive T-Zellen und Th17-Zellen,
- 4. die Pannusbildung, d. h. destruierend in Knorpel und Knochen vorwachsende Synovialisproliferationen.

Bei der Synovitis und Pannusbildung kann die Zahl der Zellschichten von normalerweise einer bis drei auf zehn Schichten oder mehr ansteigen, wobei einzelne Zellen zusätzlich hypertrophieren können. Das Wachstum der Synovialis ist vor allem auf die verlängerte Lebensdauer von ortsständigen Typ-A-Synoviozyten zurückzuführen (64). Diese akkumulieren, sodass die Gesamtzahl der Zellen in der Synovialis steigt. Das hyperplastische Synovium wächst über die physiologischen Grenzen hinaus und wandert in den darunterliegenden Knorpel ein. Die Invasion des Knorpels beginnt meist am Übergang von Knorpel zu Knochen (65). Des Weiteren wandern Leukozyten, Makrophagen und andere Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf in die Synovialis ein.

Die Zellmigration wird ermöglicht durch die Aktivierung der Endothelzellen in den synovialen Blutgefäßen. Infolgedessen steigt auch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z. B. Integrinen und Selektinen sowie von Chemokinen (66). Außerdem wird dem Entzündungsgrad entsprechend deutlich mehr niedrig visköse Gelenkflüssigkeit produziert. Beides führt zur Gelenkschwellung und Schmerzen. Die Synovia, die den Gleitfilm auf den Gelenkflächen bildet und sie zugleich ernährt, enthält bei RA-Patienten zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine, Granulozyten und Makrophagen (67, 68). Die pathologischen Abläufe werden durch ein komplexes Zusammenspiel von proinflammatorischen Faktoren vermittelt, die in den Gelenken bzw. in der Synovialis der RA-Patienten produziert werden (69).

Durch die invasive Hyperplasie der entzündlich-reaktiven Synovialis kommt es zu einer progressiven Destruktion des Gelenkknorpels und des umliegenden Knochens (70). Dies führt (bei ausbleibender Therapie) zu charakteristischen Deformitäten an Händen und Füßen und zur Invalidität (71).

Mit einer Prävalenz von etwa einem Prozent in der europäischen Bevölkerung stellt die RA die am häufigsten vorkommende Form der entzündlichen Arthritis dar (72). Frauen erkranken etwa doppelt so oft wie Männer (73). Die RA stellt sich klinisch, genetisch und histologisch heterogen dar. Neuere Forschungsergebnisse zeigen pathophysiologische Unterschiede zwischen den Patienten. Die Entdeckung neuer Varianten der RA kann daher prognostische und therapeutische Auswirkungen haben (74). Die Ursache für die Erkrankung und die Pathogenese der RA sind trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig geklärt. Ohne adäquate Therapie führt die Erkrankung zu schweren Gelenkdestruktionen mit Funktionsverlusten bis hin zur Invalidität. Dank der Entwicklung verträglicher Basistherapeutika und Biologika ist die RA bei frühzeitiger Intervention jedoch gut kontrollierbar geworden (75).

1.3.1 Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis

Die RA manifestiert sich primär an der Synovialmembran der Gelenke und Sehnenscheiden.

Sie wird anhand der ACR/EULAR-Kriterien (Tabelle 2) klassifiziert. Diese Klassifikationskriterien werden in der Praxis in der Regel auch zur Diagnosestellung herangezogen (76). Ein Patient mit einer Synovitis, die nicht durch eine andere Erkrankung erklärt werden kann, und in dem unten dargestellten Summen-Punkte-*Score* mindestens sechs Punkte erhält, wird als RA-Patient klassifiziert.

Tabelle 2: 2010-ACR/EULAR-Kriterien zur Klassifikation der RA	
Kriterium	Punktzahl
A. Gelenkbeteiligung	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit und ohne Beteiligung der großen Gelenke)	2
4-10 kleine Gelenke (mit und ohne Beteiligung der großen Gelenke)	3
>10 Gelenke (davon mindestens ein kleines Gelenk)	5
B. Serologie	
Negativer RF und negative ACPA	0
Niedrig positiver RF oder niedrig positive ACPA	2
Hoch positiver RF oder hoch positive ACPA	3
C. Akute-Phase-Proteine	
Normales CRP und normale BSG	0
Abnormales CRP oder abnormale BSG	1
D. Dauer der Symptome	
≤ 6 Wochen	0
≥ 6 Wochen	1
RF = Rheumafaktor	
ACPA = Antikörper gegen citrullinierte Peptide	
CRP = C-reaktives Protein	
BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit	
Ein Patient mit einer Synovitis, die nicht durch eine andere Erkrankung erklärt werden kann, ur	nd mindestens
6 Punkten wird eindeutig als RA-Patient klassifiziert.	
Quelle: Aletaha et al. (76)	

1.3.2 Neoangiogenese und Chemokine in der rheumatoiden Arthritis

Eines der frühesten histopathologischen Zeichen der RA ist die synoviale Neoangiogenese, die durch lokale hypoxische Bedingungen und Zytokine induziert wird (77). Die Bildung neuer Blutgefäße aus bestehenden Blutgefäßen läuft in nacheinander geschalteten kontrollierten Schritten ab, die in 1.1.3 beschrieben werden. Trotz der zahlreichen Gefäßneubildungen, über die Sauerstoff und Nährstoffe in die entzündete Synovialis gelangen, bleibt das RA-Gelenk hypoxisch. Die zahlreichen neuen Kapillaren sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der Entzündung, vermögen es aber nicht, die massiv angewachsene Synovialis adäquat zu ernähren. Dies führt zu einer chronischen lokalen Gewebsischämie mit mittleren Sauerstoffpartialdrücken von teilweise unter 15 mmHg. Wiederkehrende Zyklen von Hypoxie und Reoxygenierung infolge neu einsprießender Kapillaren sowie durch Immunzellen freigesetzte Oxidantien fördern den chronischen oxidativen Stress im RA-Gelenk. Dadurch entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die das Gewebe zusätzlich schädigen (78).

Bei der Produktion der zahlreichen angiogenen Zytokine spielt das inflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine fundamentale Rolle. Es aktiviert nicht nur die Expression von Zytokinen und Chemokinen, sondern fördert unter anderem auch die Angiogenese und ist an der Schmerzentstehung beteiligt (70, 79). Verschiedene Chemokine, darunter CXCL12, CCL13 und CCL18, wurden bezüglich der Pathogenese der RA beschrieben (80-82). CXCL12 fördert die Angiogenese und die Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Synovialis über einen TNF- α -unabhängigen Signalweg (80). Iwamoto et al. fanden heraus, dass das in den Gelenken von RA-Patienten hoch exprimierte CCL13 zum einen in der Rekrutierung inflammatorischer Zellen involviert ist. Andererseits trägt es entscheidend zur synovialen Hyperplasie in der RA bei, indem es die Proliferation von fibroblastenartigen Synoviozyten (*Fibroblast-like synoviocytes*, FLS) steigert (81). Auch CCL18 ist bei RA-Patienten deutlich höher exprimiert als bei OA-Patienten (82).

Eine Reihe von Chemokinen aus der CXC-Gruppe ist maßgeblich an den gefäßbildenden und entzündlichen Prozessen bei der RA beteiligt. ELR-positive Chemokine gelten als angiogen, während ELR-negative Chemokine eher angiostatisch wirken (vgl. 1.2.1). Ausschlaggebend zur synovialen Neovaskularisation ist das Ungleichgewicht zwischen Angiogenese-fördernden und antiangiogenen Mediatoren. In zahlreichen Studien wurden Signalwege mit Beteiligung entzündlicher Mediatoren in der Synovialis von RA-Patienten untersucht (40, 71, 83, 84). So stimulieren TNF- α und IL-1 synoviale Fibroblasten zur Freisetzung von Chemokinen (71). IL-18 wirkt als Mitglied der IL-1-Zytokin-Superfamilie ebenfalls proinflammatorisch und angiogen, indem es unter anderem die Sekretion der angiogenen Faktoren CXCL12 und CCL2 durch synoviale Fibroblasten induziert (85). CXCL12 nimmt in dieser Klassifizierung eine Sonderstellung ein. Es bindet spezifisch an den CXCR4- und den CXCR7-Rezeptor und wird trotz fehlendem ELR-Motiv als ein Schlüsselregulator der Angiogenese betrachtet, da es chemotaktisch auf Endothelzellen wirkt und über die Rezeptorinteraktion die Ausschüttung von VEGF fördert (86, 87). Die Produktion des angiogenen ELR-positiven Chemokins CXCL8 wird unter anderem durch das Zytokin MIF (Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor) stimuliert (88). Das ELRnegative Chemokin CXCL10 wirkt wiederum inflammatorisch, hemmt jedoch die Neovaskularisation. Da es in Anwesenheit von VEGF hochreguliert wird, handelt es sich bei CXCL10 möglicherweise um einen Gegenspieler von VEGF bei der Regulation der Gefäßneubildung (89).

1.3.3 Kardiovaskuläre Komorbidität bei rheumatoider Arthritis

Die inflammatorischen Signalwege, die zur Synovitis und der damit einhergehenden Gelenkdestruktion führen, haben auch relevante systemische Auswirkungen. RA-Patienten haben nach wie vor eine geringere Lebenserwartung als Menschen ohne RA. Das liegt vor allem am kardiovaskulären Risiko, das unabhängig von klassischen atherogenen Risikofaktoren erhöht ist (90). Schlaganfälle und Herzinfarkte sind Metastudien zufolge der Hauptgrund für die erhöhte Mortalität von RA-Patienten (91, 92).

Die Atherosklerose und die RA sind zwei sehr eng verbundene entzündliche Erkrankungen. Die chronische Entzündung bei der RA beschleunigt mutmaßlich das Fortschreiten der Atherosklerose. Verantwortlich dafür könnten die Wirkungen von Zytokinen, T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen oder von oxidativem Stress sein. Pathologische Entzündungsprozesse mit abnormalen Antworten des adaptiven Immunsystems wurden sowohl bei der Atherosklerose als auch bei der RA-Synovitis beschrieben. Zytokine wie IL-6 und TNF-α, die an der Pathogenese der RA beteiligt sind, steigern die Aktivierung von Endothelzellen und destabilisieren dadurch möglicherweise atherosklerotische Plaques der Gefäßwand (93-95). Mehrere Langzeitstudien ergaben, dass chronisch erhöhte IL-6-Spiegel ebenso stark mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind wie traditionelle Risikofaktoren (z. B. Blutdruck und Cholesterinspiegel) (96). Eine weitere pathophysiologische Verbindung der beiden Erkrankungen besteht über das Zytokin MIF (vgl. 1.3.2). MIF ist nicht nur an der Angiogenese bei der RA beteiligt, sondern wird auch in atheromatösen Läsionen exprimiert und mit der Plaqueentstehung in Verbindung gebracht (97).

16

Auch wenn die genauen Zusammenhänge noch nicht abschließend untersucht sind, wird die chronische Entzündung als eine der Hauptverbindungen zwischen der RA und der Atherosklerose betrachtet (98).

1.4 in-situ-Hybridisierung (ISH)

Die *in-situ*-Hybridisierung (ISH) dient der Lokalisierung und der Detektion spezifischer Nukleinsäuresequenzen in Zellen, fixierten Gewebeschnitten oder ganzen Organen. Sie wurde Ende der 1960er-Jahre von Mary Lou Pardue und Joe Gall entwickelt (99). Der Zweck dieser Untersuchungsmethode ist es, das Vorhandensein einer gewissen Gensequenz zu überprüfen und diese spezifische Sequenz bestimmten Zellen oder Chromosomabschnitten zuzuordnen. Dabei bindet der komplementäre Strang einer Nukleotidsonde an eine bestimmte Zielsequenz in der Probe. Das dabei entstandene Hybrid kann im Wesentlichen auf zwei verschiedene Weisen sichtbar gemacht werden: Bei radioaktiv markierten Sonden werden die Hybride per Autoradiographie visualisiert. Bei nichtradioaktiv markierten Sonden werden bei der Synthese an Biotin oder Digoxigenin gekoppelte Nukleotide verwendet. Anhand dieser veränderten Nukleotide können die Hybride dann immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Biotin oder Digoxigenin detektiert werden (100).

Bei ISHs wird das zu untersuchende Gewebe in der Regel vorbehandelt, um die Effizienz der Hybridisierung zu erhöhen und die unspezifische Hintergrundfärbung zu verringern. Die Permeabilisierung mit Proteasen wie etwa Proteinase K wird als einer der wichtigsten Arbeitsschritte betrachtet, um die Zugänglichkeit der Ziel-Nukleinsäuresequenz zu verbessern. Die Konzentration der Protease und die Dauer der Behandlung hängen vom Gewebetyp und von der Dauer der davor stattfindenden Fixierung ab. Grundsätzlich wird eine kurze Nachfixierung in Paraformaldehyd empfohlen. Ein weiterer vorbereitender Schritt ist die Acetylierung, bei der die unspezifische Bindung geladener Sonden verringert wird. Bei der Gewebefixierung ist zu beachten, dass die Integrität der DNA bzw. RNA und die Gewebemorphologie erhalten werden müssen (101).

Diese Methode hat den Vorteil, dass die Zellen während des Nachweises morphologisch intakt bleiben und diese direkt vor Ort (*in situ*) im Gewebe lokalisiert werden können.

1.5 Immunfluoreszenz (IF)

Bei der Immunfluoreszenz (IF) werden Antigene im Gewebe mit Antikörpern nachgewiesen, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind (102).

Zu den am häufigsten verwendeten fluoreszierenden Farbstoffen zählt Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Bei der direkten IF sind die Antikörper primär fluoreszenzmarkiert. Bei der indirekten IF werden nicht markierte Primärantikörper eingesetzt, die nach ihrer Bindung an das Antigen mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die gebundenen Antikörper werden mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops identifiziert, wobei der Farbstoff durch Licht spezifischer Wellenlänge (bei FITC wird blaues Licht verwendet) angeregt wird. Die angeregten Fluorochrome emittieren infolgedessen selbst Licht (bei FITC grünes Licht), das entsprechend gefiltert wird, bevor es ins Okular tritt (103).

1.6 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund, dass nur wenige Standardprotokolle zu ISHs an Synovialisgefrierschnitten existieren und es keine Erkenntnisse zur Rolle von CXCL17 bei der rheumatoiden Arthritis gibt, sind die Ziele der Arbeit:

- 1. die Markierung einer geeigneten Sonde zur *in-situ*-Hybridisierung an Synovialisgewebe
- 2. die Etablierung der in-situ-Hybridisierung an Synovialis gegen CXCL17
- 3. die Etablierung der in-situ-Hybridisierung an Synovialis gegen Actin
- 4. die Doppelfärbung der Synovialisschnitte zur Identifizierung der CXCL17 exprimierenden Zellen

2. Material und Methoden

2.1 Methodisches Vorgehen

Bei der Erarbeitung eines Standardprotokolls für die ISH an Synovialisschnitten wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet und modifiziert:

- 1. Protokoll nach Janes et al. (104)
- 2. Protokoll nach Kuchen et al. (105)

In Tabelle 3 wird das Vorgehen bei der Etablierung einer Methode zur molekularen Lokalisationsdiagnostik der mRNA-Expression an Synovialis-Gefrierschnitten beschrieben. Die Protokolle unterscheiden sich an bedeutenden Stellen des Verfahrens. Zudem wurden verschiedene Sondentypen verglichen. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in den Abschnitten 2.2 bis 2.5 erläutert.

	Janes et al. (104)	Kuchen et al. (105)
Fixierung und Per- meabilisierung der Gewebeschnitte	 initial Vorbehandlung mit Salz- säure (HCl) kein Enzymverdau 	 initial Fixierung mit PFA Permeabilisierung mit Proteinase K
Vorbehandlung und Prähybridisierung	keine Vorbehandlung	Rehydrierung mit Nuklease-freiem A. dest.
<i>in-situ-</i> Hybridisierung	Vergleich zwischen einfach markierten Sonden und 3'-getailten Sonden	
	 Verdünnung der Sonde mit Nuklease-freiem Wasser und Prähybridisierungspuffer Denaturierung der Sonde bei 65 °C 	 Verdünnung der Sonde aus- schließlich mit Prähybridisie- rungspuffer Denaturierung der Sonde bei 80 °C

Tabelle 3: Wichtige Gemeinsamkeiten und Unterschiede der getesteten HybridisierungsprotokolleJanes et al. (104)Kuchen et al. (105)

2.2 Patienten und Materialgewinnung

Zur Etablierung eines *in-situ*-Hybridisierungs-/Immunfluoreszenzprotokolls wurde Synovialis aus Synovektomien (an der Schulter oder am Handgelenk) bzw. Gelenkersatzoperationen des Knies und der Hüfte verwendet. Die Patienten wurden im Rheinischen Rheumazentrum Meerbusch-Lank wegen einer Arthrose (OA) oder rheumatoiden Arthritis (RA) operiert. Insgesamt wurde Material von 14 OA-Patienten (5 Männer, 9 Frauen, mittleres Alter zum OP-Zeitpunkt 62 Jahre \pm 13,7) und sieben RA-Patienten (3 Männer, 4 Frauen, mittleres Alter zum OP-Zeitpunkt 59 Jahre \pm 8,5) für die Experimente genutzt. Die Patienten wurden vor der Operation aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur

Weiterverwendung des Operationsmaterials. Die Gewebeproben wurden noch im OP vollständig in Einbettungsmittel zur Gefrierschnittvorbereitung (Slee Technik GmbH, Mainz) eingebettet. Das eingebettete Gewebe wurde in Isopentan (2-Methylbutan) schockgefroren, das durch flüssigen Stickstoff abgekühlt wurde. Nach wenigen Sekunden wurde die Probe in ein Alutöpfchen überführt und in einem Stickstoffbehälter bei -80 °C aufbewahrt (106). Es besteht ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer 4944) vom 27.02.2015, zuletzt erneuert am 03.01.2019 (Studiennummer 2018-87-KFogU).

Zur Erhaltung der RNA im Gewebe und der Sonden wurde während der gesamten Arbeitsschritte bis zur Hybridisierung der Schnitte unter DNAse- und RNAse-freien Bedingungen gearbeitet. Dazu wurden Glas- und Metallwaren in Aluminiumfolie für vier Stunden lang auf 250 °C erhitzt. Nicht ofenfeste Materialien wie die Hybridisierungskammer sowie die Arbeitsflächen wurden mit einer Oberflächendekontaminationslösung (RNase AWAY®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) behandelt. Während der gesamten Prozedur bis zum Start der Hybridisierung wurden Handschuhe getragen. Alle Arbeitsschritte wurden an einem separaten Nuklease-freien Arbeitsplatz mit separaten RNAse-freien Pipetten und Pipettenspitzen durchgeführt. Für die Nuklease-freien Arbeitsschritte wurden nur RNAseund DNAse-frei deklarierte Lösungen verwendet.

Zur weiteren Untersuchung wurden die Proben an einem Kryostat (Jung CM 3000, Leica Microsystems, Wetzlar) unter DNAse- und RNAse-freien Bedingungen geschnitten. Dazu wurden die *Cryo-Vials* mit den Gewebeproben drei Stunden bei einer Kammertemperatur von -28 °C inkubiert und bei einer Objektkopftemperatur von -25 °C geschnitten. Es wurde eine Schnittdicke von fünf bis acht µm ausgewählt. Die Schnitte wurden auf Adhäsionsob-jektträger (Superfrost Plus®, VWR International GmbH, Langenfeld) aufgezogen und in einer Glasküvette zwischengelagert. Pro Objektträger wurden zwei aufeinanderfolgende Schnitte aufgezogen.

2.3 Fixierung des Gewebes und Permeabilisierung der Zellmembran

Um das Gewebe zu erhalten und die Sondenbindung zu erleichtern, wurden unterschiedliche Fixierungsprotokolle von Janes et al. (2010) (104) und Kuchen et al. (2007) (105) getestet und modifiziert. Die für die Fixierung notwendigen Lösungen wurden unter einer Sicherheitsbank mit Abzugshaube (Vinitex Air Typ TA 1500-900, Vinitex Laboreinrichtungen GmbH + Co. KG, Coswig) angefertigt (Tabelle 4 und Tabelle 5). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipetten (Eppendorf Reference® variabel, Eppendorf AG, Hamburg) und Pipettenspitzen mit Filter (Tip One, PCR clean, Starlab GmbH, Ahrensburg) benutzt. Zur pH-Einstellung wurden nicht blutende pH-Indikatorstäbchen (Merck, Darmstadt) verwendet.

Frisch herzustellende Lösungen:

Reagenz	Firma	Menge
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, MO,	7,5 g
	UŠA	-
A. dest. (Nuklease-frei)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO,	200 ml (auf 60 °C erhitzen)
	USA	
5 M NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland	900 µ1
PBS (10x)	Life Technologies, Carlsbad, CA,	25 ml
	USA	
- Einstellen auf pH 7,0 mit konzentrierter HCl und mit A. dest. auf 250 ml auffüllen.		
- Aufbewahren max. 1 Woche dunkel bei +4 °C.		

Tabelle 4: PFA-Lösung

Tabelle 5:	0,1	M	Triethanolamin-Lösung, pH	8,0
------------	-----	---	---------------------------	-----

Reagenz	Firma	Menge	
Triethanolamin 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, MO,	2,66 ml	
	USA		
A. dest. (Nuklease-frei)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO,	160 ml	
	USA		
Einstellen auf pH 8,0 mit konzentrierter HCl und kurz vor Gebrauch mit 0,2 ml Essigsäureanhydrid verset-			
zen.			

2.3.1 Fixierungsprotokoll nach Janes et al. (2010)

Die in der Küvette gelagerten Schnitte wurden aus dem Kryostat bzw. Tiefkühler entnommen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) equilibriert. Anschließend wurden die Schnitte wie folgt behandelt:

1.	Vorbehandlung	10 min in 0,2 M HCL
2.	Waschen in Puffer	5 min in 1x PBS
3.	Fixieren	15 min in 3 % Paraformaldehyd
4.	Waschen in Puffer	2 x 10 min in 1x PBS
5.	Equilibrierung	10 min in Triethanolamin
6.	Acetylierung	5 min in Triethanolamin und Essigsäureanhydrid
7.	Waschen	10 min in 2x SSC
8.	Dehydrierung	jeweils 2 min in 70-, 80- und 95%igem Ethanol

2.3.2 Fixierungsprotokoll nach Kuchen et al. (2007)

Die in der Küvette gelagerten Schnitte wurden aus dem Kryostat in den Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) überführt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, um ein Abschwimmen der Schnitte zu verhindern und die Schnitte zu dehydrieren. Alle Schnitte, die nicht am selben Tag weiterverarbeitet werden, sind bis zu eine Woche lang bei -80 °C lagerbar.

Anschließend wurden die Schnitte wie folgt behandelt:

1.	Fixierung	15 min in 3 % Paraformaldehyd
2.	Waschen in Puffer	10 min in 1x PBS
3.	Rehydrierung	2 x 5 min in Nuklease-freiem Aqua dest.
4.	Proteinverdauung	15 min in 0,2 M HCL
5.	Waschen in Puffer	2 x 3 min in 1 x PBS (oder länger)
6.	Permeabilisierung	10 min in Proteinase K [3,4 µg/ml]
7.	Enzyminhibierung	10 min in 0,2 % Glycin in PBS bei 4 °C
8.	Acetylierung	20 min in Triethanolamin und Essigsäureanhydrid
9.	Waschen in Puffer	2 x 3 min in 1 x PBS (oder länger)
10.	Nachfixierung	30 min in 3 % Paraformaldehyd (aus Schritt 1)
11.	Waschen in Puffer	2 x 3 min in 1 x PBS (oder länger)
12.	Dehydrierung	jeweils 2 min in 70-, 80- und 95% igem Ethanol

Die Schnitte wurden für 15 Minuten in 3%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. PFA ist ein quervernetzendes Agens, wodurch insbesondere Membranstrukturen bei zufriedenstellender Antigenität fixiert werden. Durch den relativ geringen Fixierungseffekt soll das Eindringen größerer Transkripte ermöglicht werden. Die Proteinverdauung mit HCl dient zur Verminderung von unspezifischem Hintergrund. Die Proteinase K ist eine unspezifische Endopeptidase, die Peptidbindungen angreift und Proteine entfernt, die die Zielsequenz umgeben. Dadurch kann die Sonde besser binden. Es wurden Proteinase-K-Konzentrationen von 1 bis 3,4 µg/ml getestet.

Die Reaktion wurde mittels 10-minütiger Inkubation in einer vorgekühlten 0,2%igen Glycin-PBS-Lösung gestoppt. Die Objektträger wurden anschließend 20 Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur mit 200 µl Acetanhydrid in 80 ml 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 acetyliert. Bei der Acetylierung werden positiv geladene Moleküle im Gewebe und auf dem Objektträger neutralisiert, um eine unspezifische Bindung der Sonde zu verhindern. Die Schnitte wurden 30 Minuten in PFA nachfixiert und nach einem kurzen Waschgang mit einer Alkoholreihe dehydriert. Nach der Fixierung sind die Schnitte in einer verschlossenen und mit Verschlussfolie (Parafilm® M, Bemis *flexible packaging*, Meckenheim) versiegelten Küvette bis zu eine Woche lang bei +4 °C lagerbar.

2.4 Auswahl der Sonden

Während der Etablierungsphase wurden einfach markierte Oligonukleotid-Sonden (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin) sowie Oligonukleotide mit 3'-*Tail* verwendet. Hierbei wurden kleine, exonüberspannende *Sense*- und *Antisense*-Sonden (Abb. 3-Abb. 4) mit optimalen Hybridisierungseigenschaften gewählt (verwendete Software: Primer3 (107)). Die Sonden wurden anschließend mittels des BLAST-Algorithmus (*basic local alignment search tool*) des NCBI auf ihre Sequenzspezifität überprüft (108).

1	GCTCTCTGCT	CCTCCTGTTC	GACAGTCAGC	CGCATCTTCT	TTTGCGTCGC	CAGCCGAGCC
61	ACATCGCTCA	GACACCATGG	GGAAGGTGAA	GGTCGGAGTC	AACGGATTTG	GTCGTATTGG
121	GCGCCTGGTC	ACCAGGGCTG	CTTTTAACTC	TGGTAAAGTG	GATATTGTTG	CCATCAATGA
181	CCCCTTCATT	GACCTCAACT	ACATGGTTTA	CATGTTCCAA	TATGATTCCA	CCCATGGCAA
241	ATTCCATGGC	ACCGTCAAGG	CTGAGAACGG	GAAGCTTGTC	ATCAATGGAA	ATCCCATCAC
301	CATCTTCCAG	GAGCGAGATC	CCTCCAAAAT	CAAGTGGGGC	GATGCTGGCG	CTGAGTACGT
361	CGTGGAGTCC	ACTGGCGTCT	TCACCACCAT	GGAGAAGGCT	GGGGCTCATT	TGCAGGGGGG
421	AGCCAAAAGG	GTCATCATCT	CTGCCCCCTC	TGCTGATGCC	CCCATGTTCG	TCATGGGTGT
481	GAACCATGAG	AAGTATGACA	ACAGCCTCAA	GATCATCAG C	AATGCCTCCT	GCACCACCAA
541	CTGCTTAGCA	CCCCTGGCCA	AGGTCATCCA	TGACAACTTT	GGTATCGTGG	AAGGA <u>CTCAT</u>
601	GACCACAGTC	CATGC CATCA	CTGCCACCCA	GAAGACTGTG	GATGGCCCCT	CCGGGAAACT
661	GTGGCGTGAT	GGCCGCGGGG	CTCTCCAGAA	CATCATCCCT	GCCTCTACTG	GCGCTGCCAA
721	GGCTGTGGGC	AAGGTCATCC	CTGAGCTGAA	CGGGAAGCTC	ACTGGCATGG	CCTTCCGTGT
781	CCCCACTGCC	AACGTGTCAG	TGGTGGACCT	GACCTGCCGT	CTAGAAAAAC	CTGCCAAATA
841	TGATGACATC	AAGAAGGTGG	TGAAGCAGGC	GTCGGAGGGC	CCCCTCAAGG	GCATCCTGGG
901	CTACACTGAG	CACCAGGTGG	TCTCCTCTGA	CTTCAACAGC	GACACCCACT	CCTCCACCTT
961	TGACGCTGGG	GCTGGCATTG	CCCTCAACGA	CCACTTTGTC	AAGCTCATTT	CCTG GTATGA
1021	CAACGAATTT	GGCTACAGCA	ACAGGGTGGT	GGACCTCATG	GCCCACATGG	CCTCCAAGGA
1081	GTAAGACCCC	TGGACCACCA	GCCCCAGCAA	GAGCACAAGA	GGAAGAGAGA	GACCCTCACT
1141	GCTGGGGAGT	CCCTGCCACA	CTCAGTCCCC	CACCACACTG	AATCTCCCCT	CCTCACAGTT
1201	GCCATGTAGA	CCCCTTGAAG	AGGGGAGGGG	CCTAGGGAGC	CGCACCTTGT	CATGTACCAT
1261	CAATAAAGTA	CCCTGTGCTC	AACCA			

Abb. 3: Basensequenz der GAPDH-Sense-Sonde $(5' \rightarrow 3')$

Homo sapiens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), *transcript variant* 1, mRNA. NCBI Reference Sequence: NM_002046.7.

Orange hinterlegter Abschnitt = Exon 1-6, grün hinterlegter Abschnitt = Exon 7, blau hinterlegter Abschnitt = Exon 8, rot hinterlegter Abschnitt = Exon 9. Die Sondensequenz überspannt die Exons 7 und 8. Sie ist in weißer Schriftfarbe, unterstrichen und fett markiert dargestellt. Quelle: (109)

ATAGACCACC	AGGCTGAGTA	TCCTGACCTG	AGTCATCCCC	AGGGATCAGG	AGCCTCCAGC
AGGGAACCTT	CCATTATATT	CTTCAAGCAA	CTTACAGCTG	CACCGACAGT	TGCGATGAAA
GTTCTAATCT	CTTCCCTCCT	CCTGTTGCTG	CCACTAATGC	TGATGTCCAT	GGTCTCTAGC
AGCCTGAATC	CAG GGGTCGC	CAGAGGCCAC	AGGGACCGAG	GCCAGGCTTC	TAGGAGATGG
CTCCAGGAAG	GCGGCCAAGA	AT <u>GTGAGTGC</u>	AAAGATTGGT	TCCTGAGAGC	CCCGAGAAGA
AAATTCATGA	CAGTGTCTGG	GCTGCCAAAG	AAGCAGTGCC	CCTGTGATCA	TTTCAAGGGC
AATGTGAAGA	AAACAA <mark>GACA</mark>	CCAAAGGCAC	CACAGAAAGC	CAAACAAGCA	TTCCAGAGCC
TGCCAGCAAT	TTCTCAAACA	ATGTCAGCTA	AGAAGCTTTG	CTCTGCCTTT	GTAGGAGCTC
TGAGCGCCCA	CTCTTCCAAT	TAAACATTCT	CAGCCAAGAA	GACAGTGAGC	ACACCTACCA
GACACTCTTC	TTCTCCCACC	TCACTCTCCC	ACTGTACCCA	CCCCTAAATC	ATTCCAGTGC
TCTCAAAAAG	CATGTTTTTC	AAGATCATTT	TGTTTGTTGC	TCTCTCTAGT	GTCTTCTTCT
CTCGTCAGTC	TTAGCCTGTG	CCCTCCCCTT	ACCCAGGCTT	AGGCTTAATT	ACCTGAAAGA
TTCCAGGAAA	CTGTAGCTTC	CTAGCTAGTG	TCATTTAACC	TTAAATGCAA	TCAGGAAAGT
AGCAAACAGA	AGTCAATAAA	TATTTTTAAA	TGTCACAGAT	CAAAATTGTT	TCCTTCAAAT
GGGGTCTGCC	AATTCACAAC	CAGATGACCC	ATTTTACCCT	ATTCACTGCA	GACTGAATCC
AGATTCTACA	CATACTTATC	CCCACCAAGA	CCCTCACTCT	GTCTCCATTG	GCCTACTTGT
TCATCTTTCA	CTCATTCGAC	AAATCTTTCT	GAGGTAAGAG	CGAGGTGGGA	CAAAAAAAAA
AAAGCATACC	AATGAACCAG	ACACGGTCTT	ATTAAAGATA	ATATAGGTTT	AAAAAAAAAA
	ATAGACCACC AGGGAACCTT GTTCTAATCT AGCCTGAATC CTCCAGGAAG AAATTCATGA AATGTGAAGA TGCCAGCAAT TGAGCGCCCA GACACTCTTC TCTCAAAAAG CTCGTCAGTC TTCCAGGAAA AGCAAACAGA GGGGTCTGCC AGATTCTACA AAAGCATACC	ATAGACCACCAGGCTGAGTAAGGGAACCTTCCATTATATTGTTCTAATCTCTTCCCTCCTAGCCTGAATCCAGGGGTCGCCTCCAGGAAGGCGGCCAAGAAAATTCATGACAGTGTCTGGATGTGAAGAAAACAAGACATGCCAGCAATTTCTCAAACATGACACTCTTCTTCTCCAACAGACACTCTTCTTCTCCCACCTCTCAAAAAGCATGTTTTTCCTCGTCAGTCTTAGCCTGTGTTCCAGGAAACTGTAGCTTCAGCAAACAGAAGTCAATAAAGGGGTCTGCCAATCACAACAAGGATCTTCACACATACTATCTCATCTACACATACTATCTCATCTTCACTCATTCGACAAAGCATACCAATGAACCAG	ATAGACCACCAGGCTGAGTATCCTGACCTGAGGGAACCTTCCATTATATTCTTCAAGCAAGTTCTAATCTCTTCCCTCCTCCTGTTGCTGAGCCTGAATCCAGGGGTCGCCAGAGGCCACCTCCAGGAAGGCGGCCAAGAAT GTGAGTGCAAATTCATGACAGTGTCTGGGCTGCCAAAGAATGTGAAGAAACAAGACACCAAAGGCACTGCCAGCAATTTCTCAAACAATGTCAGCTATGACGCCCACTCTTCCAATTAAACATTCTGACACTCTTCTTCTCCCACCTCACTCTCCCTCTCAAAAAGCATGTTTTTCAAGATCATTTCTCGTCAGTCTTAGCCTGTGCCCTCCCCTTTTCCAGGAAACTGTAGCTTCCTAGCTAGTGAGCAAACAGAAGTCAATAAATATTTTAAAGGGGTCTGCCAATTCACAACCAGATGACCCAGATCTACACATACTTATCCCCACCAAGAAGCATACACAATCTTTCTAAACGATACCAAAGCATACCAATGAACCAGAACGGTCTTC	ATAGACCACCAGGCTGAGTATCCTGACCTGAGTCATCCCCAGGGAACCTTCCATTATATTCTTCAAGCAACTTACAGCTGGTTCTAATCTCTTCCCTCCTCCTGTTGCTGCCACTAATGCAGCCTGAATCCAGGGGTCGCCAGAGGCCACAGGGACCGAGAGCTGAGAAGGCGGCCAAGAATGTGAGTGCAAAGATTGGTAAATTCATGACAGTGTCTGGGCTGCCAAAGAAGCAGTGCCAAATTCATGACAGTGTCTGGGCTGCCAAAGAAGCAGTGCCAAATGGAAGAAAACAAGACACCAAAGGCACCACGGAAAGCGGCCAGCAATTTCTCAAACAATGTCAGCTAAGAAGCTTTGTGAGCGCCCACTCTTCCAATTAAACATTCTCAGCCAAGAAGACACTCTTCTTCTCCCACCTCACTCTCCCACTGTACCCATCTCAAAAAGCATGTTTTCAAGATCATTTTGTTGTGCCCTCGTCAGTCTTAGCCTGTGCCCTCCCCTTACCCAGGCTTTTCCAAGAAACTGTAGCTTCCTAGCTAGTGTCATTTAACCAGCAAACAGAAGTCAATAAATATTTTAAATGTCACAGATGGGGTCTGCCAATCAACACCAGATGACCCATTTAACCTAGATCTTACACATACTAACCAGATGACCCATTTACCCTAGATCTTACACATACTAACCAGATGACCCATTTAACCTCTAGATCTTACACATACTAACCAGATGACCCATTTACCCTAGATCTTCACACATACTACACACCAGATGACCCATTTAACCTTCAGATCTTCACACATACTACACACCAGATACCAGACCCTCACTCTAGATCTTCACACATACTACACACCAGATACCAGACCCTCACTCTAAAGCATACCAATGAACCAGAACCGGTCTTATTAAAGATA	AIAGACCACCAGGCTGAGTATCCTGACCTGAGTCATCCCCAGGGATCAGGAGGGAACCTTCCATTATATTCTTCAAGCAACTTACAGCTGCACCGACAGTGTTCTAATCTCTTCCCTCCTCCTGTTGCTGCCACTAATGCTGATGTCCATAGCCTGAATCCAGGGGTCGCCAGAGGCCACAGGGACCGAGGCCAGGCTTCCTCCAGGAAGGCGGCCAAGAAT GTGAGTGCAAGGATTGGTTCCTGAGAGCAAATTCATGACAGTGTCTGGGCTGCCAAAGAAGCAGTGCCCCTGTGAGACCAATGTGAAGAAAACAAGACACCAAAGGCACCACAGAAAGCCAAACAAGCAAATGTGAAGAAAACAAGACACCAAAGGCACCACAGAAAAGCCAAACAAGCATGCCAGCAATTTCTCAAACAATGTCAGCTAAGAAGCTTTGCTCTGCCTTTTGAGCGCCACTCTTCCAATTAAACATTCCAGCCAAAGAAGACAGTGAGCCGACACTCTTCTTCTCCAACCTCACTCTCCCACTGTACCCACCCTTAAATCTCCAAAAAGCATGTTTTCAAGATCATTTTGTTGTGCCTCTCTCTAGTCTCGTCAGTCTTAGCCTGTGCCCTCCCCTTACCCAGGCTTAGGCTTAATTTTCCAGGAAACTGTAGCTTCCTAGCTAGTGTCATTTAACCTTAAATGCAAAGCAAACAGAAGTCAATAAATATTTTAAATGTCACAGATCAAAATGTTTGGGGTCTGCCAATCCAACACAGATGACCCATTTACCCTATAATGCAAAGCAAACAGACATACTTACCCACCAAGACCCTCACTCTGTCACAGATGGGGTCTGCCAATCATAACCAAGATACCCAGAGGAGACCATTTACCCTAGATCTACACATACTTACCCAACAGGACCATTTACCCTATTCACACCACAGCAATACACATACTTACCCAACAGGACCATTTTACC

Abb. 4: Basensequenz der CXCL17-Sense-Sonde $(5' \rightarrow 3')$ Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 17 (CXCL17), transcript variant 1, mRNA. NCBI Reference Sequence: NM_198477.3. Grün hinterlegter Abschnitt = Exon 1, blau hinterlegter Abschnitt = Exon 2, orange hinterlegter Abschnitt =

Exon 3, rot hinterlegter Abschnitt = Exon 4. Die Sondensequenz überspannt die Exons 2 und 3. Sie ist in weißer Schriftfarbe, unterstrichen und fett markiert dargestellt. Quelle: (110)

2.4.1 Einfach markierte Oligonukleotid-Sonden

Bei der Wahl der Sonden lag ein Hauptaugenmerk darauf, dass die Zahl der Arbeitsschritte und der potenziellen Fehlerquellen bei der Protokollentwicklung der *in-situ*-Hybridisierung mit Fluoreszenzgegenfärbung möglichst gering gehalten wird. Daher wurden zunächst gebrauchsfertige, einfach markierte Oligonukleotid-Sonden (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin) verwendet. Die Oligonukleotide waren am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert (Tabelle 6).

Tubene 0. Ongonukieotiu-Bonuen				
Oligonukleotid	Sequenz			
GAPDH – Antisense	5'- DIG-GCATGGACTGTGGTCATGAG-3'			
GAPDH – Sense	5'- DIG-CTCATGACCACAGTCCATGC-3'			
CXCL17 – Antisense	5'- DIG-TCAGGAACCAATCTTTGCACTCAC-3'			
CXCL17 – Sense	5'- DIG-GTGAGTGCAAAGATTGGTTCCTGA-3'			

Tabelle 6: Oligonukleotid-Sonden

Die Sonden wurden entsprechend der Datenblätter für eine Arbeitskonzentration von

 $0,1 \mu g/\mu l = 100 ng/\mu l$ in Nuklease-freiem Wasser aufgelöst.

2.4.2 Herstellung markierter Oligonukleotid-Sonden per 3'-tailing

Das 3'-tailing erfolgte gemäß der Anleitung des DIG Oligonucleotide Tailing Kit (2nd generation, Roche Diagnostics, Mannheim).

Beim *3'-tailing* wird mithilfe des Enzyms Terminale Transferase ein Gemisch aus dem an Digoxigenin (DIG) gekoppelten Nukleotid DIG-dUTP und dem nichtmarkierten Nukleotid dATP an das 3'-Ende eines Oligonukleotids angefügt (s. Abb. 5) (111).

Die Reaktion erfolgt unabhängig von der Größe des zu markierenden Oligonukleotids. Durch den Einbau des unmarkierten dATP wird eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit erreicht (112).



Abb. 5: Nicht-radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit DIG-dUTP mit Terminaler Transferase

Bei der Terminalen-Transferase-Reaktion wird ein 3'-*Tail* mit einer Länge von durchschnittlich 50 Nukleotiden generiert, der durchschnittlich fünf markierte dUTP-Moleküle enthält.

Für die *tailing*-Reaktion wurden Oligonukleotide gegen GAPDH (vgl. Abb. 3), CXCL17 (vgl. Abb. 4) und Actin (Abb. 6) ohne Markierung (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin) sowie ein mitgeliefertes unmarkiertes Oligonukleotid aus dem *Tailing Kit* verwendet.

1	CCTTTGGCTT	GGCTTGTCAG	GGCTTGTCCA	GGAGTTCCGC	TCCTCTCTCC	AACCGGGGGTC
61	CCCCTCCAGC	GACCCTAAAG	CTTCCCAGAC	TTCCGCTTCA	ATTCCTGTCC	GCACCCCACG
121	CCCACCTCAA	CGTGGAGCGC	AGTGGTCTCC	GAGGAGCGCC	GGAGCTGCCC	CGCCTGCCCA
181	GCGGGGGTCAG	CACTTCGCAT	CAAGGCCCAA	GAAAAGCAAG	TCCTCCAGCG	TTCTGAGCAC
241	CCGGGGCCTGA	GGGAAGGTCC	TAACAGCCCC	CGGGAGCCAG	TCTCCAACGC	CTCCCGCAGC
301	AGCCCGCCGC	TCCCAGGTGC	CCGCGTGCGC	CGCTGCCGCC	GCAATCCCGC	ACGCGTCCCG
361	CGCCCGCCCC	ACTTTGCCTA	TCCCCGGGAC	TAAGACGGGA	ATCCTGTGAA	GCAGCTCCAG
421	CTATGTG TGA	AGAAGAGGAC	AGCACTGCCT	TGGTGTGTGA	CAATGGCTCT	GGGCTCTGTA
481	AGGCCGGCTT	TGCTGGGGAC	GATGCTCCCA	GGGCTGTTTT	CCCATCCATT	GTGGGACGTC
541	CCAGACATCA	GGGGGTGATG	GTGGGAATGG	GACAAAAAGA	CAGCTACGTG	GGTGACGAAG
601	CACAGAGCAA	AAGAGGAATC	CTGACCCTGA	AGTACCCGAT	AGAACATGGC	ATCATCACCA
661	ACTGGGACGA	CATGGAAAAG	ATCTGGCACC	ACTCTTTCTA	CAATGAGCTT	CGTGTTGCCC
721	CTGAAGAGCA	TCCCACCCTG	CTCACGGAGG	CACCCCTGAA	CCCCAAGGCC	AACCGGGAGA
781	AAATGACTCA	AATTATGTTT	GAGACTTTCA	ATGTCCCAGC	CATGTATGTG	GCTATCCAGG
841	CGGTGCTGTC	TCTCTATGCC	TCTGGACGCA	CAACTGGCAT	CGTGCTGGAC	TCTGGAGATG
901	GTGTCACCCA	CAATGTCCCC	ATCTATGAGG	GCTATGCCTT	GCCCCATGCC	ATCATGCGTC
961	TGGATCTGGC	TGGCCGAGAT	CTCACTGACT	ACCTCATGAA	GATCCTGACT	GAGCGTGGCT
1021	ATTCCTTCGT	TACTACTG CT	GAGC GTGAGA	TTGTCCGGGA	CATCAAGGAG	AAACTGTGTT
1081	ATGTAGCTCT	GGACTTTGAA	AATGAGATGG	CCACTGCCGC	ATCCTCATCC	TCCCTTGAGA
1141	AGAGTTACGA	GTTGCCTGAT	GGGCAAGTGA	TCACCATCGG	AAATGAACGT	TTCCGCTGCC
1201	CAGAGACCCT	GTTCCAGCCA	TCCTTCATCG	GGATGGAGTC	TGCTGGCATC	CATGAAACCA
1261	CCTACAACAG	CATCATGAAG	TGTGATATTG	ACATCAGGAA	GGACCTCTAT	GCTAACAATG
1321	TCCTATCAGG	GGGCACCACT	ATGTACCCTG	GCATTGCCGA	CCGAATGCAG	AAGGAGATCA
1381	CGGCCCTAGC	ACCCAGCACC	ATGAAGATCA	AGATCATTGC	CCCTCCGGAG	CGCAAATACT
1441	CTGTCTGGAT	CGGTGGCTCC	ATCCTGGCCT	CTCTGTCCAC	CTTCCAGCAG	ATGTGGATCA
1501	GCAAACAGGA	ATACGATGAA	GCCGGGCCTT	CCATTGTCCA	CCGCAAATGC	TTCTAAAACA
1561	CTTTCCTGCT	CCTCTCTGTC	TCTAGCACAC	AACTGTGAAT	GTCCTGTGGA	ATTATGCCTT
1621	CAGTTCTTTT	CCAAATCATT	CCTAGCCAAA	GCTCTGACTC	GTTACCTATG	TGTTTTTTAA
1681	TAAATCTGAA	ATAGGCTACT	GGTAA			

Abb. 6: Basensequenz der ACTA2-Sense-Sonde $(5' \rightarrow 3')$

Homo sapiens actin alpha 2, smooth muscle (ACTA2), transcript variant 1, mRNA. NCBI Reference Sequence: NM_001141945.3.

Orange hinterlegter Abschnitt = Exon 1-5, grün hinterlegter Abschnitt = Exon 6, blau hinterlegter Abschnitt = Exon 7, rot hinterlegter Abschnitt = Exon 8-9. Die Sondensequenz überspannt die Exons 6 und 7. Sie ist in weißer Schriftfarbe, unterstrichen und fett markiert dargestellt. Quelle: (113)

2.4.2.1 Auflösung der Sonden

Die zu markierenden Oligonukleotide (Tabelle 7) sowie das unmarkierte Kontroll-

Oligonukleotid wurden entsprechend der Angaben in den jeweiligen Datenblättern für eine

Endkonzentration von 100 pmol/µl in Nuklease-freiem A. dest. aufgelöst.

Two the strate and the suggestion of the strate str		
Oligonukleotid	Sequenz	
ACTA2 – Antisense	5'-GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGAAT-3'	
ACTA2 – Sense	5'-ATTCCTTCGTTACTACTGCTGAGC-3'	
CXCL17 – Antisense	5'- TCAGGAACCAATCTTTGCACTCAC-3'	
CXCL17 – Sense	5'- GTGAGTGCAAAGATTGGTTCCTGA-3'	
GAPDH – Antisense	5'- GCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	
GAPDH – Sense	5'- CTCATGACCACAGTCCATGC-3'	

Tabelle 7: Sequenzen der Oligonukleotide
2.4.2.2 Herstellen der Reaktionslösung

Zunächst wurde eine Stammlösung hergestellt. Pro zu bearbeitender Probe wurden folgende Komponenten vermischt (Tabelle 8):

Tabelle 8: Stammlosung für die <i>talling</i> -Reaktion	
Reagenz	Menge pro Probe
Reaktionspuffer	4 µl
CoCl ₂ -Lösung	4 µl
DIG-dUTP-Lösung	1 µl
dATP-Lösung	1 µl
400 U Terminale Transferase	1 µl
Gesamt	11 µl

... e.. 1. / .7.

Alle Reagenzien von der Firma Roche Diagnostics, Mannheim

Die entstandene Reaktionslösung wurde durch wiederholte Aspiration mit der Pipette vermischt, über Kopf gemischt und abschließend in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert. Das Gefäß mit der Reaktionslösung wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

2.4.2.3 **Terminale-Transferase-Reaktion**

Von den aufgelösten Sonden wurde je 1 µl in ein 0,2 ml-PCR-Soft-Tube (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) pipettiert und mit 8 µl Nuklease-freiem A. dest. verdünnt. 4 µl des unmarkierten Kontroll-Oligonukleotids wurden mit 5 µl Nuklease-freiem A. dest. versetzt. In jedes Mikroreaktionsgefäß wurden nun 11 µl der Reaktionslösung pipettiert. Die Lösungen wurden durch Aspiration mit der Pipette gemischt, über Kopf gemischt und abzentrifugiert. Danach wurden die PCR-Tubes in ein Wasserbad (GFL Schüttelwasserbad 1092, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) überführt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, um das 3'-tailing durchzuführen. Anschließend wurden die Gefäße auf Eis gelegt und die darin ablaufende Reaktion durch Zugabe von jeweils 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Das Endprodukt wurde durch Aspiration mit der Pipette gemischt, über Kopf gemischt und in der vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Die fertig markierten Sonden wurden bis zur Nutzung bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Spot-Test zur Überprüfung der Labeling-Effizienz

Die *Labeling*-Effizienz wurde gemäß der Anleitung aus dem *DIG Application Manual for Filter Hybridization* (114) mit einem *Spot-Test* geprüft. Dabei handelt es sich um eine direkte Detektionsmethode, bei der die Verdünnungsreihen der markierten Oligonukleotide mit der des mitgelieferten fertig markierten Standard-Oligonukleotids aus dem *Tailing Kit* verglichen werden. Dazu waren folgende Arbeitsschritte erforderlich:

2.4.3.1 Vorbereitung der Serienverdünnungen

Die markierten Oligonukleotide wurden mit dem mitgelieferten Verdünnungspuffer auf eine Ausgangskonzentration von 2,5 pmol/µl verdünnt. Das fertig markierte Standard-Oligonukleotid lag bereits in der erforderlichen Ausgangskonzentration vor. Die Oligonukleotide wurden nach dem folgenden Schema verdünnt (Tabelle 9):

Taben	Tabene 9: verdunnungsschema für markierte Ongonukleotide								
Tube	Oligo [µl]	Aus Tube	Verdünnungspuffer [µl]	Verdünnung	Endkonzentration [fmol/µl]				
1	1	2,5 pmol/µ1	49	1:50	50				
2	5	1	5	1:2	25				
3	5	2	5	1:2	12,5				
4	5	3	5	1:2	6,25				
5	5	4	5	1:2	3,125				
6	5	5	5	1:2	1,56				
7	5	6	5	1:2	0,78				
8			5		0				

Tabelle 9: Verdünnungsschema für markierte Oligonukleotide

2.4.3.2 Auftragen und Detektion der Spots

Von den verschiedenen Verdünnungen wurde je 1 µl auf einen schmalen Streifen Nylonmembran (Nylonmembran, positiv geladen, Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Reihe aufgetragen. Dabei wurde das folgende Schema verwendet (Tabelle 10):

Tabelle 10: Pipettierschema f									
	Tube	2	3	4	5	6	7	8	
Standard-Oligonukleotid aus	K (V7)								
Gefäß 7 des Tailing Kits									
Markiertes Kontroll-	K (V6)								
Oligonukleotid									
ACTA2-AS:	A-AS								
ACTA2-S:	A-S								
CXCL17-AS:	C-AS								
CXCL17-S:	C-S								

Zur technischen Negativkontrolle wurde jeweils am Ende der Verdünnungsreihe 1 µl reiner Verdünnungspuffer aufgetragen, um ein unspezifisches Signal durch Bestandteile des Puffers auszuschließen. Zum Fixieren der *Spots* wurde die Membran für 30 Minuten bei 120 °C inkubiert.

Die Detektion der Spots erfolgte mit dem DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics, Mannheim), bestehend aus einem Waschpufferkonzentrat, Maleinsäurepuffer (10-fach konzentriert), Blockierungslösung (10-fach konzentriert) und Detektionspuffer (10-fach konzentriert). Die Puffer wurden nach den Angaben der Anleitung verdünnt und aufbereitet. Die erhitzte Membran wurde in einen Plastikbehälter mit 20 ml Waschpuffer gelegt und für zwei Minuten unter Schütteln auf einer Schüttelplatte (Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran für 30 Minuten in der Blockierungslösung inkubiert. Währenddessen wurde der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper gegen DIG (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche Diagnostics, Mannheim) in der 1-fach konzentrierten Blockierungslösung im Verhältnis 1:5.000 verdünnt. Die alkalische Phosphatase setzt ein NBT/BCIP-Substratgemisch (Nitrotetrazoliumblauchlorid/Bromchlorindolylsulphat) zu einem unlöslichen blauen Präzipitat um, das lichtmikroskopisch sichtbar ist (115). Die Membran wurde für 30 Minuten in der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 15 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine 2- bis 5-minütige Equilibrierung im Detektionspuffer, während der die Detektionslösung fertig gestellt wurde. Dazu wurden 800 µl NBT/BCIP-stocksolution (Roche Diagnostics, Mannheim) in ein 50 ml-Polypropylenröhrchen (Tube) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert, welches 39,2 ml Blockierungslösung enthielt. Nach dem Equilibrierungsschritt wurde der Detektionspuffer abgeschüttet. Die Farbentwicklung in der Detektionslösung erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Dabei wurde der Plastikbehälter mit der darin enthaltenen Membran nicht bewegt. Sobald die Spots in ausreichender Intensität zu sehen waren, wurde die Detektionslösung in einen Abfallbehälter abgeschüttet und die Membran zweimal für fünf Minuten in A. dest. gewaschen. Die feuchte Membran wurde schließlich eingeschweißt und eingescannt.

2.4.3.3 Auswertung des Spot-Tests

Nach der abgelaufenen Farbentwicklung wurde die Farbintensität der Spots der Kontrollprobe mit der des Standard-Oligonukleotids und der der experimentellen Sonden verglichen. Wenn bei der schwächsten Verdünnung (0,78 fmol/µl) ein blauer *Spot* zu erkennen ist, liegt die Sonde in der erwarteten Konzentration vor. Bei einem Einsatz von 100 pmol Sonde auf 22 µl Reaktionslösung entspricht das einer Sondenkonzentration von 4,5 pmol/µl. Diese Angabe ist als Ausgangskonzentration für weitere Verdünnungen zu verwenden.

2.5 Entwicklung einer *in-situ*-Hybridisierung mit nichtradioaktiv markierten Sonden

Das Protokoll für die *in-situ*-Hybridisierung wurde anhand verschiedener, teils modifizierter Methoden von Janes et al. (2010) (104) und Kuchen et al. (2007) (105) entwickelt. Im Rahmen dieser Experimente wurden folgende Parameter getestet:

- die Proteinase-K-Konzentration bei der Permeabilisierung der Zellen
- die Art der Sonde (einfach markierte Sonden im Vergleich zu 3'-getailten Sonden)
- die Durchführung einer Prähybridisierung
- die Sondenkonzentration
- die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers.

Sämtliche Schritte der *in-situ*-Hybridisierung erfolgten in Glasküvetten bei Raumtemperatur, sofern keine andere Angabe erfolgt.

2.5.1 Vorbehandlung der Schnitte

Die Küvette mit den fixierten Schnitten wurde zunächst zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Protokoll von Janes et al. wurde nach der Dehydrierung im Rahmen der Fixierung des Gewebes keine Vorbehandlung durchgeführt. Im Protokoll nach Kuchen et al. folgte darauf die Rehydrierung mit Nuklease-freiem A. dest. Die Schnitte wurden anschließend für zwei Minuten in 2x SSC gewaschen und wurden dort bis zur Prähybridisierung belassen.

2.5.2 Prähybridisierung

Zur Vorbeugung eines unspezifischen Hintergrunds wurde eine Prähybridisierung durchgeführt. Zum Vergleich wurde ein Durchlauf ohne Prähybridisierungsschritt durchgeführt. Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden in separaten Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verschiedene Prähybridisierungspuffer mit allen Bestandteilen des Hybridisierungsmix mit Ausnahme der Sonde vorbereitet. Die Puffer sind in Tabelle 11 zusammengefasst charakterisiert:

Hybridisierungspuffer	Reagenz	Firma	Menge
111			000 1
HI	Dextransulfat 50 % Losung	EMD Millipore, Temecula, CA, USA	800 µl
	Hefe t-RNA (20 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, USA	200 µl
	20X SSC	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	400 µl
Gesamtvolumen			1,4 ml
H2	Formamid (deionisiert)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	2,5 ml
	Denhardt's Lösung (50x- konzentriert)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,1 ml
	Dextransulfat 50 % Lösung	EMD Millipore, Temecula, CA, USA	2,0 ml
	Heringsspermien-DNA (10 mg/ml)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,25 ml
	Hefe t-RNA (5 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, USA	0,25 ml
Gesamtvolumen			5,1 ml
Н3	Formamid (deionisiert)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	2,5 ml
	Denhardt's Lösung (50x- konzentriert)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,1 ml
	Dextransulfat 50 % Lösung	EMD Millipore, Temecula, CA, USA	2,0 ml
	Heringsspermien-DNA (10 mg/ml)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,25 ml
	Hefe t-RNA (5 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, USA	0,25 ml
	Poly-A-Lösung	Roche Diagnostics, Mannheim	50 µl
Gesamtvolumen		<u> </u>	5,15 ml
Puffer H1 nach Janes et al	(104)		

Tabelle 11 Auflistung der in der Entwicklungsphase der *in-situ*-Hybridisierung getesteten Hybridisierungspuffer und deren Zusammensetzung.

Puffer H2 nach Kuchen et al. (105) Puffer H3 modifiziert nach Kuchen et al. (105)

Die Heringsspermien-DNA wurde vor Gebrauch aufgetaut, für zehn Minuten bei 65 °C denaturiert und danach für mindestens fünf Minuten auf Eis gelegt. Die Hefe-t-RNA (25 mg) lag in Pulverform vor und wurde in 1,25 ml Nuklease-freiem Wasser aufgelöst, um die für Puffer H1 nötige Konzentration von 20 mg/ml zu erhalten. Der Rest der Stammlösung wurde anschließend weiter auf 5 mg/ml verdünnt und aliquotiert. In systematischen Optimierungsschritten wurde in einem modifizierten Protokoll nach Kuchen et al. der Zusatz Polyadenylsäure (poly-A) getestet (Prähybridisierungspuffer H3). Dabei handelt es sich um ein ausschließlich aus Adenylsäure aufgebautes Homopolymer. Vor der Verwendung wurde der Prähybridisierungspuffer für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, um ihn besser pipettieren zu können.

Im Protokoll von Janes et al. wurde kein Prähybridisierungsschritt aufgeführt. Dort erfolgte die Hybridisierung direkt nach der Fixierung. Bei Kuchen et al. wurden pro Objektträger jeweils 100 µl Prähybridisierungspuffer aufgetragen und die Schnitte eine Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer (Eigenanfertigung) inkubiert.

Währenddessen wurden die Sonden verdünnt (siehe Abschnitt 2.5.3). Der Rest des Prähybridisierungspuffers wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Hybridisierung der Gewebe-mRNA

Während der Prähybridisierung wurde der Hybridisierungsmix fertiggestellt. Dazu wurden die Sonden mit unterschiedlichen Prähybridisierungspuffern (siehe Tabelle 11 in Abschnitt 2.5.2) verdünnt und aufgetragen. Anschließend wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und bei 42 °C über Nacht in einem Brutschrank (*Function Line* Typ BB 16 CU, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) inkubiert.

2.5.3.1 Einfach markierte Oligonukleotid-Sonden

Die einfach markierten Sonden wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Ausgangskonzentration von 100 ng/µl aufgelöst und anschließend wiederum mit Nuklease-freiem Wasser im Faktor 1:100 bzw. 1:40 vorverdünnt, um eine Sondenkonzentration von 1 ng/µl bzw. 2,5 ng/µl zu erhalten. Dabei wurden zwei verschiedene Verdünnungsmethoden getestet. In dem Protokoll von Janes et al. (104) wurden je 2 µl der vorverdünnten Sonde mit 1 µl Nuklease-freiem Wasser und 10 µl deionisiertem Formamid in einem 0,2 ml-*Tube* vermischt. Das Gemisch wurde in einem *Thermocycler* (peqSTAR, VWR Peqlab, Erlangen) bei 65 °C denaturiert und anschließend bei 42 °C gehalten. Der Prähybridisierungspuffer H1 wurde in einem *Tube* auf 42 °C vorerhitzt und dem Gemisch hinzugefügt. Dem Sondengemisch wurden 7 µl des auf 42 °C vorerhitzten Prähybridisierungspuffers H1 hinzugefügt, was eine finale Sondenkonzentration von 0,1 ng/µl bzw. 0,25 ng/µl ergab. Im Protokoll nach Kuchen et al. (105) wurde sowohl bei der Vorverdünnung als auch bei der endgültigen Verdünnung der Sonden ausschließlich Prähybridisierungspuffer verwendet. Die in Nuklease-freiem Wasser aufgelösten Sonden wurden mit Puffer H2 im Faktor 1:100 bzw. 1:40 vorverdünnt, um eine Sondenkonzentration von 1 ng/µl bzw. 2,5 ng/µl zu erhalten. Der Hybridisierungsmix wurde dann wiederum mit Prähybridisierungspuffer H2 auf eine Endkonzentration von 0,1 ng/µl bzw. 0,25 ng/µl gebracht. Die verdünnten Sonden wurden schließlich für 5 Minuten bei 80 °C in einem Heizblock (Unitek HB-130, Miyachi Unitek, Monrovia, CA, USA) denaturiert.

Zur Hybridisierung der Sonden mit der zellulären mRNA wurden die Objektträger, bei denen eine Prähybridisierung stattfand, mit 2x SSC überschichtet. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig abgetropft und im Anschluss daran direkt der denaturierte Hybridisierungsmix aufgetragen. Wurde nicht prähybridisiert, so wurde der denaturierte Hybridisierungsmix direkt auf die luftgetrockneten Schnitte aufgetragen. Die Schnitte wurden mit Deckgläsern (Engelbrecht GmbH, Edermünde) abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Objektträger wurden schließlich in eine feuchte Kammer überführt und bei 42 °C über Nacht in einem Brutschrank (*Function Line* Typ BB 16 CU, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) inkubiert.

2.5.3.2 3'-getailte Oligonukleotid-Sonden

Die 3[•]-markierten Sonden hatten entsprechend der Auswertung des *Spot Tests* eine Ausgangskonzentration von 4,5 pmol/µl. Bei der weiteren Verdünnung wurden Prähybridisierungspuffer H2 und H3 getestet. Die Sonden wurden mit dem entsprechenden Prähybridisierungspuffer testweise im Faktor 1:45 bzw. 1:90 verdünnt. Die Endkonzentration der Sonden betrug 0,1 pmol/µl und 0,05 pmol/µl. Die verdünnten Sonden wurden schließlich für 5 Minuten bei 80 °C in einem Heizblock (Unitek HB-130, Miyachi Unitek, Monrovia, CA, USA) denaturiert.

Zur Hybridisierung der Sonden mit der zellulären mRNA wurden die Objektträger nach dem Prähybridisierungsschritt mit 2x SSC überschichtet. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig abgetropft und im Anschluss daran direkt der denaturierte Hybridisierungsmix aufgetragen. Die Objektträger wurden schließlich in eine feuchte Kammer überführt und bei 42 °C über Nacht in einem Brutschrank (*Function Line* Typ BB 16 CU, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) inkubiert.

2.5.4 Posthybridisierungsbehandlung

In der Posthybridisierungsbehandlung müssen die nichtgebundenen Sonden gründlich abgewaschen werden, um unspezifische Signale zu verhindern.

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte zunächst dreimal 5 Minuten in 2x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in Lösung A (Tabelle 12) überführt und für 5 Minuten bei 42 °C inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschritte in 2x SSC. Die Objektträger wurden in Waschlösungen mit jeweils 0,1 % SDS (*Sodium dodecyl sulfate solution*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und absteigenden SSC-Konzentrationen (1x-, 0,5x-, 0,25x-, 0,125x-SSC) für jeweils 15 Minuten bei 42 °C inkubiert.

Tabelle 12: Lösung A

Reagenz	Firma	Menge
20 x SSC	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	10 ml
Formamid	EMD Millipore, Temecula, CA, USA	50 ml
A. dest.	B. Braun, Melsungen, Deutschland	20 ml
Gesamt		80 ml

2.5.5 Immunhistochemischer Nachweis der Sonden

Die Lösungen und Puffer für die Detektion der Sonden wurden mit dem DIG *Wash and Block Buffer Set* und der Herstelleranleitung entsprechend fertig gestellt (Tabelle 13). Die Färbung erfolgte mit Alkalischer Phosphatase (AP) und NBT/BCIP.

 Tabelle 13: Detektionslösung

Reagenz	Firma	Menge
NBT/BCIP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim	20 µ1
Detektionspuffer (1-fach kon-	Roche Diagnostics, Mannheim	1 ml
zentriert)		
Levamisol Tropfen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	3 Tropfen

Die Schnitte wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln oder Rühren in Puffer 1 gewaschen. Danach wurden sie in die Blockierungslösung überführt und für 30 Minuten inkubiert. Die Inkubation in Blockierungslösung vermindert den unspezifischen Hintergrund bei der immunhistochemischen Detektion.

Der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper gegen DIG (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde mit der 1-fach konzentrierten Blockierungslösung im Verhältnis 1:1.000 verdünnt und nach dem Blockierungsschritt aufgetragen. Die Objektträger wurden für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörper wurden die Objektträger zweimal für 15 Minuten unter Schütteln oder Rühren in Puffer 1 gewaschen. Für die Farbreaktion wurde die Detektionslösung auf die Schnitte gegeben. Die Detektionslösung enthält Levamisol, das die gewebseigene Alkalische Phosphatase inhibiert. Das Substrat NBT/BCIP kann folglich nicht von körpereigenen Enzymen verarbeitet werden, sodass ein unspezifischer Hintergrund verhindert wird.

In systematischen Optimierungsschritten wurden die Objektträger entweder mit einem Deckglas abgedeckt in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur ohne Deckglas für nur 3 bis 4 Stunden inkubiert (siehe Ergebnisteil).

Die Reaktion wurde gestoppt, sobald sich die Schnitte violett gefärbt hatten. Dazu wurden die Objektträger in A. dest. gewaschen.

2.5.6 Kontrollen

2.5.6.1 Positivkontrollen

Die Qualität des Gewebes wurde getestet, indem gezielt mit dem konstant transkribierten Haushaltsgen GAPDH hybridisiert wurde.

In einzelnen Versuchen wurden Lungenschnitte mitgeführt (Human Lung Frozen Sections, Zyagen, Life Science, San Diego, USA). Es ist bekannt, dass CXCL17 in der Lunge exprimiert wird (36).

Alpha-Actin wurde sowohl per *in-situ*-Hybridisierung auf mRNA-Ebene als auch per Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Da Alpha-Actin bekanntlich von glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) exprimiert wird, konnte die Actin-Sonde mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert werden.

2.5.6.2 Negativkontrollen

Zum Ausschluss unspezifischer Markierungen wurde bei jedem Versuch für jede Gewebeprobe ein Parallelschnitt mit den *Sense*-Sonden der jeweiligen mRNA hybridisiert. Diese *Sense*-Sonden können nicht an die Gewebs-mRNA binden, da sie zur Ziel-mRNA identisch sind. Sie dienen daher als interne Negativkontrolle.

Des Weiteren wurde als technische Negativkontrolle bei jedem Versuch ein Parallelschnitt mit dem reinen Prähybridisierungspuffer ohne Sonde inkubiert, um unspezifische Anfärbungen und endogene Enzymaktivitäten des Puffers auszuschließen.

2.5.6.3 Reproduzierbarkeit

Pro Durchlauf wurden zehn bis 20 Parallelschnitte verarbeitet. Davon wurden je 60 % mit der *Antisense*-Sonde hybridisiert. Es wurden nur Signale als positiv gewertet, die in allen sechs bzw. zwölf Parallelschnitten reproduzierbar waren.

2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte direkt nach dem immunhistochemischen Nachweis der Sonden (Abb. 7).



Abb. 7: Prinzip der Kombination von in-situ-Hybridisierung mit Immunfluoreszenzfärbung

2.6.1 Antikörper

Für die Darstellung des Endothels wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) verwendet. Für die Darstellung der *Tunica media* der Gefäßwand wurde ein aus der Maus stammender und gegen α-Actin gerichteter monoklonaler Antikörper verwendet. Die Darstellung der Adventitia erfolgte mit einem monoklonalen gegen Fibroblasten gerichteten Maus-Antikörper, Klon TE-7. Die Antikörper wurden mit verschiedenen Antigen-Desmaskierungsmethoden (keine Antigen-Demaskierung, proteolytische Andauung mit Trypsin) und teils in verschiedenen Konzentrationen getestet. Um das Ausmaß an unspezifischer Bindung des Primärantikörpers an das Gewebe aufzuzeigen, wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen gegen den jeweiligen Antikörper-Isotyp mitgeführt.

2.6.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Für die Antigendemaskierung wurde Trypsinlösung angesetzt (Tabelle 15), die in Trispuffer (Tabelle 14) aufgelöst wurde.

Reagenz	Firma	Menge				
TRIS-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	6 g				
TRIS-Base	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	1 g				
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	9 g				
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	1 ml				

Tabelle 14: Trispuffer pH 7,4/7,6

- mit Aqua dest. auf knapp 1 l auffüllen

- pH messen (der Puffer sollte zwischen pH 7,4 und pH 7,6 liegen)
- evtl. mit 5 M NaOH (Natronlauge) nach oben bzw. HCl (Salzsäure) nach unten ausgleichen
- mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Tabelle 15: Trypsinlösung 0,1 %

Reagenz	Firma	Menge
Trypsin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,08 g
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	0,08 g

- in 80 ml Trispuffer (pH 7,4/7,6) auflösen
- kann mehrmals benutzt werden
- 1 Woche haltbar

2.6.3 Etablierung der Immunhistochemie

Es wurden nur die Schnitte gegengefärbt, auf denen mit der *Antisense*-Sonde hybridisiert worden ist. Die anderen Schnitte wurden mit VectaMount Eindeckmedium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt (Deckgläser 24x60 mm, Engelbrecht GmbH, Edermünde).

Die zu färbenden Schnitte wurden für zwei Minuten in 1x PBS gewaschen. In systematischen Optimierungsschritten wurde nach dem Waschschritt in PBS eine Trypsinbehandlung getestet. Dazu wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,1%iger Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut für 2 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde zum Blockieren eines unspezifischen Hintergrunds je ein Tropfen *Antibody diluent with background reducing components* (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) auf die Schnitte gegeben, die für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert wurden. Währenddessen wurden die Primärantikörper nach dem folgenden Schema (Tabelle 16) in *Antibody Diluent* verdünnt:

Antigen	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Konzentration	Produktdaten
vWF	Maus IgG1	1:10000	0,05 ng/µ1	BD Biosciences, Heidelberg
Negativkontrolle	Maus IgG1	1:2000	0,05 ng/µ1	Dako Deutschland GmbH,
IgG1				Hamburg
a -Actin	Maus IgG2a	1:400	14 ng/µ1	Sigma Aldrich, St. Louis,
		1:800	7 ng/µ1	MO, USA
Negativkontrolle	Maus IgG2a	14:100	14 ng/µ1	Dako Deutschland GmbH,
IgG2a		7:100	7 ng/µ1	Hamburg
Fibroblasten	Maus IgG1	1:100	1 ng/µl	Dako Deutschland GmbH,
(Klon: TE-7)		1:200	0,5 ng/µ1	Hamburg
Negativkontrolle	Maus IgG1	1:100	1 ng/µl	Dako Deutschland GmbH,
IgG1		1:200	0,5 ng/µ1	Hamburg

Tabelle 16: Primärantikörper

Für die Antikörper gegen α-Actin und Stromazellen (Klon TE-7) wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Nach 30 Minuten wurde der *Antibody-Diluent*-Block abgeklopft und die Primärantikörper aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubationszeit in der feuchten Kammer wurden die Schnitte einzeln mithilfe einer Plastik-Pasteur-Pipette mit 1x PBS gespült und viermal 5 Minuten in 1x PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Proben lichtgeschützt weiterverarbeitet.

Während die Objektträger in PBS lagerten, wurde der aus der Ziege stammende Sekundärantikörper mit PBS im Faktor 1:1.500 verdünnt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Sekundärantikörper						
Antigen	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Konzentration	Produktdaten		
Anti-Maus IgG-	Ziege IgG	1:1500	1,3 ng/µ1	Life Technologies,		
Antikörper				Carlsbad, CA, USA		

Anschließend wurde der Sekundär-AK für 30 Minuten aufgetragen. Die Farbreaktion erfolgte in einer feuchten Kammer. Danach wurde die Antikörperlösung abgeklopft und die Schnitte in PBS gewaschen. Zum Schluss wurde je ein Tropfen des Eindeck-Mediums *ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) auf die Schnitte gegeben und mit Deckglas versehen. Das Eindeckmedium erhält die Fluoreszenz für mehrere Wochen. Das darin enthaltene DAPI färbt zudem spezifisch den Zellkern. Die Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.7 Dokumentation

Mithilfe der Hellfeld- und der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von CXCL17 und Actin analysiert. Die Schnitte wurden bei einer 100- bis 400-fachen Vergrößerung fotografiert (Axioskop 2 plus: Carl Zeiss, Jena, Germany; Nikon DS Vi 1: Nikon, Düsseldorf, Germany) und im TIF-Format mit einer Auflösung von 1.600x1.200 Pixel und einer Punktdichte von 96 dpi abgespeichert (Mikroskopsoftware NIS-Elements F, Nikon). Zum Teil wurden die Bilder mit dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA, https://imagej.nih.gov/ij/) digital nachbearbeitet. Dabei wurden bei den korrespondierenden Synovialisschnitten, die mit der *Sense-* und der *Antisense*-Sonde hybridisiert worden waren, dieselben Helligkeits- und Kontrasteinstellungen angewendet. Die Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator (Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA) und Inkscape (Inkscape-Projekt, https://inkscape.org/de/) erstellt.

Die verwendeten Materialien und Programme sind im Anhang aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Sonden und Hybridisierungsparameter

3.1.1 Proteinase-K-Konzentration

Um die Proteinverdauung zu optimieren, wurden Proteinase-K-Konzentrationen von 1 bis $3,4 \mu g/ml$ getestet.

In der Lichtmikroskopie zeigte sich, dass bei einer Proteinase-K-Konzentration von 3,4 µg/ml ein optimales Verhältnis zwischen Sondendurchlässigkeit des Gewebes und Geweberhalt bestand. Geringere Konzentrationen führten zu einer geringeren Signalintensität. Allerdings war das Gewebe in einzelnen Proben stärker beschädigt.

3.1.2 Prähybridisierung und Hybridisierungspuffer

Um die Ausbildung eines unspezifischen Hintergrundes zu verhindern, wurde eine Prähybridisierung mit allen Bestandteilen der Hybridisierungslösung außer der Sonde getestet.

Im Protokoll von Janes et al. (2010) (104) ist keine Prähybridisierung vorgesehen. In den Schnitten, die nach diesem Protokoll behandelt wurden, war keine NBT/BCIP-Färbung des Testgewebes nachweisbar.

Mit dem Protokoll von Kuchen et al. gelang es erstmals, ein Farbsignal in der *in-situ*-Hybridiserung zu detektieren. Um den unspezifischen Hintergrund weiter zu reduzieren, wurde der Zusatz Polyadenylsäure (poly-A) getestet (siehe Prähybridisierungspuffer H3 in Tabelle 11). Mithilfe der im modifizierten Hybridisierungspuffer nach Kuchen et al. aufgelösten 3'-*getailten* Sonden (siehe Abschnitt 2.4.2) wiesen die hybridisierten Zellen bei der Auswertung mittels Hellfeldmikroskopie gute Signalstärken auf und ließen sich visuell deutlich vom umliegenden Gewebe abgrenzen.

In den Schnitten, die mit dem reinen Hybridisierungspuffer ohne Sonde inkubiert wurden, war nach der Detektion kein NBT/BCIP-Signal sichtbar.

3.1.3 Spot-Test

Um die Effizienz der DIG-Sondenmarkierung zu evaluieren, wurde ein *Spot-Test* durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.3). Dabei wurden standardisierte Verdünnungsreihen der zu kontrollierenden Sonden erstellt und auf eine Nylonmembran aufgetragen (Abb. 8). Die Membran wurde dann in einem kurzen Detektionsverfahren prozessiert.

	Tube	2	3	4	5	6	7	8
Standard-Oligonukleotid aus Gefäß 7 des <i>Tailing Kits</i>	K (V7)		•	•	•	0		
Markiertes Kontroll- Oligonukleotid	K (V6)	e	•	e	e	e	e	
ACTA2-as:	A-AS	G	C	G	e	0	9	
ACTA2-s:	A-S	C	6	C	C	٩	. 0	
CXCL17-as:	C-AS	•	6	•	6		G	
CXCL17-s	C-S	6	6	6	G	0		

Abb. 8: Spot-Test zur Überprüfung der Labeling-Effizienz

Verdünnungen des markierten Standard-Oligonukleotids aus dem *DIG Oligonucleotide Tailing Kit* und der neu markierten Sonden wurden auf eine Nylonmembran aufgetragen, fixiert und immunhistochemisch detektiert. Zur technischen Negativkontrolle wurde jeweils am Ende der Verdünnungsreihe 1 µl reiner Verdünnungspuffer aufgetragen.

Da bei der schwächsten Konzentration von 0,78 fmol/µl (*Tube* 7) ein blauer *Spot* zu erkennen war, wurde die berechnete Konzentration von 4,5 pmol/µl als Ausgangskonzentration für weitere Verdünnungen verwendet. Aufgrund des fehlenden Signals bei den *Spots* aus *Tube* 8 konnte ein unspezifisches Signal durch Bestandteile des Verdünnungspuffers ausgeschlossen werden.

3.1.4 Einfach markierte Sonden vs. 3'-getailte Sonden

Ziel bei der Auswahl der Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung war es, nach Möglichkeit fertig markierte Sonden zu verwenden, um den Arbeitsaufwand und die Anzahl der Störfaktoren so gering wie möglich zu halten.

Trotz Optimierung der Fixierung und der Permeabilisierung ist von neun Durchläufen kein Versuch mit den einfach markierten Sonden gelungen. Obwohl das Gewebe ausreichend gut erhalten war, war weder bei einer Sondenkonzentration von 0,1 ng/µl noch bei einer Konzentration von 0,25 ng/µl in der Mikroskopie ein Farbsignal zu erkennen. Auch die verschiedenen Sondenverdünnungsmethoden nach Janes et al. und Kuchen et al. führten zu keinen interpretierbaren Ergebnissen. Die Negativkontrollen wurden an Parallelschnitten mit den GAPDH- und CXCL17-*Sense*-Sonden durchgeführt. In diesen Schnitten war nach der immunhistochemischen Detektion ebenfalls kein Farbsignal sichtbar. Diese Versuche ließen eine Weiterverwendung der einfach markierten Sonden wenig erfolgversprechend erscheinen.

Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Versuche ausschließlich Sonden verwendet, die mittels 3'-*Tailings* markiert wurden (siehe Abschnitt 2.4.2). Die 3'-*getailten Antisense*-Oligonukleotid-Sonden, die in einem nach Kuchen et al. modifizierten Prähybridisierungspuffer mit dem Zusatz poly-A aufgelöst wurden, ergaben deutlich positive Signale. Die Parallelschnitte, in denen mit der *Sense*-Sonde hybridisiert worden war, wiesen hingegen an den gleichen Stellen ein negatives bzw. ein deutlich schwächeres Signal auf. Eine Konzentration von 0,1 pmol/µl erwies sich als optimal hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnisses.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Versuche in Relation zueinander, so erzielten zusammenfassend die 3'-*getailten* Oligonukleotidsonden in Kombination mit dem nach Kuchen et al. modifizierten Prähybridisierungspuffer bei einer Konzentration von 0,1 pmol/µl die höchste Signalintensität. Mithilfe der poly-A-Lösung wurde der unspezifische Hintergrund deutlich reduziert (siehe Abb. 9 und Abb. 10).



Abb. 9: *in-situ*-Hybridisierung von Synovialisschnitten mit der 3'-getailten Sonde CXCL17 (ohne Zusatz von poly-A-Lösung)

Hellfeldaufnahme von Synovialisschnitten

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 200-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert.

A: Hellfeldaufnahme eines Schnitts, der mit der Antisense-Sonde hybridisiert wurde

B: korrespondierende Hellfeldaufnahme eines Schnitts, der mit der Sense-Sonde hybridisiert wurde



Abb. 10: *in-situ*-Hybridisierung von Synovialisschnitten mit der 3'-getailten Sonde CXCL17 (mit Zusatz von poly-A-Lösung)

Hellfeldaufnahme von Synovialisschnitten

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 200-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert.

A: Hellfeldaufnahme eines Schnitts, der mit der Antisense-Sonde hybridisiert wurde

B: korrespondierende Hellfeldaufnahme eines Schnitts, der mit der Sense-Sonde hybridisiert wurde

3.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzgegenfärbung folgte auf die immunhistochemische Detektion der Sonden und diente der Identifikation der Zellen, in denen die Ziel-mRNA exprimiert wurde.

Zur Darstellung der Gefäßschichten wurden Antikörper gegen vWF (Endothel bzw. *Tunica intima*), α-Actin (*Tunica media*) und Fibroblasten (*Tunica adventitia*) verwendet. In systematischen Optimierungsschritten wurde untersucht, ob eine proteaseinduzierte Antigendemaskierung zu einer Signalverbesserung führt.

Bei den Schnitten, bei denen keine Antigendemaskierung stattfand, waren die Signale bei den vWF- und Actingegenfärbungen kaum zu erkennen. Lediglich die Schnitte, auf denen der TE-7-Antikörper eingesetzt wurde, wiesen eine zufriedenstellende Signalstärke auf.

Im Vergleich dazu war das Fluoreszenzsignal bei vWF und α-Actin nach der Trypsinbehandlung deutlich stärker, wohingegen in den mit TE-7 gegengefärbten Schnitten keine Signalverbesserung festzustellen war. Die Negativkontrollen dieser Versuche wurden an Parallelschnitten mit Isotyp-Kontrollantikörpern durchgeführt. In diesen Schnitten war keine Färbung sichtbar.

Nach diesen Versuchen war zusammenfassend festzuhalten, dass die Gegenfärbung mit Antikörpern gegen vWF und α-Actin nur mit einer vorherigen Antigendemaskierung zufriedenstellend war, wohingegen TE-7 ohne eine zusätzliche Trypsinbehandlung verwendet werden konnte.

3.3 Ergebnisse zur Protokollentwicklung der *in-situ*-Hybridisierung mit Fluoreszenzgegenfärbung

Nachfolgend werden das aus den Versuchen resultierende, erfolgreiche Protokoll der *insitu*-Hybridisierung sowie repräsentative Fotos der Gewebeschnitte als Ergebnis der Entwicklungsarbeit dargestellt (siehe Abb. 11).



Abb. 11: *in-situ*-Hybridisierung von CXCL17 mit Fluoreszenzgegenfärbung Darstellung der *Tunica intima* mit einem Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor (vWF). Es findet sich keine Kolokalisation von CXCL17 in der Intima. Zwei repräsentative Ausschnitte.

Fixierung und Permeabilisierung der Gewebeschnitte

1.	Fixierung	15 min in 3 % Paraformaldehyd
2.	Waschen in Puffer	10 min in 1x PBS
3.	Rehydrierung	2 x 5 min in Nuklease-freiem Aqua dest.
4.	Proteinverdauung	15 min in 0,2 M HCL
5.	Waschen in Puffer	2 x 3 min in 1 x PBS (oder länger)
6.	Permeabilisierung	10 min in Proteinase K [3,4 µg/ml]
7.	Enzyminhibierung	10 min in 0,2 % Glycin in PBS bei 4 °C
8.	Acetylierung	20 min in Triethanolamin und Essigsäureanhydrid
9.	Waschen in Puffer	2 x 3 min in 1 x PBS (oder länger)
10	Nachfixierung	30 min in 3 % Paraformaldehyd (aus Schritt 1)
11	Waschen in Puffer	2 x 3 min in 1 x PBS (oder länger)
12	. Dehydrierung	jeweils 2 min in 70-, 80- und 95% igem Ethanol

in-situ-Hybridisierung

2 min in Nuklease-freiem Aqua dest.
in 2 x SSC lagern
Inkubieren der Schnitte mit 100 –200 µl pro Schnitt
Prähybridisierungspuffer für 1 h bei RT in einer
feuchten Kammer
Überschichten der Schnitte mit 2 x SSC
Sonde vorher 5 min bei 80 °C denaturieren

6. Mit Deckglas versiegeln

7. über Nacht bei 42 °C hybridisieren in feuchter Kammer

Posthybridisierungsbehandlung und immunhistochemische Detektion der Sonden

1.	Entfernung der Deckgläser	3 x 5 min mit 2 x SSC
2.	Waschen	mit Lösung A 5 min bei 42 °C
3.	Detergenz-Behandlung	in 1x-, 0,5x-, 0,25x-, 0,125x-SSC mit 0,1 % SDS für
		jeweils 15 min bei 42 °C
4.	Waschen in Puffer 1	5 min, RT unter Schütteln oder Rühren
5.	Block	30 min in 1 x Blockierungslösung
6.	Auftragen des DIG-AK	1 h bei RT in feuchter Kammer inkubieren
7.	Waschen	2 x waschen in Puffer 1 je 15 min, RT unter Schütteln
		oder Rühren

- 8. Start Färbereaktion Detektionslösung auf die Schnitte geben
- 9. Färbereaktion in feuchter Kammer über Nacht bei 4 °C (mit Deckgläsern) oder tagsüber (ca. 3-4 h bei RT) ablaufen lassen

Stopp der immunologischen Detektion und Immunfluoreszenzgegenfärbung

1.	Stopp der Reaktion	Waschen in A. dest.
2.	Waschen	2 min in 1x PBS
3.	Trypsinbehandlung	10 min in 0,1 % Trypsinlösung bei 37 °C
4.	Waschen	2 min in 1x PBS
5.	Blockierungsreaktion	je 1 Tropfen Antibody diluent auf Schnitte geben und
		30 min bei RT in feuchter Kammer inkubieren
6.	Primär-AK	1 h inkubieren lassen
7.	Short wash in PBS	Schnitte mithilfe einer Plastik-Pasteur-Pipette mit 1x
		PBS abspülen
8.	Waschen	4 x 5 min in 1x PBS

Ab hier lichtgeschützt arbeiten

- 9. Sekundär-AK 30 min bei RT inkubieren lassen
- 10. Waschen2 x 3 min in PBS
- 11. Eindecken mit Prolong Gold (gleichzeitig Kernfärbung mit DAPI, über Nacht einwirken lassen)

3.4 Untersuchungen zur Expression von Actin

Die Hybridisierung mit der Sonde gegen alpha-Actin nach dem oben erwähnten optimierten Protokoll ergab ein spezifisches Signal ohne signifikanten Hintergrund. Die Verteilung des Signals ließ wie erwartet auf Gefäße schließen. Um die spezifische Bindung der 3'-*getailten* Sonde zusätzlich zu überprüfen, wurde eine Lokalisationsdiagnostik mit Antikörpern gegen die drei Gefäßschichten *Tunica intima* (von-Willebrand-Faktor), *Tunica media* (alpha-Actin) und *Tunica adventitia* (TE-7) durchgeführt. In der Fluoreszenzmikroskopie war wie erwartet eine Kolokalisation des NBT/BCIP-Signals der Sonde und des Immunfluoreszenzsignals in der *Tunica media* festzustellen. Die *Tunica media* besteht bekanntlich aus glatten Muskelzellen. Aus den Ergebnissen der Versuche geht hervor, dass die Etablierung der *in-situ*-Hybridisierung mit Actin erfolgreich war. Da das Verteilungsmuster von alpha-Actin und die alpha-Actin exprimierenden Zellen bekannt sind, konnte die korrekte Sondenbindung per Immunfluoreszenz-Gegenfärbung bestätigt werden. Die Expression der alpha-ActinmRNA ließ sich eindeutig der Media synovialer Gefäße zuordnen (Doppelfärbung mit ASMA), während sich keine Kolokalisation von alpha-Actin in der Intima (vWF) oder Adventitia (TE7) zeigte (siehe Abb. 12).



Abb. 12: Expression von alpha-Actin in der in-situ-Hybridisierung in Synovialisschnitten

3.5 Untersuchungen zur Expression von CXCL17

Die Hybridisierung mit der Sonde gegen CXCL17 ergab ein spezifisches Signal ohne signifikanten Hintergrund.

Die Verteilung des Signals ließ auf Gefäße schließen. Um die CXCL17-exprimierenden Zellen näher zu identifizieren, wurde eine Lokalisationsdiagnostik mit Antikörpern gegen die drei Gefäßschichten *Tunica intima* (von-Willebrand-Faktor), *Tunica media* (alpha-Actin) und *Tunica adventitia* (TE-7) durchgeführt. In der Fluoreszenzmikroskopie war eine Kolokalisation des NBT/BCIP-Signals der Sonde mit dem Immunfluoreszenzsignal in der *Tunica media* festzustellen. Die *Tunica media* besteht bekanntlich aus glatten Muskelzellen. Die Expression der CXCL17-mRNA ließ sich eindeutig der Media synovialer Gefäße zuordnen (Doppelfärbung mit alpha-Actin), während sich keine Kolokalisation von CXCL17 in der Intima (vWF) oder Adventitia (TE7) zeigte (siehe Abb. 13). CXCL17 konnte nicht in der Deckzellschicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 14).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Chemokin CXCL17 von glatten Muskelzellen in der *Tunica media* synovialer Mikrogefäße exprimiert wird.



Abb. 13: Expression von CXCL17 in der *in-situ*-Hybridisierung in Synovialisschnitten

Die Expression der CXCL17-mRNA ließ sich eindeutig der Media synovialer Gefäße zuordnen (Doppelfärbung mit alpha-Actin), während sich keine Kolokalisation von CXCL17 in der Intima (vWF) oder Adventitia (TE7) zeigte.



Abb. 14: *in-situ*-Hybridisierung von Synovialisschnitten mit der 3'-getailten Sonde CXCL17
Hellfeldaufnahme von Synovialisschnitten mit Deckzellschicht
A: Hellfeldaufnahme eines Schnitts, der mit der Antisense-Sonde hybridisiert wurde
B: korrespondierende Hellfeldaufnahme eines Schnitts, der mit der Sense-Sonde hybridisiert wurde

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels einer Kombination aus *in-situ*-Hybridisierung und direkt folgender Immunfluoreszenz-Gegenfärbung erstmals gezeigt werden, dass CXCL17 von glatten Muskelzellen in der *Tunica media* von Gefäßen in der Synovialis exprimiert wird. In Folge wurde das Verfahren mit einer Sonde gegen alpha-Actin getestet und die Spezifität der Hybridisierung bestätigt.

Die Untersuchung von Synovialisproben hat in den vergangenen Jahren bei der Erforschung der RA an Bedeutung gewonnen. Molekulare und immunhistochemische Methoden dienen dazu, pathophysiologische Vorgänge bei dieser Erkrankung besser nachzuvollziehen (116). Inwiefern dieser Nutzen auf die angewandten Methoden zutrifft, wird in Abschnitt 4.1 diskutiert.

Aufgrund zahlreicher immunologischer und molekulargenetischer Untersuchungen können einige Aspekte der Pathophysiologie heute besser verstanden werden. Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung mit angiogener Komponente. D. h. die Verstetigung der synovialen Angiogenese ist assoziiert mit der Aufrechterhaltung der Entzündung und trägt so maßgeblich zur Gelenkzerstörung bei. Die physiologische Angiogenese ist ein streng regulierter, zeitlich limitierter Prozess. In gesunden Gefäßen befinden sich lediglich 0,01 % der Endothelzellen im Stadium der Zellteilung. Bei der RA ist im Gegensatz dazu die Angiogenese zeitlich pathologisch verlängert (83).

Die Rolle von CXCL17 in der Pathogenese der RA wird in Abschnitt 4.4 diskutiert. Weder zum Expressionsort noch zur Funktion von CXCL17 in der Synovialis liegen Daten vor. Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, über eine molekulare Lokalisationsdiagnostik den Expressionsort von CXCL17 in der Synovialis zu bestimmen. In Vorarbeiten wurde CXCL17 immunhistochemisch nachgewiesen. Der Expressionsort und der Wirkort von Proteinen sind allerdings in vielen Fällen verschieden, da Proteine oft sezerniert und andernorts aufgenommen werden (117). Dieser Umstand begründete die weitere Erforschung dieses Chemokins in der aktuellen Arbeit.

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

4.1.1 in-situ-Hybridisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden an Gefrierschnitten von Synovialisproben *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Ziel war es, ein zuverlässiges Routineprotokoll für ISHs an Synovialisgewebe zu etablieren.

Aus den Ergebnissen der Proteinase-K-Konzentrationsreihe konnte geschlussfolgert werden, dass die Proteinase-K-Konzentration sorgsam titriert werden muss. Die mikroskopische Auswertung der Versuchsvarianten ergab, dass die Durchführung eines Prähybridisierungsschritts für ein signifikantes Signal in der *in-situ*-Hybridisierung hilfreich war. Durch den Prähybridisierungsschritt haben die Bestandteile des Hybridisierungspuffers mehr Zeit, unspezifisch bindende Strukturen im Gewebe oder auf dem Objektträger abzusättigen als bei gleichzeitiger Inkubation mit der Sonde. Dies führt zu einer geringeren Hintergrundfärbung.

Nachdem mit diesem Protokoll die ISH an Synovialisgefrierschnitten etabliert werden konnte, wurde als nächstes die molekulare Lokalisationsdiagnostik per Immunfluoreszenzfärbung erarbeitet. Dabei wurden für die eingesetzten Antikörper Antigen-Demaskierungsverfahren zur Signalverstärkung getestet.

Die ISH ist eine anspruchsvolle und sehr zeitaufwändige molekularbiologische Methode, die viele Wasch- und Inkubationsschritte enthält. Eine erfolgreiche Etablierung erfordert eine individuelle Anpassung der Gewerbevorbereitung, der Hybridisierungsbedingungen und anderer Parameter (118).

Die Integrität der Ziel-mRNA ist elementar für die erfolgreiche Entwicklung einer *in-situ*-Hybridisierung (105). Entscheidend ist außerdem, dass die Sonden in die Zellen eindringen können, um mit der mRNA zu hybridisieren und dann ausreichend stark detektiert werden zu können. Dabei sollte die Hintergrundfärbung so gering wie möglich bleiben (119).

Trotz des Aufwandes hat die ISH entscheidende Vorteile gegenüber anderen Methoden: Zum einen ermöglicht sie die verlässliche Lokalisierung und Untersuchung von kürzlich isolierten Gensequenzen im Kontext der Gewebemorphologie sowie die zuverlässige Identifizierung von exprimierenden Zellen, selbst wenn die RNA-Expression zu gering ist für eine *Northern-Blot*-Analyse. Zum anderen kann dieses Verfahren unverzüglich angewendet werden, sobald eine bestimmte Gensequenz bekannt ist. So lässt sich eine Zielstruktur bereits untersuchen, noch bevor ein spezifischer Antikörper verfügbar ist (117). Hinsichtlich der Sonden bewährten sich die 3'-*getailten*, mit DIG markierten Oligonukleotidsonden. Da die *Tailing*-Reaktion *Template*-unabhängig verläuft, können auch relativ kurze Oligonukleotide effektiv markiert werden.

Zudem lassen sich die genexprimierenden Zellen genau identifizieren, indem die ISH und der immunhistochemische Nachweis protein- und zellspezifischer Antigene an einem Schnitt kombiniert werden. Diese Doppelmarkierung ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der separaten Durchführung der Methoden an Serienschnitten (117).

4.1.2 Immunfluoreszenzgegenfärbung

Die Auswertung der ISH ergab, dass CXL17 in der Gefäßwand exprimiert wird. Ohne weitere immunzytochemische Untersuchungen konnte allerdings keine Aussage über die Identität der CXCL17-exprimierenden Zellen und ihre Lage zu den in der Gefäßwand vorkommenden Zellen getroffen werden. Um die mRNA-haltigen Zellen eindeutig zu identifizieren, wurden die ISH und die Gegenfärbung zur Darstellung der Gefäßwandschichten an einem Schnitt durchgeführt.

Der Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor ist ein geläufiger Antikörper zur Markierung von Endothel (120). In früheren Studien von Goodpaster et al. erwiesen sich die Antikörper gegen alpha-Actin und der Klon TE-7 als zuverlässige Antikörper zum Nachweis der glatten Muskelzellen in der *Tunica media* und der Fibroblasten in der *Tunica adventitia* der Gefäßwand (121).

Die Darstellung von adventitiellen Fibroblasten per Immunfluoreszenz-Gegenfärbung war erfolgreich. Daher wurden die weiteren Versuche mit dem TE-7-Antikörper ohne weitere Behandlung des Gewebes durchgeführt. Die ersten Detektionsversuche von vWF und alpha-Actin, bei denen das Gewebe nicht zusätzlich behandelt worden war, führten hingegen zu keinen interpretierbaren Ergebnissen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Da die *insitu*-Hybridiserung auf denselben Schnitten ein gut verwertbares Signal ergab, wurde geschlussfolgert, dass die entsprechenden Antigene maskiert worden waren und die Immunreaktivität abgenommen hatte. Als Antigenmaskierung werden fixierungsbedingte Vernetzungsreaktionen bezeichnet, aufgrund derer die Bindung des primären Antikörpers zum Zielantigen nicht möglich bzw. erschwert ist. Im Falle von Formaldehyd, das in der vorlie-

51

genden Studie zur Fixierung verwendet wurde, führt die Reaktion mit verschiedenen Aminosäureresten an den Epitopen zur Addition von funktionellen Gruppen wie etwa Methylengruppen. Otali et al. haben in einer systematischen Untersuchung demonstriert, wie aus diesen Reaktionen eine Veränderung der nativen Architektur des Epitops und damit die Denaturierung resultieren (122).

Dapson et al. haben in ihrer Arbeit festgestellt, dass sich formalinbedingte Quervernetzungen am besten mit enzymbasierten Antigendemaskierungsverfahren aufbrechen lassen (123). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Trypsin spaltet Peptide ab, die das Epitop maskieren. So wird die Immunreaktivität wiederhergestellt (124).

4.2 Limitationen und methodische Einschränkungen

Bei der Interpretation der Ergebnisse sind einige Einschränkungen zu berücksichtigen: Zunächst gibt es grundsätzlich potenzielle Störfaktoren, die zu einer Degradation der RNA führen können. Bei der Durchführung der ISH muss unbedingt auf RNAse-freie Arbeitsbedingungen geachtet werden Es ist beispielsweise nicht nachvollziehbar, wie schnell die Gewebeproben nach Entnahme zur Gefrierschnittvorbereitung eingebettet und eingefroren wurden. Bei der Probenentnahme bzw. einer längeren Verweildauer im Freien ist eine Gewebe-Kontamination mit RNAse nicht auszuschließen. Das für die Untersuchungen dieser Arbeit genutzte Gewebe wurde von den Mitarbeiterinnen im Rheinischen Rheumazentrum aufgearbeitet. Es ist daher möglich, dass einzelne Gewebeproben bereits kontaminiert im Labor angekommen sind und die Gewebeproben somit zum Zeitpunkt der Verwendung unterschiedlich gut erhalten waren.

Inwieweit sich die Exprimierung von CXCL17 bei OA- und RA-Patienten unterscheidet, lässt sich aus diesen Untersuchungen nicht ableiten. Die hohe interindividuelle Variabilität der verschiedenen Gewebeproben erschwert einen Vergleich verschiedener Proben. Diese Frage kann möglicherweise mit weniger fehleranfälligen Methoden beantwortet werden.

Diese Limitationen sollten in zukünftigen Forschungsarbeiten berücksichtigt und behoben werden.

4.3 Nachweis und Untersuchung der Expression von Actin

Der Hauptzweck für die Etablierung der ISH gegen Actin bestand darin, die Methode an einer Zielstruktur mit bekanntem Expressionsort zu testen, die darüber hinaus zuverlässig per Immunfluoreszenz nachgewiesen werden kann. So sollte die Spezifität der Methode überprüft werden. Die Ergebnisse korrelieren mit den Ausführungen von Crnogorac-Jurcevic et al., dass sich über die Detektion einer Zielstruktur per ISH und per Immunfluoreszenzgegenfärbung am selben Schnitt Antikörper validieren lassen (117).

4.4 Nachweis und Untersuchung der Expression von CXCL17

4.4.1 CXCL17 als potenzieller Angiogenesefaktor in der Synovialis bei der rheumatoiden Arthritis

Im Jahre 1982 formulierten Rothschild et al. die Hypothese, dass es bereits in der frühen Phase der RA zu Gefäßveränderungen kommt und diese eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen (125). Die ,vaskuläre Hypothese' der RA war seitdem Gegenstand zahlreicher Publikationen. Als Angiogenese bezeichnet man die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Ihr wird eine zentrale Rolle in der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und der Atherosklerose zugeschrieben. Bei der RA führt die exzessive Migration von Leukozyten in das entzündete Gelenk zur Neubildung zahlreicher Gefäße, um dem steigenden Sauerstoff- und Energiebedarf nachzukommen. Die proangiogenen Faktoren dominieren gegenüber den angiostatischen Faktoren und stimulieren so die Gefäßneubildung. Mit der Neovaskularisation wird die Synovitis aufrechterhalten. Die Bildung neuer Gefäße spielt aufgrund dessen eine zentrale Rolle in der Progression der RA (84). Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung von Rooney et al., dass die Zahl der synovialen Blutgefäße mit der Hyperplasie von Synoviozyten, der Monozyteneinwanderung und mit der Schmerzempfindlichkeit der Gelenke korreliert (126).

Das Chemokin CXCL17 wurde bei seiner Entdeckung im Jahre 2006 als *VEGF coregulated chemokine 1* (VCC-1) bezeichnet. Es handelt sich um ein Protein, das mit VEGF, dem *growth related oncogene peptide* (GRO1, auch bekannt als CXCL1) und Interleukin-8 (IL-8, auch bekannt als CXCL8) koreguliert und gemeinsam mit ihnen an der Angiogenese beteiligt ist (34, 127, 128). Weinstein et al. gehen davon aus, dass dieser *Path*- way über die drei letztgenannten Proteine mit Signalwegen der Entzündungsreaktion und der Apoptose verbunden ist (34). Die angiogenen Eigenschaften von CXCL17 wurden von Lee et al. bestätigt (45). Diese fanden heraus, dass CXCL17 die Expression von VEGF, dem stärksten proangiogenen Faktor, steigert. Die Tatsache, dass ein Überschuss an CXCL17 die Tumorgenese fördert, korreliert mit den Forschungsergebnissen von Brown et al., denen zufolge Synovialisproben von RA-Patienten einen dem Tumorangiogenesefaktor sehr ähnlichen Angiogenesefaktor enthielten (129). Turner et al. zählen CXCL17 zu den ELR-negativen CXC-Chemokinen und schließen daraus, dass CXCL17 angiostatisch wirkt (130). Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen der Arbeit von Lee et al, auf die sich Turner et al. beziehen. Weinstein und Lee et al. sind in ihren jeweiligen Arbeiten zu dem Schluss gekommen, dass CXCL17 an der Angiogenese beteiligt ist (34, 45). Die Beispiele CXCL12 und CXCL17 zeigen, dass ELR-negative Chemokine indirekt die Angiogenese fördern können, indem sie die Produktion angiogener Chemokine wie VEGF stimulieren (40).

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse der molekularen Lokalisationsdiagnostik in der vorliegenden Arbeit und setzt sie in Relation zu den bisherigen Erkenntnissen zur Angiogenese und zum Chemokin CXCL17, so ist denkbar, dass CXCL17

- 1. Einfluss auf die synoviale Angiogenese bei der RA nimmt
- direkt am Ort der Angiogenese exprimiert wird (möglicher autokriner Mechanismus).

4.4.2 Glatte Gefäßmuskelzellen und die mögliche Rolle von CXCL17 bei Entzündungsprozessen

Durch die in dieser Arbeit angewandte Doppelmarkierung von CXCL17-mRNA und zellspezifischen Antigenen auf einem Schnitt wurde nachgewiesen, dass es sich bei den CXCL17-mRNA-haltigen Zellen um vaskuläre glatte Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) handelt. Der dreischichtige Aufbau der Gefäße und der mikroskopische Befund lassen darauf schließen, dass es sich um Arteriolen in der Subintima der Synovialis handelt.

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden bisher vor allem in Zusammenhang mit der Atherosklerose erforscht. Die RA und die Atheroklerose als Ursache kardiovaskulärer Ereignisse sind durch gemeinsame pathophysiologische Faktoren, Risikofaktoren und die zentrale Rolle der Entzündung eng miteinander verbunden (siehe 1.3.3). Obwohl unter den klinischen Manifestationen der RA die Gelenkentzündung am prominentesten ist, zählen atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen zu den Hauptursachen für die gesteigerte Mortalität von RA-Patienten (91). Es wird angenommen, dass die chronische Entzündung in der RA zu einer beschleunigten Atherosklerose beiträgt (131). Erkenntnisse über die Rolle von VSMCs bei der Atherosklerose sind daher grundsätzlich auch relevant für die Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

VSMCs sind bekanntlich in der Lage, ihren Phänotyp infolge von Umweltreizen zu verändern und weisen ein breites Spektrum an Phänotypen zwischen differenziert (kontraktil) und entdifferenziert (synthetisch) auf, wobei die VSMC im synthetischen Status proliferieren und migrieren können. Die andauernde Proliferation der VSMC führt langfristig zur Seneszenz, die sich durch einen irreversiblen Zellteilungsstopp auszeichnet (siehe Abschnitt 1.1.2).

Gardner et al. untersuchten die inflammatorische Wirkung seneszenter VSMCs in der Atherosklerose und stellten fest, dass seneszente vaskuläre glatte Muskelzellen über die Sekretion von autokrin wirkendem Interleukin-1α (IL-1α) einen sogenannten Seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) ausbilden. Dabei setzen sie zahlreiche proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie das Monozyten-chemotaktische Protein 1 (MCP-1) frei, die durch die Aktivierung umliegender Endothelzellen Atherosklerosefördernde Eigenschaften besitzen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass seneszente VSMCs zu chronischen Entzündungsprozessen beitragen, die mit der Atherosklerose assoziiert sind (13). Die Untersuchungen stützen die These von Bennett et al., dass die Atherosklerose mit einer vorzeitigen Seneszenz unter anderem von VSMCs assoziiert ist. Zudem wurde festgestellt, dass verschiedene Phänotypvarianten der VSMCs zu einer Entzündungsreaktion und einer Monozytenchemotaxis führen (23).

Vor dem Hintergrund, dass CXCL17 von vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird und es zahlreiche Voruntersuchungen hinsichtlich der proinflammatorischen Wirkung von VSMCs gibt, ist denkbar, dass CXCL17 ebenfalls zu den autokrin bzw. parakrin wirkenden Chemokinen gehört, die durch glatte Gefäßmuskelzellen sezerniert werden. Um welchen Phänotyp genau es sich dabei handelt, muss näher untersucht werden. Auch die Funktion von CXCL17 in der Synovialis muss noch untersucht werden. Über die mögliche Rolle von CXCL17 in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis liegen bisher keine Arbeiten vor.

Die Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen bei Entzündungsprozessen lässt die Vermutung zu, dass CXCL17 kein rein antiinflammatorisches Chemokin ist. Die teils widersprüchlichen Angaben wurden bereits eingangs besprochen (siehe Abschnitt 1.2.2). Zusammenfassend betrachtet sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Relation zu den Erkenntnissen über VSMCs eher für die Schlussfolgerungen von Burkhardt et al., dass es sich bei CXCL17 um ein Chemokin mit Doppelfunktion handelt. Duale Chemokine werden sowohl unter homöostatischen als auch inflammatorischen Bedingungen exprimiert. Die Befunde von Hernández-Ruiz et al. stützen diese These. So wurde eine homöostatische CXCL17-Expression im oberen Gastrointestinaltrakt nachgewiesen. Im unteren Gastrointestinaltrakt hingegen konnte CXCL17 nur bei einer Entzündung oder bei dort liegenden Tumoren nachgewiesen werden (35).

Nach Lee et al. wirkt CXCL17 chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen (45). Daher ist CXCL17 möglicherweise Teil eines Mechanismus, über den synoviale glatte Gefäßmuskelzellen Chemotaxis betreiben und inflammatorisch wirken. Dieser Mechanismus stellt einen interessanten Ansatz für Folgearbeiten dar und spricht für die These, dass die Zellen am Ort des Entzündungsgeschehens nicht nur auf die Stimulation durch das Immunsystem reagieren, sondern selbst aktiv Immunzellen rekrutieren und die Entzündungsreaktion aufrechterhalten (6). So sind beispielsweise fibroblastenartige Synoviozyten (FLS) als direkt verantwortliche Schlüsselspieler für den Entzündungsprozess und die Gelenkdestruktion in der Pathogenese der RA anerkannt (7).

Die Erkenntnisse über den Expressionsort von CXCL17 in der Synovialis und die bekannten Fakten über die Rolle von glatten Muskelzellen bei entzündlichen Prozessen legen den Verdacht nahe, dass CXCL17 an der Gelenkentzündung in der RA beteiligt ist. Es ist noch weiter zu untersuchen, über welchen Mechanismus bzw. welche stimulierenden Faktoren die VSMC zur Expression von CXCL17 aktiviert werden.

4.5 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse und Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen,

- den Nachweis zu erbringen, dass CXCL17-mRNA von Mediazellen synovialer Gefäße exprimiert wird,
- ein routinetaugliches Protokoll f
 ür die *in-situ*-Hybridisierung (ISH) mit 3'-*getailten* Oligonukleotiden in Kombination mit einer Immunfluoreszenz-Gegenf
 ärbung f
 ür Synovialis zu erarbeiten.

Die Etablierung der *in-situ*-Hybridisierung erfolgte an alpha-Actin und CXCL17. Durch die in dieser Arbeit angewandte Doppelmarkierung von mRNA und Antigenen auf einem Schnitt wurde nachgewiesen, dass CXCL17 von glatten Muskelzellen in der *Tunica media* synovialer Gefäße exprimiert wird.

An die Erkenntnisse dieser Arbeit schließen sich folgende Fragen an, die in weiteren Studien untersucht werden könnten:

- 1. Besteht ein Expressionsunterschied von CXCL17 zwischen OA- und RA-Patienten?
- 2. Um welchen Phänotyp handelt es sich bei den CXCL17-exprimierenden VSMC?
- 3. Über welchen Rezeptor bzw. welche Rezeptoren wirkt CXCL17 an der Synovialis?
- 4. Wo in der Synovialis ist der CXCR8-Rezeptor exprimiert?
- 5. Über welchen Mechanismus bzw. welche stimulierenden Faktoren exprimieren VSMC CXCL17?
- 6. Stimuliert CXCL17 die Angiogenese in der Synovialis?
- 7. Wirkt CXCL17 proinflammatorisch in der Synovialis?
- 8. Lässt sich CXCL17 als Prognosemarker verwenden?
- 9. Eignet sich CXCL17 als therapeutisches Target?

Zunächst erscheint die Erforschung der synovialen Entzündung und der Angiogenese sinnvoll bei der RA, da beide Prozesse bekanntlich eine zentrale Rolle in deren Pathogenese spielen. Es wird angenommen, dass die Expression bestimmter inflammatorischer und angiogener Chemokine ebenso wie die Zahl der neu entstandenen Blutgefäße mit dem Ausmaß der synovialen Inflammation und dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert sind (40). Die Inhibition der Neovaskularisation im Gelenk kann folglich die Synovitis lindern und der Pannusbildung entgegenwirken (84, 132). So besteht beispielsweise die Möglichkeit, mithilfe von Chemokin- bzw. Chemokinrezeptor-Inhibitoren die synoviale Inflammation zu kontrollieren (40).

Ein weiterer praktischer Nutzen der Identifizierung neuer angiogener Mediatoren besteht darin, dass sie meist Teil einer Kaskade und somit kreuzreguliert sind. Die Blockade eines angiogenen Mediators kann folglich möglicherweise auch die Aktivität anderer Faktoren einschränken und die RA-Therapie verbessern (84).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für die These von Guo et al., dass der Rezeptor CXCR8 auch außerhalb der bisher bekannten Gewebe vorkommt und in der Synovialis mit CXCL17 über parakrine oder andere Mechanismen interagiert (49). Es erscheint daher sinnvoll, die CXCL17-CXCR8-Achse in Bezug auf die Interaktionen und die klinische Bedeutung für die rheumatoide Arthritis weiter zu erforschen und das Expressionsmuster des CXCR8-Rezeptors zu untersuchen.

Inwiefern CXCL17 und CXCR8 miteinander interagieren, ist noch nicht abschließend geklärt. Park und Binti Mohd Amir et al. konnten in ihren Arbeiten bestätigen, dass CXCL17 chemotaktisch auf THP-1-Zellen wirkt. Im Gegensatz zu Maravillas-Montero et al. fanden sie bei diesem Vorgang aber keinen Nachweis für eine Interaktion mit CXCR8. Stattdessen fanden sie heraus, dass CXCL17 auch bei einer gezielten Blockade von CXCR8 bzw. GPR35 die Migration von THP-1-Zellen fördert und in dieser Hinsicht unabhängig agiert. Die Ergebnisse dieser Studien legen die Vermutung nahe, dass es noch einen anderen bisher unbekannten Rezeptor für CXCL17 gibt (133, 134). Aus diesem Grund wird CXCL17 mitunter nach wie vor als verwaistes (*orphan*) Chemokin ohne spezifischen Rezeptor betrachtet (135).

Die Rolle von CXCL17 als Biomarker wurde im Kontext unterschiedlicher maligner und non-maligner Erkrankungen untersucht. Hinsichtlich der Eignung von CXCL17 als prognostischem Marker nehmen Weinstein et al. an, dass CXCL17 als sezerniertes Chemokin auch im Blut und im Urin nachweisbar sein sollte. Sie schlagen daher vor, CXCL17 als indirekten Marker für die Effektivität von zytotoxischen und antiangiogenen Therapien zu prüfen (34). Neuere Veröffentlichungen zu CXCL17 sprechen für diesen Ansatz. So ist es Choreño et al. gelungen, anhand der Serumspiegel von CXCL17 bei Patienten mit Atemwegserkrankungen das Influenza-A-Virus H1N1 (A/H1N1) vom Coronavirus SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) und anderen Atemwegserkrankungen abzugrenzen. In ihrer Studie war ein spezifischer Anstieg der CXCL17-Spiegel im Blutserum von Patienten mit A/H1N1 zu beobachten, nicht jedoch bei Patienten, die sich mit SARS-CoV-2 oder Tuberkulose infiziert hatten. Sie betonen den Nutzen von CXCL17 als prognostischem Biomarker, da bei Influenzapatienten erhöhte Serumspiegel von CXCL17 mit einem erhöhten Risiko für Nierenversagen und einer erhöhten Mortalität assoziiert sind. Auch bei Patienten mit instabiler Angina pectoris wurde im Gegensatz zu denen mit einer stabilen Angina pectoris ein signifikanter Anstieg des CXCL17-Serumspiegels beobachtet. Gong et al. schlagen daher CXCL17 als potenziellen neuen Biomarker vor, um nach dem Ausschluss eines akuten Myokardinfarkts eine instabile von einer stabilen Angina pectoris zu differenzieren. Sie postulieren zudem einen Zusammenhang zwischen dem CXCL17-Serumspiegel und der Entzündungsaktivität sowie der Instabilität der atherosklerotischen Plaques der Gefäßwand (136).

Laut Rashad et al. könnte die Untersuchung der CXCL17-Expression insbesondere bei wenig differenzierten Kolonkarzinomen, bei denen der CEA-Wert (*Carcinoembryonic antigen*, karzinoembryonales Antigen) im Blut relativ niedrig ist, eine nützliche Ergänzung zu den klassischen Tumormarkern darstellen. Dabei scheint die Expression von CXCL17 durch Tumorzellen in regionalen Lymphknoten bei Patienten mit Kolonkarzinom auf eine ungünstige Prognose hinzudeuten.

Die vorbeschriebenen Erkenntnisse zu CXCL17 als Entzündungs- und Tumorwachstumsfaktor (vgl. Abschnitt 1.2.2) legen nahe, dass CXCL17 auch in der RA als Marker untersucht werden sollte. Die vermehrte CXCL17-Expression in der Synovialis könnte auf einen akuten Schub oder eine besonders rasch fortschreitende Form der RA hindeuten.

Um die Rolle von CXCL17 als pharmakologischen Angriffspunkt zu evaluieren, sind eine genaue Erforschung der pathogenetischen Zusammenhänge und die Überprüfung der Hypothesen aus Abschnitt 4.4.1 sinnvoll. Hierzu bieten sich beispielsweise Zellkulturmodelle an. Einerseits lassen sich Zellen, die mit dem zentralen inflammatorischen Zytokin TNF- α stimuliert wurden, mit unstimulierten Zellen hinsichtlich der Expression von CXCL17 vergleichen. Andererseits sehen Gowhari Shabgah et al. in der Blockade des GPR35-Rezeptors bzw. des CXCL17-/GPR35-Signalwegs einen möglichen therapeutischen Ansatz in der Krebstherapie (135). Diesbezüglich fanden Hsu et al. bei ihrer Arbeit mit Lungenmetastasen von Mammakarzinomen heraus, dass die gezielte Blockade von GPR35 durch den kompetitiven Antagonisten CID2745687 die CXCL17-abhängige Migration von myeloiden Suppressorzellen (*Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) unterdrückt. Dadurch

wird die Bildung einer prämetastasierenden Nische, in die der Primärtumor metastasieren kann, verhindert (137). Die Untersuchungen an Metastasen von Adenokarzinomen der Lunge sind ein weiteres Indiz für das therapeutische Potenzial einer CXCL17-Blockade. Saracatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der den Src-FAK-Signalweg blockiert (vgl. Abschnitt 1.2.2) und somit die CXCL17-vermittelte Migration von Makrophagen und die Bildung einer prämetastasierenden Nische im Bereich der Wirbelsäule erschwert (59). Auch der GPR35-Rezeptor ist Gegenstand der Forschung. Aus den Arbeiten mit den GPR35-Agonisten Kynurensäure und Zaprinast lässt sich schließen, dass GPR35 ein mögliches pharmakologisches *Target* bei der Behandlung von neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen ist (57, 138). Diese Ansätze sollten auch im Kontext der rheumatoiden Arthritis untersucht werden.

Mithilfe des in der vorliegenden Arbeit etablierten Verfahrens zur molekularen Lokalisationsdiagnostik können in Zukunft neue *Targets* in der Synovialis identifiziert werden, anhand derer neue Medikamente entwickelt werden können. McInnes und Schett heben in ihrer Arbeit hervor, welche herausragenden Erfolge bei der Therapie der RA auf der Grundlage neuer immunologischer Erkenntnisse erzielt wurden (139). Pitzalis et al. führen als weiteres Argument für die hohe praktische Bedeutung molekularer und immunhistochemischer Untersuchungen von Synovialisproben an, dass sich auf diese Weise die Auswirkungen medikamentöser Interventionen auf die Produktion von Zytokinen, gelenkschädigenden Enzymen und anderen entzündlichen Mediatoren untersuchen lassen (116). Scott und McInnes et al. prognostizieren einen Übergang zu einer molekularen Taxonomie, die Untergruppen der RA mit unterschiedlichen prognostischen und therapeutischen Konsequenzen definiert. Ziel ist die dauerhafte Remission durch intensive Kurzzeitbehandlungen, die spezifisch auf RA-Untergruppen mit entsprechenden Biomarkerprofilen ausgerichtet sind (139, 140). Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode liefert eine der Grundlagen für die zukünftigen Therapien der RA.

Schlussendlich konnten mithilfe der durchgeführten Studien und Ergebnisse mehrere Ansatzpunkte abgeleitet werden, um ein umfassenderes Bild bezüglich des Zusammenhangs zwischen der CXCl7-Expression in der Synovialis und der Pathogenese der RA zu erhalten.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten erstmals auf eine Verbindung zwischen dem Chemokin CXCL17 und der rheumatoiden Arthritis hin.

Die Etablierung der ISH mit Immunfluoreszenzgegenfärbung war erfolgreich. Mithilfe der in dieser Arbeit angewandten Doppelmarkierung von CXCL17-mRNA und zellspezifischen Antigenen auf einem Schnitt wurden die CXCL17-mRNA-haltigen Zellen als vaskuläre glatte Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) identifiziert. Der dreischichtige Aufbau der Gefäße und der mikroskopische Befund lassen darauf schließen, dass es sich um Arteriolen in der Subintima der Synovialis handelt. Der Nachweis der CXCL17-exprimierenden VSMC in der *Tunica media* der Gefäßwand korreliert mit der heute gängigen Hypothese, dass glatte Gefäßmuskelzellen Zytokine und Chemokine produzieren können.

Aufgrund der Vorarbeiten zur angiogenen Rolle von CXCL17 und dem CXCL17-Nachweis in der Synovialis kann davon ausgegangen werden, dass CXCL17 an der Angiogenese im Rahmen der Pannusbildung in der Pathogenese der RA beteiligt ist. Die Rolle von CXCL17 in der Pathogenese der RA sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Das in der vorliegenden Arbeit erarbeitete Verfahren zur molekularen Lokalisationsdiagnostik kann als Routineprotokoll für die Untersuchung neu entdeckter Chemokine und Mediatoren in der Synovialis verwendet werden.

5. Literaturverzeichnis

- 1. Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. Bone. 1. Juli 2003;33(1):1–13.
- Simkin PA, Pizzorno JE. Transynovial exchange of small molecules in normal human subjects. J Appl Physiol. Mai 1974;36(5):581–7.
- 3. Tiwari N, Chabra S, Mehdi S, Sweet P, Krasieva TB, Pool R, u. a. Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool. J Biomed Opt [Internet]. 2010 [zitiert 28. März 2018];15(5). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2951994/
- Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M, u. a. Synovial Joints. In: Anatomy & Physiology [Internet]. OpenStax/Oregon State University; 2019 [zitiert 4. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://open.oregonstate.education/aandp/
- Smith M, Barg E, Weedon H, Papengelis V, Smeets T, Tak P, u. a. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. Ann Rheum Dis. April 2003;62(4):303–7.
- Kiener HP, Karonitsch T. The synovium as a privileged site in rheumatoid arthritis: Cadherin-11 as a dominant player in synovial pathology. Best Pract Res Clin Rheumatol. 1. Dezember 2011;25(6):767–77.
- Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. Clin Immunol. 1. Mai 2005;115(2):118–28.
- Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. J Rheumatol. März 2000;27(3):594– 600.
- 9. Smith MD. The Normal Synovium. Open Rheumatol J. 30. Dezember 2011;5:100–6.
- Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M, u. a. Structure and Function of Blood Vessels. In: Anatomy & Physiology [Internet].
 OpenStax/Oregon State University; 2019 [zitiert 4. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://open.oregonstate.education/aandp/
- Wang H, Rätsep M, Chapman A, Boyd R. Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: The role of oxidative stress and beyond. Can J Physiol Pharmacol. 1. März 2010;88:177–86.
- Enzerink A, Vaheri A. Fibroblast activation in vascular inflammation. J Thromb Haemost. 1. April 2011;9(4):619–26.
- Gardner SE, Humphry M, Bennett MR, Clarke MCH. Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1α–Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. September 2015;35(9):1963–74.
- Figueroa XF, Duling BR. Gap Junctions in the Control of Vascular Function.
 Antioxid Redox Signal. Februar 2009;11(2):251–66.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med. April 2000;6(4):389–95.
- 16. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhastonay C,
 Vandekerckhove J, u. a. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proc Natl Acad Sci U S A. Januar 1981;78(1):298–302.
- Duband JL, Gimona M, Scatena M, Sartore S, Small JV. Calponin and SM22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. Differentiation. 1. Dezember 1993;55(1):1–11.

- Stegemann JP, Hong H, Nerem RM. Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. J Appl Physiol. 1. Juni 2005;98(6):2321–7.
- Yoshida T, Owens GK. Molecular Determinants of Vascular Smooth Muscle Cell Diversity. Circ Res. 18. Februar 2005;96(3):280–91.
- Willis AI, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. Vascular Smooth Muscle Cell Migration: Current Research and Clinical Implications. Vasc Endovascular Surg. 1. Januar 2004;38(1):11–23.
- Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. Circ Res. 1. April 1986;58(4):427–44.
- 22. Ross R. Cell Biology of Atherosclerosis. Annu Rev Physiol. 1995;57(1):791–804.
- Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. Circ Res. 19. Februar 2016;118(4):692–702.
- 24. SZEKANECZ Z, BESENYEI T, PARAGH G, KOCH AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Autoimmunity. November 2009;42(7):563–73.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications.
 Biochem Pharmacol. 1. Februar 2001;61(3):253–70.
- 26. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, u. a. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J Biol Chem. 15. Mai 1988;263(14):6579–87.
- Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. Semin Cancer Biol. 1. Juni 1999;9(3):211–20.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, u. a. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature. April 1996;380(6573):439–42.

- 29. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, u. a. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. Nat Med. April 2000;6(4):460–3.
- 30. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. Oncogene. Dezember 2000;19(53):6122–9.
- Zlotnik A, Yoshie O. The Chemokine Superfamily Revisited. Immunity. 25. Mai 2012;36(5):705–16.
- Proudfoot AEI. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol. Februar 2002;2(2):106–15.
- Chensue SW. Molecular Machinations: Chemokine Signals in Host-Pathogen Interactions. Clin Microbiol Rev. Oktober 2001;14(4):821–35.
- Weinstein EJ, Head R, Griggs DW, Sun D, Evans RJ, Swearingen ML, u. a. VCC1, a novel chemokine, promotes tumor growth. Biochem Biophys Res Commun. 10.
 November 2006;350(1):74–81.
- Hernández-Ruiz M, Zlotnik A. Mucosal Chemokines. J Interferon Cytokine Res. 1. Februar 2017;37(2):62–70.
- Burkhardt AM, Maravillas-Montero JL, Carnevale CD, Vilches-Cisneros N, Flores JP, Hevezi PA, u. a. CXCL17 Is a Major Chemotactic Factor for Lung Macrophages. J Immunol. 8. Januar 2014;193(3):1468–74.
- Maravillas-Montero JL, Burkhardt AM, Hevezi PA, Carnevale CD, Smit MJ,
 Zlotnik A. Cutting Edge: GPR35/CXCR8 Is the Receptor of the Mucosal Chemokine
 CXCL17. J Immunol. 1. Januar 2015;194(1):29–33.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. Immunity. 1. Februar 2000;12(2):121–7.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, u. a. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. J Biol Chem. 11. Oktober 1995;270(45):27348–57.

- 40. Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. Front Biosci Elite Ed. 1. Juni 2009;1:44–51.
- 41. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, u. a. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 7. Dezember 1999;96(25):14470–5.
- Homey B, Alenius H, Müller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, u. a. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. Nat Med. Februar 2002;8(2):157–65.
- 43. Pisabarro MT, Leung B, Kwong M, Corpuz R, Frantz GD, Chiang N, u. a. Cutting Edge: Novel Human Dendritic Cell- and Monocyte-Attracting Chemokine-Like Protein Identified by Fold Recognition Methods. J Immunol. 15. Februar 2006;176(4):2069–73.
- 44. Matsui A, Yokoo H, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Chun NAL, Kadouchi I, u. a. CXCL17 Expression by Tumor Cells Recruits CD11b+Gr1highF4/80– Cells and Promotes Tumor Progression. PLoS ONE [Internet]. 29. August 2012 [zitiert 28. Mai 2015];7(8). Verfügbar unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3430639/
- 45. Lee WY, Wang CJ, Lin TY, Hsiao CL, Luo CW. CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. Am J Physiol - Endocrinol Metab. 1. Januar 2013;304(1):E32–40.
- Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. N Engl J Med. 18. November 1971;285(21):1182–6.
- 47. Mu X, Chen Y, Wang S, Huang X, Pan H, Li M. Overexpression of VCC-1 gene in human hepatocellular carcinoma cells promotes cell proliferation and invasion. Acta Biochim Biophys Sin. August 2009;41(8):631–7.
- Ohlsson L, Hammarström ML, Lindmark G, Hammarström S, Sitohy B. Ectopic expression of the chemokine CXCL17 in colon cancer cells. Br J Cancer. 15. März 2016;114(6):697–703.

- 49. Guo YJ, Zhou YJ, Yang XL, Shao ZM, Ou ZL. The role and clinical significance of the CXCL17-CXCR8 (GPR35) axis in breast cancer. Biochem Biophys Res Commun. 25. November 2017;493(3):1159–67.
- 50. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, u. a. CXCL17 is a Mucosal Chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity. J Immunol Baltim Md 1950. 15. Juni 2012;188(12):6399–406.
- 51. Hernández-Ruiz M, Zlotnik A, Llorente L, Hernandez-Molina G. Markedly high salivary and lacrimal CXCL17 levels in primary Sjögren's syndrome. Joint Bone Spine [Internet]. 19. Mai 2017 [zitiert 10. März 2018]; Verfügbar unter: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X17301057
- O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HHQ, u. a. Discovery of Three Novel G-Protein-Coupled Receptor Genes. Genomics. 15. Januar 1998;47(2):310–3.
- 53. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, u. a. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. J Biol Chem. 8. April 2006;281(31):22021–8.
- Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. FEBS Lett. 18. September 2006;580(21):5003–8.
- 55. Okumura Shun-ichiro, Baba Hiroko, Kumada Tatsuro, Nanmoku Koji, Nakajima Hirofumi, Nakane Yasushi, u. a. Cloning of a G-protein-coupled receptor that shows an activity to transform NIH3T3 cells and is expressed in gastric cancer cells. Cancer Sci. 19. August 2005;95(2):131–5.

- 56. Paluszkiewicz P, Zgrajka W, Saran T, Schabowski J, Piedra JLV, Fedkiv O, u. a. High concentration of kynurenic acid in bile and pancreatic juice. Amino Acids. 1. Oktober 2009;37(4):637–41.
- 57. Divorty N, Mackenzie AE, Nicklin SA, Milligan G. G protein-coupled receptor 35: an emerging target in inflammatory and cardiovascular disease. Front Pharmacol [Internet]. 10. März 2015 [zitiert 28. Mai 2015];6. Verfügbar unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354270/
- 58. Ellinghaus D, Folseraas T, Holm K, Ellinghaus E, Melum E, Balschun T, u. a. Genome-wide association analysis in Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis identifies risk loci at GPR35 and TCF4. Hepatology. 1. September 2013;58(3):1074–83.
- Liu W, Xie X, Wu J. Mechanism of lung adenocarcinoma spine metastasis induced by CXCL17. Cell Oncol. 1. April 2020;43(2):311–20.
- Bolós V, Gasent JM, López-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. OncoTargets Ther. 24. Juni 2010;3:83– 97.
- Kaiser H. A. J. Landré-Beauvais (1772–1840)—der wirkliche Erstbeschreiber der rheumatoiden Arthritis. Z Für Rheumatol. 1. Oktober 2004;63(5):430–5.
- 62. Schumacher HR, Bautista BB, Krauser RE, Mathur AK, Gall EP. Histological appearance of the synovium in early rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum. 1. Juni 1994;23(6):3–10.
- 63. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, u. a. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum. Mai 2001;44(5):1003–12.

- Athanasou NA, Quinn J. Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow derived cells. Ann Rheum Dis. 1. Mai 1991;50(5):311–5.
- 65. Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. Dezember 2005;1(2):102–10.
- McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med. 8.
 Dezember 2011;365(23):2205–19.
- 67. Szekanecz Z, Strieter RM, Kunkel SL, Koch AE. Chemokines in rheumatoid arthritis. Springer Semin Immunopathol. 1998;20(1–2):115–32.
- 68. Ghosh P, Guidolin D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? Semin Arthritis Rheum. August 2002;32(1):10–37.
- 69. Scrivo Rossana, Di Franco Manuela, Spadaro Antonio, Valesini Guido. The Immunology of Rheumatoid Arthritis. Ann N Y Acad Sci. 29. August 2007;1108(1):312–22.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid Arthritis. Cell. 3. Mai 1996;85(3):307–10.
- Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2002;4(Suppl 3):S81–90.
- 72. Spector TD. Rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. August 1990;16(3):513–37.
- 73. Symmons DPM. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. Best Pract Res Clin Rheumatol. 1. Dezember 2002;16(5):707–22.
- van der Pouw Kraan TCTM, van Gaalen FA, Kasperkovitz PV, Verbeet NL,Smeets TJM, Kraan MC, u. a. Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: Evidence

for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues. Arthritis Rheum. 1. August 2003;48(8):2132–45.

- Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. The Lancet. 10. Juni 2017;389(10086):2338–48.
- 76. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, u. a. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis. 1. September 2010;69(9):1580–8.
- 77. Bodolay Edit, Koch Alisa E., Kim Joon, Szegedi Gyula, Szekanecz Zoltan. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. J Cell Mol Med. 1. Mai 2007;6(3):357–76.
- Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. Mai 2005;17(3):293–8.
- 79. Hess A, Axmann R, Rech J, Finzel S, Heindl C, Kreitz S, u. a. Blockade of TNF-α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci. 1. März 2011;108(9):3731–6.
- Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, u. a. Synoviocyte-Derived CXCL12 Is Displayed on Endothelium and Induces Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. J Immunol. 15. Februar 2003;170(4):2147–52.
- Iwamoto T, Okamoto H, Kobayashi S, Ikari K, Toyama Y, Tomatsu T, u. a. A role of monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 from chondrocytes in rheumatoid arthritis. FEBS J. 1. September 2007;274(18):4904–12.
- 82. Radstake T, van der Voort R, ten B, de Waal MM, Looman M, Figdor C, u. a. Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation by Fc gamma receptors. Ann Rheum Dis. März 2005;64(3):359–67.

- Koch AE. Angiogenesis: Implications for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1. Juni 1998;41(6):951–62.
- Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. Angiogenesis. 1. Oktober 2015;18(4):433–48.
- 85. Amin MA, Mansfield PJ, Pakozdi A, Campbell PL, Ahmed S, Martinez RJ, u. a. Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways. Arthritis Rheum. 1. Juni 2007;56(6):1787–97.
- 86. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, u. a. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells. Am J Pathol. April 1999;154(4):1125–35.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, u. a. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. J Biol Chem. 21. Oktober 2005;280(42):35760–6.
- Santos LL, Morand EF. The role of macrophage migration inhibitory factor in the inflammatory immune response and rheumatoid arthritis. Wien Med Wochenschr. 1. Januar 2006;156(1–2):11–8.
- 89. Bodnar RJ, Yates CC, Wells A. IP-10 Blocks Vascular Endothelial Growth Factor– Induced Endothelial Cell Motility and Tube Formation via Inhibition of Calpain. Circ Res [Internet]. 17. März 2006 [zitiert 8. März 2018];98(5). Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826264/
- 90. Meune C, Touzé E, Trinquart L, Allanore Y. High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. Arch Cardiovasc Dis. 1. April 2010;103(4):253–61.

- 91. Cavagna L, Boffini N, Cagnotto G, Inverardi F, Grosso V, Caporali R. Atherosclerosis and Rheumatoid Arthritis: More Than a Simple Association. Mediators Inflamm [Internet]. 2012 [zitiert 26. Januar 2018]; Verfügbar unter: https://www.hindawi.com/journals/mi/2012/147354/
- 92. Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. Arthritis Care Res. 15. Dezember 2008;59(12):1690–7.
- Gerli R, Schillaci G, Giordano A, Bocci EB, Bistoni O, Vaudo G, u. a.
 CD4+CD28– T Lymphocytes Contribute to Early Atherosclerotic Damage in Rheumatoid Arthritis Patients. Circulation. 8. Juni 2004;109(22):2744–8.
- Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, u. a. Monoclonal T-Cell Proliferation and Plaque Instability in Acute Coronary Syndromes. Circulation. 27. Juni 2000;101(25):2883–8.
- 95. Sattar N, McInnes IB. Vascular comorbidity in rheumatoid arthritis: potential mechanisms and solutions. Curr Opin Rheumatol. Mai 2005;17(3):286.
- 96. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, u. a. Long-Term Interleukin-6 Levels and Subsequent Risk of Coronary Heart Disease: Two New Prospective Studies and a Systematic Review. PLoS Med [Internet]. April 2008 [zitiert 25. Februar 2018];5(4). Verfügbar unter:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2288623/

- 97. Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. Nat Rev Drug Discov. Mai 2006;5(5):399–411.
- Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J. Chronic Inflammatory Diseases and Cardiovascular Risk: A Systematic Review. Can J Cardiol. 1. März 2011;27(2):174–82.

- 99. Gall JG, Pardue ML. FORMATION AND DETECTION OF RNA-DNA HYBRID MOLECULES IN CYTOLOGICAL PREPARATIONS*. Proc Natl Acad Sci U S A. Juni 1969;63(2):378–83.
- 100. Jensen E. Technical Review: In Situ Hybridization. Anat Rec. 1. August 2014;297(8):1349–53.
- 101. Jin Long, Lloyd Ricardo V. In situ hybridization: Methods and applications. J Clin Lab Anal. 7. Dezember 1998;11(1):2–9.
- 102. Coons AH. The Beginnings of Immunofluorescence. J Immunol. 1. November 1961;87(5):499.
- 103. Goding JW. 12 Immunofluorescence. In: Monoclonal Antibodies (Third Edition)
 [Internet]. London: Academic Press; 1996 [zitiert 22. März 2018]. S. 352–99. Verfügbar
 unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780122870231500602
- 104. Janes KA, Wang CC, Holmberg KJ, Cabral K, Brugge JS. Identifying single-cell molecular programs by stochastic profiling. Nat Methods. April 2010;7(4):311–7.
- 105. Kuchen S, Seemayer CA, Neidhart M, Gay RE, Gay S. In situ hybridization of synovial tissue. Methods Mol Med. 2007;135:65–75.
- 106. Mucke J, Hoyer A, Brinks R, Bleck E, Pauly T, Schneider M, u. a. Inhomogeneity of immune cell composition in the synovial sublining: linear mixed modelling indicates differences in distribution and spatial decline of CD68+ macrophages in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther [Internet]. 2016 [zitiert 27. November 2017];18. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4947315/
- 107. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, u. a. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. August 2012;40(15):e115.
- 108. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 5. Oktober 1990;215(3):403–10.

- 109. Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 1, mRNA [Internet]. 2022 [zitiert 27. Februar 2023]. Verfügbar unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002046.7
- 110. Homo sapiens C-X-C motif chemokine ligand 17 (CXCL17), transcript variant 1, mRNA [Internet]. 2023 [zitiert 27. Februar 2023]. Verfügbar unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_198477.3
- Schmitz GG, Walter T, Seibl R, Kessler C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. Anal Biochem. 1991;192(1):222–31.
- 112. Regenbogen J. Herstellung und Analyse normalisierter cDNA-Banken. München: Utz, Wiss; 1997. 180 S. (Biochemie).
- 113. Homo sapiens actin alpha 2, smooth muscle (ACTA2), transcript variant 1, mRNA
 [Internet]. 2023 [zitiert 27. Februar 2023]. Verfügbar unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001141945.3
- 114. Roche Diagnostics GmbH (ed.) [Online]. DIG Application Manual for Filter Hybridization [Internet]. 4th edn. Mannheim, Germany; 2008 [zitiert 22. Oktober 2015].
 Verfügbar unter: http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05353149001_08.08.pdf
- 115. Arndt T, Rothhämel S. Detektion von mRNA und Protein in situ. In: Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.
 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; 2012.
- 116. Pitzalis C, Kelly S, Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. Curr Opin Rheumatol. Mai 2013;25(3):334.
- 117. Crnogorac-Jurcevic T, Poulsom R, Lemoine NR. The molecular pathology of cancer. In: Knowles MA, Selby P, Herausgeber. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. New York: Oxford University Press; 2005. S. 356–68.

- 118. Hayat MA. Comparison of Immunhistochemistry, in situ Hybridization, Fluorescence in situ Hybridization, and Chromogenic in situ Hybridization. In: Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas Volume 1, Volume 1, [Internet]. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; 2004 [zitiert 12. Mai 2017]. S. 3–11. Verfügbar unter: http://www.123library.org/book_details/?id=44357
- 119. Wilson KH, Schambra UB, Smith MS, Page SO, Richardson CD, Fremeau RT,u. a. In situ hybridization: identification of rare mRNAs in human tissues. Brain ResProtoc. Mai 1997;1(2):175–85.
- 120. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, u. a. Expression of von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: A potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. Int J Cancer. 15. Januar 2000;85(2):281–8.
- 121. Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J, Coller HA. An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalinfixed, Paraffin-embedded Tissue. J Histochem Cytochem. 1. April 2008;56(4):347–58.
- 122. Otali D, Stockard CR, Oelschlager DK, Wan W, Manne U, Watts SA, u. a. THE COMBINED EFFECTS OF FORMALIN FIXATION AND INDIVIDUAL STEPS IN TISSUE PROCESSING ON IMMUNO-RECOGNITION. Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm. Oktober 2009;84(5):223–47.
- Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. Biotech Histochem. 1. Januar 2007;82(3):133–40.
- 124. Honvo-Houéto E, Truchet S. Indirect Immunofluorescence on Frozen Sections of Mouse Mammary Gland. J Vis Exp [Internet]. 1. Dezember 2015 [zitiert 2. Oktober 2016];(106). Verfügbar unter: http://www.jove.com/video/53179/indirectimmunofluorescence-on-frozen-sections-of-mouse-mammary-gland

- 125. Rothschild BM, Masi AT. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: A vascular hypothesis. Semin Arthritis Rheum. 1. August 1982;12(1):11–31.
- 126. Rooney M, Condell D, Quinlan W, Daly L, Whelan A, Feighery C, u. a. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. August 1988;31(8):956–63.
- 127. Owen JD, Strieter R, Burdick M, Haghnegahdar H, Nanney L, Shattuck-Brandt R, u. a. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine β and γ proteins. Int J Cancer. 26. September 1997;73(1):94–103.
- 128. Yatsunami J, Tsuruta N, Ogata K, Wakamatsu K, Takayama K, Kawasaki M, u. a. Interleukin-8 participates in angiogenesis in non-small cell, but not small cell carcinoma of the lung. Cancer Lett. 25. November 1997;120(1):101–8.
- 129. Brown RobertA, Weiss JacquelineB, Tomlinson IanW, Phillips P, Kumar S. ANGIOGENIC FACTOR FROM SYNOVIAL FLUID RESEMBLING THAT FROM TUMOURS. The Lancet. 29. März 1980;315(8170):682–5.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res. 1. November 2014;1843(11):2563–82.
- 131. Ciftci O, Yilmaz S, Topcu S, Caliskan M, Gullu H, Erdogan D, u. a. Impaired coronary microvascular function and increased intima-media thickness in rheumatoid arthritis. Atherosclerosis. Juni 2008;198(2):332–7.
- 132. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 5. Juni 1992;267(16):10931–4.
- 133. Park S, Lee S, Nam S, Im D. GPR35 mediates lodoxamide-induced migration inhibitory response but not CXCL17-induced migration stimulatory response in THP-1 cells; is GPR35 a receptor for CXCL17? Br J Pharmacol. Januar 2018;175(1):154–61.

- Binti Mohd Amir NAS, Mackenzie AE, Jenkins L, Boustani K, Hillier MC,
 Tsuchiya T, u. a. Evidence for the Existence of a CXCL17 Receptor Distinct from
 GPR35. J Immunol Author Choice. 15. Juli 2018;201(2):714–24.
- 135. Gowhari Shabgah A, Jadidi-Niaragh F, Ebrahimzadeh F, Mohammadi H, Askari E, Pahlavani N, u. a. A comprehensive review of chemokine CXC17 (VCC1) in cancer, infection, and inflammation. Cell Biol Int. 2022;46(10):1557–70.
- 136. Gong F han, Xiao X qiang, Zhang X ping, Long L, Huang S, Wang X sheng, u. a. Association Between Unstable Angina and CXCL17: a New Potential Biomarker. Open Med. 8. Dezember 2019;14:939–44.
- 137. Hsu YL, Yen MC, Chang WA, Tsai PH, Pan YC, Liao SH, u. a. CXCL17-derived CD11b+Gr-1+ myeloid-derived suppressor cells contribute to lung metastasis of breast cancer through platelet-derived growth factor-BB. Breast Cancer Res. 12. Februar 2019;21(1):23.
- 138. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, u. a. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. Neuropharmacology. 1. Juni 2011;60(7):1227–31.
- McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. The Lancet. 10. Juni 2017;389(10086):2328–37.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. The Lancet. 25. September 2010;376(9746):1094–108.

6. Anhang

Produktname	Bezugsquelle
Aqua	B. Braun, Melsungen, Deutschland
0,2 M HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
2 M HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
5 M NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antibody diluent with background reducing compo-	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
nents	
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	Roche Diagnostics, Mannheim
Denhardt's Lösung (50x-konzentriert)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dextran Sulfate 50 % Solution	EMD Millipore, Temecula, CA, USA
Dextran sulfate sodium salt, from Leuconostoc spp.	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics, Mannheim
-Waschpuffer (10x-konzentriert)	
-Maleinsäure-Puffer (10x-konzentriert)	
-Blockierungslösung (10x-konzentriert)	
-Detektionspuffer (10x-konzentriert)	
Einbettungsmittel zur Gefrierschnittvorbereitung	Slee Technik GmbH, Mainz
Essigsäureanhydrid Acetic anhydride	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut (99,9 %) AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Langenfeld
Formamid	EMD Millipore, Temecula, CA, USA
Formamid, deionisiert (<i>Formamide</i> \geq 99.5 % (<i>GC</i>),	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
BioReagent, for molecular biology)	
Glycergel	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Goat Anti-Mouse IgG Antibodies	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Hefe-t-RNA (20 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Heringsspermien-DNA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Human Lung Frozen Sections (HF-601-2Y)	Zyagen, Life Science, San Diego, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung 0,1 % für die	Merck, Darmstadt, Germany
Mikroskopie	
Levamisol Tropfen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Monoclonal Anti-a Smooth Muscle Actin (IgG2a)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
NBT/BCIP stock solution	Roche Diagnostics, Mannheim
Negative Control Mouse IgG1	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Negative Control Mouse IgG2a	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Oligonukleotid-Sonden	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS (10x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Purified Mouse Anti-Human vWF	BD Biosciences, Heidelberg
RNÅse A	Roche Diagnostics, Mannheim
Rnase AWAY®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
SSC-Puffer (Saline-sodium citrate buffer), 20x-	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
konzentriert	
TE-7 (Mouse anti-human fibroblasts monoclonal	Chemicon GmbH, Limburg an der Lahn
antibody)	
Triethanolamin 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin from porcine pancreas (lyophilized powder,	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Type II-S)	
VectaMount AQ Aqueous Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Water (Molecular Biology Reagent)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 19 Verwendete Geräte	
Produktname	Bezugsquelle
Brutschrank Function Line Typ BB 16 CU	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf PCR-Cooler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
feuchte Kammer	Eigenanfertigung
GFL Schüttelwasserbad 1092	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwe-
	del
Heizblock Unitek HB-130	Miyachi Unitek, Monrovia, CA, USA
Heizplatte Digsi-Therm	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Kryostat Jung CM3000	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Laborabzug (Vinitex Air Typ TA) 1500-900	Vinitex Laboreinrichtungen GmbH + Co. KG, Cos-
	wig
Magnetrührer (MR3001)	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eber-
	stadt
Mikroskop Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Farbkamera Nikon DS Vi 1	Nikon, Düsseldorf
Pipetten Eppendorf Reference® variabel	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage Sartorius 1465	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelplatte	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam,
	Niederlande
Thermocycler, peqSTAR	VWR Peqlab, Erlangen
Thermomix 1419	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle 20 Verwendete Programme

Produktname	Bezugsquelle
Adobe Illustrator CS2, Version 12.0.0	Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA
ImageJ, Version 1.52a	Wayne Rasband, NIH, USA
	(https://imagej.nih.gov/ij/)
Inkscape, Version 1.2.2	Inkscape-Projekt (https://inkscape.org/de/)
Mikroskopsoftware NIS-Elements F	Nikon, Düsseldorf

Tabelle 21 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produktname	Bezugsquelle
1,5-ml-Safe-Lock-Tube PCR-clean	Eppendorf AG, Hamburg
Adhäsionsobjektträger, Superfrost® Plus	VWR International GmbH, Langenfeld
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Glasküvetten (Objektträgerkästen nach Hellendahl)	Karl Hecht GmbH&Co KG "Assistent" 97647 Sond-
	heim v. d. Rhön
Nylonmembranen, positiv geladen	Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger Starfrost® Advanced Adhesive, ge-	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH,
schliffen	Edermünde, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus® Gold	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger-Versandbehälter	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Hei-
	delberg, Deutschland
Parafilm® M	Bemis Flexible Packaging, Meckenheim
PCR Soft-Tubes, 0,2 ml, farblos (DNA-, DNAse-,	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
RNAsefrei)	
PCR Soft-Tubes, 0,5 ml, farblos (DNA-, DNAse-,	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
RNAsefrei)	
pH-Indikatorstäbchen (nicht blutend) pH 0-14	Merck, Darmstadt, Germany
pH-Indikatorstäbchen (nicht blutend) pH 6,5-10,0	Merck, Darmstadt, Germany
Pipettenspitzen mit Filter (Tip One, PCR clean)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Polypropylenröhrchen (Tubes)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, Polystyrol	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Danksagung

Für die Überlassung des Themas danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Doktor Stefan Vordenbäumen, der diese Arbeit mit viel Geduld betreut hat und alle meine Fragen stets zeitnah beantwortet hat.

Meinem Zweitbetreuer Herrn Professor Doktor Matthias Schneider danke ich für die konstruktive Begleitung des Projekts.

Für die Schaffung der Rahmenbedingungen sowie die Bereitstellung aller benötigten Arbeitsmittel und Geräte danke ich dem Hiller Forschungslabor und der Hiller-Stiftung.

Für die Entnahme der Gewebeproben danke ich den Kolleginnen und Kollegen des Rheinischen Rheumazentrums Meerbusch-Lank.

Mein Dank gilt auch den Patientinnen und Patienten, die mit ihrer Einwilligung in die Verwendung der Gewebeproben diese Arbeit ermöglicht haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Ellen Bleck, der leitenden MTA des rheumatologischen Forschungslabores, für die Einarbeitung in Grundtätigkeiten der Laborarbeit, die technische Unterstützung und aufmunternde Worte in besonders kritischen Phasen der experimentellen Arbeit.

Herrn Professor Doktor Georg Pongratz danke ich für die Unterstützung bei der Vorbereitung des Posters und des Vortrags für den 45. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) in Stuttgart.

Für Ratschläge zum Erstellen von wissenschaftlichen Abbildungen und zum Umgang mit Bildbearbeitungsprogrammen danke ich Dennis Bleck.

Herrn Professor Doktor Peter Angerer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Jennifer Panitz und Marie-Claire Wygand.

Ich danke meinen Eltern Hoa Tran Thi und Can Tang Chieu für ihre bedingungslose Unterstützung.