

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/ Saar
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Michael Pfreundschuh

**p53-, Mdm2-, NF- κ B-, pNF- κ B-, p21-Expression und
Apptoseraten des Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider
Arthritis und Arthrose in Abhängigkeit von den p53 (G72C)- und
Mdm2 (T309G)-DNA-Polymorphismen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von Judith Stephanie Huwer
geb. 05.10.1984 in Homburg

Dekan: Professor Dr. med. Michael D. Menger

Erster Berichtserstatter: Privatdozent Dr. med. Gunter Aßmann

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden am Lehrstuhl/Institut Innere Medizin I im José-Carreras-Zentrum, Zentrum für Immun- und Gentherapie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Die Synovialis-Operationspräparate wurden von der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes (unter der Leitung von Univ.-Professor Dr. med. Dieter Kohn) und der Orthopädischen Klinik der Westpfalz- Klinikum GmbH, Standort II – Kusel, (unter der Leitung von Dr. med. Harald Dinges) zur Verfügung gestellt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heyne K, Conrad M, Dohmen D, Huwer J, Assmann G, Roemer K.(2011) Differential basal levels of MDM-2 transcription induced by p53-P72 and p53-R72. Cell Cycle 9:4028-4030

Heyne K, Huwer J, Zimmer V, Pfreundschuh M, Ney JT, Assmann G (2012) Different apoptotic responses of RA synoviocytes depending on different genotypes of the mdm2 SNP T309 G. Apoptosis. 17:424-427

Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes: N67110 712010

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen und Symbole	1
1	Zusammenfassung	3
	Abstract	5
2	Einleitung	7
2.1	Rheumatoide Arthritis	7
2.2	Arthrose	10
2.3	Der p53-Pathway bei der rheumatoiden Arthritis	11
2.4	Single Nucleotide Polymorphisms (Einzel-Nucleotid-Polymorphismus, SNP) SNPp53 G72C und Mdm2 T309G bei der RA	13
2.5	Ziel der Studie	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Allgemeine Chemikalien	18
3.1.2	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3	Lösungen zur DNA-Isolierung aus Zellen	19
3.1.4	Lösungen für die transiente Transfektion	19
3.1.5	Puffer und Lösungen für Western blotting	19
3.1.6	Molekulargewichtsmarker für Proteine	20
3.1.7	Antikörper	21

3.1.7.1	Primäre Antikörper	21
3.1.7.2	Sekundäre Antikörper	21
3.1.8	Materialien zur Zellkultivierung	21
3.1.9	Stimulantien	22
3.1.10	Computersoftware	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	23
3.2.2	Präparation und Kultivierung der Synoviozyten	23
3.2.3	Ausschluss des Wachstums immunkompetenter Synoviozyten	25
3.2.4	Vermehrung der humanen Synoviozyten unter identischen Bedingungen	36
3.2.5	Zellzyklusverteilung humaner Synoviozyten	37
3.2.6	Vergleich der Zellkonfluenz der Synoviozyten von RA- und Arthrosepateinten	38
3.2.7	Einfrieren und Auftauen primärer Synoviozyten	30
3.2.8	Stimulation der Synoviozyten mit TNF- α und Il-1 β	31
3.2.9	Kultivierung von H1299- und HCT116-Zellen	31
3.2.10	Transiente Transfektion von H1299-Zellen mit Nanofectin	32
3.2.11	DNA-Extraktion aus primären Synoviozyten	32
3.2.12	Proteinextraktion aus primären Synoviozyten	33
3.2.13	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	34
3.2.14	SDS (Sodium dodecylsulfate)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-	

	PAGE)	34
3.2.15	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	35
3.2.16	Western-Blot	36
3.2.17	Blotting	37
3.2.18	Immunologische Proteindetektion	37
3.2.19	Entfernen gebundener Antikörper nach ECL-Färbung („Stripping“)	38
3.2.20	Apoptoseassays	38
3.2.20.1	DNA-Färbung mit Propidiumiodid	38
3.2.20.2	Durchflusszytometrie	40
3.3	Statistik	40
3.4	Versuchsaufbau in Abhängigkeit von der Genotypverteilung	41
3.4.1	Zusammenstellung der Patienten mit RA in Abhängigkeit von den Genotypfrequenzen des p53 SNP (G72C) und Mdm2 SNP (T309G)	41
3.4.2	Zusammenstellung der Patienten mit Arthrose in Abhängigkeit von den Genotypfrequenzen des p53 SNP (G72C) und Mdm2 SNP (T309G)	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Apoptoseraten	43
4.1.1	Vergleich der Apoptoseraten der Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und von Patienten mit Arthrose	43
4.1.2	Vergleich der Apoptoseraten der Synoviozyten von RA-Patienten mit homzygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp) und mit homozygotem Genotyp G/G	44

4.1.3	Vergleich der Apoptoseraten der Synoviozyten von RA-Patienten mit homzygotem Genotyp G/G SNP p53 72 (Wildtyp) Mdm2 und mit homozygotem Genotyp C/C	46
4.2	Darstellung der Proteinbanden von Mdm2, NfκB, phospho- NfκB, p53, p21 und β-Actin mittels Western-Blot-Verfahren	47
4.3	Proteinkonzentrationen von p53 und p21 in Synoviozyten	48
4.3.1	p53- und p21-Proteinkonzentration beim einzelnen Patienten vor und nach Stimulation	48
4.3.1.1	Homozygoter Genotyp SNP p53 G/G (Wildtyp)	49
4.3.1.2	Heterozygoter Genotyp SNP p53 72 G/C	54
4.3.1.3	Homozygoter Genotyp SNP p53 72 C/C	59
4.3.1.4	Homozygoter Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)	62
4.3.1.5	Heterozygoter Genotyp SNP Mdm2 309 G/T	67
4.3.1.6	Homozygoter Genotyp SNP Mdm2 309 G/G	72
4.4	Abgleich der p53/p21- Proteinkonzentrationen mit der Apoptoseaktivität	76
5	Diskussion	77
5.1	Synoviozyten	77
5.1.1	Morphologie und Funktion der Synoviozyten	77
5.1.2	Isolierung und Kultivierung von Synoviozyten	78
5.2	Verteilung der SNP p53 G72C und SNP Mdm2 T309G in der Studienpopulation	80
5.3.1	Detektion der Apoptose	81
5.3.2	Das Apoptoseverhalten der Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider	

	Arthritis und Patienten mit Arthrose	82
5.3.3	Apoptoseverhalten der Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis in Abhängigkeit vom Genotyp	83
5.4	Die Konzentrationen der Proteine p53, p21, Mdm2, NF- κ B und phospho-NF- κ B in Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose	85
6	Literaturverzeichnis	88
7	Danksagung	98

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
bzl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
d.h.	das heißt
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	fötales Kälberserum
FLS	Fibroblast like Synoviocytes
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCT	Humane Kolontumorzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Il-1 β	Interleukin-1beta
l	Liter
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampere
Mdm2	Murine-double-minute 2
mg	milligramm
min	Minute
NaOH	Natriumhydroxid
Nf κ B	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
OA	Arthrose
p	Statistische Signifikanz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Salzlösung

ph	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
POX	Peroxidase
Pro	Prolin
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenendiamin
TNF- α	Tumornekrosefactor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
vs	versus
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung der Gelenke, die unbehandelt über Gelenkdestruktionen bis zur Ankylose oder Multilierung und damit schwerwiegenden Einschränkungen der Gelenkfunktion führt.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, eine mögliche „Funktionalität“ der Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphisms“, SNPs) SNP p53 G72C und SNP Mdm2 T309G bei der Erkrankung „rheumatoide Arthritis“ zu erkennen. Ausgangssituation hierfür ist die vorausgegangene Studie von Assmann et al, die bei RA- Patienten im Vergleich zu gesunden das G-Allel des SNP Mdm2 309 seltener nachwies.

Von Patienten, die wegen einer rheumatoiden Arthritis und von Patienten, die wegen einer Arthrose (Kontrollgruppe) operiert wurden, wurde im Rahmen der Operation synoviales Gewebe gewonnen. Aus den entnommenen Proben erfolgte die Kultivierung von Synoviozyten (fibroblast like synoviocytes, FLS).

Aus ihnen wurde DNA extrahiert, und der Genotyp für die Einzelnukleotidpolymorphismen SNP p53 G72C und SNP Mdm2 T309G wurde bestimmt.

Mittels Propidiumjodidmethode wurde die Apoptoserate der Synoviozyten der Patienten mit rheumatoider Arthritis und der Patienten mit Arthrose in Abhängigkeit vom Allel des SNP Mdm2 T309G und des SNP p53 G72C bestimmt. Dies erfolgte sowohl ohne als auch mit Stimulation mit TNF- α und IL-1 β .

Zusätzlich erfolgte mittels Western Blot, vor und nach Stimulation der kultivierten Zellen mit TNF- α und IL-1 β , die Bestimmung der zellgebundenen Proteinkonzentrationen (Zell Lysate) von p53, Mdm2, Nf κ B, pNf κ B und p21. Als weitere Vergleichsgruppen dienten HCT116-, H1299- und mit Mdm2 transfizierte H1299-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unabhängig vom Genotyp bezüglich p53 und Mdm2 und ohne Stimulation der Zellen eine signifikant niedrigere Apoptoserate der Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (=RA-FLS) ($31,8 \pm 12,6$ %) verglichen mit Synoviozyten von Patienten mit Arthrose (=OA-FLS) ($38,4 \pm 17,2$ %; $p < 0,05$). Auch nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β war die Apoptoserate der RA-FLS ($21,0 \pm 5,1$ %) signifikant niedriger als die Apoptoserate der OA-FLS ($32,4 \pm 16,3$ %; $p < 0,05$).

Die Zelllinien von Patienten mit rheumatoider Arthritis und mit dem homozygoten Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp) zeigten ohne Stimulation eine hoch signifikant reduzierte Apoptoserate

($27,3 \pm 4,3 \%$; $p < 0,01$) im Vergleich zu RA-FLS mit dem homozygoten Genotyp SNP Mdm2 309 G/G ($44,8 \pm 1,2 \%$).

Auch nach Stimulation mit TNF- α und Il-1 β war die Apoptoserate der Synoviozyten der Patienten mit rheumatoider Arthritis und Wildtyp für Mdm2 signifikant niedriger als die Apoptoserate der Synoviozyten der Patienten mit Homozygotie für SNP Mdm2 T309G ($19,2 \pm 2,3 \%$ vs. $26,8 \pm 2,1 \%$; $p < 0,05$).

Der Vergleich der Apoptoseraten von Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und dem homozygoten Genotyp p53 72 G/G (Wildtyp) mit den Apoptoseraten von Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und homozygotem SNP C/C (SNP p53 G72C) ergab zwar eine höhere Apoptoserate der FLS mit SNP G72C, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant.

Diese Ergebnisse bestätigen, wie bereits in früheren Studien und ohne Stimulation mit TNF- α und Il-1 β gezeigt wurde, den anti-apoptischen Faktor als wesentliches Merkmal im Geschehen der rheumatoiden Arthritis. Aus den weiteren Ergebnissen lässt sich ein eher protektiver Effekt des SNP Mdm2 T309G, zumindest aber des homozygoten SNP, bei rheumatoider Arthritis ableiten.

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 mittels Western Blotting zeigten sich weder mit noch ohne Stimulation mit TNF- α und Il-1 β signifikante Unterschiede zwischen den Synoviozyten von RA- und den Synoviozyten von OA-Patienten. Verglichen wurden jeweils Patienten mit gleichem Genotyp bzgl. des SNP p53 G72C und des SNP Mdm2 T309G.

Durch die Stimulation selbst konnten auch innerhalb der beiden Gruppen der Erkrankten (RA und OA) keine signifikanten Änderungen der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 induziert werden. Bei allen Proben zeigte sich vor und nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β ein in etwa gleichsinniges Verhalten der Proteinkonzentrationen von p53 und p21.

Mdm2, Nf κ B und phospho- Nf κ B konnten auf Proteinbasis nur in den Kontrollzellen, aber nicht in den Synoviozyten der Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose detektiert werden.

Die fehlende Signifikanz bei den Konzentrationsunterschieden von p53 und p21 und der fehlende Nachweis von Mdm2, Nf κ B und phospho- Nf κ B liegt zunächst einmal an den sehr niedrigen Konzentrationen dieser Proteine in den untersuchten Zellen. Darüber hinaus müssen die aufgezeigten Veränderungen im Apoptoseverhalten nicht unbedingt mit einem auf Proteinbasis detektierbaren p53-Mdm2-Antagonismus verknüpft sein.

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic, systemic inflammatory disorder that affects synovial joints. The pathology of the disease process often leads to the destruction of the joints up to ankylosis or mutilating changes with seriously impaired function.

The aim of the study was to identify a potential functionality of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) G72C of the tumor suppressor p53 and T309G of the oncogene Mdm2 in rheumatoid arthritis. For that purpose samples of synovial tissue were acquired during joint surgery of patients with rheumatoid arthritis and arthrosis, respectively. From these tissue specimens fibroblasts-like synoviocytes were grown in culture.

Genomic DNA was obtained from the cell lines and the p53 SNP C72G and the Mdm2 SNP T309G were genotyped.

The apoptosis response was detected by cell cycle distribution of fibroblasts-like synoviocytes after DNA staining with propidium iodide followed by flow cytometry analysis. Apoptosis rate measurement was done before and after stimulation of the cells using TNF- α and IL-1 β .

In addition, the protein concentrations of p53, Mdm2, Nf κ B, pNf κ B und p21 were determined in whole synoviocyte extracts using western immunoblots. This was also performed before and after stimulation of the cells using TNF- α and IL-1 β . HCT116-, H1299-cells and Mdm2 transfected H1299-cells served as controls.

In the present study we found independently of the genotype regarding p53 and Mdm2 and without stimulation a significantly lower apoptosis rate of the fibroblast like synoviocytes of the patients with rheumatoid arthritis (31.8 ± 12.6 %) compared with the fibroblast like synoviocytes of the patients with arthrosis (38.4 ± 17.2 %; $p < 0.05$). After stimulation using TNF- α and IL-1 β the apoptosis rate of the synoviocytes of the patients with rheumatoid arthritis (21.0 ± 5.1 %) was also significantly lower in comparison with the synoviocytes of the patients with arthrosis (32.4 ± 16.3 %; $p < 0.05$).

The cell lines of patients with rheumatoid arthritis and homozygosity for Mdm2 genotype T/T (wild type) presented, if not stimulated, with a significantly lower apoptosis rate (27.3 ± 4.3 %; $p < 0.01$) compared with synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and homozygosity for Mdm2 genotype G/G (SNP T309G) ($44,8 \pm 1,2$ %).

After stimulation using TNF- α and IL-1 β the apoptosis rate of the synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and homozygosity for wild type-Mdm2 was also significantly lower in

comparison with synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and homozygosity for SNP T309G-Mdm2 ($19.2 \pm 2.3\%$ vs. $26.8 \pm 2.1\%$; $p < 0.05$).

Neither homozygosity for p53 SNP G72C nor homozygosity for wild type p53 did influence statistically the apoptosis rates of synoviocytes in rheumatoid arthritis.

The present investigation underlines the anti-apoptotic character of synoviocytes in rheumatoid arthritis. Furthermore, in our cell culture in vitro model homozygosity for Mdm2 SNP 309 G/G of rheumatoid arthritis-derived synoviocytes appeared to be associated with a higher apoptotic activity compared to homozygosity for wild type Mdm2 suggesting a protective effect of the SNP.

Determining the protein concentrations of p53 and p21 of the lysates of synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and of patients with arthrosis no statistically significant differences could be found between the groups, neither before nor after stimulation using TNF- α and IL-1 β . We compared patients of identical genotype regarding p53 SNP G72C and Mdm2 SNP T309G.

Within the disease groups (rheumatoid arthritis and arthrosis) stimulation of the synoviocytes using TNF- α and IL-1 β could not induce significant modifications of p53 and p21, but both protein concentrations were found to react concordantly.

Analyses of the cell lysates by standard western immunoblots could detect Mdm2-, NfkB- and phospho- NfkB solely in the control cells but not in synoviocytes of the patients having rheumatoid arthritis or arthrosis.

Lacking significance regarding protein concentrations of p53 and p21 and lacking detection of the proteins Mdm2, NfkB and phospho- NfkB are first due to the low concentrations of the proteins in the cytoplasm of the cell lines examined. Furthermore, the described differences of the apoptotic behavior of synoviocytes of patients suffering from rheumatoid arthritis need not essentially be linked to a p53-Mdm2-antagonism which is detectable by protein measurements.

2 Einleitung

2.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um die häufigste systemische entzündliche Erkrankung der Gelenke mit progressiver Gelenkszerstörung. Etwa 0,5-1% der europäischen Bevölkerung sind heutzutage von der RA betroffen. An RA erkranken vorwiegend Frauen (w:m= 3:1) (Genth, 2002)). Der Erkrankungsgipfel ist das 4.-6. Lebensjahrzehnt. Prinzipiell kann die Erkrankung jedoch in jedem Alter auftreten. Statistisch gesehen ist die Lebenserwartung der Patienten mit RA im Vergleich zur Normalbevölkerung um 5-10 Jahre vermindert. Verantwortlich für die erhöhte Mortalität ist hauptsächlich das gesteigerte kardiovaskuläre Risiko, erst in zweiter Linie ist diese bedingt durch Infekte, Nieren-, Atemwegs-, und Magen-Darm-Erkrankungen. Diese wiederum sind oft durch die Grundkrankheit und/oder Folgen der notwendigen therapeutischen Immunsuppression verursacht.

Ein prompter Krankheitsbeginn ist genauso möglich wie ein schleichendes Auftreten der Symptomatik. Erster Manifestationsort sind meistens die kleinen Gelenke, wo es zu symmetrischen Schwellungen, starken Schmerzen, Druckempfindlichkeit, Überwärmung und Rötung kommt. Vorwiegend sind die kleinen peripheren Gelenke, wie die Metakarpophangealgelenke (MCP), die proximalen Interphangealgelenke (PIP) und die Metatarsophalangealgelenke (MTP) betroffen. Dabei sind die größeren Gelenke wie Ellenbogen-, Schulter- und Hüftgelenke etwas seltener betroffen. Die Symptome können für den Patienten zunächst unspezifisch bleiben, sie beginnen mit einer typischen Morgensteifigkeit, die bei normaler Belastung der Gelenke zurückgeht (Arnett et al., 1988), jedoch auch über Stunden hinweg andauern kann. Durch den eingeschränkten Gelenkgebrauch resultiert eine Muskelatrophie der gelenknahen Muskulatur. Die rheumatoide Arthritis beschränkt sich jedoch nicht ausschließlich auf die Gelenke. Sie verursacht auch sog. Rheumaknoten, Serositiden, Vaskulitiden und verschiedene weitere Erscheinungen. Der Verlauf ist meist schubweise, und bei vielen Patienten führt die Erkrankung zu einer zunehmenden Bewegungseinschränkung und ohne Therapie zur Deformierung der Gelenke mit Knochenerosionen (Genth, 2002).

Synoviale Hyperplasie und Formierung eines Pannus sind typische pathomorphologische Kennzeichen der rheumatoiden Arthritis. Das synoviale Gewebe wird durch lokale Makrophagen, Fibroblasten und aktivierte Lymphozyten infiltriert, und im nächsten Schritt erfolgt die Invasion in

den Knorpel und in den Knochen als Folge der Sekretion Kollagen-degradierender Enzyme (Bodolay et al., 2002; Müller-Ladner und Pap, 2005).

Die genaue Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es scheint jedoch eine fehlgeleitete Aktivierung des Immunsystems eine zentrale Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen. Hiernach gilt die RA als eine „Autoimmunerkrankung“. Dabei sind wichtige Zellen des Immunsystems wie T- und B- Lymphozyten sowie Makrophagen involviert, welche die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Matrixmetalloproteinasen, Interleukin 1 β (IL-1 β) oder Interleukin 6 (IL-6) triggern. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten. Diese sind an der bei der RA beobachteten Gewebe- und Gelenkzerstörung maßgeblich beteiligt (Smith und Haynes, 2002).

Im chronischen Verlauf kommt es zur Entkopplung des metabolisch hochaktiven und autonomen Pannus von der Kontrolle des spezifischen Immunsystems (Neumann et al., 2010).

Wird im Tierexperiment durch genetische Manipulation TNF- α überexprimiert bzw. seine Regulation unterdrückt, ist es möglich, auf diese Weise eine chronische, destruierende Arthritis auszulösen (Fiers, 1991). Ebenso zeigen in-vitro Experimente, dass TNF- α Signalwege in Fibroblasten induziert, die für die Erkrankung von Bedeutung sind. Im Tiermodell kann auch eine Überexpression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 eine Arthritis induzieren (Horai et al., 2000; Atsumi et al., 2002).

Es hat sich gezeigt, dass sich im Rahmen der RA die biologischen Eigenschaften der Fibroblasten verändern. Bei Gesunden sind sie ortsständige Zellen, welche für die Homoöstase im Gelenkspalt sorgen. Bei Erkrankten werden sie durch inflammatorische Marker und auch durch das entzündete Synovium selbst aktiviert. Die inflammatorischen Marker, die die Fibroblasten stimulieren, sind Membran assoziierte und extrazelluläre Matrix assoziierte Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und bioaktive Lipide, die in erster Linie von infiltrierenden Leukozyten und den Fibroblasten selbst synthetisiert werden. Die Entzündung führt letzten Endes zu einer dauerhaften Veränderung der Fibroblasten, was sich zum Beispiel in ihrer Morphologie zeigt. Die Fibroblasten haben nun blasse und große Zellkerne mit prominenten Nukleoli und ein dichtes endoplasmatisches Retikulum. Außerdem zeigen sie ein aggressiv-invasives Verhalten. Sie respektieren nicht mehr die Grenze zum Knorpel, breiten sich über die artikulierenden Flächen aus und bauen die Knorpelmatrix ab (Firestein, 1996; Neumann et al., 2010).

Im Jahr 1983 konnte Stastny die genetische Assoziation der rheumatoiden Arthritis mit Antigenen des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA) nachweisen. Näher beschrieben die genetischen

Zusammenhänge Gregersen, Winchester und Silver (1987). Sie fanden eine Sequenz innerhalb von DR β des HLA Klasse II Moleküls, die an der Bildung der Peptid-Bindungs-Furche in HLA-DR Allel-Formen beteiligt ist, die mit der RA assoziiert sind. Da diese Sequenz sich aber nur bei einem Teil der Erkrankten nachweisen lässt, ist unklar, inwieweit ihr Vorhandensein die Entstehung der Erkrankung beeinflusst. Heute weiß man, dass bestimmte HLA-Allele wie das Shared-Epitop (HLA-DR4) mit einer vermehrten Krankheitshäufigkeit sowie einem ungünstigen Verlauf der RA vergesellschaftet sind (Plenge, 2009).

Neuere Studien haben eine Assoziation der rheumatoiden Arthritis mit weiteren Molekülen der Immunantwort, z.B. der Tyrosinphosphatase N22, dem Zytokinsignalmolekül STAT4, dem Tumornekrosefaktorrezeptor assoziierten Faktor 1 und der Komplementkomponente 5 ergeben (Begovich et al., 2004; Remmers et al., 2007; Plenge et al., 2007).

Außerdem wurden mehrere Genvariationen (sogenannte single nucleotide polymorphisms) für Gene, die für zentrale Entzündungsmediatoren wie Il-1 β und Il-6 sowie TNF- α kodieren, in Assoziation mit gehäuftem Krankheitsauftreten der RA identifiziert.

Ein Einzelnukleotidpolymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) ist eine DNA-Sequenzvariation, die durch Austausch eines einzigen Nukleotids durch ein Nukleotid mit einer anderen Base entsteht. Die Nomenklatur der SNPs ist nicht einheitlich. Die 4 in Frage kommenden Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin werden wie üblich abgekürzt. Dann bedeutet G/C, bzw. G \rightarrow C, bzw. G $>$ C, dass im SNP das Nukleotid mit der Base Guanin durch ein Nukleotid mit der Base Cytosin ersetzt ist. Wenn die Nukleotidnummer im Gen zur Vervollständigung der SNP – Charakterisierung eingesetzt wird, wird der SNP nomenklatorisch z.B als 72G $>$ C usw. oder aber als G72C beschrieben (den Dunnen und Antonarakis, 2000).

Die Untersuchung von Genvariationen in weiteren Genen für Proteine, die typischerweise in der Pathogenese der RA bedeutsam sind, kann beim gegenwärtigen Kenntnisstand ein Ansatz in der Erforschung der Ätiologie dieser Erkrankung sein. Andererseits zeigt die Zwillingsforschung, dass die Konkordanz der rheumatoiden Arthritis bei eineiigen Zwillingen mit 12-16 % relativ niedrig ist (Aho et al., 1986; Silman et al., 1993).

Nach neuen Erkenntnissen zeigen die Osteoklasten und Synoviozyten ein verändertes Muster der Aktivität und der Überlebenszeit bei der RA (Hassan et al., 2010; Marinou et al., 2010). Synoviale Fibroblasten weisen eine Resistenz gegen Apoptose auf, d.h. sie sind unfähig, den programmierten Zelltod zu vollenden, bzw. auf Stimuli, die ihn auslösen, adäquat zu reagieren. Die Ursachen für

diese Apoptoseresistenz sind aber nicht vollständig erforscht (Baier et al., 2003).

2.2 Arthrose

Bei der Arthrose handelt es sich um eine Degeneration des Knorpelgewebes mit sekundärer Knochenläsion und entzündlich bedingter Schrumpfung der Gelenkkapsel. Nicht immer gehen die morphologischen Veränderungen mit einer entsprechenden klinischen Symptomatik einher. Die degenerativen Gelenkerkrankungen sind von großer sozialmedizinischer Bedeutung. Aufgrund der Häufigkeit nimmt die Arthrose unter den Erkrankungen des Bewegungsapparates den größten Anteil und somit eine zentrale Stelle in ihrer Behandlung ein (Reginster und Khaltaev, 2002). Sie betrifft über 60% der älteren Population. Im 65. Lebensjahr gibt es praktisch keinen Menschen mehr ohne degenerative Gelenkveränderungen. Für den Patienten bedeutet die Arthrose in der Regel eine deutliche Einschränkung seiner Lebensqualität. Unter den chronischen Erkrankungen sind Erkrankungen des Bewegungsapparates mit dem stärksten Verlust an Lebensqualität assoziiert (Sprangers et al., 2000). Insbesondere Schmerzen und die Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit wirken sich negativ aus (Reginster und Khaltaev, 2002).

Die Arthrose entwickelt sich aus einem Missverhältnis zwischen Belastung und Belastungsfähigkeit des Gelenkes. Durch die Reduktion des Gelenkstoffwechsels begünstigt auch Immobilisation die Entstehung einer Arthrose.

Die Pathogenese der primären Arthrose basiert auf einer intrinsischen Erkrankung des Knorpels, bei der biochemische und metabolische Veränderungen zu einem Zusammenbruch führen. In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch auch Modelle entworfen, die andere Gelenkanteile wie Knochen oder den Bandapparat in den Mittelpunkt der Genese stellen. Veränderungen des subchondralen Knochens, die dem Knorpelabbau vorangingen, wurden beschrieben und lenkten die Aufmerksamkeit auf diese Region als Ort des primären Geschehens. Andere Untersuchungen konzentrierten sich auf die metabolische Aktivität der Chondrozyten im unveränderten Knorpelgewebe von Arthrosepatienten. Der ausschlaggebende Faktor für den Krankheitsbeginn ist jedoch immer noch unklar (Reginster, 2002). Sekundäre Arthrosen können sich auf dem Boden von metabolischen Störungen wie Gicht und Chondrokalzinose, Fehlbelastungen, Traumen wie Gelenkflächenfrakturen und Luxationen, Entzündungen wie bakterielle Arthritiden und chronische Polyarthritiden oder auch altersabhängig entwickeln. Oft ist auch eine genetische Disposition ererbbar. Als beeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung einer Arthrose gelten Übergewicht, hormonelle Einflüsse sowie frühere operative Eingriffe an den Gelenken. Erhöhte BMI-Werte

scheinen vor allem das Risiko für eine Gonarthrose zu erhöhen (Günther et al., 2002; Hart et al., 1999).

Der Verlauf der Erkrankung ist langsam progredient. Anfangs kommt es zu einem Elastizitätsverlust des Gelenkknorpels mit Veränderung der Knorpelgrundsubstanz und Demaskierung kollagener Fasern. Auf der Röntgenaufnahme wird der Beginn durch Höhenabnahme des Knorpelgewebes (Gelenkspaltverschmälerung) und subchondrale Sklerosierung der Gelenkfläche deutlich. Der Knorpelschaden verursacht Schub- und Scherkräfte an den Gelenkflächenrändern. Dadurch entstehen wulstartige Knochenvorsprünge und im Verlauf bildet sich unter den maximal beanspruchten Arealen der Gelenkflächen der Knorpel zurück. Es kommt zur Zystenbildung und schließlich zum Knochenabschliff. Erst durch den vermehrten Anfall von Knorpelabriebprodukten wird die Arthrose klinisch relevant. Im Frühstadium der Erkrankung kommen therapeutisch krankengymnastische Maßnahmen in Frage (Zustin und Aigner, 2009). Bei starken Schmerzen und konsekutiv eingeschränkter Bewegung ist eine Operation zur Verbesserung der Gelenkmechanik bzw. der Gelenkbiologie in Form einer Gelenkplastik, einer Arthrodesse oder einer Endoprothese notwendig.

2.3 Der p53-Pathway bei der rheumatoiden Arthritis (RA)

Bei der RA konnte eine Apoptoseresistenz von Synoviozyten nachgewiesen werden, so dass die Untersuchung des Tumprogressorproteins p53 für Apoptose und Zellzyklusregulation sinnvoll wurde. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der den normalen Zyklus des Zellwachstums reguliert. Er aktiviert die Transkription von Genen, die das Fortschreiten durch den Zellzyklus kontrollieren und von anderen Genen, die im Falle einer Genomschädigung den Zyklus in der G₁- Phase anhalten oder den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten (Milner, 1995; Dumont et al., 2003; Vogelstein und Kinzler, 2004). P53 spielt dabei auf dem Typ II intrinsischen, dem mitochondrialen Apoptosepfad eine übergeordnete Rolle (Vousden, 2000). Das p53 Protein gilt wegen dieser Rolle in der Koordinierung zellulärer Reaktionen auf genotoxische Belastungen als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992, Levine, 1997). Bei Mäusen und Menschen mit inaktivierender Keimbahnmutation eines Allels des p53 Gens entwickeln sich früh im Leben und mit großer Häufigkeit Tumoren (Garber et al., 1992). Diese Mechanismen schützen effektiv vor genomischer Instabilität und Tumorenstehung (Olson et al., 1994).

In der normalen und nicht belasteten Zelle hat Mdm2 die Schlüsselposition der negativen Regulierung von p53. Mdm2 – Protein ist eine ubiquitär vorkommende Ligase, welche an die Transaktivierungsdomäne von p53 bindet und das Protein ubiquitiniert zur konsekutiven

Degradierung durch das Proteasom (Fuchs et al., 1998; Bond et al., 2005). Darüber hinaus bindet Mdm2-Protein am N-terminalen Ende von p53 und verhindert damit dessen Aktivierung als Transkriptionsfaktor und führt auf diese Weise zur Inaktivierung von p53 (Momand et al., 1992).

Andererseits kann die Ligase Mdm2 selbst destabilisieren und autoubiquitinieren, mit der Folge, dass p53 in der Zelle ansteigt. Diese Autoubiquitinierung ist das Resultat der durch Zellstress aktivierten Mitglieder der Phosphatidylinositol 3 Kinasen (PI3Ks) (Stommel und Wahl, 2004).

Außerdem existiert eine negative Rückkopplung von p53 und Mdm2, indem p53 an den Promotor von Mdm2 bindet und damit die Expression von Mdm2 steigert (Momand et al., 2000, Vogelstein et al., 2000). Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass Mdm2 neben der Negativregulation von p53 eine Funktion ähnlich eines Hitzeschockproteins als sogenanntes "chaperone" annimmt, welches abhängig von bestimmten Cofaktoren entweder p53-Tetramer stabilisierend oder destabilisierend wirken kann.

Da p53 und Mdm2 gegenseitig rückkoppeln, resultiert ein schwingungsfähiges System. Die Oszillationen der p53- und Mdm2-Spiegel als Antwort der Zelle auf Belastungen lassen sich durch DNA-Schädigung, z.B. durch ionisierende Strahlen, provozieren (Lev Bar-Or et al., 2000). Erst wenn es zu einer exzessiven Schädigung der Zelle kommt, nimmt p53 so zu, dass es zu einer irreversiblen Antwort, zur Apoptose, kommt (Bond et al., 2005). Die Oszillationen der p53- und Mdm2-Spiegel treten nur dann auf, wenn ein bestimmtes „optimales“ Verhältnis zwischen der Konzentrationen von p53 und Mdm2 vorliegt. Wenn die basalen Konzentrationen entweder von p53 oder von Mdm2 zu hoch oder zu tief sind, lassen sich die Oszillationen nicht nachweisen (Ma et al., 2005).

Die Einleitung von Zellzyklusarrest oder Apoptose ist von dem Zerfall des p53-Mdm2-Komplexes abhängig. Die verschiedenen Zellnoxen verursachen auf unterschiedliche Weisen die Verdrängung von Mdm2 aus dem Komplex, z.B. durch Phosphorylierung von p53 oder durch Phosphorylierung der p53 bindenden Region von Mdm2 (Moll und Petrenko, 2003; Waning et al., 2010).

Neueren Erkenntnissen zu Folge gibt es zudem eine funktionelle Verbindung zwischen NF- κ B-abhängigen Mechanismen und der p53-Suppression. Dies wurde zunächst in Tumorzellen nachgewiesen. NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ist der Begriff für multiple Homo- und Heterodimere von Polypeptiden, die als Gemeinsamkeit die hochkonservierte Rel-Homologie Domäne enthalten. Sie ist für die Bildung der Dimere und ihr Transport in den Zellkern mit Bindung an die Ziel-DNA verantwortlich (Müller et al., 1995; Gilmore, 2003; O'Dea und Hoffmann, 2010).

In wenigen Zelllinien ist NF- κ B immer im Zellkern vorhanden und damit konstitutiv aktiv. In den meisten Zellen liegt NF- κ B inaktiv im Zytoplasma vor und kann damit die DNA im Zellkern nicht

beeinflussen. Diese Retention im Zytoplasma wird durch die Maskierung der für den Kernimport verantwortlichen Aminosäuresequenz durch Bindung an inhibitorische κ B-Proteine (I κ B) erreicht. Eine Aktivierung, einschließlich der Translokation in den Zellkern, erfolgt durch Abspaltung und Degradation des I κ B (Hayden und Ghosh, 2004). Die Induktion dieses Prozesses erfolgt durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli. Zu ihnen gehören Zytokine, Wachstumsfaktoren, bakterielle und virale Antigene und chemisch-physikalische Noxen.

NF- κ B stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor für die proinflammatorischen Zytokine dar, wie sie bei der rheumatoiden Arthritis gesteigert nachgewiesen werden können. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt unter anderem die Expression von TNF- α (Tian et al., 2005), reguliert also inflammatorische Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle hoch, induziert die Expression von Wachstumsfaktoren und blockiert die Apoptose (Okamoto, 2006).

p53 ist quasi Antagonist von NF- κ B und beeinflusst damit auch die Immunreaktionen (Komarovo et al., 2005). Diese antagonistische Wirkung von NF- κ B und p53 wurde zunächst nur in Tumorzellen nachgewiesen, allerdings auch bei tumorös entarteten Sarkomzellen aus Fibroblasten (Gudkov et al., 2007). Aus diesem Kontext heraus legen die Gemeinsamkeiten der Zelltypen Fibroblast und Synoviozyt (FLS) und die Tatsache, dass eine Vielzahl von Entzündungsprozessen bei der rheumatoiden Arthritis NF- κ B vermittelt ist, die Vermutung nahe, dass die funktionelle Verbindung zwischen NF- κ B und p53 nicht nur in Tumorzellen, sondern auch bei Entzündungsvorgängen der RA eine wichtige Bedeutung hat.

2.4 Single Nucleotide Polymorphisms (Einzel-Nucleotid-Polymorphismus, SNP)

SNP p53 G72C und Mdm2 T309G bei der RA

In p53 und Mdm2 sowie auch in anderen Genen gibt es sogenannte erfolgreiche Punktmutationen, d.h. Basensubstitutionsmutationen, die sich bis zu einem gewissen Grad im Genpool einer Population durchgesetzt haben. Die Einzelnucleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) stellen etwa 90 % aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar (Collins, 1998). Der p53 SNP rs 1042522 hat Guanin statt Cytosin im Codon 72 (CGC statt CCC), dies führt zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Prolin im p53 Protein. Daraus resultieren eine geänderte Bindungskapazität und damit funktionelle Unterschiede des p53 Pro72.

Es sind mehrere Polymorphismen im Mdm2 Gen bekannt. Von diesen ist der SNP rs 2279744 im Nucleotid 309 des ersten Intron im Promotor 1 von Mdm2 am besten charakterisiert. Es handelt sich um eine Basenänderung vom Thymin (Wildtyp) zu Guanin (T309G) (Bond et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Auftretenswahrscheinlichkeit für die rheumatoide Arthritis für die unterschiedlichen Genotypen des SNP Mdm2 T309G vorliegt.

Außerdem wird das Risiko, an rheumatoider Arthritis zu erkranken, zusätzlich modifiziert, je nachdem welcher Genotyp des SNP p53 G72C vorliegt. So konnte ein signifikant krankheitsprotektiver Effekt für das Minorallel des SNP Mdm2 beobachtet werden. Bei Individuen, welche sowohl Träger des Minorallel Mdm2 SNP G als auch Träger des homozygoten Genotyps des SNP p53 72CC sind, zeigt sich eine gesteigerte Erkrankungshäufigkeit für die RA. In der Zusammenschau scheint abhängig vom Genotyp SNP G72C das G-Allel des SNP Mdm2 T309G in einem Fall das Erkrankungsrisiko zu steigern, im andern Fall zu senken (Assmann et al., 2009).

Aus dem Modell mit p53-negativen Mäusen gibt es eindeutige Hinweise, dass das Vorhandensein von p53 die Schwere der Kollagen-induzierten Arthritis und die Gelenkzerstörung vermindert. Des Weiteren zeigte sich auch eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 6, Interleukin 1 beta (IL-1 β) sowie der Metalloproteinase 3 (Yamanishi et al, 2002). Wahrscheinlich ist der diesem Phänomen zugrunde liegende Mechanismus die verminderte Apoptose der entzündeten Synovialis bei p53-Knock-out Mäusen.

Beim Menschen begünstigt bzw. trägt eine veränderte Apoptose zum Pathomechanismus der Gelenkentzündung bei. So zeigt sich bei RA-Synoviozyten (RA-FLS) regelmäßig eine p53-Expression, die in manchen Fällen sogar gesteigert sein kann (Baier et al., 2003).

Das Vorhandensein des Minorallels SNP p53 72C führt im Vergleich zu seinem Majorallel, zur herabgesetzten Apoptose (Dumont et al., 2003). Es konnten keine Unterschiede der Häufigkeit für RA in Abhängigkeit der verschiedenen Allele bzw. Genotypen vom SNP p53 G73C gezeigt werden. Diese Untersuchungsergebnisse zeigen auch eine Übereinstimmung mit anderen Assoziationsstudien bei anderen Patientenkollektiven der RA (Macchioni et al., 2007; Taubert et al., 2000; Lee et al., 2001). Nur 7% der RA-Patienten und 6,6% des gesunden Kollektivs sind Träger des homozygoten Genotyps des Minorallel p53 72C. In der Arbeit von Assmann et al. war die Verteilung der Kontrollgruppe der Genotypen entsprechend der Verteilung einer bereits publizierten Studie für die mitteleuropäische Bevölkerung. Andere Studien haben gezeigt, dass zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedliche Verteilungen der Genotypen vorliegen (Ørsted et al., 2007).

Macchioni et al. veröffentlichten 2007 eine Studie mit 170 RA-Patienten und 200 Kontrollen; in der Studie konnte eine Assoziation für den SNP p53 G72C mit einem gesteigerten RA-Risiko gezeigt werden. Allerdings war die Häufigkeit des homozygoten Genotyps des Minorallels bei den RA-Patienten und auch bei der Kontrollgruppe höher als in unserer Studienpopulation. Außerdem konnte bei den Trägern des homozygoten Genotyps SNP p53 72 CC die höchste Anzahl radiologisch

sichtbarer Knochenerosionen nach 5 jährigem Krankheitsverlauf gezeigt werden.

Mdm2, der wichtigste negative Rückkoppler von p53 wurde 2005 in einer Studie aus Australien in einer Anzahl von Synovialisgewebeproben von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen. Ziel der Studie war ein Vergleich der Mdm2-Proteinmengen in der Synovialis von Patienten, die an Arthrose erkrankt sind, und denen, die an rheumatoider Arthritis leiden, anzustellen. Die Autoren berichten über den Nachweis von höheren Mdm2-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten (Taranto et al., 2005). Für den SNP Mdm2 T309G konnte in Tumorzellen beobachtet werden, dass sich das Expressionsmuster in Abhängigkeit der verschiedenen Genotypen unter Zellstress ändert, wobei das Minorallel G zu höheren Mdm2-Proteinkonzentrationen intrazellulär führt (Bond et al., 2004). In Analogie zu der genannten Studie wäre aufgrund dieser geänderten Funktionalität in Abhängigkeit des Genotyps des SNP Mdm2 T309G eine vermehrte Häufigkeit des Minorallels Mdm2 309 G bzw. des entsprechenden homozygoten Genotyps des Minorallels bei Patienten mit RA im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zu erwarten. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich ein differenzierendes Ergebnis: das G-Allel und der homozygote Genotyp GG des SNP Mdm2 T309G waren signifikant seltener bei Patienten mit RA als im Kontrollkollektiv. Nur in der kleinen Gruppe der Träger des homozygoten C-Allels des SNP p53 G72C steigerte das G-Allel des SNP Mdm2 T309G signifikant das Risiko für RA (Assmann et al., 2009). Es lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Das Risiko für RA kann auf verschiedene Weise durch Mdm2 modifiziert werden. Beim SNP p53 G72C liegt ein Aminosäureaustausch von Arginin mit Prolin vor. Es konnte gezeigt werden, dass p53 Arg72 im Gegensatz zu p53 Pro72 ein stark pro-apoptotisch wirksames Protein ist. Außerdem ist p53 Pro72 im Vergleich zu p53 Arg72 nicht nur nicht pro-apoptotisch, sondern sogar aktiv anti-apoptotisch wirksam. Dies beruht auf einer effizienteren Transaktivierung des Gens für den Inhibitor von Cyklin-abhängigen Kinasen p21-WAF/CIP1 den Zellzyklus anhalten zu können (Dumont et al., 2003). Zellen, die auf diese Weise arretiert sind, sind im Allgemeinen resistenter gegen Apoptose.

Das Onkoprotein Mdm2 ist wichtigster Inhibitor von p53: Einmal durch Destabilisierung von p53 sowie durch aktive Hemmung der Transaktivierung von Genen durch p53.

So konnte beobachtet werden, dass viel Mdm2, also wenig funktionelles p53, und das Vorliegen von p53 Arg72 vor rheumatoider Arthritis schützt, im Umkehrschluss viel Mdm2 und das Vorliegen von p53 Pro72 rheumatoide Arthritis fördert. Aus dieser Erkenntnis lässt sich folgende Erklärung formulieren: p53 Arg72 trägt zur rheumatoiden Arthritis durch Auslösung von Apoptose bei, wobei viel Mdm2 diese Funktion effektiver hemmt als wenig Mdm2. Bei p53 Arg72 wirkt Mdm2 entsprechend protektiv für die RA, wohingegen p53 Pro72 vor Apoptose schützt und dadurch auch vor der Erkrankung RA. Ein erhöhte Proteinkonzentration von Mdm2 hemmt auf die gleiche Weise

p53 Pro72 wie p53 Arg72 und erhöht in diesem Zusammenhang das Erkrankungsrisiko, an rheumatoider Arthritis zu erkranken. Dieses Erklärungsmodell steht jedoch im Gegensatz zu dem Modell, dass die rheumatoide Arthritis eine eher anti-apoptotische Erkrankung ist (Korb et al., 2009).

Ein alternatives Erklärungsmodell für die unterschiedliche Risikokonstellation je nach Genotyp SNP Mdm2 T309G und SNP p53 G72C geht davon aus, dass Mdm2 nachgewiesenermaßen nicht nur wichtiger Negativregulator von p53 ist, sondern noch weitere Funktionen im Zellstoffwechsel und der Steuerung des Zellzyklus inne hat. (Momand J. et al., 2000). Eine von Wawrzynow et al. 2007 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass Mdm2 auch die Funktion eines "chaperone" hat. Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit musste interpretiert werden, dass Mdm2 bei RA eine vorwiegend stabilisierende Funktion der p53-Konformation zeigt, wobei eine Interaktion von Mdm2 und p53 mit dem Hitzeschockprotein HSP90 einen vorübergehenden Proteinkomplex bildet und p53 aktiv bleibt. Eine Degradierung des p53-Komplexes mittels Mdm2-Ubiquitin-Ligase ist für den homozygoten Genotyp p53 72G anzunehmen. Das Protein Mdm2 hat folglich mehrere regulatorische Funktionen in der Zellhomöostase. Mdm2 hat in diesem Erklärungsmodell, auf der einen Seite in Richtung Deaktivierung und Degradierung von p53 hinzuwirken und auf der anderen Seite in Richtung Stabilisierung des p53-Komplexes, in der konservierenden Funktion als "chaperone" zu wirken (Assmann G. et al., 2009).

Es kann nicht abschließend festgelegt werden, welches der beiden Erklärungsmodelle für unsere Beobachtungen eher zutrifft. Darüber kann die Frage nicht geklärt werden, welcher Pathomechanismus bei dem Minorallel des SNP Mdm2 309G des SNP p53 G72C Genotyps auf der einen Seite zur Risikominderung und auf der anderen Seite zur Risikosteigerung für die rheumatoide Arthritis führt.

2.5 Ziel der Studie

In der vorliegenden Studie wurde von Patienten, die wegen einer rheumatoiden Arthritis und von Patienten, die wegen einer Arthrose operiert wurden, im Rahmen der Operation synoviales Gewebe gewonnen und untersucht. Es wurden somit Patienten mit einer immunologisch auffälligen Erkrankung mit Patienten mit einer degenerativen und immunologisch nicht auffälligen Erkrankung verglichen. Eine Vergleichsgruppe mit gesunden Probanden konnte aus ethischen Gründen nicht gebildet werden.

Aus den entnommenen Synoviaprobe erfolgte die Kultivierung von Synoviozyten (fibroblasts like

synoviocytes).

Aus ihnen wurde DNA extrahiert, und der Genotyp für die Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphisms“, SNPs) SNP p53 G72C und SNP Mdm2 T309G wurde bestimmt.

Danach erfolgte mittels Western Blot vor und nach Stimulation der kultivierten Zellen mit TNF- α und IL-1 β , die Bestimmung der zellgebundenen Proteinkonzentrationen (Zell Lysate) von p53, Mdm2, Nf κ B, pNf κ B und p21.

Die Werte wurden dann in Abhängigkeit von den verschiedenen Genotypen für den Einzelnukleotidpolymorphismus SNP p53 G72C und SNP Mdm2 T309G verglichen. Als weitere Vergleichsgruppen dienten HCT116-, H1299- und mit Mdm2 transfizierte H1299-Zellen.

P21 ist primärer Effektor der wachstumsinhibierenden Wirkung von p53, und es besteht eine enge Korrelation zwischen Status von p53 und der Expression von p21 (Adams et al., 1996; Brugarolas et al., 1999).

NF- κ B reguliert inflammatorische Zytokine und Zelladhäsionsmoleküle hoch, induziert die Expression von Wachstumsfaktoren und blockiert die Apoptose (u.a. durch Protein-Protein Interaktion mit p53) (Komarova et al., 2005; Okamoto, 2006).

P21, NF- κ B und pNF- κ B können damit möglicherweise Aussagen über die Funktionalität von p53 und Mdm2 und Mutationen in diesen Genen zulassen.

Zusätzlich wurde mittels Propidiumjodidmethode die Apoptoserate von Fibroblasten der Patienten mit rheumatoider Arthritis und der Patienten mit Arthrose bestimmt. Dies erfolgte vor und nach Stimulierung mit TNF- α und IL-1 β (Tumornekrosefaktor alpha und Interleukin 1beta).

Ebenfalls vor und nach Stimulierung mit TNF- α und IL-1 β wurden die Apoptosenraten von Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis in Abhängigkeit vom Allel des SNP Mdm2 T309G und des SNP p53 G72C bestimmt.

In der vorliegenden Studie wurde somit zunächst ein Zellkulturmodell mit Synoviozyten entwickelt und etabliert. Vor und nach Stimulation mit Zytokinen wurden die Expression von p53, Mdm2, NF- κ B, pNF- κ B und p21 und die Apoptoserate in Abhängigkeit vom Genotyp für SNP p53 G72C und SNP Mdm2 T309G, d.h. die basalen sowie die maximal stimulierbaren Konzentrationen, bestimmt.

Durch diese Untersuchungen soll eine mögliche „Funktionalität“ dieser definierten Genpolymorphismen bei den beiden Erkrankungen rheumatoide Arthritis und Arthrose überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller sind in unten stehenden Tabellen aufgelistet. Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (H₂O_{dd}) angefertigt.

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agarose Rot Garose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL™)	Amersham (Freiburg)
Formaldehyd 4%	Fischar (Saarbrücken)
Glycerin	Caesar und Koretz (Hilden)
Glycin	AppliChem Merck
Isopropanol	Hedinger (Stuttgart)
Magermilchpulver	Töpfer (Dietmannsried)
Methanol	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (München)
Natriumchlorid	Apotheke, UdS
Natriumdihydrogensulfatmonohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogensulfatdihydrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Propidiumiodid	AppliChem (Darmstadt)
RNase A	Roche (Mannheim)
Salzsäure	Roth
β-Mercaptoethanol	Merck
Tissue freezing Medium	Jung (Nussloch)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Hyperfilm ECL™	GE Healthcare (Buckinghamshire UK)
Immobilon-Membran	Millipore (Billerica USA)
Insulinspritze 1ml	BD Biosciences (Oxford UK)
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2,0ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (10ml; 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Whatman™#1	neoLab Migge (Heidelberg)
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellkulturschalen	Sarstedt

Tabelle 2. Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Lösungen zur DNA-Isolierung aus Zellen

Die DNA- Extraktion aus Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Kit von Qiagen (Hilden).

Proteinkinase K (Protease)
Puffer AL
Waschpuffer AW I
Waschpuffer AW II
Puffer AE

Tabelle 3. Verwendete Lösungen zur DNA-Isolierung

3.1.4 Lösungen für die transiente Transfektion

Die transiente Transfektion erfolgte mit Hilfe des Nanofectin Kits von PAA (Linz, Österreich).

3.1.5 Puffer und Lösungen für Western blotting

Puffer	Zusammensetzung
20x PBS	22,8 g/l Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
	6,8 g/l NaHPO ₄ · H ₂ O
	176 g/l NaCl
Tris ph 6,8 für Sammelgel	1M Tris = 121,4 g
Tris ph 8,8 für Trenngel	1M Tris
10x SDS- Laufpuffer	30,3 g/l Tris
	144,1 g/l Glycin
	10 g/l SDS
2x SDS-Ladepuffer („Lämmli-Puffer“) für Proteinextrakte	100 mM Tris ph 6,8
	200 mM DTT (Dithiothreitol)
	20 % Glycerin
	4 % SDS
	0,2 % Bromphenolblau

10x Western- Puffer (WTP) Für 1x WTP	Transfer-	144,2 g/l Glycin
		30,3 g/l Tris
		100 ml 10x WTP
		200 ml Methanol
		700 ml destilliertes H ₂ O
Blocking- Puffer		5 % Magermilchpulver
		1x PBS
“Stripping- Puffer”		174 µl β- Mercatoethanol
		20 ml 10 % SDS
		6,25 ml 1M Tris ph 6,6
		ad 100 ml destilliertes H ₂ O
APS		10 % APS

Tabelle 4. Verwendete Puffer und Lösungen für Western blotting

3.1.6 Molekulargewichtsmarker für Proteine

Das Molekulargewicht von Proteinen wird mit Hilfe eines vorgefärbten Markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) der Firma Fermentas (St. Leon- Rot) bestimmt. Dieser Marker setzt sich aus zehn in E. coli rekombinant hergestellten und gereinigten Polypeptiden zusammen. Die Proteine sind zwischen 10 und 170 kDa groß und an sie wurde ein blauer Farbstoff kovalent gebunden. Als Größenreferenz dienen die 72 kDa Bande, welche orange gefärbt ist und die 10 kDa Bande, welche grün gefärbt ist (Abb.1). Die einzelnen Proteine im Marker besitzen folgendes Molekulargewicht: ~170 / ~130 / ~100 / ~70 / ~55 / ~40 / ~35 / ~25 / ~15 / ~10 [kD].

Außerdem lässt sich mit den vorgefärbten Proteinen überprüfen, ob der Proteintransfer auf eine Nitrozellulose- Membran erfolgreich war.

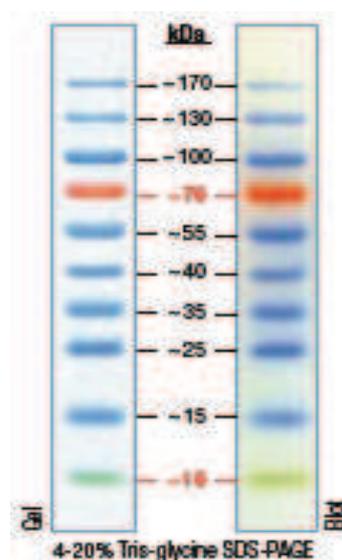


Abbildung 1. PageRuler™ Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichtes, Firma Fermentas (St. Leon-Rot)

3.1.7 Antikörper

3.1.7.1 Primäre Antikörper

<u>Antikörper/Bezeichnung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
DO-1, p53	IgG aus Maus, monoklonal	1:500	Calbiochem (Bad Soden)
Mdm2	IgG aus Maus, monoklonal	1:200	Calbiochem (Cambridge, UK)
NFκB p65	IgG aus Maus, monoklonal	1:200	Abcam (Cambridge, UK)
NFκB p65 (phospho S536)	IgG aus Kaninchen, monoklonal	1:200	Abcam
p21	IgG aus Maus, monoklonal	1:1000	BD-Pharmingen (Heidelberg)
β-Actin	IgG aus Maus, monoklonal	1:10000	Sigma-Aldrich (München)

Tabelle 5. Verwendete primäre Antikörper

3.1.7.2 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper/Bezeichnung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
Anti-Maus-Pox	Peroxidase gekoppelter Anti-Maus-AK	1:2000	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen-Pox	Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen-AK	1:2000	Sigma-Aldrich

Tabelle 6. Verwendete sekundäre Antikörper

3.1.8 Materialien zur Zellkultivierung

<u>Material</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
DMEM low glucose	Glucose 1mg/ml 1 % Natriumpyruvat L-Glutamin	PAA-Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
DMEM high glucose	Glucose 4,5 mg/ml 1 % Natriumpyruvat	PAA-Laboratories GmbH

	L- Glutamin	
McCoy's		PAA- Laboratories GmbH
Penicillin/ Streptomycin		Gibco-invitrogen (Eggenstein)
Amphotericin B		Bristol-Myers Squibb (München)
Hepes	1M Pufferlösung	PAA-Laboratories GmbH
Fötale Kälberserum (FKS)		PAA-Laboratories GmbH
Trypin-EDTA (10x)		PAA-Laboratories GmbH
Dispase II (neutral protease, grade II)	1g Dispase gelöst: in 95ml physiologischer NaCl- Lösung und 5ml Hepes	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Tabelle 7. Verwendete Materialien zur Zellkultivierung

Dem Kulturmedium, DMEM low glucose für primäre Fibroblasten, wird 10% FKS, welches zuvor bei 56°C für 30 min im Wasserbad inaktiviert wird, Penicillin- Streptomycin (1:200), Amphotericin B (1:50000) und Hepes (1:100) hinzugefügt.

3.1.9 Stimulantien

Stimulans	Endkonzentration	Hersteller
Rekombinat Human TNF- α	5ng/ml	R & D Systems (Minneapolis, USA)
Rekombinat Human IL-1 β	2,5ng/ml	R & D Systems

Tabelle 8. Verwendete Stimulantien

TNF- α und IL-1 β werden bei einer Endkonzentration von 5 ng/ml bzw. 2,5 ng/ml in einem Verhältnis von 1:100 zur Stimulation der primären Fibroblasten in vitro eingesetzt.

3.1.10 Computersoftware

Diese Arbeit wurde mit Hilfe des Textverarbeitungsprogramms Microsoft Office Word 2003 erstellt. Für graphische Darstellungen wurde Microsoft Office Excel 2003 benutzt. Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen erfolgt mit dem Programm Image Quant.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Als Zellkultur wird die Kultivierung eukaryotischer Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus, also *in vitro*, bezeichnet.

Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, die sich im Lauf dieser Zellkultur unbegrenzt fortpflanzen können. Es werden sowohl immortalisierte Zelllinien als auch primäre Zellen kultiviert .

Unter einer Primärkultur versteht man eine nicht immortalisierte Zellkultur, die direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde. Zellkulturen können nach Art ihres Wachstums in Adhäsionskultur oder Suspensionskultur eingeteilt werden. Voraussetzung für das Gedeihen dieser sogenannten adhären Zellen ist - im Gegensatz zu Zellen in Suspension - dass sie eine geeignete Unterlage vorfinden, da sie anders als Bakterien nicht über längere Zeit in Suspension überleben können. Sie benötigen zum Anwachsen und zur Proliferation feste Oberflächen, die heute üblicherweise die speziell beschichtete Oberfläche von Zellkulturflaschen bzw. -schalen aus Plastik oder Glas sind. In Anwesenheit eines geeigneten Kulturmediums teilen sich die Zellen und bilden schließlich einen flächendeckenden einschichtigen "Rasen" (Monolayer). Durch die nach Erreichen des Monolayer-Stadiums auftretende Kontakthemmung hört die Zellteilung auf, und die Kultur wird stationär und bleibt über Tage und Wochen intakt.

Für das Wachstum der Zellen *in vitro* ist es von großer Bedeutung, eine möglichst natürliche physiologische Umgebung zu schaffen. Die Zellen werden so in halbsynthetischen gepufferten Medien gehalten, welchen u.a Vitamine, Salze, Mineralstoffe und Aminosäuren zugesetzt werden.

Zur Zellpassage oder Subkultivierung werden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Die Protease Trypsin ist für das Auflösen der Proteinbrücken zwischen den Zellen untereinander und zwischen Zellen und Gefäßboden verantwortlich. EDTA ist ein Komplexbildner, welcher zweifach geladene Ionen, die die Proteinwechselwirkungen unterstützen, komplexiert. Dadurch liegen die Zellen dann vereinzelt und kurzzeitig in Suspension vor und können dann zur Inokulation neuer Kulturen verwendet werden.

3.2.2 Präparation und Kultivierung der Synoviozyten

Die zur Gewinnung von primären Synoviozyten benötigte Synovialis wurde von der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dieter Kohn und der Orthopädischen Klinik der Westpfalz- Klinikum GmbH,

Standort II – Kusel, unter der Leitung von Dr. med. Harald Dinges zur Verfügung gestellt. Die Synovialis wurde von Patienten gewonnen, die sich entweder im Rahmen einer Gon- oder Coxarthrose einer Gelenkersatzoperation unterziehen mussten oder die aufgrund ihrer rheumatoiden Arthritis eine Synovektomie (arthroskopisch oder offen-chirurgisch) erhielten.

Die Synovialis der RA- (rheumatoide Arthritis) Patienten stammte aus folgenden für diese Erkrankung typischen Gelenken: MCP- (Metakarpophalangealgelenk), PIP- (proximales Interphalangealgelenk), Hand-, Ellenbogen-, Knie-, Sprung- und MTP- (Metatarsophalangealgelenk) Gelenke. Um sicher zu sein, dass diese Patienten tatsächlich an RA erkrankt waren, mussten mindestens vier von sieben der ACR- (American College of Rheumatology) Kriterien zutreffen (Arnett et al., 1987).

Damit die Kultivierung der Fibroblasten aus der Synovialis möglich war, musste die Gelenkinnenhaut unmittelbar während der Operationen gewonnen, in einem sterilen Gefäß in PBS als Schutz vor Austrocknung aufbewahrt, auf Eis ins Labor gebracht und zeitnah präpariert werden.

Die Präparation der Synovialis erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank. Die Synovialis wurde in kleine Fragmente zerlegt; dabei wurde darauf geachtet, dass Fettstücke, Blutgefäße und elektrokoaguliertes Gewebe verworfen wurden, um eine Kontamination weitgehend auszuschließen. Ein Teil der zerkleinerten Synovialis-Stücke inkubierte im Anschluss, je nach Menge in einer Lösung mit 18 bzw. 36 ml PBS und 2 bzw. 4 ml Dispase, eine Stunde auf einem Taumler bei Raumtemperatur. Dispase, eine neutrale Protease, dient dazu, die interzellulären Bindungen zu spalten und so die Zellen aus der extrazellulären Matrix zu lösen. Durch die Zerkleinerung der Synovialis in kleine Fragmente konnte eine Oberflächenvergrößerung erreicht und somit der Protease Dispase eine größere Angriffsfläche zum Zell-Verdau geliefert werden.

Der andere Teil der Synovialis wurde für histologische Untersuchungen in 4%igem Formaldehyd eingelegt und in tissue- tek schockgefroren.

Um eine weitestgehend aus einzelnen Fibroblasten bestehende Kultur zu erhalten, wurde die Lösung (Dispase + PBS + Synovialis) mit Hilfe eines Filters der Porengröße 70µm filtriert. Die Zentrifugation der so gewonnenen Lösung erfolgte bei 300 g für 10 min. Das so entstandene Pellett wurde in eine ventilierte 25cm² Kulturflasche mit DMEM (low glucose, 1 mg/ml), welchem 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % Antibiotika (Streptomycin und Penicillin), 1 % Hepes- Puffer und Amphotericin B (1:50000) zugesetzt wurde, überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 7% CO₂- Begasung. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, und bei einer Zelldichte von ca. 80- 90% wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Um eine optimierte Reinheit der Zellkultur zu erreichen (nur Typ B-Synoviozyten, also fibroblast like synoviocytes (FLS); keine Typ A-

Synoviozyten, also Makrophagen), wurde die Zellkultur bis zur dritten Passage durchgeführt.

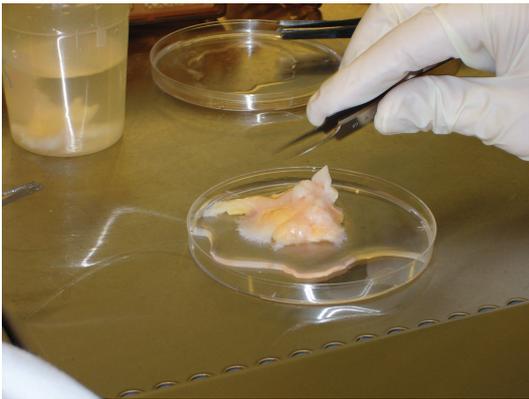


Abbildung 2. Präparation der Synovialis



Abbildung 3. Zerlegung der Synovialis in kleine Fragmente

3.2.3 Ausschluss des Wachstums immunkompetenter Synoviozyten

Es gibt zwei Arten von Synoviozyten, die Typ A- und die Typ B- Zellen (Iwanaga et al., 2000). Die Typ A-Zellen sind aus dem Blut eingewanderte gewebständige Makrophagen. Die Typ B-Zellen hingegen sind die in dieser Arbeit zu untersuchenden "fibroblasts like Synoviocytes" (FLS). Sie sind spindelförmig mit langen Fortsätzen, haben teilweise feine Verästelungen und ein „fischzugartiges“ Wachstumsmuster. Um zu gewährleisten, dass nur Typ B-Zellen in Kultur sind, ist die Kultivierung bis zur dritten Passage notwendig. Dadurch sterben die gewebständigen Makrophagen ab. Um dies zu beweisen, wurden die Zellen in Passage 3 mit fluoreszierenden CD14- und CD45-Antikörpern gefärbt und mittels FACS untersucht.

Die folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis der FACS-Analyse.

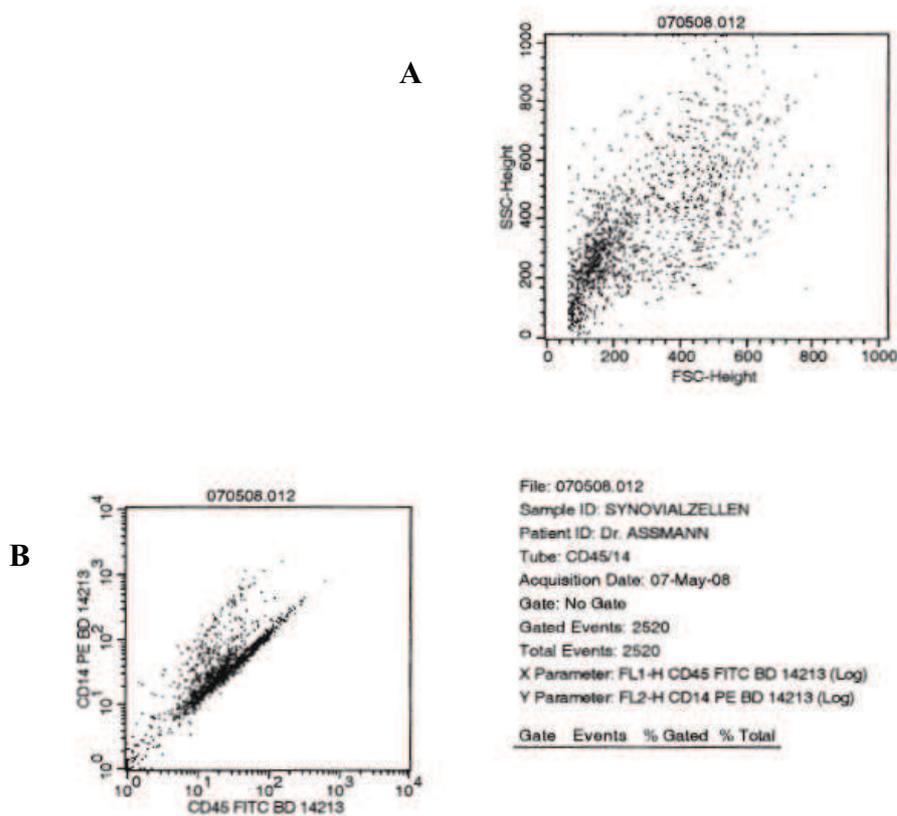


Abbildung 4: Immunphänotypisierung CD14/CD45 positiver Synoviozyten.

Diagramm A zeigt die Normalverteilung der Zellen im peripheren Blut, Diagramm B die Synoviozyten. Man sieht, dass keine CD14- und keine CD45-positive Zellen detektiert werden konnten.

3.2.4 Vermehrung der humanen Synoviozyten unter identischen Bedingungen

Alle zu untersuchenden Synoviozyten, sowohl von Patienten mit Arthrose als auch von Patienten mit rheumatoider Arthritis, wurden bis zu Passage fünf (p5) kultiviert. Das Nährmedium hatte bei allen Zellen die gleiche Zusammensetzung.

Für alle Versuche wurden die Zellen zuvor auf 10 cm Schalen ausgesät. Es wurden ausschließlich Zellen verwendet, die zuvor konfluent waren (Abb.7), d.h. die Zellen befanden sich in sehr engem Kontakt, so dass die Oberfläche des Kulturgefäßes komplett bedeckt war. Die Synoviozyten hören unter dieser Bedingung auf, sich zu teilen, denn es kommt zu einer Kontaktinhibition.

Im Allgemeinen sind Zellen einer Population in der exponentiellen Wachstumsphase auf die einzelnen Zellzyklusphasen verteilt, wobei zu einem gegebenen Zeitpunkt der Prozentsatz der Zellen in einer bestimmten Phase von der relativen Länge dieser Phase abhängt. Bei exponentiell wachsenden Zellen wie z.B. den Synoviozyten sind etwa 40% der Zellen in G1, 40% in S und 20%

in G2/M.

Um zu gewährleisten, dass bei allen Versuchen die Synoviozyten an einem bestimmten, zeitlich scharf begrenzten und genau definierten Punkt im Zellzyklus sind, ist eine Synchronisation der Population notwendig, d.h. möglichst alle Zellen durchlaufen die Phasen des Zellzyklus synchron. Die Synchronisation der Zellen wurde durch Serumentzug (Reduktion der fötalen Kälberserumkonzentration im Wachstumsmedium von 5% auf 1%) für zwei Tage erreicht, wodurch die Zellen nach der Mitose den Zellzyklus verlassen und in die G0 Phase eintreten.

3.2.5 Zellzyklusverteilung humaner Synoviozyten

Die Zellzyklusverteilung wird mittels FACS-Analyse ermittelt (siehe 3.2.20.2). Die einzelnen Zellkerne lagern je nach ihrem DNA-Gehalt unterschiedlich Propidiumiodid (PI) an. Der Grad der Fluoreszenz der Einzelzelle ist damit ein Maß für die DNA-Menge dieser Zelle, so dass sich daraus auf die Zellzyklusphase der Einzelzelle schließen lässt (siehe Abbildung 5. Grundprinzip der FACS-Analyse).

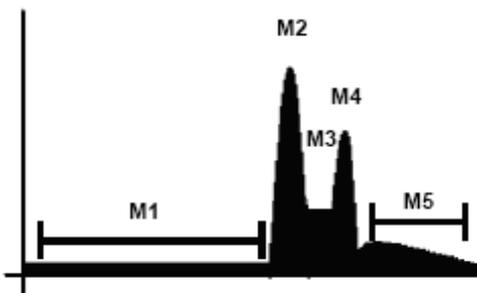


Abbildung 5. Grundprinzip der FACS-Analyse der Zellen nach PI-Färbung

M1 repräsentiert die Zellen mit einem weniger als doppeltem Chromosomensatz ($<2n$ = apoptotische Zellen), M2 die Zellen in der G1-Phase ($2n$), M3 die Zellen der S-Phase ($2n$ bis $4n$), M4 die Zellen in der G2- bzw. M-Phase ($4n$). M5 sind polyploide Zellen.

Die Synoviozyten wurden in der FACS-Analyse auf die Zellzyklusverteilung untersucht. Die meisten Zellen befinden sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus.

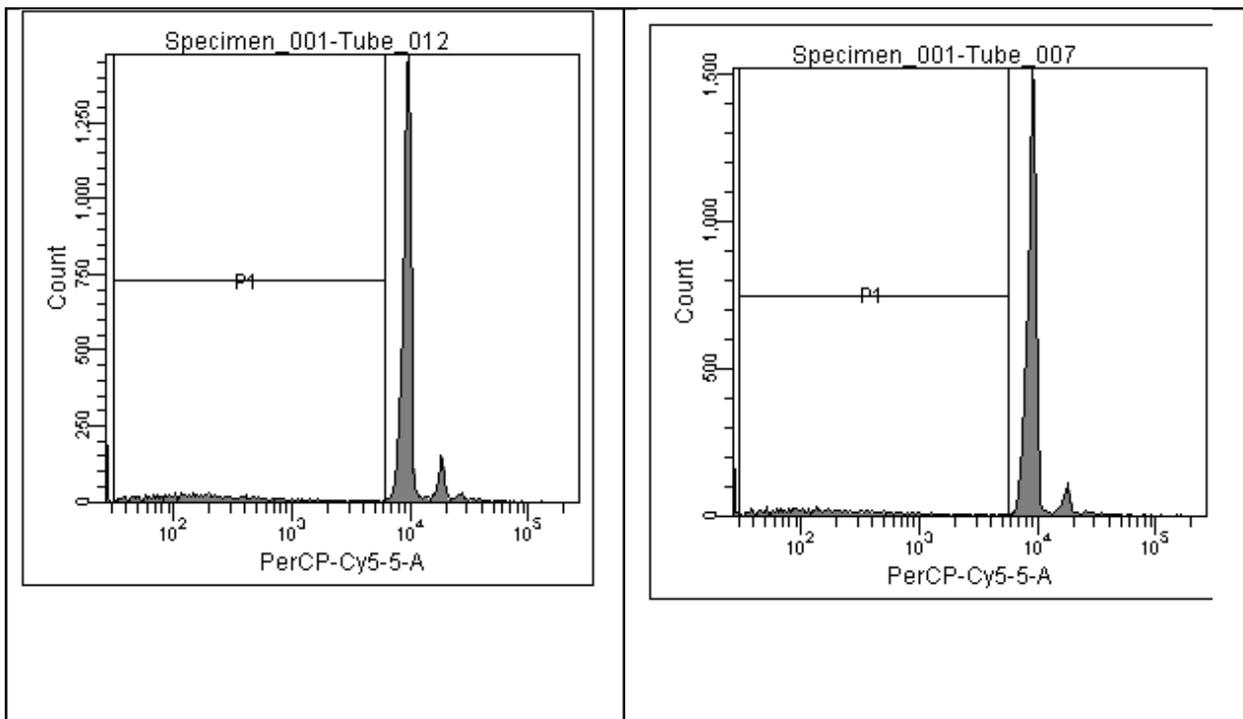


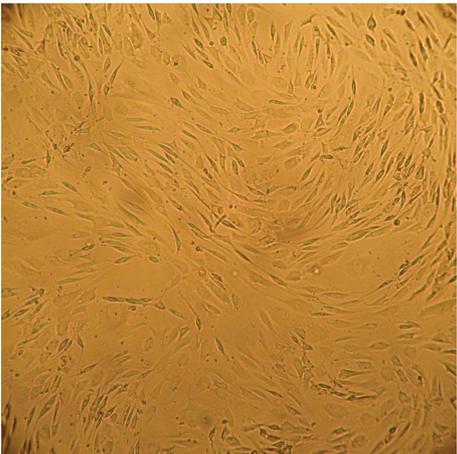
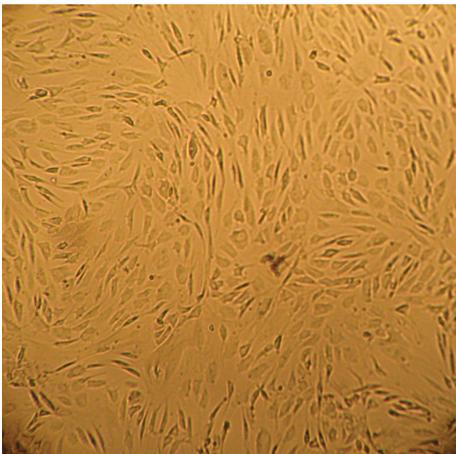
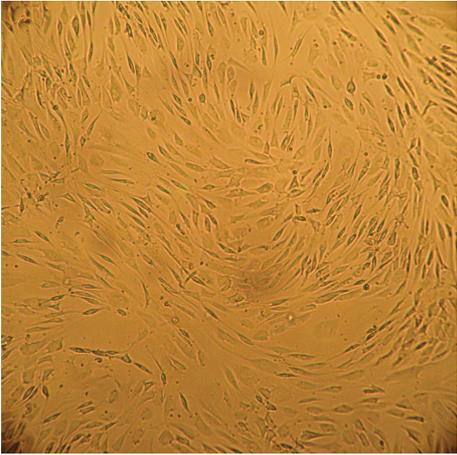
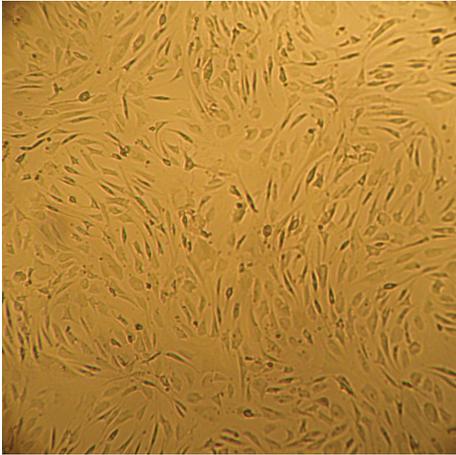
Abbildung 6. FACS- Profil: RA- Fibroblasten versus OA- Fibroblasten

Darstellung eines FACS-Profiles der humanen Synoviozyten nach Färbung der DNA mit PI. Die Zellen wurden auf 6-Loch-Platten ausgesät, konfluent wachsen gelassen, und im Anschluss wurde für zwei Tage dem Medium Serum entzogen.

Man sieht, dass die weit überwiegende Zahl der Zellen sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befinden.

3.2.6 Vergleich der Zellkonfluenz der Synoviozyten von RA- und Arthrosepatienten

Nachfolgend sieht man eine lichtmikroskopische Dokumentation der Synoviozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit $Il-1\beta$ und $TNF-\alpha$. Man erkennt nahezu identisch dichte und vitale Zellen, unabhängig von den verschiedenen Zeitpunkten (vor Stimulation und 24h, 48h bzw. 72h nach Stimulation).

Zeitpunkt	RA	OA
Vor Stimulation		
24h nach Stimulation		

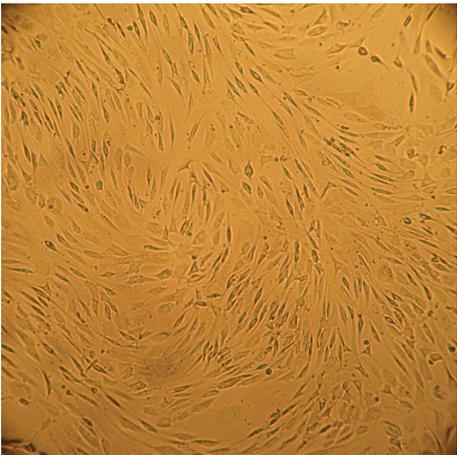
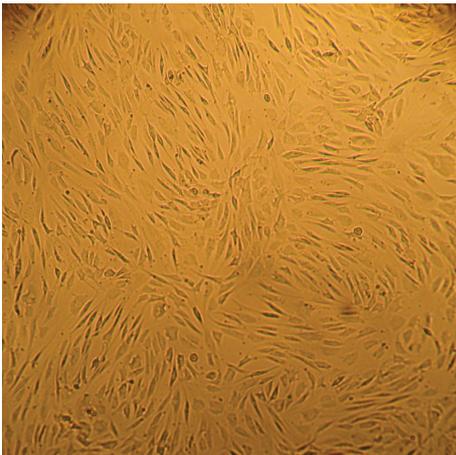
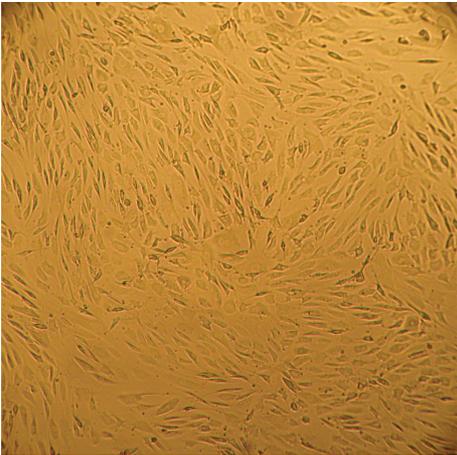
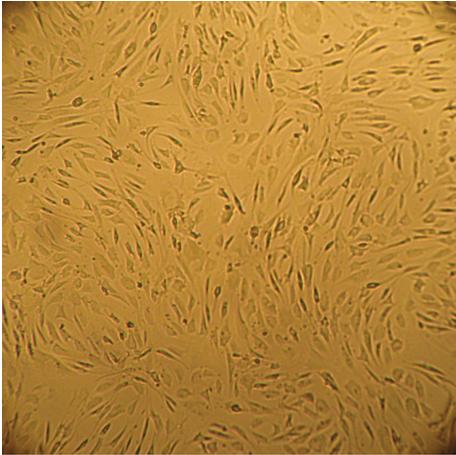
Zeitpunkt	RA	OA
48h nach Stimulation		
72h nach Stimulation		

Abbildung 7. Lichtmikroskopische Aufnahmen primärer Synoviozyten (RA vs. OA) vor und 24h, 48h, 72h nach Stimulation mit Il-1 β und TNF- α .

3.2.7 Einfrieren und Auftauen primären Synoviozyten

Unter Kryokonservierung versteht man das Aufbewahren von Zellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Synoviozyten wurden hierzu in ein Einfriermedium, bestehend aus DMSO und FKS im Verhältnis 1:9 überführt. DMSO (Dimethylsulfoxid) verhindert als eine Art Gefrierschutzmittel während des Einfrierprozesses die Bildung von Eiskristallen, welche sonst die Zellen zerstören würden. Um ein für die Synoviozyten schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden sie zunächst bei -80°C in einer Freezerbox über Nacht aufbewahrt und erst am darauf folgenden Tag in Stickstofftanks untergebracht. Die Freezerbox gewährleistet ein langsames Einfrieren; die Temperatur nimmt pro Stunde um 1°C ab. Die konservierte Zellen können so über einen sehr langen Zeitraum in einer Art Kältestarre gehalten werden, in der alle Stoffwechselfvorgänge nahezu zum Stillstand kommen.

Das Auftauen der Synoviozyten muss hingegen sehr rasch erfolgen, um die Sterberate der Zellen beim Auftauvorgang so gering wie möglich zu halten. Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden rasch im 37°C Wasserbad aufgetaut, in Falcons mit vorgewärmtem Medium überführt, abzentrifugiert und das Zellpellett unter Resuspension in eine Zellkulturflasche übergeben. Schon am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um sicher zu gehen, dass die Zellen komplett von DMSO befreit waren. Nach dem Auftauen können die Zellen ihre normalen physiologischen Prozesse wieder aufnehmen.

3.2.8 Stimulation der primären Synoviozyten mit TNF- α und Il-1 β

Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Interleukin- 1 β (Il-1 β) sind multifunktionale Zytokine. Sie besitzen vielfältige Aufgaben in der Regulation der Immunabwehr, der Entzündungsreaktion, der Hämatopoese und der Apoptose.

Bevor die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren bzw. Onkogenen mittels Western blotting nachgewiesen wurden, erfolgte die Stimulation der primären Synoviozyten mit TNF- α und Il-1 β im Verhältnis 1:100. Damit für alle zu untersuchenden Zellen von verschiedenen Patienten gleiche und somit vergleichbare Bedingungen herrschten, wurden die Synoviozyten jeweils auf vier 10 cm Schalen ausgesät und konfluent wachsen gelassen. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte ein Serumentzug für zwei Tage, d.h. das Nährmedium enthielt statt 5 % FKS nur 1 % FKS. So konnte davon ausgegangen werden, dass sich alle Zellen zum Zeitpunkt der Stimulation in der gleichen Zellzyklusphase, nämlich in der Ruhephase G₀, befanden. Das Ernten der stimulierten Fibroblasten erfolgte jeweils 24h, 48h, 72h nach Stimulation. Als Kontrolle diente jeweils eine unstimulierte Kultur. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Zellkulturgefäß abgekratzt, und nach Überführen in ein Eppendorfggefäß und Abzentrifugation, wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefren und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

3.2.9 Kultivierung von H1299- und HCT116-Zellen

Die humane Bronchialcarcinom- Zelllinie H1299 wurde in dem Kulturmedium DMEM (high glucose 4,5mg/ml) bei 37°C und 7% CO₂- Begasung kultiviert. Dem Medium wurden 10 % FKS und die Antibiotika Streptomycin und Penicillin im Verhältnis 1:200 zugesetzt.

HCT116-Zellen sind Tumorzellen aus einem Colocarzinom mit Wildtyp p53. Die Kultivierung erfolgte in McCoys- Medium bei gleichen Brutschrankbedingungen.

3.2.10 Transiente Transfektion von H1299-Zellen mit Nanofectin

Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion).

Die transiente Transfektion von H1299- Zellen wurde mit dem Reagenz Nanofectin (PAA) durchgeführt, welches aus einem positiv geladenen Polymer, das die DNA bindet, und einem Nanopartikel, in den das Polymer eingebettet ist, besteht. Durch diese Einbettung wird der Abbau der DNA durch Nukleasen verhindert. Die zu 100 % konfluenten H1299-Zellen wurden am Vortag der transienten Transfektion in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Am Tag der Transfektion waren diese bis zu 70-80 % konfluent.

Nun wurden zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße bereit gestellt. In das eine wurden 8 µl des Plasmides pcMdm2 und 492 µl Diluent pipettiert, durch Vortexen vermischt und kurz abzentrifugiert. In das andere wurde 25 µl Nanofection und 475 µl Diluent überführt, wiederum gevortext und abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte das Zusammenmischen der Lösung mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin und der DNA- Lösung, welche dann für 30 min bei Raumtemperatur inkubierten. Die Transfektionslösung wurde nach Inkubation tropfenweise auf die Zellen verteilt und 2 bis 4 h im Brutschrank bei 37°C und 7% CO₂- Begasung inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumswechsel. Am nächsten Tag konnten die Zellen geerntet werden.

3.2.11 DNA-Extraktion aus primären Synoviozyten

Die Extraktion der DNA aus den Synoviozyten erfolgte mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit und der vom Hersteller (QIAGEN) mitgelieferten Anleitung. Bei einem Elutionsvolumen von 200 µl liefert die Extraktion im Durchschnitt 34,0 ng/µl DNA. Durch mehrmaliges Wiederholen der Elution kann die gewonnene DNA- Menge erhöht werden.

Als erster Schritt der DNA- Isolierung wurden 20 µl Proteinkinase K (Protease) in einen 1,5 ml Mikrozentrifugen- Behälter pipettiert. Zur Proteinkinase K wurden im Anschluss 200 µl in PBS gelöste Zellen hinzugegeben. Danach wurden 200 µl des Puffers AL zugefügt. Um eine Lysierung der Zellen zu erreichen, ist es von großer Bedeutung, dass der Puffer und die Zellproben ein homogenes Gemisch bilden. Deshalb wurden die Proben 15 sec gevortext, bevor sie für 10 min bei 56°C im Heizblock inkubiert wurden. Dann wurden die Proben kurz zentrifugiert, um so die Deckel der Behältnisse von etwaigen Tropfen zu befreien. 200 µl Ethanol wurden den Proben zugegeben und die Lösung wurde erneut durch Vortexen homogenisiert. Tropfen, die sich danach an den

Deckeln befanden, wurden wiederum durch kurzes Zentrifugieren der Proben entfernt. Die Lösung wurde nun auf die DNA- bindenden Säulen, die sich in 2 ml Mikrozentrifugen- Behältern befanden, pipettiert und bei 8000 rpm über 1 min zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Die Säulen wurden in frische Behälter überführt und 500 µl des Waschpuffers AW I wurde auf die Säulen gegeben. Beim Pipettieren ist es von großer Bedeutung, den Säulenrand nicht mit Flüssigkeit zu verunreinigen. Der Waschpuffer I wurde dann über 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde erneut verworfen, und die dann bereits einmal gereinigten Säulen wurden in neue Behälter überführt. Für den zweiten Waschschrift wurden 500 µl des Waschpuffers AW II auf die Säulen gegeben und über 2 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde wieder verworfen, und die Säulen mit ihren Behältern wurden noch einmal für 1 min zentrifugiert. So konnten mögliche Ethanol- Rückstände endgültig von den Säulen entfernt werden. Im Anschluss wurden die Säulen in Eppendorf- Gefäße gestellt. Danach wurden 200 µl Elutionspuffer auf die Säulen pipettiert. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 8000 rpm wurde die DNA durch den Elutionspuffer von den Säulen gelöst und im Eppendorf- Gefäß gesammelt. Die Proben wurden bei -20°C im Gefrierschrank weggefroren.

3.2.12 Proteinextraktion aus primären Synoviozyten

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten unter denaturierenden Bedingungen war es zunächst notwendig, dass die adhärennten Synoviozyten auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm konfluent wachsen. Die Zellen wurden dann nach Abnahme des Mediums zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem sterilen Zellschaber vom Schalenboden abgekratzt. Dann erfolgte das Überführen der Zellen in ein Eppendorfreaktionsgefäß. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (1min, 13000 rpm) und Verwerfen des Überstandes, wurde dem Zellpellet je nach Größe 100- 250 µl 100°C 2x SDS- Lysis- Puffer hinzugegeben. Das mit dem Ladepuffer versetzte Zellpellet wurde leicht resuspendiert, so konnten die Zellen aufgeschlossen werden. Die Probe wurde dann für 10 min. bei 100°C im Heizblock gekocht. Der SDS- Ladepuffer sorgte außerdem noch für das Aufbrechen von Disulfidbrücken und somit für die Zerstörung der Tertiärstruktur der Proteine. Diese Denaturierung der Proteine ist Voraussetzung für das Laufverhalten der Proteine im Gel. Dieses ist proportional zu ihrem Molekulargewicht. Aufgrund der fehlenden nativen Faltung werden folglich auch Protein- Protein- Interaktionen aufgehoben. Im einem nächsten Schritt wurde das Lysat mehrmals durch eine 23- gauge- Kanüle bewegt, um die in den Proben enthaltene chromosomale DNA zu scheren. Es folgte ein weitere Zentrifugation (10 min., 13000rpm). Das so entstandene Pellet wurde verworfen und die Proteine im Überstand nach Bestimmung der Proteinkonzentration zur Analyse in der SDS- PAGE eingesetzt.

3.2.13 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 4 µl der Probe in 400 µl 0,1 M NaOH verdünnt und photometrisch gemessen. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm wurde die Absorption bestimmt. Als Referenzwert diente 0,1% ige NaOH. In der SDS- PAGE wurden jeweils 15 µg Protein eingesetzt. Anhand nachfolgender Formel konnte dann die Proteinmenge berechnet werden:

$3,2 : A(280) = x \mu\text{l}$, die 15 µg Protein enthalten

A= Absorption

Mit Hilfe des Photometers Ultrospec 3100 pro der Firma Amersham Biosciences erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung.

3.2.14 SDS (Sodium dodecylsulfate)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine sind aufgrund der Mischung an geladenen Aminosäuren, die sie enthalten, entweder positiv oder negativ geladen. Wird nun ein elektrisches Feld an eine Lösung von Proteinmolekülen gelegt, wird das Protein mit einer Geschwindigkeit wandern, die von seiner Ladung, Größe und Gestalt abhängig ist. Diese als Elektrophorese bekannte Technik wurde ursprünglich genutzt, um Mischungen von Proteinen entweder in freier wässriger Lösung oder in Lösungen, die in einer festen porösen Matrix (z.B. Stärke) gehalten wurden, aufzutrennen. In den 60er Jahren wurde diese Methode modifiziert; die SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE) wurde entwickelt. Bei diesem Verfahren wird eine inerte Matrix aus einem stark vernetzten Polyacrylamid- Gel aufgebaut, durch die die verschiedenen Proteine in schmalen Banden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern können. Die Wanderung der Makromoleküle ist zusätzlich von der Struktur des Gels abhängig. Durch die Polymerisation von Acrylamid und durch die Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'- Methylenebisacrylamid entstehen die Polyacrylamidgele. Damit Acrylamid und Bisacrylamid polymerisieren kann, kommt Ammoniumperoxidisulfat (APS), welches leicht Radiakale bildet, zum Einsatz. N,N,N',N'-Tetramethylethan-1-2- diamin (TEMED) dient dabei als Katalysator. Die Acrylamidkonzentration im Polymerisationsansatz bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad. Für Porengröße, Elastizität und Dichte des Gels sind beide zusammen verantwortlich. So werden je nach Größe der zu trennenden Moleküle Gele unterschiedlicher Porosität eingesetzt. Diese Methode dient somit der Analyse von Makromolekülen und ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtbestimmung.

Bei der SDS- Gelelektrophorese befinden sich die Proteine nicht nur in einer einfachen wässrigen

Lösung, sondern in einem Medium, das ein starkes, negativ geladenes Detergens enthält, das Sodiumdodecylsulfat (SDS). Da dieses Detergens an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle bindet, wodurch sich diese zu gestreckten Polypeptidketten entfalten, werden die einzelnen Proteinmoleküle aus ihren Assoziationen mit anderen Peptiden oder Lipiden entlassen und werden frei lösbar in der Detergens- Lösung. Außerdem wird eine reduzierende Substanz, wie β -Mercaptoethanol oder DTT (Dithiothreitol) zugesetzt, die alle S-S- Bindungen im Protein löst, so dass alle Polypeptide, die ein aus vielen Untereinheiten bestehendes Molekül aufbauen, getrennt analysiert werden können. Da sich jedes Proteinmolekül zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen zusammenschließt, verliert die dem Protein eigene Ladung von Bedeutung. Alle Proteine wandern so beim Anlegen einer Spannung zur positiven Elektrode, der Kathode. Proteine gleicher Größe sollten sich nahezu identisch verhalten, da ihre native Struktur durch SDS völlig entfaltet wird, so dass sich ihre Formen gleichen, und da von ihnen die gleiche Menge an SDS gebunden wird, sie die gleiche elektrische Ladung tragen. Größere Proteine mit mehr Ladungen unterliegen größeren elektrischen Kräften und daher einem größeren Sog. Im Netzwerk des Polyacrylamidgels, welches wie ein Sieb wirkt, werden große Proteine viel stärker verlangsamt als kleine. Als Ergebnis entsteht aus einer komplexen Proteinmischung eine Reihe diskreter Proteinbanden, die entsprechend ihrer molaren Massen angeordnet sind. Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen werden neben den zu untersuchenden Proteinen, Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht aufgetrennt.

In der diskontinuierlichen SDS- PAGE nach Laemmli (1970) werden Sammel- und Trenngel hergestellt, welche sich in Porengröße und pHs unterscheiden. Das Sammelgel überschichtet das Trenngel. Der pH- Wert im großmaschigen Sammelgel ist niedriger, die Proteine werden fokussiert, es erfolgt jedoch noch keine Auftrennung. Das Trenngel ist engporig und dort erfolgt erst die Auftrennung der Probe nach Molekulargewicht.

3.2.15 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Um ein SDS- Polyacrylamidgel herstellen zu können, benötigt man zunächst eine rechteckige Glasplatte und eine darauf passende Ohrenplatte. Die Glasplatten wurden vor Gebrauch zunächst mit absolutem Ethanol gereinigt, um etwaige Gelreste zu entfernen. Auf die rechteckige Glasplatte wurde an drei Seiten jeweils ein Abstandshalter aus Teflon gelegt. Die Ohrenplatte wurde bündig auf die rechteckige Glasplatte aufgelegt und auf den drei Seiten jeweils mit zwei Klammern befestigt. Um nach dem Gießen des Gels ein Auslaufen auszuschließen, wurden die durch die Abstandshalter entstandenen Lücken zwischen den beiden Glasplatten mit 2,5% Agarose und mittels einer Pipette vorsichtig abgedichtet. Nach völligem Trocknen der Agarose wurde mit

destilliertem Wasser überprüft, ob die Konstruktion tatsächlich komplett abgedichtet war. Wenn das der Fall war, wurde das Wasser wieder entfernt und der Raum zwischen den Glasplatten mit Whatman-Papier abgetrocknet. Nun wurde das Trenngel hergestellt und bis etwa 3 cm unter den oberen Rand der Ohrenplatte in die Gelkammer gefüllt und mit destilliertem Wasser überschichtet, um so ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Nach vollständigem Polymerisieren des Trenngels wurde das destillierte Wasser abgenommen und der Zwischenraum, wiederum mit Whatman-Papier, vorsichtig und ohne das Trenngel zu beschädigen, getrocknet. Im Anschluss wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Um Geldaschen für das spätere Auftragen der Proben zu formen, wurde ein Teflonkamm in das Sammelgel geschoben. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden dann schließlich Kamm und Abstandshalter an der unteren Seite der Konstruktion entfernt. Die Vorrichtung wurde danach in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer mit Hilfe von Klammern eingespannt und zwar so orientiert, dass die Ohrenplatte zur Kathode der Kammer gerichtet war. Es musste so viel Laufpuffer in der Kammer sein, dass der Puffer die Geldaschen vollständig überdeckte. Nun konnten mit Hilfe einer Hamilton- Pipette die Proteinproben und der Größenstandard in die Taschen überführt werden. Die Wanderung der Proteinproben durch das Sammelgel von der Anode zur Kathode erfolgte bei einer Spannung von 120 V. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 240 V erhöht. Die Auftrennung erfolgte, bis die erste Bande des Größenstandards das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Gelkomponenten	Trenngel 8%	Sammelgel 5%
1M Tris pH 6,8		0,75 ml
1M Tris pH 8,8	4,5 ml	
30 % Acrylamid	3,2 ml	1 ml
2 % Bisacrylamid	1,28 ml	0,4 ml
10 % SDS	240 µl	120 µl
H₂O dest.	2,72 ml	3,67 ml
APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 9. Zusammensetzungen eines 8 % igen Trenngels und eines 5 % igen Sammelgels

3.2.16 Western-Blot

Western Blot oder Immuno-Blot bezeichnet die Übertragung (Blotting) von Proteinen, die zuvor in einer SDS- Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Beim Western- Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid- Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern aus dem Gel auf eine Membran und werden auf der beschichteten Membran immobilisiert, indem sie hydrophobe Wechselwirkungen

mit dieser eingehen. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung und die immunologische Reaktion der Proteine bleiben bei diesem Verfahren weitgehend erhalten. So ist es möglich, die Proteine sowohl quantitativ als auch qualitativ mit Hilfe von spezifischen Antikörper nachzuweisen.

3.2.17 Blotting

Um die Proteine aus der Gelmatrix auf die Immobilon- Membran (Millipore, Schwalbach) übertragen zu können, wurde diese zunächst für ca. 10 min in Methanol getränkt. Dann wurde das Blotting Sandwich zusammengebaut. Dazu wurden nacheinander ein dünnes Schwammtuch und drei Whatman- Filterpapiere in Gelgröße mit Western- Transferpuffer getränkt und auf die eine Seite eines aufklappbaren Kunststoffgitters platziert. Nun wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten befreit. Auf das Gel wurden dann die in Methanol äquilibrierte Immobilon- Membran sowie drei weitere getränkte Whatman- Papiere und ein weiteres Schwammtuch gelegt. Um das Blotting-Sandwich möglichst luftblasenfrei zu bekommen, wurden diese vorsichtig mit einer feuchten 5 ml Pipettenspitze auf dem Whatman- Papier glatt gestrichen. Das Kunststoffgitter konnte schließlich verschlossen werden. Das Blotgitter wurde dann in die mit Western- Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt und so orientiert, dass das Gel zur Anode und die Membran zur Kathode gerichtet waren. Nach Anlegen des elektrischen Feldes konnten die Proteine dann aus der Gelmatrix in die Membran wandern. Das Blotting- Verfahren wurde für 5 h bei einer Stromstärke von 370 mA durchgeführt.

3.2.18 Immunologische Proteindetektion

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran auf ein Whatman-Papier gelegt und kurz luftgetrocknet. Anschließend wurde sie je nach Molekulargewicht des einzelnen zu untersuchenden Proteins in Streifen geschnitten. Die Streifen wurden dann in Methanol geschwenkt. Danach erfolgte ein Waschvorgang mit PBS, um das überschüssige Methanol von den Streifen zu entfernen. Für mindestens 30 min kamen die Membranstreifen dann in Blocking- Puffer (PBS mit 5 % Magermilchpulver), um unspezifische Bindungen der nachfolgend eingesetzten Antikörper zu unterbinden. Nach diesem Schritt konnten die einzelnen Membranstreifen mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert werden. Dazu wurden die Streifen zusammen mit den Antikörpern in 2-4ml 5 % iger Magermilchlösung luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem in kreisförmigen Bewegungen rotierenden Schüttler. Am nächsten Tag wurden die Membranstreifen 3 mal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. So konnten unspezifisch gebundene Antikörper gewaschen werden. Die

Sekundärantikörper wurden ebenfalls in 5% iger Magermilchlösung angesetzt, und die Streifen wurden wiederum luftblasenfrei in Folie, dieses Mal mit dem sekundären, an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper, eingeschweißt. Nun erfolgte die Inkubation bei 4°C für 2 h auf dem Taumler. Danach wurden die Streifen wieder 3 mal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Durch die Kopplung des sekundären Antikörpers an Meerrettichperoxidase konnte mit ECL-Reagenz (Amersham Biosciences) eine Chemolumineszenz hervorgerufen werden, die eine Schwärzung auf lichtempfindlichem Film während der Exposition in einer Autoradiographiekassette hervorrief. Die Lichtemission konnte mit Hilfe eines blaulichtempfindlichen ECL™- Films festgehalten werden. Die Membranstreifen wurden jeweils für 1 min in den im Verhältnis 1:1 gemischten ECL™- Detektions- Reagenzien 1 und 2 inkubiert. Dann wurden die Filme (GE Healthcare) aufgelegt und für die dem Protein entsprechende Zeit (zwischen 1 min und 1h) exponiert. Danach wurde der Film entwickelt, fixiert und getrocknet.

3.2.19 Entfernen gebundener Antikörper nach ECL-Färbung („Stripping“)

Um den gleichen Membranstreifen für weitere Proteinnachweise verwenden zu können, war es notwendig, die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper nach ECL- Färbung zu entfernen. Diese Stripping ist nötig, um NF-κB und phospho- NF-κB zu trennen. Dazu wurde die Membran für eine halbe Stunde bei 50°C im Wasserbad in einen sogenannten „Stripping- Puffer“ gelegt. Der Puffer enthielt u.a. β-Mercaptoethanol, welches für das Aufbrechen kovalenter und nicht-kovalenter Bindungen sorgt. Im Anschluss erfolgte ein mehrfaches Waschen der Membran mit PBS, um β-Mercaptoethanol vollständig von der Membran zu spülen. Die Blockingreaktion in PBS mit 5% Magermilchpulver musste wiederum für mindestens 30 min durchgeführt werden.

3.2.20 Apoptoseassays

3.2.20.1 DNA-Färbung mit Propidiumiodid

Zur Markierung der DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Propidiumiodid (PI) wirkt als Nukleinsäureinterkalator. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 536 nm und das Emissionsmaximum bei 617 nm. Ein Argonlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm generiert, regt so den Fluoreszenzfarbstoff an. Das emittierte Licht wird durch ein optisches System gemessen.

Proliferierende Zellen durchlaufen nacheinander folgende Stadien des Zellzyklus: G1 (Ruhephase), S (DNA- Synthese) und G2/M (Mitose), worauf wieder G1 folgt. Wenn man Zellen über diesen Zyklus hinweg verfolgt, besitzen sie in G1 den einfachen DNA- Gehalt, im Verlauf der S- Phase

wird dieser verdoppelt, in G2/M liegt dann der doppelte DNA- Gehalt vor und bei der anschließenden Zellteilung halbiert er sich wieder auf den einfachen Wert. Durch PI lässt sich der DNA- Gehalt einer Zelle durchflusszytometrisch analysieren und sich somit ihre Position im Zellzyklus feststellen. Außerdem können so der Anteil der apoptotischen Zellen ermittelt werden.

Eines der typischen Merkmale von apoptotischem Zelltod ist die Fragmentierung von chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke von 180 Basenpaaren oder ein mehrfaches davon. Diese entstehen durch enzymatische Verdauung der DNA zwischen den Histonproteinen. Zudem wird während der Apoptose oft auch der Zellkern fragmentiert. Die kleineren und größeren Fragmente werden oft von der Zelle freigesetzt, so dass bei der DNA- Färbung von apoptotischen Zellen ein DNA- Gehalt beobachtet wird, der niedriger ist als bei einer normalen Zelle in der G1-Phase. Man spricht dann von sub-G1-Zellen. Somit kann die DNA- Färbung benutzt werden, um den apoptotischen Prozess in einer Zellpopulation relativ zu quantifizieren.

Zur Färbung der DNA mit Propidiumiodid und anschließender FACS-Analyse wurden die Fibroblasten zunächst in 6- Loch- Platten ausgesät und konfluent wachsen gelassen. Vor Stimulation mit TNF- α und Il-1 β wurde den Zellen FKS entzogen, um davon auszugehen, dass sie sich zum Untersuchungszeitpunkt im Zellzyklusarrest befanden und somit dann später alle Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten.

Alle Zelllinien wurden ohne Stimulation und 48h nach Stimulation untersucht. Entsprechend wurde ohne Stimulation und 48h nach Stimulation der Mediumüberstand verworfen und die Zellen wurden mit 0,5 ml Trypsin vom Untergrund gelöst und in ein 2 ml Eppendorf- Gefäß überführt. Zum Waschen der Zellen wurde 1,5 ml 1x PBS hinzugegeben und 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 μ l NaCl (0,9 %) resuspendiert, nachdem der Überstand vollständig abgenommen worden war. In ein 2 ml Eppendorf- Gefäß wurden 1,8 ml Methanol vorgelegt. Der Ansatz wurde mit einer 23-gauge-Kanüle aufgezogen und in das mit Methanol gefüllte Gefäß überführt. Dann wurden die Proben bis zur Färbung bei -20°C gelagert (mindestens 1 h).

Die methanolfixierten Zellen wurden 2 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann erfolgte das Waschen mit 500 μ l 1x PBS und das erneute zweiminütige Zentrifugieren bei 12.000 rpm. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen und in 250 μ l PBS plus RNaseA (25 μ g/ml) resuspendiert. Nun erfolgte die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden 25 μ g/ml PI zu den Proben gegeben, die vorher in FACS-Röhrchen überführt worden waren. Danach wurde kurz gevortext und für 60 min bei RT im Dunklen inkubiert. Dann erfolgte die Messung per FACS.

3.2.20.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS- („Fluorescence activated cell sorting“) Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung bzw. Analyse von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen und Einzelzellen. Die Durchflusszytometrie macht sich Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zunutze. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Durch Überdruck werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie sich vereinzeln und am Messpunkt fokussiert werden

(= hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die sehr glatten T-Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird.

Mit dem FACS können auch Fluoreszenzfarben gemessen werden. Da nur wenige Zellen per se fluoreszierendes Licht emittieren, verwendet man u.a. Propidiumiodid, welches in die DNA einer Zelle interkaliert. So kann man anhand der Helligkeit der Zelle untersuchen, wieviel DNA sie enthält. Da die DNA apoptotischer Zellen fragmentiert vorliegt, kann mittels FACS auch zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

3.3 Statistik

Die Ergebnisse der verschiedenen Proteinkonzentrationen und der verschiedenen Apoptoseraten wurden statistisch mittels Wilcoxon Mann Whitney Test ausgewertet. Es wurden die Unterschiede zwischen Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis im Vergleich mit Synoviozyten bei Arthrose und die Unterschiede zwischen den Allelen von p53 (in Bezug auf SNP G72C) und von Mdm2 (in Bezug auf SNP T309G) in Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis, jeweils vor und nach Stimulation der Zellen mit TNF- α und IL-1 β , untersucht. Als signifikant wurden p-Werte $<0,05$ gewertet.

3.4 Versuchsaufbau in Abhängigkeit von der Genotypverteilung

Für die Entwicklung des Zellkulturmodells erfolgte die Akquirierung der Synovialis nach operativen Gelenkersatz bei insgesamt 19 Patienten mit RA und 33 Patienten mit Arthrose (Kontrollgruppe). Nach Präparation der Gelenkhaut wurden Synoviozyten (Fibroblasten der Gelenkhaut, FLS) in Kultur genommen und einer Stimulation mit Il-1 β und TNF- α für 24h, 48h und 72h ausgesetzt. TNF- α ist ein Zytokin des Immunsystems, welches in lokale und systemische Entzündungen involviert ist. Es wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Fibroblasten, Lymphozyten, Mast- und Endothelzellen ausgeschüttet. Es ist für die Regulation der Immunabwehr, der Entzündungsreaktionen, der Hämatopoese und der Apoptose im Gelenk zuständig.

Il-1 β gehört zur Interleukin-1-Familie und ist eines von vielen Interleukinen. Es wird hauptsächlich von Monozyten produziert und ist zentraler Botenstoff in der Antwort des Gastorganismus auf eine Reihe von Fremdeinflüssen.

TNF- α und Il-1 β sind in arthritischen Gelenken bei RA nachgewiesenermaßen deutlich vermehrt exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fibroblasten in der G0/G1- Phase und nach Erreichen der Konfluenz und somit der Kontaktinhibition mit 5 ng/ml TNF- α und 2,5 ng/ml Il-1 β stimuliert, um die in-vitro-Situation dem physiologischen Zustand bei der RA möglichst anzugleichen.

Alle FLS-Kulturen wurden anschließend nach DNA-Extraktion auf den Genotyp der SNPs im p53- und Mdm2-Gen untersucht. Nach Bestimmung des Genotyps erfolgte die Analyse der Proteinkonzentrationen mittels Western-Blot-Verfahren. Die Fibroblasten der beiden Patientenkollektive wurden in Abhängigkeit von den Gentyppfrequenzen des p53 SNP (G72C) und Mdm2 SNP (T309G) hinsichtlich unterschiedlicher Konzentrationen von MDM2, NF- κ B, phospho-NF- κ B, p53 und p21 untersucht.

3.4.1 Zusammenstellung der Patienten mit RA in Abhängigkeit von den Gentyppfrequenzen des p53 SNP (G72C) und Mdm2 SNP (T309G)

Insgesamt wurden n = 52 Synovialisproben entnommen und kultiviert.

Nach Etablierung des Modells waren für die weitere Studie jeweils maximal vier Patientenproben mit gleichem Genotyp bzgl. der SNPs G72C von p53 bzw. T309G von Mdm2 vorgesehen (Homozygotie für den SNP G72C bzw. T309G, Homozygotie für die jeweiligen Wildtypen und Heterozygotie).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Patienten mit RA zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Western-Blot-Verfahren ausgewählt:

Alle Patienten der RA- Gruppe sind weiblichen Geschlechts.

- Homozygoter Genotyp G/G für p53: n = 4; mittleres Lebensalter $65,75 \pm 10,05$ Jahre
- Heterozygoter Genotyp G/C für p53: n = 4; mittleres Lebensalter $63,5 \pm 15,5$ Jahre
- Homozygoter SNP 72 C/C für p53: n = 1 Lebensalter 16 Jahre
- Homozygoter Genotyp T/T für Mdm2: n = 5; mittleres Lebensalter $68,4 \pm 10,53$ Jahre
- Heterozygoter Genotyp G/T für Mdm2: n = 3; mittleres Lebensalter $43,6 \pm 27,5$ Jahre
- Homozygoter SNP 309 G/G für Mdm2: n = 1; Lebensalter 60 Jahre

3.4.2 Zusammenstellung der Patienten mit Arthrose in Abhängigkeit von den Genotypfrequenzen des p53 SNP (G72C) und Mdm2 SNP (T309G)

Folgende Patienten mit Arthrose wurden zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Western-Blot-Verfahren ausgewählt:

- Homozygoter Genotyp G/G für p53: n = 5 (w = 3; m = 2); mittleres Lebensalter $71 \pm 7,42$ Jahre
- Heterozygoter Genotyp G/C für p53: n = 4 (w = 3; m = 1); mittleres Lebensalter $71,75 \pm 9,74$ Jahre
- Homozygoter SNP 72 C/C für p53: n = 2 (w = 1; m = 1); mittleres Lebensalter $74 \pm 1,41$ Jahre
- Homozygoter Genotyp T/T für Mdm2: n = 3 (w = 2; m = 1); mittleres Lebensalter $69,3 \pm 6,43$ Jahre
- Heterozygoter Genotyp G/T für Mdm2: n = 3 (w = 3); mittleres Lebensalter $72,3 \pm 4,04$ Jahre
- Homozygoter SNP 309 G/G für Mdm2: n = 5 (w = 3; m = 2); mittleres Lebensalter $73 \pm 9,72$ Jahre

4 Ergebnisse

4.1 Apoptoseraten

4.1.1 Vergleich der Apoptoseraten der Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und von Patienten mit Arthrose

Es erfolgte der Vergleich von 11 Zelllinien von Arthrose-Patienten (zwischen 43 und 48 Jahre alt) und 9 Zelllinien von Patienten mit rheumatoider Arthritis (zwischen 43 und 46 Jahre alt). Bei den Synoviozyten (FLS) von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA-FLS) zeigt sich sowohl ohne als auch mit Stimulation mit TNF- α und Il-1 β eine signifikant geringere Apoptoserate als bei den Zelllinien von Arthrosepatienten (OA-FLS) (Tabelle 9, 10; Abbildung 8).

	RA-FLS ohne Stimulation	OA-FLS ohne Stimulation
Apoptoserate (%)	31,8	38,4
Standardabweichung	$\pm 12,6$	$\pm 17,2$
p-Wert	0,023	

Tabelle 10. Vergleich der Apoptoseraten von RA- versus OA-FLS ohne Stimulation

RA-FLS = Rheumatoide Arthritis- fibroblasts like synoviocytes

OA-FLS = Arthrose- fibroblasts like synoviocytes

	RA-FLS mit Stimulation	OA-FLS mit Stimulation
Apoptoserate (%)	21,0	32,4
Standardabweichung	$\pm 5,1$	$\pm 16,3$
p-Wert	0,015	

Tabelle 11. Vergleich der Apoptoseraten von RA- versus OA-FLS mit Stimulation

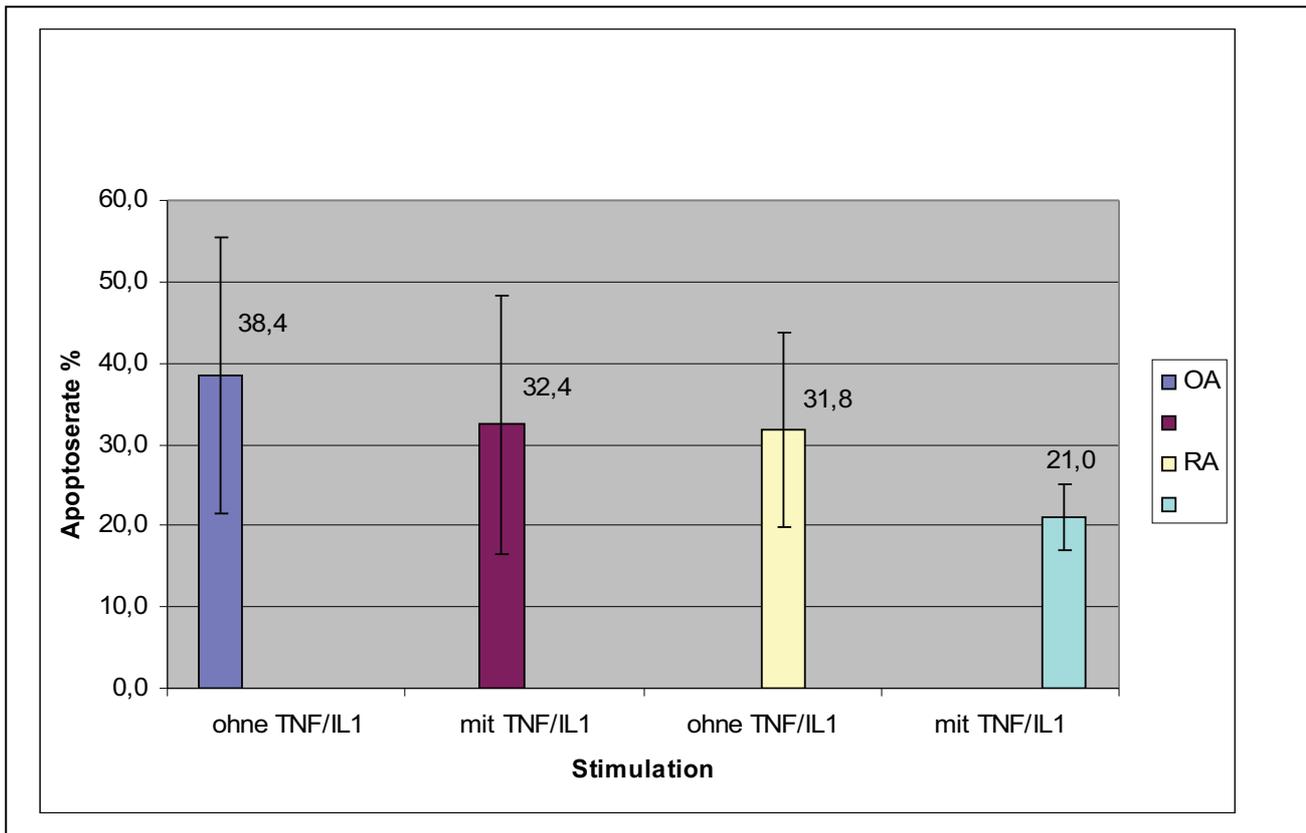


Abbildung 8. Apoptoseraten der OA-FLS und RA-FLS mit und ohne Stimulation mit TNF- α und IL-1 β

TNF = tumor necrosis factor, IL-1= Interleukin-1

4.1.2 Vergleich der Apoptoseraten der Synoviozyten von RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp) und mit homozygotem Genotyp G/G

Es erfolgte die DNA-Extraktion aus 12 verschiedenen Zelllinien von primären Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und anschließend die Genotypisierung hinsichtlich des Mdm2 SNP T309G. Dabei waren fünf Zelllinien Träger des homozygoten Genotyps T/T für Mdm2 (Wildtyp) und zwei des homozygoten Genotyps G/G für Mdm2 (SNP T309G).

Alle Zelllinien wurden ohne Stimulation und 48h nach Stimulation untersucht. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mit der Propidiumjodidmethode wie beschrieben. Die Apoptoseraten werden mit Standardabweichungen und p-Werten der FLS in Abhängigkeit vom Genotyp und mit und ohne Stimulation dargestellt.

Tabelle 12 vergleicht die Apoptoseraten von RA-FLS, die homozygot den Genotyp T/T für Mdm2 (Wildtyp) haben mit den Apoptoseraten von RA-FLS, die homozygot den Genotyp G/G für Mdm2 (SNP T309G) haben.

Ohne Stimulation ist die Apoptoserate der RA-FLS mit homozygotem SNP T309G signifikant niedriger, als die Apoptoserate der RA-FLS mit homozygotem Wildtyp. Unter Stimulation nehmen die Apoptoseraten in den Zelllinien beider genetischer Variationen (SNP Mdm2 TT und GG) ab, die Unterschiede sind aber nicht signifikant.

Auch nach Stimulation ist die Apoptoserate der RA-FLS mit homozygotem SNP T309G signifikant niedriger ($p < 0,05$), als die Apoptoserate der RA-FLS mit homozygotem Wildtyp (Tabelle 12).

Mdm2-Genotyp	T/T ohne Stimulation	G/G ohne Stimulation
Apoptoserate (%)	27,3	44,8
Standradabweichung	±4,3	±1,2
p-Wert	0,009	
Mdm2-Genotyp	T/T mit Stimulation	G/G mit Stimulation
Apoptoserate (%)	19,2	26,8
Standradabweichung	±2,3	±2,1
p-Wert	0,02	

Tabelle 12 Vergleich der Apoptoserate bei RA mit Genotyp SNP Mdm2 T/T (Wildtyp) bzw. G/G

Die folgende Abbildung zeigt graphisch die Apoptoseraten der RA-FLS mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp) und homozygotem Genotyp G/G jeweils ohne und mit Stimulation (Heyne, Assmann, 2012).

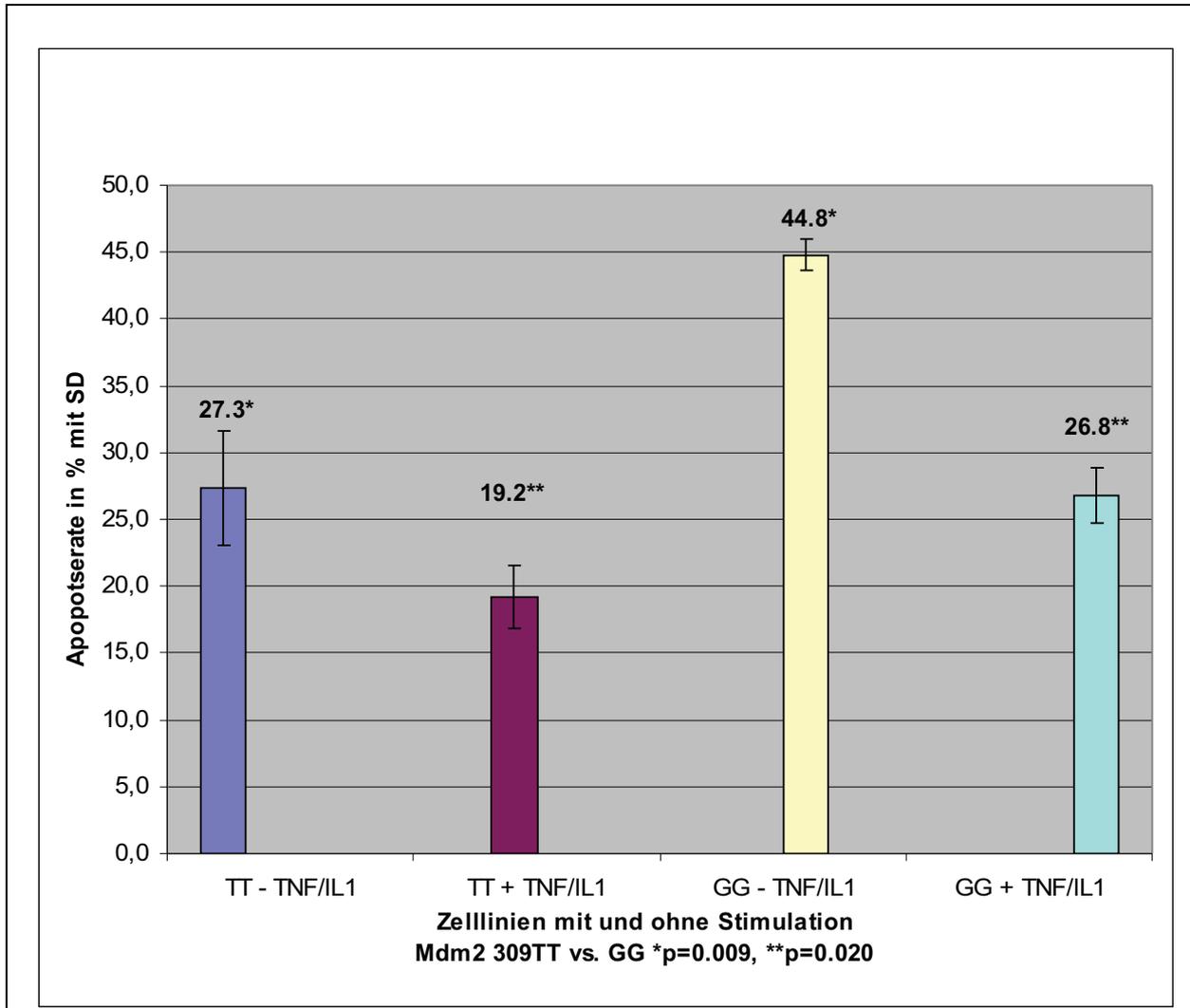


Abbildung 9. Apoptoseraten der RA-FLS mit Wildtyp SNP Mdm2 309 T/T und G/G jeweils mit und ohne Stimulation
SD= Standardabweichung; TNF/IL1 = Stimulation mit tumor necrosis factor-alpha und Interleukin-1 β

4.1.3 Vergleich der Apoptoseraten der Synoviozyten von RA-Patienten mit homozygotem Genotyp G/G SNP p53 72 (Wildtyp) und mit homozygotem Genotyp C/C

Aufgrund des epidemiologisch sehr seltenen homozygoten Genotyps C/C (SNP G72C) für p53 war es nicht möglich, statistisch ausreichende Probenmengen zu akquirieren. Ein orientierender Vergleich zweier RA-Synoviozytenkulturen mit Genotyp C/C mit Wildtypproben (n=4) (Genotyp G/G) ergab einen Trend zur höheren Apoptoserate bei den FLS mit homozygotem SNP p53 72 C/C,

jedoch ohne dass der Unterschied das Signifikanzniveau erreicht.

4.2 Darstellung der Proteinbanden von Mdm2, NF- κ B, phospho-NF- κ B, p53, p21 und β -Actin mittels Western- Blot- Verfahren

Mdm2 (Molekulargewicht 90 kDa), das Protein des Mdm2-Gens, fungiert als negativer Regulator von p53.

Es konnte aufgrund geringer Proteinkonzentrationen weder bei Patienten mit RA noch mit Arthrose bei unterschiedlichen Genotypen für p53 und Mdm2 nachgewiesen werden. Lediglich eine Bande, welche von H1299- Proteinextrakten stammte, konnte bei allen zu untersuchenden Proben detektiert werden. Die H1299- Zelllinie wurde für diese Versuchsreihe mit Mdm2 transfiziert und diente als Kontrolle. Bei H1299-Zellen handelt es sich um humane, epitheliale Bronchialcarcinomzellen, die kein p53 besitzen.

NF- κ B und phospho-NF- κ B (Molekulargewicht jeweils 65 kDa) sind Proteine, welche bei oxidativem Stress, Infektionen und Entzündungen vermehrt aktiviert werden. Diese Aktivierung bewirkt eine vermehrte Transkription entzündungsfördernder Substanzen. Keines der beiden Proteine konnte in einem Patientenkollektiv in so ausreichenden Proteinmengen detektiert werden, dass eine Aussage zu quantitativen Unterschieden erfolgen konnte. Wie bei Mdm2 waren bei NF- κ B und phospho-NF- κ B lediglich Banden in den Kontrollzelllinien (Hct116 und H1299) nachweisbar.



Abb. 10: Repräsentative Immundetektion von Mdm2

15 μ g Protein wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Der immunologische Nachweis geschah mittels ECL nach Inkubation mit Primär-Antikörper (Calbiochem 1:200) und Sekundär- Antikörper (α -Maus; 1:2000) jeweils in 5% Magermilch. Die Bande stammt von einem Proteinextrakt aus H1299-Zellen, die mit Mdm2 transfiziert sind. Fehlender Nachweis von Mdm2 in FLS.



Abb. 11: Repräsentative Immundetektion von NF- κ B und phosho- NF- κ B

(Primär- Antikörper: NF- κ B p65 bzw. NF- κ B p65 (phospho S536) Abcam 1:200; Sekundär- Antikörper: α - Maus bzw. α - Kaninchen; 1:2000). Die Banden stammen von Proteinextrakten aus Hct116- bzw. H1299- Zelllinien. Fehlender Nachweis von NF- κ B und phosho- NF- κ B in FLS.

Das Tumorsuppressorprotein p53 (Molekulargewicht 53 kDa) spielt eine zentrale Rolle im Zellzyklus. Der Nachweis von p53 war bei allen untersuchten Synoviozyten sowohl von Patienten mit RA als auch von Patienten mit Arthrose möglich. Es zeigten sich je nach Genotyp und Erkrankung unterschiedlich starke Banden im Western blot. Das Proteinextrakt aus der Hct116-Zelllinie diente als Positivkontrolle für p53. Hct116-Zellen sind Tumorzellen aus einem Colocarzinom mit Wildtyp-p53.

Das Protein p21 (Molekulargewicht 21 kDa) gehört ebenfalls zur Tumorsuppressorgen-Familie. Es ist in der Lage, durch Inhibition von CDK/Cyclin-Komplexen die Zelle am G1- und G2-Kontrollpunkt des Zellzyklus zu arretieren. Außerdem zeigt es die Aktivität von p53 an. Auch p21 konnte bei allen Patienten unabhängig von ihrer Erkrankung detektiert werden.

Beide Proteine konnten nach Aufzeichnung im Western blot mit Hilfe des Programms Image Quant quantifiziert werden.

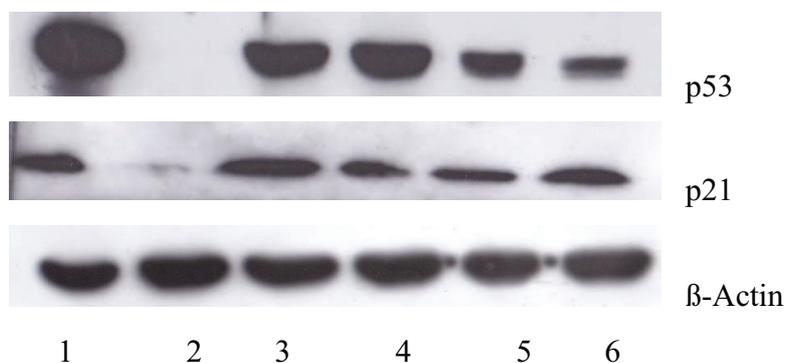


Abb. 12: Repräsentative Immunodetektion von p53, p21 und β-Actin bei einem Patienten mit RA (Primär-Antikörper: DO-1 1:500; p21 von BD Pharmingen 1:100; β-Actin von Sigma- Aldrich 1:10000; Sekundär-Antikörper α-Maus 1:2000). Die unterschiedlichen Banden sind mit Zahlen markiert: 1 = Hct116- Zelllinie; 2 = H1299- Zelllinie; 3 = FLS vor Stimulation; 4 = FLS 24h nach Stimulation mit TNF-α und Il-1β; 5 = 48h nach Stimulation; 6 = 72h nach Stimulation.

4.3 Proteinkonzentrationen von p53 und p21 in Synoviozyten

4.3.1 p53- und p21-Proteinkonzentration bei RA-und OA-Patienten vor und nach Stimulation

Da die Genotypen von p53 und Mdm2 unabhängig voneinander vererbt werden, kommt es vor, dass Patienten doppelt aufgeführt sind. Dies tritt jedoch nur innerhalb der Gruppen RA und OA auf, nicht aber in den Vergleichen zwischen diesen Gruppen. Anzumerken ist weiterhin, dass zu der besseren Übersicht der Ergebnisse die Skalierung zwischen den Graphiken variiert.

4.3.1.1 Homozygoter Genotyp SNP p53 72G/G (Wildtyp)

p53-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp G/G (Wildtyp)

Das Diagramm zeigt die p53- Proteinkonzentrationsverteilung bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp G/G über die Zeit. Die absoluten Proteinkonzentrationen wurden gegen die Absolutkonzentration von β -Actin normalisiert. Dies ist möglich, da die β -Actin-Konzentrationen weitgehend konstant sind (Abbildung 13)

Z0 steht für den Zeitpunkt 0, d.h. ohne Stimulation, Z1 für 24h, Z2 für 48h und Z3 für 72h nach Stimulation mit TNF- α und Il-1 β .

Man sieht, dass die p53-Konzentrationen bei Z0 und Z1 fast konstant bleiben, jedoch auf unterschiedlich hohen Konzentrationsniveaus. Sie fallen in der Folge zu Z2 hin ab, um dann zu Z3 hin wieder anzusteigen.

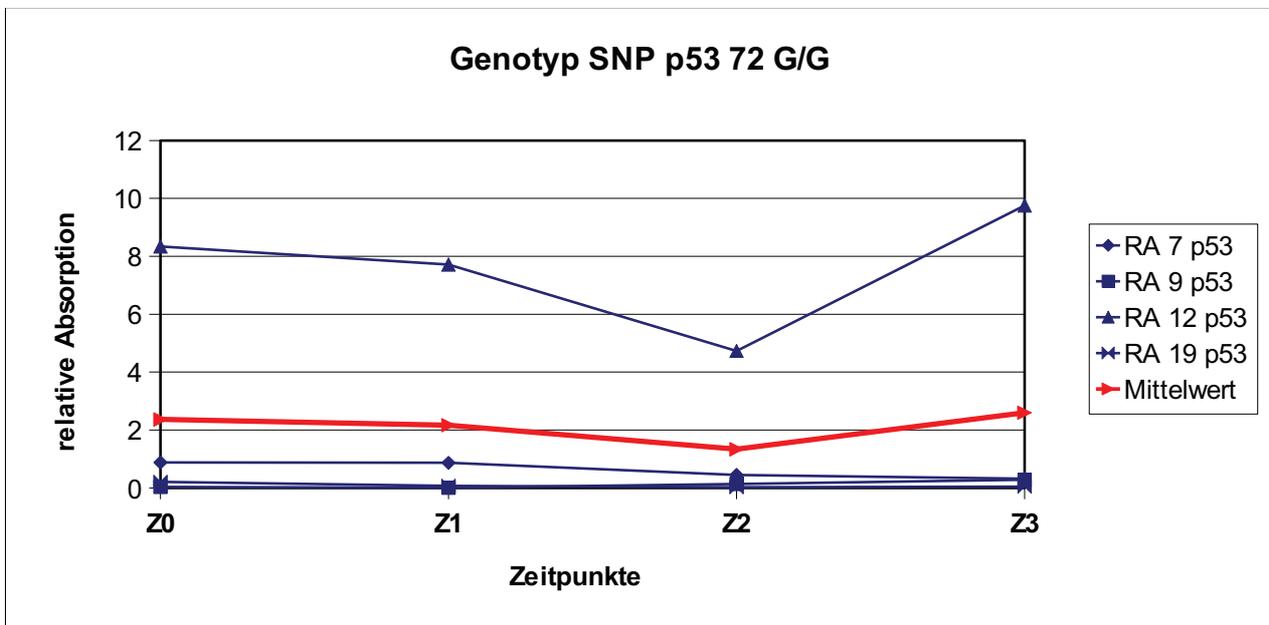


Abbildung 13. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei RA-Patienten homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp) zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

RA = rheumatoide Arthritis

p21-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp G/G (Wildtyp)

Die Konzentrationen von p21 zeigen in den ersten 48h zunächst einen leichten Abfall, um danach bis zum Zeitpunkt 72h gering anzusteigen.

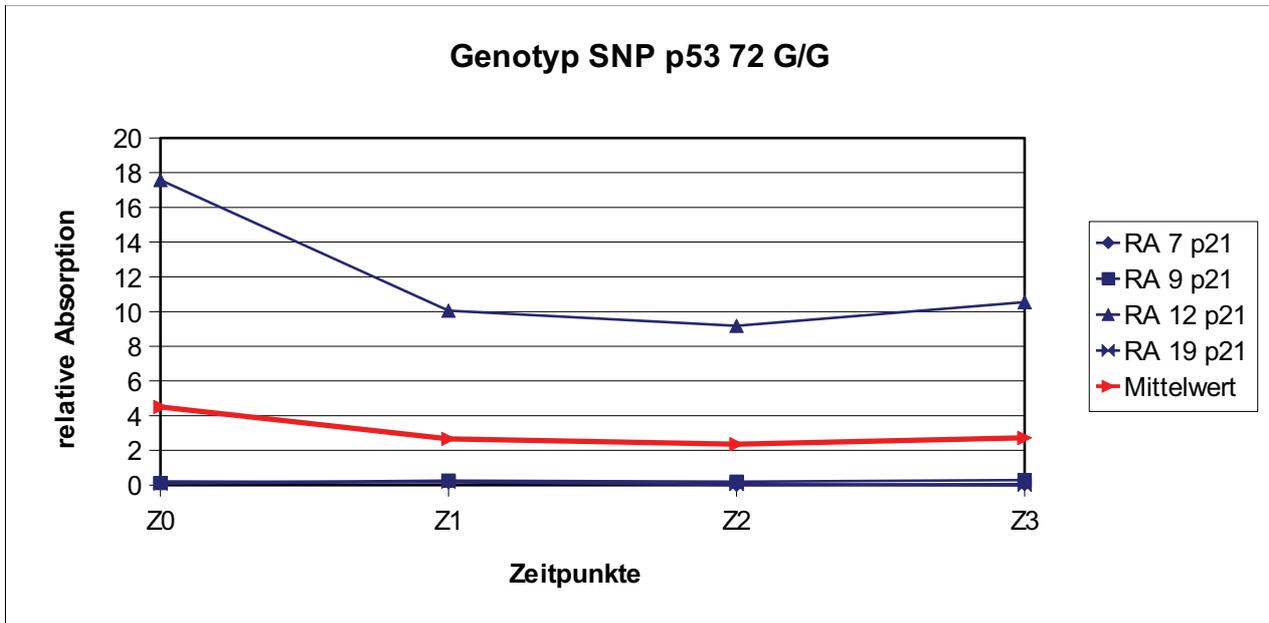


Abbildung 14. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei RA-Patienten homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp) für p53 zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Insgesamt ist bei allen Proben von RA- Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 G/G (Wildtyp) ein eher gleichsinniges Verhalten mit tendenziellem Abfall der Konzentrationen der beiden Proteine p53 und p21 zu beobachten.

p53-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G

Nach mäßigem Abfall der p53- Proteinkonzentration kommt es tendenziell zu einem Anstieg zwischen Z1 und Z2 und danach wieder zu einem Abfall.

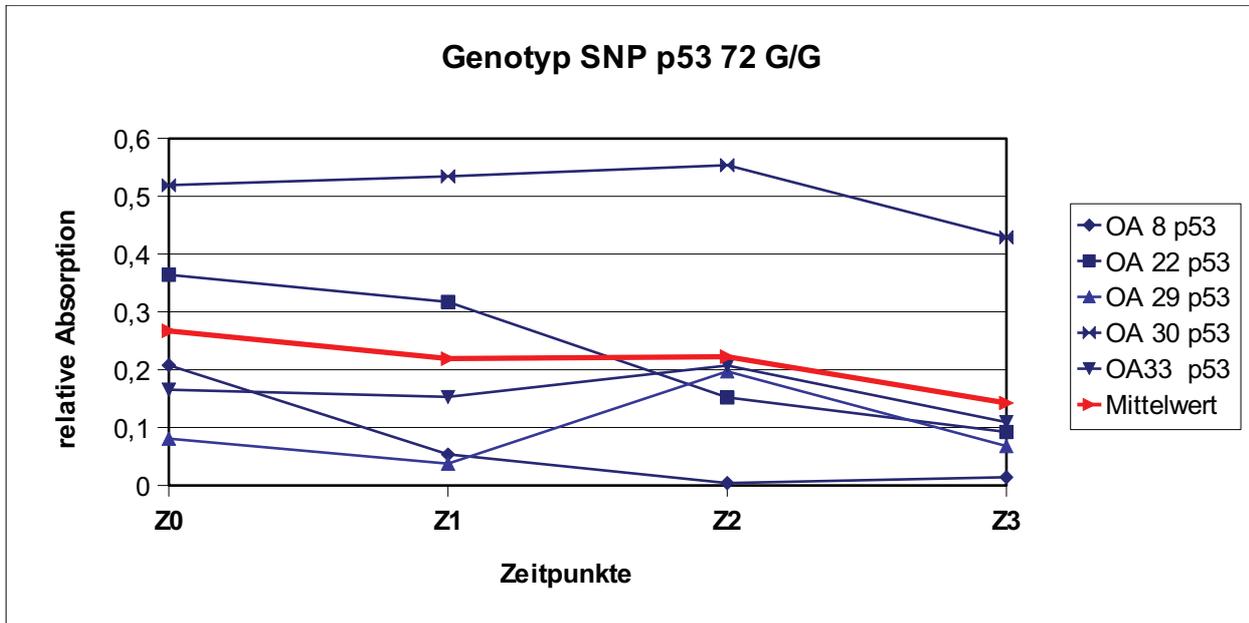


Abbildung 15. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei OA-Patienten homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp) zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

OA = Osteoarthritis (Arthrose)

p21-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G

Die Proteinkonzentrationen von OA22, OA30 und OA 33 zeigen zunächst bis Z1 einen leichten Anstieg und verhalten sich dann ab Z2 sehr unterschiedlich. OA8 und OA29 verhalten sich nahezu identisch jedoch auf unterschiedlichen Konzentrationsniveaus.

Der Mittelwert der p21-Proteinkonzentrationen zeigt einen nahezu linearen Abfall der Proteinkonzentrationen.

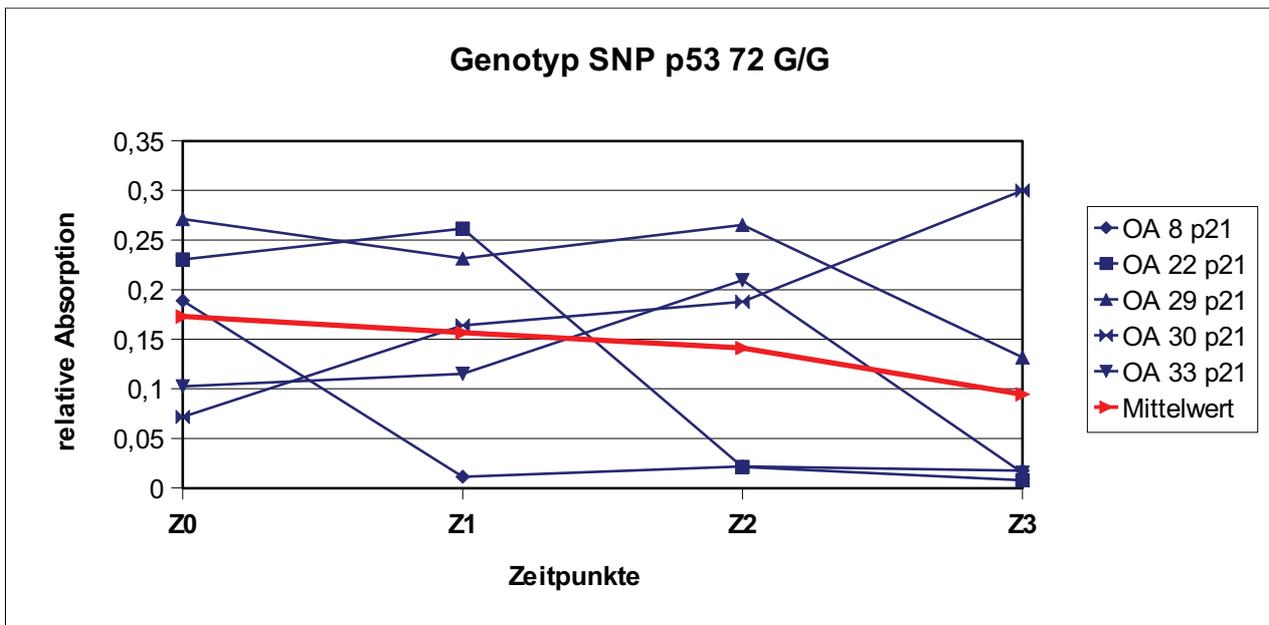


Abbildung 16. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei OA-Patienten homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp) zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Insgesamt ist bei allen Proben von OA- Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G ein etwa gleichsinniges Verhalten der beiden Proteine p53 und p21 im Sinne eines Konzentrationsabfalls zum Zeitpunkt Z3 hin zu beobachten.

Bei beiden Patientenkollektiven (RA und OA, beide mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G) verlaufen die Proteinkonzentrationen für p53 und p21 in etwa gleichsinnig. Weitere Tendenzen zu beschreiben, wäre spekulativ.

Tabelle 13 fasst die relativen Absorptionsraten der p53-Konzentrationen des untersuchten Kollektivs (RA-FLS SNP 72 p53 G/G und OA-FLS SNP 72 p53 G/G) zu den jeweiligen Zeitpunkten zusammen und vergleicht die Mittelwerte der beiden Zelllinien (RA versus OA).

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,54	0,21	0,46	0,15	0,28	0,19	0,28	0,09
Mittelwert	2,36	0,26	2,16	0,21	1,33	0,22	2,59	0,14
SD	3,46	0,15	3,22	0,18	1,96	0,18	4,13	0,14
SEM	1,73	0,06	1,61	0,08	0,98	0,08	2,06	0,06
p-Wert	0,73		0,73		0,91		0,41	

Tabelle 13. Vergleich der p53-Konzentrationen bei RA mit homozygotem Genotyp SNP 72 p53 G/G (Wildtyp) vs. OA mit homozygotem Genotyp SNP 72 p53 G/G (Wildtyp)

SD: Standardabweichung, SEM: Standardfehler

Der Vergleich der p-Werte der p53-Proteinkonzentrationen von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit den p53-Proteinkonzentrationen von Patienten, die an Arthrose erkrankt sind, zeigt bei homozygotem Genotyp SNP p52 72G/G (Wildtyp), unabhängig von Stimulation mit TNF- α und Il-1 β , zu den untersuchten Zeitpunkten Z0-Z3 keinen signifikanten Unterschied.

Analog zu Tabelle 13 zeigt Tabelle 14 die jeweiligen p21-Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten im Vergleich RA versus OA.

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,16	0,18	0,23	0,16	0,12	0,18	0,17	0,02
Mittelwert	4,5	0,17	2,67	0,15	2,36	0,14	2,72	0,09
SD	7,55	0,07	4,25	0,08	3,93	0,11	4,51	0,11
SEM	3,77	0,03	2,12	0,03	1,96	0,04	2,25	0,05
p-Wert	0,91		0,19		1		0,73	

Tabelle 14. Vergleich der p21-Konzentrationen bei RA mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp) vs. OA mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp)

Der Vergleich der p-Werte der p21-Proteinkonzentrationen von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit den p21-Proteinkonzentrationen von Patienten, die an Arthrose erkrankt sind, zeigt bei homozygotem Genotyp SNP p53 72 G/G (Wildtyp), unabhängig von Stimulation mit

TNF- α und Il-1 β , keinen signifikanten Unterschied.

4.3.1.2 Heterozygoter Genotyp SNP p53 72 G/C

p53-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C

Die p53-Konzentrationen fallen ab bzw. steigen leicht an. Zwischen Z1 und Z2 zeigt sich dann ein leichter Anstieg und danach ein geringer Abfall der Proteinkonzentrationen.

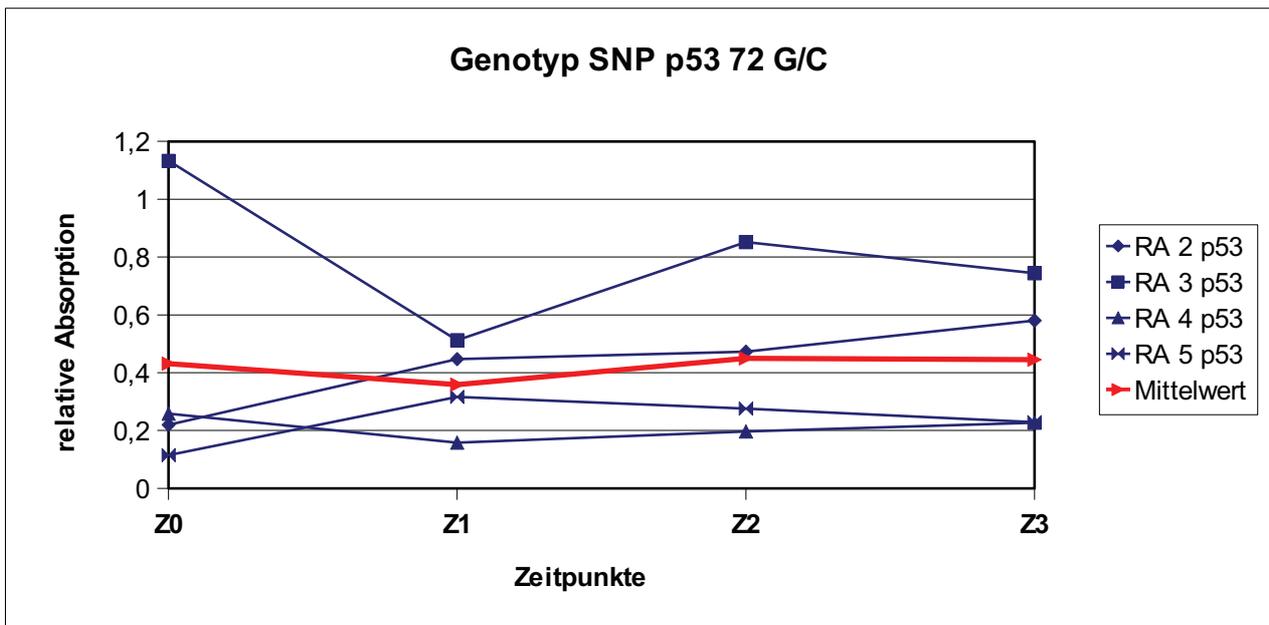


Abbildung 17. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei RA-Patienten heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C

Bei p21 ist über den ganzen Zeitverlauf ein fast kontinuierliches Abfallen der Konzentration zu beobachten.

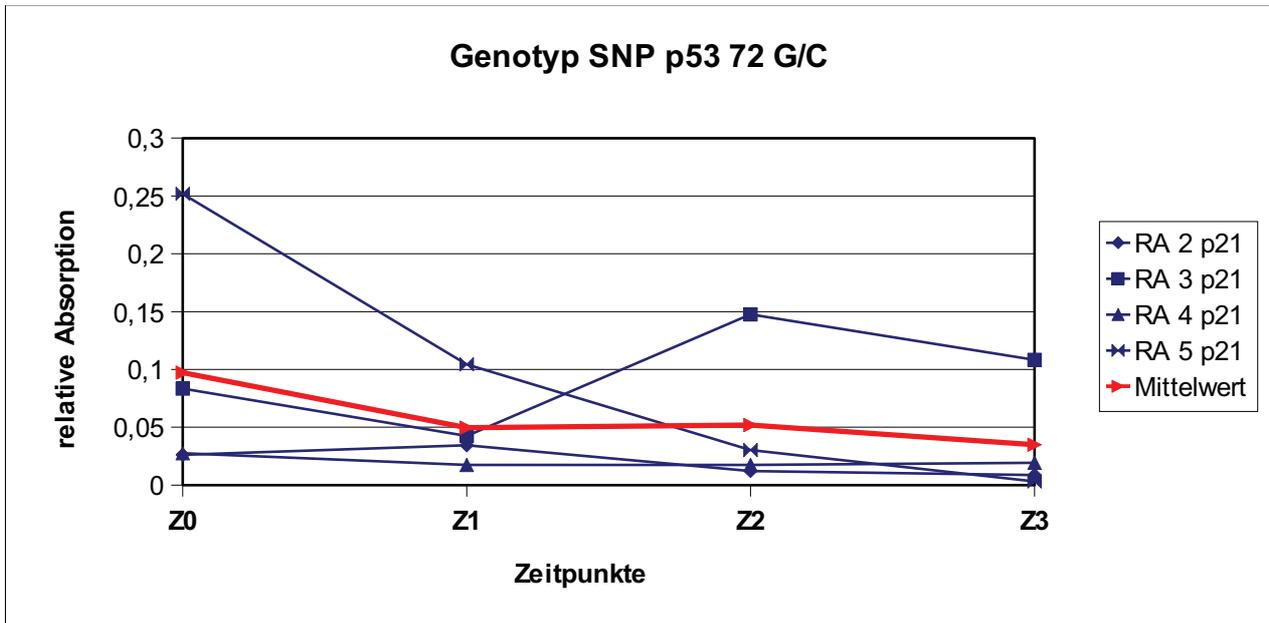


Abbildung 18: Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei RA-Patienten heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Verlauf der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 bei Patienten mit RA und heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C keinem einheitlichen Muster folgt. Die p53-Konzentrationen scheinen durch TNF- α und IL-1 β stimulierbar; die p21-Konzentrationen bleiben niedrig.

p53-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C

.Die p53-Proteinkonzentrationen zeigen zunächst einen Abfall zu Z1, danach einen deutlichen Anstieg zu Z2, dann wiederum einen deutlichen Abfall.

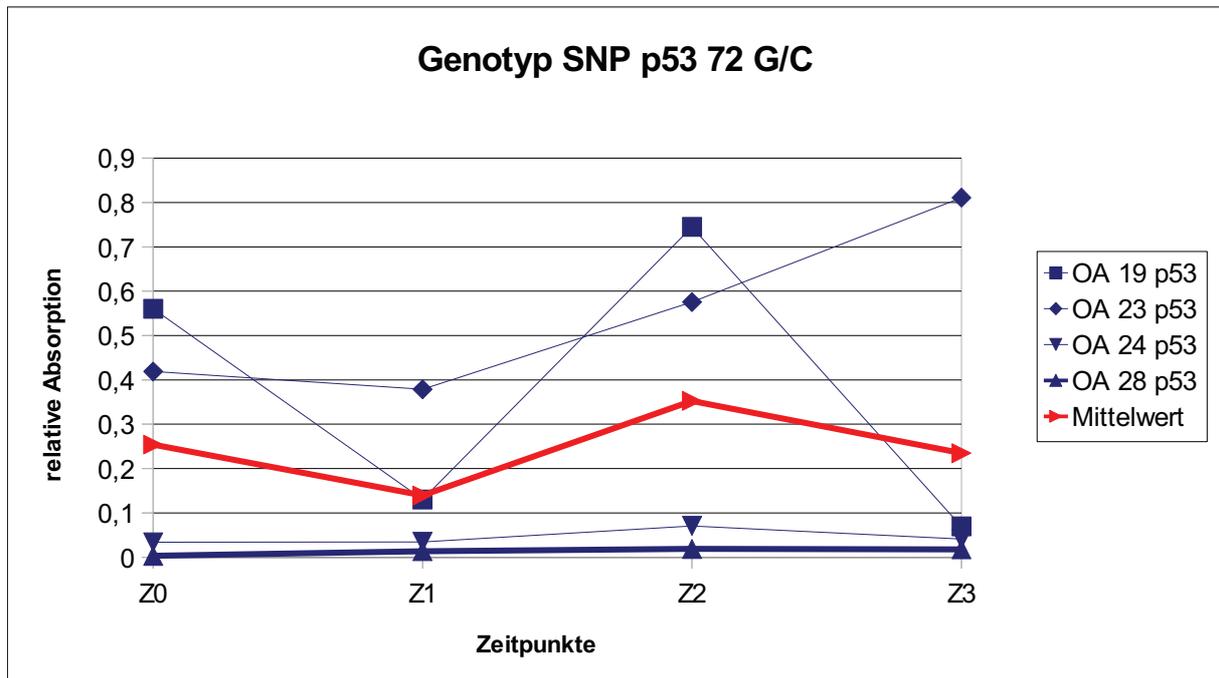


Abbildung 19. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei OA-Patienten heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C

Einem tendenziellen Anstieg der p21-Proteinkonzentrationen über die ersten 48h folgt ein leichtes Abfallen in den letzten 24h. Abweichend davon verhält sich die Proteinkonzentration von OA23, bei der ein permanenter Anstieg der p21-Konzentration über die Zeit zu sehen ist.

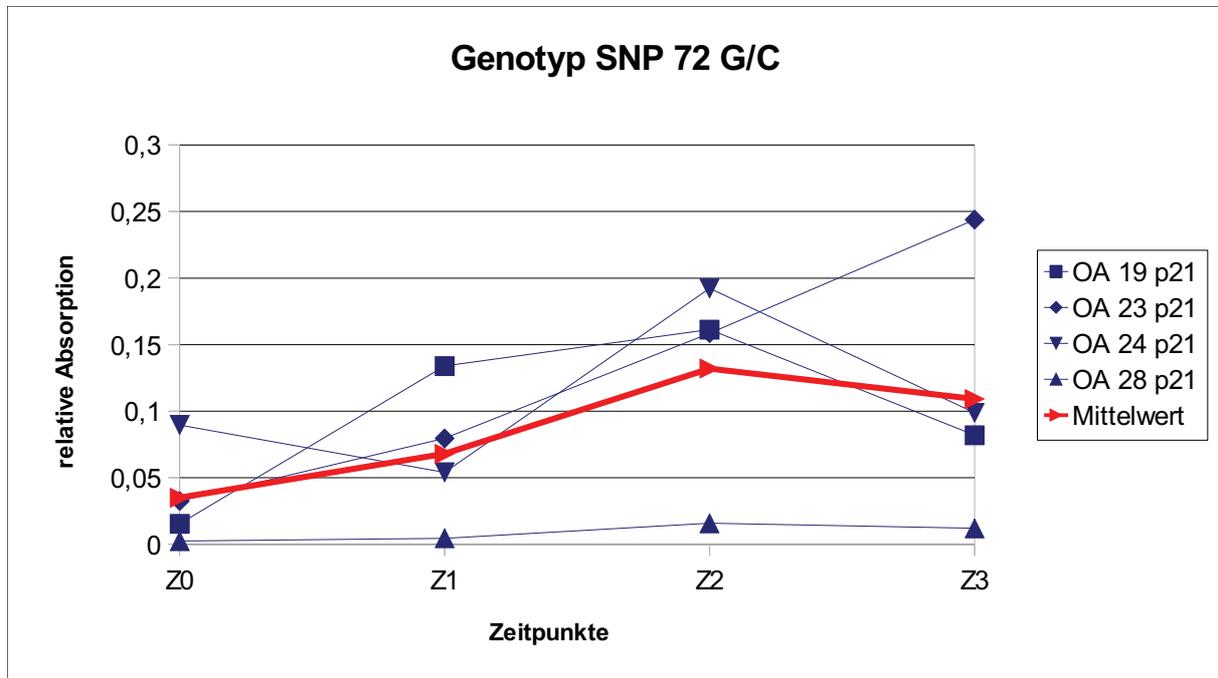


Abbildung 20. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Die p53- und p21-Proteinkonzentrationen verhalten sich bei allen OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C annähernd gleichsinnig mit einer Konzentrationssteigerung nach Z1.

Beide Proteinkonzentrationen (p53 und p21) beider heterozygoter Patientengruppen mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C scheinen stimulierbar, bei RA scheint die p21-Konzentration konstant niedrig zu sein.

Tabelle 15 fasst die relativen Absorptionswerte des untersuchten Kollektivs (RA-FLS und OA-FLS) zu den jeweiligen Zeitpunkten zusammen und vergleicht die Mittelwerte der beiden Gruppen von Zelllinien (RA versus OA).

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,23	0,22	0,38	0,08	0,37	0,32	0,41	0,51
Mittelwert	0,43	0,25	0,35	0,13	0,44	0,35	0,44	0,23
SD	0,41	0,24	0,13	0,14	0,25	0,31	0,22	0,33
SEM	0,21	0,12	0,06	0,07	0,12	0,15	0,11	0,16
p-Wert	0,68		0,11		0,68		0,34	

Tabelle 15. Vergleich der p53-Konzentrationen bei RA mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C vs. OA mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C

Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen (RA versus OA) mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C sind hinsichtlich der p53-Proteinkonzentrationen nicht signifikant.

Analog zu Tabelle 15 zeigt Tabelle 16 die jeweiligen p21-Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten im Vergleich RA versus OA.

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,05	0,02	0,03	0,06	0,02	0,15	0,01	0,09
Mittelwert	0,09	0,03	0,04	0,06	0,05	0,13	0,03	0,11
SD	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	0,06	0,04	0,08
SEM	0,04	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,04
p-Wert	0,48		0,68		0,21		0,34	

Tabelle 16 Vergleich der p21-Konzentrationen bei RA mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C vs. OA mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C

Die Unterschiede zwischen den Patientengruppen (RA versus OA) mit heterozygotem Genotyp SNP p53 72 G/C sind hinsichtlich der p21-Proteinkonzentrationen nicht signifikant.

4.3.1.3 Homozygoter Genotyp SNP p53 72 C/C

p53-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C

Bei einem Anstieg der p53-Proteinkonzentration zu Z1 folgt ein kontinuierlicher Abfall.

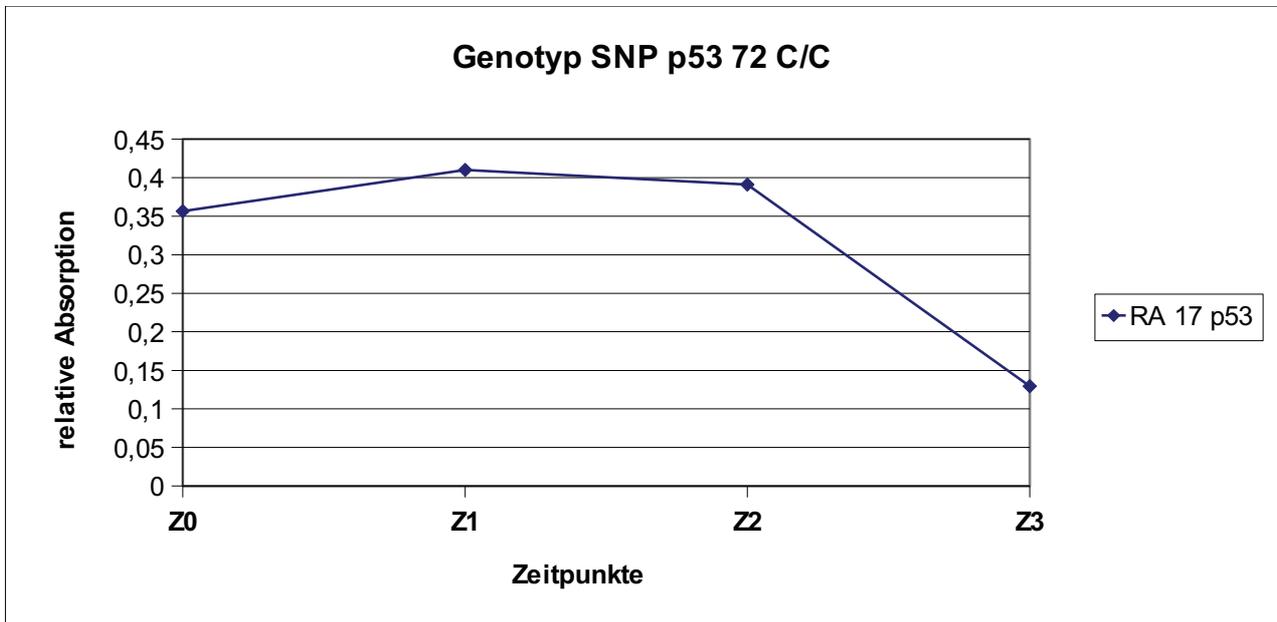


Abbildung 21. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei einem RA-Patient mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C

p21-Anstieg zu Z1, dann zeigt sich ein kontinuierlichen Abfall der Proteinkonzentration.

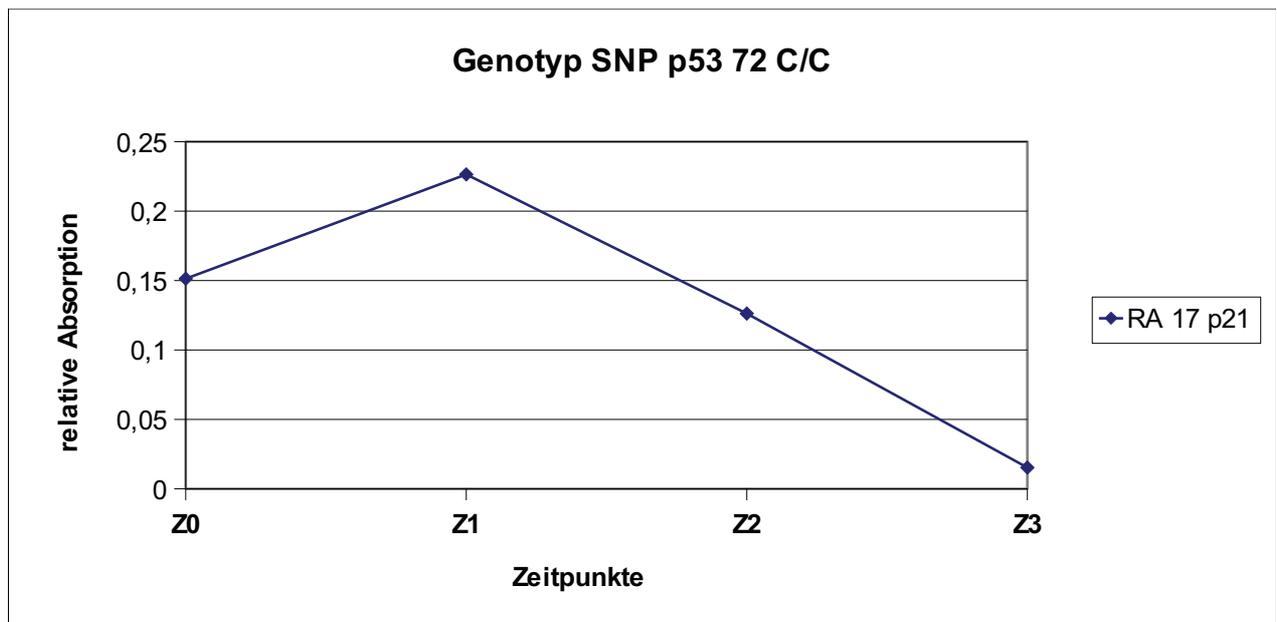


Abbildung 22. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei einem RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Aufgrund der generell niedrigen Allelfrequenz für den homozygoten Genotyp SNP p53 72 C/C gibt es in dieser Gruppe nur einen Patienten.

p53-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C

Tendenziell zeigt sich ein Anstieg der p53-Konzentration über die verschiedenen Zeitpunkte.

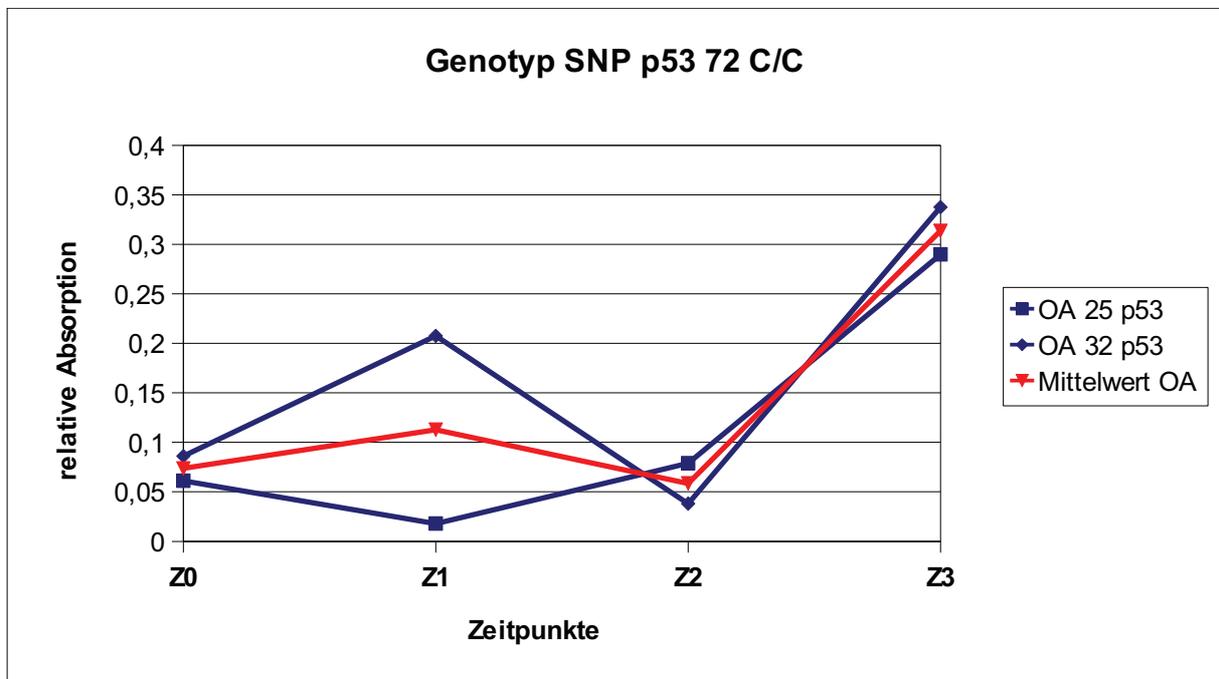


Abbildung 23. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C

Die p21-Konzentration steigt bis Z1 minimal, fällt zu Z2 ab und hat zu Zeitpunkt Z3 seinen Höhepunkt.

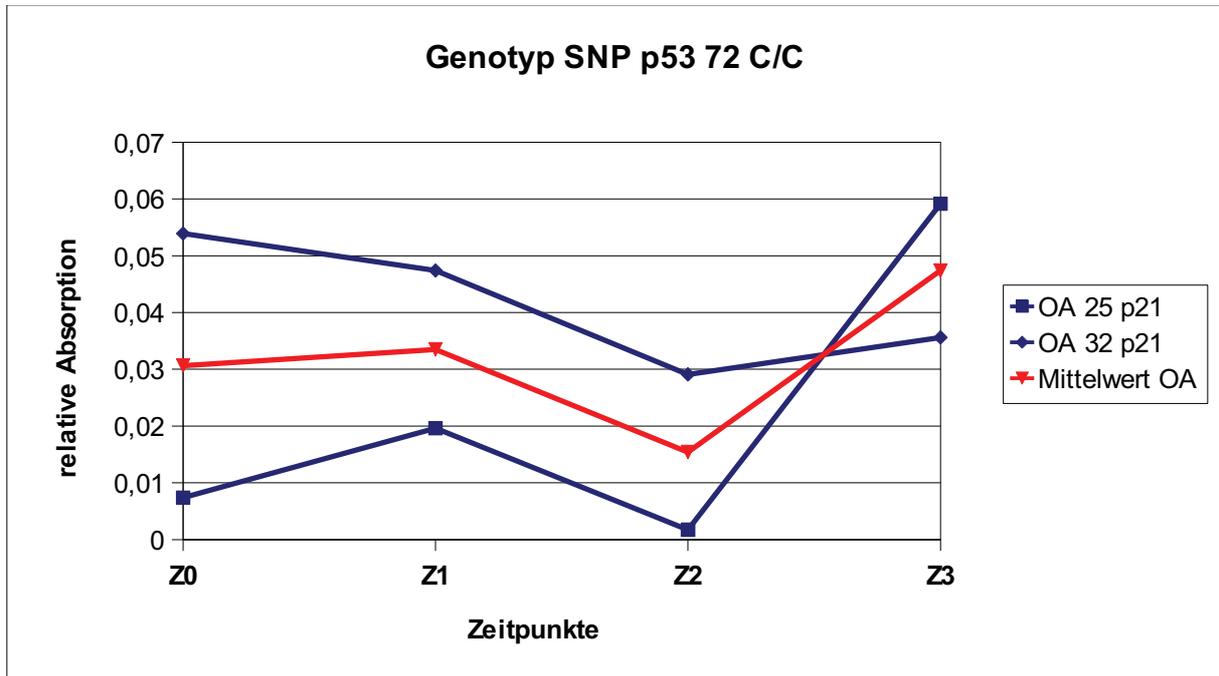


Abbildung 24. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP p53 72 C/C zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Vergleicht man die Proteinkonzentrationen im Mittel der beiden Patienten (OA 25 und OA 32), so stellt man fest, dass p53 mit Stimulation tendenziell ansteigt.

Für den homozygoten Genotyp SNP p53 72 C/C ist aufgrund des kleinen Patientenkollektivs (RA n = 1 versus OA n = 2) eine statistische Auswertung nicht sinnvoll.

4.3.1.4 Homozygoter Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

p53-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

Die Proteinkonzentration für p53 ist bei allen Proben nahezu konstant hoch über die Zeit, bei RA 12 jedoch auf höherem Niveau.

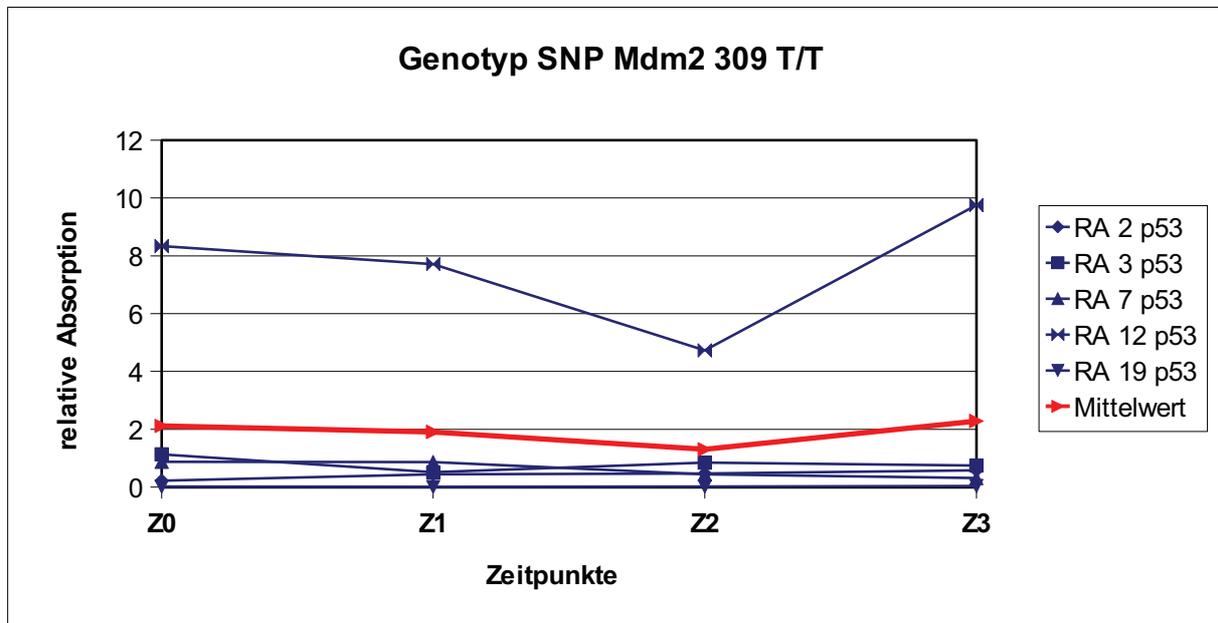


Abbildung 25. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

Die Konzentration von p21 zeigt in den ersten 48h zunächst einen leichten, Abfall, um danach bis zum Zeitpunkt 72h gering anzusteigen. Bis auf RA 12 liegen die Proteinkonzentrationen auf niedrigem Niveau.

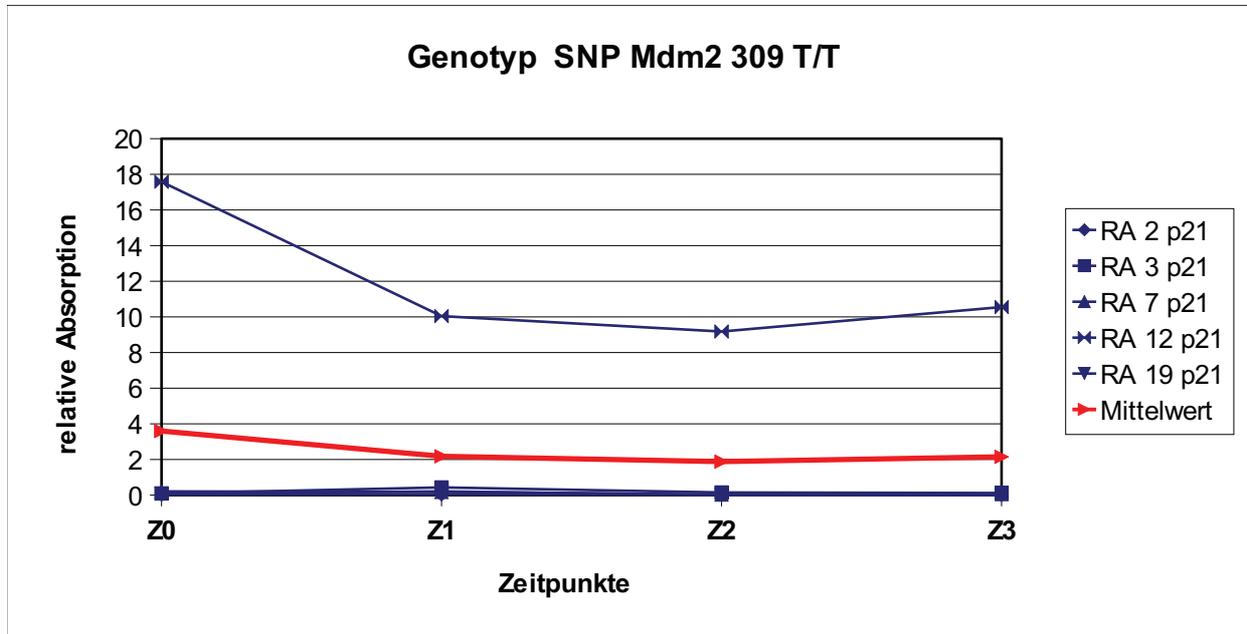


Abbildung 26. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Insgesamt zeigt sich ein homogenes Muster der beiden Proteinkonzentrationen.

p53-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

Es zeigt sich ein geringfügiger Anstieg der p53-Konzentration über die verschiedenen Messzeitpunkten.

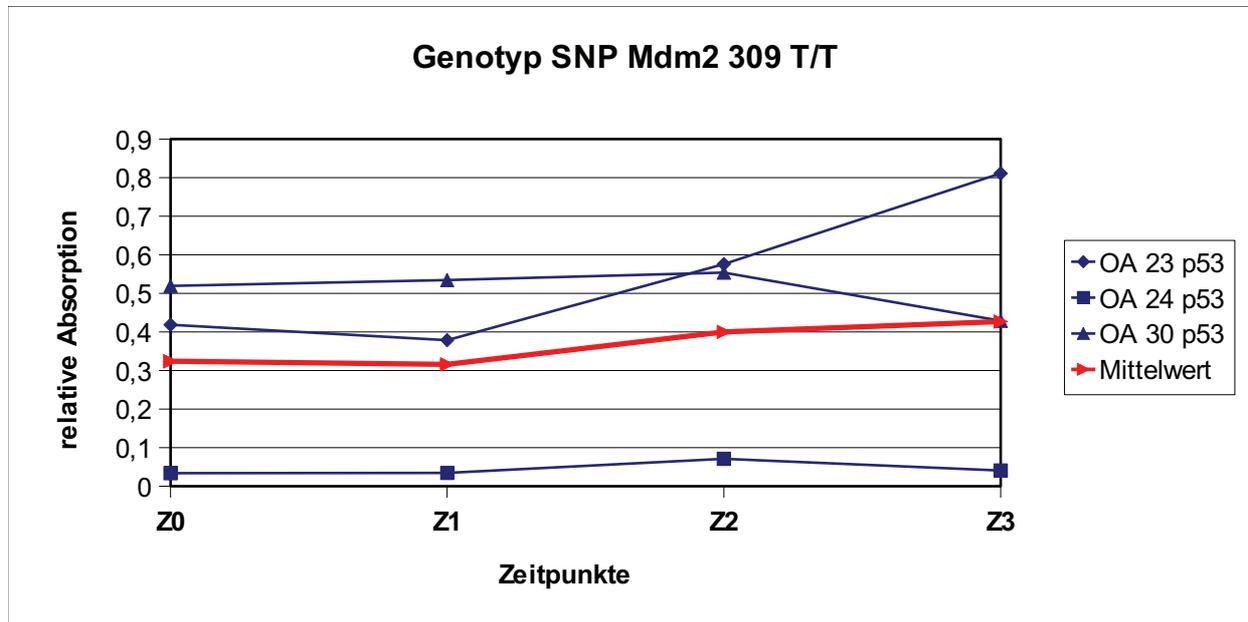


Abbildung 27. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

Es ist tendenziell ein Anstieg der p21-Konzentration über die Zeit zu sehen.

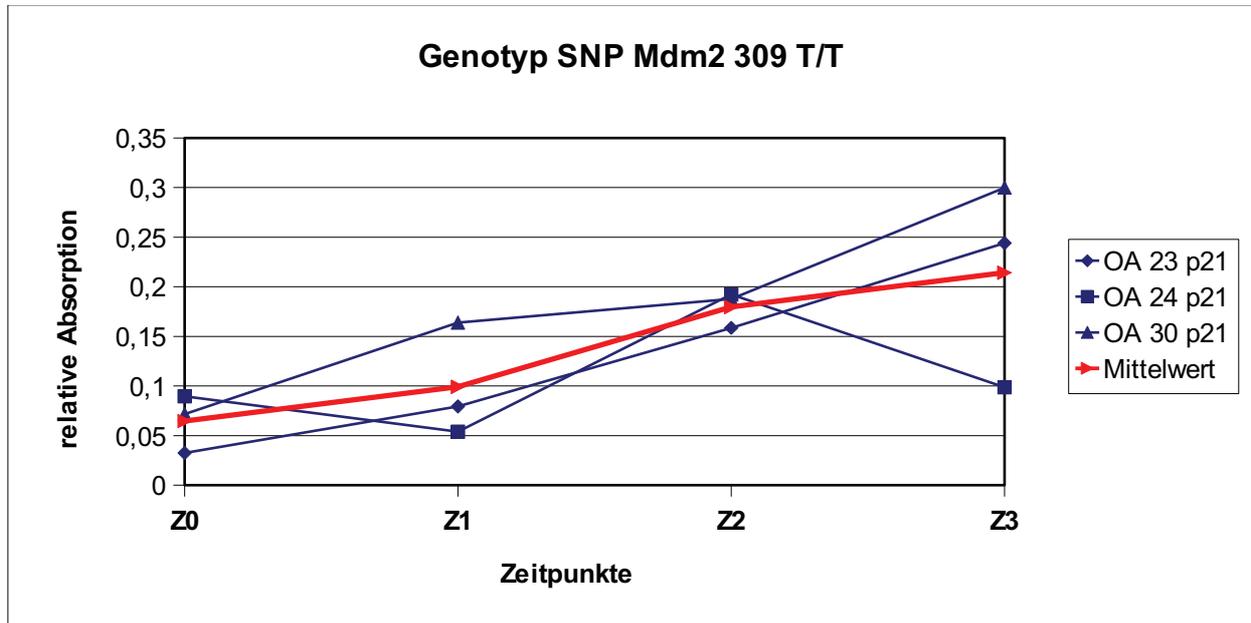


Abbildung 28. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei den Proben von OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T ein annähernd gleichsinniges Verhalten mit Tendenz zu einem Konzentrationsanstieg nach Stimulation zu sehen ist.

Bei den RA-Patienten sind die Proteinkonzentrationen annähernd konstant hoch, mit lediglich diskretem Proteinanstieg zum Zeitpunkt Z3.

Tabelle 17 fasst die relativen Absorptionwerte des untersuchten Kollektivs (RA-FLS und OA-FLS) zu den jeweiligen Zeitpunkten zusammen und vergleicht die Mittelwerte der beiden Gruppen von Zelllinien (RA versus OA).

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,87	0,41	0,51	0,37	0,47	0,55	0,58	0,42
Mittelwert	2,11	0,32	1,91	0,31	1,31	0,39	2,28	0,42
SD	3,13	0,18	2,91	0,18	1,37	0,21	3,47	0,27
SEM	1,41	0,14	1,31	0,14	0,77	0,16	1,67	0,22
p-Wert	0,39		0,39		1,01		1,01	

Tabelle 17. Vergleich der p53-Konzentrationen bei RA mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp) vs. OA mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

Beim Vergleich der p53-Konzentrationen (RA versus OA) bei homozygotem Genotyp SNP Mdm2 T/T (Wildtyp) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die RA-Gruppe stellt sich insgesamt wenig homogen dar.

Analog zu Tabelle 17 zeigt Tabelle 18 die jeweiligen p21-Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten im Vergleich RA versus OA.

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,08	0,07	0,19	0,07	0,01	0,18	0,05	0,24
Mittelwert	3,59	0,06	2,17	0,09	1,87	0,17	2,14	0,21
SD	6,99	0,02	3,93	0,04	3,65	0,01	4,21	0,08
SEM	3,12	0,01	1,76	0,02	1,63	0,01	1,87	0,04
p-Wert	0,57		0,78		0,25		0,39	

Tabelle 18. Vergleich der p21-Konzentrationen bei RA mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp) vs. OA mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 T/T (Wildtyp)

Beim Vergleich der p21-Konzentrationen (RA versus OA) bei homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309T/T (Wildtyp) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

4.3.1.5 Heterozygoter Genotyp SNP Mdm2 309 G/T

p53-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T

Das Diagramm von p53 zeigt in den ersten 24h ein leichtes Abfallen der Konzentration. Zu den Zeitpunkten Z1 bis Z3 sieht man dann einen nahezu linearen Anstieg der Proteinkonzentration. RA17 verhält sich genau gegensätzlich.

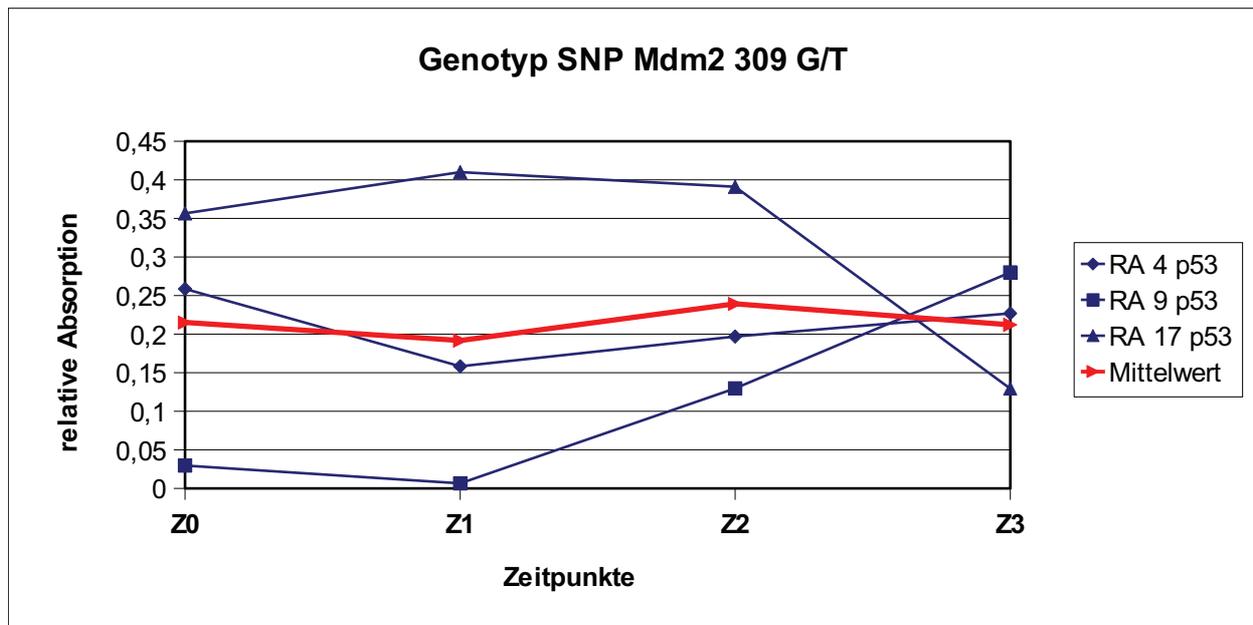


Abbildung 28. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei RA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T

Nach einem Anstieg, fällt p21 bis zum Zeitpunkt Z2 ab. Zu Z3 ist die Tendenz der Proteinkonzentration bei allen Proben unterschiedlich.

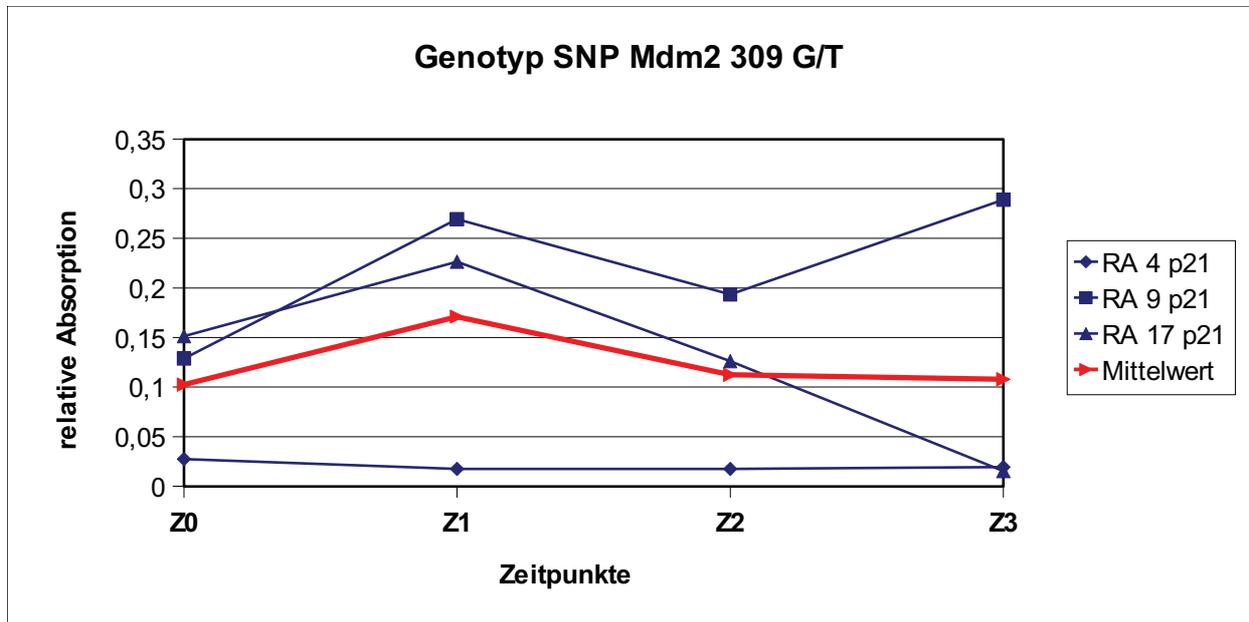


Abbildung 29. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei RA-Patienten mit heterozygotem GenotypSNP Mdm2 309 G/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Betrachtet man alle Kurven sowohl von p53 als auch von p21, so ist bis auf den anfänglichen Konzentrationsabfall von p53 ein gleichsinniges Verhalten mit Tendenz zu einem Konzentrationsanstieg zu beobachten. In der Zusammenschau lässt sich also folgendes sagen: p53- und p21-Konzentrationen verhalten sich in etwa gleichsinnig.

p53-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T

Im Mittel zeigt sich ein Proteinkonzentrationsanstieg über die Zeit.

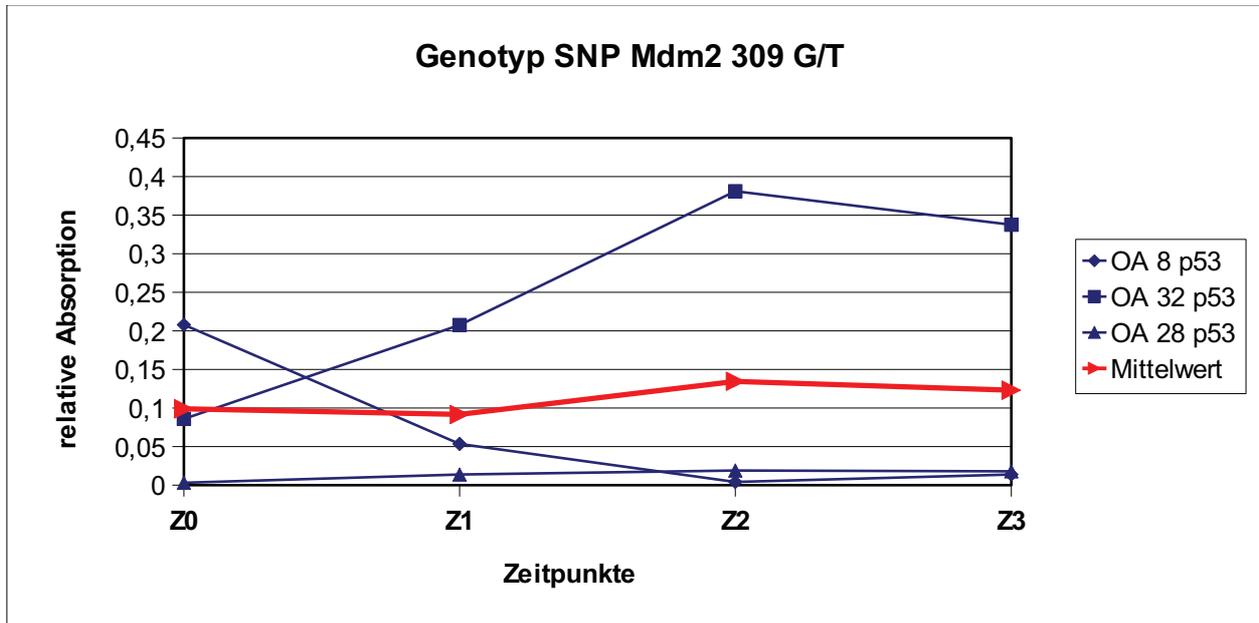


Abbildung 30. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p53 bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T

Nach 24h ist ein rascher Abfall der p21- Proteinkonzentration zu sehen, danach nimmt die Konzentration bis auf den Ausgangswert wieder zu.

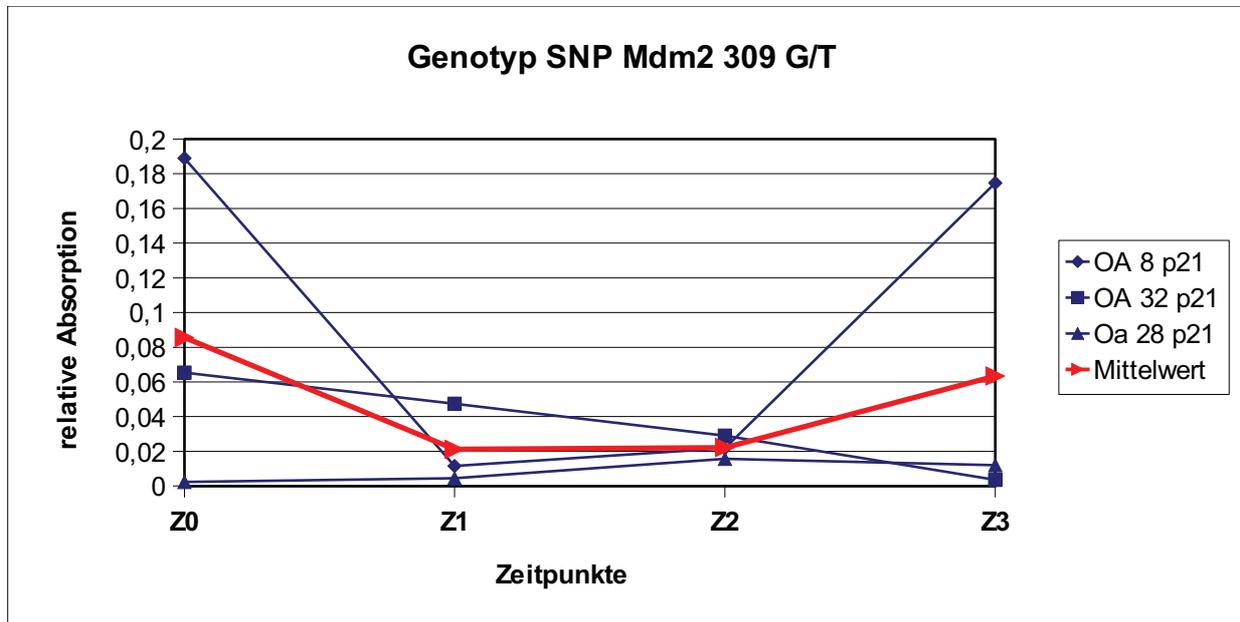


Abbildung 31. Quantifizierung der Proteinkonzentrationen für p21 bei OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Tendenziell ist bei allen Proben von OA-Patienten mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T ein unheitliches Muster der Proteinkonzentrationen für p21 und p53 über die verschiedenen Messzeitpunkte auszumachen.

Tabelle 19 fasst die relativen Absorbitionswerte des untersuchten Kollektivs (RA-FLS und OA-FLS) zu den jeweiligen Zeitpunkte zusammen und vergleicht die Mittelwerte der beiden Gruppen von Zelllinien (RA versus OA).

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,25	0,08	0,15	0,05	0,19	0,01	0,22	0,01
Mittelwert	0,21	0,09	0,19	0,09	0,23	0,13	0,21	0,12
SD	0,13	0,08	0,16	0,08	0,11	0,17	0,06	0,15
SEM	0,07	0,04	0,09	0,04	0,06	0,01	0,03	0,08
p-Wert	0,41		1,01		0,11		0,69	

Tab. 19 Vergleich der p53-Konzentrationen bei RA mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T vs. OA mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 (G/T).

Beim Vergleich der p53-Konzentrationen (RA versus OA) bei heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Analog zu Tabelle 19 zeigt Tabelle 20 die jeweiligen p21-Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten im Vergleich RA versus OA.

	Z0		Z1		Z2		Z3	
	RA	OA	RA	OA	RA	OA	RA	OA
Median	0,12	0,06	0,22	0,01	0,12	0,02	0,01	0,01
Mittelwert	0,11	0,08	0,17	0,02	0,11	0,02	0,11	0,06
SD	0,05	0,07	0,11	0,01	0,07	0,01	0,12	0,07
SEM	0,02	0,04	0,04	0,01	0,03	0,01	0,05	0,04
p-Wert	1,01		0,21		0,39		0,71	

Tabelle 20. Vergleich der p21-Konzentrationen bei RA mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T vs. OA mit heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T.

Beim Vergleich der p21-Konzentrationen (RA versus OA) bei heterozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/T zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

4.3.1.6 Homozygoter Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

p53-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

Nach 24h ist ein rascher Abfall der p53- Proteinkonzentration zu sehen.

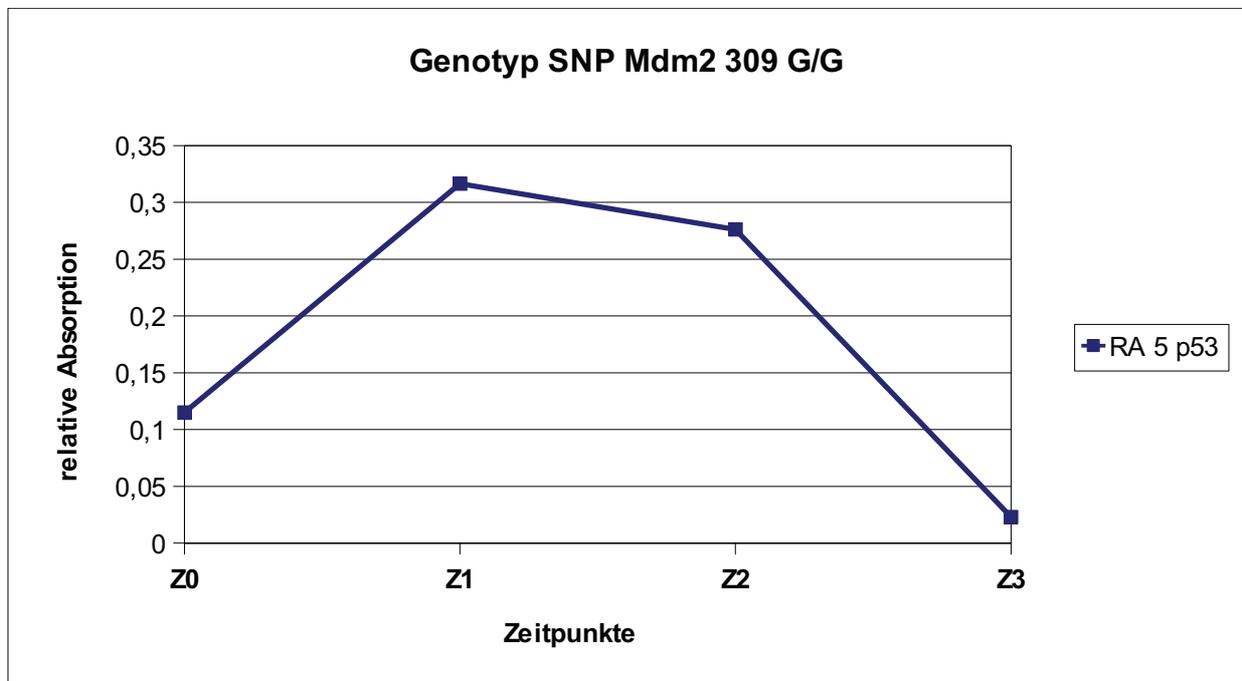


Abbildung 32. Quantifizierung der Proteinkonzentration für p53 bei einem RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

Die p21-Konzentration fällt kontinuierlich über die Zeit.

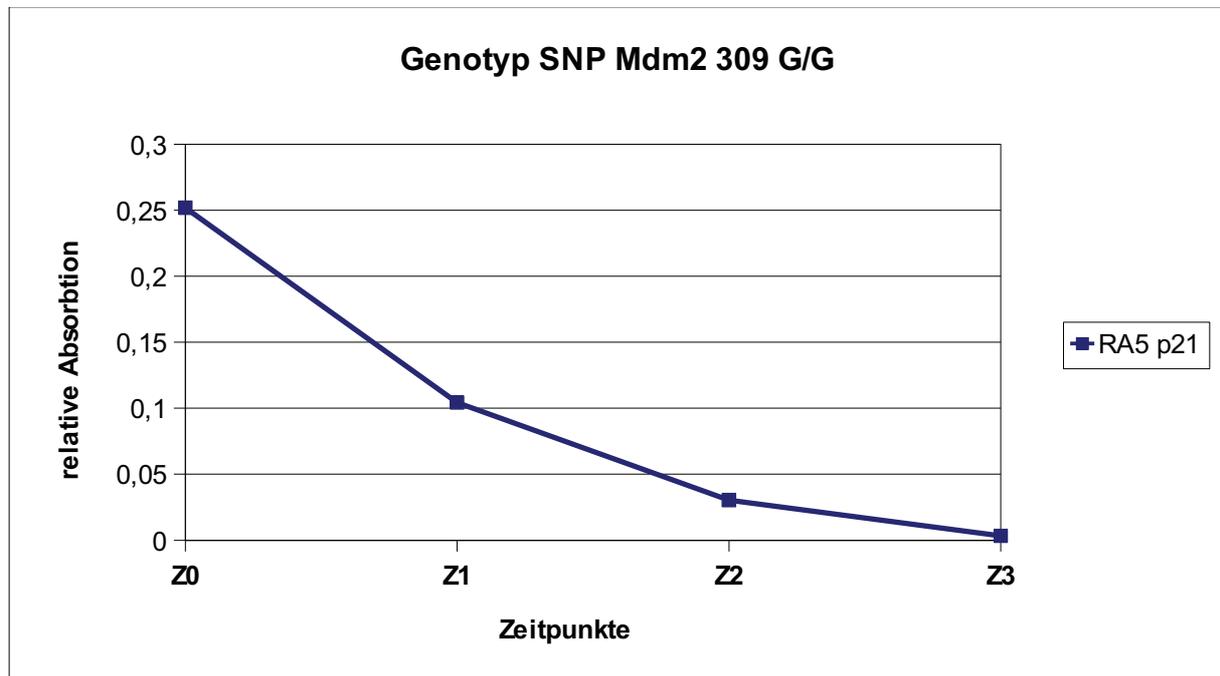


Abbildung 33. Quantifizierung der Proteinkonzentration für p21 bei einem RA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Aufgrund der niedrigen Allelfrequenz für den Genotyp SNP Mdm2 309 G/G gibt es in dieser Gruppe nur einen Patienten.

p53-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

Die p53-Konzentration fällt zum Zeitpunkt Z1, danach folgt ein geringer Anstieg zu Z2, dann zu Z3 ein Abfall der Konzentration.

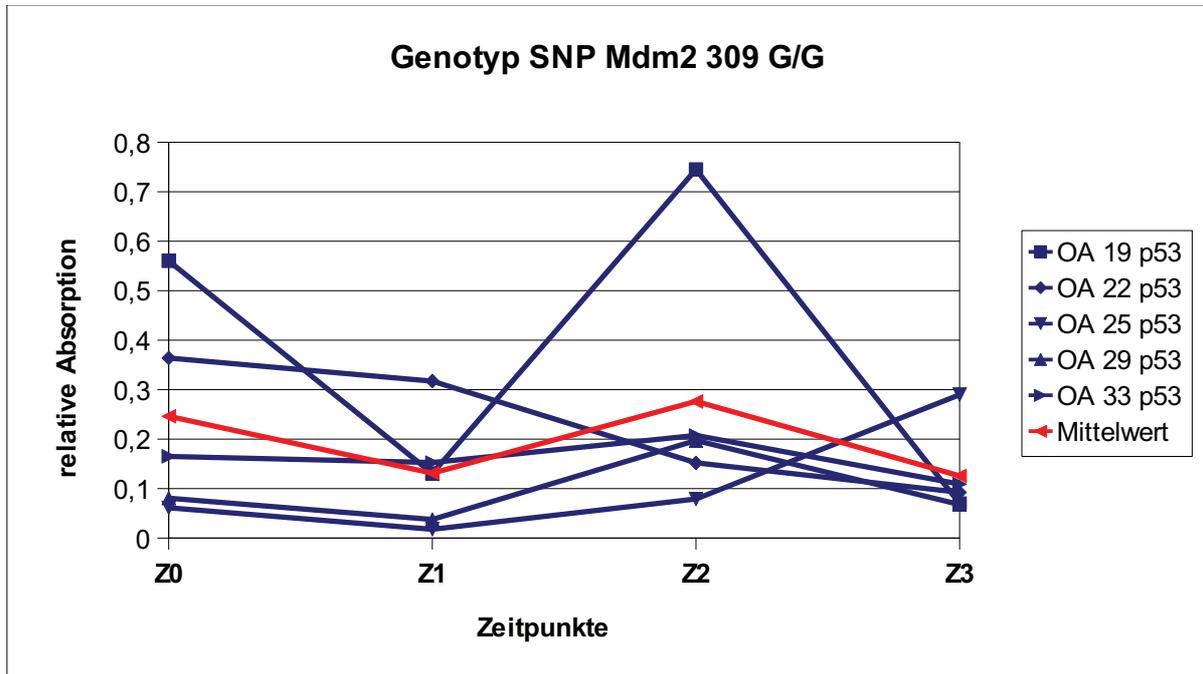


Abbildung 34. Quantifizierung der Proteinkonzentration für p53 bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309G/G zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

p21-Proteinkonzentrationen bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

P21 zeigt tendenziell einen Abfall der Konzentration bis zum Zeitpunkt Z3.

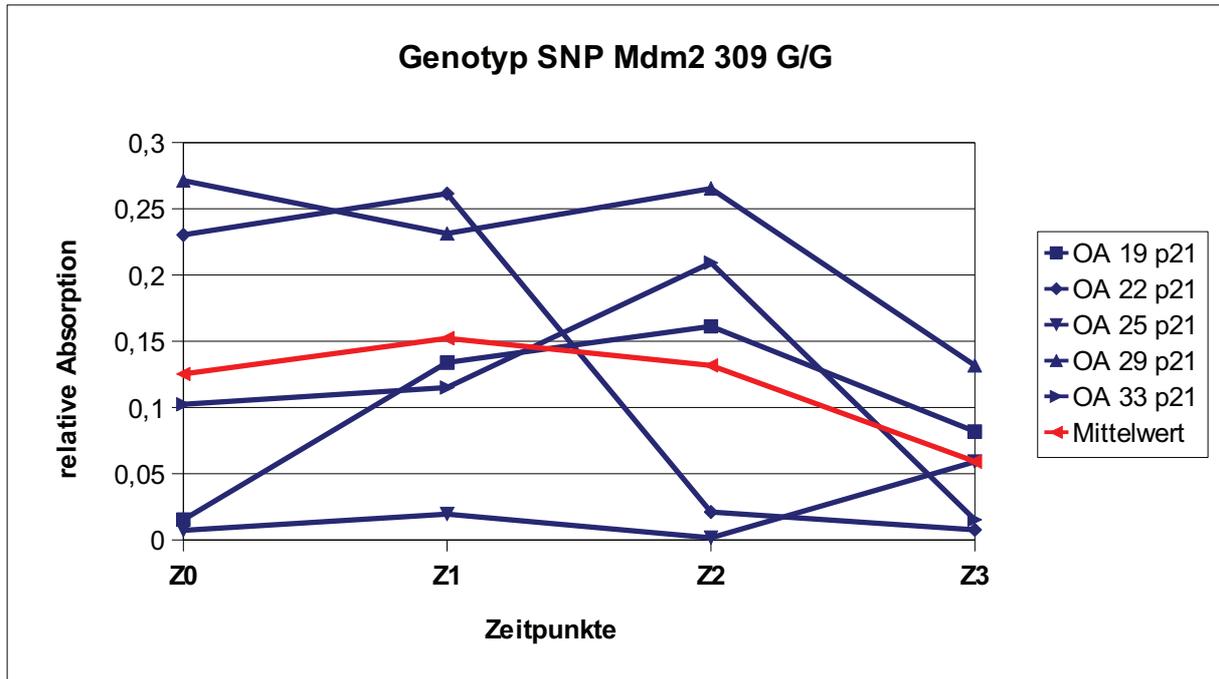


Abbildung 35. Quantifizierung der Proteinkonzentration für p21 bei OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G zu den Zeitpunkten Z0 bis Z3, angegeben als relative Absorption.

Es zeigt sich bei allen Proben von OA-Patienten mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G tendenziell ein Konzentrationsabfall von p53 und p21 zum Zeitpunkt Z3.

	Z0	Z1	Z2	Z3
Median	0,16	0,13	0,19	0,09
Mittelwert	0,24	0,13	0,27	0,12
SD	0,19	0,11	0,23	0,08
SEM	0,09	0,05	0,11	0,04

Tabelle 21. p53-Konzentrationen bei OA mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

	Z0	Z1	Z2	Z3
Median	0,11	0,13	0,16	0,05
Mittelwert	0,12	0,15	0,13	0,05
SD	0,11	0,08	0,11	0,04
SEM	0,05	0,04	0,05	0,02

Tabelle 22. p21-Konzentrationen bei OA mit homozygotem Genotyp SNP Mdm2 309 G/G

Für den homozygoten Genotyp SNP mdm2 309 G/G für Mdm2 ist aufgrund des kleinen Patientenkollektivs (RA n = 1 versus OA n = 5) eine statistische Auswertung nicht sinnvoll.

4.4 Abgleich der p53/p21- Proteinkonzentrationen mit der Apoptoseaktivität

Kapitel 4.1.1 zeigt signifikant höhere Apoptoseraten bei OA-Synoviozyten als bei RA-Synoviozyten, ohne zunächst zwischen den verschiedenen Genotypen differenziert zu haben. Das Ergebnis ist auch unabhängig von der Stimulation mit TNF- α und Il-1 β . Vergleicht man die Proteinkonzentrationen von p53 und p21 zwischen den Krankheitsentitäten, so spiegelt sich der signifikante Unterschied der Apoptoseaktivität nicht in den Proteinkonzentrationen des Apoptoseproteins p53 und dem Zyklusarrest-Markern p21 wieder.

Kapitel 4.3.1 zeigt die Proteinkonzentrationen von p53 und p21 graphisch und tabellarisch auf, dabei entspricht der Zeitpunkt Z0 dem ohne Stimulation und Z2 dem der Stimulation nach 48h wie bei der Bestimmung der Apoptoseaktivität.

Die statistische Auswertung der relativen Absorptionsraten für p53 und p21 aus den Tabellen 13 und 15 (p53) und Tabellen 14 und 16 (p21) erbringt keinen Unterschied zwischen RA- und OA-Synoviozyten: p53 ($0,58 \pm 0,13$ versus $0,40 \pm 0,26$) und p21 ($0,71 \pm 0,12$ versus $0,19 \pm 0,11$).

Zum Zeitpunkt Z2 (entspricht 48h Stimulation) ergeben sich ebenfalls keine signifikante Unterschiede in den Proteinkonzentration zwischen den beiden Krankheitsentitäten.

Vergleicht man die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von p53 und p21 bei den RA-Synoviozyten, die je nach Genotyp Mdm2 T309G signifikante Unterschiede in der Apoptoseaktivität haben, stellt man folgendes fest:

RA-Synoviozyten, die den Genotyp TT mit signifikant erniedrigter Apoptoserate tragen, haben im Vergleich zu den Genotypträgern GG mit höherer Apoptoserate keine unterschiedlichen Konzentrationen von p53 und p21 auf Proteinebene.

Tabelle 17-19 sowie Abbildung 32 und 33 zeigen die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Genotyp ohne signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt Z0 und Z2. Dabei fällt die erhebliche Streubreite der Proteinkonzentrationen für p53 und p21 trotz des Darstellungsmodus der relativen Absorption (Abgleich mit β -Actin, Kapitel 4.3.1.1) auf.

5 Diskussion

Synoviale Fibroblasten haben eine Schlüsselposition bei der Destruktion der Gelenke im Rahmen der rheumatoiden Arthritis. Eine Resistenz dieser Zellen gegen Apoptose scheint zur synovialen Hyperplasie zu führen und ist mit ihrem invasiven Phänotyp verbunden (Baier et al., 2003).

In der vorliegenden Untersuchung soll eine mögliche „Funktionalität“ definierter Genpolymorphismen im p53- und Mdm2-Gen bei den Erkrankungen „rheumatoide Arthritis“ und „Arthrose“ überprüft werden. Bei den Genpolymorphismen handelt es sich um den „single nucleotide polymorphism“ SNP p53 G72C und den SNP Mdm2 T309G.

Dazu wurden Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Synoviozyten von Patienten mit Arthrose gewonnen und kultiviert.

Aus den Zellen wurde die DNA extrahiert, und der Genotyp für die SNPs p53 G72C und Mdm2 T309G wurde bestimmt.

Dann wurde mittels Propidiumjodidmethode die Apoptoserate primärer Fibroblasten der Patienten mit rheumatoider Arthritis und der Patienten mit Arthrose in Abhängigkeit vom Genotyp bezüglich der beiden SNPs bestimmt. Dies erfolgte mit und ohne Stimulation mit TNF- α und IL-1 β .

Zusätzlich erfolgte mittels Western Blot, mit und ohne Stimulation der kultivierten Zellen mit TNF- α und IL-1 β die Bestimmung der zellgebundenen Proteinkonzentrationen (Zell Lysate) von p53, Mdm2, NF- κ B, pNF- κ B und p21.

Als weitere Vergleichsgruppe dienten HCT116-, H1299- und mit MDM2 transfizierte H1299-Zellen.

5.1 Synoviozyten

5.1.1 Morphologie und Funktion der Synoviozyten

Echte Gelenke besitzen einen Gelenkspalt mit Synovialflüssigkeit. Der Gelenkspalt ist von einer straffen Kapsel umgeben. Die Wand der Gelenkkapsel besteht aus einem äußeren Stratum fibrosum und einem inneren Stratum synoviale (Synovialmembran). Die Synovialmembran hat zum Gelenkspalt hin eine Auskleidung mit der sogenannten synovialen Intima, die ein bis drei Zellschichten von Synoviozyten dick ist (i.e. 20 bis 40 μ m), die avaskulär ist, keine Basalmembran hat und zwei unterschiedliche Zellarten enthält, Makrophagen (Typ A Zellen) und „fibroblast-like cells“ (Typ B Zellen). Typ B Synoviozyten repräsentieren 75 – 80 % der Gesamtpopulation der Zellen der

synovialen Intima (Okada et al., 1981) und waren Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Angepasst an ihre Funktion (Synthese und Sekretion von Matrix- und Synovialbestandteilen) weisen sie ein stark entwickeltes raues Endoplasmatisches Retikulum auf. Typ A Zellen sind aus dem Blut eingewanderte Makrophagen. Sie sind gekennzeichnet durch den stark entwickelten Golgi-Apparat und durch Vakuolen.

Bei der rheumatoiden Arthritis sind die Typ B Zellen die dominante Zellart im Pannusgewebe, insbesondere an der Pannus-Knorpel-Grenze (Bromley und Woolley, 1894). In Kokultur mit Makrophagen sind die aktivierten synovialen Fibroblasten in der Lage, Knorpel abzubauen, was darauf hindeutet, dass sie im Pannus die Hauptrolle bei der Knorpelzerstörung im Gelenk mit rheumatoider Arthritis spielen (Scott et al., 1997). Sie besitzen also durch ihren veränderten aggressiven Zustand die Fähigkeit, maßgeblich zur Zerstörung des artikulären Knorpels beizutragen (Müller-Ladner et al., 1995, 1996). Bei keinen anderen Synovialzellen konnte dieses aktiv destruierende Verhalten beobachtet werden. Fibroblasten vermitteln die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und halten so die Entzündung aufrecht. Dies führt zur weiteren Progression der rheumatoiden Arthritis (Müller-Ladner et al., 2007).

Darüber hinaus führen diese aktivierten synovialen Fibroblasten nach intraartikulärer Injektion bei der SCID Maus zu einer erosiven Arthritis (Müller-Ladner et al., 1996). Aktivierte synoviale Fibroblasten sind in der Lage, sowohl unter Kulturbedingungen als auch im Tiermodell aktiv zu migrieren. Die Wanderung dieser Zellen u.a. zum Knorpel findet hierbei durch das Gefäßsystem statt. Sie lagern sich an den Knorpel und beginnen diesen abzubauen. Ein gesundes Gelenk scheint vor der Anheftung der aggressiven Fibroblasten geschützt zu sein. Erst bei Schäden der Knorpelmatrix sind die Fibroblasten fähig, aktiv zum Knorpel zu wandern und diesen abzubauen (Lefèvre et al., 2009).

5.1.2 Isolierung und Kultivierung von Synoviozyten

Negative Isolierung der Typ B Synoviozyten aus der Primärkultur (mit anti-CD14, an magnetische Beads gekoppelten, monoklonalen Antikörpern) und positive Identifizierung der Typ B Synoviozyten (mit anti-CD90, an magnetische Beads gekoppelten, monoklonalen Antikörpern) sind prinzipiell möglich. Man erhält mit diesen eher aufwändigen Methoden jedoch nur eine limitierte Zahl von Zellen, die im Falle der positiven Identifizierung noch mit den Beads belastet sind.

Da die Makrophagen der synovialen Intima aber in Kultur nicht proliferieren und darüber hinaus in das Kulturmedium wandern, sind bei der Kultivierung der Zellen nur wenige Passagen notwendig, bis sie eliminiert sind. Nach der dritten Passage lag in der vorliegenden Untersuchung eine

Reinkultur von Typ B Synoviozyten vor, was sich in der FACS Analyse durch das Fehlen CD14- und CD45-positiver Zellen beweisen ließ (siehe Abb.4). CD14 ist ein zuverlässiger Marker für synoviale Makrophagen und korreliert auch mit der Aktivität der rheumatoiden Arthritis. CD45 ist ein Panleukozytenmarker, der hauptsächlich lymphoide Zellen markiert.

Diesem Passagieren zur Isolierung von Zellarten werden jedoch auch Nachteile zugeschrieben. Es scheint mit steigender Anzahl von Passagen zu funktionellen und phänotypischen Veränderungen der Zellen zu kommen, z.B. zu einer Erhöhung der Proliferationsrate nach Zytokinstimulation oder zu einer höheren c-Fos und Jun-D Expression (Zimmermann et al., 2001)

Eine Zellzyklussynchronisierung der Synoviozyten erfolgte in der vorliegenden Untersuchung durch Serumentzug (Reduktion der Serumkonzentration im Wachstumsmedium auf 1 % für zwei Tage). Danach zeigte die DNA Färbung mit Propidiumjodid in der FACS Analyse, dass die weit überwiegende Anzahl der Zellen sich in der G1/G0-Phase des Zellzyklus befand (siehe Abb.6).

Typ B Synoviozyten erscheinen lichtmikroskopisch als elongierte Zellen, manchmal oval oder polygonal mit wenigen verzweigten Fortsätzen, gelegentlich haben sie ein sternförmiges Aussehen (siehe Abb.7). Elektronenmikroskopisch fallen sie durch ein ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum als Ausdruck einer aktiven sekretorischen Tätigkeit auf (Rosengren et al., 2007). Während der Kultur bilden die Typ B Synoviozyten generell keine Foci, sie hören schließlich als Folge der Kontaktinhibition auf zu proliferieren (siehe Abb.7). Die Primärkultur der Fibroblasten sowohl von Patienten mit rheumatoider Arthritis als auch von Patienten, die an Arthrose erkrankt sind, zeigte ein langsames Wachstum. Je nach Inkubationsmenge dauerte es ca. vier bis sechs Wochen, bis die Zellen konfluent waren. Um vergleichbare Ergebnisse zu produzieren, wurden alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Fibroblasten der unterschiedlichen Patienten befanden sich alle in der fünften Passage.

Die Stimulation der Fibroblasten erfolgte in der vorliegenden Studie mit TNF- α und IL-1 β zur Simulation einer akuten Gelenkentzündung und zur Untersuchung möglicher unterschiedlicher Reaktionsweisen von FLS aus arthrotisch bzw. rheumatisch veränderter Synovialis. Besonderheiten des RA-Synoviums sind, im Gegensatz z.B. zum Synovium bei entzündlich aktivierter Arthrose, eine vermehrte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle durch aktivierte gewebständige Zellen und eine gesteigerte Zytokinsynthese (Youssef et al., 1997, Smith und Haynes, 2002). Im Zusammenhang mit der Entzündung bei der RA spielen TNF- α , IL-1 β und IL-6 eine zentrale Rolle (Maini et al., 1994, Arend, 2001). Das Zytokin TNF- α ist in die Regulation anderer Botenstoffe, in

das Rekrutieren von Immunzellen, in die Angiogenese und die Zerstörung von Gewebe insbesondere bei der RA involviert (Maini und Feldmann, 2002). IL-1 β bewirkt den Anstieg von Thrombozyten, Akute-Phase-Proteinen und neutrophilen Granulozyten. Außerdem triggert es die Freisetzung von IL-6.

5.2 Verteilung des SNP p53 G72C und des SNP Mdm2 T309G in der Studienpopulation

SNP 72 für p53 bzw. SNP 309 des Mdm2-Gens wurden erstmals von Harris et al. (1986) bzw. Bond et al. (2004) beschrieben. 40 % der untersuchten Proben hatten den Polymorphismus für Mdm2 heterozygot (G/T) und 12% homozygot (G/G). Bond machte in seiner Studie jedoch keine Angaben zu Rassenzugehörigkeiten der Probanden. In einer weiteren Studie hatten 25,6 % der Normalbevölkerung den homozygoten Genotyp G/G (Wildtyp) für p53 bzw. 38,7 % den homozygoten Genotyp T/T (Wildtyp) für Mdm2 und 6,3 % den homozygoten SNP C/C für p53 bzw. 14,2 % den homozygoten SNP G/G für Mdm2 (Assmann et al., 2009). Liu (2009) untersuchte die Polymorphismen hinsichtlich des Auftretens von Adenokarzinomen des Ösophagus. In seiner Arbeit hatten 8 % der Patienten den SNP für p53 homozygot bzw. 18 % den SNP für Mdm2 homozygot.

In der vorliegenden Arbeit wurden 33 Synoviozytenkulturen von Patienten mit Arthrose (OA) bzw. 19 von RA-Patienten gezüchtet und hinsichtlich ihres Genpolymorphismus für p53 und Mdm2 untersucht. Von den untersuchten OA-Patienten bzw. RA-Patienten hatten zwei (= 6 %) bzw. einer (= 5,2 %) den SNP für p53 homozygot. Den SNP für Mdm2 hatten sieben (= 21,2 %) der OA-Patienten bzw. einer (= 5,2 %) der RA-Patienten homozygot.

Erstaunlich ist, dass 21,2 % der OA-Patienten (w = 4, m = 3) den SNP (G/G) für Mdm2 homozygot besaßen. Da eine mögliche Verwandtschaft der Patienten untereinander ausgeschlossen wurde, weist dies auf eine mögliche Assoziation des SNP Mdm2 T309G für arthrotische Erkrankungen hin. In der Weltbevölkerung gibt es deutliche Unterschiede in Bezug auf die Genotyp-Verteilung; z.B. sind 18,4 % der Afroamerikaner heterozygot (G/T) für Mdm2 und 2 % haben den SNP für Mdm2 homozygot (Pine et al., 2006).

5.3.1 Detektion der Apoptose

Unter Apoptose versteht man den Vorgang des aktiven programmierten Zelltodes. Dieser stellt ein streng biochemisch-zytogenetisch vorbestimmtes Programm zur Beseitigung unerwünschter Zellen dar. Im Gegensatz zur Nekrose, die einen katastrophenartigen, passiven Zelltod mit komplettem Zusammenbruch der intrazellulären Homöostase und Regulation darstellt, wird der phylogenetisch hoch konservierte Prozess von der betroffenen Zelle selbst durchgeführt (Cohen, 1993).

Der Verlust der natürlichen Membranasymmetrie gehört zu den frühen Ereignissen des apoptotischen Prozesses. Während dieses Prozesses bleibt die Zellmembran intakt, der Zellinhalt kann nicht austreten und das umliegende Gewebe schädigen. In der zytosolseitigen Membranschicht befindet sich das Phospholipid Phosphatidylserin (PS). Schon in der frühen Exekutionsphase der Apoptose, d.h. im Anschluss an die durch Caspasen verursachte proteolytische Kaskade, wird dieses Phospholipid vermehrt an die äußere Membranschicht transportiert und damit der Umwelt zugänglich (van Engeland et al., 1998). Diese Tatsache macht man sich bei der sog. Annexin-Methode zunutze. Annexin bindet an PS. Dabei können die Annexin V-Moleküle mit Farbstoffen wie Fluorescein Isothiocyanit (FITC), Biotin oder Phycoerythrin (PE) markiert werden und so für die flowzytometrische oder fluoreszenzmikroskopische Analyse verwendet werden (van Engeland et al., 1998). Annexin-V ist nicht in der Lage, die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran vitaler Zellen zu penetrieren. Bei avitalen Zellen ist die Integrität der Membran aufgehoben und so zugänglich für das von außen einwirkende Annexin V.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptoserate der Fibroblasten mit der Propidiumjodid-Methode (PI) gemessen. Mit dieser Methode lassen sich spätapoptotische Zellen durch Interkalation von PI in die DNA nachweisen. Dies ist wie bei der Annexin V-Methode erst möglich, wenn die Zellmembran ihre Integrität verliert. Beide Methoden werden trotz ihres unterschiedlichen Prinzips für die Apoptosedetektion verwendet, auch wenn die PI-Methode erst spätere Stadien der Apoptose detektiert.

Bai et al. (2004) und Zhang et al. (2001) zeigten in Voruntersuchungen, dass es sowohl für die Annexin V- als auch für die PI-Methode Hinweise für eine Apoptoseresistenz der RA-FLS im Vergleich zu Kontrollgruppen gibt.

5.3.2 Das Apoptoseverhalten der Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Patienten mit Arthrose

Die Apoptose ist ein zentraler physiologischer Mechanismus, der die Homöostase von Geweben, darunter auch der Gelenkinnenhaut, sichert. Veränderungen der Apoptose haben weitreichende pathologische Konsequenzen.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass unter den frühen synovialen Veränderungen der RA eine verringerte Apoptose der ortsständigen Fibroblasten auftritt. Dies führt durch die längere Lebensdauer der Fibroblasten und damit verbundener Anhäufung zur Hyperplasie und Einwanderung von Entzündungszellen aus dem Blut (Zvaifler et al., 1994, Matsumoto et al., 1996, Bodolay et al., 2002).

Die Ursachen für die Apoptoseresistenz synovialer Fibroblasten sind bis heute noch nicht vollständig verstanden.

Es konnte z.B. gezeigt werden, dass erhöhte Spiegel des Signalmoleküls FLIP („FLICE inhibitory proteins“) die Apoptosesignalkaskade durch direkte Hemmung der Caspase-8 unterbrechen (Zaitseva et al., 2011). Neben der Überexpression von Faktoren, die direkt in die apoptotische Signalkaskade eingreifen, zeigen weitere Untersuchungen, dass auch die posttranslationale Modifikation bereits gebildeter Proteine eine wichtige Regulationsebene darstellt.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich unabhängig vom Genotyp bezüglich p53 und Mdm2 und ohne Stimulation der Zellen eine signifikant niedrigere Apoptoserate der Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis ($31,8 \pm 12,6$ %) verglichen mit Synoviozyten von Patienten mit Arthrose ($38,4 \pm 17,2$ %; $p < 0,05$).

Auch nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β ist die Apoptoserate der RA-FLS ($21,0 \pm 5,1$ %) signifikant niedriger als die Apoptoserate der OA-FLS ($32,4 \pm 16,3$ %; $p < 0,05$).

Diese Ergebnisse bestätigen, wie bereits in früheren Studien und ohne Stimulation mit TNF- α und IL-1 β gezeigt wurde, die anti-apoptotische Eigenschaft als wichtiges Merkmal im Geschehen der rheumatoiden Arthritis (Firestein et al., 1997, Zhang et al., 2001; Bai et al., 2004; Korb et al., 2009).

Die durch die Stimulation mit TNF- α und IL-1 β erzeugte quantitative Absenkung der Apoptoseraten ist bei den beiden untersuchten Zelllinien (RA-, OA-FLS) nicht signifikant verschieden (RA: $11,8 \pm 2,2$ %; OA: $6,0 \pm 1,4$ %; $p > 0,05$). Wir hätten durch die Stimulation eine deutlichere Senkung der Apoptoseraten der RA-Zellen erwartet, da die Stimulation mit TNF- α und IL-1 β die in vivo Situation im Schub der rheumatoiden Arthritis nachahmen sollte.

Das Ergebnis kann jedoch auch dadurch mitbedingt sein, dass die hier eingesetzte Propidiumjodid-Methode nur ein relativ spätes Stadium des apoptotischen Prozesses detektiert (Korb et al., 2009).

Die Synoviozytenpopulation eines individuellen Gelenks ist darüber hinaus, unabhängig von der Erkrankung des Gelenks, nicht homogen in ihrem Apoptoseverhalten. Es gibt Unterschiede zwischen oberflächlich (superficial lining) und tiefer (sublining) liegenden Zellschichten insofern, dass die oberflächlichen Zellen ein gegenüber den tieferen Zellen reduziertes Apoptoseverhalten aufweisen (Matsumoto et al., 1996; Korb et al., 2009).

In der vorliegenden Untersuchung erlaubt das Modell aber nicht, zwischen „superficial lining“ und „sublining“ sicher zu unterscheiden, da die Synoviozyten aller Schichten zusammen in Kultur gebracht wurden.

5.3.3 Apoptoseverhalten der Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis in Abhängigkeit vom Genotyp

Die Zelllinien von Patienten mit rheumatoider Arthritis und mit dem homozygoten Genotyp T/T (Wildtyp) für Mdm2 zeigten ohne Stimulation eine hoch signifikant reduzierte Apoptoserate ($27,3 \pm 4,3$ %; $p < 0,01$) im Vergleich zu RA-FLS mit dem homozygoten Genotyp G/G (SNP T309G) für Mdm2 ($44,8 \pm 1,2$ %).

Auch nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β war die Apoptoserate der Synoviozyten der Patienten mit rheumatoider Arthritis und Wildtyp für Mdm2 signifikant niedriger als die Apoptoserate der Synoviozyten der Patienten mit Homozygotie für SNP T309G von Mdm2 ($19,2 \pm 2,3$ % vs. $26,8 \pm 2,1$ %; $p < 0,05$) (Heyne et al., 2012).

Mdm2 ist als wichtigster Gegenspieler und Negativregulator von p53 bekannt. Ein direkter Einfluss der Genvariation über die vermehrte Degradierung mit Ubiquitin-Ligasen kann nachgewiesen werden und beeinflusst die Funktion von p53 als Transkriptionsgen (Hu et al., 2007). Vor diesem Hintergrund erfolgte die Auswertung der RA-Synoviozyten nach Bestimmung des Genotyps des SNP Mdm2 T309G und der Vergleich der homozygoten Genotypen des Majorallels (309TT, Wildtyp) mit denen des Minorallels (309GG). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Bestimmung der Apoptoserate von 5 RA-Zelllinien mit dem Wildtyp 309TT und zwei mit dem homozygoten Genotyp des Minorallels 309GG und zwar mit einer niedrigeren Apoptoserate für den Wildtyp - sowohl ohne Stimulation als auch unter

Stimulation mit TNF- α und Il-1 β . Ergebnisse der Assoziationsstudien zum SNP Mdm2 T309G Gen bei rheumatoider Arthritis im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe lassen Rückschlüsse darauf ziehen, dass das Minorallel SNP 309GG einen vorwiegend krankheitsprotektiven Effekt hat, wohingegen das Majorallel SNP 309TT eher krankheitsfördernd wirkt. Betrachtet man diese beobachtete Assoziation in Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen der unterschiedlichen Apoptoserate je nach Genotyp der RA-Synoviozyten, lässt dies folgende Interpretation zu: Die rheumatoide Arthritis als Erkrankung, bei der bestimmte Krankheitsunterhaltende Synoviozyten eine Verminderung der Apoptose bzw. eine Apoptoseresistenz zeigen, tritt häufiger mit dem Wildtyp 309TT des SNP Mdm2 T309G auf. Als mögliches pathomorphologisches Korrelat für den krankheitsfördernden Effekt des Wildtyps zeigen die RA-Synoviozyten mit Wildtyp 309TT im Zellkulturmodell eine verminderte Apoptose. Im Gegensatz dazu kann also angenommen werden, dass der homozygote Genotyp der Genvariante SNP 309GG in den RA-Synoviozyten protektiv durch eine vergleichsweise höhere Apoptoserate wirkt. Diese Ergebnisse sind sowohl unter Stimulation als auch ohne Stimulation mit TNF- α und Il-1 β reproduzierbar. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse im Zellkulturmodell kann schließlich die Hypothese aufgestellt werden, dass der SNP Mdm2 T309G das Krankheitsrisiko für die RA aufgrund einer Änderung der Apoptoserate in den Synoviozyten beeinflussen kann. Die Apoptoserate bei dem veränderten Genotyp 309 GG sinkt unter Stimulation mit TNF- α und Il-1 β tendenziell noch stärker als beim Wildtyp. Die Unterschiede zwischen Wildtyp und Varianten Genotyp sind dabei aber nicht signifikant.

Der Vergleich der Apoptoseraten von Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und dem homozygoten Genotyp G/G (Wildtyp) für p53 mit den Apoptoseraten von Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und homozygotem SNP C/C (SNP G72C) für p53 ergab zwar tatsächlich eine höhere Apoptoserate der Synoviozyten mit SNP G72C, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant.

5.4 Die Konzentrationen der Proteine p53, p21, Mdm2, NF-κB und phospho-NF-κB in Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose

Um die Bedeutung der veränderten Apoptoserate je nach Genotyp des SNP Mdm2 T309G noch weiter zu untersuchen, wurden die Proteinkonzentrationen für die die Apoptose und den Zellzyklus beeinflussenden Proteine p53, p21, NF-κB, Mdm2 (jeweils in Western Blot Technik) untersucht.

Neuere *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF-κB, der eine Resistenz gegen den programmierten Zelltod vermittelt, ein weiterer Gegenspieler des proapoptotischen Transkriptionsfaktors p53 ist (Gudkov und Komarova, 2007).

NF-κB induziert darüber hinaus Mdm2, das den T-Zell vermittelten Zelltod verhindert (Busuttill et al., 2010), und es aktiviert die „early response“ Zytokine TNF-α und IL-1β, die wiederum Osteoklasten und Kollagenasen aktivieren (Firestein und Manning, 1999).

Vom heutigen Verständnis der rheumatoiden Arthritis scheint ein pro-apoptotischer Phänotyp eine Protektion gegen die Erkrankung darzustellen.

Das hier beschriebene Zellkulturmodell wurde u.a. zur Bestimmung der Konzentrationen der Proteine der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle (Mdm2, NF-κB, phospho-Nf-κB, p53 und p21) aus primären Fibroblasten etabliert.

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 mittels Western blot zeigten sich weder mit noch ohne Stimulation mit TNF-α und IL-1β signifikante Unterschiede zwischen den FLS von RA- und den FLS von OA-Patienten. Verglichen wurden jeweils Patienten mit gleichem Genotyp bzgl. des SNP G72C für p53 und des SNP T309G für Mdm2.

Durch die Stimulation selbst konnten auch innerhalb der beiden Gruppen der Erkrankten (RA und OA) keine signifikanten Änderungen der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 induziert werden.

Während bei Tumorzelllinien hohe Proteinkonzentrationen von p53 vorliegen, ist dies bei Synoviozyten jeder nicht-malignen Krankheitsentität, wie durch Voruntersuchungen bereits bekannt ist, nicht der Fall (Taranto et al., 2005). Diese Situation erschwert generell den Nachweis eines signifikanten Unterschiedes in den Proteinkonzentrationen.

Zusätzlich lag interindividuell eine große Streubreite der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 vor.

Bei der Darstellung der Proteinkonzentrationen von p53 und p21 war es aber möglich, Tendenzen zu beschreiben. So zeigte sich bei allen Proben ein in etwa gleichsinniges Verhalten von p53 und p21. Dies bestätigt frühere Studien. Adams et al. (1996) und Brugarolas et al. (1999) beschrieben p21 als den primären Effektor der wachstumsinhibierenden Wirkung von p53. Außerdem korreliert der Status des p53-Gens mit der Expression von p21. Bei p53 Arg72 und p53 Pro72 scheint der Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen gleich zu sein (Dumont et al., 2003). Im Abgleich mit der unterschiedlichen Apoptoseaktivität konnte jedoch im vorliegenden Modell keine gleichsinnigen Proteinkonzentrationen für p53 und p21 detektiert werden.

Grundsätzlich haben wir bei OA- im Vergleich zu RA-Synoviozyten bzw. bei RA-Synoviozyten des Genotyp Mdm2 TT im Vergleich zu GG höhere p53-Konzentrationen als pro-apoptisches Protein erwartet. Das gleichsinnige Verhalten von p21 haben wir ebenfalls angenommen, aber vorliegende Ergebnisse konnten das nicht dokumentieren.

In der vorliegenden Studie wurde weiterhin die quantitative Bestimmung der Proteine des „Onkogens“ Mdm2 und des Transkriptionsfaktors für Mediatoren der Entzündung, NF- κ B (p65 phosphoryliert und unphosphoryliert) durchgeführt. NF- κ B und phospho-NF- κ B sind deshalb im Rahmen der rheumatoiden Arthritis von Interesse, weil man vermuten kann, dass es durch den p53-SNP G72C zu einer unterschiedlichen Aktivität oder Wirkweise von p53 auch im Hinblick auf die Suppression von NF- κ B kommt. Außerdem ist NF- κ B der wichtigste Regulator der Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene.

Es zeigte sich aber, dass es nur in den Kontrollzellen und nicht in den Synoviozyten der Patienten mit rheumatoider Arthritis und den Patienten mit Arthrose möglich war, Mdm2, NF- κ B und phospho-NF- κ B auf Proteinbasis zu detektieren. Mdm2- Protein lässt sich mittels Standard-Western Immunoblots in den FLS und auch in anderen Zelllinien nicht nachweisen, so z.B. in Fibroblasten, in denen die korrespondierenden Mdm2 Transkripte etwa 7 PCR Zyklen über der Zahl der Zyklen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) liegen (Heyne et al., 2010).

Die schwierige Detektierbarkeit von Mdm2 bei nicht-tumorösen Zellen ist vorbeschrieben, da es sich als Enzym zur Initiierung der Ubiquitin-Ligasen nur in geringen Konzentrationen intrazellulär findet. Methoden, die Mdm2-Aktivität anhand seiner Enzym-Aktivität als Ubiquitin-Ligase zu messen, gibt es nicht.

Die beschriebenen Veränderungen im Apoptoseverhalten der untersuchten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich mit Synoviozyten von Patienten mit Arthrose und die beschriebenen Veränderungen im Apoptoseverhalten der Synoviozyten von Patienten mit

rheumatoider Arthritis und den verschiedenen Genotypen von Mdm2 bezüglich des SNP 309 (SNP 309 G/G vs. Wildtyp 309 T/T) spiegeln sich nicht in konstanten und nachvollziehbaren Veränderungen der Proteinkonzentrationen von p53, p21, Mdm2, NF-κB und phospho-Nf-κB wider. Dies liegt u.a. an den generell - im Vergleich zu malignen Erkrankungen - niedrigen Proteinkonzentrationen in der Zelle und betrifft insbesondere Mdm2, NF-κB und phospho-Nf-κB. Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig der krankheitsprotektive Effekt des Genotyp Mdm2 309 GG mit der gesteigerten Apoptose bei Synoviozyten der RA assoziiert werden - einer Erkrankung, die unterschiedliche apoptotische Charakteristika trägt.

Darüber hinaus muss angenommen werden, dass die aufgezeigten Veränderungen im Apoptoseverhalten nicht unbedingt mit verändertem Aktivierungsgrad des p53-Mdm2-Netzwerkes korrelieren, sondern weitere zelluläre Mechanismen jenseits des p53-Mdm2-Netzwerkes für die Induktion apoptotischer Vorgänge beteiligt sind. Dafür sprechen kürzlich publizierte Daten, die eine weitgehend p53- unabhängige Interaktionen von Mdm2 mit NF-κB bei Tumorzellen nach Mdm2-Transfektion nach weisen konnten (Heyne et al.,2013). Gerade für primär entzündliche Erkrankungen können Mdm2 Interaktionen mit dem wichtigen Transkriptionsfaktor für Entzündung NF-κB bedeutsam sein und damit Gegenstand zukünftiger Untersuchungsmodelle.

6 Literaturverzeichnis

Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG (1996) Identification of a cyclin-Cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* 16:6623-6633

Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J (1986) Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 13:899-902

Arend WP (2001) Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 45:101-106

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324

Assmann G, Wagner AD, Mueller M, Pfoehler C, Pfreundschuh M, Tilgen W, Roemer K (2009) Single-nucleotide polymorphisms p53 G72C and MDM2 T309G in patients with psoriasis, psoriatic arthritis, and SAPHO syndrome. *Rheumatol Int.* 30:1273-1276

Assmann G, Voswinkel J, Mueller M, Bittenbring J, König J, Menzel A, Pfreundschuh M, Roemer K, Melchers I (2009) Association of rheumatoid arthritis with Mdm2 SNP309 and genetic evidence for an allele-specific interaction between MDM2 and p53 P72R variants: a case control study. *Clin Exp Rheumatol.* 27:615-619

Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T (2002) A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* 196:979-990

Baier A, Meinecke I, Gay S, PapT (2003) Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15:274-279

Bai S, Liu H, Chen KH, Eksarko P, Perlman H, Moore TL, Pope RM (2004) NfκB- regulated

expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.* 50:3844-3855

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75:330-337

Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z (2002) Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med* 6:357-376

Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ (2004) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promotor attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591-602

Bond GL, Hu W, Levine AJ (2005) MDM2 is a central node in the p53 pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 5:3-8

Bromley M, Woolley DE (1984) Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum* 27:857-863

Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA (1999) Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1002-1007

Cohen JJ (1993) Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130

Collins AR (1998) Molecular epidemiology in cancer research. *Mol Aspects Med* 19:359-432

Dumont P, Leu JIJ, Della Pietra III AC, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic

variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-365

Dunnen JT den, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12

Fiers W (1991) Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285:199-212

Firestein GS (1996) Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39:1781-1790

Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR (1997) Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10895-10900

Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Wu X, Ronai Z (1998) MDM2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17:2543-2547

Garber JE, Friend SH, Strong LC, Patenaude AF, Juengst ET, Reilly PR, Correa P, Fraumeni JF Jr, Frebourg T (1992) Germ line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *J Natl Cancer Inst* 84:1156-1160

Genth E (2002) Rheumatoide Arthritis. *LaboratoriumsMedizin* 26:130-136

Gilmore TD (2003) The Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat Res* 115:241-265

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. A approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205-1213

Gudkov AV, Komarova EA (2007) Dangerous habits of a security guard: The two faces of p53 as a drug target. *Hum Mol Genet* 16:67-72

Günther KP, Puhl W, Brenner H, Stürmer T (2002) Klinische Epidemiologie von Hüft- und

Kniegelenksarthrosen: Eine Übersicht über die Ergebnisse der “Ulm Osteoarthrose-Studie”.

Z Rheumatol. 61:244-249

Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V (1986) Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. Mol Cell Biol.6:4650-4656

Hart DJ, Doyle DV, Spector TD (1999) Incidence and risk for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford study. Arthritis Rheum 42:17-24

Hassan B, Maxwell JR, Hyrich KL; Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, Morgan AW, Wilson AG (2010) Genotype at the sIL-6R A358C polymorphism does not influence response to anti- TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 49:43-47

Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF- κ B. Genes Dev 18:2195-2224

Heyne K, Conrad M, Dohmen D, Huwer J, Assmann G, Roemer K (2010) Differential basal levels of MDM-2 transcription induced by p53-P72 and p53-R72. Cell Cycle 9:4028-4030

Heyne K, Huwer J, Zimmer V, Pfreundschuh M, Ney JT, Assmann G (2012) Different apoptotic responses of RA synoviocytes depending on different genotypes of the mdm2 SNP T309G.

Apoptosis. 17:424-427

Heyne K, Winter C, Gerten F, Schmidt C, Roemer K (2013) A novel mechanism of crosstalk between the p53 und NF κ B pathways: MDM2 binds and inhibits p65Rel A. Cell Cycle 28;12(15)

Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y (2000) Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. J Exp Med 191:313-320

Hu W, Feng Z, Ma L, Wagner J, Rice JJ, Stolovitzky G, Levine AJ (2007) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells. Cancer Res 67:2757-2765

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint Arch Histol Cytol 63:17-31

Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan ML, Golovkina TV, Rokhlin OW, Kuprash DV, Nedospasov SA, Hazen SL, Feinstein E, Gudkov AV (2005) p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. FASEB J 19:1030-1032

Korb A, Pavenstädt H, Pap T (2009) Cell death in rheumatoid arthritis. Apoptosis 14:447-454

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 15;227:680-685

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358:15-15

Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG (2001) p53 codon 72 polymorphism and rheumatoid arthritis. J Rheumatol 28:2392-2394

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U & Neumann E (2009) Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. Nature Medicine 15:1414-1420

Lev Bar-Or R, Maya R, Segel LA, Alon U, Levine AJ, Oren M (2000) Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. Proc Natl Acad Sci USA 97:11250-11255

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323-331

Liu G, Cescon DW, Zhai R, Zhou W, Kulke MH, Ma C, Xu W, Su L, Asomaning K, Heist RS, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC (2009) p53 Arg72Pro, MDM2 T309G and CCND1 G870A polymorphisms are not associated with susceptibility to esophageal adenocarcinoma. Dis Esophagus 23:36-39

Macchioni P, Nicoli D, Casali B, Catanoso M, Farnetti E, Boiardi L, Salvarani C (2007) The codon 72 polymorphic variants of p53 in Italian rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 25:416-421

Ma L, Wagner J, Rice JJ, Hu W, Levine AJ, Stolovitzky GA (2005) A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1466-1471

Maini RN, Elliot M, Brennan FM, Williams RO, Feldmann M (1994) Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 12:S63-66

Maini RN, Feldmann M (2002) How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 2:S22-28

Marinou I, Maxwell JR, Wilson AG (2010) Genetic influences modulating the radiological severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69:476-482

Matsumoto S, Müller-Ladner U, Gay RE, Nishioka K, Gay S (1996) Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 23:1345-1352

Milner J (1995) Flexibility: the key to p53 function? *Trends Biochem Sci* 20:49-51

Moll UM, Petrenko O (2003) The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1:1001-1008

Momand J, Wu HH, Dasgupta G (2000) MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gen* 25: 242: 15-29

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245

Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373:311-317

Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Gay RE, Gay S (1995) Oncogenes in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 21:675-690

Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res* 9:223-232

Müller-Ladner U, Pap T (2005) Pathogenesis of RA: more than just immune cells. *Z Rheumatol* 64:396-401

Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S (1996) Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 149:1607-1615

Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U (2010) Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med* 16:458-468

Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefèvre S, Tamer ICH, Grifka J, Steinmeyer I, Schölmerich I, Gay S, Müller-Ladner U (2010) Cell culture an passaging alters gene expression pattern an proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 12:R83

O'Dea E, Hoffmann A (2010) The regulatory logic of the NF- κ B signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000216

Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K (1981) Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix. *Arth Rheum* 24:835-843

Okamoto T (2006) NF- κ B and rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6:359-372

Olson DC, Levine AJ (1994) The properties of p53 proteins selected for the loss of suppression of transformation. *Cell Growth Differ* 5:61-71

Ørsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2007) Tumor suppressor p53 Arg 72 Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J Exp Med*. 204:1295-1301

Pine SR, Mechanic LE, Bowman ED, Welsh JA, Chanock SC, Shields PG, Harris CC (2006) MDM2 SNP 309 and SNP 354 are not associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers* 15:1559-1561

Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis – a genomwide study. *N Engl J Med* 357:1199-1209

Plenge RM (2009) Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update. *Curr Rheumatol Rep.* 11:351-356

Reginster JY, Khaltsev NG (2002) Introduction and WHO perspective on the global burden of musculoskeletal conditions. *Rheumatology (Oxford)* 41(Suppl 1):1-2

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK (2007) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 357:977-986

Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS (2007) Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol Med* 135:365-375

Scott BB, Weisbrot LM, Greenwood JD, Bogoch ER, Paige CJ, Keystone EC (1997) Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 40:490-498

Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32:903-907

Smith JB, Haynes MK (2002) Rheumatoid arthritis – a molecular understanding. *Ann Intern Med* 136:908-922

Sprangers MA, de Regt EB, Andries F, van Agt HM, Bijil RV, de Boer JB, Foets M, Hoeymans N, Jacobs AE, Kempen GI, Miedema HS, Tijhuis MA, de Haes HC (2000) Which chronic conditions are associated with better or poorer quality of life? *J Clin Epidemiol* 53:895-907

Stastny P (1983) Rheumatoid arthritis: relationship with HLA-D. *Amer J Med* 75:9-15

Stommel JM, Wahl GM (2004) Accelerated MDM2 autodegradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J* 23:1547-1556

Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB (2005) Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123:49-63

Taranto E, Xue JR, Lacey D, Hutchinson P, Smith M, Morand EF, Leech M (2005) Detection of p53 regulator murine double-minute protein 2 in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32:424-429

Taubert H, Thamm B, Meye A, Bartel F, Rost AK, Heidenreich D, John V, Brandt J, Bache M, Würfl P, Schmidt H, Riemann D (2000) The p53 status in juvenile chronic arthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 122:264-269

Tian B, Nowak DE, Jamaluddin M, Wang S, Brasier AR (2005) Identification of direct genomic targets downstream of the Nuclear Factor- κ B transcription factor mediating Tumor Necrosis factor signaling. *J Biol Chem* 280:17435-17448

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31:1-9

Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 10:789-799

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 2000 408:307-310

Vousden KH (2000) p53: death star. *Cell* 103:691-694

- Waning DL, Lehmann JA, Batuello CN, Mayo LD (2010) Controlling the mdm2-mdmx-p53 circuit. *Pharmaceuticals (Basel)* 3:1576-1593
- Wawrzynow B, Zylicz A, Wallace M, Hupp T, Zylicz M (2007) MDM2 chaperones the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem*: 282: 32603-32612
- Youssef PP, Triantafilou S, Parker A, Coleman M, Roberts-Thompson PJ, Ahern MJ, Smith MD (1997) Variability in cytokine and cell adhesion molecule staining in arthroscopic synovial biopsies: quantification using color video image analysis. *J Rheumatol* 24:2291-2298
- Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, Green DR, Zvaifler NJ, Firestein GS (2002) Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10025-10030
- Zaitseva L, Rushworth SA, MacEwan DJ (2011) Silencing FLIP(L) modifies TNF-induced apoptotic protein expression. *Cell Cycle*. 10:1067-1072
- Zhang HG, Wang Y, Xie JF, Liang X, Liu D, Yang P, Hsu HC, Ray RB, Mountz JD (2001) Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase. *Arthritis Rheum*. 44:1555-1567
- Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne RW (2001) Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture – primary culture cells markedly differ from fourth passage cells. *Arthritis Res* 3:72-76
- Zustin J, Aigner T (2009) Osteoarthritis-histopathologic diagnosis: typing, grading, and staging. *Orthopäde* 38:491-500
- Zvaifler NJ, Boyle D, Firestein GS (1994) Early synovitis – synoviocytes and mononuclear cells. *Semin Arthritis Rheum* 23:11-16

7. Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Aßmann für das Überlassen des Themas der vorliegenden Dissertation und die hervorragende Betreuung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. M Pfreundschuh danke ich für die Möglichkeit, wissenschaftlich zu arbeiten und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im José-Carreras-Zentrum, Zentrum für Immun- und Genterapie der Universität des Saarlandes.

Ich danke Frau Dr. K Heyne für das Vermitteln der Methoden und für die stete freundschaftliche Hilfe.

Frau Dr. E. Neumann (Bad Nauheim) danke ich für die Einführung in das Arbeiten mit Zellkulturen.

Ich danke Herrn Prof. K. Römer für seine kritische Diskussion von Ergebnissen.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. D. Kohn und Herrn Dr. H. Dinges (Westpfalz-Klinikum GmbH, Standort II-Kusel) für die Gewebeproben.

Herrn A. Huwer danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Ich danke Herrn B. Büttner für die stetige Unterstützung während der gesamten Arbeit.