

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor. Dr. N. Wülker

**Optimierung der Methode zum Gen - Transfer
in synoviale Fibroblasten
durch Transfektion**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Enikő Krisztina Pall
aus
Turda /Rumänien

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. K. Aicher
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Rodemann

Meinen Eltern,
meiner Schwester Eva Katalin
und meinen Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	..7
1.1	Rheumatoide Arthritis	7
1.2	Zytokine	10
1.2.1	Interleukin 16	11
1.2.2	Interleukin 16 bei rheumatoider Arthritis	13
1.2.3	Gentherapie in rheumatoider Arthritis	14
1.2.4	Fragestellung und Zielsetzung	15
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte und Materialien	17
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Medien	18
2.1.3	Gekaufte Zelllinien	19
2.1.4	Humanes Gewebe	20
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkulturmethoden	22
2.2.1.2	Anlage humaner Fibroblastenkulturen	22
2.2.1.3	Anlage humaner Fibroblastenkulturen aus synovialen Gewebe	22
2.2.1.4	Anlage von Kulturen dermalen Fibroblasten	23
2.2.2	Nährmedium und Zellpflege	23
2.2.2.1	Herstellung des Vollmediums	23
2.2.2.2	Mediumwechsel	24
2.2.2.3	Subkultivierung der Zellen	24
2.2.2.4	Immunhistochemische Charakterisierung der Fibroblasten	25
2.2.2.5	Kryokonservierung	26
2.2.2.6	Zellzahlbestimmung	27
2.2.3	Methoden zur Plasmid DNA Präparation	27
2.2.3.1	Bakterien und Bakterienmedien	27

2.2.3.2	Klonieren von Expressionsvektoren	29
2.2.3.3	Präparation von Plasmid DNA	30
2.2.3.4	Plasmidverdau mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	30
2.2.4	Darstellung der DNA Fragmente mittels Elektrophorese	31
2.2.5	Transfektion von Expressionsvektoren in synoviale Fibroblasten mit Hilfe von verschiedenen Transfektionsreagenzien	33
2.2.5.1	Eingesetzte Konzentrationen	33
2.2.5.2	Durchführung der Transfektion mit hGH Plasmid	35
2.2.6	hGH – ELISA (Roche)	36
2.2.7	Transfektion mit pEGFP Plasmid	37
2.2.7.1	Eingesetzte Konzentrationen	37
2.2.7.2	Durchführung der Transfektion mit pEGFP Plasmid	39
2.2.8	Leica Fluoreszenzmikroskop	39
2.2.9	Statistische Methoden	40
2.2.9.1	Statistische Auswertung der hGH Produktion	40
2.2.9.2	Statistische Auswertung der GFP Expression	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Fibroblastenkultur und Wachstum	41
3.2	Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung	41
3.3	Herstellung von Expressionsvektoren	41
3.3.1	Darstellung des hGH Plasmids (pUC-12) mittels Gelelektrophorese	42
3.3.2	Darstellung des GFP Plasmids (pEGFP) mittels Gelelektrophorese	42
3.4	Transfektion mit hGH Plasmid	43
3.5	hGH ELISA	43
3.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse des hGH ELISA	50
3.7	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit GFP transfizierten Zellen	51
3.8	Statistische Auswertung der GFP Transfektion	60

4.	Diskussion	61
4.1	Synoviale Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis	61
4.2	Zytokinantagonisten in der Therapie der rheumatoiden Arthritis	62
4.3	Übertragbarkeit der in vitro Studien auf in vivo Vorgänge	63
4.4	Fibroblastenkultur und wachstum	64
4.5	Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung	65
4.6	Herstellung von Expressionsvektoren	65
4.6.1	Klonierung von Expressionsvektoren	65
4.6.2	Plasmid DNA Isolierung	66
4.7	Gelelektrophorese	66
4.8	Transfektion mit hGH und EGFP Plasmid	67
4.9	hGH ELISA	68
4.10	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP Produktion	70
4.11	Conclusio	71
5.	Zusammenfassung	73
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Anhang	82
7.1	Abkürzungsverzeichnis	83
7.2	Danksagung	86
7.3	Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische, entzündliche Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie. Studien zur Ätiopathogenese innerhalb der letzten Jahre haben vor allem Mechanismen, die im Gelenk zu einer chronischen Entzündungsreaktion mit irreversibler Zerstörung von Knorpel – und Knochenzellen führen, definieren lassen. Besonders konnte die zentrale Rolle proinflammatorischer Zytokine in der Unterhaltung der intraartikulärer Entzündung und Gelenkdestruktion nachgewiesen werden. Das Gleichgewicht zwischen induktiven proinflammatorischen und entzündungshemmenden antagonistischen Aktivitäten ist entscheidend für die Entstehung und den Verlauf von RA.

Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) agieren bereits am Anfang einer im Gelenk induzierten Zytokinkaskade und sind somit verantwortlich für die sich entwickelnden Entzündungsvorgänge und die Aktivierung von Fibroblasten, die letztlich zur Knorpel- und Knochenzerstörung führen [Burmester und Kalden, 2001]. Unlängst konnte ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, Interleukin-16, im RA Synovium nachgewiesen werden [Franz et al., 1998] (siehe unten).

Im fortgeschrittenen Stadium kann RA zu Mitbeteiligung von inneren Organen führen, wie z.B. Valvulitis am Herzen, oder Serositis mit folgender Fibrose [Bely et al., 1969], hepatische Veränderungen und pulmonale Beteiligung [Fernandes et al., 1979].

Die RA ist weltweit verbreitet, in Deutschland sind ca. 2% der Bevölkerung betroffen, davon drei bis viermal so viele Frauen (im 4. Lebensjahrzent) wie Männer.

Eine genetische Grundlage spielt eindeutig eine wichtige Rolle. Finnische und britische Studien zeigten, dass eineiige Zwillinge ein Risiko von 12-15% und zweieiige Zwillinge ein Risiko von 4% haben RA zu bekommen. Eine genetische Komponente als begünstigender Faktor wurde relativ sicher nachgewiesen. Die RA ist mit HLA Klasse II Genen assoziiert, insbesondere das HLA-DR4 und DR1 Antigen, das von 70% der RA – Kranken exprimiert wird (HLA-DR4 Häufigkeit bei Gesunden ist 25%) und

möglicherweise für die Bindung eines arthritogenen Peptids in der Initialphase der Erkrankung verantwortlich sind [Nepom et al., 1989; Stasny et al., 1978; Ronningen et al., 1990; Wordsworth et al., 1989]. HLA Klasse II Moleküle werden intrazellulär in Antigen – präsentierenden Zellen synthetisiert und gehen mit CD4 Rezeptoren auf T – Zellen eine Bindung ein. Dadurch aktivieren sie CD4 positive T-Helfer-Zellen die wiederum durch Zytokinausschüttung andere Zellen stimulieren und zur Pathologie der RA beitragen [Pichler et al., 1996] .

Trotz dieser genetischen Faktoren ist klar, dass die Vererbung allein einen maximalen Anteil von 30 – 50 % ausmacht. Daher müssen Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen; hier werden in erster Linie Infektionen vermutet, die im Zusammenspiel mit Autoimmunreaktionen schließlich den Durchbruch zu einer Autoimmunerkrankung ermöglichen. Ist die Erkrankung einmal eingetreten, wird sie im Verlauf durch weitere Faktoren, insbesondere proinflammatorische Zytokine modifiziert [Burmester und Kalden, 2001].

In der Pathogenese der RA stehen folgende Veränderungen im Mittelpunkt:

- Synoviale Hyperplasie
- Chronische Entzündung
- Pathologische Immunantwort

Im Gegensatz zu anderen Arthritiden ist die Zerstörung von Gelenkknorpel und knöchernen Gelenkanteilen, das wichtigste Charakteristikum der RA [Gay et al., 1993].

Die Gelenkinnenhaut (Synovium) von RA Patienten ist verdickt und weist eine Infiltration von Entzündungszellen auf was mit der Hyperplasie dieser Zellschicht einhergeht [Henderson et al., 1988; Maini und Zvaivler, 1998]. Ein Grossteil (ca. 70%) dieser an sog. Pannusbildung beteiligten Zellen besteht aus makrophagenähnlichen Typ A Synoviozyten, [Kelly et al., 1988; Burmester et al., 1997] und ca. 25% aus fibroblastenähnlichen Typ B Synoviozyten [Gay et al., 1993; Firestein et al., 1988; Hoyhtya et al., 1984]. Aus den Studien von Fassbender et al. ist bekannt, dass die Typ B Synoviozyten eine veränderte Morphologie aufweisen, (rundlich, statt spindelförmig, helle, große Zellkerne, prominente Nukleoli) und aktiv sind in der Invasion, sowie bei der Destruktion von Gelenkknorpel beteiligt sind [Müller-Ladner et al., 1997]. Die Typ A Synoviozyten exprimieren das Oberflächenantigen CD68 anhand dessen sie als Makrophagen identifiziert werden können [Kreipe et al., 1986]. Die Typ B

Synoviozyten exprimieren eine große Zahl an Oberflächenliganden [Edwards et al., 1995; Lee et al., 1996; Medof et al., 1987] die als Adhäsionsmoleküle interpretiert werden und eine Reihe von Matrix-degradierenden Enzymen, sog. Metalloproteinasen (MMP's) die Knorpel und Knochen angreifen [Krane et al., 1982; Firestein et al., 1991; McCachren et al., 1990].

In Synovialbiopsien von RA Patienten konnte die Expression von *ras* und *myc* Onkoproteinen nachgewiesen werden, die an der Regulation von Proliferation und Differenzierungsprozessen beteiligt sind [Trabandt et al., 1990]. Die Expression dieser Onkoproteine führt zu Hemmung der natürlichen Zellproliferation und zum Wachstum pathologischer Zellarten, wie z.B. das rheumatoide Synovium. Die synoviale Hyperplasie kann auch durch verminderte Apoptoserate und eine verlängerte Überlebenszeit der Fibroblasten bedingt sein [Mohr et al., 1986; Petrow et al., 1997].

Bei RA findet man im Serum und in der Gelenkflüssigkeit erhöhte Spiegel von inflammatorischen Zytokinen wie: IL-1, IL-8 oder TNF- α und IL-16 [Feldmann et al., 1996] die grossteils von aktivierten synovialen Fibroblasten sezerniert werden. IL-1 stimuliert die Synthese von Matrixmetalloproteinasen (MMP-1 und MMP-3) und induziert die Sekretion von IL-16, ein sehr wichtiges Interleukin in der Pathogenese der RA (siehe unten). Durch die verlängerte Überlebenszeit der Synoviozyten kommt es zu einer längeren Einwirkung von Zytokinen und matrixabbauenden Metalloproteinasen.

Für die pathologische Immunantwort ist die klonale Expansion von B- und T- Zellen im RA Synovium, sowie die Produktion großer Mengen von Rheumafaktoren (RF) verantwortlich. Die RF werden von B-Lymphozyten produziert und gehören zu den Immunglobulinklassen: IgM, IgA, IgE und IgG [Smiley et al., 1968; Waaler, 1940]. Bei 75 bis 80% der Patienten werden diese RF im Laufe der Krankheit nachgewiesen [Maini und Zvaifler, 1998]. Aus diesem Grund bietet der Nachweis von dieser Immunglobuline im Blut gute diagnostische Möglichkeiten [Janssens et al., 1988; Jonsson et al., 1993]. Dauerhaft hohe RF Konzentrationen im Serum führen zu einer ungünstigen Prognose.

Die Rheumafaktoren im Serum können Vaskulitis auslösen. In 1% der Fälle, wurden hohe Titer IgG – AK gegen Endothelzellen [Heurkens et al., 1989] beobachtet, die anschließend zu schwerwiegenden Hautulzerationen, Neuropathien und Gangrän führten [Maini und Zvaifler, 1998].

Die Entstehung der rheumatischen Angiogenese ist unabhängig von RF. Sie entsteht durch Hypoxie, welche wiederum durch hohen intraartikulären Druck bedingt ist [Mapp et al., 1995, Jackson und Jenkins, 1991; Schweiki et al., 1992]. Angiogenese ist, ähnlich wie aktivierte Synoviozyten, an Pannusbildung und Knorpeldestruktion beteiligt [Folkman et al., 1985].

Die Diagnose der RA wird nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 [Arnett et al., 1988] gestellt:

1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen
3. Arthritis eines der Gelenke an Hand- und Fingergelenken
4. Symmetrischer Befall kontralateraler Gelenke
5. Rheumaknoten: Subkutane Knoten an druckbelasteten Sehnen, z.B. über Knochenvorsprüngen, häufig an Extensorenflächen oder juxtaartikulär
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7. Typische radiologische Veränderungen der betroffenen Gelenke: gelenknahe Osteoporose und/ oder Erosionen

Sind mindestens vier der sieben Kriterien erfüllt und bestehen die Kriterien 1 – 4 über mindestens 6 Wochen, so liegt bei dem Patienten eine RA vor.

Im Verlauf dieser Arbeit wird die Rolle der Zytokine und insbesondere die Funktion der IL-16 in der Pathogenese und Therapie der RA erläutert.

1.2 Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine oder Polypeptide, die normalerweise als Mediatoren für die Kommunikation zwischen Zellen verantwortlich sind. Dabei wirken sie meistens in der unmittelbaren Umgebung ihrer Sekretion. Allerdings kann es bei schweren Autoimmunerkrankungen wie RA, zu erheblichen systemischen Wirkungen der Zytokine kommen, da sie in die Blutbahn und in zahlreiche Gewebe des Körpers gelangen können. Durch Chemotaxis werden entzündliche Zellen ins Gelenk gelockt und aktiviert. In der Konsequenz werden Produkte, vorrangig Enzyme ausgeschüttet, die zu einer Zerstörung des Gewebes führen [Nüßlein, 2001].

Grob schematisch werden sie in zwei Gruppen eingeteilt: pro- und antiinflammatorischen Zytokine. Normalerweise hält sich die Wirkung dieser beiden Systeme die Waage, bei bestimmten Störungen des Systems überwiegt jedoch die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine, sodass zu einer Arthritis kommen kann. In Tiermodellen konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Gelenkerkrankungen insbesondere dann eintreten, wenn IL-1 oder TNF- α übermäßig produziert werden.

Die Zytokine umfassen zahlreiche Stoffe, wie: Lymphokine (von Lymphozyten produziert), Monokine (von Monozyten/Makrophagen sezerniert), Chemokine, Wachstumsfaktoren, Interferone und Interleukine.

Interleukine werden von verschiedensten Zellarten gebildet [Pichler et al., 1996]. Sie werden autokrin oder parakrin sezerniert und nur während eines kurzen Zeitraumes. Bei Bedarf steigt die Syntheserate innerhalb weniger Stunden an. Nach der Sekretion über den Blutweg binden die Interleukine spezifisch an Rezeptoren, deren Expression sie ebenfalls mitregulieren.

Interleukine lösen verschiedene, zum Teil überlappende Effekte aus: IL-1, IL-4, IL-6 und IL-14 sind unter anderem für die humorale Immunität verantwortlich. IL-1 und IL-6 lösen Fieberreaktionen aus. IL-2, IL-4, IL-13 und IL-15 sind an der Steuerung der Differenzierung, Aktivierung und Wachstum der T- und B-Lymphozyten beteiligt. IL-9 und IL-11 zeigen Wachstumsfördernde Wirkungen an hämatopoetischen Zellen. IL-3 und IL-7 sind an der Leukozytenproliferation beteiligt.

1.2.1 Interleukin 16

Bei RA findet man im Serum und in der synovialen Flüssigkeit erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-8 oder TNF- α . Franz et al. konnten 1998 zeigen, dass in RA synovialer Flüssigkeit erhöhte IL-16 Titer nachweisbar sind und dass synoviale Fibroblasten in situ vermehrt IL-16 kodierende mRNA transkribieren.

Interleukin 16 ist ein proinflammatorisches und chemotaktisch aktives Zytokin das erstmals 1982 von Center und Cruickshank entdeckt wurde [Center und Cruickshank, 1982]. Wegen seiner chemotaktischen Wirkung auf T-Lymphozyten, wurde es als „lymphocyte chemoattractant faktor (LCF)“ beschrieben [Cruickshank und Center, 1982].

IL-16 wird zuerst als 631 Aminosäuren langes Vorläuferprotein translatiert und post-translationell modifiziert [Baier et al., 1997]. Bei der Proteolyse bei Asp510 durch Caspase, entsteht C-terminal ein 121 Aminosäuren großes reifes Protein. [Zhang et al., 1998] Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und Immunoblot weisen ein 20 kD schweres Protein aus. Die biologische Aktivität nach Gelsiebchromatographie wird bei 55kD gefunden. Daher vermutet man, dass IL-16 als Monomer sezerniert wird und in wirksamen Zustand zu einem Homotetramer multimerisiert [Baier, 1999; Cruikshank und Center, 1982; Cruikshank et al., 1994].

IL-16 unterscheidet sich von anderen Zytokinen oder Interleukinen. Nur das processing über Caspasen zeigt Ähnlichkeiten zum processing von IL-1 oder IL-18 [Center et al., 2000]. IL-16 wurde in lymphatischem Gewebe, [Baier et al., 1997] eosinophilen Zellen, Epithelien der Luftwege, [Bellini et al., 1993] Pankreas, Magen, Kleinhirn und Knochenmark, sowie in synoviale Fibroblasten nachgewiesen [Cruikshank et al., 1996]. IL-16 aktiviert die CD4 T-Helfer-Zellen durch Bindung an deren Oberfläche an den sog. D4 Domäne, deshalb können gegen CD4 gerichtete monoklonale Antikörper eine IL-16 induzierte Aktivierung hemmen [Cruikshank et al., 1994]. Eine Präinkubation von T-Zellen mit IL-16 kann eine spätere T-Zellaktivierung und/oder Proliferation ebenfalls hemmen [Cruikshank et al., 1996]. IL-16 induziert die Expression von MHC Klasse II Molekülen an inaktiven T-Zellen [Cruikshank et al., 1994] und IL-2 Rezeptoren [Amiel et al., 1999]. IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für T-Zellen [Center et al., 1996].

IL-16 mRNA wird von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen exprimiert nach antigener oder mitogener Stimulation. CD8⁺ Zellen setzen IL-16 frei, nach Stimulation mit Serotonin oder Histamin [Center et al., 1996; Laberge et al., 1996; Laberge et al., 1995].

IL-16 Expression steht in Zusammenhang mit Entzündungsprozessen bei Asthma, systemischem Lupus erythematodes, Colitis, atopische Dermatitis, Multiple Sklerosis und Rheumatoide Arthritis [Franz et al., 1998].

IL-16 zeigt eine suppressive Wirkung bei HIV-1 Infektion [Walker et al., 1986]. Baier et al konnten 1995 zeigen, dass rekombinantes IL-16 die Replikation des HIV-1 im peripheren Blut mononuklearer Zellen unterdrückt [Baier et al., 1995]. Sie fördert die Inhibition der HIV-1 promotor Aktivität. Andererseits führen hohe IL-16 Titer zu einer antigenunabhängigen Proliferation der CD4⁺ T-Zellen [Center et al., 2000].

1.2.2 Interleukin 16 bei rheumatoider Arthritis

Das rheumatoide Synovium ist durch Infiltration von: CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen, und proliferierende Fibroblasten charakterisiert [Gay et al., 1993; Weyand und Gorozny, 1997]. Die aggressive Invasion dieser Zellen führt zu Knorpel und Knochenstrukturen. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 spielen dabei eine sehr wichtige Rolle.

1998 konnten Franz et al zeigen, dass in Serum und synovialer Flüssigkeit von RA Patienten erhöhte IL-16 Titer im Vergleich zu Osteoarthrosepatienten bzw. Patienten mit reaktiven Arthritiden nachweisbar waren [Franz et al., 1998]. Blaschke et al. bestätigten in 2001 dieses Ergebnis [Blaschke et al., 2001].

IL-16 ist ein Ligand des CD4 Rezeptors, das CD4⁺ Zellen aktiviert und so bei RA zu chronischen Entzündungen im Gelenk führt. Mittels in situ Hybridisierung (ISH) wurde gezeigt, dass synoviale Fibroblasten vermehrt IL-16 kodierende mRNA transkribieren. Mittels Immunhistochemischer Untersuchungen und ISH konnte nachgewiesen werden, dass CD68 negative synoviale Fibroblasten die Hauptproduzenten von IL-16 mRNA in RA Synovium sind.

Franz et al. konnten ebenfalls zeigen, dass Patienten in frühen Krankheitsstadien (≤ 1 Jahr) und v.a. im aktiven Schub höhere IL-16 Titer aufwiesen. Dies führt wahrscheinlich zu Chemotaxis weiterer Entzündungszellen. RA-SF in frühen Krankheitsstadien zeigten eine stärkere chemotaktische Aktivität als RA-SF in späten Stadien (≥ 1 Jahr). Bei Patienten in frühen Krankheitsstadium korrelierten hohe IL-16 Titer mit der Dauer der Morgensteifigkeit, nicht aber mit den Entzündungsparametern (BSG, C-reaktives Protein) bzw. den klinischen Zeichen (geschwollene Gelenke).

Erhöhte IL-16 Spiegel kann ebenfalls durch IL-1 β produzierende Makrophagen induziert werden [Cruikshank et al., 1991; Cruikshank et al., 1994]. In synovialer Flüssigkeit von RA Patienten wurden erhöhte IL-1 β Titer gefunden [Burmester et al., 1997].

Es gibt auch Untersuchungen, die IL-16 als immunsuppressives Zytokin beschreiben [Klimiuk et al., 1999]. Klimiuk et al. zeigten, dass infiltrierende CD8⁺ T-Zellen durch IL-16 die CD4⁺ synoviale T-Zellen in ihrer Funktion hemmen. Da trotz

antiinflammatorischer CD8⁺ T-Zellen die Entzündung weiterhin besteht, scheint die IL-16 abhängige Immunsuppression für RA Patienten nicht ausreichend zu sein.

Im Gegensatz zu anderen Disziplinen, wie z.B. der Pulmonologie oder Virologie, gibt es zur Bedeutung von IL-16 in RA und die IL-16 Expression, sowie Sekretion durch Fibroblasten, kaum publizierte Daten [Franz et al., 1998; Sciaky et al., 2000].

Die Beeinflussung der IL-16 Sekretion und dadurch erzielte Reduktion der Entzündungszellen in RA Synovium konnte ein wichtiger Schritt in der Therapie der RA sein.

1.3 Gentherapie in rheumatoider Arthritis

Nur wenige medizinische Forschungsgebiete erhielten in den letzten Jahren so viel Aufmerksamkeit wie die somatische Gentherapie. Sie ist definiert als das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens einen therapeutischen Nutzen zu erzielen. Heute kann man mit zunehmend ausgefeilten Methoden Gene in Zellen einbringen und diese dadurch neu programmieren. Es wird jedoch noch einige Jahre dauern bis es zu einer festen medizinische Größe heranwachsen wird um vielen nichtbehandelbaren Krankheiten zur Verfügung zu stehen [Hallek et al., 2001]. Ziel der Gentherapie ist die systemische Arzneimitteltherapie durch lokale, selektive und hoch spezifische Modifizierung der Zellen auf Molekularebene zu ersetzen [Pap et al., 1999].

Bei einer unklaren Ätiopathogenese der RA ist bislang keine kausale Therapie möglich. Mit zunehmenden Verständnis der Endstrecke einer pathogenetischen gelenkdestruierenden Sequenz ist es in den letzten Jahren jedoch möglich geworden, neue und effektive Therapieprinzipien zu entwickeln. Die Analyse molekularer Mechanismen, die zu einer Gelenkdestruktion führen, ließen neue Zielmoleküle für neue therapeutische Interventionen definieren [Kalden et al., 2001].

Evans et al. leisteten Pionierarbeit auf diesem Gebiet. Sie entwickelten recombinante Zytokinantagonisten, antiinflammatorische Mediatoren, die sie in Form von adenoviralen Vektoren in das Synovium von Tiermodellen applizierten. Der Transfer von IGF-I und BMP-2 Genen durch virale Vektoren, führte zu Veränderungen in

Synoviozyten und zur Proteoglykansynthese. Müller-Ladner et al., zeigten 1996, dass synoviale Fibroblasten auch in Abwesenheit menschlicher Entzündungszellen ihre zerstörerische Eigenschaften beibehalten. Daraus hat sich die Versuchsreihe mit dem Ziel entwickelt, die invasiv wachsenden Zellen durch Gentransfer so zu verändern, dass ihr aggressives Wachstum gehemmt wird [Müller-Ladner et al., 1996]. Synoviale Fibroblasten wurden mit Hilfe von retro- und adenoviralen Vektoren mit dem gewünschten Gen, hier dem Gen, das für den humanen IL-1-Rezeptor-Antagonisten kodiert, transfiziert. Diese Zellen wurden unter der Nierenkapsel von SCID Mäusen injiziert und untersucht. Die IL-1-Ra-transduzierte SF führten kaum zu einer perichondrozytäre Knorpelzerstörung [Müller-Ladner et al., 1997]. Aufgrund der positiven Ergebnisse der gentherapeutischen Studien mit den löslichen IL-Rezeptor-Antagonisten an den o.g. Tiermodellen wurde in Pittsburgh, PA, 1996 mit diesem Zytokinantagonisten die erste FDA- genehmigte Studie an Patienten mit RA begonnen [Evans et al., 1996].

Der adenovirale Transfer des IL-1sR Typ I Vektors, zeigte ebenfalls chondroprotektive Effekte und reduzierte die Leukozytenmigration im Gelenk [Evans et al., 1999].

Diese Art von Gentransfer muss man vorsichtig betrachten, da virale Vektoren Entzündungsprozesse induzieren können, und systemische Störungen wie Fieber und Gewichtsverlust verursachen [Evans et al., 1999]. Außerdem wurden onkogene Eigenschaften [Miller, 1992; Morgan und Anderson, 1993] beobachtet.

In den letzten zehn Jahren hat sich eine effektive, nichtvirale DNA-Transfektionsmethode entwickelt, die kationische liposomenvermittelte Transfektion, oder Lipofektion. Kationische Liposomen interagieren spontan mit DNA unter Bildung von Liposomen/Polynukleotid – Komplexen und bieten so eine einfache und reproduzierbare Methode zur Transfektion von Nucleinsäuren in eukaryontischen Zellen [Hellgren et al., 2000].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Doktorarbeit war, eine optimale Gentransfer Methode zu finden, um in möglichst viele synoviale Fibroblasten effizient DNA einzubringen. Dies ist notwendig

um Fibroblasten mit Expressionsvektoren zu transfizieren und dadurch die Mechanismen der IL-16 Expression, sowie Sekretion zu erforschen. Langfristig können erfolgreiche Gentransfer Methoden zur Gentherapie der rheumatoiden Arthritis beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit der Methode der Lipofektion, die vier verschiedenen Transfektionsreagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE miteinander verglichen, um den effizientesten Reagenz herauszufinden. Ein weiteres Ziel der Experimente war, eine optimale DNA und Reagenzmenge zu bestimmen für die erfolgreiche Lipofektion der Zellen.

Als Expressionsvektoren dienten, zum einen das pUC-12 Plasmid, mit dem hGH Gen unter Kontrolle des RSV Promotors und zum anderen ein Plasmid mit EGFP Gen, welches für GFP (Green Fluorescent Protein) kodiert und von CMV Promotor gesteuert wird. Die Plasmide werden in E. coli vermehrt und durch Plasmidpräparation aus den Bakterien gewonnen.

Für die Experimente wurden synoviale und dermale Fibroblasten aus acht Patientenproben verwendet. Die Auswertung der Transfektionseffizienz des Reagenzien /hGH – Komplexes erfolgt durch hGH-ELISA. Dabei wird das durch synoviale Fibroblasten produzierte und in den Zellüberständen befindliche humane hGH gemessen. Die Transfektionseffizienz des EGFP Vektors mit den o.g. Transfektionsreagenzien wird mit Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Die transfizierten Fibroblasten produzieren in ihrem Zytoplasma autofluoreszierende GFP, das mit entsprechenden GFP Filter im Leica Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann. Der Anteil GFP positiver Zellen wird mit Hämocytozometer gezählt.

Es werden äquivalente Mengen von DNA und Transfektionseagenzien verwendet und unter gleichen Bedingungen gearbeitet, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Es ist notwendig unter dem großen Angebot von Transfektionsreagenzien auf dem Markt einen optimalen, wenig zytotoxischen und effizienten Reagenz zu finden, der für die Lipofektion synovialer Fibroblasten geeignet ist.

Langfristiges Ziel der Untersuchungen ist es, die Mechanismen aufzuklären, die zu einer erhöhten IL-16 Expression bei RA beitragen. Die Ergebnisse können die Entwicklung von therapeutischen Strategien zur Behandlung der IL-16 abhängigen Entzündungen nicht nur bei RA fördern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

6-Well-Makroplatten (Fa. Greiner, Nürtingen, BRD)

24-Well-Platten (Fa. Greiner)

96-Well-Mikroplatten (Fa. Greiner)

Absaugpumpe (Suc-O-Mat; Fa. Bachofer, Reutlingen, BRD)

Auswerteprogramm IM 1000 (Fa. Leica, Bensheim, BRD)

Bechergläser (verschiedene Größen; Fa. Schott, BRD)

Brutschrank (CO₂ Auto-Zero; Fa. Heraeus, Hanau, BRD)

DAKO-Kit (LSAB2 System Alkaline Phosphatase, Fa. Dako)

DC Camera (Fa. Leica, Bensheim, BRD)

Einmalskalpelle (Cutfix; Fa. Braun Medical AG, Melsungen, Schweiz)

Eppendorf-Cups (0,5 ml, 1,8 ml; Fa. Eppendorf, Hamburg, BRD)

Erlenmeyerkolben (verschiedene Größen; Fa. Schott, BRD)

Farbdiafilm (Kodak Ektachrome 100 HC; Kodak, Stuttgart; BRD)

Feinwaage (Sartorius Handy H51; Fa. Sartorius, Göttingen, BRD)

Fluoreszenzmikroskop (DM IRB/E; Fa. Leica, Bensheim, BRD)

Gefrierschränke (Fa. Bosch, Stuttgart, BRD)

Gelkammer (Fa. Appligene, Heidelberg, BRD)

Glasflaschen (verschiedene Größen; Fa. Schott, BRD)

Kanülen (Sterican 0,45 x 25 mm, 26 G, Fa. Braun Medical AG)

Kühlschränke (Fa. Bosch)

Kulturflaschen (50 ml, 250 ml; Fa. Costar, Cambridge, Grossbritannien)

Latexhandschuhe (Fa. Beiersdorf, Hamburg, BRD)

Lichtmikroskop (Fluovert FS Mikroskop, Fa. Leitz, BRD)

Mikrowellenofen (Fa. Bosch)

PCR-Block (Typ UNO II; Fa. Biometria, Göttingen, BRD)

Perfusorspitzen (25ml, 50 ml; Fa. Braun Medical AG)

Petrischalen (Cellstar, 94/16 mm, steril; Fa. Greiner)
Photometer (Spectrophotometer V-530; Fa. Jasco, Groß Umstadt, BRD)
Pinzetten (Fa. Aesculap, Tuttlingen, BRD)
Pipetten (Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner)
Pipettierhilfen (accu-jet; Fa. Brand)
Pipettenspitzen (Fa. Biozym)
PP-Röhrchen steril (50 ml, 15 ml; Fa. Greiner)
Schüttler (Ika MTS4; Fa. Bachofer)
Software (AnalySIS; Fa. Soft-Imaging Software, Münster, BRD)
Sterilbank (Gelaire Laminar Air Flow; Fa. BDK, Sonnenbühl, BRD)
Sterilfilter (Millisart 0,45 µm; Fa. Sartorius)
Stickstofftank (Taylor Wharton Cryogenics; Fa. Bachofer)
Urinbecher steril mit Deckel (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, BRD)
Wärmeplatte mit Magnetrührer (Ikamag RCT; Janke & K.; Staufen BRD)
Wasserbad (DT Hetotherm; Fa. Bachofer)
Zentrifugen (Firmen Beckmann, Eppendorf)

Außerdem wurde die allgemeine Laborausrüstung mit Personalcomputern und Druckern eingesetzt.

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Agarose (Fa. Merck, Darmstadt, BRD)
Albumin, Bovine (100 g, Fa. Sigma)
Antimykotikum Fungizone (Amphotericin B; Fa. Gibco, Karlsruhe, BRD)
AS02 (Anti-Fibroblasten-AK, Maus IgG1, Fa. Dianova, Hamburg, BRD)
Bakterien XL-1- Blue MRF⁹ Komp.(Fa. Stratagene)
Bakterien XL-2-Blue MRF Ultracompetent Cells (Fa. Stratagene)
Basenpaarmarker (100 bp DNA Ladder; Fa. Gibco)
Beta-Mercaptoethanol (Fa. BioRad, München, BRD)
Borsäure 1M (Fa. Merck)
Bromophenolblau (10%ig in Aqua dest.)

cDNA-Synthese-Kit (Adv. RT-for-PCR Kit; Fa. Clontech, Palo Alto, USA)
Collagenase XI (Fa. Sigma, Taufkirchen, BRD)
DAB-Puffertabletten (Diaminobenzidin; Fa. Merck)
Desinfektioslösung Antiinfekt Liquid (Fa. Schülke & M., Norderstedt, BRD)
Desinfektionslösung Barrycidal 36 (Fa. Schröder, Stuttgart, BRD)
Dimethylsulfoxid (Fa. Merck)
Dispase II (2,4 Units/ml; Fa. Roche)
DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz (Fa. Roche)
DOSPER Liposomales Transfektionsreagenz (Fa. Roche)
EDTA-Natrium (Titrplex III; Fa. Merck)
Ethidiumbromid (10 mg/ml; Fa. Amersham, Braunschweig, BRD)
Fötale Serum (Myoclon Super Plus Fötale Rinderserum ; Fa. Gibco)
Forskolin (Fa. Calbiochem)
FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Fa. Roche)
Gentamicin Sulfat (10 mg/ml, Fa. Sigma)
Glycerin
hGH – ELISA (Fa. Roche)
LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagent (Fa. Gibco)
Mercaptoethanol (Fa. Bio-Rad)
Nährmedium (DMEM /F12 (1:1) Medium flüssig, Fa. Gibco)
Natriumacetat (Fa. Merck)
pEGFP-C1 Expressionsvektor (20 µg; Fa. Clontech, Palo Alto, USA)
Penicillin/Streptomycin- Lösung (10000 E/10000 µg/ml; Fa. Gibco)
Phenylhydrazin (5ml, Fa. Merck)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca und Mg (Fa. Gibco)
Plasmid Purification Maxi Kit (Fa. Qiagen)
pUC-12 Vektor (Fa. Boehringer Mannheim)

2.1.3 Gekaufte Zelllinien

1. Normal Human Dermal Fibroblasts (Neonatal Skin; Fa. Bio Whittaker)

- NHDF Charge 6499, 1.Passage

2.1.4 Humanes Gewebe

Das Synovialgewebe wurde den Patienten nach schriftlicher Einverständniserklärung in der orthopädischen Uniklinik Tübingen entnommen. Die Genehmigung durch die Ethikkommission lag zu diesem Zeitpunkt vor.

Es handelt sich um insgesamt acht Patienten mit verschiedenen Diagnosen: Coxarthrose, Gonarthrose, Arthritis , Psoriasisarthritis und ein Patient mit rheumatoider Arthritis.

Die Patienten werden aus Gründen des Datenschutzes im weiteren nur mit Kürzeln bezeichnet. Im folgenden eine kurze Beschreibung der einzelnen Patienten:

MIR:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: Coxarthrose
- Alter: 73
- Geschlecht: weiblich

RZK:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: Osteo-Arthrose, Knie
- Alter: 63
- Geschlecht: männlich

GIH:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: ankylierende Varusgonarthrose
 - Alter: 71
 - Geschlecht: weiblich

PLF:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: Varusgonarthrose
- Alter: 81
- Geschlecht: männlich

HEK:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: Psoriasisarthritis, Handgelenk
- Alter: 37
- Geschlecht: weiblich

RKL:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: rheumatoide Arthritis, Gonarthrose
- Alter: 42
- Geschlecht: männlich

PLO:

- Gewebe: Synovia
- Diagnose: Coxarthrose
- Alter: 76
- Geschlecht: weiblich

BRM:

- Gewebe: Spongiosa
- Diagnose: Hüftgelenkdysplasie
- Alter: 7
- Geschlecht: weiblich

KNI:

- Gewebe: Synovia

- Diagnose: Chondromatose
- Alter: 46
- Geschlecht: weiblich

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Allgemeines

Die Arbeit mit Fibroblasten wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu verhindern. Gearbeitet wurde unter einer Sterilbank mit laminarer Luftströmung und es wurden ausschließlich sterile bzw. sterilisierte Materialien verwendet. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank gezüchtet bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Um den Kontakt mit gefährlichen Chemikalien zu vermeiden und das Laborpersonal vor einer Infektion zu schützen wurden Latexhandschuhe benützt.

2.2.1.2. Anlage humaner Fibroblastenkulturen

Die humanen Gewebestücke wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem sterilen Gefäß mit physiologischer Kochsalzlösung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.3 Anlage humaner Fibroblastenkulturen aus synovialen Gewebe

Das Gewebe wurde sauber von anderen Gewebearten wie z.B. Fett, Blutgefäßen oder Knorpelzellen getrennt. Anschließend in eine sterile Petrischale überführt und mit Hilfe von Skalpell und Scheren zerkleinert (ca.1mm³ große Stückchen), um eine größere Angriffsfläche für den späteren Verdau zu erhalten. Durch Zugabe einiger Tropfen PBS⁻ wurde ein Austrocknen des Gewebes verhindert. Das zerkleinerte

Material wurde dann in 50 ml-Röhrchen aufgenommen, mehrmals mit PBS⁻ gewaschen und zentrifugiert (1000 upm/4°C/ 5min) bis der Überstand frei von Fett- und Blutzellen war. Nach Überstandabnahme wurde das Pellet mit Kollagenase (1500U/ml) und Dispase (2,4 U/ml) überschichtet und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte der weitere Verdau nur mit Kollagenase für ca. 2 Stunden, um die Bindegewebszellen aus dem Gewebeverband herauszulösen. Im Anschluß an den Verdau folgten zwei weitere Waschschrift mit PBS⁻ . Das Pellet wurde im Vollmedium aufgenommen und in Kulturflaschen, bzw. 6-Well-Platten überführt . Das Gewebe wurde ca. zehn Tage in Kultur im Brutschrank belassen .

2.2.1.4 Anlage von Kulturen dermalen Fibroblasten

Die nativen neonatalen Hautfibroblasten in der ersten Passage wurden von der Firma BioWhittaker bezogen. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Vollmedium aufgenommen und nach Zugabe von PBS⁻ abzentrifugiert (1000 rpm/4°C/8 Min), um das zelltoxische DMSO (Dimethylsulfoxid) herauszuwaschen. Der Überstand wurde mit sterilen Pipetten abgesaugt, die Zellen nach resuspendieren in Vollmedium, in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank kultiviert.

2.2.2 Nährmedium und Zellpflege

2.2.2.1 Herstellung des Vollmediums:

Kulturmedium für Fibroblasten enthält folgende Substanzen:

Das verwendete Grundmedium: Dulbecco's MEM/F 12 (500 ml) enthält anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glukose Puffer und den Indikator Phenolrot. Für das optimale Zellwachstum wurden noch folgende Medien zugefügt:

- 50 ml Mycolone Super Fötales Kälberserum (FCS), entspricht 10% FCS
- 12 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
- 6 ml Fungizone
- 10 ml MEM Vitaminlösung

- 0,5 ml Insulin-Transferrin-Selen-Supplement (ITS)
- 0,5 ml Tylosin-Lösung oder 2,5 ml Gantamycin-Lösung im Wechsel
-

Das FCS enthält Wachstumsfaktoren, Hormone und Proteine wie Albumin. Es wird bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert um in Serum enthaltene Komplementfaktoren und kreuzreagierende Immunglobuline zu inaktivieren. Dadurch kann eine Komplementaktivierung und Zellyse vermieden werden.

Die Antibiotika und Antimykotika sollen die Kontamination mit Bakterien und Pilzen verhindern.

Das FCS und die anderen Lösungen wurden im Kühlschrank bei –20°C gelagert. Das Vollmedium wurde höchstens zwei Wochen benützt um Qualitätsverluste zu vermeiden.

2.2.2.2 Mediumwechsel

In Abhängigkeit von Zellart, Zelldichte und Zellwachstumsrate wurde der Mediumwechsel durchgeführt.

Dem Medium wurde ein pH - Farbindikator zugesetzt, welcher bei Zunahme des pH-Wertes ins rot-violette und bei Überwiegen saurer Valenzen (z.B. bei hohem CO₂ – Gehalt des Mediums durch hohe Stoffwechselaktivität der Zellen) ins gelbe umschlägt. Letzteres zeigt die Notwendigkeit eines Mediumwechsels an. In der Regel wurde das Medium alle 3-4 Tage ausgewechselt, da manche der im Medium enthaltenen Zusätze (z.B. Antibiotika) bei 37°C lediglich 3 Tage stabil sind.

Zum Wechsel des Mediums wurde mit sterilen Pasteurpipetten, an der UV sterilisierten Sterilbank gearbeitet. Hier herrscht ein permanenter, partikelfreier Luftstrom um eine Kontamination mit Keimen zu verhindern. Das alte Medium wurde vorsichtig abgesaugt, ohne den Zellrasen zu beschädigen und je nach Kulturflasche 7-14 ml frisches Kulturmedium, welches auf 37°C erwärmt geworden war hinzugegeben.

2.2.2.3 Subkultivierung der Zellen

Jede Zellart hat bei gleichen Kulturbedingungen ihre eigene charakteristische Verdopplungszeit (bei Hautfibroblasten ca. 20 Stunden). Bei Züchtung der Fibroblasten in Kulturflaschen kommt es zur Ausbildung eines einlagigen Zellrasens. Spätestens bei Erreichen des Konfluenzstadiums, d.h. der dichtestmöglichen Anordnung der Zellen als Monolayer, sollten die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und umgesetzt werden, um die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten und so ein optimales Wachstum der Kultur zu ermöglichen.

Wird der Zellrasen zu dicht, tritt Kontaktinhibition auf, hören die Zellen auf zu proliferieren und gehen in die Erhaltungsphase des Zellzyklus über. Dies kann zum Absterben der Kultur führen.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS⁻ gewaschen. Durch das Fehlen von Ca²⁺- und Mg²⁺- Ionen in der Spüllösung werden diese dem Zellrasen entzogen, wodurch die Adhärenz der Zellen am Flaschenboden sowie der Zusammenhalt der Zellen untereinander geschwächt wird.

Nach Entfernen der Spüllösung wurde Trypsin /EDTA zugegeben, bei großen Flaschen 5 ml und bei kleinen 3 ml. Das Trypsin/EDTA – Gemisch bewirkt die vollständige Lösung der Zellen voneinander und vom Boden. Leichtes klopfen auf die Unterseite der Kulturflasche verkürzt die Ablösedauer. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Ablösung erfolgte die Aufnahme der Zellsuspension in Vollmedium. Das Serum im Medium bewirkt eine Inhibierung der Protease Trypsin, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Danach folgte eine Zentrifugation (1000 rpm/4°C/8 min) und nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium aufgenommen und auf Kulturflaschen verteilt

2.2.2.4 Immunhistochemische Charakterisierung der Fibroblasten

Die Zellen wurden am Vortag in 24 – Well – Platten ausgesät, (4×10^3 pro Well) im Brutschrank inkubiert, so dass für die Färbung eine subkonfluente Kultur zur Verfügung stand. Nach zweimal waschen mit mit PBS⁻ wurden die Zellen für 10 Minuten in 4%igem eiskaltem Formaldehyd fixiert. Nach erneuter Spülung mit PBS⁻ wurden die Zellen 30 Minuten mit 0,1%igem Phenylhydrazin inkubiert. Phenylhydrazin

hemmt endogene Peroxidasen. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit 1%igem BSA, um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren.

BSA wurde abgesaugt und fibroblastenspezifische Antikörper AS02 (Maus IgG1) in einer Konzentration von 2µg/ml zugefügt. Zum anderen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CD68 (für Makrophagen bzw. Monozyten) in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt.

Die Färbung wurde mit dem DAKO- Kit durchgeführt. Der nichtgebundene Antikörper wurde mit PBS⁻ herausgewaschen, danach folgte der sogenannte „Link-Antibody“ (biotinylierte anti-mouse und anti-rabbit Immunglobuline) auf alle Proben, bis sie bedeckt waren und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach zwei Spülschritten mit PBS⁻ wurde mit Streptavidin, das an alkalische Phosphatase gekoppelt ist inkubiert und nach 10 Minuten gespült. Abschließend wurden die „Substrate – Chromogen Solution“ zugefügt bis ein deutlicher Farbumschlag sichtbar war. Diese Lösung besteht aus gleichen Anteilen Fuchsin, Chromogen und Activating Agent (z.B. je 120 µl) und wird mit gepuffertem Substrat auf z.B. 2ml aufgefüllt und gut vermischt.

Die angefärbten Fibroblasten wurden fotografisch dokumentiert.

2.2.2.5 Kryokonservierung

Um die Zellen für spätere Versuche aufzuheben und vor häufigem passagieren zu schützen, wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196° C gelagert.

Als Gefrierschutzmittel wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt, das in ungefrorenem Zustand zelltoxisch ist. Deshalb soll das Einfrieren und Auftauen rasch erfolgen.

Diese Substanz verhindert die Dehydratation des Zytoplasmas und unterbindet die Ausbildung von Eiskristallen, welche die Zellmembranen zerstören und zur Lyse der Zellen führen würde.

Vor dem Einfrieren wurde das Einfriermedium, bestehend aus 10% DMSO, 20% FCS und 70% Serumfreiem Medium hergestellt und kühl gelagert. Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen, mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Das Pellet wurde in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen (2 ml) überführt.

Das Einfrieren erfolgte schrittweise. Zunächst wurde die Zellsuspension für 1,5 Stunden bei -20°C abgekühlt und über Nacht in -70°C Schrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in den flüssigen Stickstofftank überführt.

Für die Reaktivierung wurden die Zellen in 37°C Wasserbad aufgetaut. Danach sofort in vorgewärmtes FCS 10% aufgenommen und zentrifugiert, um das zelltoxische DMSO herauszuwaschen.

Das Pellet wurde in Vollmedium aufgenommen, in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank gelagert.

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung

Die konstante Zellzahl für die Versuche wurde mit einem Hämozytometer nach Neubauer bestimmt. Das Raster der Zählkammer ist in neun Quadrate unterteilt, wobei sich an den vier Ecken und im Zentrum Flächen zum Auszählen befinden. Die vier Eckquadrate haben jeweils eine Fläche von $0,1\text{mm}^2$ und sind wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt.

Vor dem Zählen wurden die Zellen, wie bei der Subkultivierung bzw. beim Einfrieren vom Flaschenboden gelöst, abzentrifugiert und nochmals mit PBS^- gewaschen. Die Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde $20\mu\text{l}$ Zellsuspension mit $20\mu\text{l}$ Trypanblau-Lösung gut vermischt und auf die Zählkammer aufgebracht. Durch das Trypanblau werden tote Zellen blau angefärbt, da ihre Zellmembran für den Farbstoff durchlässig ist. Diese gefärbten Zellen werden nicht mitgezählt.

Unter dem Lichtmikroskop wurden die vier Eckquadrate ausgezählt. Die Quadranten von waren $0,0025\text{ mm}^2$ groß und $0,100\text{ mm}$ tief.

2.2.3 Methoden zur Plasmid DNA Präparation

2.2.3.1 Bakterien und Bakterienmedien

E. coli (K 12 Derivate) eignen sich sehr gut für Plasmidtransformation und Vermehrung nach S1, da sie als Sicherheitsstamm zugelassen sind.

Zur Transformation wurden transformations kompetente und ultrakompetente Stämme: XL-1-blue MRF⁺ bzw. XL-2-blue MRF⁺ von der Firma Stratagene verwendet.

Zwei Expressionsvektoren wurden benötigt: ein Expressionsvektor in pUC 12 mit dem humanen hGH Gen unter Kontrolle des RSV Promotors, und Antibiotikaresistenzgen gegen Ampicillin.

Das andere Plasmid enthält ein Gen (EGFP), welches für Green Fluoreszent Protein kodiert und von CMV Promotor gesteuert wird, außerdem noch Selektionsgene gegen Kanamycin (für Prokaryonten) und Neomycin (für eukaryonte Zellen) unter Kontrolle des SV40 Promotors. Für die E. Coli Vermehrung ist das pUC Amplifikationsgen verantwortlich.

Für das optimale Bakterienwachstum benötigt man LB-Medium („Luria Broth“). Das Medium beinhaltet: 10g Trypton oder Pepton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, je Liter destilliertes Wasser. Mit 1N NaOH wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Das Medium wurde in 400ml Glasflaschen abgefüllt und anschließend autoklaviert. Falls die Plasmid-Menge in LB zu gering ist kann man D-Glucose-Monohydrat ad. 20mM (3,92g/l) hinzufügen.

Das Medium wurde in 400ml Glasflaschen abgefüllt und anschließend autoklaviert.

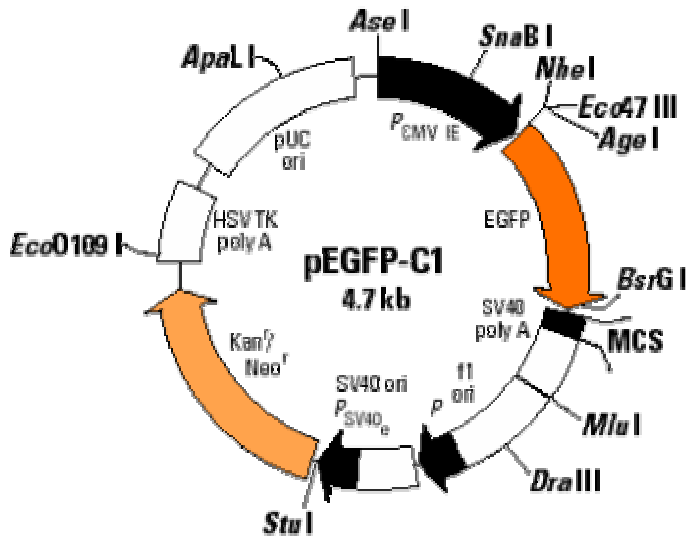


Abbildung 1 a: Dargestellt ist ein Plasmid mit folgenden Genen: GFP (Green Fluoreszenz Protein), gesteuert von CMV Promotor; Selektionsgene gegen Kanamycin (Kan) und Neomycin (Neo) unter Kontrolle des SV40 Promotors; pUC Amplifikationsgen

2.2.3.2 Klonieren von Expressionsvektoren

Die kompetenten bzw. ultrakompetenten Bakterien: 250 μ l wurden mit 2,5 μ l Mercaptoethanol versetzt um die Transformationskompetenz zu erhöhen und dadurch das Einschleusen der DNA zu erleichtern. Daraus wurden 125 μ l Bakterien entnommen und mit dem zu transformierenden Plasmid, je 2 μ l (pUC-12 oder PEGFP) gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend stellt man die Bakterien für 90 Sekunden in 42°C warmen Wasserbad (Hitzeschock) um die DNA Aufnahme-Effizienz 3-10-Fach zu erhöhen. Danach kommen die Zellen für 2 min auf Eis (Kälteschock). Anschließend gibt man 750 μ l LB Medium (ohne Antibiotika) zu und inkubiert für 40 min auf Schüttel-Gerät bei 37°C.

Um die Bakterien auf Antibiotikaresistenz zu selektionieren, plattiert man sie auf Agar – Platten die Ampicillin bzw. Kanamycin enthalten und inkubiert sie über Nacht bei 37°C.

Am nächsten Tag wurde mit einer Impföse, der vorher mit 70% igem Ethanol und Feuerflamme sterilisiert worden war und anschließend auf Agar platte abgekühlt wurde, eine frische Bakterienkultur entnommen. Die E. Coli wurden in Glasflaschen (400ml)

die ad 200ml mit LB-Medium gefüllt waren, angeimpft. Das Medium enthielt Kanamycin (30µg/ml) bzw. Ampicillin (50µg/ml). Die Glasflaschen wurden auf ein Flachbettrüttler gestellt und 12- 16 Std. lang bei 240 upm und 37° C durchrüttelt, damit die Bakterien gut belüftet werden.

2.2.3.2 Präparation von Plasmid DNA

Die Bakterienlyse und die Plasmid- DNA-Isolierung wurde nach der EndoFree Plasmid Maxi Kit anhand der Anleitung der Fa. Qiagen durchgeführt.

Durchführung:

Die Bakterien, (100 ml Kultur) in LB-Medium wurden in 50 ml Röhrchen verteilt, und abzentrifugiert (6000g/4°C/ 15 min.). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 10ml Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von alkalischem Puffer lysiert. Das Lysat wurde mit saurem Acetatpuffer angesäuert. Dadurch flocken Proteine und bakterielle DNA sowie Lipide aus. Das Präzipitat wurde durch QIAfilter abgetrennt. Dann wird das Lysat durch QIAGEN-tip nach den Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt, wobei die Plasmid DNA an die Säulenmatrix bindet. Nach zwei Waschsritten, wurde mit Hilfe von Elutions-Puffer die DNA herausgelöst.

Die eluierte DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol versetzt, es wurde 1ml Ethanol dazugefügt, damit die DNA weißlich ausfällt.

Nach zwei Zentrifugationsschritten und einmal Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in 200µl TE-Puffer aufgenommen.

Die DNA Menge wurde mit Spektrophotometer gemessen.

2.2.3.4 Plasmidverdau mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Um Plasmide zu identifizieren und ihre Größe zu bestimmen kann man sie mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen schneiden. Die Restriktionsenzyme (der Klasse II)

Erkennen, je nach Spezifität vier bis acht Basenpaare in einem DNA–Strang und sie schneiden innerhalb der Erkennungssequenz nur unter richtigen Pufferbedingungen.

Es wurden DNA, Wasser, der passende Puffer aus der Enzymaktivitätsliste und Enzym zusammengemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Für pUC-12 Plasmid-Verdau wurden folgende Mengen verwendet:

- 2µl Plasmid (1,2µg/µl)
- 5µl H-Puffer
- 2,5 µl Sca I Enzym (10U/µl)
- 40,5 µl Aqua dest.

Für pEGFP Plasmid wurden verwendet :

- 2 µl DNA(1,1µg/µl)
- 5 µl A-Puffer
- 2,5 µl Stu I Enzym (10U/µl)
- 2,5 µl Nhe I Enzym (10U/µl)
- 38 µl Aqua dest.

2.2.4 Darstellung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese

Agarosegel-Elektrophorese ist eine effektive Methode um DNA– Fragmente von 0,5-5 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Es wurde ein 1% -iges Agarosegel verwendet, dem Ethidiumbromid zugesetzt war um die DNA sichtbar zu machen. Um zu prüfen, ob die richtigen Produkte dargestellt wurden, diente ein mitgelaufener, DNA-Größenmarker. Das Gel wurde im Anschluß fotografisch dokumentiert.

Folgende Reagenzien wurden benötigt:

20xTBE-Puffer: auf 1l Aqua dest. kommen:

- 121 g Trisaminomethan

- 61,7 g Borsäure
- 7,4 g EDTA-Natrium

Agarosegel: auf 400 ml 20xTBE-Puffer kommen:

- 6 g Agarose
- 30 µl Ethidiumbromid

40xTAE-Puffer: auf 1l Aqua dest. kommen:

- 193,6 g Trisaminomethan
- 108,9 g Natriumacetat
- 15,2 g EDTA-Natrium

Ladepuffer: auf 250 ml 40xTAE-Puffer kommen:

- 5 ml Glycerin
- 1 ml Bromophenolblau
- 1 ml Xylene cyanol
- 2,75 ml Aqua dest.

100 bp-Ladder-Mix :

- 80 µl Ladepuffer
- 50 µl ddH₂O
- 30 µl Ladder

Versuchsdurchführung:

Agarosepulver (3 g) wurde in 300 ml TBE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von 30 µl Ethidiumbromid, auf dem Magnetrührer auf 60°C heruntergekühlt und zügig in die Gelkammer gegossen. Mit Hilfe eines Kammes, der nach dem Gelieren entfernt wird entstehen Taschen. Hier werden dann die Proben eingeführt. Nach dem Aushärten wird das Gel mit TBE-Puffer bedeckt.

Es wurden 15 µl der verdauten Plasmid-Proben mit jeweils 5 µl Ladepuffer vermischt, resuspendiert und 20 µl in die Gel-Taschen eingeführt. In die erste Vertiefung wurden 10 µl des DNA-Größenmarkers pipettiert.

Die Kammer wurde an ein Netzgerät angeschlossen und die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60 Volt. Nach ca. 60 min wurde eine ausreichende Trennung erreicht, das Gel wurde mit UV Licht bestrahlt, und dadurch der DNA-Ethidiumbromid-Komplex sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.2.5 Transfektion von Expressionsvektoren in synovialen Fibroblasten mit Hilfe von verschiedenen Transfektionsreagenzien

Ziel der Experimente war es die Transfektionsreagenzien miteinander zu vergleichen, das optimale Lipid zu finden, die richtigen Reagenzienmengen mit DNA-Menge zu mischen für eine erfolgreiche Transfektion der synovialen Fibroblasten.

Die kationischen liposomalen und nicht-liposomalen Reagenzien die spontan mit DNA interagieren unter Bildung von Liposomen/Polynukleotid-Komplexen bieten eine einfache und reproduzierbare Methode zur Transfektion von Expressionsvektoren in eukaryontischen Zellen. Die Mischung wird zu den Zellen pipettiert und für 4-6 Stunden inkubiert. In dieser Zeit fusionieren die Liposomen-DNA-Komplexe mit der Zellmembran und die DNA gelangt in den Zellkern. Danach wechselt man das Medium und wartet weitere 24-72 Stunden bis die Expression ihren Höhepunkt erreicht hat.

Vier verschiedene Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE™ 2000 wurden miteinander verglichen. Die Transfektions-Effizienz in den Fibroblasten wurde anhand der Extrazelluläre hGH-Produktion mit hGH-ELISA nachgewiesen und die zytoplasmatische GFP-Produktion wurde mit dem Fluoreszenz Mikroskop beobachtet.

2.2.5.1 Eingesetzte Konzentrationen

Die Arbeitskonzentrationen von Reagenzien und DNA wurden von den Anleitungen der Firma Roche und GIBCOBRL entnommen.

DOSPER Liposomales Transfektionsreagenz

- Zellzahl: 3×10^5 pro Well
- Zelldichte: 60-80%
- DNA-Menge: **1,5 μg** (1,25 μl)
- HBS-Puffer: 48,75 μl
- Gesamt : 50 μl
- DOSPER: **4 μl**
- HBS-Puffer: 46 μl
- Gesamt: 50 μl

DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz:

- Zellzahl: 3×10^5 pro Well
- Zelldichte: 60-80%
- DNA-Menge: **2,5 μg** (2,08 μl)
- HBS-Puffer: 22,92 μl
- Gesamt : 25 μl
- DOTAP-Menge: **15 μl**
- HBS-Puffer: 35 μl
- Gesamt: 50 μl

FuGENE nicht-Liposomales Transfektionreagenz:

- Zellzahl: 3×10^5 pro well
- Zelldichte: 60-80%
- DNA-Menge: **1,5 μg** (1,25 μl)
- FuGENE-Menge: **4 μl** +
- FCS 0% : 96 μl
- Gesamt: 100 μl

LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagenz:

- Zellzahl: $4,5 \times 10^5$ pro well
- Zelldichte: 80-90%
- DNA-Menge: **1,5 µg** (1,25µl)
- FCS 0%: 248,7 µl
- Gesamt: 250 µl
- LIPOFECTAMINE: **4 µl**
- FCS 0%: 246 µl
- Gesamt: 250 µl

Kontrolle:

- Zellzahl: 3×10^5 pro well
- Zelldichte: 60-80%

2.2.5.2 Durchführung der Transfektion mit hGH-Plasmid

Die Versuche wurden nach Angaben der Herstellerfirmen des Transfektionsreagenzes durchgeführt.

Die synovialen Fibroblasten wurden am Vortag in 6-well-Platten ausgesät : 3×10^5 bzw. $4,5 \times 10^5$ Zellen pro Well-Platte und in 10% igem FCS Medium, 2ml/well aufgenommen.

Am Transfektionstag wurde die DNA mit serumfreiem Medium verdünnt (HBS-Puffer oder FCS 0%), mit den Reagenzien vermischt und 20 Minuten bei RT inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Zellmedium mit 1%-igem FCS ersetzt: 1ml/well um die unspezifische Aktivierung der Zellen durch heterologes Serum vorübergehend zu reduzieren.

Die DNA/Reagenzien – Mischung wurde tropfenweise zu den Zellen pipettiert und 4-6 Stunden lang in den 5% CO₂ Schrank, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch Zugabe je 2ml/well Vollmedium (10% FCS) ersetzt.

Es wurden regelmäßig, nach 24, 48 und 72 Stunden, Überstände von 500 µl/well abgenommen und mit Hilfe von hGH-ELISA die hGH Produktion gemessen.

Als Kontrolle dienten Zellen in 10% igem FCS ohne DNA und Transfektionsreagenz Zugabe.

2.2.6 hGH – ELISA (Roche)

hGH wird von den transfizierten Zellen sekretiert und dient als Reportergen, deren Nachweis über die Messung der hGH Konzentration im Medium erfolgt, ohne daß Zellen dafür lysiert werden.

Der Test wurde mit hGH-ELISA Kit (Fa. Roche) durchgeführt.

Die Überstände: 500µl/well wurden in Abständen von 24, 48 und 72 Stunden entnommen und bis zur Messung in –70°C Kühlschränk gelagert.

Testprinzip:

Der hGH ELISA basiert auf dem sog. Sandwich ELISA Prinzip. Der Boden der Mikrotiterplatte ist mit Antikörpern gegen hGH beschichtet. In den Überständen vorhandenes hGH bindet spezifisch an die Antikörper. Danach bindet ein mit Digoxigenin gekennzeichneter Anti-hGH Serumantikörper (anti-hGH-DIG) an hGH, gefolgt von einem an Peroxidase gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin (anti-DIG-POD). Anschließend wird ein ABTS-Substrat der Peroxidase hinzugefügt, das durch die Enzym –Substrat Reaktion eine Farbänderung zeigt.

Durchführung:

Um die Messgenauigkeit zu erhöhen wurden zwei Proben von jedem Überstand verwendet. Auf die mit Anti-hGH beschichtete MTP wurden jeweils 200 µl hGH

Standardlösung und die Zellüberstände pipettiert. Die Proben wurden mit Folie bedeckt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde ausgeschüttet und die MTP mit Waschpuffer fünfmal gewaschen. Es folgten je 200 µl anti-hGH-Digoxigenin Lösung, die ebenfalls eine Stunde wirkte. Nach dem Waschen wurde die anti-DIG- Peroxidase Mischung aufgetragen und ebenfalls eine Stunde inkubiert. Nach dem letzten Waschgang wurde die Peroxidase Substrat (POD) dazugegeben, die Platte wurde zugedeckt bis ein deutlicher Farbumschlag zu sehen war (nach 5-20 Minuten). Abschließend erfolgte die photometrische Messung am ELISA-Reader bei 405 nm (Referenzwellenlänge 492 nm). Das FCS 10% Medium diente als Nullwert.

2.2.7 Transfektion mit pEGFP- Plasmid

2.2.7.1 Eingesetzte Konzentrationen:

DOSPER Liposomales Transfektionsreagenz

- Zellzahl: 2×10^5 pro Well
- Zelldichte: 40-60%
- DNA-Menge: **1,5 µg** (1,36µl)
- HBS-Puffer: 48,64 µl
- Gesamt Konz: 50 µl
- DOSPER: **4 µl**
- HBS-Puffer: 46 µl
- Gesamt Konz.: 50 µl

DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz:

- Zellzahl: 2×10^5 pro Well
- Zelldichte: 40-60%
- DNA-Menge: **2,5 µg** (2,27 µl)
- HBS-Puffer: 22,73 µl

- Gesamt: 25 μ l
- DOTAP-Menge: **15 μ l**
- HBS-Puffer: 35 μ l

- Gesamt: 50 μ l

FuGENE nicht-Liposomales Transfektionreagenz:

- Zellzahl: 2×10^5 pro well
- Zelldichte: 40-60%
- DNA-Menge: **1,5 μ g** (1, 36 μ l)
- FuGENE-Menge: **4 μ l**
- FCS 0% : 96 μ l
- Gesamt: 100 μ l

LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagenz:

- Zellzahl: $3,5 \times 10^5$
- Zelldichte: 65-85%
- DNA-Menge: **1,5 μ g** (1, 36 μ l)
- FCS 0%: 248,7 μ l
- Gesamt: 250 μ l
- LIPOFECTAMINE: **4 μ l**
- FCS 0%: 246 μ l
- Gesamt: 250 μ l

Kontrolle:

Zellzahl: 2×10^5 pro well
 Zelldichte: 40-60%

2.2.7.2 Durchführung der Transfektion mit pEGFP-Plasmid

Die Lipofektion wurde genauso durchgeführt wie im Versuch mit hGH-Plasmid. Im Fall von green fluorescent protein (GFP) wurden weniger Zellen ausgesät: $2 - 3,5 \times 10^5$ pro well.

Die optische Beurteilung der Transfektionseffizienz erfolgte am Leica Fluoreszenz Mikroskop nach 24, 48, 72 Stunden. Die Zellen wurden nach 48 und 72 Stunden, mit PBS⁻ gewaschen, trypsinisiert (EDTA) in Medium aufgenommen und zentrifugiert (1000 upm/5min/ RT). Mit Hilfe von Neubauer Zellkammer wurde der Anteil der grün fluoreszierenden Zellen in der Gesamtzellpopulation bestimmt.

2.2.8 Leica Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich zu eine außerordentlich wichtige Nachweismethode entwickelt in der Molekulargenetik. Das Green Fluorescent Protein hat die Eigenschaft bei Anregung mit kurzweiliger Strahlung Fluoreszenzlicht zu emittieren. Es dient als Reporter gen zur Visualisierung der Proteinexpression und eröffnet dadurch neue Perspektiven für die zellbiologische Forschung.

Am Fluoreszenzmikroskop wurde eine DC Digitalkamera installiert um die Bilder aufzunehmen und anschließend mit Hilfe des IM 1000 Auswerteprogrammes zu bearbeiten und speichern.

Die Zellen wurden mit Objektivgröße 10, 20 und 40 vergrößert. Das Mikroskop hat vier Filtersysteme. Zuerst wurden die Zellen mit Durchlicht fotografiert (Filtersystem D), bei 455 nm Wellenlänge und danach mit Hilfe von GFP Filter, bei 500 nm Wellenlänge, die Fluoreszierenden Zellen sichtbar gemacht. Die transfizierten Fibroblasten wurden in 6-Well-Platten, nach 24, 48 und 72 Stunden am Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Nach 48 und 72 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS⁻ gewaschen und zentrifugiert. Es wurden 10 µl Zellsuspension auf Neubauer Zählkammer aufgetragen und der Anteil grün leuchtender Zellen bestimmt.

2.2.9 Statistische Methoden

2.2.9.1 Statistische Auswertung der hGH Produktion

Die gemessenen hGH-Werte der sechs Patientenproben wurden in eine Excel Datei tabellarisch übertragen und mit dem JMP Programm statistisch ausgewertet. Als statistisches Modell eignete sich die Varianzanalyse, um die Streuung zwischen den Stichproben zu analysieren.

Es wurde untersucht ob der logarithmische Wert der hGH-Ausschüttung durch die verschiedenen Reagenzien und durch die Zeit (in Stunden) beeinflusst wird. Die Patienten wurden als zufälliger Effekt modelliert. Außerdem wurde eine Wechselwirkung zwischen Zeit (in Stunden) und Reagenzien berücksichtigt.

Als Zielvariable diente die log. hGH Ausschüttung und als Haupteffekt-Variable die Reagenzien, sowie die Zeit in Stunden. Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen den Reagenzien und die Zeit in Stunden gemessen. Für die einzelnen Variablen wurden die Mittelwerte, die Standardfehler, p-Werte ermittelt, miteinander verglichen und dadurch die effektivste Transfektionsreagenz bestimmt.

2.2.9.2 Statistische Auswertung der GFP-Expression

Die Ergebnisse der zytoplasmatischen GFP Produktion wurden ebenfalls mit JMP Computerprogramm ausgewertet. Mit Hilfe der Varianzanalyse wurden die vier Reagenzien (FuGENE, DOSPER, DOTAP und LIPOFECTAMINE) miteinander verglichen. Als Zielvariable diente der Anteil grün fluoreszierender Zellen in der Gesamtzellpopulation in Prozent.

3. Ergebnisse

3.1 Fibroblastenkultur und Wachstum

Nach enzymatische Verdau der Biopsate, wuchsen die synovialen Fibroblasten in den ersten 10 Tagen inselartig aus den Gewebestücken heraus, und adherierten am Flaschenboden.

Je nach Bedarf für die Versuche wurden die Zellen bis zur fünften Passage subkultiviert. Die Primärkulturen wuchsen unterschiedlich lang, zwischen 4-6 Wochen, abhängig von Gewebeat und – menge. Sobald sich ein einlagiger, dichter Zellrasen bildete wurden die Fibroblasten passagiert.

Die gekauften dermalen Fibroblasten wurden ab der 1. Passage subkultiviert.

3.2 Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung

Die subkultivierten Fibroblasten konnten durch die immunhistochemische Färbung, mit Hilfe von fibroblastenspezifischen Antikörpern AS02 identifiziert werden.

Durch den monoklonalen Antikörper Ki-M6 gegen das Oberflächenantigen CD-68 wurde eine Verunreinigung der synovialen Fibroblasten mit Typ A Synoviozyten wie: Makrophagen, Monozyten ausgeschlossen. Die ungefärbten Negativkontrollen zeigten, daß der Zweitantikörper nicht unspezifisch mit dem Substrat reagiert hat.

3.3 Herstellung von Expressionsvektoren

Die Expressionsvektoren für hGH und EGFP wurden aus 100 ml Maxipräparationen gewonnen. Die DNA- Menge wurde spektrophotometrisch bei 260 nm gemessen:

Folgende Konzentrationen wurden gemessen:

Die E. coli produzierten 1200 µg/ml (420 µg) hGH Plasmid und 1100 µg/ml (220 µg) EGFP-Plasmid.

3.3.1 Darstellung des hGH-Plasmids (pUC-12) mittels Gelelektrophorese

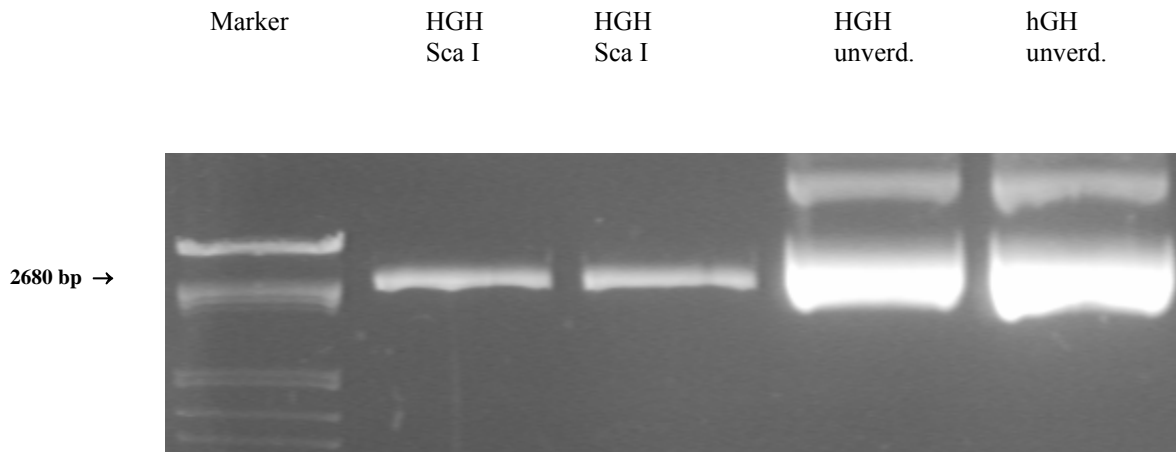


Abbildung 2-a: Darstellung des hGH Plasmids (2680 bp) mittels Gelelektrophorese, je zwei Proben: geschnitten mit Sca I Restriktionsendonuklease und unverdaut als ganzes Plasmid, sowie der DNA Größenmarker.

3.3.2 Darstellung des GFP-Plasmids (pEGFP) mittels Gelelektrophorese

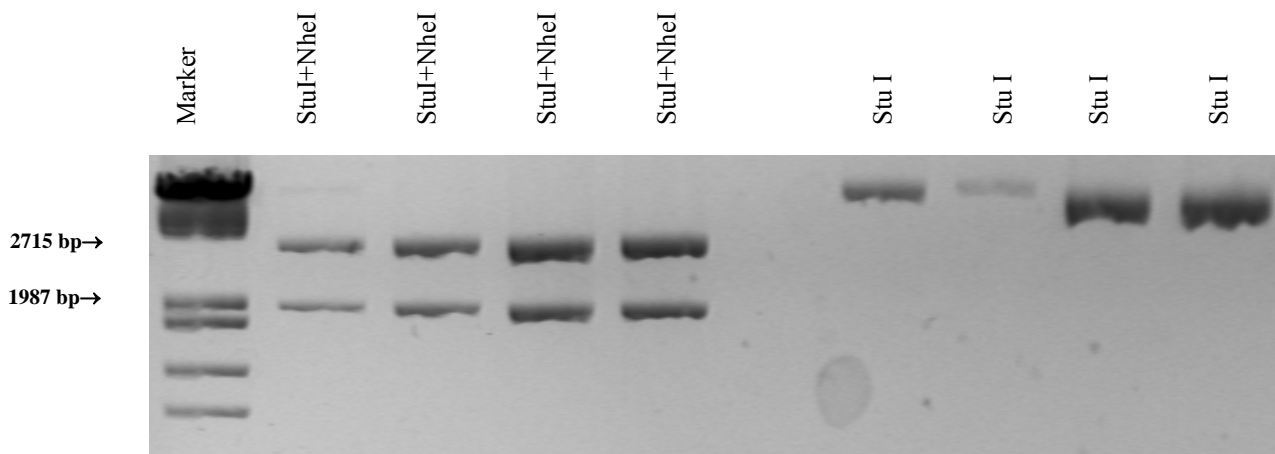


Abbildung 2-b: Darstellung des EGFP Plasmids mittels Gelelektrophorese, geschnitten mit zwei Restriktionsendonukleasen: Stu I und Nhe I, sowie 4 Proben DNA verdaut mit Stu I und DNA Größenmarker.

Durch Restriktionskartierung wurde die Identität der Plasmide geprüft.

Stu I schneidet eine Länge von 2715 bp und Nhe I, 1985 bp.

3.4 Transfektion mit hGH Plasmid

Für das Experiment wurden synoviale Fibroblasten von fünf Patienten und dermale Fibroblasten verwendet.

24 Stunden nach der Lipofektion konnte man folgende Zellveränderungen unter dem Lichtmikroskop beobachten: Bei der Transfektion mit DOTAP sind viele Zellen abgestorben, es zeigten sich viele Zelltrümmer und vergrößerte Zellkerne.

48 Stunden später wurden auch bei der Transfektion mit DOSPER Zelltrümmer sichtbar und die Konfluenz der Fibroblasten hat sich reduziert. Die mit DOTAP transfizierten Zellen waren in der Zahl deutlich reduziert und die meisten Zellmembranen waren nicht mehr intakt. Bei der Transfektion mit FuGENE und LIPOFECTAMINE waren keine Zellveränderungen zu sehen.

72 Stunden nach der Lipofektion mit DOSPER wurde reduzierte Zellzahl beobachtet. Bei DOTAP waren keine Fibroblasten mehr zu sehen, nur noch Zelltrümmer. Nach der Transfektion mit FuGENE und LIPOFECTAMINE waren kaum morphologische Veränderungen zu sehen, nur die Zellzahl war etwas reduziert.

Die unbehandelten Kontrollen zeigten keine Veränderung.

3.5hGH ELISA

Die Auswertung der hGH ELISA erfolgte durch Messung des in Zellüberständen vorhandenen humanen hGH. Die vier verschiedenen Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE wurden miteinander verglichen und die Transfektionseffizienz anhand der hGH Produktion gemessen.

Die Abbildungen **3a – f** zeigen die hGH Ausschüttung (in pg/ml) der Fibroblasten: 24, 48 und 72 Stunden nach Lipofektion mit den verschiedenen Reagenzien bei sechs Patienten.

Nach der Messung wurde aus den Ergebnissen der Mittelwert mit der Standartabweichung bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgenden Tabellen dargestellt.

hGH Ausschüttung: NHDF

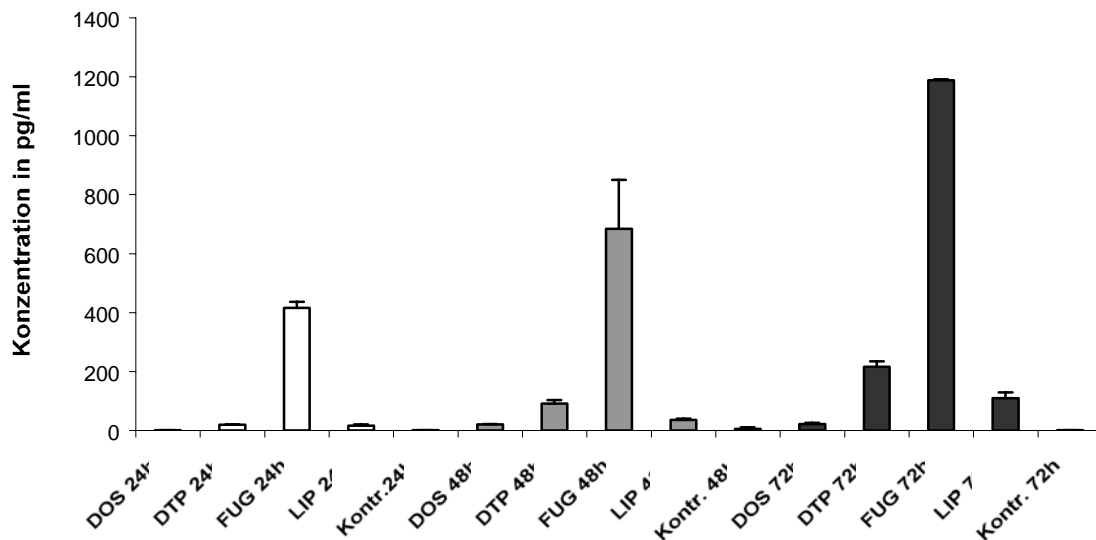


Abbildung 3 a: Darstellung der hGH Produktion in pg/ml und der Standartabweichung der Mittelwerte bei dermalen Fibroblasten (NHDF) in der 9-ten Passage; 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion von hGH Plasmid mit Hilfe der Reagenzien: DOTAP, DOSPER, FuGENE und LIPOFECTAMINE, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen.

Die dermalen Fibroblasten in der 9-ten Passage zeigten bei FuGENE den höchsten hGH Wert. Die hGH Konzentration stieg kontinuierlich von 416 pg/ml 24 Std. nach Transfektion auf 1188 pg/ml nach 72 Std. Die anderen Reagenzien zeigten Werte unter 200 pg/ml.

hGH Ausschüttung: RZK

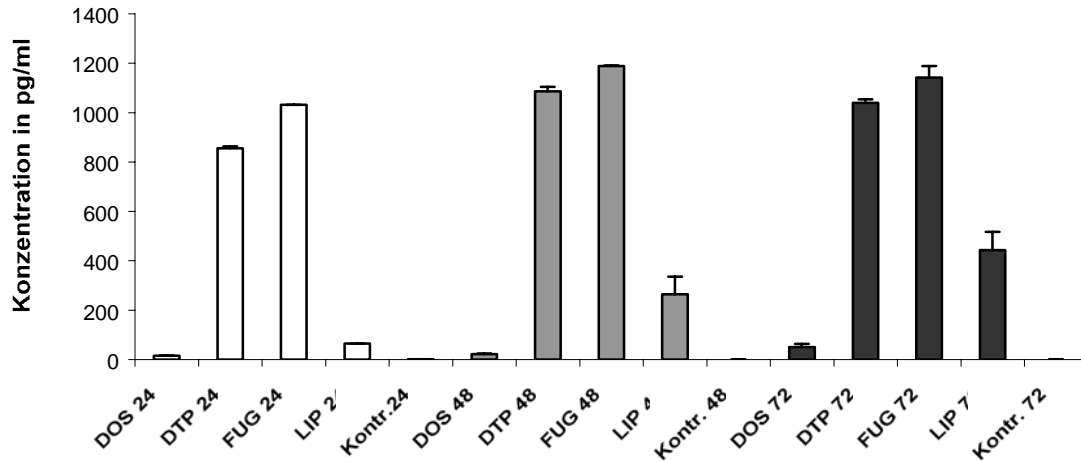


Abbildung 3 b: Darstellung der hGH Ausschüttung (in pg/ml) von synovialen Fibroblasten des Patienten: RZK ; 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion des hGH Plasmids mit Hilfe der Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE. Die unbehandelten Fibroblasten dienen als Kontrolle.

Die Fibroblasten des Patienten RZK in der ersten Passage haben bei FuGENE die höchste hGH Ausschüttung gezeigt (1188 pg/ml) 48 Stunden nach Transfektion. Es folgte DOTAP mit 1010 pg/ml Höchstwert ebenfalls nach 48 Stunden. Bei LIPOFECTAMINE stieg der hGH Wert auf ein Maximum von 420 pg/ml nach 72 Stunden. Nach der Transfektion mit DOSPER stieg die hGH Menge kaum und die unbehandelten Kontrollen zeigten ebenfalls einen Nullwert.

hGH Ausschüttung: PLF

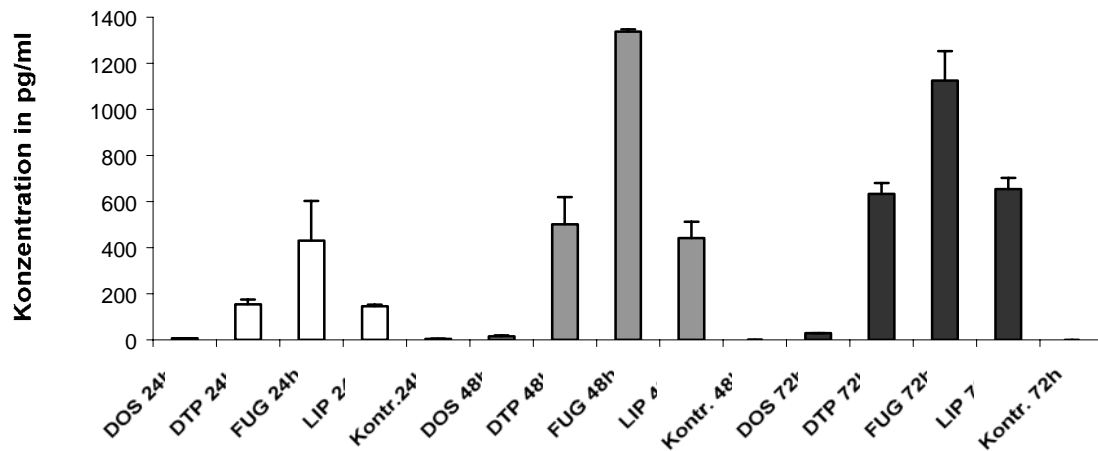


Abbildung 3 c: Darstellung der hGH Ausschüttung (in pg/ml) von synovialen Fibroblasten des Patienten: PLF; 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion von hGH Plasmid mit Hilfe der Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE. Die unbehandelten Fibroblasten dienen als Kontrolle.

Bei den Patienten PLF in der ersten Passage erwies sich deutlich FuGENE als effektivste Transfektionsreagenz mit 1338 pg/ml hGh Maximalwert nach 48 Stunden. Der 72 Stunden-Wert sank auf 1125 pg/ml. DOTAP und LIPOFECTAMINE erreichten die Maximalkonzentration von 650 pg/ml 72 Std. nach Transfektion.

hGH Ausschüttung: HEK

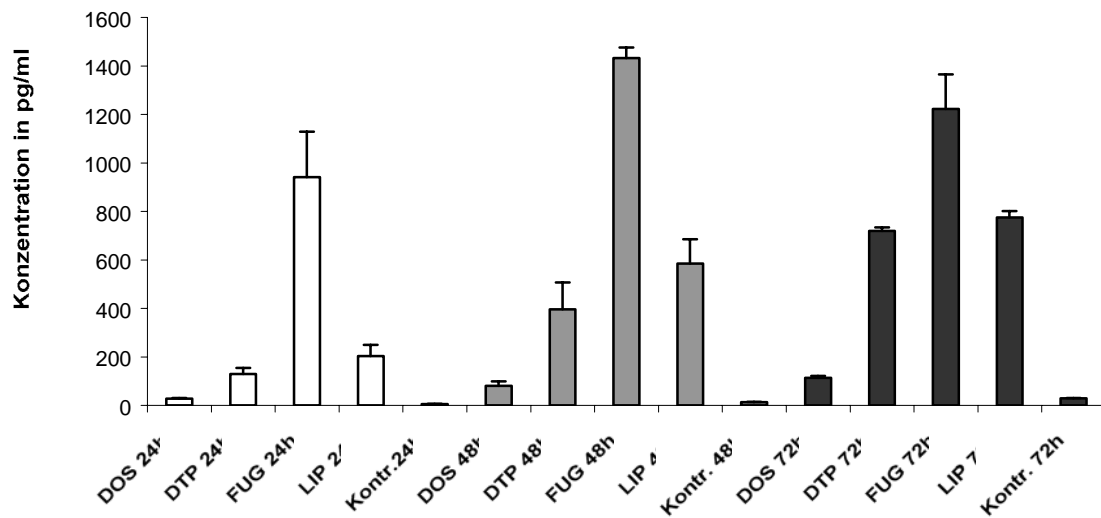


Abbildung 3 d: Darstellung der hGH Ausschüttung (in pg/ml) von synovialen Fibroblasten des Patienten: HEK; 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion von hGH Plasmid mit Hilfe der Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE. Die unbehandelten Fibroblasten dienen als Kontrolle.

Die Messung der Zellüberstände des Patienten HEK in der zweiten Passage zeigten wieder bei FuGENE die höchste Protein Menge: 1433 pg/ml, 48 Std. nach Transfektion. 24 Stunden später wurde weniger hGH (1222 pg/ml) gemessen.

hGH Ausschüttung : GIH

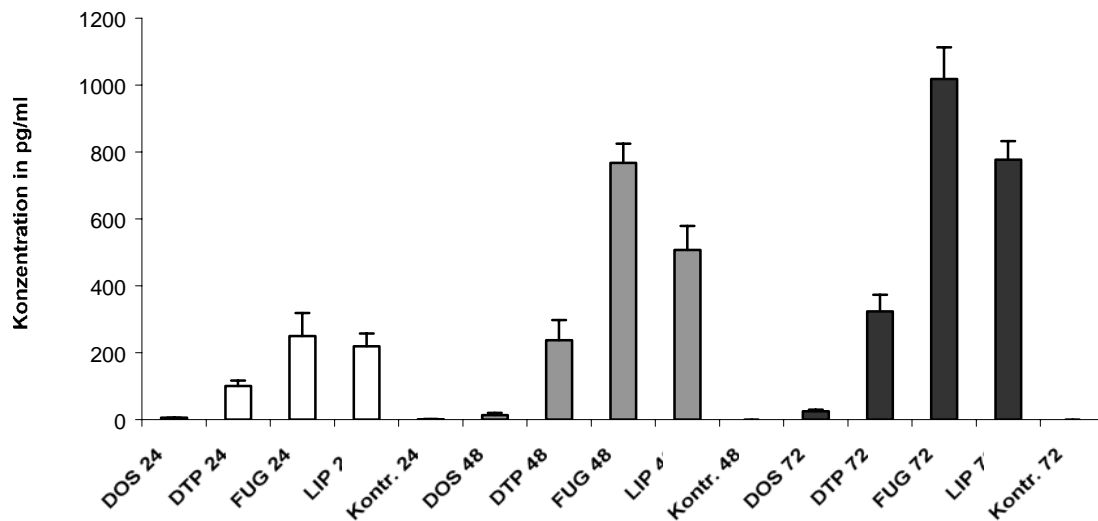


Abbildung 3 e: Darstellung der hGH Ausschüttung (in pg/ml) in synovialen Fibroblasten der Patienten: GIH; 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion von hGH Plasmid mit Hilfe der Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE. Die unbehandelten Fibroblasten dienen als Kontrolle.

Die Zellen des Patienten GIH in der vierten Subkultur produzierten ebenfalls bei FuGENE das meiste Hormon (1018 pg/ml), 72 Stunden nach Lipofektion, gefolgt von LIPOFECTAMINE (777 pg/ml) und DOTAP (323,3 pg/ml). Bei DOSPER wurde sehr wenig hGH produziert und die Kontrollproben zeigten kein Protein in den Zellüberständen.

hGH Ausschüttung: MIR

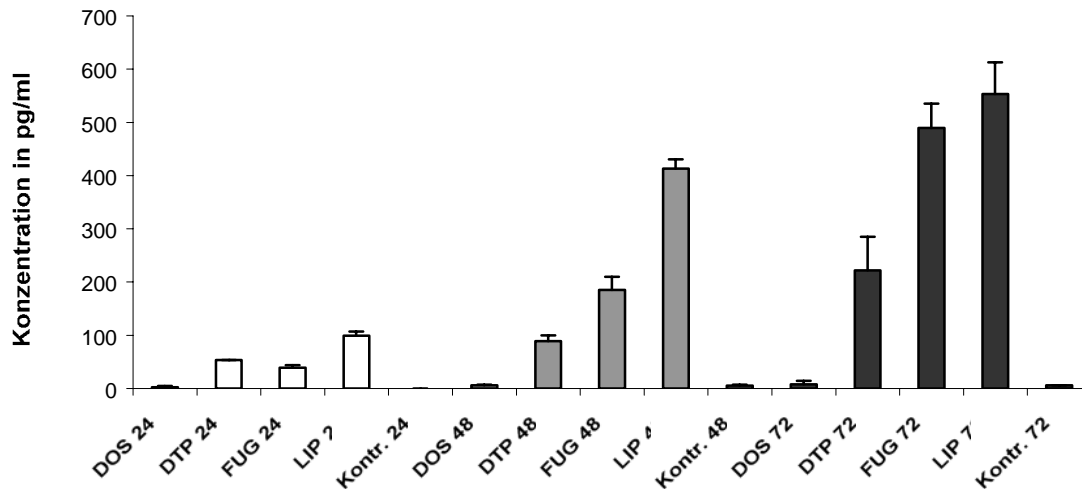


Abbildung 3 f: Darstellung der hGH Ausschüttung (in pg/ml) von synovialen Fibroblasten des Patienten: MIR; 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion von hGH Plasmid mit Hilfe der Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE. Die unbehandelten Fibroblasten dienen als Kontrolle.

Die Zellen des Patienten MIR produzierten insgesamt wenig hGH. Die höchste Protein Expression wurde bei der mit LIPOFECTAMINE transfizierten Zellen erreicht: 553 pg/ml, gefolgt von FuGENE (489 pg/ml) und DOTAP (221 pg/ml). Bei DOSPER war die hGH Menge ebenfalls gering und die Kontrollen zeigten weiterhin keine hGH Produktion.

Anhand der Abbildungen 3a – f, kann man beobachten, dass 24 Stunden nach Gen – Transfer die Hormon Produktion am geringsten war. 48 Stunden nach Transfektion wiesen die mit FuGENE transfizierten Fibroblasten die höchste hGH Produktion (1188 pg/ml) auf. Die 72 Stunden Werte waren kaum geringer: 1142 pg/ml. Für die Lipofektion wurden für alle Zellen, äquivalenten Mengen von DNA und Reagenzien verwendet. Zu 4 µl FuGENE wurden 1,5 µg pUC-12 DNA pipettiert.

Für den Gen-Transfer mit 15 µl DOTAP wurden 2,5 µg DNA verwendet. Die Zellen produzierten: 1085 pg/ml(nach 48 h) und 1040 pg/ml (nach 72 h) hGH. Die mit LIPOFECTAMINE (4 µl) und 1,5 µg pUC-12 DNA transfizierten Fibroblasten

produzierten: 264 pg/ml (nach 48 h) und 443 pg/ml hGH (nach 72 h). Am wenigsten Hormone im Zellüberstand wurden bei der mit DOSPER (4 µl) und 1,5 µg Plasmid transfizierten Zellen gemessen: 22 pg/ml nach 48 Stunden und 51 pg/ml nach 72 Stunden.

In den Zellüberständen der nichttransfizierten Kontrollen wurde kein hGH nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Transfektion mit FuGENE am effektivsten war. Mit einem Höchstwert von 1188 pg/ml nach 48 Stunden, danach folgte DOTAP mit 1085 pg/ml (48 h Wert). Die mit LIPOFECTAMINE transfizierten Fibroblasten exprimierten deutlich weniger hGH: 264 pg/ml. Die geringste Menge an hGH wurde bei DOSPER gemessen: 21,6 pg/ml.

Bei der Lipofektion mit FuGENE und DOTAP wurde die maximale hGH Expression 48 Stunden nach Transfektion gemessen, danach fiel das hGH-Peak ab. Bei der Transfektion mit LIPOFECTAMINE und DOTAP, wurden nach 72 Stunden die maximalwerte erreicht.

3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse des hGH ELISA

Die Ergebnisse der Varianzanalyse zeigten dass die hGH Testergebnisse von den erwarteten Werten nur gering abweichen ($P < 0,0001$). Die Residuen erwiesen eine Normalverteilung und konstante Streuung.

Die verschiedenen Zeitpunkte der Messung zeigten einen Anstieg der hGH Menge in den Zellüberständen: von 24 auf 72 Stunden nach Transfektion.

Außerdem wurden anhand der Mittelwerte und Standardfehler die Reagenzien miteinander verglichen und die mit FuGENE transfizierten Zellen zeigten die höchste hGH Produktion.

In Abbildung **3 g** sind die Gesamtergebnisse der hGH Ausschüttung dargestellt. Die höchste Hormonproduktion wurde mit FuGENE erreicht.

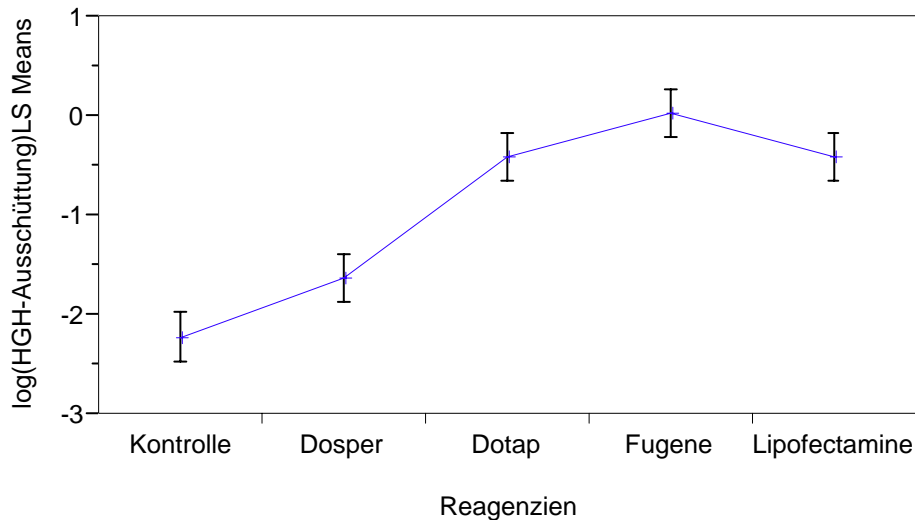


Abbildung 3 g: Dargestellt sind die logarithmischen Gesamtwerte der hGH – Ausschüttung, nach der Transfektion mit den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE im Bezug auf die nichtbehandelten Kontrollen.

3.7 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit GFP transfizierten Zellen

Die adhärenenten Fibroblasten wurden in den 6-Well-Platten zuerst im Durchlicht beobachtet. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit GFP-Filter sichtbar gemacht. Mit DC Digitalkamera wurden die fluoreszierenden Zellen fotografiert und im IM 1000 Computerprogramm gespeichert. Zusätzlich zu den Fluoreszenz-Bildern wurden Durchlichtaufnahmen gemacht um die transfizierten Zellen zuordnen zu können.

Die trypsinisierten Zellen wurden 48 und 72 Stunden nach Transfektion mittels eines Hämocytometers nach Neubauer ausgezählt. Der Anteil grün fluoreszierender Zellen von sechs Patienten wurde in den folgenden Tabellen: **4 a- f** (in %) dargestellt.

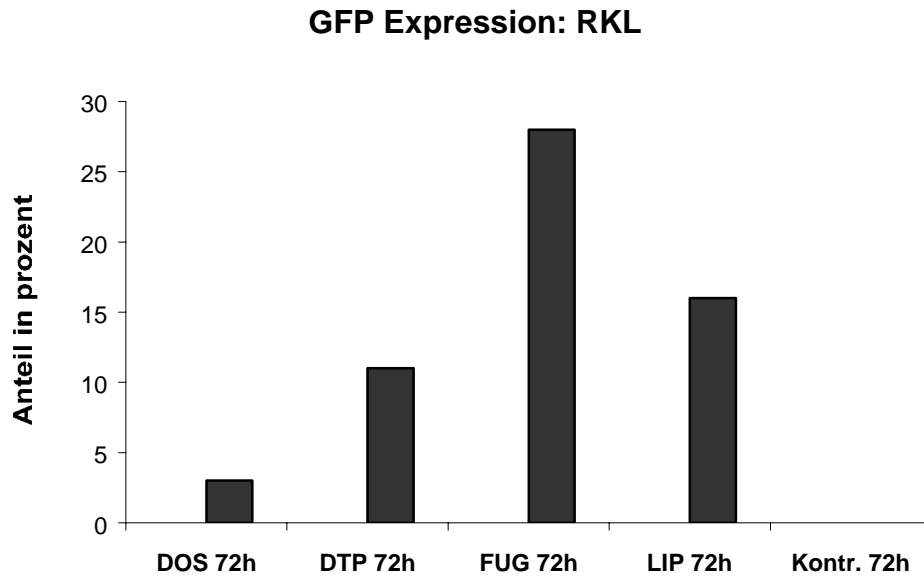


Abbildung 4 a: Darstellung des Anteils der mit GFP (Grün Fluoreszenz Protein) transfizierten Zellen bezogen auf die Gesamtzellpopulation des Patienten RKL; 72 Stunden nach Transfektion mit GFP(Green Fluoreszenz Protein) und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE, LIPOFECTAMINE. Die nichttransfizierte Kontrolle enthielt keine fluoreszierenden Zellen.

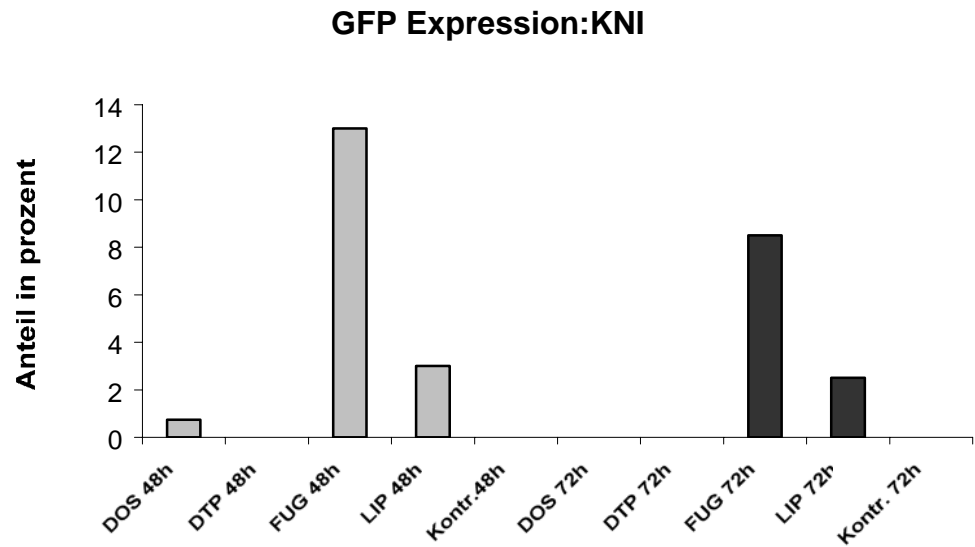


Abbildung 4 b: Darstellung des Anteils der mit GFP (Green Fluoreszenz Protein) transfizierten Zellen des Patienten KNI bezogen auf die Gesamtzellpopulation; 72 Stunden nach Transfektion mit GFP und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE, LIPOFECTAMINE. Die nichtbehandelten Kontrollen zeigten keine Fluoreszenz.

GFP Expression: BRM

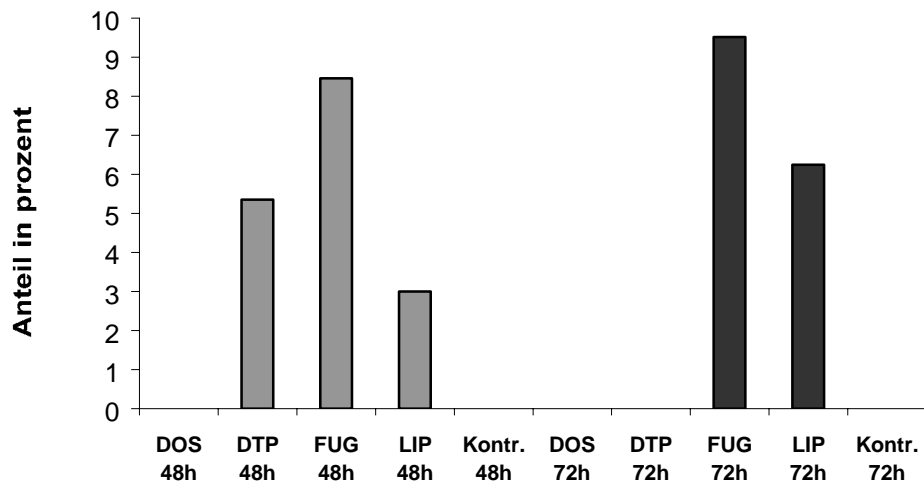


Abbildung 4 c: Darstellung des Anteils grün fluoreszierender Zellen des Patienten BRM, bezogen auf die Gesamtzellpopulation; 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit GFP und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE, LIPOFECTAMINE. Die nichttransfizierten Kontrollen zeigten keine Fluoreszenz

GFP Expression: PLO

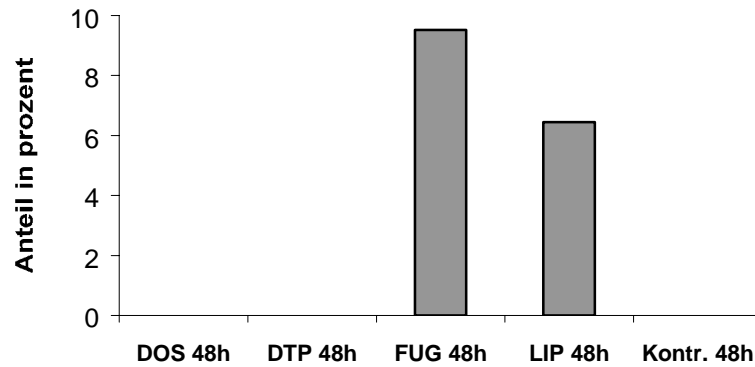


Abbildung 4 d: Darstellung des Anteils grün fluoreszierender Zellen des Patienten PLO, bezogen auf die Gesamtzellpopulation; 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit GFP (Green Fluoreszenz Protein) und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE, LIPOFECTAMINE. Die nichttransfizierten Kontrollen zeigten keine Fluoreszenz. Bei Patient PLO wurde, 72 Stunden nach Transfektion, kein GFP in der Zytoplasma der Fibroblasten beobachtet.

GFP Expression: HEK

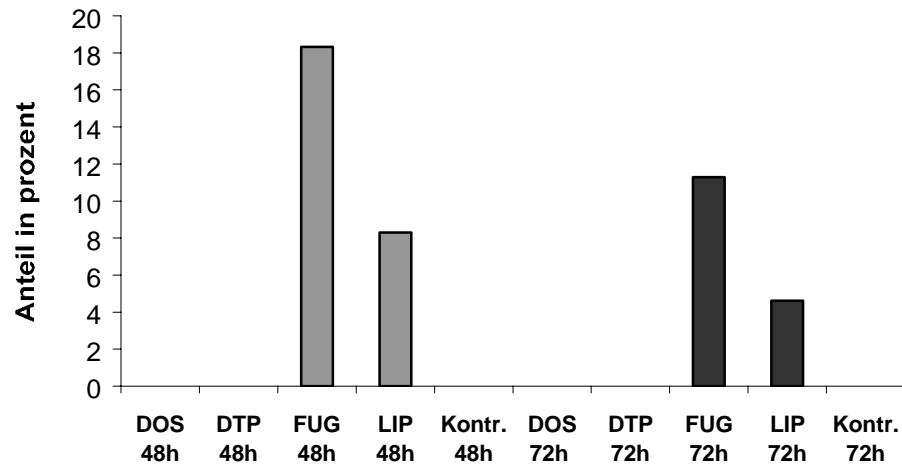


Abbildung 4 e: Darstellung des Anteils grün fluoreszierender Zellen des Patienten HEK in der Gesamtzellpopulation; 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit GFP (Green Fluoreszenz Protein) und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE, LIPOFECTAMINE. Die nichttransfizierten Kontrollen zeigten keine Fluoreszenz.

GFP Expression: GIH

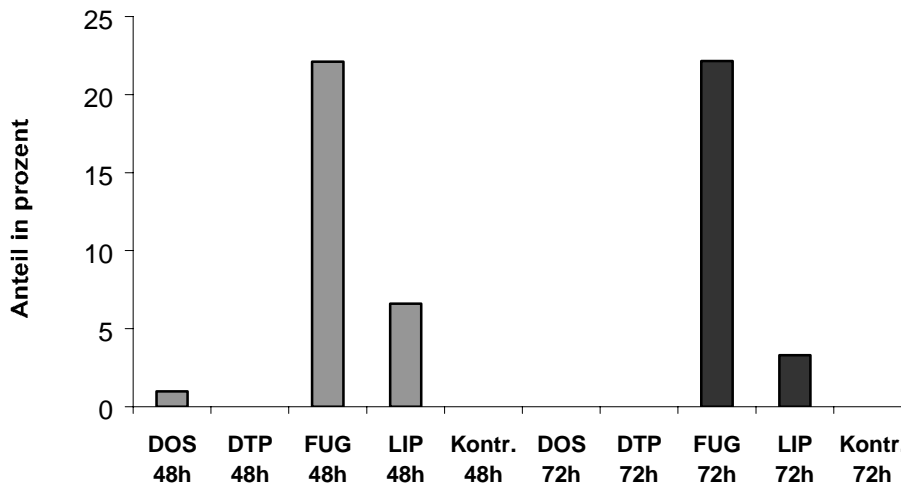


Abbildung 4 f: Darstellung des Anteils grün fluoreszierender Zellen des Patienten GIH in der Gesamtzellpopulation; 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit GFP (Green Fluoreszenz Protein) und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE, LIPOFECTAMINE. Die nichttransfizierten Kontrollen zeigten keine Fluoreszenz.

Zusammenfassend für die sechs Patientenproben anhand der Abbildungen **4a - f** lässt sich feststellen, dass FuGENE die höchste Transfektionseffizienz bezüglich der Anzahl transfizierter Zellen gezeigt hat, im Vergleich zu DOSPER, DOTAP und LIPOFECTAMINE.

Anhand der zytoplasmatischen GFP Produktion wurde die Transfektionseffizienz gemessen. Unter dem Leica Fluoreszenzmikroskop mit GFP Filter wurde der Anteil grün fluoreszierender Zellen bestimmt.

Bei einem Ansatz von 1,5 µg EGFP – DNA und 4 µl FuGENE, ergab sich eine Transfektionseffizienz von 14 %, nach 48 Stunden. 72 Stunden nach der Gen-Transfer stieg die Effizienz auf 16 %.

Für die Transfektion mit LIPOFECTAMINE wurden ebenfalls 1,5 µg DNA und 4 µl Reagenz verwendet. Der Anteil autofluoreszierender Zellen betrug 6 % nach 48 h und 7% nach 72 Stunden.

Obwohl bei der Transfektion mit DOTAP 2,5 µg Plasmid verwendet wurde und 15 µl Reagenz, wurden nur bei zwei Patientenproben von sechs grün fluoreszierende Zellen beobachtet. Der Anteil GFP positiven Zellen betrug 1 %, 48 Stunden nach Transfektion und 3 % nach 72 Stunden.

Die mit 4 µl DOSPER und 1,5 mg EGFP- DNA transfizierten Zellen zeigten wieder sehr niedrige Effizienz. Der Anteil grün fluoreszierender Zellen betrug: 0,35 % (nach 48 h) und 0,56 % nach 72 Stunden.

Bei den nichtbehandelten Kontrollen wurden keine fluoreszierenden Zellen beobachtet. Insgesamt lässt sich feststellen dass, bei allen Reagenzien die 72 Stunden Werte etwas höher lagen als die 48 Stunden Werte.

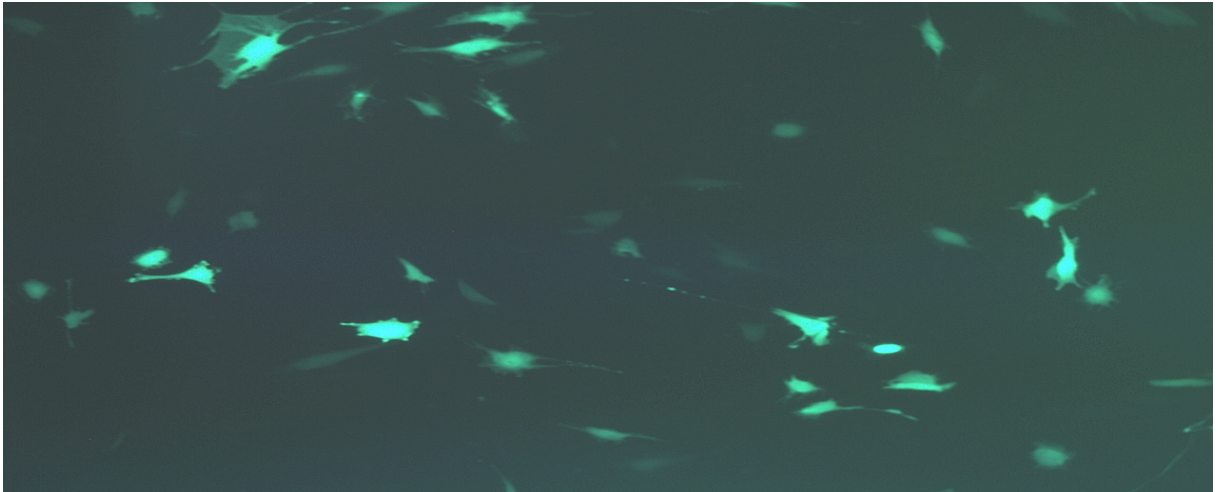


Abb. 5 a: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung GFP positiver Zellen des Patienten KNI in der 4. Passage, 48 h nach Lipofektion mit FuGENE. 10 fache Vergrößerung.

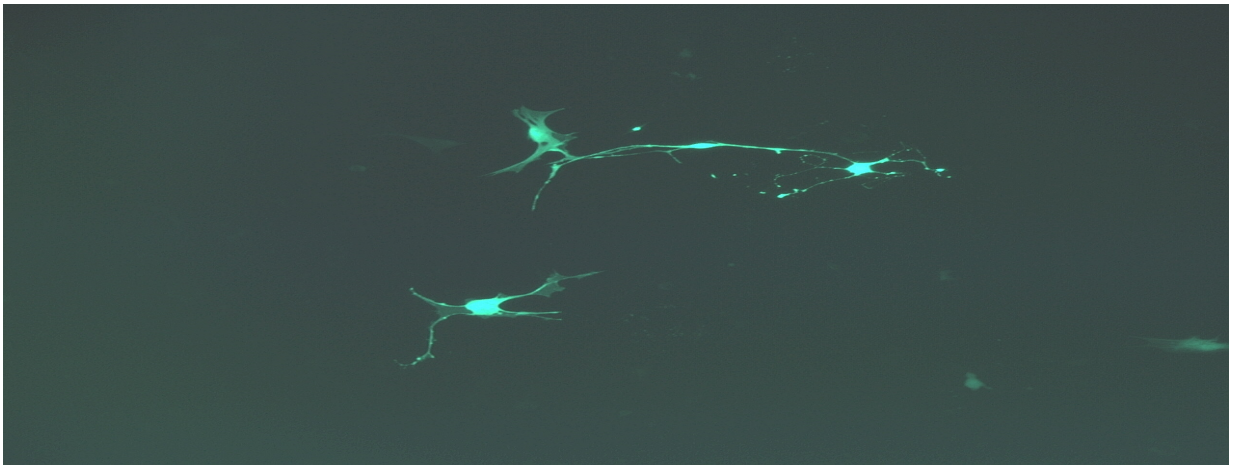


Abb. 5 b: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung GFP positiver Zellen des Patienten GIH in der 3. Passage, 48 h nach Lipofektion mit LIPOFECTAMINE. 10 fache Vergrößerung.



Abb. 5 c: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung GFP positiver Fibroblasten des Patienten BRM 4. Subkultur, 72 h nach der Transfektion mit DOTAP. 10 facher Vergrößerung.

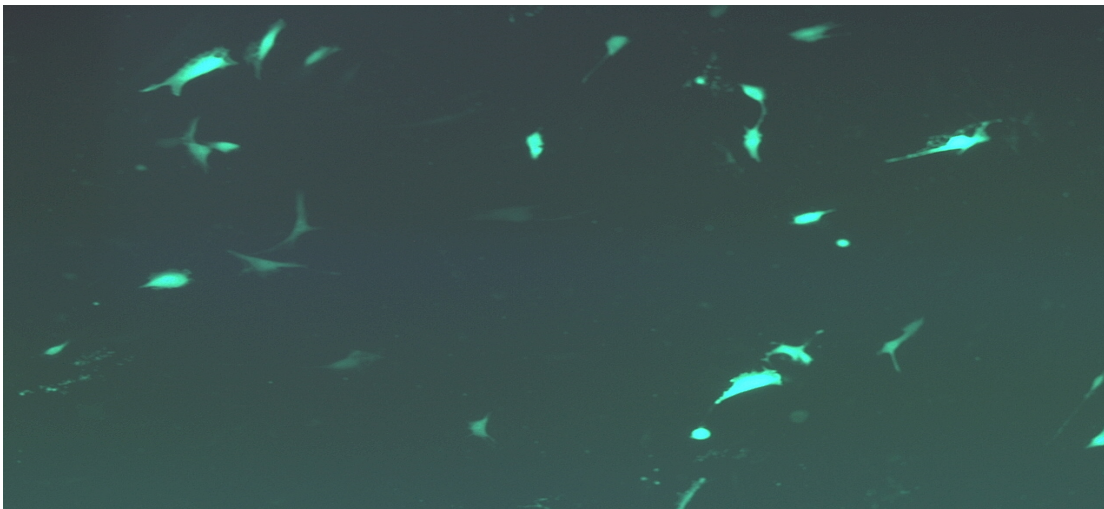


Abb. 5 d: Darstellung GFP positiver Fibroblasten 48 h nach Lipofektion mit FuGENE. Die Transfektionseffizienz betrug 13%. 10 facher Vergrößerung.

Die Abbildungen **5a – d** zeigen, dass die mit FuGENE transfizierten Fibroblasten, deutlich mehr GFP positive Zellen aufweisen als mit LIPOFECTAMINE und DOTAP behandelten Zellkulturen.

4. Diskussion

4.1 Synoviale Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische, entzündliche Erkrankung, die sich vor allem an den Gelenken manifestiert und zu einer fortschreitenden Zerstörung von Gelenkknorpel und knöchernen Gelenkanteilen führt. Pathophysiologisch ist ein hervorstechendes Merkmal der RA die Verbreiterung der Synovialzellschicht mit einer starker Infiltration von Makrophagen. Unterhalb der Synovialzellschicht kommt es zu einer Invasion durch T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen sowie Makrophagen. Ein charakteristisches Merkmal ist die Anwesenheit von zahlreichen aktivierten synovialen Fibroblasten, die entweder ortsständig proliferieren oder vermindert dem apoptotischen Zelltod anheim fallen. Aus diesen Fibroblasten und den mononukleären Zellen bildet sich schließlich das Pannusgewebe, das infiltrierend Knorpel und Knochen zerstört. [Gay et al., 1993; Firestein et al., 1998]. Bei RA findet man im Serum und in der synovialen Flüssigkeit erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-8 oder TNF- α [Feldman et al., 1996; Feldman und Maini, 1999], die an all diesen Vorgängen maßgeblich beteiligt sind [Burmester et al., 2001].

Franz et al. zeigten 1998, dass RA synoviale Fibroblasten vermehrt IL-16 kodierende mRNA transkribieren. Mittels in situ Hybridisierung und in vitro Untersuchungen wurde gezeigt, dass synovialen Fibroblasten von RA Patienten im Vergleich zu Osteoarthrose Patienten, bzw. Patienten mit reaktiven Arthritiden vermehrt IL-16 produzieren [Franz et al., 1998].

IL-16 ist ein chemotaktisch aktives Zytokin, das 1982 erstmals als T-cell specific chemoattractant factor (LCF) beschrieben wurde [Center et al., 1996]. IL-16 wird von CD4⁺ T-Zellen und insbesondere von CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung sezerniert. IL-16 ist ein Ligand des CD4 Rezeptors, das CD4⁺ T-Lymphozyten aktiviert und so bei RA zur massiven T-Zell-Infiltration und chronischen Entzündung im Gelenk beiträgt [Franz et al., 1998]. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass Präinkubation von T-

Zellen mit IL-16 eine spätere T-Zellaktivierung und/oder Proliferation auch hemmen kann [Cruikshank et al., 1996].

IL-16 ist nicht nur für die Chemoattraktion von CD4⁺ Zellen verantwortlich, [Franz et al., 1998] es wirkt auch chemotaktisch auf Makrophagen, induziert dort MHC Klasse II Expression und moduliert die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD25, CD80, und von Zytokinen. Da synoviale Makrophagen als Antigen präsentierende Zellen T-Helferzellen aktivieren können, spielt möglicherweise IL-16 in situ eine wichtige Rolle für die chronisch-entzündliche Matrixdegradation im Verlauf von RA.

Im Gegensatz zu anderen Disziplinen, wie z.B. der Pulmonologie oder Virologie, gibt es zur Bedeutung von IL-16 in RA und der Sekretion von IL-16 durch synoviale Fibroblasten kaum publizierte Daten [Sciaky et al., 2000] . Daher ist es dringend erforderlich die Mechanismen der Aktivierung der Expression von IL-16 im Synovium von RA Patienten zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Expressionsvektoren die Gentransfer Methode in synoviale Fibroblasten durch Transfektion optimiert, um später die Mechanismen der IL-16 Expression bis zur Sekretion zu untersuchen.

Das in den letzten Jahren rasch zunehmende Verständnis intrazellulärer Signalwege und die molekulare Charakterisierung einzelner Komponenten helfen, neue potentielle Angriffspunkte für die therapeutische Intervention zu identifizieren. Erkenntnisse über die IL-16 Expression können die Entwicklung von therapeutischen Strategien zur Behandlung IL-16 abhängiger Entzündungen nicht nur bei RA fördern.

4.2 Zytokinantagonisten in der Therapie der rheumatoiden Arthritis

Bei der unklaren Ätiopathogenese der rheumatoiden Arthritis ist bislang keine kausale Therapie möglich. Mit zunehmenden Verständnis der Endstrecke einer pathogenetischen gelenkdestruierenden Sequenz ist es in den letzten Jahren möglich geworden, neue und effektive Therapieprinzipien für die Behandlung von Patienten mit RA zu entwickeln.

Der Einsatz hochspezifischer Biomoleküle wie monoklonaler Antikörper und molekularbiologisch modifizierter löslicher Zytokinrezeptoren beginnt die Therapie entzündlich rheumatischer Krankheiten zu revolutionieren. Bisher ist nur der TNF-

neutralisierender Antikörper (Infliximab) und ein lösliches Fusionprotein bestehend aus dem p75-TNF-Rezeptor und dem Fc-Teil des menschlichen Immunglobulin G1 (Etanercept) zur Therapie zugelassen. Auch rekombinante IL-1-Rezeptorantagonist (Anakinra) wurde inzwischen zugelassen. Die Antagonisierung weiterer Zytokine verspricht nach tierexperimentellen Untersuchungen und zum Teil schon ersten klinischen Anwendungen ebenfalls wirksam in den Pathomechanismus bestimmter entzündlich-rheumatischen Erkrankungen einzugreifen [Firestein und Paine, 1992; Hanemaaijer et al., 1993; Shingu et al., 1993; Nüßlein, 2001].

Im Vergleich zu den etablierten Basistherapeutika der RA, die in über 50% der Fälle über 5 Jahre zu einem Abbruch wegen Nebenwirkungen oder Ineffizienz führen [Pincus et al., 1992], sind die bisher berichteten unerwünschten Wirkungen der Immunbiologika vergleichsweise als geringer einzustufen. Diese reichen von allergischen Reaktionen an Einstichstellen über anaphylaktische Reaktionen bis hin zu Panzytopenien, neurologischen Symptomen, die der multiple Sklerose ähneln, oder der Induktion von Autoimmunphänomenen, die dem systemischen Lupus erythematodes ähneln.

Proinflammatorische Zytokine bleiben jedoch weiterhin besonders geeignete Zielantigene, um den chronisch perpetuierenden Entzündungsprozess im Gelenk bei RA Patienten zu inhibieren.

4.3 Übertragbarkeit der in vitro Studien auf in vivo Vorgänge

Bei der Entwicklung von Therapien ist es notwendig experimentelle Vorarbeiten wie Zellkulturuntersuchungen durchzuführen. Fibroblasten sind relativ einfach zu kultivieren und über die Jahre haben sich optimale Kulturbedingungen entwickelt, die ermöglichen die Zellen über längere Zeit zu kultivieren. Mit häufiger Passagier-Dauer verändert sich der Phänotyp der Zellen, daher ist der Einsatz von Primärkulturen am idealsten.

Viele Studien zeigten, dass in vitro Untersuchungen eine hohe Aussagekraft haben wenn es darum geht, an humanen Zellen Experimente durchzuführen und auf in vivo Vorgänge durchaus übertragbar sind [Althoff et al., 1988]. Die Ergebnisse werden nicht durch unterschiedliche Umwelteinflüsse verfälscht und die Patienten werden dabei nicht belastet.

Zusätzliche Unterschiede bestehen darin, dass in vitro immunologische Reaktionen, Verstoffwechslung von Pharmaka, hormonelle Einflüsse sowie eine Vaskularisation fehlen. Aufgrund der fehlenden organismusbedingten in vivo Verhältnisse ist es notwendig nach zellexperimentellen Versuchen randomisierte klinische Studien durchzuführen.

4.4 Fibroblastenkultur und Wachstum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Patientengewebe unter sterilen Bedingungen verarbeitet, in Zellkulturflaschen überführt und mit Nährmedium versetzt.

Die dermalen und synovialen Fibroblasten wuchsen inselartig aus den Gewebestücken heraus und adherierten am Flaschenboden. Die Gewebestücke beinhalten möglicherweise Wachstumsfaktoren, die im Nährmedium nicht enthalten sind und locken dadurch die Zellen an. Nach dem Passagieren wuchsen die Zellen einlagig am Flaschenboden entlang, und nach Erreichen der Konfluenz konnte ein mehrlagiges Wachsen beobachtet werden.

Erfahrungsgemäß ließen sich nach dem ersten Subkultivieren der Fibroblasten keine Monozyten, Makrophagen nachweisen, da sie eine kurze Lebensdauer von 5 –7 Tagen haben. Um eine reine Fibroblastenkultur zu gewährleisten wurden vor dem Einsatz der Kulturen im Experiment eine immunhistochemische Zelltypcharakterisierung vorgenommen. Dem Kulturmedium wurde zwei Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) und Antimykotika (Fungizone) zugefügt um ein Überwachsen der Kulturen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden.

Aus ethischen Gründen und wegen Infektionsgefahr wurde zur Zellzucht fötales Kälberserum statt humanem Serum eingesetzt.

Die Fibroblasten wurden für die Transfektionversuche mit DNA und verschiedene Reagenzien verwendet.

4.5 Immunhistochemische Zelltypcharakterisierung

Vor der Durchführung der Experimente wurden die Fibroblasten immunhistochemisch auf ihren Zelltyp untersucht, um eine Verunreinigung mit Monozyten und Makrophagen auszuschließen. Es wurden zwei Antikörper eingesetzt: Zum einen der fibroblastenspezifische AS02 und zum anderen das gegen Monozyten/Makrophagen (CD68) gerichtete Ki-M6 Antikörper [Kreipe et al., 1986].

Der hochspezifische Antikörper AS02 gehört zu der Immunglobulinklasse G (aus Mäusen) und bindet an das membranständige Protein der humanen Fibroblasten. Der monoklonale Antikörper Ki-M6 (Maus IgG1) gegen humane Monozyten/Makrophagen erkennt CD68 auf Membranen.

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten kultiviert (4×10^3 Zellen/Well) um sie optimal voneinander unterscheiden zu können.

Der Versuch wurde mit DAKO-Kit durchgeführt. Die immunhistochemisch als CD68-negativ nachgewiesenen Zellen, d.h. die reinen Fibroblastenkulturen wurden für weitere Versuche verwendet.

4.6 Herstellung von Expressionsvektoren

4.6.1 Klonierung von Expressionsvektoren

Für die Transfektion der Fibroblasten wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren hergestellt. Zum einen ein Vektor in pUC-12 mit dem humanen hGH-Gen unter Kontrolle des RSV Promotors, zum anderen ein Plasmid das ein Gen enthält (EGFP), welches für GFP (Green Fluoreszent Protein) kodiert und vom CMV Promotor gesteuert wird.

Die Plasmide wurden in *E. Coli* (K12 Derivate) eingeschleust. Die transformierten Bakterien vermehrten sich in 400 ml Glasflaschen die ad 200 ml mit LB Medium gefüllt waren und über Nacht auf dem Flachbettrüttler standen.

4.6.2 Plasmid DNA Isolierung

Nach der Anleitung des EndoFree Plasmid Protokolls der Fa. Qiagen wurde die DNA aus den Bakterien isoliert. Die Plasmid Reinigung mit dem Qiagen Purification Kit, ist eine schnelle und einfache Methode, hohe DNA Mengen (500 µg) mit Hilfe von Qiagen Harzen innerhalb von wenigen Stunden zu isolieren.

Zuerst wurden die Bakterien durch die Zugabe von alkalischem Puffer lysiert. Durch Zugabe von saurem Acetatpuffer flockte die bakterielle DNA und Eiweiß aus.

Das Präzipitat wurde durch QIAfilter abgetrennt und die DNA wurde mit Elutionspuffer aus der Säulenmatrix herausgelöst. Anschließend mit Isopropanol versetzt, zentrifugiert, mit Ethanol (70%) versetzt und Luftgetrocknet. Vor der Messung wurde die DNA mit TE-Puffer verdünnt.

Die Plasmid - DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt bei 260 nm. Es wurde eine DNA Menge von: 420 µg hGH - Plasmid und 220 µg EGFP-Plasmid gemessen, bei einer max. möglichen DNA-Gewinnung von 500 µg.

Für die Transfektionsversuche der Fibroblasten wurden äquivalente Mengen DNA (1,5 bzw. 2,5 µg) und Reagenzien eingesetzt um eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Herstellung und Transfektion von Expressionsvektoren ist notwendig, um Signaltransduktionswege von Zytokinen (IL-16) in synoviale Fibroblasten zu untersuchen.

4.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid – Fluoreszenz ist eine schnelle und effektive Methode um DNA – Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Ethidiumbromid (EtBr) bindet an die DNA – Moleküle und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar. Anhand der mitlaufenden DNA-Größenmarker (100 bp, bzw. λ DNA + Hind III + Eco RI), kann man prüfen ob die richtigen Produkte dargestellt wurden.

Zur Versuchsdurchführung wurden Handschuhe aus Nitril verwendet, da EtBr innerhalb weniger Sekunden durch Latexhandschuhe diffundiert und dort neurotoxisch, bzw. mutagen wirken kann. Ein weiterer Nachteil der Methode ist daß schwache

Fluoreszenz-Signale durch die Auflösung der Videokamera, PC und Drucker verloren gehen können.

Die mit Restriktionsendonukleasen verdauten DNA-Fragmente wurden identifiziert und fotografisch festgehalten.

4.8 Transfektion mit hGH und EGFP Plasmid

Die Gentherapie als neue Behandlungsmethode wird in den nächsten Jahren einen wichtigen Platz in der Medizin einnehmen. Bei der Gentherapie wird genetisches Material in die Zellen eingebracht wodurch die Produktion eines Wirkstoffes (Protein) an einem bestimmten Ort des Körpers erreicht werden kann [Hallek et al., 2001].

Die Zell Transfektion mit DNA ist ein wichtiger Bestandteil der Gen-Forschung um Genexpression, - funktion und deren Regulation zu untersuchen. Optimale Gentransfermethoden sind notwendig, um die komplexen intrazellulären Signaltransduktionsketten proinflammatorischer Zytokine zu erforschen, sowie ihre pathogenetische Beteiligungen an chronisch-entzündlichen Erkrankungen zu untersuchen. Die gezielt Unterbrechung von Signaltransduktionsketten ermöglicht, selektiv bestimmte Zytokineffekte, wie die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren , zu verhindern [Nüblein, 2001].

Obwohl es eine Reihe von Methoden gibt um DNA in eukaryontischen Zellen einzubringen, haben in den letzten Jahren viele Forschungsgruppen versucht eine effiziente nicht – virale Gentransfer - Methode zu entwickeln [Hellgren et al., 2000]. Die virale Gentransfer-Methode ist zwar hoch effizient, auch bei Teilungsinaktiven Zellen, [Dinser et al., 2001; A del Vecchio et al., 2001] aber sie kann auch gefährlich sein. Viele Studien zeigten, dass adenovirale Vektoren Entzündungsprozesse [Evans et al., 1999] induzieren, was gerade bei RA von Nachteil ist. Ebenfalls virale Vektoren mit IL-1 β -Gen haben Synovitis und Pannus induziert mit Zerstörung des Knorpels, sowie systemischen Reaktionen wie Fieber und Gewichtsverlust [Evans et al., 1999]. Die virale Transduktion des TGF- β Gens verursachte massive Fibrose. Weiterer Nachteil viraler Vektoren ist ihre mutagene Eigenschaft. Sie integrieren Virale DNA ins menschliche Genom (Retro- und Adenoassoziierte Virusvektoren), außerdem besteht die

Rekombinationsgefahr mit anderen wild-typ Viren. Sie nehmen nur geringe Mengen an DNA auf und sind kompliziert und teuer herzustellen [Hellgren et al., 2000].

Vorteil der Gen – Transfer – Methode mit nichtviralen Vektoren ist, daß Plasmide leicht herzustellen und ungefährlich sind. Sie werden nicht ins Genom integriert und eine zeigen niedrige Immunogenität. Außerdem liefern sie uneingeschränkte DNA Mengen [Campeau et al., 2001]. Nachteil der Transfektion mit Plasmid DNA ist die geringere Transfektionseffizienz im Vergleich mit viralen Systemen [Hallek et al., 2001].

In den letzten zehn Jahren, hat sich eine effektive, nichtvirale Methode etabliert, nämlich die liposomale Transfektion oder Lipofektion. Unter vorsichtigem Optimieren der Konditionen, ist Lipofektion hoch effizient und viel leichter zu handhaben als frühere Methoden wie : Kopräzipitation der DNA mit Kalziumphosphat oder anderen bivalenten Kationen, Mikroinjektion, oder Elektroporation [Dinser et al., 2001].

Ziel dieser Arbeit war es Gene durch Lipofektion, effektiv in Fibroblasten einzubringen. Dazu wurden verschiedene Transfektionsreagenzien (FuGENE6, DOSPER, DOTAP und LIPOFECTAMINE) miteinander verglichen um das effizienteste Reagenz herauszufinden. Außerdem wurde eine optimale Plasmid-/Reagenzmenge bestimmt um die Transfektionseffizienz zu erhöhen.

Die Ergebnisse vieler Studien zeigten, daß bei verschiedenen Zellreihen, mit FuGENE sehr erfolgreich transfiziert wurde [Kurachi et al., 1998; Ritter 1998; Subramanian et al., 2001; Madry und Trippel, 2000; Hellgreen et al., 2000].

In dieser Arbeit wurde anhand der Proteinexpression der Fibroblasten und der darauffolgenden Messung in den Zellüberständen, bzw. der Beobachtung am Fluoreszenzmikroskop gezeigt, daß mit FuGENE am effektivsten transfiziert wurde.

4.9 hGH ELISA

hGH – ELISA ist eine präzise Methode um kleinste Mengen hGH (5 µg/ml) in Zellüberständen nachzuweisen. Vorteile dieser Nachweismethode sind, dass die eingefrorenen Zellüberstände (bei –70°C) können auch zu späteren Zeitpunkten mit hoher Sensitivität gemessen werden können. Die sechs Patientenproben wurden jeweils zweimal aufgetragen um Fehler auszuschließen.

Der Boden der Mikrotiterplatte ist mit Antikörpern (Ak) gegen hGH beschichtet. Daran bindet das Hormon spezifisch. Nach dem sog. Sandwich Prinzip, dem hGH - Antikörper - Komplex, folgten mit DIG (Digoxigenin) gekennzeichnete anti-hGH Serumantikörper, danach ein an Peroxidase gekoppeltes Ak gegen DIG. Anschließend wurde ein Substrat der Peroxidase hinzugefügt, das durch die Enzym - Substrat - Reaktion eine Farbänderung zeigt. Die photometrische Messung wurde bei 405 nm am ELISA Reader durchgeführt.

Am meisten hGH (1120 pg/ml) produzierten die mit FuGENE 6 (4 µl/Well) und 1,5 µg DNA transfizierten Fibroblasten. Danach folgten die mit DOTAP (15 µl) und 2,5 µg DNA transfizierten Zellen (990 pg/ml). In weniger als 24 Stunden nach der Transfektion mit DOTAP wurden morphologische Veränderungen bei den Fibroblasten beobachtet: Zellmembranzerstörung, Zellkernvergrößerung. Es waren viele Zelltrümmer zu sehen, v.a. nach 72 Stunden. Es ist wahrscheinlich auf die Zytotoxizität des Reagenzes zurückzuführen. Trotz der zelltoxischen Wirkungen des Reagenzes, wurden hohe hGH Mengen gemessen, da das Hormon nach der Expression in das Zellmedium sekretiert wurde und in den Zellüberständen der abgestorbenen Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die mit LIPOFECTAMINE (4 µl) und 1,5 µg Plasmid - DNA transfizierten Zellen zeigten keine morphologische Veränderung und produzierten deutlich weniger hGH (560 pg/ml) als FugENE 6 und DOTAP.

Die geringste Protein Sekretion wurde bei der Lipofekton mit DOSPER (4 µl) und 1,5 µg DNA Komplex gemessen (22 pg/ml). Die mit DOSPER transfizierten Fibroblasten zeigten 48 Stunden nach der Transfektion, ebenfalls morphologische Veränderungen, was auch auf die Zelltoxizität des Reagenzes zurückzuführen ist.

Ergebnisse der statistischen Varianzanalyse zeigten auch, dass die zwischen 24 auf 72 Stunden, gemessene hGH Menge kontinuierlich anstieg. Dies ist mit der Anhäufung des Proteins in den Zellüberständen zu erklären ist.

4.10 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP – Produktion

Die Fibroblasten von sechs Patienten wurden ebenfalls durch Lipofektion, mit den Reagenzien (DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE) und EGFP – DNA transfiziert.

Die Versuche wurden unter äquivalenten Bedingungen wie bei der Transfektion mit hGH durchgeführt mit gleichen DNA und Reagenz-Mengen (siehe oben). Der Unterschied lag in der Nachweismethode, da GFP (Green Fluorescent Protein) im Zytoplasma produziert wird und die Proteinexpression durch Visualisierung mit dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen wurde. Die transfizierten Zellen wurden vom Flaschenboden abgelöst (48 und 72 Stunden nach Gentransfer), gewaschen, zentrifugiert und jeweils 10 µl Zellsuspension auf das Hämozytometer aufgetragen. Es wurde der Anteil GFP positiver Zellen (in %) in der Gesamtzellpopulation bestimmt. Nachteil der Methode ist, dass durch die Behandlung mit Trypsin (EDTA), die Zellen an ihrer Autofluoreszenz verlieren. Vorteil ist, daß durch das Auszählen der Zellen mit dem Hämozytometer der Anteil GFP positiver Zellen in der Gesamtzellpopulation genauer bestimmt werden kann.

Die Zellen wurden zuerst mit Durchlicht beobachtet, bei 455 nm Wellenlänge und anschließend wurden die autofluoreszierenden Zellen mit GFP – Filter bei 500 nm sichtbar gemacht. Die Bilder wurden mit DC (Digitalkamera) aufgenommen und mit Hilfe des IM Auswertprogramm's bearbeitet.

Die Transfektion mit EGFP – DNA und den Reagenzien: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE wurde mit äquivalenten DNA- und Reagenzmengen durchgeführt wie bei der Transfektion mit hGH.

Die Ergebnisse der sechs Patientenproben zeigten auch hier, dass die mit FuGENE behandelten Fibroblasten mehr GFP produzierten bei gleicher transfizierter DNA – Menge. Der Anteil GFP positiver Zellen betrug 72 Stunden nach Transfektion 16 %, und 14% nach 48 Stunden. Im Gegensatz zur Lipofektion mit DOTAP, zeigte FuGENE geringe Zytotoxizität.

Die mit 15 µl DOTAP und 2,5 µg EGFP – Plasmid transfizierten Zellen zeigten starke morphologische Veränderungen wie Zellkernvergrößerung, Membranzerstörung und Reduktion der Zellzahl. Nur bei zwei Patientenproben von sechs, wurden GFP positive

Fibroblasten beobachtet. Daraus ergab sich eine Gesamteffizienz von 1% nach 48 h und 3% nach 72 h. Dies spricht für die hohe Zelltoxizität von DOTAP.

An zweiter Stelle nach FuGENE, folgten LIPOFECTAMINE (4 µl) und 1,5 µg DNA – Komplex mit sehr geringer Zytotoxizität und einer Transfektionseffizienz von 6% nach 48 h und 7% nach 72 h. Der Vorteil der Reagenzien FuGENE und LIPOFECTAMINE ist, daß man auch unter serumfreien Bedingungen wirksam transfizieren kann.

Ähnlich wie bei der Transfektion mit pUC-12 Plasmid, zeigte DOSPER die geringste Transfektionseffizienz von 0,35 % nach 48 h und 0,56% nach 72 h. DOSPER zeigt geringere Zytotoxizität als DOTAP, aber es sind bereits nach 48 h morphologische Veränderungen und eine reduzierte Zellzahl zu sehen. Die Kontrollen zeigten keine Autofluoreszenz.

4.11 Conclusio

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Methode der Lipofektion synoviale Fibroblasten erfolgreich zu transfizieren. Dazu wurden vier Transfektionsreagenzien getestet und miteinander verglichen: DOSPER, DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE.

Die Versuche mit hGH –Gentransfer zeigten, daß man, abgesehen von DOSPER, mit den drei Reagenzien (DOTAP, FuGENE und LIPOFECTAMINE), synoviale Fibroblasten erfolgreich transfizieren kann. Nachteil von DOTAP war die hohe Zytotoxizität. Trotz hoher Zelltoxizität bei der Transfektion mit DOTAP wurden hohe Mengen hGH's in den Zellüberständen gemessen. Lichtmikroskopisch jedoch wurden stark geschädigte Fibroblasten gesichtet. 72 Stunden nach der Transfektion waren nur noch Zelltrümmer sichtbar. Dies ist vermutlich auf die zytotoxische Wirkung von DOTAP zurückzuführen.

LIPOFECTAMINE zeigte geringe Zelltoxizität und gute Transfektionseffizienz.

Die Ergebnisse der statistischen Varianzanalyse bestätigten, dass mit FuGENE am erfolgreichsten transfiziert wurde. Bei der optimalen Reagenz (4 µl) und DNA (1,5 µg) Menge wurde die höchste hGH Expression (1188 pg/ml nach 48 h) gemessen.

Die Experimente mit EGFP – Gentransfer mittels Lipofektion wurden unter äquivalenten Bedingungen durchgeführt. Der anschließende GFP (Green Fluoreszenz

Protein) Nachweis im Zytoplasma der Fibroblasten zeigte ebenfalls bei FuGENE die höchste Effizienz.

Es ist allerdings schwierig die Ergebnisse der Transfektion mittels zwei verschiedener Expressionsvektoren mit der Nachweismethode der hGH Expression, sowie der zytoplasmatischen GFP Produktion mittels Fluoreszenzmikroskop zu vergleichen.

Bei der Transfektion mit DOTAP/EGFP Komplex, sind viele Fibroblasten zerstört worden, deshalb war der zytoplasmatische GFP Nachweis kaum möglich. Im Gegensatz dazu wurden bei der Lipofektion mit hGH Plasmid, nach 48 und 72 Stunden hohe Mengen von humanem Growth Hormon in den Zellüberständen der morphologisch veränderten Fibroblasten gemessen. Die Transfektion mit LIPOFECTAMINE zeigte mäßigen Transfektionserfolg (6%) und geringe Zytotoxizität. DOSPER ist wegen insuffizienten DNA – Transfer's in den Zellen, nicht zu empfehlen.

Beide Verfahren haben bewiesen, daß FuGENE mit Abstand der effektivste Transfektionsreagenz ist, zeigt geringe Zytotoxizität, leicht optimierbar und anwendbar auch in serumfreien Medien.

Die Liposomen vermittelte Transfektion hat sich ebenfalls als äußerst effiziente, leicht reproduzierbare und ungefährliche Gen – Transfer – Methode bewährt.

Die Lipofektion mit FuGENE und DNA Komplex eignet sich daher als hoch effiziente Transfektionsmethode für synoviale Fibroblasten. Dieses Gentransfer – Verfahren ist empfehlenswert und kann nützlich sein für weitere Forschungszwecke. Beispielsweise wie IL-16 in Fibroblasten anzureichern und dadurch die Mechanismen der Translation bzw. das Processing zur Sekretion zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Hauptziel dieser Arbeit war eine effiziente und im Rahmen der Zulassung des Labors als S1 Gentechniklabor sichere Gentransfer – Methode mit Hilfe von Transfektionsreagenzien zu etablieren um möglichst viel DNA in synovialen Fibroblasten anzureichern. Ein langfristiges Ziel ist es, mit erfolgreichen und gut etablierten Transfektionsmethoden die Mechanismen der IL-16 Expression und das Prozessing zur Sekretion zu erforschen. Dies kann unter anderem zur Therapie der rheumatoiden Arthritis beitragen.

Im Verlaufe der Experimente wurde das Transfektionsreagenz FuGENE mit drei weiteren Reagenzien DOSPER, DOTAP und LIPOFECTAMINE verglichen um das effizienteste Verfahren herauszufinden. Ein weiteres Ziel der Versuche war es eine optimale DNA und Reagenzmenge für die Lipofektion zu bestimmen.

Für diese Studie wurden neonatale dermale und adulte synoviale Fibroblasten eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war es leider nicht möglich nur Gewebe von Rheumapatienten zu gewinnen. Die Biopsate stammten von insgesamt acht Patienten mit verschiedenen Arthritiden, wie Psoriasisarthritis, Arthrose und ein Patient mit RA.

Als Vektoren dienten zwei verschiedene Plasmide. Zum einen das pUC-12 Plasmid, mit dem hGH Gen unter Kontrolle des RSV Promotors und zum anderen ein Plasmid mit EGFP Gen, welches für das Green Fluoreszenz Protein (GFP) kodiert und vom CMV Promotor gesteuert wird.

Die in vitro Transfektion der Zellen mit dem DNA Reagenzkomplex wurde unter sterilen und äquivalenten Bedingungen durchgeführt.

In den Zellüberständen vorhandenes hGH wurde durch ELISA nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass am meisten humanes Growth Hormon bei der Transfektion mit FuGENE exprimiert wurde.

Bei der Lipofektion des EGFP Plasmids, wurde die darauffolgende zytoplasmatische GFP Expression mit Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Ergebnisse zeigten hier auch, dass die mit FuGENE transfizierten Zellen den höchsten Anteil an GFP positiven Fibroblasten hatten. Das Transfektionsreagenz FuGENE ist kaum zytotoxisch. Im Gegensatz zu anderen Reagenzien wie DOSPER und DOTAP, wiesen die Zellen

beim Gentransfer mit FuGENE und LIPOFECTAMINE keine morphologischen Veränderungen auf.

Diese Studie demonstrierte, dass FuGENE ein höchst effizientes Reagenz ist um synoviale Fibroblasten erfolgreich zu transfizieren und eignet sich dadurch zur Erforschung der IL-16 Expression und Sekretion.

6. Literaturverzeichnis

1. **A Del Vecchio, M., Georgescu, H.I., McCormack, J.E., Robbins, P.D., Evans, C.H.** (2001): Approaches to enhancing the retroviral transduction of human synoviozytes. *Arthritis Research* 3:259-263.
2. **Amiel, C., Darcissac, E., Truong, M.J., Dewulf, J., Loyens, M., Mouton, Y., Capron, N., Bahr, G.M.** (1999): Interleukin 16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects, and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J Infect Dis* 179: 83-91.
3. **Althoff, J., Quint, J., Richter, K.D., Jones, D.B.** (1988): Osteoblasten- und Knochenorgankulturen unter in vivo Bedingungen. *Z Zahnärztl Impl* 4: 282-285.
4. **Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Lian, M.H., Luthra, H.S., Medsger, T.A. Jr, Mitchell, D.M., Neustadt, D.H., Pinals, R.S., Schaller, J.G., Scharp J.T., Wilder R.L., Hunder G.G.,** (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-324.
5. **Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K., Kurth, R.** (1995): HIV Suppression by Interleukin 16. *Nature* 381: 29-30.
6. **Baier, M., Bannert, N., Werner, A., Lang, K., Kurth, R.** (1997): Molecular cloning, sequence, expression and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5273-5277.
7. **Baier, M.** (1999): GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1541
8. **Bellini, A., Yoshimura, H., Vitori, E., Marini, M., Mattoli, S.** (1993): Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 92: 412.
9. **Bely, M., Apathy. A., Beke-Martos, E.** (1969): Cardiac changes in RA. *Acta Morphol Hun* 40; 149-186.
10. **Blaschke, S., Schulz, H., Schwarz, G., Blaschke, V., Müller, G.A., Reuss-Borst, M.,**(2001): Interleukin 16 Expression in Relation to Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol*, 28,12-21
11. **Burmester, G.R., Stuhlmüller, B., Keyszer, G., Kinne, R.W.** (1997): Mononuklear phagozyten und rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 40: 5-18

12. **Burmester, G.R., Kalden, J.R.** (2001): Der IL-1-Rezeptor-Antagonist im Zytokin Netzwerk, Steinkopff, Darmstadt, Kapitel:1-4, S: 1-36
13. **Campeu, P., Chapdelaine, P., Seigneurin-Venin, S., Massie, B., Tremblay J.P.,** (2001) : Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Therapy*, 8, 1387-1394
14. **Center, D.M., Cruikshank, W.W.** (1982): Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines: identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J Immunol* 128: 2562-2568.
15. **Center, D.M., Kornfeld, H., Ryan, T.C., Cruikshank, W.W.** (2000): Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol Today* 21: 273-280.
16. **Cruikshank, W.W., Center, D.M.** (1982): I. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (lymphocyte chemoattractant factor). *J Immunol* 128: 2569-2574.
17. **Cruikshank, W.W., Greenstein J.L., Theodore, A.C., Center D.M.** (1991): Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signal in lymphocytes. *J Immunol* 146: 2829-2934.
18. **Cruikshank, W.W., Center, D.M., Nisar, N., Wu-M, Natke, B., Theodore, A., Kornfeld, H.** (1994): Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5109-5113.
19. **Cruikshank, W.W., Lim, K., Theodore, A.C. et al** (1996): IL-16 Inhibition of CD3- dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol* 157: 5240-5248.
20. **Davis, L., Dibner, M., Battey, J.** (1986): Basic Methods in Molecular Biology, by Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, p.89-115, 285-286.
21. **Dinser, R., Kreppel, F., Zaucke, F., Blank, C., Paulsson, M., Kochanek, S., Maurer, P.** (2001): Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 116: 69-77.
22. **Edwards, J.C.W.** (1995): Synovial intimal fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 54: 395-397.
23. **Evans, C.H., Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C., Herndorn, J.H., Kang, R., Bahnson, A.B., Barranger, J.A., Elders, E.M., Gay, S., Tomaino, M.M., Wasco, M.C., Watkins, S.C., Whiteside, T.L.** (1996) Clinical Protocol: clinical trial to assess the safety, feasibility and efficacy of transferring a

- potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 7:1261-1280
24. **Evans, C.H., Ghivizzani, S.C., Lechman, E.R. et al** (1999): Lessons learned from gene transfer approaches. *Arthritis research* Vol1. S.43.
 25. **Feldman, M., Brennan F.M., Maini, R.N. in Paul, W.E., Fathman, C.G., Metzger, H.,** (Eds.), Annual Review of Immunology, Annual Reviews Inc., Palo Alto 1996, p.397
 26. **Feldman, M., Brenan, F.M., Chantry, D., Haworth, C., Turner, M., Katsikis, P., Londei, E., Abney, G., Buchan, G., Barrett, K., Corcoran, A., Kissonerghis, M., Zheng, R., Grubeck Loebenstein, Barkleey, D., Chu, C.Q., Field, M., Maini, R.N.,** (1991): Cytokine assays: Role of the evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol Rev* 119; 105-123.
 27. **Fernandes, L., Sullivan, S., Mc Farlane, I.G., Wojcicka, B.M., Warnes, T.W., Eddleston, Hamilton, E.B., Willams, R.** (1979): Studies on the frequency and pathogenesis of liver involvement in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 38; 501-506
 28. **Firestein, G.S.** : Rheumatoid synovitis and pannus, Rheumatology. Edited by JH Klippel, PA Dieppe. London, Mosby Int., London, 1998.
 29. **Firestein, G.S., Wu, M., Townsend, K., Alvaro-Garcia, J., Glasebrook, A., Zvaifler, N.J.**(1988): Cytokines in chronic inflammatory arthritis. *J Exp Med* 168: 1573-1586.
 30. **Firestein, G.S., Paine, M.M., Littman, B.H.** (1991): Gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium: quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 34:1094-1105.
 31. **Firestein, G.S., Paine M.M.** (1992): Stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 140:1309-1314
 32. **Folkman, J., Ausprunk, D.H., Langer, R.:** Connective Tissue, small blood vessels and capillaries. In: Kelly WN (ed) , Ruddy S, Harris ED. Textbook of Rheumatology, 2. Ed., WB Saunders, Philadelphia, 1985.
 33. **Franz, J.K., Kolb, S.A., Hummel, K.M., Lahrtz, F., Neidhart, M., Aicher, W.K., Pap, T., Gay, R.E., Fontana, A., and Gay, S.,** (1998): Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4⁺ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 28: 2661-2671.
 34. **Gräfenstein, K.,(ed), Altus RE, Geidel H, Nagel WD:** Klinische Rheumatologie, 3. Aufl., ecomed, Landsberg, 1992.

35. **Gay, S., Gay, R., Koopmann, W.J.**, (1993): Molecular and cellular mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 52 Suppl 1: S 39-47,
36. **Hallek, M., Buening, H., Ried, M., Hacker, U., Kurzeder, Ch., Wendtner, C.-M.**, (2001): Grundlagen der Genterapie. *Der Internist*, 42, 1306-1313
37. **Hanemaaijer R., Koolwijk, P., Clerq L. le., de Vree W.J., van Hinsbergh V.W.** (1993): Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 296:803-809
38. **Hellgren, I., Drvota, V., Pieper, R., Enoksson, S., Blomberg, P., Islam, K., Sylven, C.** (2000): Highly efficient cell-mediated gene transfer using non-viral vectors and FugeneTM 6: in vitro and in vivo studies. *Cell Mol Life Sciences* 57(2000)1326-1333
39. **Henderson, B., Revell, P., Edwards, J.W.S.** (1988): Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact. *Ann Rheum Dis* 47: 348-349.
40. **Heurkens, A.H., Hiemstra, P.S., Lafeber, G.J., Daha, M.R., Breedveld, F.C.** (1989): Anti – endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vaskulitis. *Clin Exp Immunol* 78: 7-12.
41. **Hoyhtya, M., Myllyla, R., Piuva, J., Kivirikko, K.I., Tryggvason, K.** (1984): Monoclonal antibodies to human prolyl 4-hydroxylase. *Eur J Biochem* 141: 472-482.
42. **Jackson, C.J., Jenkins, K.L.** (1991): Type 1 collagen fibrills promote rapid vascular tube formation upon contact with the apical side of cultured endothelial cells. *Exp Cell Res* 192: 319-323
43. **Janssens, X., Veys, E., Verbruggen, G., Declerq, L.** (1988): The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 15: 1346-1350
44. **Jonsson, T., Valdimarsson, H.** (1993): Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? *Ann Rheum Dis* 52: 161-1664.
45. **Kelly, P.M., Bliss, E., Morton, J.A., Burns, J., McGee, J.O.**, (1988): Monoclonal antibody EBM/11: high cellular specificity for human macrophages. *J Clin Pathol* 41: 510-515.
46. **Klimiuk, P.A., Goronzy J.J., Weyand, C.M.** (1999): IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 162: 4293- 4299.

47. **Klippel, J. H., Dieppe, D. A.** (1998): Rheumatoid Arthritis and other synovial disorders, Sektion 5, Pharmacia & Upjohn, London
48. **Krane, S.M., Goldring, S.R., Dayer, J.M.,** (1982): Interactions among lymphocytes, monocytes and other synovial cells in the rheumatoid synovium. *Lymphokines* 7: 75-87.
49. **Kreipe, H., Radzun, H.J., Parwaresch, M.R., Auerswald, U., Magnussen, H., Barth, J.,** (1986): Phenotypic differentiation patterns of the human monocyte/macrophage system. *Histochem J* 18: 441-450.
50. **Kurachi, S., Sze, L., Kurachi, K.** (1998): Improved Transfection of HepG2 Cells Using FuGENE™ 6 Transfection Reagent. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 3712 Medical Science II, Ann Arbor MI 48109-0618 U.S.A
51. **Laberge, S., Cruikshank, W.W., Beer, D.J., Center, D.M.** (1996): Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8⁺ T-cells in vitro. *J Immunol* 156: 310-315.
52. **Laberge, S., Cruikshank, W.W., Kornfeld, H., Center, D.M.** (1995): Histamine induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8⁺ T-cells is independent of transcription and translation: evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J Immunol* 155: 2902-2910.
53. **Lawrencia, C., Mahendran, R., Esuvaranathan, K.,** (2001): Transfection of urothelial cells using ethyl-β-cyclodextrin solubilized cholesterol and Dotap. *GeneTherapy*,8, 760-768
54. **Lee, B.O., Ishihara, K., Denno, K., Kobune, Y., Itoh, M., Muraoka, O., Kaisho, T., Sasaki, T., Ochi, T., Hirano, T.** (1996): Elevated levels of the soluble form of bone marrow stromal cell antigen 1 in the sera of patients with severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 629-637.
55. **Madry, H. and Trippel, S.B.** (2000): Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Therapy* 7: 286-291.
56. **Maini, R.N., Zvaifler, N.J.:** Rheumatoid arthritis and other synovial disorders. In: Klippel JH, Dieppe PA, eds. Rheumatology. Mosby Int., London, 1998.
57. **Mapp, P.I., Grootveld, M.C., Blake D.R.** (1995): Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 51: 419-436
58. **McCachren, S.S., Haynes, B.F., Niedel, J.E.,** (1990): Localisation of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridisation histochemistry. *J Clin Immunol* 10: 19-27.

59. **Medof, M.E., Walter, E.I., Rutgers, J.L., Knowles, D.M., Nussenzweig, V.,** (1987): Identification of the complement decay accelerating factor an epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med* 165: 848-864.
60. **Miller, A.D.** (1992): Human gene therapy comes of age. *Nature* 357: 455-460.
61. **Mohr, W., Hummler, N., Pelster, B., Wessinghage, D.** (1986): Proliferation of pannus tissue cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 6: 127-132.
62. **Morgan, R.A. and Anderson, W.F.** (1993): Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 62: 191-217.
63. **Mühlhart, C.** (2000): Der Experimentator: Molekularbiologie, 26-46, 108-130, 2. Aufl., Spektrum Akad., Verl., Berlin
64. **Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B.N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay R.E., 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* 49:1607-1615
65. **Müller-Ladner, U., Gay R.E., Gay, S.** (1997): Cellular pathways of joint destruction. *Curr Opin Rheumatol* 9: 213-220
66. **Müller-Ladner, U., Roberts, C.R., Franklin, B.N. et al** (1997): Human IL-1 Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol* 158: 3492-3498.
67. **Müller-Ladner, U., Evans, C.H., Barry, N.F., Roberts, C.R., Gay, R.E., Robbins, P.D., Gay, S.** (1999): Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis & Rheumatism* 3: 490-497.
68. **Nepom, G.T., Byers, P., Seyfried, C., Healay, L.A., Wilske, K.R., Stage, D., Nepom, B.S.,** (1989): HLA Genes associated with rheumatoid arthritis: identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 32: 15-21
69. **Nüßlein, H.** (2001): Zytokine in der Rheumatologie – Klinische Bedeutung und therapeutische Prinzipien. 1. Auflage –Bremen: UNI-MED Verlag, S: 14-21, 90-100
70. **Pap,T., Müller-Ladner,U., Gay,R., Gay,S.,**(1999):Gene therapy in rheumatoid arthritis: how to target joint destruction? *Arthritis Research* Vol 1, No1
71. **Petrow, P.K., Theis, B., Eckard, A., Karbowski, A., Eysel, P., Salzmann, G.** (1997): Determination of proliferating cells at the sites of cartilage invasion in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40 Suppl 9: 251

72. **Pichler, W.J., Peter H.H., Hänsch, M.G.:** Prinzipien des Immunsystems. In: Peter HH, Pichler WJ, Hrsg. Klinische Immunologie, 2. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, 1996.
73. **Pincus, T., Marcum, S.B., Callahan, L.F.** (1992): Longterm drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices: II. Second line drugs and prednisone. *J Rheumatol* 19:1885-1894
74. **Piotr, A., Goronzy J.J., Weyand, C.M.** (1999): IL-16 as an Anti-Inflammatory Cytokine in Rheumatoid Synovitis. *The Journal of Immunology* 162: 4292-4299.
75. **Rau, R.,**(2000):Basistherapie der rheumatoiden Arthritis 34-52, 1.Aufl.,Uni-Med, Bremen
76. **Ronningen, K.S., Spurkland, A., Eegland, T., Iwe, T., Vartdal, F., Thorsby, E.,** (1990): Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74. *Tissue Antigens* 36: 235-240.
77. **Ritter, S.J.** (1998): Improved Transfection of Eukaryotic Cells using FuGENETM6 Transfection Reagent. Department of Integrative Biology, Pharmacology, and Physiology;
78. **Sciaky, D., Brazer, W., Center, D.m., Cruickshank, W.W., Smith, T.J.** (2000): Cultured Human fibroblasts Express Constitutive IL-16 mRNA: Cytokine Induktion of Active IL-16 Protein Synthesis Through a caspase-3-Dependent mechanism. *J. Immunol.* 164:3806-3814.
79. **Shingu, M., Nagai, Y., Isayama, T., Naono, T., Nobugana, M.** (1993): The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and (TIMP) production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 94: 145-149
80. **Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E.** (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845
81. **Smiley, J.D., Sachs, C., Ziff, M.** (1968): In vitro synthesis of immunoglobulin by rheumatoid synovial membrane. *J Clin Invest* 47: 624-632
82. **Stasny, P.** (1978): Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 298: 869-871
83. **Subramanian, V., Sneddon, S.F., Martin L., Evans, G.S.,** (2001): Differentiation potential of intestinal Mesenchyme and its interaction with epithelial cells: a study using β -Galactosidase-expressing fibroblast lines. *Cell Biol International.* 8, 741-751

84. **Tak, P.P., Bresnihan, B.** (2000): The Pathogenesis and prevention of joint Damage in rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 12: 2619-2633.
85. **Trabandt, A., Gay, R.E., Stransky, G., Aicher, W.K., Gay, S., in Talal, N.:** Molecular Autoimmunity, Academic Press, London 1991, p. 232
86. **Trabandt, A., Aicher, W.K., Gay R.E.,** (1990): Expression of the collagenolytic and ras-induced cysteine protease cathepsin L and proliferation – associated oncogenes in synovial cells of MRL/1 mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 10: 349-361.
87. **Trabandt, A., Gay, R.E., Gay, S.** (1992): Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 100: 861-875.
88. **Trabandt, A., Gay, R.E., Birkedal Hansen, H., Gay, S.** (1992): Expression of collagenase and potential transcription factors in the MRL/1 mouse arthropathy. *Semin Arthritis Rheum* 21: 246-251.
89. **Zhang, P., Andreassen, P., Fender, P., Geissler, E., Hernandez, J-F., Chroboczek J.,** (1999): A transfecting peptide derived from adenovirus fiber. *Gene Therapy*, 6,171-181
90. **Zhang, Y., Center, D.M., Wu, D.M.H., Cruickshank, W.W., Yuan, J.Y., Andrews D.W., Kornfeld, H.** (1998): Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase 3. *J Biol Chem* 273: 1144-149.
91. **Waller, E.**(1940): On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand* 17:172-188
92. **Walker, C.M., Moody, D.J., Stites, D.P., Levy, J.A.** (1986): CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234: 1563-1566.
93. **Weyand, C.M., Goronzy, J.J.** (1997): Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med Clin North Am* 81: 29-55.
94. **Wordsworth, B.P., Lanchbury, J.S.S., Sakkas, L.I., Welsch, K.I., Panay, G.S., Bell, J.I.,** (1989): HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB 1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10049-10053.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS02	Anti-Fibroblasten-Antikörper
B-Lymphozyten	aus dem Knochenmark (bone marrow) stammende Lymphozyten
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BRM	Patientenkürzel
bzw.	beziehungsweise
CII	Collagen Typ II
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CD(n)	cluster of differentiation, aus n Immunglobulinomänen
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalie Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	chronische Polyarthrit
dest.	destilliert
d.h	das heißt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOS	Dosper Transfektionsreagenz
DTP	Dotap Transfektionsreagenz
E	Extinktion
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
et al.	et alteri, und andere
EtBr.	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
Fc	Kristallisationsfähiges Fragment eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum
FUG	FuGENE 6 Transfektionsreagenz
G, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikogramm
GFP	Green Fluorescent Protein

GIH	Patientenkürzel
GM-CSF	Granulozyte-macrophage colony-stimulating factor
H	Stunde(n)
hGH	humanes Growth Hormone
H ₂ O	Wasserstoffdioxid, Wasser
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HLA	humanes Lymphozyten-Antigen
HEK	Patientenkürzel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-x	Interleukin- (Nummer x)
ISH	In situ Hybridisierung
IST	Insulin-Transferrin-Selen-Supplement
Kan	Kanamycin
KDa	kiloDalton
Ki-M6	Antikörper gegen CD68
KNI	Patientenkürzel
Kontr.	Kontrolle
l, ml, µl	Liter, Milli-, Mikroliter
LCF	lymphocyte chemoattractant factor
LIP	LIPOFECTAMINE Transfektionsreagenz
M.	Mykobakterium
M, mM, µM, nM	Mol, molar, Milli-, Mikro-, Nanomolar
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
MIR	Patientenkürzel
MMP	Matrixmetalloproteasen
MRNA	messenger RNA, Mittler-Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
myc.	ein Protoonkogen
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
Neg.	Negativ(kontrolle)
Neo	Neomycin
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
Nhe I	Restriktionsenzym
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p53	Suppressorgen
PBS ⁻	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	Polymerasekettenreaktion
pEGFP	Enhanced green fluorescent protein Gen
PH	pH –Wert
PK	Proteinkinase
PLF	Patientenkürzel
PLO	Patientenkürze

POD	Peroxidase
Pos.	Positiv(Kontrolle)
PP1, 2A,	Proteinphosphatase1, 2A
PPasen	Proteinphosphatasen
pUC	
RA	rheumatoide Arthritis
Ras	ein Protoonkogen
RF	Rheumafaktoren
RKL	Patientenkürzel
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
RZK	Patientenkürzel
Sca I	Restriktionsenzym
SCID	severe combined immune deficiency
SK	Subkultur
Stabwn	Standardabweichung
Stu I	Restriktionsenzym
s.u.	siehe unten
SV 40 stammend)	Simian Virus 40 (aus der afrikanischen, grünen Meerkatze
SF	Synoviale Fibroblasten
T-	thymusabhängig
TAE	Trisaminomethan-Ethylendiamintetraacetat
TBE	Trisaminomethan-Borsäure-Ethylendiamintetraacetat
TGF	transforming growth factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
u.p.m.	Umdrehungen pro minute
UV	ultraviolett (es Licht betreffend)
V, kV	Volt, kiloVolt
v.a.	vor allem
z.B	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
z.T.	zum Teil

7.2 Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. W.K. Aicher möchte ich ganz herzlich für die großartige, fachkundige Betreuung und permanente Beratung in organisatorischen und inhaltlichen Fragen meiner Dissertation danken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Giehl und Prof. Dr. N. Wülker für die Gewährleistung der Rahmenbedingungen, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Orthopädischen Forschungslabor danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau M. Weis-Klemm und Frau Dr. D. Alexander für die exzellente und geduldige Unterstützung während des gesamten Projektes, sowie für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. R. Schwabe für die Beratung und Ausarbeitung der statistischen Methoden und allen operierenden Ärzten der Orthopädischen Universitätsklinik für die regelmäßige Entnahme und Bereitstellung von Gewebeproben.

Danken möchte ich Herrn Ch. Geistdörfer für sein Interesse und die großzügige Unterstützung welche es mir ermöglichte zeitgemäß und konzentriert zu arbeiten.

Meinen Eltern danke ich ebenfalls für ihr Interesse und Unterstützung.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Enikö Krisztina Pall
Geburtsdatum	9.04.1972
Geburtsort	Turda/ Rumänien
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbesuche:

1979 – 1983	Grundschule in Rumänien
1983 – 1986	Gymnasium in Rumänien
1987 – 1990	Leo Beck High School in Haifa/ Israel
	Abitur Juli 1990

Militärdienst:

12.09.1990 – 11.11.1992	Militärdienst in Israel
-------------------------	-------------------------

Berufsausbildung:

1.04.1993 – 12.09.1995	Sport- und Krankengymnastikschule in Waldenburg mit Abschluß als Sport- und Bewegungstherapeutin
15.10.1995 – 15.11.1995	Flugbegleiterausbildung bei LTU
15.09.1997 – 15.10.1997	Flugbegleiterausbildung bei Lufthansa

Berufstätigkeit:

15.11.1995 – 1.05.1997	Flugbegleiterin bei LTU
15.09.1997 – 1.04.1998	Flugbegleiterin bei Lufthansa

Universität / Prüfungen:

15.04.1998	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
13.03.2000	Ärztliche Vorprüfung
22.03.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.04.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.04.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Datum: 9.06.2004