

**Analyse des anti-inflammatorischen Pilzmetaboliten
S-Curvularin in verschiedenen Modellen der
rheumatoiden Arthritis**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nadine Schmidt
geb. in Rockenhausen
Mainz, 2009

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

3. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2010

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	6
II. Tabellenverzeichnis.....	9
III. Abkürzungsverzeichnis	11
IV. Einleitung	15
IV.1 Die rheumatoide Arthritis als Beispiel einer pro-inflammatorischen Erkrankung..	15
IV.1.1 Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	15
IV.1.2 Die Bedeutung der pro-inflammatorischen Genexpression in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	17
IV.1.2.1 Die Rolle von NO bei entzündlichen Gelenkerkrankungen	19
IV.1.3 Die Therapie der rheumatoiden Arthritis	20
IV.1.3.1 Glukokortikoide in der Therapie der rheumatoiden Arthritis.....	21
IV.2 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthasen	24
IV.2.1 NO und Isoformen der NO-Synthase.....	25
IV.2.2 Die induzierbare NO-Synthase (iNOS)	26
IV.3 Die Regulation der Genexpression.....	27
IV.3.1 Die Regulation der Genexpression am Beispiel der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	29
IV.3.1.1 Die Regulation der iNOS-Promotoraktivität	30
IV.3.1.2 Die Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität.....	31
IV.3.1.3 Die Regulation der iNOS-Proteinexpression und der Proteinstabilität..	32
IV.4 Wirkstoffe aus Pilzen als Inhibitoren der Expression pro-inflammatorischer Enzyme.....	33
IV.4.1 Der Pilzwirkstoff S-Curvularin als Inhibitor der humanen iNOS.....	34
IV.5 Modelle zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	34
IV.5.1 Humane immortalisierte Chondrozyten als in vitro-Modell der RA	34
IV.5.2 Das Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA).....	35
IV.5.3 Das Modell der LPS-induzierten akuten Inflammation	36
V. Zielsetzung der Arbeit.....	37
VI. Material und Methoden	38
VI.1 Laborgeräte	38
VI.2 Chemikalien und Lösungen.....	38

VI.3	Plastikwaren	39
VI.4	Reagenzien und Kits	40
VI.5	Zelllinien	40
VI.6	Plasmide	40
VI.7	Antikörper	40
VI.8	Zytokine	41
VI.9	Inhibitoren	42
VI.10	Zellbiologische Methoden	42
VI.10.1	Kultivierung eukaryoter Zellen	42
VI.10.2	Herstellung einer Alginatkultur	43
VI.10.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	44
VI.10.4	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	44
VI.10.5	Stimulation eukaryoter Zellen mit Zytokinen	44
VI.10.6	Stabile Transfektion eukaryoter Zellen	45
VI.10.7	Analyse der NO-Produktion mit dem NO-Analyzer	45
VI.11	Molekularbiologische Methoden	46
VI.11.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	46
VI.11.2	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	47
VI.11.3	Qualitative Analyse von RNA mit dem Experion Automated Electrophoresis System	47
VI.11.4	Agarose-Gelelektrophorese	48
VI.11.5	Reverse Transkription (RT)	49
VI.11.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	50
VI.11.7	Quantitative "real-time"-PCR (qRT-PCR)	51
VI.11.8	DNA-Mikroarray-Analyse	54
VI.11.8.1	Isolierung und Markierung der RNA	55
VI.11.8.2	Hybridisierung des Genchips	56
VI.11.8.3	Auswertung der Genchips	57
VI.12	Proteinbiochemische Methoden	59
VI.12.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen	59
VI.12.2	Quantifizierung von Proteinen	59
VI.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
VI.12.4	Immunodetektion mittels Western Blot	61
VI.12.5	Immunodetektion mit dem Proteome Profiler™ (R&D Systems)	63
VI.13	Tierexperimente	65
VI.13.1	Blutentnahme zum Nachweis von Zelloberflächenmolekülen mittels FACS-Analysen (fluorescence activated cell sorting)	65

VI.13.2 Immunisierung von Mäusen mit Kollagen Typ II zur Induktion einer Arthritis.....	66
VI.13.3 Bestimmung des Arthritisindex	67
VI.13.4 Behandlung der Kollagen-induzierten Arthritis	68
VI.13.5 Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Inflammationsmodell	68
VI.14 Statistik.....	69
VII. Ergebnisse.....	70
VII.1 Analyse der iNOS-Expression in humanen C-28/I2-Chondrozyten.....	70
VII.1.1 Die iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen	70
VII.1.2 Die Induktion der iNOS-Expression ist abhängig von den verwendeten Zytokinen und der Dauer der Zytokin-Behandlung	73
VII.1.3 Eine Inhibierung der iNOS-Aktivität hat keinen Einfluss auf die Zytokin- induzierte iNOS-Expression	76
VII.1.4 Einfluss der Hemmung verschiedener Signaltransduktionswege auf die Zytokin-induzierte iNOS-Expression.....	77
VII.1.5 Die Induktionsrate des humanen iNOS-Promotors in C-28/I2-Zellen nach einer Zytokin-Inkubation korreliert mit der iNOS-mRNA-Expression.....	79
VII.1.6 Analyse der mRNA-Expression von RNA-bindenden Proteinen in C-28/I2- Chondrozyten.....	81
VII.1.7 Glukokortikoide haben keinen Einfluss auf die iNOS-Expression in C-28/I2- Chondrozyten.....	83
VII.1.8 Die Zytokin-induzierte iNOS-Expression wird in C-28/I2-Chondrozyten von S-Curvularin gehemmt	86
VII.2 Die Wirkung von S-Curvularin auf die pro-inflammatorische Genexpression im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis	89
VII.2.1 Typisierung von TCR- β tg-Mäusen	89
VII.2.2 Die Immunisierung mit Kollagen Typ II führt bei TCR- β tg-Mäusen zur Entstehung einer Arthritis	90
VII.2.3 Die Behandlung einer etablierten Kollagen-induzierten Arthritis mit S-Curvularin und Dexamethason führt zu einer Verminderung der Krankheitssymptome	93
VII.2.4 Analyse der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in peripheren Blutmonozyten und Pfoten von immunisierten TCR- β tg-Mäusen....	94
VII.2.5 Analyse der iNOS-mRNA-Expression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis.....	96
VII.2.6 Analyse der Proteinexpression wichtiger Zytokine und Chemokine im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	100

VII.2.7 Genexpressionsanalysen in den Pfoten Kollagen-induzierter TCR- β tg-Mäuse mittels DNA-Mikroarray-Analysen.....	102
VII.2.8 Analyse der S100A8-mRNA-Expression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis.....	110
VII.2.9 Analyse der S100A8-Proteinexpression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis.....	114
VII.3 Wirkung von S-Curvularin im akuten LPS-induzierten Entzündungsmodell	115
VIII. Diskussion	118
VIII.1 Analyse der iNOS-Expression in humanen C-28/I2-Chondrozyten.....	118
VIII.1.1 Die Induktion der iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig.....	118
VIII.1.2 Regulation der iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten durch NO.....	120
VIII.1.3 An der Induktion der iNOS-Expression sind verschiedene Signaltransduktionswege beteiligt	120
VIII.1.4 Analyse der iNOS-Promotoraktivität in C-28/I2-Chondrozyten	122
VIII.1.5 Analyse der mRNA-Expression RNA-bindender Proteine	122
VIII.1.6 Einfluss von Glukokortikoiden auf die iNOS-Expression in C-28/I2- Chondrozyten.....	124
VIII.1.7 Die iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten wird von S-Curvularin gehemmt.....	125
VIII.2 Die Wirkung von S-Curvularin auf die pro-inflammatorische Genexpression im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA).....	126
VIII.2.1 Die Immunisierung mit Kollagen Typ II führt zur Entstehung einer CIA	126
VIII.2.2 Therapeutische Ansätze zur Behandlung einer CIA.....	127
VIII.2.3 Analyse der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren im Modell der CIA.....	128
VIII.2.4 Analyse der iNOS-mRNA-Expression im Modell der CIA.....	128
VIII.2.5 Analyse der Proteinexpression im Modell der CIA	130
VIII.2.5.1 Analyse der Expression von Chemokinen im Modell der CIA	130
VIII.2.5.2 Analyse der Expression von Zytokinen im Modell der CIA.....	132
VIII.2.6 Genexpressionsanalysen in den Pfoten Kollagen-induzierter TCR- β tg-Mäuse mittels DNA-Mikroarray-Analysen.....	136
VIII.2.7 Analyse der S100A8-mRNA- und Protein-Expression im Modell der CIA	141
VIII.3 Die Wirkung von S-Curvularin im akuten LPS-induzierten Entzündungsmodell	142
IX. Zusammenfassung.....	145

X. Literaturverzeichnis	147
XI. Anhang.....	169
XII. Publikationen.....	174
Danksagung	175
Lebenslauf.....	176

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	16
Abb. 2: Der Wirkmechanismus von Glukokortikoiden	22
Abb. 3: Struktur von S-Curvularin	34
Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Mikroarray-Analyse	54
Abb. 5: Schematische Darstellung der Auswertung von Mikroarrays	58
Abb. 6: Aufbau eines Western Blots	63
Abb. 7: Die Induktion der iNOS-Expression in C-28/I2-Zellen ist abhängig von der Zelldichte	71
Abb. 8: Die Expression von Chondrozyten-Marker-Genen ist abhängig von der Zelldichte...72	72
Abb. 9: Die maximale Induktion der iNOS-mRNA-Expression wird durch die Behandlung mit einem Zytokingemisch (CM) erreicht	74
Abb. 10: Die maximale Induktion der iNOS-Expression ist abhängig von der Dauer der Zytokinbehandlung.....	75
Abb. 11: Die Hemmung der iNOS-abhängigen NO-Produktion hat keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expression.....	76
Abb. 12: Die Hemmung des p38-MAPK-, des JAK/STAT-1 α - und des NF- κ B- Signaltransduktionswegs reduziert die Zytokin-induzierte iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten.....	78
Abb. 13: Die Zytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression ist auf eine erhöhte Promotoraktivität zurückzuführen.....	80
Abb. 14: Analyse der mRNA-Expression von TTP, PTB, HuR, KSRP und AUF-1 in C-28/I2- Chondrozyten	82
Abb. 15: Die Co-Inkubation der C-28/I2-Zellen mit CM und Glukokortikoiden hat keinen Einfluss auf die iNOS-Expression	84
Abb. 16: Die Behandlung mit Dexamethason hat keinen Einfluss auf NF κ B-regulierte Gene.....	85
Abb. 17: C-28/I2-Chondrozyten exprimieren keinen Glukokortikoidrezeptor	86
Abb. 18: Die iNOS-Expression wird in C-28/I2-Zellen nach Zytokin-Stimulation von S-Curvularin gehemmt	88
Abb.19: Expression der transgenen TCR-V β 12-Kette auf CD4+-T-Lymphozyten	90
Abb. 20: Immunisierungsschema zur Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)	91
Abb. 21: Entwicklung einer Arthritis nach Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit heterologem Kollagen Typ II	91
Abb. 22: Klinische Symptome einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA).....	92

Abb. 23: Immunisierungs- und Behandlungsschema der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)	93
Abb. 24: Wirkung der Behandlung mit S-Curvularin und Dexamethason auf eine etablierte Kollagen Typ II induzierte Arthritis in TCR- β tg-Mäusen	94
Abb. 25: Analyse der mRNA-Expression in peripheren Blutmonozyten und in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	95
Abb. 26: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in peripheren Blutmonozyten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	97
Abb. 27: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	98
Abb. 28: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in der Leber im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	99
Abb. 29: Darstellung eines Proteome Profiler „Mouse Cytokine Array“ zur Analyse der Proteinexpression in Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	100
Abb. 30: Quantitative Auswertung des Proteome Profiler zur Analyse der Proteinexpression in Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)	101
Abb. 31: Beispiel eines SAM-Graphs einer Zwei-Farben-Mikroarray-Analyse	102
Abb. 32: Schematische Darstellung der Anzahl signifikant regulierter Gene im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)	103
Abb. 33: Einteilung der signifikant regulierten Gene anhand der Beteiligung an biologischen Prozessen	105
Abb. 34: Darstellung der signifikant herabregulierten Gene nach S-Curvularin-Behandlung (SC) im Vergleich zu CII-behandelten Mäusen	106
Abb. 35: Analyse der mRNA-Expression von Camp, Mpo, Defb6 und Ppib im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	108
Abb. 36: Darstellung der signifikant hoch regulierten Gene nach S-Curvularin-Behandlung im Vergleich zu CII-behandelten Mäusen.....	109
Abb. 37: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in peripheren Blutmonozyten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	111
Abb. 38: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	112
Abb. 39: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in der Leber im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	113
Abb. 40: Analyse der S100A8-Proteinexpression in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis	114
Abb. 41: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in PBMCs, Leber und Milz von C57BL/6-Mäusen nach LPS-Injektion	116

Abb. 42: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in PBMCs, Leber und Milz von
C57BL/6-Mäusen nach LPS-Injektion117

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Laborgeräte	38
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	38
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Plastikwaren.....	39
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Kits	40
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.....	40
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Plasmide	40
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper für Western Blot-Analysen.....	41
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper für FACS-Analysen	41
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Zytokine	41
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren	42
Tabelle 11: Medien und Lösungen für die Zellkultur	42
Tabelle 12: Lösungen und Puffer für die Alginatkultur.....	43
Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung	46
Tabelle 14: Puffer für die Agarose- Gelelektrophorese	48
Tabelle 15: Pipettierschema einer Reaktion für die cDNA-Synthese.....	49
Tabelle 16: Reaktionsansatz für die PCR	50
Tabelle 17: PCR-Programm	51
Tabelle 18: Verwendete Oligo-Sets für die PCR.....	51
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die „real-time“ PCR	52
Tabelle 20: Programm für die „real-time“ PCR.....	52
Tabelle 21: humane Primer/Sonden-Sets für die „real-time“ PCR.....	52
Tabelle 22: murine Primer/Sonden-Sets für die „real-time“ PCR.....	53
Tabelle 23: Reaktionsansatz zur Markierung der RNA (A).....	55
Tabelle 24: Reaktionsansatz zur Markierung der RNA (B).....	55
Tabelle 25: Puffer für die Hybridisierung.....	56
Tabelle 26: Ablauf der Hybridisierung.....	57
Tabelle 27: Pipettierschema für Trenngele	60
Tabelle 28: Zusammensetzung des Sammelgels (4%).....	61
Tabelle 29: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.....	61
Tabelle 30: Lösungen für die Detektion mittels Western Blot.....	62
Tabelle 31: Reagenzien und Lösungen für den Proteome Profiler™.....	64
Tabelle 32: Puffer für die FACS-Analysen	66
Tabelle 33: Lösungen und Reagenzien für die Immunisierung	67
Tabelle 34: Bestimmung des Arthritisindex.....	67
Tabelle 35: Substanzen für die Behandlung der CIA	68

Tabelle 36: Lösungen und Substanzen für die Induktion einer akuten Entzündungsreaktion	68
Tabelle 37: Signifikant herabregulierte Gene nach S- <i>Curvularin</i> -Behandlung (CIA_SC) im Vergleich zu CII-immunisierten (CIA) und Dexamethason-behandelten (CIA_Dex) Tieren	169
Tabelle 38: Signifikant hochregulierte Gene nach S- <i>Curvularin</i> -Behandlung (CIA_SC) im Vergleich zu CII-immunisierten (CIA) und Dexamethason-behandelten (CIA_Dex) Tieren	173

III. Abkürzungsverzeichnis

A549/8	humane Alveolarepithel-Karzinomzellen
AIRE	Atuimmun-Regulator
AKN-1	humane Leberzellen
AP-1	Aktivator Protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen-presenting cell)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-reiches Element
ATF-2	activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
AUF-1	ARE/poly-(U)-binding factor
BH ₄	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
CII	Kollagen Typ II
C5a	Complement component 5a
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Camp	cathelicidin antimicrobial peptide
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CD	cluster of differentiation
cds	für ein Protein codierende Sequenz eines Gens (coding sequence)
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (collagen-induced arthritis)
CM	Zytokingemisch (cytokine mixture; IFN- γ (100 U/ml), IL-1 β (50 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml))
CO	unbehandelte (nicht mit Zytokinen behandelte) Zellen
COL2A	Kollagen 2A
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP-responsives Element-bindendes Protein
CRP	C-reaktives Protein
Defb6	beta-Defensin 6
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason

DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen
DMARD	disease modifying anti-rheumatic drug
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetrasessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
eNOS	endotheliale Isoform der NOS (NOS III)
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sortieren
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMN	Flavin-Mononukleotid
Foxc1	Forkhead box 1
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GIT	Guanidiniumisothiocyanat-haltiger Puffer
GK	Glukokortikoid
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/monocyte colony stimulating factor)
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
h	Stunde
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
hsp	Hitzeschockprotein
HuR	ELAV-(„embryonic lethal abnormal vision“)-Protein
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
I- κ B	Inhibitor von κ B
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Isoform der NOS (NOS II)

IRF	Interferon-regulierter Faktor
JAK	Januskinase
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
KSRP	KH-type splicing regulatory protein
L-NMMA	L-N ^G -monomethyl-Arginine-Citrat
LWAR	langwirksame Antirheumatika
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luciferase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	monocyte chemotactic protein
min	Minute
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	Metalloproteinase
Mpo	Myeloperoxidase
mRNA	messenger-RNA
MTX	Methotrexat
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
Nm	nano-Meter
nNOS	neuronale Isoform der NOS (NOS I)
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric oxide synthase)
Notch2	Notch gene homolog 2
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug
OD	optische Dichte
Ogn	Osteoglycin
PABP	Poly-A-bindendes Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phycoerithrin
PLB	passive lysis buffer

PKA/PKC	Proteinkinase A/C
Ppib	peptidylprolyl isomerase B
PBMC	periphere Blutmonozyten (periphere blood mononuclear cell)
Pred	Prednisolon
PTB	Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein
qRT-PCR	quantitative realtime RT-PCR
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Upm	Umdrehungen pro Minute
RA	rheumatoide Arthritis
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT	Reverse Transkription
S100A8	S100-Calciumbindeprotein A8
SC	S-Curvularin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
SEM	standard error of mean
siRNA	small interfering RNA
STAT-1 α	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription-1 α (signal transducer and activator of transcription-1 α)
TBE	Tris-HCl-, Borsäure- und EDTA-haltiger Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor- β)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTP	Tristetraprolin
UTR	untranslatierte Region eines Gens
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

IV. Einleitung

IV.1 Die rheumatoide Arthritis als Beispiel einer pro-inflammatorischen Erkrankung

Chronisch-entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis (RA, chronische Polyarthritits), Morbus Crohn und Asthma gehören zu den häufigsten Indikationen von Arzneimittelverordnungen in der westlichen Welt. Weiterhin ist schon länger bekannt, dass eine permanente Entzündung einen starken Risikofaktor für eine karzinogene Entartung von Zellen in den betroffenen Geweben darstellt. Bei allen chronisch-inflammatorischen Erkrankungen scheint die fehlgesteuerte Expression pro-inflammatorischer Gene, die Induktoren oder Mediatoren entzündlicher Prozesse sind, einen zentralen Teil der Pathogenese auszumachen.

Die Ursache der rheumatoiden Arthritis ist noch weitgehend ungeklärt. Die Krankheit ist durch eine oft symmetrisch auftretende und fortschreitende Entzündung der Gelenke gekennzeichnet, die schubweise vorwiegend die kleinen Gelenke der Finger und der Zehen befällt. Die Entzündung führt letztendlich zur Schädigung des Knorpels und zum Abbau des Knochens. Seltener werden durch die Erkrankung weitere Organe, wie die Augen oder die Haut befallen. Die Anzahl der RA-Erkrankungen weltweit wird auf etwa 0,5 – 1 % geschätzt. Pro 100 000 Einwohner werden jährlich ca. 25-30 Neuerkrankungen gemeldet (Alamanos *et al.*, 2005). Insgesamt sind 2-3 Mal mehr Frauen wie Männer von der Krankheit betroffen. Bei Patienten kann eine erhöhte Sterblichkeit als Folge von gleichzeitig auftretenden Krankheiten beobachtet werden. So sterben 42% der RA-Patienten an kardiovaskulären Erkrankungen, die wiederum vermutlich durch die chronische Entzündung verursacht werden (Callahan *et al.*, 1995; Maradit-Kremers *et al.*, 2005).

IV.1.1 Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

An der Entwicklung und Aufrechterhaltung der rheumatoiden Arthritis (RA) ist eine Vielzahl genetischer und nicht-genetischer Faktoren beteiligt. Als Ursache wird die Präsentation eines bisher noch unbekanntes Antigens durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) gegenüber T-Lymphozyten betrachtet. Diese Antigenpräsentation führt zu einer Aktivierung von T-Zellen, für welche außerdem noch ko-stimulatorische Moleküle benötigt werden (Voll *et al.*, 2005). Zusätzlich kommt es zu einer Stimulation von Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten, was zu einer abnormalen Akkumulation von Immunzellen im Gelenk führt (Joosten *et al.*, 1999). Diese Zellen synthetisieren und sekretieren ein komplexes

Die freigesetzten Zytokine aktivieren ihrerseits wiederum Chondrozyten, Osteoklasten und Fibroblasten, die daraufhin Kollagenasen und Metalloproteinasen bilden. Diese bewirken einen Abbau der extrazellulären Matrix, was letztendlich zu einer Schädigung des Knochens führt (Feldmann *et al.*, 1999; Harris, 1990). Auf der anderen Seite bewirken die T-Lymphozyten eine Aktivierung von B-Zellen, die daraufhin Immunglobuline und Antikörper produzieren. Die Bildung von Immunkomplexen sowie die Freisetzung von destruktiven Mediatoren führen zu einer Entzündung des Synoviums. Als Folge kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems und zur Freisetzung von Komplementfaktoren wie des „complement factor 5a“ (C5a). Diese sind verantwortlich für das Einwandern von Immunzellen aus der Peripherie des Gelenks in den Knorpel. Dies führt zur Ausbildung des sogenannten Pannus (Afuwape *et al.*, 2002), der aus mesenchymalen und vom Knochenmark stammenden Zellen besteht. Der Pannus lagert sich durch invasiv-destruktives Wachstum in den Knorpel ein und ruft Knochenerosionen hervor. Die Bildung des Pannus stimuliert zusätzlich die Freisetzung von IL-1, dem „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) und Prostaglandinen aus Makrophagen, was ebenfalls zur Knorpelschädigung und zum Knochenabbau führt (Voulgari, 2008).

Im Synovium von RA-Patienten ist die Produktion pro- und auch anti-inflammatorischer Zytokine erhöht. Allerdings kann ein Ungleichgewicht in Richtung der pro-inflammatorischen Mediatoren beobachtet werden.

IV.1.2 Die Bedeutung der pro-inflammatorischen Genexpression in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die RA stellt eine multifaktorielle Krankheit dar, die durch eine chronische Entzündung der Gelenke charakterisiert ist. Durch eine Ansammlung von Immunzellen im Gelenk kommt es zur Ausbildung des Pannus und schließlich zu einem Abbau des Knorpels und der Schädigung des Knochens. An diesem Prozess ist eine Vielzahl von Zytokinen (TNF- α ; IL-1, IL-6, IL-17, IFN- γ , etc.), Chemokinen (MCP-1, MCP-4, CCL18, etc.), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, etc.), verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B, STATs, AP-1, NF-AT) und inflammatorische Enzyme (iNOS, COX-2, lösliche Phospholipase A₂, Matrixmetalloproteinasen) beteiligt (Elenkov *et al.*, 2002; Firestein, 2003; LaDuca *et al.*, 2001; Smolen *et al.*, 2003). Zytokine und Chemokine regulieren das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion einer Vielzahl von Zellen und spielen eine wichtige Rolle sowohl als Mediatoren der Immunantwort als auch bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen. Nach Bindung an ihren Rezeptor induzieren die Moleküle durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B („nuclear factor κ B“) und STAT („signal transducer and activator of transcription“) verschiedene intrazelluläre

Signaltransduktionswege, die zumeist in einer veränderten Genexpression der Zielzelle resultieren (Barnes *et al.*, 1998; Holloway *et al.*, 2002; Kracht *et al.*, 2002).

Die Analyse der in der Synovialflüssigkeit vorhandenen Zytokine von RA-Patienten ergab, dass vor allem pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und GM-CSF in großen Mengen nachweisbar sind (Feldmann *et al.*, 1996).

Verschiedene Experimente liefern Hinweise, dass TNF- α eine zentrale Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen scheint. So konnte gezeigt werden, dass TNF- α in den Gelenkhaut- und Knorpelzellen die Bildung verschiedener Matrixmetalloproteasen wie Kollagenase (MMP-1) oder Stromlysin (MMP-3) und von Prostaglandin E₂ (PGE₂) steigert und die Proteoglykansynthese inhibiert. Diese Faktoren sind an der Zerstörung der extrazellulären Matrix beteiligt. Somit verursacht TNF- α die Zerstörung des Knorpels und seiner angrenzenden Knochenflächen (Feldmann *et al.*, 1992). Ferner konnte gezeigt werden, dass TNF- α die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8 und GM-CSF erhöht (Bagasra *et al.*, 1995; Butler *et al.*, 1997; Dinarello, 1997; Feldmann, 1996). Darüber hinaus induziert TNF- α in Endothelzellen die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (z.B. β_2 -Integrin, ICAM-1, E-Selektin) und fördert die Synthese von Chemokinen (z.B. MIP-1 α , MCP-4, RANTES) (Akahoshi *et al.*, 1993; Cope, 1998; Feldmann, 1996; Taylor *et al.*, 2000). Diese locken Immunzellen wie z.B. Monozyten, Neutrophile, T- und B-Lymphozyten an, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind.

T-Zellen können aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine in zwei Gruppen eingeteilt werden, die jeweils unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Dabei ist die eine Subpopulation an der Ausbildung der Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt, während die andere Subpopulation eine Rolle bei der humoralen Immunantwort spielt. Als Typ 1-T-Zellen (T_H1-T-Zellen) werden solche Lymphozyten bezeichnet, welche typischerweise IFN- γ , IL-2 und TNF- α sezernieren. Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sind charakteristisch für T-Zellen vom Typ 2 (Mosmann *et al.*, 1986).

An der Entstehung der RA sind ebenfalls autoreaktive T-Zellen vom T_H1-Typ beteiligt (Feldmann *et al.*, 1996). So konnten aus der Synovialmembran oder aus dem peripheren Blut von RA-Patienten autoreaktive T-Zellen isoliert werden, die gegen gelenkspezifische Proteinantigene wie z.B. Kollagen Typ II gerichtet waren (Londei *et al.*, 1989). Diese Zellen sezernierten nach Stimulation überwiegend die T_H1-Zytokine wie IFN- γ und IL-2 (Kasama *et al.*, 1995; Londei *et al.*, 1989; Miltenburg *et al.*, 1992; Schulze-Koops *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in entzündeten Gelenken IL-12, welches die Entwicklung von T_H1-Zellen fördert, ebenfalls vorhanden ist (Feldmann *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen zeigen, dass T_H1-Zytokine an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA beteiligt sind (Miltenburg *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1994).

IV.1.2.1 Die Rolle von NO bei entzündlichen Gelenkerkrankungen

Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) ist besonders gut für die Pathogenese entzündlicher Gelenkerkrankungen untersucht. Dabei stellt NO nicht nur einen Marker für die Erkrankung dar, sondern ist ebenfalls Mediator der Entzündung.

In Streptokokken-induzierter Arthritis in Ratten konnte *ex vivo* eine erhöhte NO-Produktion im Synovialgewebe und in neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren gemessen werden. Eine Behandlung mit L-NMMA, einem unspezifischen NOS-Inhibitor, verringerte sowohl die *ex vivo* NO-Produktion, als auch das Ausmaß der *in vivo*-Entzündungsreaktion (McCartney-Francis *et al.*, 1993). Die tierexperimentellen Ergebnisse konnten durch eine Reihe von Studien an Patienten bestätigt werden. In Patienten, die an RA erkrankt waren, konnten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Nitrit-Serumkonzentrationen gefunden werden. Auf eine intraartikuläre NO-Produktion konnte durch die viel höhere Nitritkonzentration in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu den korrespondierenden Serumproben geschlossen werden (Farrell *et al.*, 1992). Bei Patienten mit einem akuten Schub einer RA wurde eine um das 8-fache gesteigerte Urinnitritausscheidung gegenüber gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen (Stichtenoth *et al.*, 1995; Ueki *et al.*, 1996). Nach erfolgter Therapie, welche zu einer deutlichen Besserung des klinischen Befundes und zur Normalisierung der CRP-Menge im Serum geführt hat, war die Nitritausscheidung signifikant reduziert, aber nicht normalisiert. Dies wurde auf eine persistierende NO-Produktion in den verbliebenen entzündeten Gelenken zurückgeführt (Stichtenoth *et al.*, 1995). Dabei konnte man eine Korrelation der Serumnitritkonzentrationen sowohl mit den klinischen und laborchemischen Parametern der Entzündungsaktivität als auch mit den Serumkonzentrationen der Zytokine TNF- α und IL-6 feststellen. Ein Hinweis auf eine NO-abhängige oxidative Schädigung liefern erhöhte Nitrotyrosin-Konzentrationen, die im Serum und der Synovia von Patienten mit RA, nicht jedoch in Arthrose-Patienten oder gesunden Kontrollpersonen gefunden wurden (Kaur *et al.*, 1994). Nitrotyrosin wird durch die Reaktion von Peroxynitrit mit Tyrosin gebildet und stellt, da Peroxynitrit das Reaktionsprodukt von NO mit Superoxidradikalen ist, einen Index-Parameter für die NO-abhängige oxidative Schädigung *in vivo* dar.

Zusätzlich zu Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die in der Blutbahn und im entzündeten Gelenk zu finden sind, sind auch Mastzellen, Synoviozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten nach Induktion der iNOS durch Zytokine in der Lage, große Mengen NO zu bilden (McInnes *et al.*, 1996; Ralston *et al.*, 1994; St Clair *et al.*, 1996). Die intraartikuläre NO-Produktion ist dabei mitverantwortlich für die Gelenkzerstörung, da sie zu Knochenabbau, verminderter Kollagen- und Proteoglykansynthese (Taskiran *et al.*, 1994), einer Aktivierung von Metalloproteinasen (Hirai *et al.*, 2001) und Knorpelzellapoptose (Clancy *et al.*, 1997; van't Hof *et al.*, 2000) führt. Eine

hohe Konzentration von Sauerstoffradikalen trägt ebenfalls zur Knorpelzellnekrose bei (Blanco *et al.*, 1995b; Ralston *et al.*, 1994).

IV.1.3 Die Therapie der rheumatoiden Arthritis

Bei der medikamentösen Therapie der RA können vier Hauptgruppen von Medikamenten unterschieden werden, die sich durch ihre unterschiedlichen Wirkungen und therapeutischen Zielsetzungen unterscheiden. Um eine optimale Behandlung zu erzielen, werden sie deshalb häufig miteinander kombiniert.

Zur symptomatischen Therapie werden vor allem nicht-steroidale Antiphlogistika, wie z.B. NSAIDs (nonsteroidal antiinflammatory drugs) verabreicht. Es handelt sich hierbei um Substanzen, deren entzündungshemmende Wirkung im Wesentlichen durch eine nicht-selektive Hemmung der Cyclooxygenase (COX-1/2) vermittelt wird und zu einer Inhibition der Prostaglandinsynthese führt. Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen der NSAIDs sind Magenschleimhautschädigungen mit Ulkusbildungen und bei der Langzeittherapie konnte eine nierenschädigende Wirkung beobachtet werden. Zu den NSAIDs werden z.B. Salicylsäurederivate wie die Acetylsalicylsäure und Arylessigsäure- und Arylpropionsäurederivate wie Diclofenac und Ibuprofen gezählt.

Als weitere Gruppe werden Glukokortikoide zur anti-inflammatorischen Therapie eingesetzt. Die Gabe von Glukokortikoiden führt unter anderem zu einer Hemmung der Phospholipase A und zu einer Hemmung der Transkription pro-inflammatorischer Gene.

Zu den sogenannten Basistherapeutika werden die krankheitskontrollierenden Medikamente (disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARD) und langwirksame Antirheumatika (LWAR) gezählt. Diese Substanzen vermindern die Krankheitsaktivität und verlangsamen das Fortschreiten der Erkrankung. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Immunsuppressivum Methotrexat (MTX), das in 38% aller Erkrankungen in niedrigen Dosen verabreicht wird (Blumberg *et al.*, 2001). Allerdings werden nur 50% aller Patienten, die anfänglich mit MTX behandelt wurden, nach fünf Jahren weiterhin mit diesem Immunsuppressivum therapiert, was auf toxische Effekte der Substanz zurückgeführt werden kann. So wird ein erhöhtes Risiko für Leberschädigungen durch die Kombination von MTX und Leflunomid vermutet (Kremer *et al.*, 2002). Cyclosporin, das ebenfalls immunsupprimierend wirkt, kann alleine oder in Kombination mit MTX verabreicht werden. Trotz seiner Effizienz ist der Einsatz von Cyclosporin aufgrund seiner nachteiligen Effekte auf die Nierenfunktion begrenzt (Zachariae, 1999). Zu den Basistherapeutika werden noch weitere Substanzen wie Chloroquin oder Sulfasalazin gezählt.

Um optimale Ergebnisse bei der Behandlung der RA zu erzielen, werden häufig neben den Basistherapeutika zusätzlich Glukokortikoide oder NSAIDs verabreicht. Glukokortikoide können das Fortschreiten der RA verlangsamen (Bijlsma *et al.*, 2003). Eine

Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden kann aber zu kardiovaskulären und metabolischen Problemen führen. Der Einsatz der entzündungshemmenden NSAIDs wird durch seine Nebenwirkungen, die es auf den Gastrointestinaltrakt und die Niere ausübt, begrenzt. Des Weiteren müssen negative Effekte auf das kardiovaskuläre System in Betracht gezogen werden.

Neuere Basistherapeutika, sogenannte Biologicals, sind in Form von Antikörpern, löslichen Rezeptoren oder Antagonisten gegen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 gerichtet. Zu den Biologicals zählen die TNF- α -Antikörper Infliximab und Adalimumab sowie der lösliche TNF- α -Rezeptor Etanercept. Ein IL-1-Rezeptor-Antagonist (Anakinra) ist ebenfalls für die Therapie verfügbar. Seit 2006 ist ein CD20-Antikörper zugelassen, der in der B-Zell-Therapie eingesetzt wird. Die Biologicals können ebenfalls als Monotherapie oder in Kombination mit DMARDs eingesetzt werden (Klareskog *et al.*, 2004; Lipsky *et al.*, 2000; Weinblatt *et al.*, 2003). Ihre Effektivität kann durch die Kombination mit MTX oder anderen DMARDs noch gesteigert werden und sie werden besser von den Patienten toleriert. Trotz der beeindruckenden klinischen Effekte erhöht sich aber z.B. das Risiko von Infektionen wie Tuberkulose nach der Hemmung von TNF- α durch den Einsatz der TNF- α -Antikörper (Hamilton, 2004).

IV.1.3.1 Glukokortikoide in der Therapie der rheumatoiden Arthritis

Bei Glukokortikoiden (GK) handelt es sich um sehr potente Pharmaka, die bei der Behandlung einer Vielzahl von inflammatorischen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Asthma zum Einsatz kommen. Die Aufklärung der Transkriptionsmechanismen und Signaltransduktionswege bei einer Inflammation führen zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus, über den Glukokortikoide viele an der Inflammation beteiligten Signaltransduktionswege hemmen (Barnes *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2003). Glukokortikoide reduzieren im Hintergrund der RA hauptsächlich die Expression pro-inflammatorischer Gene wie Zytokine (TNF- α , IL-1, etc.) und inhibieren das Einwandern von Leukozyten ins Gelenk. GKs beeinflussen weiterhin die Funktion und die Entwicklung von natürlichen Killerzellen, T-Lymphozyten und unreifen B-Zellen.

Glukokortikoide binden im Zytoplasma an Glukokortikoidrezeptoren (GR), die normalerweise mit molekularen Chaperonen (z.B. heat shock protein 90) assoziiert sind. Diese verhindern die Translokation des Rezeptors in den Zellkern (Wu *et al.*, 2004). Glukokortikoidrezeptoren werden durch ein einziges Gen kodiert. Durch alternatives Spleißen können jedoch verschiedene Isoformen des Rezeptors entstehen. Dabei können GKs direkt an die α -Isoform binden, wohingegen die β -Isoform zwar an DNA binden kann, aber nicht durch GKs aktiviert wird (Pujols *et al.*, 2002). Nach der Bindung von GKs an den Rezeptor

dissoziiert der Komplex von den molekularen Chaperonen und wird in den Zellkern transportiert. Dort reguliert der Komplex aus Rezeptor und Glukokortikoid die Genexpression vieler Gene, zu denen unter anderem IL-1 α , IL-1 β , NF- κ B, I- κ B, TNF- α , Lipocortin-1, IL-10 und COX-2 gehören.

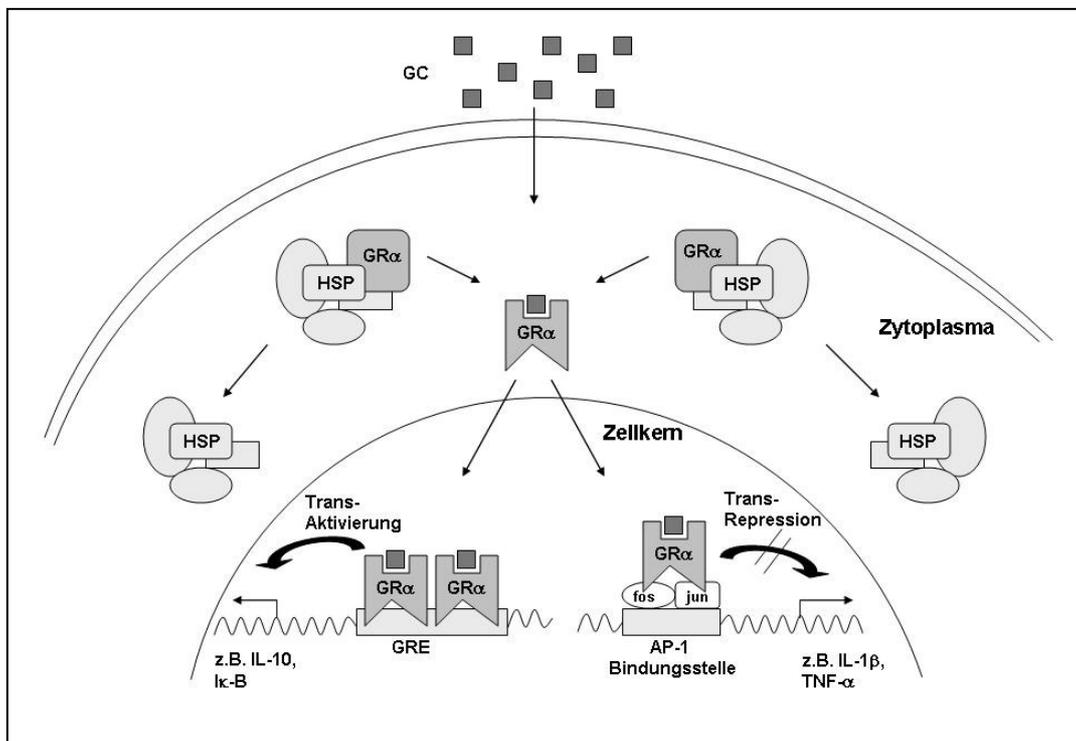


Abb. 2: Der Wirkmechanismus von Glukokortikoiden

Glukokortikoide (GC) diffundieren in das Zytoplasma und binden an den Glukokortikoidrezeptor (GR α), welcher vorher einen Komplex mit Heat-Schock-Proteinen (HSP) bildet. Es kommt zur Dissoziation des GC-GR-Komplexes und zum Transport in den Zellkern. Dort kann es einerseits durch eine Interaktion mit der DNA am Glukokortikoid-Response-Element (GRE) zur Transaktivierung anti-inflammatorischer Gene kommen. Andererseits kann der GC-GR-Komplex durch eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, der aus den Proteinen fos und jun gebildet wird, die pro-inflammatorische Genexpression inhibieren, was als Transrepression bezeichnet wird. IL-10: Interleukin 10; I κ -B: Inhibitor von κ -B; IL-1 β : Interleukin-1 β ; TNF- α : Tumornekrosefaktor- α ; AP-1: Aktivatorprotein-1

Ihre Effekte auf die Genexpression erreichen GKs auf zwei Wegen. Im Kern binden zwei GK-Rezeptor-Komplexe als Homodimer an spezifische Elemente in Promotorregionen, sogenannten „glucocorticoid responsive elements“ (GREs). Die Interaktion der GR mit GREs führt normalerweise zu einer Induktion der Transkription (*trans*-Aktivierung). Die Bindung kann aber auch zu einer Hemmung der Genexpression (*trans*-Repression) führen (Dostert *et al.*, 2004). Über die Bindung von anderen aktivierten Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B,

AP-1) kann der GR ebenfalls Einfluss auf die Genexpression nehmen (Almawi *et al.*, 2002). Die weitreichenden anti-inflammatorischen Effekte der GKs können also auf der einen Seite durch die verstärkte Transkription einer kleinen Anzahl anti-inflammatorischer Gene, wie Annexin-1, IL-10 und den I κ -B (Inhibitor von NF- κ B) erklärt werden. Auf der anderen Seite inhibieren GKs die Expression pro-inflammatorischer Gene, in dem der aktivierte GK-GR-Komplex mit Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 interagiert (Karin, 1998). Dabei stellt die Repression den Hauptwirkmechanismus der GKs dar. Die inhibitorischen Effekte der GKs scheinen auf die Interaktion des aktivierten GR und Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF- κ B und C/EBP β zurückzuführen sein (Karin, 1998). Eine direkte Protein-Protein-Interaktion des GR mit Transkriptionsfaktoren konnte für AP-1 (Jonat *et al.*, 1990; Pfahl, 1993), die p65-Untereinheit von NF- κ B (Adcock *et al.*, 1994; Caldenhoven *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1994) und einige STAT-Proteine (STAT3, STAT5, STAT6) (Moriggl *et al.*, 1997; Stocklin *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997) gezeigt werden. GRs sind außerdem in der Lage, die c-Jun-Phosphorylierung und anschließend die AP-1-Aktivierung zu verhindern, was zu einer Hemmung der Induktion des JNK-Signaltransduktionswegs führt. Die aktivierten Rezeptoren können anderen JNK-aktivierte Transkriptionsfaktoren, wie Ets-like-1 (Elk-1) und activating transcription factor-2 (ATF-2) entgegenwirken (Caelles *et al.*, 1997; Rider *et al.*, 1996; Swantek *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 1999). Weiterhin können GR durch die Erhöhung der Transkription von spezifischen Ribonukleasen, deren Zielstrukturen AU-reiche Elemente in der 3'-UTR von mRNAs darstellen, den Abbau von mRNAs (z.B. GM-CSF, COX-2) beschleunigen (Bickel *et al.*, 1990; Newton *et al.*, 1998; Ristimaki *et al.*, 1996).

Seit der erste RA-Patient mit GKs behandelt wurde, war klar, dass diese Substanzklasse einen sehr schnellen Effekt auf die Krankheitsaktivität ausübt. Allerdings ist die Frage noch ungeklärt, ob die frühen positiven Veränderungen wichtig für eine Langzeitbehandlung sind. Viele Studien konnten allerdings belegen, dass eine Langzeitbehandlung mit GKs die Zerstörung des Knochens verlangsamen kann (1954; 1959; Kirwan, 1995; Larsen *et al.*, 1977). Genauso scheint eine Kombinationstherapie mit DMARDs erfolgreicher zu sein als eine Monotherapie mit GKs (Boers *et al.*, 1997; Landewe *et al.*, 2002).

Allerdings zeigen GKs als pleiotrop wirkende Hormone viele Nebenwirkungen, die ihre Verwendung in der Behandlung der RA einschränken (McDougall *et al.*, 1994; Saag *et al.*, 1994). Die auftretenden unerwünschten Wirkungen können in direkte, späte und spezifische Effekte eingeteilt werden. Zu den direkten Nebenwirkungen werden Wasseransammlungen, Gewichtszunahme und Hypertension gezählt (Jackson *et al.*, 1981; Kalbak, 1972; Lieberman *et al.*, 1972). Zu den später eintretenden Effekten gehören Veränderungen im Knochen (z.B. Osteoporose), im Fettstoffwechsel und der Nebenniere. Osteonekrose und die Entwicklung eines grauen Stars werden zu den spezifischen und nicht vorhersehbaren Nebenwirkungen der GKs gezählt. Außerdem wurde eine um 1,5-fach erhöhte Sterblichkeit bei GK-

behandelten RA-Patienten beobachtet. Die Ursachen dafür sind aber noch unbekannt (Gabriel *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1994).

Subkutane Blutungen und ein dünner Werden der Haut sind meist die ersten Nebenwirkungen, die bei Patienten nach einer Behandlung mit GKs auftreten (Saag *et al.*, 1994). Weitere dermatologische Effekte können das Auftreten von Akne, Hirsutismus und eine verzögerte Wundheilung sein.

Bei einer Langzeittherapie mit GKs können ebenfalls gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Ulkusbildung (Messer *et al.*, 1983; Piper *et al.*, 1991), Entzündungen der Bauchspeicheldrüse (Nelp, 1961) und eine Perforation des Darms auftreten (Canter *et al.*, 1971; Gabriel *et al.*, 1991). Da GKs in der RA-Therapie oft in Kombination mit NSAIDs verabreicht werden ist jedoch nicht vollständig geklärt, welche Substanz letztendlich die gastrointestinalen Nebenwirkungen verursacht. Studien zeigen jedoch, dass GKs unabhängig von einer NSAID-Behandlung Geschwüre verursachen können. Eine Kombination beider Substanzen bringt ein um 2-4-fach gesteigertes Risiko von gastrointestinalen Beschwerden mit sich (Gabriel *et al.*, 1991).

Die Frage, ob GKs mit einem frühzeitigen Auftreten von Atherosklerose in Verbindung gebracht werden kann, ist noch nicht endgültig beantwortet (Moreland *et al.*, 2001; Raynaud, 1997). Zusätzlich zu den auftretenden Wassereinträgungen können GKs eine Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie vorantreiben, welche bekannte Risikofaktoren für koronare Herzkrankheiten darstellen.

Die schwerwiegendste und am besten untersuchte Komplikation bei langzeitiger GK-Behandlung ist das Auftreten von Osteoporose (Hall *et al.*, 1993; Haugeberg *et al.*, 2000; Peel *et al.*, 1995). GKs steigern die Osteoklasten- und hemmen direkt die Osteoblastenfunktion (Lukert *et al.*, 1990; Manolagas *et al.*, 1999). Es wurde aber auch schon beschrieben, dass eine Therapie mit low-dose GKs vor dem Knochenabbau durch eine Erhöhung der Osteoklastenaktivität und somit durch eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine schützen kann (Gough *et al.*, 1994; Sambrook *et al.*, 1989; Verhoeven *et al.*, 1997).

IV.2 Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthasen

Erst 1987 wurde entdeckt, dass das zuvor nur als Umweltgift bekannte Stickstoffmonoxid (NO) von Säugetieren produziert wird und ein wichtiger Mediator für die Regulation des Blutdrucks und der Plättchenfunktion ist. Kurz danach wurde auch die Bedeutung von NO als Effektormolekül der Immunabwehr und als Neurotransmitter bekannt.

Die lokale exzessive Bildung von NO ist an der Pathogenese verschiedener autoimmunologischer und chronisch-entzündlicher Prozesse, wie z.B. der rheumatoiden

Arthritis und Asthma beteiligt ist. Bei diesen pathophysiologischen Prozessen führt NO zu irreversiblen Zellschäden am Entzündungsort (Kleinert *et al.*, 2003; Kroncke *et al.*, 1998). Für die Bildung von NO im Entzündungsgeschehen ist die induzierbare Form der NO-Synthase (iNOS) verantwortlich. Es scheint daher sinnvoll, im Rahmen einer Therapie dieser Erkrankungen spezifisch die NO-Bildung durch die iNOS zu hemmen.

IV.2.1 NO und Isoformen der NO-Synthase

Stickstoffmonoxid (NO) ist das kleinste bioaktive Molekül (Forstermann *et al.*, 1995b) und wird von fast allen tierischen und pflanzlichen Zelltypen endogen gebildet (Hausladen *et al.*, 1998) (Choi 1995).

Die Biosynthese von NO wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS; EC 1.14.13.39) katalysiert, das im Säugetier in drei Isoformen vorkommt (Hausladen *et al.*, 1998): die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) (Forstermann *et al.*, 1995b; Geller *et al.*, 1998). Anfang der neunziger Jahre wurde erstmals in Neuronen des Ratten- und Schweinekleinhirns die nNOS identifiziert. Die eNOS konnte zuerst in bovinen Aorten-Endothelzellen gefunden werden (Bredt *et al.*, 1990; Forstermann *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1991). Diese beiden Enzyme werden konstitutiv exprimiert. Die in Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten murinen Makrophagen gefundene induzierbare NOS ist in ruhenden Zellen normalerweise nicht nachweisbar (Lowenstein *et al.*, 1993). Ihre Expression kann allerdings durch verschiedene Stimuli wie Zytokine oder LPS induziert werden (Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991). Alle Isoformen katalysieren die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin, bei der molekularer Sauerstoff (O_2) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Ko-Substrate benötigt werden. Als Ko-Faktoren des Enzyms wurden Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und Häm beschrieben (McMillan *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992). Bei der Regulation der NO-Synthasen werden als weitere Ko-Faktoren Calmodulin und 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4) benötigt. Nach einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgt die Aktivierung des NOS-Enzyms durch die Bindung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes. Im Unterschied zu der konstitutiv exprimierten eNOS und nNOS ist die Aktivität der iNOS Ca^{2+} -unabhängig, weil Calmodulin auch in Abwesenheit von Ca^{2+} als Untereinheit fest an das Enzym bindet (Cho *et al.*, 1992; Stuehr *et al.*, 1991). Durch die daraus resultierende permanente Enzymaktivität führt dies zu einer um bis zu drei Zehnerpotenzen höheren NO-Produktion im Vergleich zu der von eNOS und nNOS freigesetzten NO-Menge (Geller *et al.*, 1998), die nach einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nur einige Minuten NO produzieren. Alle drei NOS-Enzyme sind nur als Homodimere katalytisch aktiv.

IV.2.2 Die induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Die induzierbare NO-Synthase wird unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration exprimiert. Ihre Expression kann allerdings in einer Vielzahl von Zellen durch verschiedene Stimuli induziert werden (Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991; Yui *et al.*, 1991).

In Makrophagen und den meisten anderen untersuchten Zellen führt eine Behandlung der Zellen mit LPS oder einzelnen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ , IL-1 β , IL-6 oder TNF- α zu einer Induktion der iNOS-Expression. Eine Erhöhung der iNOS-Expression konnte in einer Vielzahl von Zellen beobachtet werden, unter anderem in Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Mastzellen der Ratte (Bandaletova *et al.*, 1993) als auch in Chondrozyten des Menschen (Charles *et al.*, 1993). Eine konstitutive Expression der iNOS konnte z.B. im Bronchialepithel von Ratte und Mensch (Guo *et al.*, 1995; Kobzik *et al.*, 1993) und im menschlichen Nasenepithel (Guo *et al.*, 1995) nachgewiesen werden.

Das Enzym ist nach seiner Synthese permanent aktiv und produziert große Mengen von NO, das in zu hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken kann. Makrophagen machen sich diesen Effekt zunutze, um Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten oder Tumorzellen abzutöten (Green *et al.*, 1990a; Green *et al.*, 1990b; Karupiah *et al.*, 1995). NO stellt somit einen essentiellen Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr dar (Bogdan, 2001; Kroncke *et al.*, 1995; MacMicking *et al.*, 1997).

Durch seine Fähigkeit, die Synthese von VEGF und Kollagen zu steigern, trägt von der iNOS gebildetes NO zur Wundheilung bei (Frank *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 1998). In Mäusen, die ein nicht-funktionelles iNOS-Gen exprimieren (iNOS^{-/-}), wurde eine verzögerte Wundheilung beobachtet, die durch einen adenoviralen Retransfer des iNOS-Gens wieder hergestellt werden konnte (Yamasaki *et al.*, 1998). NO wird des Weiteren eine hepatoprotektive Eigenschaft zugeschrieben (Bohlinger *et al.*, 1995; Harbrecht *et al.*, 1997).

Neben diesen positiven Effekten spielt die iNOS auch bei zahlreichen pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Bogdan, 2001; Kroncke *et al.*, 1998). Da sich das zytotoxische Potential von NO bei diesen Vorgängen gegen körpereigene Zellen richtet, ist es an der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen und chronisch-inflammatorischen Zuständen beteiligt. Durch das von der iNOS gebildete NO werden z.B. β -Zellen des Pankreas beim Diabetes mellitus Typ I zerstört (Corbett *et al.*, 1992; Kolb-Bachofen, 1996; Kolb *et al.*, 1992).

Weiterhin spielt NO eine wichtige Rolle bei der Entstehung der rheumatoiden Arthritis (Stichtenoth *et al.*, 1998). Eine selektive Hemmung der iNOS *in vivo* führt zu einer Reduktion der Entzündungssymptome und der krankheitsbedingten Veränderungen des Knochens (Connor *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1996). Des Weiteren wird angenommen, dass NO zu einer Hemmung der Kollagensynthese (Cao *et al.*, 1997;

Hauselmann *et al.*, 1994; Taskiran *et al.*, 1994), einer Steigerung der MMP-Aktivität und der Chondrozytenapoptose beiträgt (Blanco *et al.*, 1995b; Clancy *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 1998). NO steigert zusätzlich die Empfindlichkeit der Knorpelzellen gegenüber einer Schädigung durch andere Oxidantien wie H₂O₂ (Clancy *et al.*, 1997; Loeser *et al.*, 2002). In iNOS^{-/-}-Mäusen ist es nicht möglich, eine Arthritis zu induzieren (van de Loo *et al.*, 1998). NO-Inhibitoren üben einen schützenden Effekt auf den Knorpelabbau in Tiermodellen der Arthritis aus (Ohtsuka *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die iNOS und dem von dem Enzym gebildeten NO eine Rolle bei der Knorpelschädigung im Krankheitsbild der RA einnehmen.

NO wird ebenfalls eine Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Kimura *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1996), multipler Sklerose (Bagasra *et al.*, 1995; De Groot *et al.*, 1997), Asthma bronchiale (Barnes, 1996a; Barnes, 1996b; Hamid *et al.*, 1993), systemischem Lupus erythematodes und bestimmten Glomerulonephritiden und Vaskulitiden (Forstermann, 1994; Mulligan *et al.*, 1991) zugeschrieben. Des Weiteren ist von der iNOS synthetisiertes NO an der unspezifischen Form der Gewebeabstoßung beteiligt (Langrehr *et al.*, 1991) und es scheint für den massiven Blutdruckabfall beim septischen Schock verantwortlich zu sein (MacMicking *et al.*, 1995). Die Induktion der iNOS-Expression erfolgt dabei in glatten Gefäßmuskelzellen als Antwort auf LPS, das als Antigen in der Zellwand gram-negativer Bakterien zu finden ist. Das daraufhin gebildete NO hat den gleichen Wirkmechanismus wie von der eNOS produziertes NO und führt durch Vasodilatation zu schwerer Hypotension und Mikrozirkulationsstörungen. Gleichzeitig scheint die iNOS bei der Sepsis jedoch auch protektive Funktionen auf die Niere (Markewitz *et al.*, 1993) und den Darm (MacKendrick *et al.*, 1993) auszuüben.

Die Rolle der iNOS bei der Tumorentstehung ist noch nicht endgültig geklärt. NO stellt auf der einen Seite ein wirksamer Abwehrmechanismus gegen das Tumorwachstum dar, auf der anderen Seite fördert NO aber auch die Vaskularisierung und Perfusion und damit die Tumorproliferation (Chinje *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass von der iNOS produziertes NO und dessen reaktiver Metabolit Peroxynitrit die Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) steigern, was zur Bildung von Prostaglandinen führt. Diese fördern ihrerseits wieder das Tumorwachstum (Rao, 2004).

IV.3 Die Regulation der Genexpression

Seit der vollständigen Analyse des humanen Genoms ist bekannt, dass nur etwa 1,5% des genetischen Materials für Proteine kodiert (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Der weitaus größere Teil der genomischen DNA ist an der Regulation der Genexpression beteiligt. Eine differentielle Regulation der Genexpression ist in Zellen von entscheidender

Bedeutung. Sie stellt die Grundlage für die Zelldifferenzierung dar und ermöglicht es den Zellen, auf eine Änderung durch chemische Reize oder wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren. Die Regulation der Genexpression erfolgt in mehreren, differentiell regulierten Schritten im Zellkern und im Zytoplasma. Im Zellkern erfolgt die Transkription der Gene in prä-messenger-RNAs (prä-mRNA), die einer Reihe von nukleären Reifungsschritten unterliegen. Prozessierte mRNAs werden daraufhin ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation in Proteine stattfindet. Gleichzeitig kann die mRNA dort durch verschiedene Prozesse abgebaut werden. An der Regulation der Genexpression sind viele multifunktionelle Proteine im Zellkern und im Zytoplasma beteiligt, die zwischen den beiden Kompartimenten pendeln (Wilkinson *et al.*, 2001).

Die Transkription wird durch eine Reihe von allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren, RNA-Polymerasen und von in der DNA lokalisierten *cis*-Elementen wie Promotoren, Enhancern oder Silencern kontrolliert. Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind dabei essentiell für die Transkription und können dabei direkt an Promotorelemente (z.B. die TATA-Box), an die RNA-Polymerase oder an Proteine des Transkriptionsinitiationskomplexes binden. Spezifische Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, STAT, p53 oder CREB werden meist durch Proteinkinasen aktiviert und sind nur in den Zellen aktiv, in denen ein bestimmtes Gen aktiviert oder reprimiert werden soll. Die transkribierte prä-mRNA unterliegt nun weiteren Reifungsprozessen, bevor sie als reife RNA ins Zytoplasma exportiert und zu einem Protein translatiert wird. Zu den Reifungsschritten wird das Entfernen von Introns (Spleißen), das Anfügen einer 7-Methyl-Guanosin-Gruppe am 5'-Ende der prä-mRNA („Capping“) sowie die Synthese eines Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende des letzten Exons gezählt. Das Spleißen der prä-mRNA dient dabei nicht nur dem Entfernen von Introns, sondern führt durch den alternativen Gebrauch von Exons zu unterschiedlichen RNA-Transkripten. Nach der Transkription kann außerdem ein Basenaustausch stattfinden, der als „mRNA-Editing“ bezeichnet wird. Dadurch kann die mRNA-Sequenz von der zugehörigen DNA-Sequenz abweichen.

Die entstandene reife mRNA besitzt eine Struktur, die in eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR), die kodierende Sequenz (cds) und eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) unterteilt werden kann. Die untranslatierten Regionen spielen bei der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Die UTRs sind am Transport der mRNA aus dem Zellkern, der Effektivität der Translation (van der Velden *et al.*, 1999), der subzellulären Lokalisation (Jansen, 2001) sowie der Stabilität der mRNA beteiligt (Bashirullah *et al.*, 2001).

Als Beispiel eines zentral an der Immunantwort beteiligten Gens soll im Folgenden die Regulation der Genexpression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) betrachtet werden.

IV.3.1 Die Regulation der Genexpression am Beispiel der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Die Expression der iNOS als induzierbares Gen unterliegt transkriptionellen und posttranskriptionellen Mechanismen (Geller *et al.*, 1998; Kleinert *et al.*, 2003). Das Enzym bildet nach seiner Synthese bis zu seiner Degradation kontinuierlich NO, so dass auf dieser Ebene nur wenige Möglichkeiten zur Beeinflussung der Enzymaktivität bestehen (Forstermann *et al.*, 1995a; Geller *et al.*, 1998; Kleinert *et al.*, 2004; MacMicking *et al.*, 1997). Eine Regulation der Aktivität der iNOS durch eine Interaktion des Enzyms mit Proteinen, die die Dimerisierung verhindern (Daniliuc *et al.*, 2003; Ratovitski *et al.*, 1999a; Ratovitski *et al.*, 1999b), durch eine Verminderung der Arginin-Verfügbarkeit (Bruch-Gerharz *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2000), sowie durch die Veränderung der intrazellulären Konzentration des Ko-Faktors BH₄ (Muhl *et al.*, 1994) wurde beschrieben. Die Modulation der iNOS-Expression stellt jedoch den wichtigsten Faktor in der Regulation der iNOS dar (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003).

In humanen Zellen ist für eine signifikante Erhöhung der Expression des Enzyms *in vitro* meist ein Zytokingemisch aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α notwendig (Kleinert *et al.*, 2003). Weiterhin wurden auch cAMP-erhöhende Substanzen (z.B. Forskolin, 8-Bromo-cAMP, Dibutyryl-cAMP) (Eberhardt *et al.*, 1998; Koide *et al.*, 1993), Proteinkinase C-Aktivatoren wie TPA (Hortelano *et al.*, 1993; Kleinert *et al.*, 1996b) und Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF (Gilbert *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1997) als Induktoren der iNOS beschrieben. Einen inhibitorischen Effekt auf die iNOS-Induktion wurde für anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 (Bogdan *et al.*, 1994; Sands *et al.*, 1994), IL-10 (Cunha *et al.*, 1992; MacMicking *et al.*, 1997), IL-13 (Saura *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1997), Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β 1, 2, 3) (Vodovotz *et al.*, 1993), Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Genistein, Herbimycin A und Tyrphostin) (Dong *et al.*, 1993), Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B (z.B. PDTC) (Sherman *et al.*, 1993) und Glukokortikoide (De Vera *et al.*, 1997; Kleinert *et al.*, 1996b; Kunz *et al.*, 1996) gezeigt. Jedoch kann eine Substanz in einem Zelltyp stimulierend, in einem anderen aber inhibierend auf die iNOS-Expression wirken. So übt z.B. TGF- β in murinen Makrophagen und glatten Gefäßzellen der Ratte eine inhibitorische Funktion auf die iNOS-Expression aus, führt in murinen 3T3-Fibroblasten jedoch zu einer Stimulation des Enzyms (Forstermann *et al.*, 1992; Gilbert *et al.*, 1993; Schini *et al.*, 1992).

An der Regulation der iNOS-Expression scheint hauptsächlich der JAK/STAT-(Janus-Kinase/Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription-) und der NF- κ B-Signaltransduktionsweg beteiligt zu sein (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003). Eine Beteiligung des IFN- γ -JAK/STAT-Signaltransduktionswegs an der Induktion der iNOS-Expression konnte in murinen (Kleinert *et al.*, 1998a; Meraz *et al.*, 1996; Nishiya *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1996), Ratten- (Doi *et al.*, 2002; Kitamura *et al.*, 1996) und humanen Zellen

(Ganster *et al.*, 2001; Kleinert *et al.*, 1998a) beobachtet werden. In murinen 3T3-Fibroblasten führen der Zytokin- und Wachstumsrezeptor-Tyrosinkinase-Signaltransduktionsweg, der cAMP-Proteinkinase A (PKA)- und Proteinkinase C (PKC)-Weg, die in diesen Zellen allesamt eine iNOS-Induktion herbeiführen können, zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Kleinert *et al.*, 1996b). In humanen Zellen scheint die iNOS-Induktion jedoch nur teilweise von der NF- κ B-Aktivierung abhängig zu sein (Kleinert *et al.*, 1998b).

An der Regulation der iNOS-Expression sind ebenfalls die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) beteiligt. Es handelt sich dabei um eine Familie von Threonin- oder Serinkinasen, die in drei Gruppen unterteilt werden: die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERKs), zu denen p44-MAPK (ERK1) und p42-MAPK (ERK2) gehören, die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPKs), die auch als c-jun amino-terminale Kinasen (JNKs) bezeichnet werden, und die p38-MAPK.

Für die IL-1 β - oder IFN- γ -vermittelte iNOS-Induktion in Myozyten und kardialen Endothelzellen der Ratte wurde eine Beteiligung von ERK1/ERK2 beschrieben (Singh *et al.*, 1996). In murinen Makrophagen (Caivano, 1998) oder humanen DLD-1-Zellen (Kleinert *et al.*, 1998a) hat eine Inhibition von ERK keinen Effekt auf die Zytokin-induzierte iNOS-Expression. Eine Behandlung von murinen Astrozyten mit einer Kombination aus IL-1 α und TNF- α induziert die iNOS-Expression und aktiviert alle drei MAP-Kinasen. Eine Hemmung der p38-MAPK, aber nicht der ERKs führt in diesen Zellen zu einer Hemmung der iNOS-Expression (Da Silva *et al.*, 1997). In Ratten-Mesangialzellen nimmt die p38-MAPK die Funktion eines negativen Regulators der iNOS-Expression ein. Eine Hemmung des Enzyms führt dabei zu einer Verstärkung des expressionssteigernden Effekts von IL-1 β auf die iNOS-Expression (Guan *et al.*, 1997).

IV.3.1.1 Die Regulation der iNOS-Promotoraktivität

Die Analyse des iNOS-Promotors in den meisten Spezies zeigte, dass dieser in der 5'-flankierenden Region neben einer „TATA“-Box, die etwa 30 bp vom Transkriptionsstartcodon lokalisiert ist, weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besitzt, die durch Zytokine induzierbar sind (Linn *et al.*, 1997).

Bei der Regulation der iNOS-Promotoraktivität spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle (Ghosh *et al.*, 1998). Pro-inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-1 β und TNF- α vermitteln über eine Aktivierung von NF- κ B eine Induktion der iNOS, wohingegen Glukokortikoide, TGF- β 1, Antioxidantien und Inhibitoren der phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase durch Inaktivierung des Transkriptionsfaktors die iNOS-Expression hemmen (Kleinert *et al.*, 2004). Da der iNOS-Promotor jedoch kein Glukokortikoid-responsives Element aufweist (Chu *et al.*, 1998; Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993; Zhang *et al.*,

1998), kann die Hemmung der iNOS-Expression durch Glukokortikoide über eine verstärkte Expression von I- κ B (De Vera *et al.*, 1997), eine inhibitorisch wirkende Protein-Protein-Interaktion des aktivierten Glukokortikoidrezeptors mit NF- κ B (Kleinert *et al.*, 1996b) oder durch post-transkriptionelle Mechanismen erklärt werden (Cetkovic-Cvrlje *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1996). Weitere induktionsfördernde Transkriptionsfaktoren sind STAT-1 α , der Interferon-regulierende Faktor IRF-1 und das „cAMP-responsive binding“-Protein CREB. Einen negativen Einfluss auf die iNOS-Expression scheint der Transkriptionsfaktor AP-1 auszuüben, der durch die Zusammenlagerung der Proteine c-jun und c-fos gebildet wird. Eine Überexpression von AP-1 durch die Kotransfektion von c-jun- und c-fos-Expressionsvektoren führte in humanen DLD-1- und A549/8-Zellen zu einer verminderten iNOS-Promotoraktivität (Kleinert *et al.*, 1998b).

IV.3.1.2 Die Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität

In humanen Zellen korreliert die iNOS-Promotoraktivität nicht mit der Expression der iNOS-mRNA. Transfektionsanalysen mit einem 16kb-Fragment der 5'-flankierenden Sequenz des humanen iNOS-Gens und „nuclear run on“-Analysen haben gezeigt, dass die Induzierbarkeit der iNOS-mRNA-Expression (mehr als 20-fach) nicht allein durch die Zytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität (etwa 2-5-fach) erklärt werden kann (de Vera *et al.*, 1996; Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Es müssen also noch weitere Zytokin-abhängige Regulationsmechanismen zur Kontrolle der iNOS-Expression vorhanden sein. Die Modulation der mRNA-Stabilität stellt neben der Regulation der Promotoraktivität einen wichtigen Mechanismus in der Regulation der Genexpression dar (Guhaniyogi *et al.*, 2001) und scheint auch bei der Regulation der iNOS eine zentrale Rolle einzunehmen.

Bisher sind verschiedene Untersuchungen zur Regulation der iNOS-Expression durch die Modulation der mRNA-Stabilität bekannt. Die Hemmung der IL-1 β -induzierten iNOS-Expression in humanen Chondrozyten durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Geng *et al.*, 1995) wurde mit einer Destabilisierung der iNOS-mRNA erklärt. In murinen Makrophagen erniedrigt TGF- β 1 die IFN- γ -induzierte iNOS-Expression durch eine Verminderung der iNOS-mRNA-Stabilität, Inhibierung der iNOS-Translation und Verringerung der iNOS-Protein-Stabilität (Vodovotz *et al.*, 1993). Eine Hemmung der JNK in murinen J774-Makrophagen führt zu einer verminderten LPS-induzierten iNOS-Expression durch Destabilisierung der iNOS-mRNA (Lahti *et al.*, 2003). Ebenso wurde die Erhöhung der LPS/IFN- γ -induzierten iNOS-Expression in glatten Muskelzellen der Ratte durch Zugabe von Tetrahydrobiopterin (BH₄) der dadurch resultierenden Stabilisierung der iNOS-mRNA zugeschrieben (Linscheid *et al.*, 1998). Die Dexamethason-vermittelte Hemmung der LPS-

induzierten iNOS-Expression in murinen RAW-Makrophagen wurde durch die verminderte Stabilität der iNOS-mRNA erklärt (Korhonen *et al.*, 2002).

In den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) von mRNAs können sich AU-reiche Elemente (ARE) befinden, die Zielstrukturen für die mRNA-Degradation darstellen. AREs sind durch Adenylat- und Uridylat-reiche Sequenzbereiche charakterisiert. Eine Vielzahl von Proteinen kann an diese Sequenzelemente binden, was zu einer Destabilisierung von Zytokin- und Onkogen-mRNAs führt (Caput *et al.*, 1986; Dean *et al.*, 2001). Der Mechanismus des ARE-vermittelten mRNA-Abbaus ist noch nicht vollständig geklärt. Für den 3'-5'-Abbau von ARE-haltigen mRNAs wird das Exosom benötigt (Mitchell *et al.*, 2000). Das Exosom kann allerdings nicht alleine den Abbau vermitteln, sondern benötigt zusätzlich noch ARE-bindende Proteine (ARE-BP). Die ARE-BPs interagieren mit dem Exosom und führen dieses zu instabilen RNAs, wo sie zum schnellen Abbau in 3'-5'-Richtung beitragen (Chen *et al.*, 2001). Es sind aber auch ARE-BPs bekannt, die eine stabilisierende Funktion auf mRNAs ausüben.

In der 3'-UTR der humanen iNOS-mRNA sind ebenfalls fünf AU-reiche Elemente zu finden (Geller *et al.*, 1993). Die gleichen Sequenzmotive finden sich zweimal in der murinen iNOS-mRNA (Lyons *et al.*, 1992) und viermal in der iNOS-mRNA der Ratte (Galea *et al.*, 1994).

In Transfektionsexperimenten führte die 3'-UTR der humanen iNOS-mRNA zu einer Reduktion der Expression eines heterologen Reportergens (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). In den letzten Jahren sind mehrere Proteine identifiziert worden, die an AU-reiche Elemente in den 3'-UTR verschiedener instabiler RNAs binden. Das ELAV-(„embryonic lethal abnormal vision“)-Protein HuR interagiert mit der 3'-UTR der iNOS-mRNA, in dem es an die AU-reichen Elemente bindet und so die Stabilität der iNOS-mRNA in DLD-1-Zellen erhöht (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Der gleiche Effekt wird durch das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein PTB (Pautz *et al.*, 2006) vermittelt. Tristetraprolin (TTP), das nicht direkt an die iNOS-mRNA binden kann, kann jedoch zur Stabilisierung durch eine Interaktion mit dem „KH-splicing regulatory protein“ KSRP beitragen (Fechir *et al.*, 2005). KSRP ist als iNOS-mRNA-destabilisierendes Protein bekannt, in dem es das Exosom zur mRNA rekrutiert und dadurch den Abbau beschleunigt (Linker *et al.*, 2005). Der ARE/poly-(U)-binding factor (AUF-1), ein weiteres RNA-bindendes Protein, ist an der Destabilisierung ARE-haltiger mRNAs beteiligt (Misquitta *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2000). Eine Überexpression von AUF-1 in DLD-1-Zellen führt zu einer Verminderung der humanen iNOS-Expression, in dem es die Stabilität der iNOS-mRNA vermindert (Pautz *et al.*, 2009).

IV.3.1.3 Die Regulation der iNOS-Proteinexpression und der Proteinstabilität

Ein weiterer Mechanismus der iNOS-Regulation ist auf Ebene der Translation zu finden. Humane primäre Kardiomyozyten exprimieren *in vitro* nach Stimulation mit Zytokinen die

iNOS-mRNA, es kann allerdings kein iNOS-Protein nachgewiesen werden (Luss *et al.*, 1997). In COS-Zellen, die mit der aus den Kardiomyozyten isolierten iNOS-cDNA-transfiziert wurden, konnte eine iNOS-Proteinexpression beobachtet werden. Der Retransfer von cDNA-Fragmenten in die Kardiomyozyten, die nur die für das Protein kodierende Region enthielten, führte ebenfalls zu einer Expression des iNOS-Proteins. In menschlichen Kardiomyozyten müssen also Faktoren vorhanden sein, welche die Translation der iNOS durch Interaktion mit der 5'- und/oder 3'-UTR der iNOS-mRNA inhibieren (Luss *et al.*, 1997). Des Weiteren scheint die Inhibition der iNOS-Expression durch Substanzen wie TGF- β 1 in primären murinen Makrophagen (Vodovotz *et al.*, 1993) oder Dexamethason in Ratten-Mesangialzellen (Kunz *et al.*, 1996) über eine Destabilisierung von iNOS-mRNA und iNOS-Protein vermittelt zu werden.

In humanen Nierenzellen (HEK293), welche die iNOS überexprimieren, wurde gezeigt, dass das Proteasom am Abbau des iNOS-Proteins beteiligt ist (Musial *et al.*, 2001). Nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors Lactacystin war in humanen Epithelzellen und murinen Makrophagen 48 Stunden nach Induktion der iNOS eine Erhöhung des iNOS-Proteins nachweisbar (Musial *et al.*, 2001). In humanen DLD-1-Zellen war durch eine Interaktion von Calveolin-1 mit der iNOS ein gesteigerter Abbau des iNOS-Proteins durch das Proteasom zu beobachten, der durch Zugabe von Proteasom-Inhibitoren hemmbar war (Felle-Bosco *et al.*, 2000).

IV.4 Wirkstoffe aus Pilzen als Inhibitoren der Expression pro-inflammatorischer Enzyme

Selektiv wirkende Naturstoffe sind wertvolle biochemische Werkzeuge der Untersuchung von komplexen Stoffwechselwegen, die bei Erkrankungen eine Rolle spielen. Biologisch-aktive Naturstoffe, die aus Pilzen und Pflanzen isoliert wurden, haben sich als nützliche Quelle neuer Pharmaka erwiesen und eine Reihe von Naturstoffen oder von ihnen abgeleitete Derivate befinden sich unter den umsatzstärksten Medikamenten weltweit.

Entsprechend ihrem pharmazeutischen Potential werden Sekundärmetabolite aus Pilzen bereits seit mehr als 70 Jahren erforscht. Nach der Entdeckung des Penicillins durch Fleming im Jahr 1929 war der nächste Meilenstein die Entdeckung des Cyclosporins, einem immunsupprimierenden Fermentationsprodukts aus z.B. *Tolypocladium inflatum* (Dreyfuss, 1976).

Es ist auch heute noch von Bedeutung, neue Naturstoffe zu finden, die als mögliche Therapeutika zum Einsatz kommen können.

IV.4.1 Der Pilzwirkstoff S-Curvularin als Inhibitor der humanen iNOS

Zur Identifizierung neuer Naturstoffe, die als Inhibitoren der pro-inflammatorischen Genexpression eingesetzt werden können, wurden aus Pilzen Verbindungen isoliert, die durch die Hemmung des JAK2-STAT1 α -Signaltransduktionswegs die Induktion der iNOS-Expression in A549/8-Zellen negativ beeinflussen. Auf diesem Weg konnten drei Verbindungen aus unterschiedlichen *Penicillium*-Stämmen isoliert werden. Bei diesem Screening-Verfahren wurde S-Curvularin gefunden, ein Naturstoff, der schon früher aus Kulturen von *Aspergillus oryzae*, *Hansfordia pulvinata* und aus *Alternaria*-, *Curvularia*- und *Penicillium*-Spezies isoliert wurde.

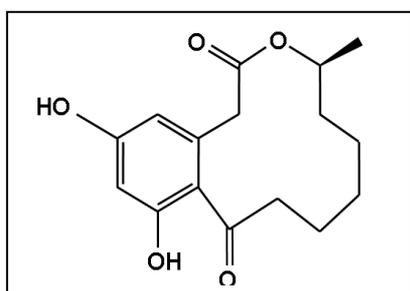


Abb. 3: Struktur von S-Curvularin

S-Curvularin führte in A549/8-Zellen zu einer Hemmung der iNOS-Promotoraktivität, der iNOS-mRNA-Expression und der iNOS-vermittelten NO-Produktion. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass S-Curvularin die Zytokin-abhängige Phosphorylierung von Tyrosin 701 von STAT-1 α inhibiert. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure stellt ein essentieller Schritt für die Dimer-Bildung, den nukleären Transfer und somit für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors dar und führt somit zu einer Reduktion der iNOS-Expression (Yao *et al.*, 2003).

IV.5 Modelle zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

IV.5.1 Humane immortalisierte Chondrozyten als in vitro-Modell der RA

Gelenkknorpel besteht fast ausschließlich aus Chondrozyten, die einzeln in Knorpelhöhlen zu finden sind. Diese sind wiederum durch ein engmaschiges Netzwerk von Kollagenfasern umgeben, die aus den Kollagenen Typ II, IX und XI bestehen und die extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes (Knorpelmatrix) bilden. Unter physiologischen Bedingungen regulieren die Chondrozyten das Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Matrixkomponenten. Die Proliferation der Knorpelzellen ist unter diesen Bedingungen stark

begrenzt. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt einzig über die Diffusion von der Gelenkoberfläche in die Chondrozyten. Im Krankheitsbild der RA spielt der Abbau der Knorpelmatrix eine wichtige Rolle. Da Chondrozyten am Auf- als auch am Abbau der Matrix beteiligt sind, ist es möglich, dass diese Zellen aktiv zu den destruktiven Prozessen bei der Pathogenese der RA beitragen.

Da Primärkulturen von humanen artikulären Chondrozyten hauptsächlich eine postmitotische Zellpopulation repräsentieren, ist ihre Verwendung zur Untersuchung der Zellphysiologie sowie der Mechanismen des degenerativen Knochenabbaus stark eingeschränkt (Aigner *et al.*, 2001a). Außerdem zeigen die Zellen nach ihrer Isolation kaum noch Proliferationsaktivität. Wenn dennoch eine Vermehrung der Zellen zu beobachten ist, geht dies mit einem Verlust ihres differenzierten Phänotyps einher, was durch Veränderungen der Genexpression deutlich wird (Stokes *et al.*, 2002). Die Gewinnung von primären Chondrozyten ist außerdem sehr schwierig und es sind große Unterschiede zwischen einzelnen Patienten zu beobachten (Aigner *et al.*, 2001b).

Um ein reproduzierbares Zellkultursystem zu etablieren, wurden primäre Chondrozyten mit dem großen T-Antigen des Simian-Virus 49 (SV40) retroviral transfiziert. So wurde die T/C-28a2-Zelllinie generiert, von denen die Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a4 abgeleitet wurden (Goldring *et al.*, 1994). Diese Zelllinien zeigen ein vergleichbares Expressionsprofil wie primäre Chondrozyten. Die Expression von SOX-9, der als Hauptregulator der Differenzierung von Chondrozyten angesehen wird, stellt dabei ein guter Marker des chondrogenen Phänotyps dar (Finger *et al.*, 2003). Ein Problem von immortalisierten Zellen ist die geringe Synthese von Matrixkomponenten. Die C-28/I2-Zellen zeigen von allen untersuchten Zelllinien die höchste Expression von Matrix-abbauenden und -aufbauenden Genen. Diese Zelllinie ist also sehr gut geeignet, die anabolen und katabolen Vorgänge sowie ihre Regulation in der Pathogenese der RA zu untersuchen (Finger *et al.*, 2003).

IV.5.2 Das Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Tiermodelle bieten experimentelle Möglichkeiten, um die zu Grunde liegenden Mechanismen einer Krankheit aufzuklären. Zum Beispiel kann die Pathogenese einer Arthritis zu verschiedenen Zeitpunkten, das heißt vor und nach der Entwicklung klinischer Symptome untersucht werden. Im Gegensatz dazu werden Patienten immer erst dann behandelt, wenn die Krankheit schon ausgebrochen ist und sich bereits Arthritissymptome zeigen. Außerdem können durch die Verwendung von genetisch identischen Tieren unter stabilen und kontrollierbaren Lebensbedingungen die Einflüsse von Umweltfaktoren weitestgehend ausgeschlossen werden.

Kollagen-Typ-II (CII) wird von Chondrozyten synthetisiert und ist nur in der extrazellulären Matrix von Knochen und Knorpel zu finden (Cremer *et al.*, 1998). Von Trentham *et al.* wurde 1977 erstmal die Induktion einer destruktiven Arthritis in bestimmten Ratteninzuchtstämmen nach einer intradermalen Immunisierung mit homologem (Ratte) oder heterologem (Huhn, Mensch) nativem Kollagen Typ II (CII) in Adjuvans beschrieben (Trentham, 1988; Trentham *et al.*, 1977). Später konnte das Modell der Kollagen-Typ-II-induzierten Arthritis (CIA) auf Mäuse (Bakker *et al.*, 1990; Wooley *et al.*, 1981) und Primaten (Cathcart *et al.*, 1986; Trentham, 1982) übertragen werden und gilt als anerkanntes Modell für die RA (Trentham, 1982). Im Mausmodell führt die Immunisierung mit heterologem CII zur Entwicklung einer akuten Arthritis (Courtenay *et al.*, 1980; Wooley *et al.*, 1981). Die Rötung und Schwellung der betroffenen Gelenke sind ein Hinweis auf die entstehende Entzündungsreaktion (Holmdahl *et al.*, 1986).

Histologisch sind die RA und die CIA durch eine stark ausgeprägte Synovitis, also eine Entzündung der Gelenkkapsel, gekennzeichnet, die mit einer Abnutzung des Knorpels und des Knochens durch den Pannus einhergeht (Stuart *et al.*, 1985). Des Weiteren wird angenommen, dass CII ebenfalls als potentiell Antigen bei der RA fungiert (Jasin, 1985; Stuart *et al.*, 1983; Watson *et al.*, 1986). Die Autoimmunantwort wird bei der CIA durch CII-spezifische T- und B-Zellen und ihre sekretierten Zytokine vermittelt und stellt somit ebenfalls eine Gemeinsamkeit zur Pathogenese der RA dar (Wooley *et al.*, 1981).

Zur Untersuchung der pro-inflammatorischen Genexpression im CIA-Modell wurden TCR- β tg-Mäuse verwendet. Diese exprimieren die β -Kette eines T-Zellrezeptors, die aus einem Kollagen-arthritogenen T-Zell-Klon isoliert wurde. Die Expression dieser transgenen β -Kette führt zu einer stärkeren Reaktion auf die Immunisierung mit heterologem CII und somit zu einer erhöhten Empfindlichkeit einer CIA (Mori *et al.*, 1992).

IV.5.3 Das Modell der LPS-induzierten akuten Inflammation

Das Modell der LPS-induzierten akuten Inflammation bietet die Möglichkeit, die frühen Vorgänge im Organismus während einer Entzündungsreaktion zu untersuchen.

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand gram-negativer Bakterien und wirken bei einer Infektion als Endotoxine. LPS bindet an „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs), die von Immunzellen, wie Makrophagen, Monozyten und Granulozyten, exprimiert werden. Diese Zellen synthetisieren und sekretieren daraufhin pro-inflammatorische Zytokine und setzen NO frei. Dies führt letztendlich zu den pathophysiologischen Symptomen der Sepsis, wie Fieber, Tachykardie, Hypotonie, Mangel an Leukozyten, verstärkte Blutgerinnung bis zum multiplen Organversagen.

V. Zielsetzung der Arbeit

Für die Entstehung und Aufrechterhaltung chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) ist die Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6), Chemokine (IL-8, MCP-1), Adhäsionsmoleküle (ICAMs) und inflammatorische Enzyme (iNOS, COX-2) von großer Bedeutung. Aufgrund dieser multifaktoriellen Genese erscheint es sinnvoll, die RA mit Pharmaka zu behandeln, die auf Ebene der Genexpression die Synthese entzündungsrelevanter Zytokine und Enzyme unterdrücken. Glukokortikoide, die zur Behandlung inflammatorischer Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, vermitteln ihre anti-inflammatorische Wirkung durch die Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression. Als pleiotrop wirkende Hormone besitzen sie jedoch viele Nebenwirkungen, wodurch ihr Einsatz in der anti-inflammatorischen Therapie begrenzt wird. Somit sind neue, die pro-inflammatorische Genexpression hemmende Substanzen für die anti-inflammatorische Therapie von entzündlichen Gelenkerkrankungen von hoher Bedeutung.

In Vorarbeiten konnten mit Hilfe molekulargenetischer Screeningverfahren Wirkstoffe aus imperfekten Pilzen isoliert werden, die die humane IFN- γ -JAK-STAT-, die NF- κ B- und die IL-6-abhängige Genexpression effizient hemmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung der anti-inflammatorischen Substanz S-Curvularin auf die inflammatorische Genexpression im Vergleich zu Dexamethason im Modell der RA untersucht werden.

Zunächst sollten Analysen der Signaltransduktionswege in der humanen Chondrozyten-Zelllinie C-28/I2 durchgeführt werden, die an der Expression der iNOS beteiligt sind. Anschließend sollte die Wirkung von S-Curvularin im Vergleich zu dem etablierten Glukokortikoid Dexamethason in diesem humanen Zellkulturmodell untersucht werden.

Die Wirksamkeit und die molekularen Wirkmechanismen des isolierten Pilz-Wirkstoffs S-Curvularin sollte weiterhin im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) überprüft werden. Dabei sollten zur Identifizierung zentraler Angriffspunkte in der Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression, die bei der RA eine Rolle spielen, Mikroarray-Analysen durchgeführt werden.

Des Weiteren sollte die Wirkung von S-Curvularin ebenfalls in einem Modell der akuten Inflammation analysiert werden. Dazu wurde das Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Entzündungsmodell verwendet, um Veränderungen der Genexpression in der akuten Phase einer Entzündung untersuchen zu können.

VI. Material und Methoden

VI.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Art	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophorese	Gleichstromquellen	Power Pac 300, Power Pac HC	BioRad
	Vertikal-Gelelektrophorese-Kammer	Mini Protean II	BioRad
Zentrifugen	Tischzentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
	Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
	Vakuumpzentrifuge	Speed Vac SC-110 mit Kühlfalle und Vapor Trap RVT 100	Savant
Messgeräte	Photometer	ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop
	Luminometer	Centro LB 960	Berthold
	NO-Analyzer	Nitric Oxide Analyzer NOA	FMI GmbH
	pH-Meter	Φ32 pH-Meter	Beckmann
	PCR-Gerät	iCycler	BioRad
Sonstige	Pipetten	1-20 µl, 20-200 µl und 100-1000 µl	Gilson
	Multipette	Multipette	Eppendorf
	Mikroliterspritze	50 µl	Hamilton
	Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus	Millipore
	Sterile Werkbank	Vacunsafe comfort	IBS Integra Bioscience
	Brutschrank	Hera Cell	Heraeus
	Zählkammer für Zellen	Neubauer-Zählkammer	Labotec
	Semi-Dry blot	Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell	BioRad
	Wasserbad	Julabo TW20	Julabo
	Mikroskop	Leitz DMIL	Leica
	Präzisionswaagen	Kern 440-35n, Kern EW	Kern
	Homogenisierer	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
	Hybridisierungsgerät	Lucidea Slide Pro Hybridizer	Amersham Bioscience
	Microarray Scanner	ScanArray Express Microarray Scanner	Perkin Elmer

VI.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Lösungen

Chemikalie/Lösung	Hersteller
Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8)	Roth
Agarose	Life Technologies, Paisley, Schottland
Anti-rabbit IgG Serum	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
ATP	AppliChem
Biorad Protein Assay	Biorad
Borsäure	AppliChem

Chemikalie/Lösung	Hersteller
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	AppliChem
Bromphenolblau	AppliChem
Chloroform	AppliChem
Coenzym A	AppliChem
Collagen Type II (chicken)	Sigma-Aldrich
Complete Freund's Adjuvant (CFA)	Otto Nordwald
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
D-Luciferin	AppliChem
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Biomol
EDTA	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	Serva
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidiniumisothiocyanat (GIT)	Roth
HCl	Roth
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Kaliumbicarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Methanol	AppliChem
Natriumacetat	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
N-Laurylsarcosine	AppliChem
5x PLB (Passive Lysis Buffer)	Promega
Phenol, Wasser-gesättigt	Roth
Ponceau S	Roth
SDS	AppliChem
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich
Tricin	Sigma
Tris	AppliChem
Tween 20	Sigma-Aldrich

VI.3 Plastikwaren

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden steril von Greiner BioOne oder Sarstedt bezogen.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Plastikwaren

Artikel	Beschreibung
Einweg-Auslaufpipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml
Zellkulturflaschen Filter Top	Kulturflasche/Volumen (cm ² /ml): 75/250 und 25/50
Beschichtete Gewebekultur-Petrischalen	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm ²): 14,5/145; 9,4/58 und 6,0/21
Zellkulturplatten, 6-Loch	Kulturfläche je Loch: 9,6 cm ²
Zellkulturplatten, 12-Loch	Kulturfläche je Loch: 3,8 cm ²
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml Spitzboden
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 1,5 ml und 2,2 ml Safe-Lock; Kryo-Röhrchen
Plastikpipettenspitzen	0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
PCR-Platten	96-Lochformat
Einwegspritzen	1 ml
Kanülen	0,40 x 12 mm, 27G x 1/2" Luer-Lock

VI.4 Reagenzien und Kits

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
Fugene HD Transfektionsreagenz	Roche
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
RNeasy Midi Kit	Qiagen
Super Script Plus Direct Labeling Kit	Invitrogen
Experion RNA StdSens Analysis Kit	BioRad
OpArray Hybridization Buffer Kit	Operon
Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Panel A Kit	R&D Systems

VI.5 Zelllinien

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zellen	Beschreibung	Quelle/Hersteller
A549/8	humane Alveolarepithel-Karzinomzellen	Edgell, J. University of North Carolina at Chapel Hill, USA
C-28/I2	humane immortalisierte Knorpelzellen	Goldring, MB. Laboratory for Cartilage Biology, Hospital for Special Surgery, Caspary Research Building, New York, USA
EA.hy 926	Fusion aus HUVEC und A549/8	Edgell, J. University of North Carolina at Chapel Hill, USA

VI.6 Plasmide

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle/Hersteller
pNOS2(16)luc	Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragments des humanen iNOS-Promotors (16 kb des humanen iNOS-Promotors in pXP2), beschrieben in: de Vera, M.E. <i>et al.</i> 1996	Geller, D.
psiRNA_H1_GFP_Zeo	shRNA-Expressionsplasmid, kodiert für ein Fusionprotein, das das Antibiotikum Zeocin inaktiviert und zum anderen grün fluoresziert	Invivogen
pHG0	Expressionsplasmid des humanen Glukokortikoidrezeptor	Dr. Pierre Chambon, Illkirch, Frankreich

VI.7 Antikörper

Als Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Primärantikörper verwendet.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper für Western Blot-Analysen

Name des Antikörpers	Klasse	Hersteller	Verdünnung	Blockier- und Verdünnungspuffer
iNOS-Antikörper	monoklonal	R & D Systems	1:5000	5 % Milchpulver 0,1 % Tween-20 in TBS
Tubulin-Antikörper	monoklonal	Sigma	1:2000	5 % Milchpulver 0,1 % Tween-20 in TBS
S100A8-Antikörper	monoklonal	Santa Cruz Antibodies	1:200	5 % Milchpulver 0,1 % Tween-20 in TBS
p38 MAPK-Antikörper	monoklonal	Cell Signaling	1:500	5 % BSA 0,1 % Tween-20 in TBS

Die Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper anti-mouse-IgG, anti-goat-IgG und anti-rabbit-IgG wurden vor Gebrauch 1:10000 in 5 % Milchpulver und 0,1 % Tween-20 in TBS verdünnt.

Als Antikörper für die fluoreszenzzytologischen Untersuchungen (fluorescence activated cell sorting, FACS) wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper für FACS-Analysen

Name des Antikörpers	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus CD4-PE (L3T4)(H129.19)	1:400	BD Biosciences
anti-Maus-IgG _{2a} -PE	1:400	BD Biosciences
anti-Maus-IgG ₁ -FITC	1:200	CALTAG Laboratories
anti-Maus-TCR-V β ₁₂	1:100	E. Schmitt, Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

VI.8 Zytokine

Alle Zytokine zur Untersuchung der iNOS-Expression wurden von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) bezogen. Sie wurden in sterilem PBS + 1% BSA gelöst, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Zytokine

Zytokin	exprimiert in	Konz. der Stocklösung	Endkonzentration
Humanes rekombinantes IFN- γ	<i>E. coli</i>	1000 U/ μ l	100 U/ml
Humanes rekombinantes IL-1 β	<i>E. coli</i>	2000 U/ μ l	50 U/ml
Humanes rekombinantes TNF- α	<i>E. coli</i>	10 ng/ μ l	10 ng/ml

VI.9 Inhibitoren

Zur Untersuchung der iNOS-Expression in Zellkulturexperimenten wurden Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege verwendet. S-Curvularin wurde von Herrn PD Dr. Erkel (Abteilung Biotechnologie, TU Kaiserslautern) für die Analysen zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Inhibitoren wurden von Calbiochem bezogen.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Inhibitor der/von	Lösungsmittel	Konz. der Stocklösung	Endkonz.
SP600125	c-Jun N-terminalen Kinase	DMSO	10 mM	10 μ M
PD98059	MEK, blockiert die Aktivierung von ERK1/2	DMSO	50 mM	50 μ M
AG490	JAK2/3, blockiert die JAK2-abhängige Aktivierung von STAT-1 α	DMSO	30 mM	30 μ M
SB203580	p38MAPK	DMSO	10 mM	10 μ M
Bay11-7082	Phosphorylierung von I κ B- α und somit der Translokation von NF κ B in den Zellkern	DMSO	30 mM	30 μ M
Dexamethason	pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren	EtOH	5 mM	5 μ M
Prednisolon	pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren	MeOH	15 mM	15 μ M
S-Curvularin	pro-inflammatorische Genexpression	EtOH	100 mM	

VI.10 Zellbiologische Methoden

VI.10.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Tabelle 11: Medien und Lösungen für die Zellkultur

Komponente	Hersteller
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 1 g/l Glucose, L-Glutamin und Phenolrot	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) ohne Glucose/l, L-Glutamin und Phenolrot	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 1 g/l Glucose, L-Glutamin, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich
PBS (steril)	GIBCO
TrypLE TM Express mit Phenolrot	GIBCO
Trypanblau-Lösung 0,4 % Trypanblau in PBS	Serva
fötale Kälberserum (FCS), Hitze-inaktiviert	HyClone
L-Glutamin (100x) 200 mM	PAN Biotech GmbH
Natrium-Pyruvat (100x) 100 mM	GIBCO
Penicillin/Streptomycin (100x) 10 mg/ml	PAA
Zeocin	Invivogen

Zur Vermeidung von Kontaminationen der Zellkulturen mit Luftkeimen (Pilzsporen, Bakterien) wurden die Arbeiten an sterilen Werkbänken unter Verwendung steriler Plastik- bzw. Glasgeräte durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in Zellkulturflaschen mit Filter-Top. Zur Kultivierung von C-28/I2-Zellen wurde Phenolrot-haltiges DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) verwendet, für A549/8-Zellen wurde dem DMEM-Medium 5 % FCS zugesetzt. Die Kultivierung von Ea.hy926-Zellen erfolgte in Phenolrot-freiem DMEM-Medium mit 10% FCS. Vor Gebrauch wurde das Serum zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 40 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Zusätzlich wurde das Kulturmedium mit L-Glutamin (2 mM), Natriumpyruvat (1 mM) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) versetzt. Stabil transfizierte Zellen wurden in DMEM-Medium, dem 0,2 mg/ml Zeocin zugesetzt wurde, selektioniert. Die anschließende Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte anschließend in Medium mit 0,1 mg/ml Zeocin.

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle vier Tage. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation bei 37 °C mit TrypLE™ Express abgelöst. Zur Weiterführung der Kultur wurden 1/10 der Zellsuspension in der Kulturflasche belassen und mit frischem Medium kultiviert. Die restlichen Zellen wurden bei Bedarf für Experimente in Zellkulturschalen bzw. Loch-Platten ausgesät, eingefroren oder verworfen. Nach zehn Passagen wurde die Zellkulturflasche gewechselt. Nach 20 Passagen wurden die Zellen verworfen, weitere Arbeiten wurden mit frisch aufgetauten Zellen durchgeführt.

VI.10.2 Herstellung einer Alginatkultur

Alginat besteht aus linearen Polymeren, die aus Braunalgen gewonnen werden. Ähnlich wie Agarose bildet es in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen ein großporiges Gel.

Zur Kultivierung der Zellen in Alginatperlen wurden diese nach der Zellzählung abzentrifugiert und ein Mal mit Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer steril filtrierten 1,2%-igen Alginatlösung resuspendiert. Für die Herstellung der Alginatperlen wurde die Zellsuspension anschließend in Calciumpuffer getropft. Nach 10-minütiger Aushärtung wurden die Alginatperlen mit PBS gewaschen und in entsprechendem Medium inkubiert.

Tabelle 12: Lösungen und Puffer für die Alginatkultur

Komponente	Konzentration
Waschlösung NaCl, pH 7,4	150 mM
Alginatlösung Alginat	1,2% in Waschlösung
Calciumpuffer CaCl ₂	102 mM

VI.10.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei wurden tote Zellen blau gefärbt, während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht aufnehmen können. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe: 0,1 mm) wurden die Zellen gezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen eines Großquadrates (bestehend aus 16 Einzelquadraten (N)) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (V) und der Kammerkonstante (10^4) ergab dabei die Anzahl der lebenden Zellen pro ml Zellsuspension ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

VI.10.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zellen wurden diese nach dem Ablösen in 5 ml Medium resuspendiert, in 15 ml-Spitzbodenröhrchen überführt und bei 1200 Upm für 5 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in Einfriermedium (FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und in 1,5 ml-Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für eine Stunde bei -20°C eingefroren und danach in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut, in ein 15 ml-Spitzboden-Röhrchen mit 5 ml Kulturmedium überführt und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in geeignetem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen mit Filter-Top übertragen.

VI.10.5 Stimulation eukaryoter Zellen mit Zytokinen

Um die iNOS-Expression in Zellen zu induzieren wurden diese mit einzelnen Zytokinen, verschiedenen Zytokinkombinationen oder einem Zytokingemisch (CM) behandelt, sobald sie ungefähr 70-80 % konfluent waren. Etwa 18 Stunden vor der Zytokinbehandlung wurde ein Mediumwechsel mit Serum-freiem Medium durchgeführt, so dass sich die Zellzyklen der Zellen angleichen konnten. Die iNOS-Expression konnte dadurch einfacher induziert werden.

Zur Induktion wurden $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml), $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) und $\text{IL-1}\beta$ (50 U/ml) alleine oder in Kombination verwendet. Das Zytokingemisch bestand aus $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{IL-1}\beta$ in den oben angegebenen Konzentrationen. Die Behandlung erfolgte für die in den Experimenten angegebenen Zeitperioden.

Beim Gebrauch von Inhibitoren wurden die Zellen mit diesen in den angegebenen Konzentrationen für eine Stunde vorbehandelt, die Zytokinstimulation erfolgte im Anschluss.

VI.10.6 Stabile Transfektion eukaryoter Zellen

Durch die stabile Transfektion wird DNA in die Zellen eingebracht und in das zelleigene Genom stabil integriert. So wird die DNA permanent exprimiert und auch an die Tochterzellen weitergegeben. Zellen, die die DNA aufgenommen haben, können durch Zugabe eines Antibiotikums in das Kulturmedium selektioniert werden. Da Wildtyp-Zellen kein Resistenzgen gegen das Antibiotikum besitzen, sterben diese ab. Das Resistenzgen liegt meist auf dem gleichen Plasmid wie das zu übertragende Gen bzw. wird durch eine Ko-Transfektion in die Zellen eingebracht. Deshalb nimmt man an, dass Zellen, die eine Resistenz zeigen, auch das gewünschte Gen aufgenommen haben und exprimieren.

Für die stabile Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Zum Ansetzen des Transfektionsgemisches wurden zunächst 2 µg DNA in 100 µl Serum-freiem Medium verdünnt. Anschließend wurden 3 µl Fugene-Transfektionsreagenz zugegeben, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation konnten sich lipophile Komplexe aus DNA und Transfektionsreagenz bilden. Das Gemisch wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch TrypLETMExpress-Behandlung abgelöst. Die Zellen konnten anschließend in Medium aufgenommen und in eine Ø 10 cm-Zellkulturschale überführt werden. Die Zellen wurden erneut für 24 h kultiviert, bevor das Selektionsmedium auf die Zellen gegeben wurde. Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt, um abgestorbene Wildtyp-Zellen zu entfernen. Die nach einiger Zeit entstandenen Zellklone wurden vereinigt und konnten mittels PCR und Luziferase-Messung auf die Integration und Expression des transfizierten Genes untersucht werden.

VI.10.7 Analyse der NO-Produktion mit dem NO-Analyzer

Nach Behandlung der Zellen mit Zytokinen konnte die iNOS-vermittelte NO-Produktion durch die Bestimmung der Nitritmenge im Zellkulturüberstand gemessen werden. Unter physiologischen Bedingungen reagiert NO schnell zu Nitrit, das bei der NO-Messung wieder zu NO umgewandelt wird. Zunächst erfolgt die Reduktion von Nitrit in Anwesenheit von Eisessig zum Nitrosonium-Ion (NO^+), welches schließlich durch Kaliumiodid zu gasförmigem NO reduziert wird. Dieses entweicht in die Gasphase und reagiert im NO-Analyzer mit Ozon unter Lichtemission zu Sauerstoff und Stickstoffdioxid.

Zur Messung der Nitritmenge wurden 50 µl der Zellkulturüberstände in eine Lösung aus 100 mM Kaliumiodid in 10 mM Eisessig eingespritzt. Die NO-Menge ist direkt proportional zu der emittierten Lichtmenge. Zum Vergleich wurde eine Eichkurve mit definierten Nitritmengen erstellt.

VI.11 Molekularbiologische Methoden

VI.11.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987) angewendet. Es wurden RNase-freie Gefäße und Pipettenspitzen verwendet. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

Zunächst wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums durch Zugabe von GIT-Puffer lysiert. Das Zelllysate wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4,0 angesäuert. Anschließend wurde 1 Volumen saures, Wasser-gesättigtes Phenol zugegeben und auf dem Vortex gut durchmischt. Nach dem Zugeben von 0,5 Volumen einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 24:1) wurde erneut gut gemischt und die Probe anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C wurde die wässrige, RNA enthaltende Oberphase von der Phenolhaltigen Unterphase, in die die DNA durch das Absenken des pH-Wertes überführt wurde, und der Protein-haltigen Unterphase getrennt. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugeben von 1 Volumen eiskaltem Isopropanol für mindestens eine Stunde bei -20°C präzipitiert. Nach der Fällung wurde die RNA durch Zentrifugation für 20 min, 13000 Upm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit 80 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 Upm, 4°C) wurde das Pellet getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Die so gewonnene RNA wurde für 6-8 Wochen bei -20°C bzw. längerfristig bei -70°C gelagert. Zur Isolierung von RNA aus Gewebe wurde dieses zunächst mit Hilfe des UltraTurrax in GIT-Puffer unter permanenter Kühlung auf Eis homogenisiert. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung

Komponente	Menge/Konzentration
GIT-Puffer	
Guanidiniumisothiocyanat	4 M
Natriumcitrat pH 7,0	25 mM
N-Laurylsarcosine	0,5 %
	vor Gebrauch 360 µl β-Mercaptoethanol/50 ml zugeben
Natriumacetat	2 M, pH 4,0
Phenol	Wasser-gesättigt
Chloroform/Isoamylalkohol	Verhältnis 24:1
DEPC-H₂O	200 µl DEPC Ad 1 l H ₂ O 16 h rühren und 2 x 60 min autoklavieren

Zur Isolierung von RNA für anschließende Microarray-Analysen wurde das RNeasy Midi Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

VI.11.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung wurde photometrisch mit dem Nano-Drop® ND-1000-Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurde 1,5 µl einer DNA- bzw. RNA-Lösung auf das Ende einer optischen Kabel-Faser pipettiert (receiving fiber). Eine zweite optische Faser (source fiber) wurde mit der Probe in Kontakt gebracht, so dass die DNA- bzw. RNA-Lösung die Verbindung zwischen den beiden optischen Faser-Enden bildete. Die Nukleinsäurekonzentration wurde automatisch aus der OD bei 260 nm und einem für die DNA bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor errechnet.

Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Ein Verhältnis von 1,8 gilt hierbei als „rein“ für eine DNA- Probe, für eine RNA-Probe beträgt das Verhältnis 2,0. Ist das Verhältnis niedriger als vorher angegeben kann dies ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinen, Phenol oder andere Verunreinigungen sein, die ihr Absorptionsmaximum bei oder in der Nähe von 280 nm besitzen.

VI.11.3 Qualitative Analyse von RNA mit dem Experion Automated Electrophoresis System

Zur Analyse der Genexpression mittels Mikroarray-Experimenten ist die Qualität der verwendeten RNA von entscheidender Bedeutung. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde das Experion Automated Electrophoresis System von BioRad verwendet. Dabei werden kleine Mengen an RNA auf einem Mikrochip analysiert. Der Chip besteht aus einer Anzahl von Plastikvertiefungen, die über eine kleine Glasplatte verbunden sind. Die Glasplatte ist von einem Netzwerk von Mikrokanälen durchzogen, wobei jeder Kanal mit einer Vertiefung in Kontakt steht. Zur Vorbereitung werden die Kanäle mit einer Gellösung beladen und anschließend die RNA-Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Mit Hilfe der Elektrophorese-Station wird die RNA nach Anlegen einer Spannung durch die Mikrokanäle geleitet. Mit diesem „microfluid“-basierten System ist es möglich, in einem Vorgang eine RNA-Probe aufzutrennen, zu färben, zu detektieren und zu analysieren.

Für die Analysen wurden Experion RNA StdSens Chips und das Experion RNA StdSens Analysis Kit verwendet. Zunächst wurden alle Reagenzien für mindestens 20 min auf Raumtemperatur erwärmt. Der RNA-Marker wurde auf Eis aufgetaut. Ein Reinigungschip wurde mit 800 µl Elektroden-Reiniger luftblasenfrei befüllt, in das Gerät eingesetzt und für 2 min darin belassen. Anschließend wurde ein Wasch-Chip mit 800 µl RNase-freiem Wasser

eingesetzt. Die Reinigung erfolgte nun für 5 min. Das Wasser wurde gewechselt und die Elektroden nochmals für 2 min gewaschen, bevor sie 1 min bei offenem Gerät getrocknet wurden.

Vor dem Beladen des RNA StdSens-Chips wurden 600 µl der Gellösung bei 5400 Upm für 10 min filtriert. Die gefilterte Lösung konnte nun für die Analysen verwendet werden. 65 µl der filtrierten Gellösung wurden mit 1 µl der Färbelösung gemischt und 9 µl in die vorgesehene Vertiefung auf dem Chip pipettiert. Anschließend wurde der Analyse-Chip in die Priming-Station eingelegt. Das Verteilen der Gellösung erfolgte für 1 min. Dann wurden die entsprechenden Vertiefungen mit 9 µl gefärbter bzw. ungefärbter Gellösung beladen. Alle anderen Vertiefungen wurden zunächst mit 5 µl Lade-Puffer befüllt, bevor 1 µl RNA-Probe (max. 500 ng) bzw. 1 µl RNA-Marker, die vorher für 5 min bei 70 °C Hitze-denaturiert wurden, zugegeben wurde. Anschließend wurde der Chip in die Vortex-Station eingespannt, für 1 min gemischt, in die Elektrophorese-Station eingelegt und der Analyse-Lauf gestartet. Die Auswertung erfolgte mit der Experion Software. Nach dem Lauf wurde der Chip entnommen, die Elektroden durch Einlegen des Wasch-Chips für 2 min gereinigt und anschließend getrocknet.

VI.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Auftrennungsvermögen ist dabei abhängig von der eingesetzten Agarosekonzentration. Es handelt sich bei der Agarose um ein lineares Polymer, das aus alternierenden D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Resten aufgebaut ist. Diese Reste bilden je nach Konzentration der Agarose unterschiedlich dichte Netzwerke aus. Durch die negative Ladung der DNA wandert diese in einem elektrischen Feld zur Anode. Es wird ein Puffer verwendet, der Ionen enthält und somit den Strom leiten kann. Je kleiner die DNA-Fragmente sind, desto schneller passieren sie das Agarose-Gel.

Tabelle 14: Puffer für die Agarose- Gelelektrophorese

Puffer	Konzentration/Menge
TBE-Puffer (10x)	
Tris/HCl, pH 8,0	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM
vor Gebrauch 1:10 verdünnen	
DNA-Probenpuffer	
Ficoll 500	20 %
Xylencyanol FF	0,1 %
Bromphenolblau	0,1 %
In TBE	

Die Agarose wurde vollständig in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit Ethidiumbromid, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, in einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml versetzt. Die gefärbte Gellösung wurde in horizontale Gelelektrophoresekammern gegossen. Nach Abkühlen und Erstarren der Agaroselösung wurde das Gel in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Agarosegelkammer gelegt. In die Taschen des Gels wurden entsprechende Mengen der zur analysierenden Probe, die mit 6 x Probenpuffer versetzt wurde, pipettiert. Der Probenpuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung, die in die Tasche absinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Der Puffer enthält die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau, so dass die DNA während des Laufs besser verfolgt werden kann. Um die Fragmentgrößen bestimmen zu können wurde der GeneRuler 50 bp DNA ladder bzw. der λ DNA/Eco91I (*BstE* II) Marker von Fermentas zusätzlich auf das Gel aufgetragen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80 V für 60-90 min. Nach der Elektrophorese wurde die DNA durch UV-Licht auf einem Transilluminator (Modell M-20) sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation fotografiert.

VI.11.5 Reverse Transkription (RT)

Mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) wurde RNA in einzelsträngige cDNA umgewandelt.

Bei dieser Methode wurde die MultiScribe™ Reverse Transkriptase verwendet, die cDNA durch Verwendung von Random-Primern und bei Vorhandensein von RNA synthetisiert. Die daraus resultierende cDNA konnte als Template für die quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) eingesetzt werden.

In Tabelle 15 ist die Zusammensetzung einer Reaktion zu sehen.

Tabelle 15: Pipettierschema einer Reaktion für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x RT Buffer	2 µl	1x
10x Random Primers	2 µl	1x
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl	1x
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1 µl	50 U
Steriles H ₂ O	4,2 µl	
RNA	10 µl	

Um das wiederholte Pipettieren kleiner Mengen zu vermeiden wurde ein Master-Mix angesetzt, dem nur noch die jeweiligen RNA-Proben zugegeben wurden. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig auf dem Vortex gemischt und durch kurze Zentrifugation

am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 25°C und anschließend bei 37°C für 2 h inkubiert. Während des ersten Inkubationsschritts konnten die Primer an die RNA binden, wodurch die reverse Transkription gestartet wurde. Die cDNA-Synthese fand durch Inkubation bei 37°C statt. An die Inkubationsschritte schloss sich die Denaturierung der Reversen Transkriptase bei 85°C für 5 sec an. Danach wurde der Reaktionsansatz auf 8°C heruntergekühlt. Alle Inkubationsschritte wurden im Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die cDNA konnte nun bei 2-8°C für 1-2 h oder bei -20°C für längere Zeit gelagert werden.

VI.11.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, lineare doppelsträngige DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Dazu muss das zu amplifizierende DNA-Fragment von zwei Primern flankiert werden, die als Start- und Endpunkt der Reaktion dienen. Es handelt sich dabei zu Strang und Gegenstrang komplementäre Oligonukleotide. In Gegenwart von freien dNTPs wird dann der korrespondierende Gegenstrang durch thermostabile Polymerasen an dem als Matrize dienenden einzelsträngigen DNA-Strang in 5' → 3'-Richtung synthetisiert.

Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen: Zuerst wird die doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Nach Absenken der Temperatur erfolgt die Anlagerung der Primer (Annealing) und als letzter Schritt, der bei der Optimaltemperatur des verwendeten Enzyms stattfindet, die Neusynthese des von den Primern eingerahmten DNA-Fragments (Elongation) durch die Polymerase. Diese Schritte können beliebig oft wiederholt werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl eine eigens hergestellte Taq-DNA-Polymerase als auch die SAWADY Taq-DNA-Polymerase von peQlab verwendet.

Die Tabelle 16 zeigt einen Standardansatz für die PCR.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die PCR

Komponente	Menge
Reaktionspuffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Template-DNA bzw. cDNA	100 ng bzw. 2 µl
SAWADY Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Die Reaktionen wurden im Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm ist der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1 initiale Denaturierung	95	4 min
2 Denaturierung	95	30 s
3 Annealing	$T_m - 5$	30 s
4 Elongation	72	1 min/kb
5 abschließende Elongation	72	4 min
6 Pause	10	∞

T_m = Schmelztemperatur der verwendeten Primer

Die Schritte 2-4 wurden jeweils 40 x wiederholt. Die Elongationszeit ist von der Größe des zu amplifizierenden Fragments abhängig.

Tabelle 18: Verwendete Oligo-Sets für die PCR

Primer/Sonde	Sequenz
huGR_sense_1	TTT GCT CCT GAT CTG ATT ATT AAT GAG C
huGR_antisense_1	AGC CTG TGT AAC TCA GAG GAA ACA TAC
huGR_sense_2	CCT AAG GAC GGT CTG AAG AGC
huGR_antisense_2	GCC AAG TCT TGG CCC TCT AT

VI.11.7 Quantitative “real-time”-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative real-time PCR wird zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA aus einer Gesamt-Zell-RNA eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der RNA-Menge wird durch die Zugabe von sequenzspezifischen TaqMan-Sonden ermöglicht. Die TaqMan-Sonden besitzen an ihrem 5'-Ende eine Markierung mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)), am 3'-Ende ist die Sonde mit einem Quencher (z.B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)) markiert. Ist die Sonde komplementär an die RNA gebunden, senden die Farbstoffe durch ihre räumliche Nähe zueinander keine Fluoreszenz aus. Da Taq-Polymerasen zusätzlich zu ihrer Polymerase-Aktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzen, wird die Sonde während der Extensionsphase der PCR gespalten, wodurch sich der Fluoreszenzfarbstoff und der Quencher voneinander entfernen und ein Fluoreszenzsignal messbar wird. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge der amplifizierten cDNA. Die Quantifizierung erfolgt letztendlich durch den Vergleich der Menge der gewünschten mRNA mit der Menge einer mRNA eines in der Zelle konstitutiv exprimierten Referenzgens (z.B. Pol2a).

Ein Ansatz für die real-time PCR enthielt folgende Komponenten:

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die „real-time“ PCR

Komponente	Konzentration/Menge
2x Taq-Polymerase Puffer	12,5 µl
dNTP's	
forward-Oligo	0,4 µM
reverse-Oligo	0,4 µM
Taq-Man Sonde	0,2 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
cDNA	2 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Um Pipettierfehler zu vermeiden wurde ein Master-Mix angesetzt, der alle Komponenten außer der cDNA enthielt. Zu je 23 µl des Master-Mix wurden dann 2 µl der cDNA in eine optische 96-Loch-PCR-Platte pipettiert. Für jede cDNA-Probe wurde zusätzlich ein zweiter Ansatz zur Bestimmung der RNA-Menge des Referenzgens analysiert.

Die PCR wurde im iCycler (BioRad) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 20: Programm für die „real-time“ PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1 initiale Denaturierung	95	15 min
2 Denaturierung	94	15 s
3 Annealing/Extension	60	60 s 40 x
4 Pause	4	∞

Die Fluoreszenzmessung erfolgte in jedem Annealing/Extension-Schritt. Alle Primer-Sonden-Kombinationen wiesen Effizienzen von 100% (+/- 10%) auf. Zur Auswertung der relativen Expressionen wurde die $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ -Methode verwendet (Livak *et al.*, 2001). Dabei wurden die Schwellenwerte (C(T)-Werte) jeder Probe auf den jeweiligen C(T)-Wert des Referenzgens normiert.

Tabelle 21: humane Primer/Sonden-Sets für die „real-time“ PCR

Primer/Sonde	Sequenz
Pol2a sense	GCA CCA CGT CCA ATG ACA T
Pol2a antisense	GTG CGG CTG CTT CCA TAA
Pol2a Sonde	TAC CAC GTC ATC TCC TTT GAT GGC TCC TAT
iNOS sense	TGC AGA CAC GTG CGT TAC TCC
iNOS antisense	GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG
iNOS Sonde	TGG CAA GCA CGA CTT CCG GGT G
S100A8 sense	CCA TGC CGT CTA CAG GGA TG
S100A8 antisense	TAT CCA ACT CTT TGA ACC AGA CGT C
S100A8 Sonde	CTG AAG AAA TTG CTA GAG ACC GAG TGT CCT CAG T
Col2A1 sense	AGA TTG AGA GCA TCC GCA GC
Col2A1 antisense	GCA GAA AAC CTT CAT GGC GTC
Col2A1 Sonde	AGA GTG GAG ACT ACT GGA TTG ACC CCA ACC A

Primer/Sonde	Sequenz
SOX9 sense	CAG TAC CCG CAC TTG CAC AAC
SOX9 antisense	GCT GGT ACT TGT AAT CCG GGT G
SOX9 Sonde	CTG GGC AAG CTC TGG AGA CTT CTG AAC G
IL-8 sense	GCC GTG GCT CTC TTG GC
IL-8 antisense	TAG CAC TCC TTG GCA AAA CTG C
IL-8 Sonde	CTT CCT GAT TTC TGC AGC TCT GTG TGA AGG
RANTES sense	ACA CCA GTG GCA AGT GCT CC
RANTES antisense	GCA CAC ACT TGG CGG TTC TT
RANTES Sonde	ACC CAG CAG TCG TCT TTG TCA CCC G
TTP sense	ACT TCA GCG CTC CCA CTC TC
TTP antisense	ACG TCA GGG CTC AGC GAC
TTP Sonde	ATG GAT CTG ACT GCC ATC TAC GAG AGC C
PTB sense	CCT GAC CAA GGA CTA CGG CA
PTB antisense	TTG AGA TCC TCC TCG GAG ACT G
PTB Sonde	CTC ACC CCT GCA CCG CTT CAA GA
HuR sense	GTG AAC TAC GTG ACC GCG AAG
HuR antisense	GAC TGG AGC CTC AAG CCG
HuR Sonde	TGC AGA GAG AGC GAT CAA CAC GCT GA
KSRP sense	GCA TCA TTG GGG ATC CTT AC
KSRP antisense	TCC GTA CTC ATT CCG GTC CC
KSRP Sonde	TGG ACA TCC TCC GGG AAC GTG ACC
AUF-1 sense	GCC TTT CTC CAG ATA CAC CTG AAG
AUF-1 antisense	CTT ATT GGT CTT GTT GTC CAT GGG
AUF-1 Sonde	TGG TGG TTT TGG TGA GGT GGA ATC CAT A
luc sense	AAA AAG TTG CGC GGA GGA G
luc antisense	TTT TTC TTG CGT CGA GTT TTC C
luc Sonde	TGT GTT TGT GGA CGA AGT ACC GAA AGG TCT TAC

Tabelle 22: murine Primer/Sonden-Sets für die „real-time“ PCR

Primer/Sonde	Sequenz
Pol2a sense	ACC ACG TCC AAT GAT ATT GTG GAG
Pol2a antisense	ATG TCA TAG TGT CAC ACA GGA GCG
Pol2a Sonde	CTG GGC ATT GAG GCT GTG CGG AA
iNOS sense	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT
iNOS antisense	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
iNOS Sonde	CTG GGC ATT GAG GCT GTG CGG AA
S100A8 sense	CTC CGT CTT CAA GAC ATC GTT TG
S100A8 antisense	TCA TTC TTG TAG AGG GCA TGG TG
S100A8 Sonde	CAA TGC CGT CTG AAC TGG AGA AGG CC
TNF- α sense	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A
TNF- α antisense	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC
TNF- α Sonde	CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA
IL-1 β sense	CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G
IL-1 β antisense	GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA
IL-1 β Sonde	CTG TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC CAC C

Primer/Sonde	Sequenz
IL-6 sense	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC
IL-6 antisense	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
IL-6 Sonde	CAG AAT TGC CAT TGC ACA ACT CTT TTC TCA
MIP-1 α sense	CTG CAA CCA AGT CTT CTC AGC
MIP-1 α antisense	CTG CCT CCA AGA CTC TCA GG
MIP-1 α Sonde	ACT GCC TGC TGC TTC TCC TAC AGC C

VI.11.8 DNA-Mikroarray-Analyse

Genchips finden vor allem in der Genomanalyse, der Diagnostik und bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression Anwendung. Mit dieser Technik ist es möglich, die Expression vieler Gene parallel nachzuweisen. Für die Analysen dieser Arbeit wurden Mikroarrays verwendet, die auf synthetisch hergestellten Oligos beruhen. Diese dienen als Sonden, die an definierten Positionen eines Glasobjektträgers aufgebracht werden. Zunächst wird die RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und schließlich in einer Reaktion zu cDNA umgeschrieben und gleichzeitig mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese werden dann mit den DNA-Mikroarrays hybridisiert. Hierbei bindet die markierte cDNA an ihr komplementäres Gegenstück auf dem Array. Nach verschiedenen Waschschrritten wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des Genchips mittels eines Lasers ausgelesen.

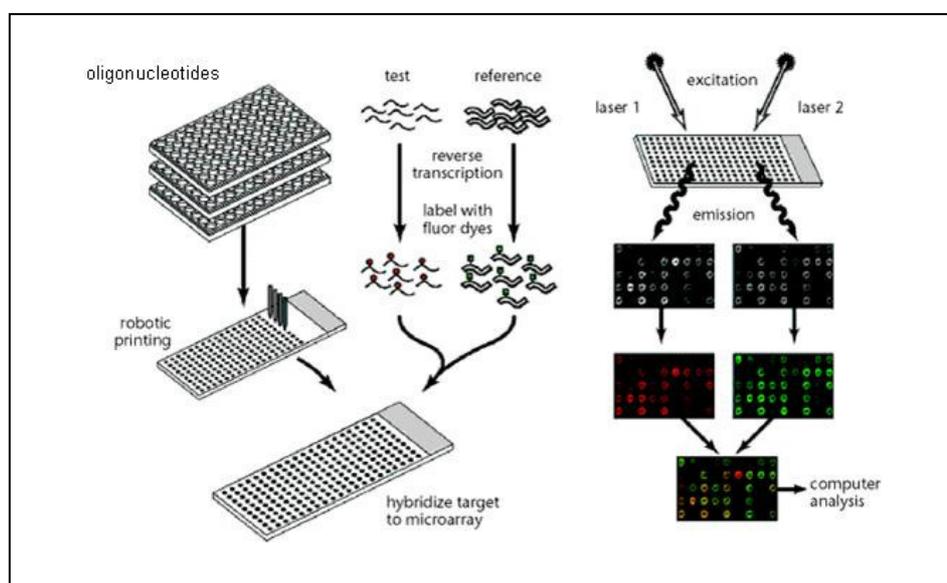


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Mikroarray-Analyse

Zur Herstellung eines Arrays werden Oligo-Sonden mittels eines Roboters auf den Mikroarray aufgebracht. Aus den zu untersuchenden Populationen wird die RNA isoliert. Bei der reversen Transkription wird die cDNA durch den Einbau fluoreszierender Farbstoffe markiert. Die so markierte cDNA wird zu gleichen Teilen für die Hybridisierung mit dem Mikroarray eingesetzt. Die einzelnen Signale werden mit Hilfe eines Arrayscanners ausgelesen. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden mit Hilfe verschiedener Computerprogramme ausgewertet.

VI.11.8.1 Isolierung und Markierung der RNA

Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe wie unter VII.11.1. beschrieben isoliert. Nachdem die Qualität der RNA mit dem Experion-System (VII.11.3.) überprüft wurde, wurden 20 µg RNA für die Markierungsreaktion eingesetzt. Zum Markieren der RNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor®555 und Alexa Fluor®647 wurde das SuperScript™ Plus Direct cDNA Labeling System Kit von Invitrogen verwendet. Zunächst wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tabelle 23: Reaktionsansatz zur Markierung der RNA (A)

Komponente	Menge
Gesamt-RNA	20 µg
Anchored Oligo(dT) ₂₀ Primer (2,5 µg/µl)	2 µl
DEPC-H ₂ O	ad 15 µl

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gehalten. Dann wurden folgende Komponenten zu dem bereits vorhandenen Reaktionsansatz gegeben:

Tabelle 24: Reaktionsansatz zur Markierung der RNA (B)

Komponente	Menge
5x First-Strand Buffer	6 µl
0,1 M DTT	3 µl
10x Nucleotide Mix mit Alexa Fluor®555-aha-dUTP oder	3 µl
Alexa Fluor®647-aha-dUTP	
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™III RT (400 U/µl)	2 µl

Die Einzelkomponenten wurden vorsichtig gemischt. Nach der Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe ist es wichtig, die Reaktionen immer im Dunkeln zu halten, um ein Ausbleichen zu verhindern. Es folgte eine Inkubation bei 46 °C für 3 h. In diesem Schritt erfolgte die cDNA-Synthese und –Markierung.

Nach der Synthese wurde durch Zugabe von 15 µl 0,1 M NaOH zu jedem Reaktionsansatz und einer Inkubation bei 70 °C für 30 min die Original-RNA degradiert. Zur abschließenden Neutralisierung wurde zu jedem Ansatz 15 µl 0,1 M HCl gegeben.

Um überschüssige Nukleotide und Reaktionspuffer zu entfernen wurde die Fluoreszenzmarkierte cDNA mit dem Purification-Modul aufgereinigt. Dabei wurde der Reaktionsansatz zunächst mit 700 µl des Binding-Buffers gemischt und auf die Aufreinigungssäulen gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 5400 Upm für 1 min. Das Filtrat wurde ein zweites Mal über die Säule gegeben und schließlich verworfen. Dann wurde die Säule mit 600 µl Wash-Buffer durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 30 sec gewaschen. Zum Trocknen der Säule wurde die Zentrifugation wiederholt. Um die cDNA zu

eluieren, wurden 20 µl DEPC-H₂O in die Mitte der Säule pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde nochmals auf die Säule gegeben, inkubiert und zentrifugiert, um die Konzentration der markierten cDNA zu erhöhen. Um die Effizienz der Markierung zu bestimmen wurde diese mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers bestimmt. Die gereinigte cDNA wurde dann bis zur Hybridisierung bei -20 °C gelagert.

VI.11.8.2 Hybridisierung des Genchips

Für die Genexpressionsanalysen wurden total-genomische *Mus musculus* (mouse) OpArrays™ von Operon mit dem dazugehörigen OpHyb Hybridization Buffer Kit verwendet. Diese Genchips enthalten 35 852 Sonden, die 25 000 Gene und etwa 38 000 Transkripte repräsentieren. Vor der Hybridisierung wurden zunächst die benötigten Puffer angesetzt bzw. nach Herstellerangaben verdünnt.

Tabelle 25: Puffer für die Hybridisierung

Komponente	Menge
20x SSPE-Puffer	
NaCl	175,3 g
NaH ₂ PO ₄	27,6 g
EDTA	9,4 g
ad H ₂ O	1 l
pH 7,4 mit NaOH einstellen, 20 min autoklavieren, vor Gebrauch 1:20 verdünnen	
Waschlösung 1	OpArray Wash B 1:40 mit diH ₂ O verdünnen
Waschlösung 2	
OpArray Wash A	10 ml
OpArray Wash B	5 ml
H ₂ O	ad 100 ml
vor Gebrauch auf 42 °C erwärmen	
Waschlösung 3	
OpArray Wash A	10
H ₂ O	ad 100 ml
Waschlösung 4	
OpArray Wash A	1 ml
H ₂ O	ad 100 ml
Prä-Hybridisierungspuffer	
vor Gebrauch auf 42 °C erwärmen	

Die Hybridisierung wurde im Lucidea Slide Pro Hybridizer (Amersham Bioscience) durchgeführt. In Tabelle 26 ist der detaillierte Ablauf der Hybridisierung dargestellt. Zur Hybridisierung wurden gleiche Teile der fluoreszenzmarkierten cDNA eingesetzt.

Nach vollständigem Trocknen der Chips wurden diese entnommen. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem ScanArray 4000 System detektiert und mit der Software ScanArray Express 4.0 (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) ausgewertet.

Tabelle 26: Ablauf der Hybridisierung

Schritt	
Prä-Hybridisierung	60 min, 42°C
Waschen	Waschlösung 1
Spülen	dest. H ₂ O
Spülen	EtOH absolut
Trocknen	37°C
SSPE-Puffer	
Injizieren der markierten cDNA	
Hybridisierung	42°C für 16 h
Waschen	Waschlösung 2 bei 42°C
Abkühlen auf Raumtemperatur	
Waschen	Waschlösung 3
Waschen	Waschlösung 4
Trocknen	

VI.11.8.3 Auswertung der Genchips

Zur Bestimmung der Fluoreszenzsignale der einzelnen Spots auf dem Genchip wurde das Programm ScanArray Express verwendet. Dazu wurde zunächst im Easy Quant-Modus eine Vorlage definiert, die dem Design des Arrays entspricht. Dazu wurde die mitgelieferte Datei verwendet, in der Informationen für jeden Spot des Arrays hinterlegt sind. Nach anschließender Kontrolle der Positionierung des Gitters konnte der Genchip quantifiziert werden. Als Auswertungsmethode wurde der „Fixed circle“-Modus, als Normalisierungsmethode die Total-Methode (Yang *et al.*, 2001) gewählt. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden als „.csv“-Datei gespeichert. In dieser Datei sind Informationen wie die Spotintensitäten des gesamten Genchips gespeichert.

Die weitere Auswertung der Mikroarrays erfolgte mit Hilfe von Mikroarray-Daten-Verarbeitungsprogrammen, die am Institute for Genomic Research (TIGR) entwickelt wurden. Zunächst wurde die „.csv“-Datei im „Express Converter“-Programm in sogenannte „.mev“- und „.ann“ (annotation)-Dateien umgewandelt, die für die Verwendung aller weiteren Programme benötigt werden. Um weitere Berechnungen durchführen zu können, müssen die gewünschten („good“ Spots; Gene) von den unerwünschten Informationen („bad“ Spots; Puffer, Marker, etc.) unterschieden werden. Dies wird durch eine Markierung mit den Buchstaben „A“ und „C“ erreicht, wobei alle Gene mit einem „C“ markiert werden. Alle weiteren Berechnungen werden nur mit den „C“-markierten Informationen durchgeführt.

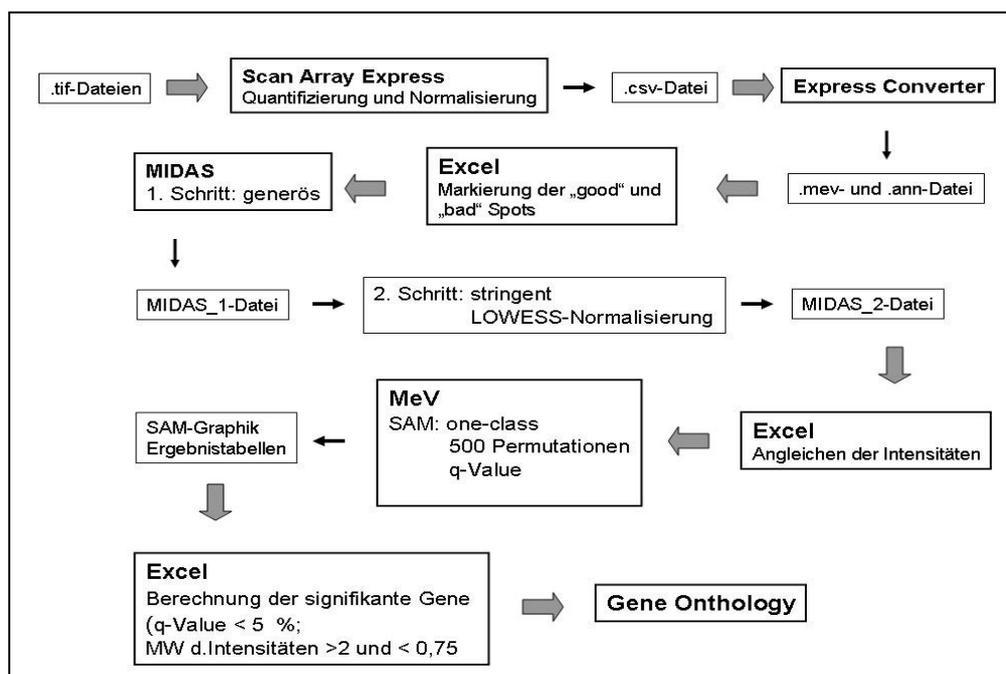


Abb. 5: Schematische Darstellung der Auswertung von Mikroarrays

Zur weiteren Normalisierung der Daten wurde das Programm „TIGR MIDAS“ (Microarray Data Analysis System) verwendet. Es wurde eine 2-Stufen-Normalisierung durchgeführt. Im ersten Schritt wurde für die „One Bad Channel Tolerance Policy“ die Einstellung „generös“ gewählt. Dabei wird, wenn ein Kanal die Intensität ≤ 0 , der andere Kanal eine Intensität > 0 aufweist, der Kanal mit der Intensität ≤ 0 auf einen Wert gesetzt, der 10% der kleinsten Intensität entspricht. So wird verhindert, dass in diesem ersten Berechnungsschritt Daten verloren gehen, die sich in den verschiedenen Versuchsgruppen stark unterscheiden. Im zweiten Schritt wurden die Bedingungen stringenter gewählt, wodurch Spots, deren Intensität ≤ 0 ist, für weitere Berechnungen nicht mehr berücksichtigt werden. In diesem Schritt wurde die „LOWESS“-Normalisierung durchgeführt. Die so erhaltene Datei konnte für alle weiteren Berechnungen verwendet werden.

Um eine größere Anzahl an Einzelexperimenten zu erhalten, wurden die Einzelintensitäten aus der MIDAS-Normalisierung aller durchgeführten Genchips auf eine gemeinsame Gesamtintensität angeglichen. So war es möglich, die Ergebnisse verschiedener Arrays untereinander zu vergleichen. Die korrigierten Daten wurden anschließend mit dem „Multi Experiment Viewer“ (MeV) statistisch ausgewertet.

Der statistischen Auswertung wurden die korrigierten Daten zugrunde gelegt. Für die Analyse wurde zusätzlich die Annotationsdatei benötigt. Nach dem Öffnen der beiden Dateien erhielt man zunächst eine sogenannte „heat-map“, in der die Expressionsstärke eines einzelnen Gens in den verschiedenen Experimenten nebeneinander dargestellt wird. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde anschließend eine „one-class“-SAM (significance analysis of microarrays)-Analyse durchgeführt. Dabei werden signifikante Gene auf der Basis

ihrer differentiellen Expression in verschiedenen Experimenten ermittelt. Dafür gilt die Annahme, dass die Mehrzahl der Gene nicht reguliert wird. Für die Analyse wurden 500 Permutationen durchgeführt. Des Weiteren wurde der q-Value berechnet. Als Ergebnis erhält man zunächst eine graphische Darstellung der Analyse (SAM-Graph). Die Anzahl der putativ falsch signifikanten Gene sollte $\leq 5\%$ der signifikanten Gene betragen. Die aus der SAM-Analyse resultierenden Ergebnistabellen wurden als Grundlage für alle weiteren Berechnungen verwendet.

Abschließend wurde zuerst der Logarithmus der Intensitäten in Verhältnisse umgewandelt. Nach der Bildung des Mittelwerts und der Standardabweichung der Intensitäten eines Gens aus den Einzelexperimenten wurden die Gene ermittelt, deren q-Value $\leq 5\%$ und bei denen der Mittelwert der Verhältnisse behandelt/unbehandelt ≥ 2 oder ≤ 0.75 war. Nur solche Gene wurden als signifikant angesehen.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Funktionen des „Panther Classification“-Systems verwendet.

VI.12 Proteinbiochemische Methoden

VI.12.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen

Analysen der Proteinexpression wurden in Gesamtzellextrakten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 200 μl PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) lysiert und mindestens 1 h bei -20°C eingefroren.

VI.12.2 Quantifizierung von Proteinen

Der Bio-Rad Protein Assay zur Bestimmung von Proteinen beruht auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Nach Bindung des Farbstoffs einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung verändert sich deren Absorptionsmaximum von 495 nm auf 595 nm. Diese Änderung kann photometrisch verfolgt werden.

Für einen Standardansatz wurden 1-10 μl einer Proteinlösung mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 100 μl verdünnt. Zu diesem Ansatz wurden 100 μl einer 40 %-igen Bio-Rad Protein Assay-Lösung zugegeben. Da es sich um eine enzymatische Reaktion handelt, wurden die Proben für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm gemessen wurde. Zusätzlich wurde eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen von BSA erstellt.

VI.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Bei der Komponente Natriumdodecylsulfat (SDS) handelt es sich um ein anionisches Detergens. SDS kann alle hydrophoben Gruppen eines Proteins über seine lipophile Kohlenwasserstoffkette binden und so seine negative Ladung auf das Protein übertragen. Dies führt zur Maskierung der eigentlichen Ladung des Proteins und stellt sicher, dass alle Proteine ein nahezu identisches Ladung-Masse-Verhältnis erhalten. Infolgedessen werden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel fast ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem kurzen Sammelgel und einem langen Trenngel. Auf das niederprozentige, weitporige Sammelgel werden die Proteinproben aufgetragen und nach Anlegen einer elektrischen Spannung konzentrieren sich die Proben an der Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel. Im engporigen Trenngel werden die Proben dann nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Herstellung eines SDS-Gels wurden zwei Glasplatten sorgfältig mit Ethanol gereinigt, zu einem Sandwich zusammengebaut und in eine Halterung zum Gießen des Gels eingespannt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 27 zu entnehmen.

Tabelle 27: Pipettierschema für Trenngele

Komponente	%iges Gel	7,5 %	10 %	15%
30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid		2,8 ml	3,75 ml	5,5 ml
H ₂ O		5,8 ml	4,5 ml	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8		2,8 ml	2,8 ml	2,8 ml
10% SDS		112 µl	112 µl	112 µl
TEMED		7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
10% APS		75 µl	75 µl	75 µl

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine gerade Grenzlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Die Polymerisierung erfolgte bei Raumtemperatur. Das Wasser wurde vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt, bevor das Sammelgel auf das Trenngel gegossen wurde. Die Acrylamidkonzentration betrug 4%, so dass eine weitere Porengröße entstand. Die Zusammensetzung des Sammelgels ist Tabelle 29 zu entnehmen.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Sammelgels (4%)

Komponente	Menge
30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid	650 µl
H ₂ O	3,05 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
TEMED	6,5 µl
10% APS	33 µl

Die Sammelgel-Mischung wurde bis zum Rand der Glasplatten eingefüllt und ein Kamm luftblasenfrei eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Kamm wieder entfernt. Das Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt und die Gelkammer mit 1 x Laufpuffer gefüllt. In die Geltaschen wurden nun die Proteinproben aufgetragen. Dazu wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach der Denaturierung der Proteinproben wurden diese kurz bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge (Hermle Z233 M-2) zentrifugiert. Nicht verwendete Taschen wurden mit SDS-Probenpuffer gefüllt, um ein gleichmäßiges Laufverhalten zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Proteingrößen nach der Auftrennung wurde ein Molekulargewicht-Standard (BenchMark™ Protein ladder, Invitrogen) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt.

Tabelle 29: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Komponente	Menge/Konzentration
Lauf-Puffer (5x)	
Tris	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
H ₂ O	ad 1 l
Vor Gebrauch 1:5 verdünnen	
Laemmli-Probenpuffer (5x)	
Tris/HCl pH 6,8	312,5 mM
EDTA	5 mM
Glycerin	50 %
SDS	15 %
Bromphenolblau	0,015 %
DTT	40 mM

VI.12.4 Immunodetektion mittels Western Blot

In Western Blot-Analysen können Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1992). In einem SDS-Gel aufgetrennte Proteine werden in einem senkrecht zum Gel angelegten elektrischen

Feld auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend kann das Protein mit spezifischen Antikörpern (Primärantikörper) detektiert werden. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird dann mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers, der meistens gegen die Fc-Bereiche des Primärantikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht. Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym, meistens eine Peroxidase, katalysiert die Umsetzung eines zugegebenen Substrats zu seiner oxidierten Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Visualisierung erfolgt schließlich durch Belichtung eines Positivfilms.

Um eine Antikörperdetektion von Proteinen durchführen zu können, wurden die Proteine zuerst mittels SDS-PAGE (VI.12.3) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran (Millipore) transferiert. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und durch Schwenken in Transferpuffer aktiviert. Zusätzlich wurde 3MM Whatmann-Papier auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran und die Filterpapiere werden ebenfalls vor dem Zusammenbau in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot wie in Abbildung 6 zusammengesetzt.

Tabelle 30: Lösungen für die Detektion mittels Western Blot

Komponente	Menge/Konzentration
Transferpuffer	
Tris/HCl, pH 7,8	25 mM
Glycin	960 mM
Methanol	20 %
Ponceau S-Färbelösung	
Ponceau S	0,5 %
Eisessig	1 %
TBS	
Tris/HCl, pH 7,8	10 mM
NaCl	150 mM
Waschpuffer (TBST)	
Tween-20	0,1 % in TBS
Blockierungslösung	
Milchpulver	5 % in TBST

Es muss darauf geachtet werden, dass sich zwischen dem SDS-Gel und der Nitrocellulose-Membran keine Luftblasen befinden, da sonst der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran beeinträchtigt wird. Der Transfer erfolgte 1-1,5 Stunden bei 12 V.

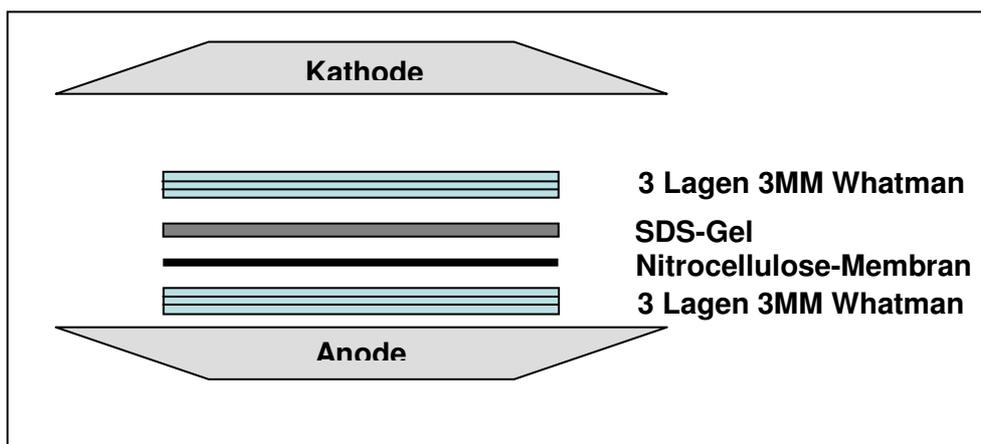


Abb. 6: Aufbau eines Western Blots

Zum Transfer von Proteinen von einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran wurde der Western blot in angegebener Reihenfolge zusammengesetzt.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst für einige Minuten mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um die Transfereffizienz zu kontrollieren. Anschließend wurde die Membran durch Spülen mit Wasser wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran 60 min bei Raumtemperatur in 5 ml Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wird die Membran mit den entsprechenden Primäantikörpern, die in Blockierungslösung verdünnt wurden, überschichtet und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Die Membran wurde nach der Antikörperinkubation 5 x für je 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, um den Primäantikörper zu entfernen. Der Blot wurde dann mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörper, der ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt wurde, überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneuten Waschschrinen mit Waschpuffer und TBS konnte der Blot mit Hilfe des ECL-Systems (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) detektiert werden. Die dabei entstandene Chemilumineszenz wurde auf einen Röntgenfilm übertragen.

VI.12.5 Immunodetektion mit dem Proteome Profiler™ (R&D Systems)

Zur Analyse pro-inflammatorischer Mediatoren in Gewebeproben von Mäusen wurde das „Mouse Cytokine Array Panel A“ von R&D Systems verwendet. Mit diesem Kit ist es möglich, die Expression vieler Zytokine und Chemokine gleichzeitig in einer Probe zu messen. Dies wird durch spezifische Antikörper ermöglicht, die in Duplikaten auf Nitrocellulose-Membranen aufgebracht wurden.

Zur Herstellung der Zelllysate wurde das Gewebe in Lyse-Puffer mit Hilfe eines Ultraturax homogenisiert und anschließend bei 4 °C für 30 min auf einem „end-over-end“-Schüttler

inkubiert. Um Zellrückstände aus der Probe zu entfernen, wurden die Proben bei 13000 Upm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein BioRAD Protein Assay (VI.12.2) durchgeführt. Zur Analyse wurden gleiche Mengen an Protein verwendet. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht, die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut. Zunächst wurden 2 ml des Array Buffer 6 in jede Kammer der Auffangschale gegeben. Die Membranen wurden anschließend in jeweils eine Kammer gelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Proteinproben wurden mit Array Buffer 4 auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufgefüllt, mit 15 µl des Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Puffer aus der Auffangschale vorsichtig entfernt und die vorbereiteten Proteinproben auf die Membranen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler. Die Membranen wurden nach der Inkubation entnommen und in separaten Schalen drei Mal mit jeweils 20 ml Wash Buffer für 10 min gewaschen. Der Peroxidasegekoppelte Streptavidin-Antikörper wurde in Array Buffer 5 verdünnt und jeweils 1,5 ml in jede Kammer der Auffangschale pipettiert. Die Membranen wurden wieder in die Auffangschale überführt und für 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen mit dem „Western Lightning Chemiluminescence Reagent“ Plus überschichtet und eine Minute inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Exposition von Röntgenfilmen.

Tabelle 31: Reagenzien und Lösungen für den Proteome Profiler™

Komponente	Menge/Konzentration
Lyse-Puffer	
NP-40	1%
Tris/HCl pH 8	20 mM
NaCl	137 mM
Glyzerin	10%
EDTA	2mM
Aprotinin	10 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml
Array Buffer 4	
Array Buffer 5	
Array Buffer 6	
Detection Antibody Cocktail	in 100 µl H ₂ O lösen
25x Wash Buffer	vor Gebrauch 1:25 mit H ₂ O verdünnen
Streptavidin-HRP	vor Gebrauch 1:2000 in Buffer 5 verdünnen

VI.13 Tierexperimente

In den verschiedenen Experimenten wurden Mäuse aus Inzuchtstämmen verwendet. Alle Tiere wurden im institutseigenen Tierstall gezüchtet.

TCR- β tg-Mäuse (H-2^a) Dr. L. Mori, Exp. Immunologie, Kantonsspital (Basel)

C57BL/6-Mäuse (H-2^b) ZVTE

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden. Die Tiere hatten ständigen Zugang zu Futter und Wasser.

VI.13.1 Blutentnahme zum Nachweis von Zelloberflächenmolekülen mittels FACS-Analysen (fluorescence activated cell sorting)

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf Zellen kann mittels direkter oder indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Fluoreszenzzytologische Untersuchungen wurden mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle durchgeführt, die entweder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren oder indirekt mittels markierter Sekundärreagenzien. In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. In einem FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) wurden die Fluoreszenzfarbstoffgruppen mit einem Argon-Laserstrahl (488 nm) angeregt und die Lichtemission gemessen. Detektiert wurde hierbei die Stärke der Ableitung der Zellen im elektrischen Feld, die proportional zur Menge der gebundenen Fluoreszenzmoleküle und damit zur Dichte des spezifisch zu detektierenden Antigens auf der Zelloberfläche ist. Da diese Detektion auf Einzelzellebene geschieht, liefert die FACS-Analyse nicht nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein bestimmte Oberflächenantigene, sondern lässt auch auf die Expressionsstärke des Antigens auf den einzelnen Zellen schließen. Als Ergebnis ist die relative Anzahl der fluoreszierenden Zellen gegen die Intensität der Fluoreszenz dargestellt.

Die Typisierung der TCR- β tg-Mäuse erfolgte durch indirekte Doppelfluoreszenzfärbung von TCR-V β ₁₂ und CD4. Die zu testenden Zellen wurden wie folgt vorbereitet:

Durch Anritzen der Schwanzvene wurde den Mäusen 3-4 Tropfen Blut entnommen und in 1 ml EDTA-Puffer aufgefangen. Die zellulären Bestandteile des Blutes wurden für 5 min bei 2500 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 4 ml kaltem ACK-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand ebenfalls verworfen. Die Monozyten des peripheren Blutes wurden auf eine 96-Loch-Spitzbodenplatte überführt, abzentrifugiert (2200 Upm,

2 min, 4°C), die Überstände dekantiert und die Zellen mit jeweils 100 µl GM-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in jeweils 50 µl GM-Puffer mit anti-TCR-Vβ₁₂-mAK (10 µg/ml) resuspendiert. Nach der Inkubation für 20 min bei 4°C wurden die Zellen abzentrifugiert, zwei Mal mit 100 µl GM-Puffer gewaschen und anschließend mit anti-Maus-IgG₁-FITC für 20 min und 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden diese in je 50 µl GM-Puffer mit Phycoerythrin-konjugiertem anti-CD4-Antikörper oder Isotypkontroll-Antikörper (Maus-IgG_{2a}, PE-konjugiert) für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Isotypkontrolle diente später der Einstellung des Durchflusszytometers und der Bestimmung der unspezifischen Fluoreszenz. Abschließend wurden die Zellen erneut zwei Mal mit 100 µl GM-Puffer gewaschen und in 400 µl GM-Puffer in sterile FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Analyse wurden die Zellen bei 4°C und dunkel gehalten, um ein Ausbleichen der der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

Die Messungen erfolgten an einem FACScan.

Tabelle 32: Puffer für die FACS-Analysen

Komponente	Menge/Konzentration
EDTA-Puffer	
EDTA	30 mM
NaN ₃ in PBS	0,01 %
ACK-Puffer	
NH ₄ Cl	150 mM
KHCO ₃	1 mM
EDTA	0,1 mM
in H ₂ O	pH auf 7,3 einstellen
GM-Puffer	
BSA	0,5 %
EDTA	5 mM
NaN ₃ in PBS	0,01 %
Antikörper	
anti-Maus CD4-PE (L3T4)(H129.19)	1:400 in GM-Puffer
anti-Maus-IgG _{2a} -PE	1:400 in GM-Puffer
anti-Maus-IgG ₁ -FITC	1:200 in GM-Puffer
anti-Maus-TCR-Vβ ₁₂	1:100 in GM-Puffer

VI.13.2 Immunisierung von Mäusen mit Kollagen Typ II zur Induktion einer Arthritis

Zur Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) wurden Mäuse des TCR-βtg-Stammes verwendet. Dieser Stamm ist aufgrund der Expression einer transgenen T-Zellrezeptor-β-Kette eines Kollagen Typ II (CII)-spezifischen, arthritogenen T-Zellklons besonders

empfindlich gegenüber einer Immunisierung mit heterologem Kollagen Typ II (CII). CII wird von Chondrozyten synthetisiert und kommt nur in der extrazellulären Matrix der Knochen und des Knorpels vor. CII stellt das potentielle Autoantigen bei der rheumatoiden Arthritis dar.

Zur Immunisierung wurde eine Emulsion aus gleichen Teilen einer wässrigen CII-Lösung (4 mg/ml in 0,01 M Essigsäure, 1:1 mit PBS (1x) verdünnt) und CFA hergestellt, das aus einer Mineralölfraction und Hitze-inaktivierten Mycobakterien besteht. Die Vermischung erfolgte unter Kühlung auf Eis mit Hilfe eines Ultraturrax. Die fertige Emulsion enthielt eine Konzentration von 1 mg/ml CII. Jedem Tier wurden 200 µl Emulsion (entspricht 200 µg CII) intradermal (i. d.) mittels 1 ml Spritze und Kanüle (0,40 x 12 mm, 27G x ½“ Luer-Lock) in die Haut beider Ohrmuscheln und an einer Seite des Rückenfalls in der Nähe der Schwanzbasis injiziert. An Tag 11 und Tag 21 nach der Immunisierung erhielten alle Tiere eine zusätzliche Injektion (boost) von 100 µg CII-Emulsion in die Schwanzbasis.

Tabelle 33: Lösungen und Reagenzien für die Immunisierung

Komponente	Menge/Konzentration
Essigsäure	0,01 M
CII-Lösung	4 mg/ml in 0,01 M Essigsäure
Complete Freund's Adjuvant	

VI.13.3 Bestimmung des Arthritisindex

Die Mäuse wurden regelmäßig auf sichtbare Veränderungen im Bereich der Extremitäten untersucht. Als Arthritis-positiv wurden Mäuse bewertet, bei denen entweder eine beginnende Schwellung im Bereich des Knöchels oder der Pfote erkennbar war oder mindestens ein peripheres Gelenk eine Schwellung zeigte. Die Bewertung der Schwere einer Arthritis basierte auf folgendem Schema:

Tabelle 34: Bestimmung des Arthritisindex

Index	Merkmale
0	Normale Gelenke
1	Schwellung an einem Interphalangeal-Gelenk
2	Schwellung an 2 - 3 Interphalangeal-Gelenken
3	Schwellung des Knöchelbereichs und des Metatarsus/-carpus
4	Extensive Schwellung der gesamten Pfote, eingeschränkte Beweglichkeit

Entsprechend der dargestellten Klassifizierung wurde für alle Extremitäten aller Tiere einer Experimentalgruppe ein Einzelindex pro Pfote vergeben. Aus der Summe der vier

Einzelindizes ergab sich der Arthritisindex (maximal 16) für Einzeltiere. Der mittlere Arthritisindex errechnete sich durch Addition der Arthritisindizes aller Tiere einer Experimentalgruppe dividiert durch die Gesamtzahl der Tiere dieser Gruppe. Die Arthritis-Schwere kommt als mittlerer Arthritisindex zum Ausdruck.

VI.13.4 Behandlung der Kollagen-induzierten Arthritis

Die therapeutische Behandlung der Kollagen-induzierten Arthritis wurde an Tag 21 nach der Immunisierung begonnen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Mäuse deutlich klinische Arthritis-symptome.

Die Tiere wurden jeden zweiten Tag mit Dexamethason, S-Curvularin in den angegebenen Konzentrationen oder dem Lösungsmittel für 14 Tage behandelt. Alle 4 Tage wurden Tiere aus allen Versuchsgruppen zur Organentnahme getötet. Weiterhin wurde der Arthritisindex bestimmt.

Tabelle 35: Substanzen für die Behandlung der CIA

Komponente	Konzentration/Menge
Dexamethason	5 mg/ml in EtOH vor Gebrauch 1:10 in PBS verdünnen
S-Curvularin	10 mg/ml in EtOH vor Gebrauch 1:10 in PBS verdünnen

VI.13.5 Lipopolysaccharid (LPS)-induziertes Inflammationsmodell

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und wirken in Säugerzellen als Pyrogene. Durch intraperitoneale Applikation von LPS wurde eine akute systemische Inflammation in den Mäusen ausgelöst.

Tabelle 36: Lösungen und Substanzen für die Induktion einer akuten Entzündungsreaktion

Komponente	Konzentration/Menge
NaCl	0,9 %
LPS	0,5 mg/ml in 0,9 % NaCl
Dexamethason	5 mg/ml in EtOH vor Gebrauch 1:10 in PBS verdünnen
S-Curvularin	3, 10 und 30 mg/ml in EtOH vor Gebrauch 1:10 in PBS verdünnen
EtOH/PBS	Verhältnis 1:10

Zur Behandlung wurden die Tiere zunächst mit Dexamethason, S-Curvularin in den angegebenen Konzentrationen oder dem Lösungsmittel als Kontrolle für zwei Stunden vorbehandelt. Anschließend wurde die akute Inflammation durch intraperitoneale Injektion von LPS (5 µg/g Körpergewicht) induziert. Nach weiteren sechs Stunden wurden die Tiere zur Organentnahme getötet.

VI.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde das Computerprogramm StatView (ABACUS) verwendet. Erhaltene Messwerte wurden zunächst mit ANOVA (analysis of variance) und anschließend mit dem Fisher's PLSD („protected least significance difference“)-Test analysiert. Dabei wurden p-Werte mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

VII. Ergebnisse

VII.1 Analyse der iNOS-Expression in humanen C-28/I2-Chondrozyten

VII.1.1 Die iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen

In der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA) ist die Überexpression pro-inflammatorischer Gene, wie die der iNOS, von entscheidender Bedeutung. Die genauen Wirkmechanismen der iNOS im Krankheitsbild der RA sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit die Regulation der iNOS-Expression in humanen C-28/I2-Chondrozyten als *in vitro*-Modell für entzündliche Gelenkerkrankungen untersucht werden.

Um physiologische Bedingungen zu imitieren, wurden die Zellen in Alginatperlen kultiviert, was den Zellen ermöglichte, in einem 3-dimensionalen Raum zu wachsen. Zum Vergleich wurden Zellen in Monolayer-Kultur verwendet.

Zunächst wurde untersucht, ob die Zelldichte einen Einfluss auf die iNOS-Expression ausübt. Dazu wurden die Zellen entweder in Monolayer- oder Alginatkultur für einen (d1), zwei (d2) oder sechs (d6) Tage inkubiert. Die Zellen wurden dann nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium mit einem Zytokingemisch (CM) aus TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IL-1 β (50 U/ml) für sechs Stunden behandelt, um die iNOS-Expression zu induzieren. Nach dieser Stimulationszeit ist die maximale iNOS-Expression zu erwarten. Kontrollzellen (CO) wurden für die gleiche Zeit in Serum-freiem Medium inkubiert. Nach Isolation der RNA wurde diese mittels einer reversen Transkription zu cDNA umgeschrieben und für qPCR-Analysen mit einer Sonde gegen die iNOS-mRNA eingesetzt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Expression in Zytokin-behandelten Zellen, die einen Tag kultiviert wurden, als 100% gesetzt.

In Kontrollzellen ist weder in der Alginat- noch in der Monolayerkultur eine signifikante iNOS-mRNA-Expression detektierbar (Abb. 7A und B). Nach Zugabe des Zytokingemischs wird die iNOS-mRNA-Expression induziert. Eine signifikante Erhöhung der iNOS-mRNA-Expression nach Zytokinbehandlung ist erst nach einer Kulturdauer von sechs Tagen unter beiden Kulturbedingungen zu erkennen. Da keine Unterschiede in der Stärke der iNOS-Expression zwischen der Alginat- und Monolayer-Kultur gefunden werden konnten, wurden weitere Analysen mit Zellen durchgeführt, die für sechs Tage als Monolayer kultiviert wurden („superkonfluent“).

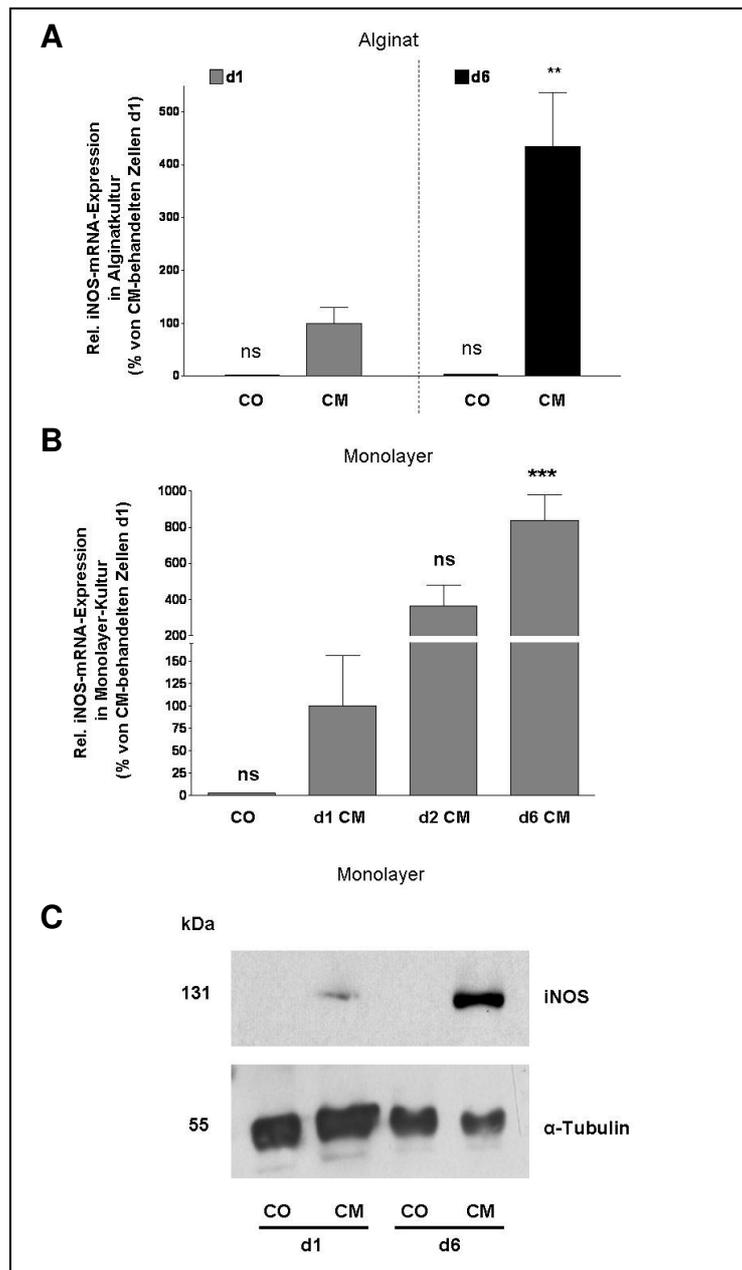


Abb. 7: Die Induktion der iNOS-Expression in C-28/I2-Zellen ist abhängig von der Zelldichte

C-28/I2-Zellen wurden für einen (d1), zwei (d2) oder sechs (d6) Tage in Monolayer- oder Alginatekultur kultiviert. Anschließend wurde die iNOS-Expression für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch (CM) induziert. Kontrollzellen (CO) wurden nicht mit CM behandelt. Dann wurde die RNA isoliert bzw. Zellen mit PLB für die Proteinanalyse lysiert.

(A) Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten Zellen nach d1 in Alginatekultur (**: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-inkubierten C-28/I2-Zellen nach einem Tag in Alginatekultur).

(B) Auswertung von sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten Zellen nach d1 in Monolayerkultur (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen nach einem Tag in Monolayerkultur).

(C) Repräsentativer Blot für drei weitere, unabhängige Western-Blot-Analysen mit 60 μ g Gesamtproteinextrakt von C-28/I2-Zellen und monoklonalen Antikörpern gegen iNOS und α -Tubulin.

Zur Analyse der iNOS-Proteinexpression wurden die Zellen mit PLB lysiert und anschließend in Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen iNOS detektiert. Als Ladungskontrolle wurde die Expression von α -Tubulin bestimmt.

Auch auf Proteinebene ist eine deutliche iNOS-Expression erst nach einer Kulturdauer von sechs Tagen detektierbar (Abb. 7C).

Um zu sehen, ob die Zellen während des 6-tägigen Wachstums Differenzierungsprozesse durchlaufen, wurde die mRNA-Expression von COL2A und SOX9, zwei Genen, deren Expression während der chondrogenen Differenzierung erhöht ist, in den bereits vorhandenen Proben von unbehandelten C-28/I2-Zellen mittels qRT-PCR-Analysen untersucht.

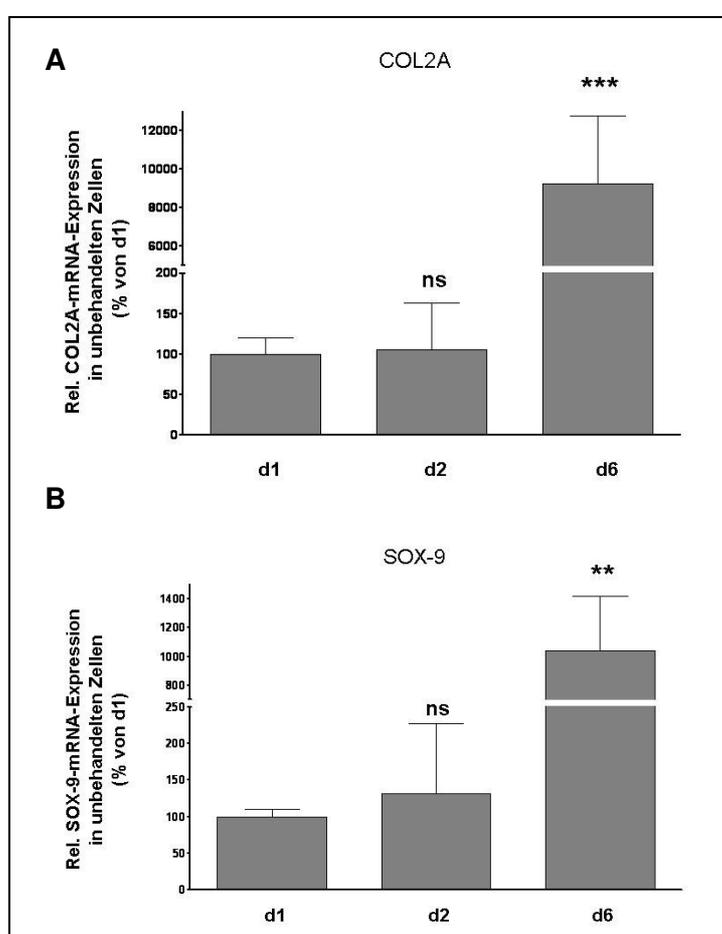


Abb. 8: Die Expression von Chondrozyten-Marker-Genen ist abhängig von der Zelldichte

C-28/I2-Zellen wurden für einen (d1), zwei (d2) oder sechs (d6) Tage kultiviert und RNA isoliert. Dargestellt ist die Auswertung von vier unabhängigen qRT-PCR-Analysen.

(A) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative COL2A1-mRNA-Mengen in Bezug auf die COL2A1-mRNA-Menge in Zellen, die für einen Tag (d1) kultiviert wurden (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von für einen Tag kultivierte C-28/I2-Zellen).

(B) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative SOX9-mRNA-Mengen in Bezug auf die SOX9-mRNA-Menge in Zellen, die für einen Tag (d1) kultiviert wurden (**: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von für einen Tag kultivierte C-28/I2-Zellen).

Die mRNA-Expression beider Gene nimmt dabei ebenfalls mit der Kultivierungsdauer zu (Abb. 8). Die iNOS-Expression scheint demzufolge von der Zelldichte bzw. des Differenzierungsgrads der Chondrozyten abhängig zu sein.

VII.1.2 Die Induktion der iNOS-Expression ist abhängig von den verwendeten Zytokinen und der Dauer der Zytokin-Behandlung

Es ist bereits bekannt, dass in humanen primären Chondrozyten als auch in aus humanen mesenchymalen Stammzellen differenzierten Knorpelzellen (hMSC; human mesenchymal stem cells) eine Inkubation mit IL-1 β alleine zu einer Induktion der iNOS-Expression führt. Die humanen Kolonkarzinomzellen DLD-1 benötigen hingegen dazu ein komplexes Gemisch aus TNF- α , IFN- γ und IL-1 β (CM).

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der iNOS-Induktion von verschiedenen Zytokinen wurden superkonfluente immortalisierte C-28/I2-Zellen mit IL-1 β (50 U/ml), IFN- γ (100 U/ml) oder TNF- α (10 ng/ml) alleine oder in verschiedenen Kombinationen nach vorangegangenem 18-stündigem Wachstum in Serum-freiem Medium für sechs Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen (CO) in Serum-freiem Medium kultiviert. qRT-PCR-Analysen zur Ermittlung der iNOS-mRNA-Expression wurden nach Isolation der RNA durchgeführt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in mit CM-stimulierten Zellen (CM) als 100% gesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit dem Zytokingemisch (CM) aus IL-1 β (50 U/ml), IFN- γ (100 U/ml) und TNF- α (10 ng/ml) zu einem maximalen Anstieg der iNOS-mRNA-Expression in humanen C-28/I2-Chondrozyten führt (Abb. 9). Eine Inkubation mit den einzelnen Zytokinen hatte keinen Effekt auf die iNOS-mRNA-Menge. Eine Behandlung der Chondrozyten mit IFN- γ in Kombination mit IL-1 β bzw. TNF- α führte zu einer geringen, aber nicht signifikanten Induktion der iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (CO), erreichte jedoch nur etwa 20% von der iNOS-mRNA-Menge der CM-behandelten Zellen.

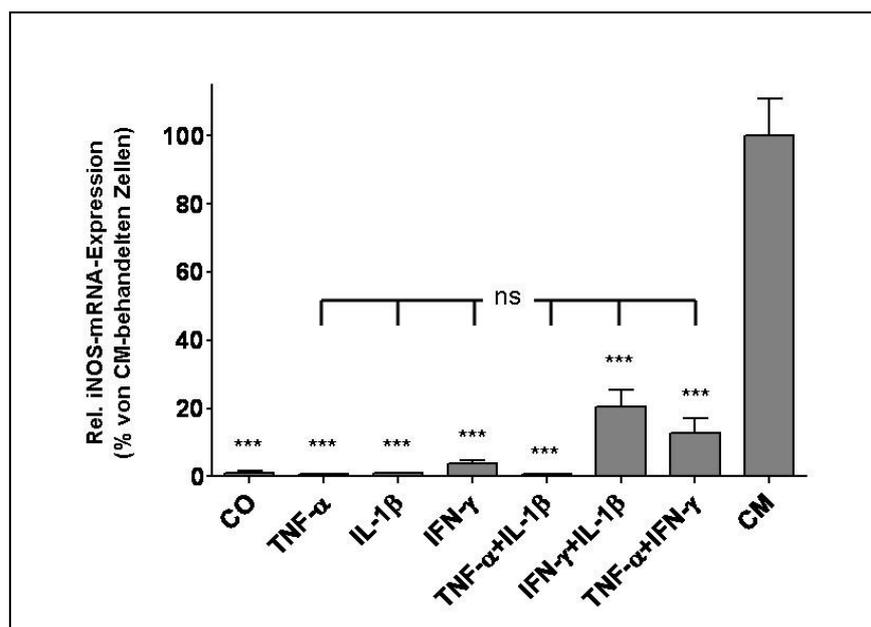


Abb. 9: Die maximale Induktion der iNOS-mRNA-Expression wird durch die Behandlung mit einem Zytokingemisch (CM) erreicht

C-28/I2-Zellen wurden mit einzelnen Zytokinen, verschiedenen Kombinationen oder einem Zytokingemisch aus TNF- α , IL-1 β und IFN- γ (CM) für sechs Stunden behandelt. Kontrollzellen (CO) wurden in Serum-freiem Medium gehalten. Gezeigt ist die Auswertung zwei unabhängiger qRT-PCR-Analysen. Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-inkubierten C-28/I2-Zellen; ns: nicht signifikant verschieden von Kontrollzellen).

Um die Zeitabhängigkeit der Zytokin-vermittelten iNOS-Induktion zu untersuchen, wurden superkonfluente C-28/I2-Zellen nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium für zwei (2 h), vier (4 h), sechs (6 h), acht (8 h) und 24 (24 h) Stunden mit dem Zytokingemisch (CM) behandelt. Kontrollzellen (CO) wurden die gesamte Zeit in Serum-freiem Medium inkubiert. Nach der RNA-Isolation wurde die iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen und einer Sonde gegen die iNOS bestimmt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge nach einer Inkubation von 6 h mit CM als 100% gesetzt.

Die iNOS-mRNA-Menge nimmt mit der Dauer der Zytokin-Behandlung stetig zu und erreicht ihr Maximum nach vier bis sechs Stunden. Nach 24 h wurden nur noch 10% der maximalen iNOS-mRNA-Menge detektiert (Abb. 10A). Zur Proteinanalyse mittels Western-Blot-Experimenten wurden die Zellen mit PLB lysiert. Die Detektion des iNOS-Proteins erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen die iNOS. Als Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen β -Tubulin verwendet. Eine maximale iNOS-Proteinexpression konnte nach sechs bis acht Stunden der Zytokinbehandlung erreicht werden (Abb. 10B).

In allen Folgeversuchen wurden C-28/I2-Zellen aufgrund dieser Ergebnisse zur Induktion der iNOS-Expression für sechs Stunden mit Zytokinen (CM) inkubiert.

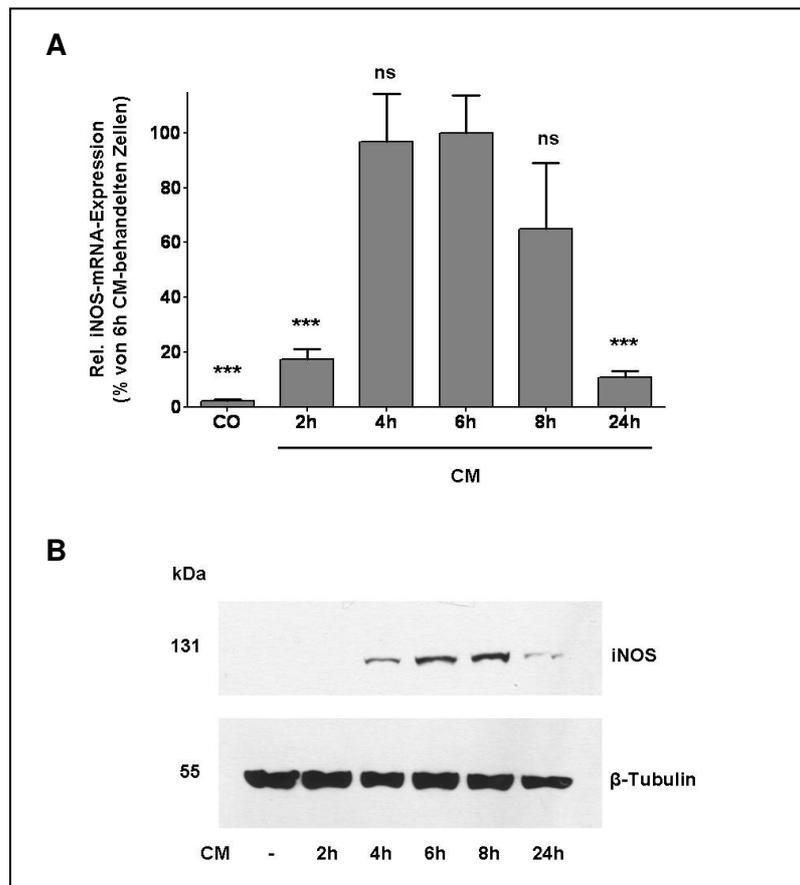


Abb. 10: Die maximale Induktion der iNOS-Expression ist abhängig von der Dauer der Zytokinbehandlung

Superkonfluente C-28/I2-Zellen wurden für zwei (2 h), vier (4 h), sechs (6 h), acht (8 h) und 24 (24 h) Stunden mit einem Zytokingemisch (CM) behandelt, um die iNOS-Expression zu induzieren. Kontrollzellen (CO) wurden in Serum-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert bzw. Zellen mit PLB für die Proteinanalyse lysiert.

(A) Auswertung von vier unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in für sechs Stunden (6 h) mit CM-behandelten Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von für 6 h mit CM-inkubierten C-28/I2-Zellen).

(B) Repräsentativer Blot für zwei weitere, unabhängige Western-Blot-Analysen mit 60 µg Gesamtproteinextrakt aus C-28/I-Zellen und monoklonalen Antikörpern gegen iNOS und β-Tubulin.

VII.1.3 Eine Inhibierung der iNOS-Aktivität hat keinen Einfluss auf die Zytokin-induzierte iNOS-Expression

Es konnte bereits in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid (NO) die Expression der iNOS reguliert. Um diesen Effekt in C-28/I2-Chondrozyten zu untersuchen wurden superkonfluente Zellen nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium zunächst mit Aminoguanidin, einem spezifischen iNOS-Inhibitor, in den Konzentrationen 100 μ M und 1 mM für eine Stunde vorbehandelt. Anschließend wurde die iNOS-Expression durch Zugabe des Zytokinmixes (CM +) induziert. Kontrollzellen (CM -) wurden für die gleiche Zeit in Serum-freiem Medium inkubiert.

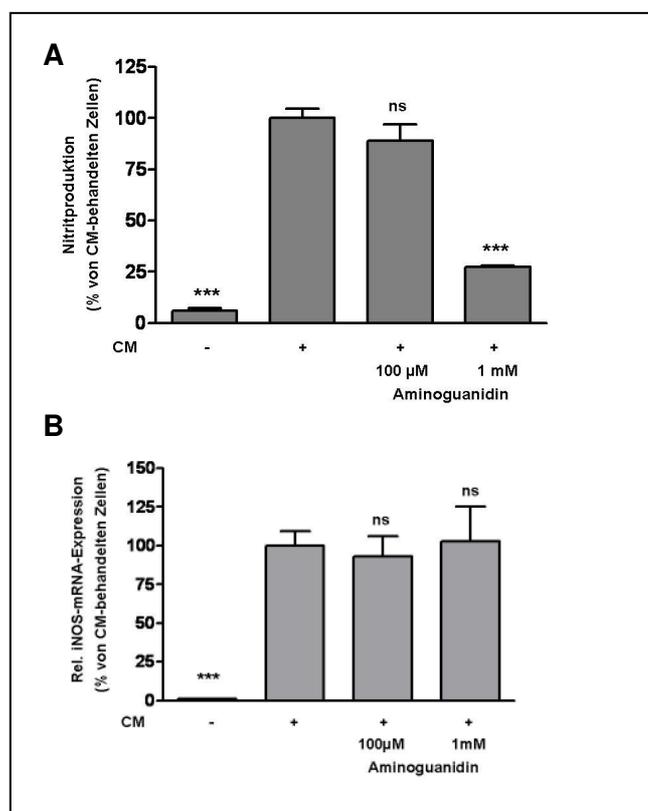


Abb. 11: Die Hemmung der iNOS-abhängigen NO-Produktion hat keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expression

C-28/I2-Zellen wurden für eine Stunde mit 100 μ M und 1 mM Aminoguanidin vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit (CM+) oder ohne (CM-) das Zytokingemisch inkubiert.

(A) Analyse der iNOS-vermittelten NO-Produktion nach 24-stündiger Behandlung mit CM. Die NO-Produktion wurde als Nitrit im Zellkulturüberstand gemessen. Gezeigt ist die Auswertung von fünf unabhängigen Analysen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in CM-behandelten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen).

(B) Auswertung von fünf unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen).

Das von den Zellen produzierte NO wurde nach 24-stündiger Zytokin-Behandlung im Zellkulturüberstand als kumulatives Nitrit mit dem NO-Analyzer gemessen. Die produzierte Nitritmenge in CM-stimulierten Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Inkubation von superkonfluenten Chondrozyten mit 1 mM Aminoguanidin und anschließender Induktion der iNOS-Expression mit Zytokinen führten zu einer deutlichen Abnahme der iNOS-abhängigen NO-Produktion (Abb. 11A). Allerdings konnte kein Effekt von Aminoguanidin auf die iNOS-mRNA-Expression, die nach sechs-stündiger Zytokin-Induktion in qRT-PCR-Analysen detektiert wurde, gefunden werden (Abb. 11B).

VII.1.4 Einfluss der Hemmung verschiedener Signaltransduktionswege auf die Zytokin-induzierte iNOS-Expression

Die Induktion der iNOS-Expression in humanen Zellen erfolgt Zelltyp-spezifisch und ist abhängig von der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. Deshalb sollte in C-28/I2-Chondrozyten der Effekt auf die Zytokin-vermittelte iNOS-Expression nach der Hemmung verschiedener Signaltransduktionswege untersucht werden.

Untersucht wurde die Wirkung der Inhibitoren des JNK (Jun-N-terminale Kinase)-, des ERK (extrazellulär regulierte Kinase)-, des p38-MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-, des JAK2/STAT1 α ("janus kinase and signal transducers and activators of transcription")- und des NF- κ B („Nuclear-factor κ B“)-Signaltransduktionswegs auf die Zytokin-vermittelte iNOS-Expression. Die Zellen wurden nach Inkubation in Serum-freiem Medium für 18 Stunden zunächst für eine Stunde mit den Inhibitoren vorbehandelt. Anschließend wurde die iNOS-Expression durch Zugabe des Zytokingemischs (CM+) für sechs Stunden induziert. Kontrollzellen (CM-) wurden für die gleiche Dauer in Serum-freiem Medium gehalten. Dann wurde RNA isoliert und die iNOS-mRNA-Menge mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Dabei wurde als Referenzwert die iNOS-mRNA-Menge in nur mit Zytokinen behandelten Zellen als 100% gesetzt. Zur Analyse der Proteinexpression wurden die Zellen durch Zugabe von PLB lysiert und anschließend mittels Western-Blot-Analysen und einem monoklonalen Antikörper gegen die iNOS detektiert. Als Ladungskontrolle wurde die Expression von β -Tubulin bestimmt.

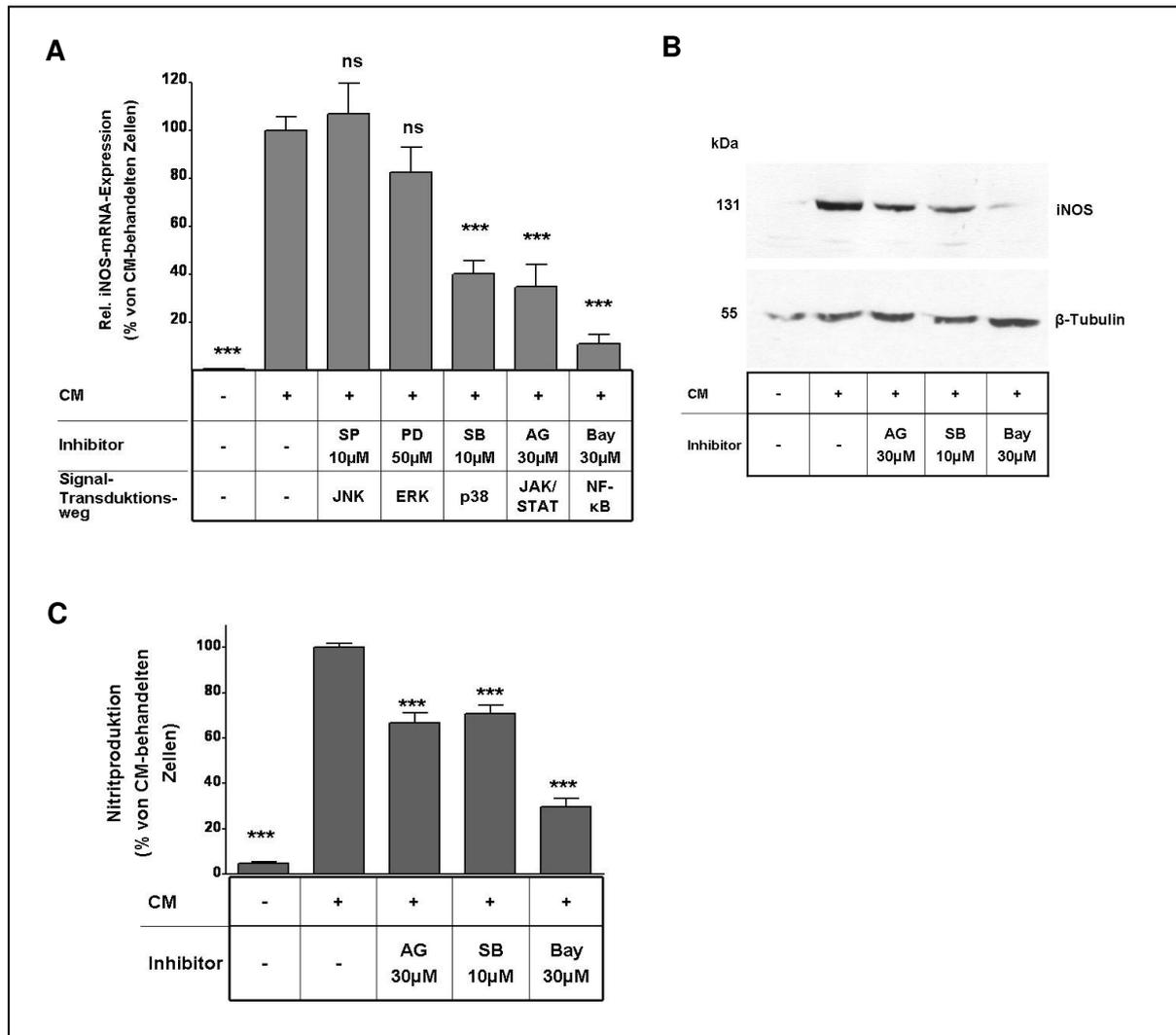


Abb. 12: Die Hemmung des p38-MAPK-, des JAK/STAT-1 α - und des NF- κ B-Signaltransduktionswegs reduziert die Zytokin-induzierte iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten

C-28/I2-Zellen wurden zunächst mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (10 μ M), dem ERK-inhibitor PD98059 (50 μ M), dem p38-MAPK-Inhibitor SB203590 (10 μ M), dem JAK/STAT-1 α -Inhibitor AG490 (30 μ M) und dem NF- κ B-Inhibitor Bay11-7082 (30 μ M) in DMSO vorinkubiert. Dann wurde die iNOS-Expression mit einem Zytokingemisch (CM+) induziert. Die jeweiligen Kontrollzellen (CM-) wurden nicht mit Zytokinen behandelt.

(A) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen aus sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-behandelten C-28/I2-Zellen, die nicht mit Inhibitoren behandelt wurden (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen).

(B) Repräsentativer Blot für drei unabhängige Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen iNOS und β -Tubulin. Analysiert wurden 60 μ g Gesamtproteinextrakt aus unstimulierten (CM-) oder für sechs Stunden mit Zytokinen behandelten (CM+) C-28/I2-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von verschiedenen Inhibitoren.

(C) Analyse der iNOS-vermittelten NO-Produktion in C-28/I2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren. Die NO-Produktion wurde nach 24-stündiger Behandlung mit (CM+) oder ohne (CM-) Zytokine als Nitrit im Zellkulturüberstand gemessen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in CM-stimulierten C-28/I2-Zellen, die nicht mit Inhibitoren behandelt wurden (***: $p < 0,001$ vs. CM-inkubierte C-28/I2-Zellen).

Weder die Inkubation der C-28/I2-Zellen mit dem direkten JNK-Inhibitor SP600125 (SP; 10 μ M) noch dem ERK-Inhibitor PD98059 (PD; 50 μ M; blockiert die Aktivierung von ERK1/2) hatten einen Effekt auf die Zytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression (Abb. 12A). Die pharmakologische Hemmung der p38-MAPK mit SB203590 (SB; 10 μ M, einem direkten p38-MAPK α - und β -Inhibitor) sowie die Inhibierung des JAK2/STAT1 α -Signaltransduktionswegs mit AG490 (AG; 30 μ M; blockiert die JAK2-abhängige Aktivierung von STAT-1 α) führten zu einer Reduktion der iNOS-mRNA-Expression auf 40% im Vergleich zu Zytokin-behandelten (CM +) Zellen (Abb. 12A). Eine Hemmung der iNOS-mRNA-Menge um 90% im Vergleich zu Zytokin-induzierten (CM +) Chondrozyten konnte durch eine Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Bay11-7082 (Bay; 30 μ M) erreicht werden, der die Phosphorylierung von I- κ B und damit auch die Aktivierung von NF- κ B inhibiert (Abb. 12A). Dieses Ergebnis konnte in Western-Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 12B). Auch die iNOS-vermittelte NO-Produktion, die als kumulatives Nitrit im Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Zytokin-Stimulation im NO-Analyzer gemessen wurde, konnte durch die Behandlung der C-28/I2-Zellen mit den Inhibitoren AG490 (AG; 30 μ M), SB203580 (SB; 10 μ M) und Bay11-7082 (Bay; 30 μ M) im Vergleich zu CM-behandelten Zellen reduziert werden (Abb. 12C).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass an der Induktion der iNOS-Expression in humanen C-28/I2-Zellen hauptsächlich der p38-MAPK- der JAK2/STAT1 α - und der NF- κ B-Signaltransduktionsweg beteiligt ist.

VII.1.5 Die Induktionsrate des humanen iNOS-Promotors in C-28/I2-Zellen nach einer Zytokin-Inkubation korreliert mit der iNOS-mRNA-Expression

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Induktion der iNOS-Expression in humanen Zellen, wie AKN-1- und DLD-1-Zellen, nicht allein durch eine Steigerung der iNOS-Promotoraktivität erklärbar ist (de Vera *et al.*, 1996; Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). In diesen Zellen kann eine basale iNOS-Promotoraktivität nachgewiesen werden, die durch eine Zytokinbehandlung nur noch um das 2-5-fache steigerbar ist. Eine deutliche iNOS-mRNA-Expression ist aber nur nach Stimulation der Zellen mit Zytokinen messbar.

Um den Einfluss der Promotoraktivität auf die iNOS-mRNA-Expression in C-28/I2-Zellen zu untersuchen, wurden die Knorpelzellen zunächst mit einem Reporter-genplasmid stabil transfiziert, in dem das Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragments des iNOS-Promotors steht.

Die Chondrozyten wurden für einen (d1) oder sechs (d6) Tage inkubiert. Die Zellen wurden dann nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium mit dem Zytokingemisch (CM) für sechs Stunden behandelt, um die iNOS-Expression zu induzieren. Kontrollzellen (CO)

wurden für die gleiche Zeit in Serum-freiem Medium gehalten. Zur Ermittlung der Luziferase- und iNOS-mRNA-Menge wurden nach Isolation der RNA qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Zur Auswertung wurde jeweils die mRNA-Menge in CM-behandelten Zellen nach sechs Tagen Wachstum als 100% gesetzt.

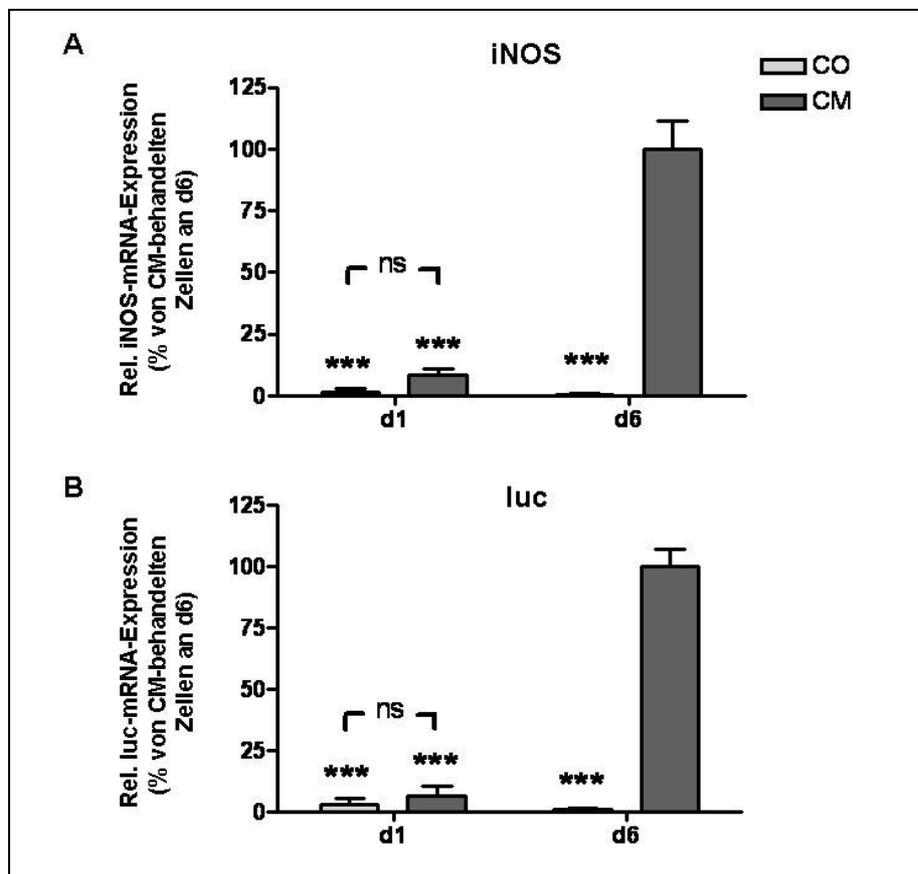


Abb. 13: Die Zytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression ist auf eine erhöhte Promotoraktivität zurückzuführen

C-28/I2-Zellen wurden mit einem Reporter-genplasmid stabil transfiziert, in dem ein Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragments des iNOS-Promotors steht. Die Zellen wurden dann für einen (d1) oder sechs (d6) Tage kultiviert. Anschließend wurde die iNOS-Expression für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch (CM) induziert. Kontrollzellen (CO) wurden nicht mit CM behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und die iNOS- (A) und Luziferase (luc)- (B) mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen ermittelt. Dargestellt ist die Auswertung von vier unabhängigen Experimenten. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf CM-behandelte Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte C-28/I2-Zellen an d6; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen an d1).

Die Ergebnisse zeigen, dass in den stabil transfizierten C-28/I2-Zellen nach einem Tag in Kultur keine signifikante Induktion der iNOS- noch eine Luziferase-mRNA-Expression nach Zytokinbehandlung nachgewiesen werden kann. Erst nach einer Wachstumszeit von sechs Tagen kann die iNOS-mRNA-Expression nach einer Stimulation mit dem Zytokingemisch signifikant induziert werden. Eine signifikante Erhöhung ist unter diesen Bedingungen auch

für die Luziferase-mRNA zu beobachten. In den Zellen kann nach sechs Tagen keine basale Expression der Luziferase-mRNA nachgewiesen werden. Die Induktionsrate der iNOS- und Luziferase-mRNA nach einer CM-Behandlung ist an diesem Tag identisch (Abb. 13).

VII.1.6 Analyse der mRNA-Expression von RNA-bindenden Proteinen in C-28/I2-Chondrozyten

Die Modulation der iNOS-mRNA-Stabilität stellt einen wichtigen post-transkriptionellen Regulationsmechanismus dar. Dabei spielen RNA-bindende Proteine eine wichtige Rolle. Die RNA-bindenden Proteine Tristetraprolin (TTP), das Polypyrimidin-Trakt-bindende Protein (PTB) und das zur „embryonic lethal abnormal vision“(ELAV)-Proteinfamilie zugehörige Protein HuR wurden als iNOS-mRNA-stabilisierende Proteine beschrieben. Eine destabilisierende Funktion konnte für das „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP) und den „ARE/poly-(U) binding factor“ (AUF-1) gezeigt werden.

Um die Expression der RNA-bindenden Proteine in C-28/I2-Zellen zu analysieren, wurden die Zellen für einen (d1) oder sechs (d6) Tage kultiviert. Zur Induktion der mRNA-Expression wurden die Zellen nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium mit dem Zytokingemisch (CM) für sechs Stunden behandelt. Kontrollzellen (CO) wurden nicht mit CM inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression der RNA-bindenden Proteine TTP, PTB, HuR und KSRP mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zur Auswertung wurden die mRNA-Mengen in Kontrollzellen an Tag 6 als 100% gesetzt.

Nach einer Kultivierungsdauer von einem Tag sind weder eine TTP- noch eine PTB-mRNA-Expression in den C-28/I-Zellen nachweisbar. Eine basale Expression ist erst an Tag sechs detektierbar. Die Behandlung mit CM führt zu einer 6-fachen Steigerung der TTP-mRNA-Menge, die PTB-mRNA-Expression wird nach einer Behandlung mit dem Zytokingemisch um das 3-fache erhöht (Abb. 14A und B). Die HuR-mRNA-Expression war an Tag 1 im Vergleich zu superkonfluenten Zellen an Tag 6 um das vier-fache erhöht. Die Expression der HuR-mRNA war dabei unabhängig von einer Zytokinbehandlung (14C). Die KSRP-mRNA wird an beiden untersuchten Tagen gleich stark exprimiert und ist ebenfalls unabhängig von einer Zytokin-Behandlung (Abb. 14D). Es konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung in der AUF-1-mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 14E).

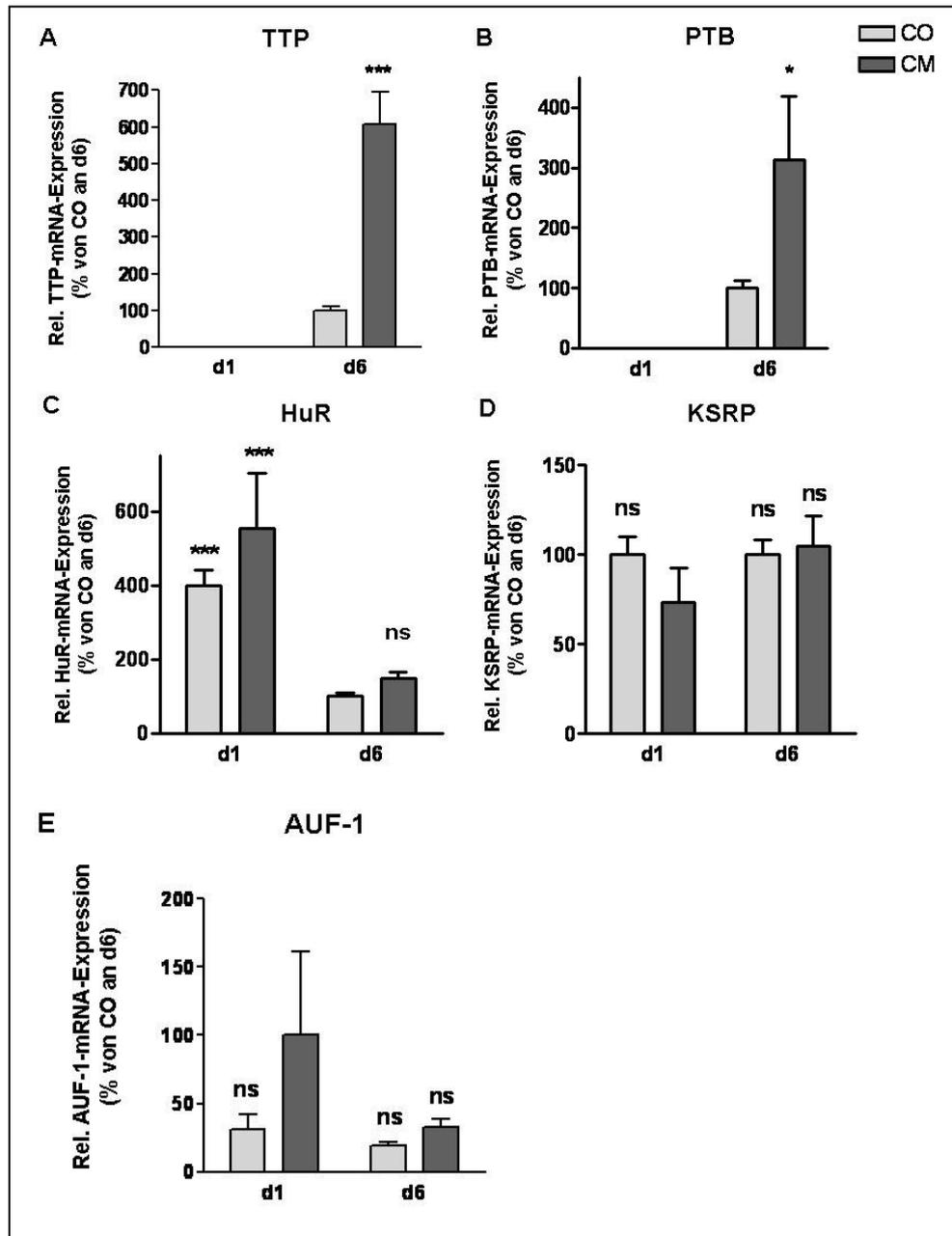


Abb. 14: Analyse der mRNA-Expression von TTP, PTB, HuR, KSRP und AUF-1 in C-28/I2-Chondrozyten

C-28/I2-Zellen wurden für einen (d1) oder sechs (d6) Tage kultiviert. Anschließend wurde die Genexpression für sechs Stunden mit einem Zytokingemisch (CM) induziert. Kontrollzellen (CO) wurden nicht mit CM behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und die TTP (A)-, PTB (B)-, HuR (C), KSRP (D) und AUF-1 (E) -mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen ermittelt. Gezeigt ist die Auswertung von drei unabhängigen qRT-PCR-Analysen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge in Kontrollzellen an d6 (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von Kontrollzellen an d6).

VII.1.7 Glukokortikoide haben keinen Einfluss auf die iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten

Zur Hemmung von entzündungsvermittelten Symptomen inflammatorischer Autoimmunerkrankungen, wie Asthma und rheumatoide Arthritis, werden Glukokortikoide (GK) zur Pharmakotherapie verwendet. Ihre Wirkung beruht überwiegend auf der Hemmung der Aktivität pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B) und der Stimulation des mRNA-Abbaus pro-inflammatorischer Mediatoren. Es ist bekannt, dass GKs in verschiedenen Zellsystemen und Tiermodellen die iNOS-Expression nach Induktion inhibieren.

Um den Effekt von Glukokortikoiden auf die iNOS-Expression in C-28/I2-Zellen aufzuklären, wurden diese nach sechs-tägigem Wachstum 18 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert. Dann wurden die Zellen zunächst mit den Glukokortikoiden Dexamethason (Dex; 5 μ M) und Prednisolon (Pred; 15 μ M) für eine Stunde vorbehandelt, bevor die iNOS-Expression durch Zugabe eines Zytokingemischs (CM) für sechs Stunden induziert wurde. Kontrollzellen wurden in Serum-freiem Medium ohne Zytokine (CO) inkubiert. Dann wurde die RNA isoliert und die iNOS-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Expression in Zytokin-stimulierten Zellen, die nicht mit GKs behandelt wurden, als 100% gesetzt.

Eine Inkubation der Zellen mit den bereits genannten Glukokortikoiden hatte keinen Effekt auf die Zytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression (Abb. 15A).

Für die Bestimmung der iNOS-Proteinexpression wurden die behandelten C-28/I2-Chondrozyten in PLB lysiert und Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen die humane iNOS durchgeführt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde zusätzlich die Expression von β -Tubulin bestimmt. Auch die iNOS-Proteinexpression wurde durch eine Dexamethason-Behandlung nicht verändert (Abb. 15B).

Eine Veränderung der iNOS-vermittelten NO-Produktion, die als kumulatives Nitrit im Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Zytokin-Stimulation im NO-Analyzer gemessen wurde, konnte nach Behandlung mit Dexamethason im Vergleich zu Zytokin-stimulierten Zellen nicht festgestellt werden (Abb. 15C).

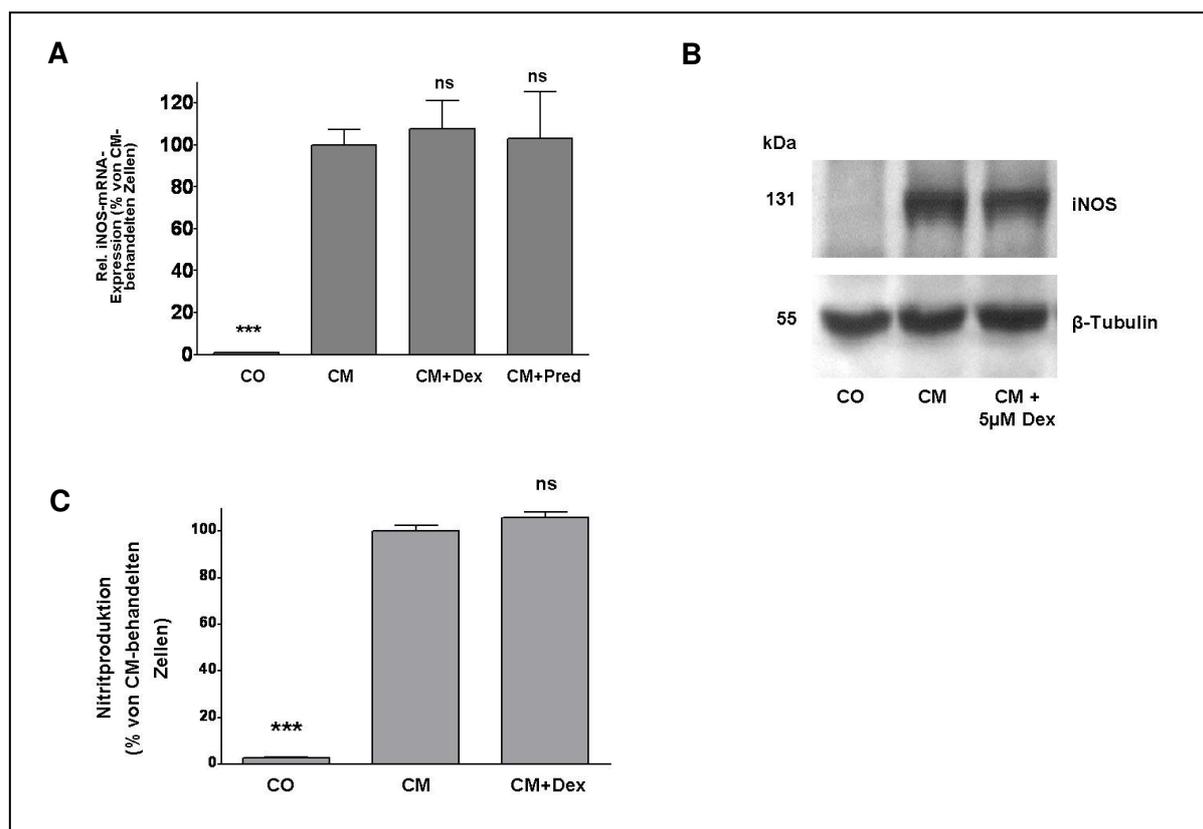


Abb. 15: Die Co-Inkubation der C-28/I2-Zellen mit CM und Glukokortikoiden hat keinen Einfluss auf die iNOS-Expression

Zunächst wurden C-28/I2-Zellen mit den Glukokortikoiden Dexamethason (5 μ M; Dex) und Prednisolon (15 μ M; Pred) für eine Stunde vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden (mRNA- und Protein-Analyse) bzw. für 24 Stunden (Nitritproduktionsanalyse) mit Zytokinen (CM) stimuliert. Als Kontrolle (CO) dienen unbehandelte Zellen. Aus den Zellen wurde RNA isoliert oder die Zellen für Proteinanalysen mit PLB lysiert. Zur Messung der Nitritproduktion wurden die Zellkulturüberstände verwendet.

(A) Analyse der iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen aus vier unabhängigen qRT-PCR-Analysen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen).

(B) Repräsentativer Blot für zwei weitere Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen iNOS und β -Tubulin. Analysiert wurden 60 μ g Gesamtproteinextrakt aus C-28/I2-Zellen.

(C) Analyse der iNOS-vermittelten NO-Produktion in C-28/I2-Zellen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in CM-stimulierten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-inkubierten C-28/I2-Zellen).

Um einen spezifischen Effekt von Dexamethason auf die iNOS-Expression ausschließen zu können, wurde in den bereits vorhandenen RNA-Proben die mRNA-Expression anderer NF- κ B-regulierter Gene nach Dexamethason-Behandlung analysiert.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit Dexamethason hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Zytokin-induzierte mRNA-Expression von RANTES und IL-8 (Abb. 16). Es kann also davon

ausgegangen werden, dass in C-28/I2-Chondrozyten Glukokortikoide generell keine inhibitorische Wirkung auf die pro-inflammatorische Genexpression vermitteln.

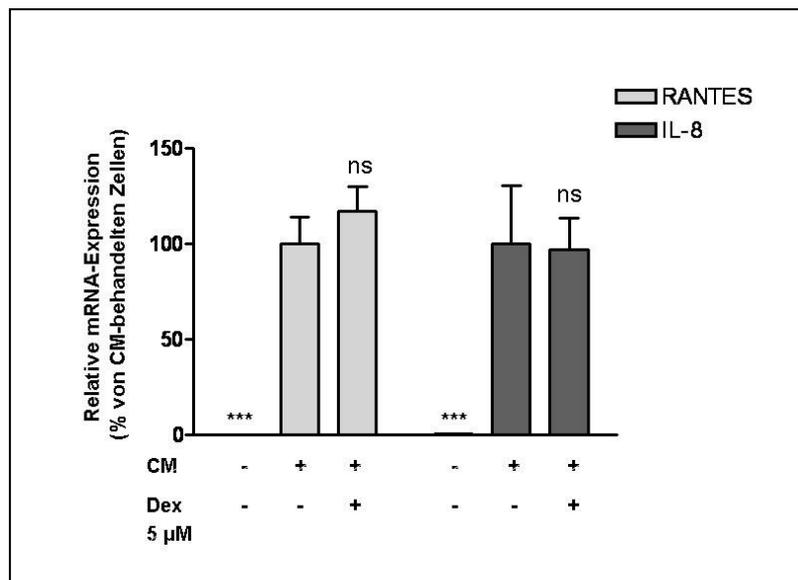


Abb. 16: Die Behandlung mit Dexamethason hat keinen Einfluss auf NF κ B-regulierte Gene

Zunächst wurden C-28/I2-Zellen mit dem Glukokortikoid Dexamethason (5 μ M; Dex) für eine Stunde vorbehandelt. Anschließend wurde die Genexpression durch Zugabe von Zytokinen (CM) für sechs Stunden induziert. Als Kontrolle (CM -) dienten unbehandelte Zellen. Die mRNA-Expression wurde anschließend mittels qRT-PCR analysiert. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen aus zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen in Bezug auf die mRNA-Menge in CM-stimulierten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von CM-behandelten C-28/I2-Zellen).

Da die Effekte der Glukokortikoide hauptsächlich durch die Bindung und Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors (GR) vermittelt werden, wurde mittels RT-PCR untersucht, ob in C-28/I2-Zellen die mRNA des Rezeptors exprimiert wird. Dazu wurde RNA aus superkonfluenten C-28/I2-Chondrozyten isoliert und anschließend in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde RNA von humanen epithelialen A549/8-Zellen und endothelialen Ea.hy926-Zellen verwendet. Für beide Zelllinien wurden Effekte auf die Genexpression durch Glukokortikoide beschrieben. Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA des eukaryotischen Expressionsvektors für den humanen GR pGH0 (CO) verwendet. Die cDNA wurde dann für PCR-Analysen eingesetzt. In der PCR-Reaktion wurden zwei unterschiedliche Primer-Paare verwendet. Mit dem Primer-Set 1 war es möglich, die α -Isoform des GR nachzuweisen, Primer-Set 2 ermöglichte einen Nachweis der α - und β -Isoform des GR. Wie in Abb. 17 zu sehen, konnte in C-28/I2-Zellen mit beiden Primer-Paaren keine Expression des GR nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in A549/8- und Ea.hy926-Zellen mit beiden Primer-Sets eine Expression des GR detektiert werden.

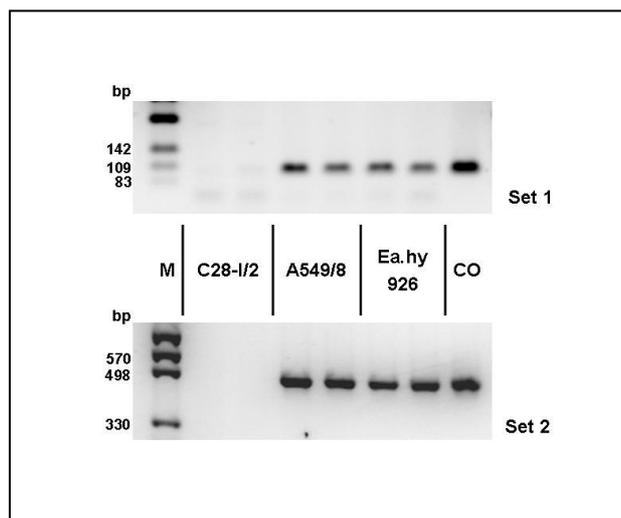


Abb. 17: C-28/I2-Chondrozyten exprimieren keinen Glukokortikoidrezeptor

Zur Analyse der Expression des humanen Glukokortikoidrezeptors (GR) wurde RNA aus C-28/I2-Chondrozyten, humanen epithelialen A549/8- und Ea.hy926-Zellen isoliert. Anschließend wurden RT-PCR-Analysen mit den Oligonukleotiden hGR_f1 und hGR_r1 (Set 1: Detektion der α -Isoform des humanen GRs; erwartete Größe des PCR-Fragments: 478 bp) bzw. hGR_f2 und hGR_r2 (Set 2: Detektion der α - und β -Isoform des humanen GRs; erwartete Größe des PCR-Fragments: 102 bp) durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle (CO) diente Plasmid-DNA des eukaryotischen Expressionsvektors für den humanen GR (pGH0). Zur Größenkontrolle wurde ein Größenmarker (M) aufgetragen.

VII.1.8 Die Zytokin-induzierte iNOS-Expression wird in C-28/I2-Chondrozyten von S-Curvularin gehemmt

Eine Überexpression pro-inflammatorischer Gene, wie zum Beispiel der iNOS, ist bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung der rheumatoiden Arthritis von entscheidender Bedeutung. Die Hemmung der Expression dieser Gene stellen Ansatzpunkte für neue Therapieansätze dar. Glukokortikoide, deren anti-inflammatorische Wirkung überwiegend auf der Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression beruhen, zeigen aber als pleiotrop wirkende Hormone viele Nebenwirkungen, die ihren Einsatz in der anti-inflammatorischen Therapie begrenzen. Somit sind neue, die pro-inflammatorische Genexpression hemmende Substanzen für die anti-inflammatorische Therapie von entzündlichen Gelenkerkrankungen von hoher Bedeutung. Mit Hilfe molekularbiologischer Screeningverfahren konnte mit S-Curvularin aus Fermentationen einer *Penicillium*-Art ein Wirkstoff isoliert werden, der auf der Ebene der Genexpression die Synthese entzündungsrelevanter Enzyme (iNOS, COX-2) und Cytokine (TNF- α) unterdrückt. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass S-Curvularin auch im *in vivo*-Modell die LPS-induzierte iNOS-mRNA-Expression in Mäusen

zu hemmen vermag. Der genaue Wirkmechanismus von S-Curvularin muss jedoch noch genauer untersucht werden. Zunächst sollte daher die Wirkung der Pilzsubstanz *in vitro* in immortalisierten C-28/I2-Chondrozyten als humanes Arthritismodell untersucht werden.

Dazu wurden superkonfluente Zellen nach 18-stündiger Inkubation in Serum-freiem Medium für eine Stunde mit S-Curvularin (SC) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die iNOS-Expression durch Zugabe des Zytokinmixes für sechs Stunden induziert. Kontrollzellen (CM- bzw. CO) wurden für die entsprechende Zeit in Serum-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und die iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt. Zur Auswertung wurde die iNOS-mRNA-Menge in mit Zytokinen behandelten Zellen (CM+ bzw. CM) als 100% gesetzt. Zur Analyse der Proteinexpression wurden die Zellen nach der Inkubation durch Zugabe von PLB lysiert. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot-Analysen und einem monoklonalen Antikörper gegen iNOS. Als Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler β -Tubulin-Antikörper verwendet. Zur Analysen der iNOS-vermittelten NO-Produktion wurden die Zellen ebenfalls für eine Stunde mit 100 μ M S-Curvularin (SC) vorbehandelt. Anschließend wurde durch Zugabe des Zytokinmixes (CM+) die iNOS-Expression für 24 Stunden induziert. Kontrollzellen (CM-) wurden für die gleiche Dauer in Serum-freiem Medium gehalten. Die NO-Produktion wurde dann als kumulatives Nitrit im Zellkulturüberstand gemessen. Die in CM-behandelten Zellen gemessene Nitritmenge wurde als 100% gesetzt.

Die Behandlung mit S-Curvularin reduzierte die iNOS-mRNA-Expression auf 50% im Vergleich zu CM-behandelten Zellen (Abb. 18A). Die iNOS-Proteinexpression (Abb. 18B) konnte ebenfalls durch S-Curvularin konzentrationsabhängig gehemmt werden. Die iNOS-vermittelte NO-Produktion (Abb. 18C) wurde durch die Behandlung der Zellen mit der Pilzsubstanz vollständig inhibiert.

In C-28/I2-Chondrozyten konnte die iNOS-Expression sowie die iNOS-vermittelte NO-Produktion durch Behandlung der Zellen mit S-Curvularin deutlich gehemmt werden.

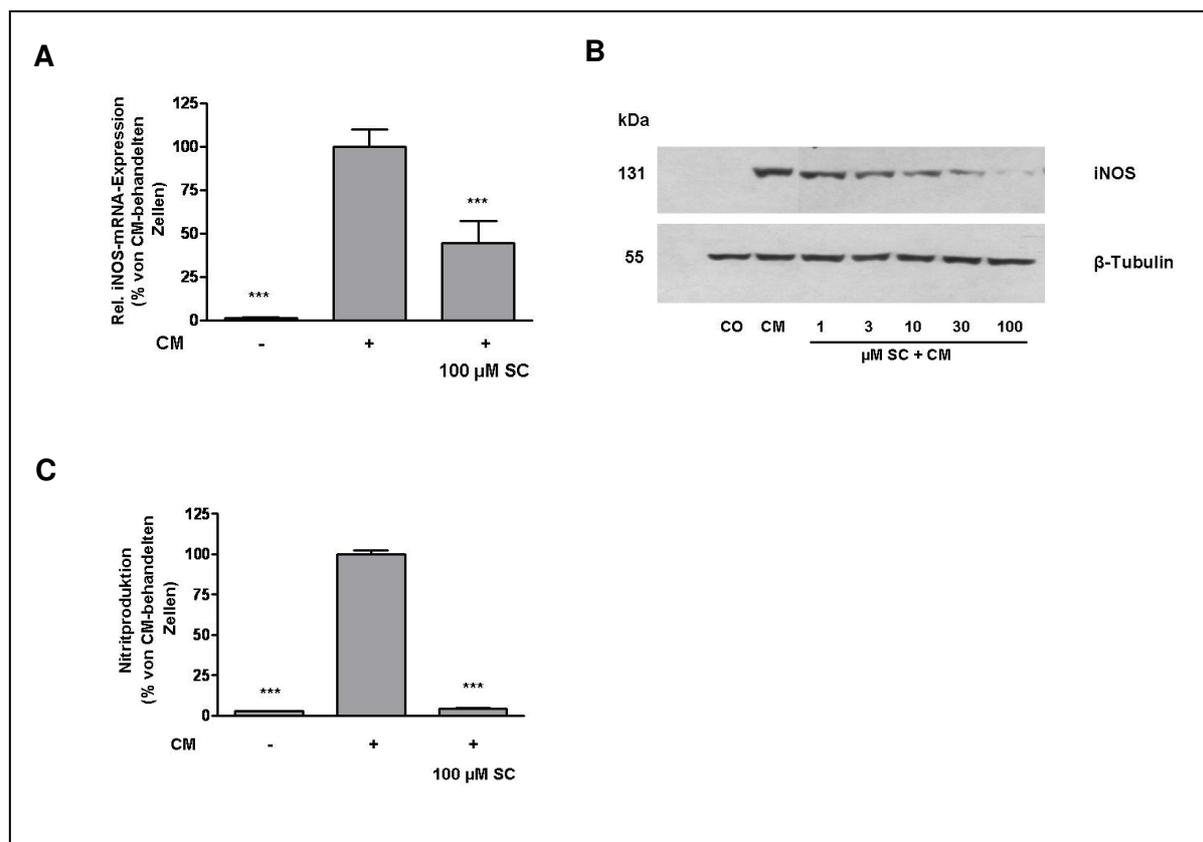


Abb. 18: Die iNOS-Expression wird in C-28/I2-Zellen nach Zytokin-Stimulation von S-Curvularin gehemmt

Zunächst wurden superkonfluente C-28/I2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von S-Curvularin (SC) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die iNOS-Expression durch Zugabe von Zytokinen (CM+ bzw. CM) induziert. Als Kontrolle (CM- bzw. CO) dienten Zellen, die in Serum-freiem Medium gehalten wurden.

(A) Analyse der iNOS-mRNA-Expression mittels qRT-PCR nach Vorbehandlung der Zellen mit 100 μ M SC und Stimulation mit (CM+) oder ohne (CM-) Zytokinen für sechs Stunden. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen aus fünf unabhängigen qRT-PCR-Analysen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in CM-stimulierten C-28/I2-Zellen (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte C-28/I2-Zellen).

(B) Repräsentativer Blot für zwei weitere Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen iNOS und β -Tubulin. Analysiert wurden 60 μ g Gesamtproteinextrakt aus unstimulierten (CO) oder für sechs Stunden mit Zytokinen behandelten (CM) C-28/I2-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von 0,3 μ g/ml, 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 10 μ g/ml und 30 μ g/ml SC.

(C) Analyse der iNOS-vermittelten NO-Produktion in C-28/I2-Zellen nach Inkubation mit 100 μ M SC aus drei unabhängigen Experimenten. Die NO-Produktion wurde nach 24-stündiger Behandlung mit (CM+) oder ohne (CM-) Zytokine als Nitrit im Zellkulturüberstand gemessen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative Nitritmengen in Bezug auf die Nitritmenge in CM-stimulierten C-28/I2-Zellen, die nicht mit SC behandelt wurden (***: $p < 0,001$ vs. CM-behandelte C-28/I2-Zellen).

VII.2 Die Wirkung von S-Curvularin auf die pro-inflammatorische Genexpression im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis

VII.2.1 Typisierung von TCR- β tg-Mäusen

Zur Untersuchung der Wirkung von S-Curvularin auf die pro-inflammatorische Genexpression im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) wurden DBA/1-Mäuse verwendet, die transgen für die T-Zellrezeptor- β -Kette eines Kollagen Typ II (CII)-spezifischen, arthritogenen T-Zellklon sind (Mori *et al.*, 1992).

Zunächst wurden die TCR- β tg-Mäuse von L. Mori auf dem für die Kollagen-induzierte Arthritis nicht suszeptiblen genetischen Hintergrund des SWR/J-Stamm entwickelt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass F1-Hybridmäuse zwischen dem für CIA suszeptiblen Stamm DBA/1 und den TCR- β tg-SWR/J-Mäusen eine schwere Arthritis mit höherer Inzidenz entwickeln als nicht transgene F1-Hybride. Dies lässt vermuten, dass die Expression der TCR- β -Kette die Entstehung einer CIA fördert. Durch die Verpaarung von Mäusen, die nicht transgen für die TCR- β -Kette sind, könnte dieses Merkmal bei der Zucht verloren gehen. Deshalb ist es von großer Bedeutung, alle Mäuse vor dem Verpaaren auf die Expression des Transgens zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst vier Tropfen Blut durch Anritzen der Schwanzvene gewonnen. Dann wurden die Monozyten des peripheren Blutes wie unter VI.13.1 beschrieben isoliert und mit den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Die Expression der transgenen TCR- β -Kette wurde mittels FACS-Analyse und einem Antikörper untersucht, der die transgene TCR- β -Kette erkennt (anti-TCR-V β_{12} -mAK). Die FACS-Analysen zeigen, dass die CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut der TCR- β tg-Mäuse die transgene TCR- β -Kette exprimieren (Abb. 19). Mäuse werden als positiv bewertet, wenn mehr als 90% der CD4⁺-T-Zellen die transgene TCR-V β_{12} -Kette exprimieren.

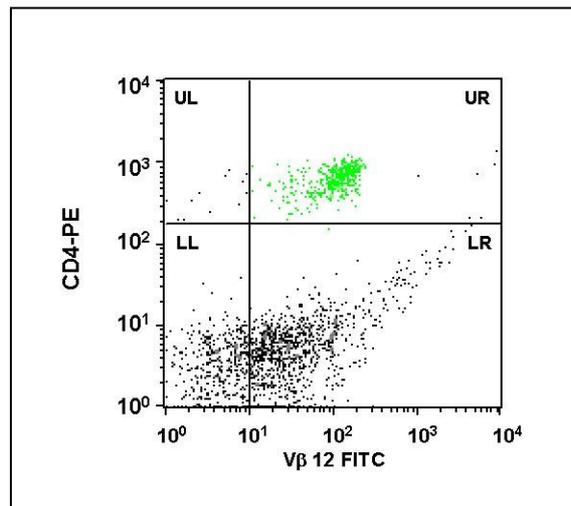


Abb.19: Expression der transgenen TCR-V β 12-Kette auf CD4⁺-T-Lymphozyten

Die peripheren Blutmonozyten wurden wie unter VI.13.1 beschrieben isoliert. Die Fluoreszenzmarkierung der CD4⁺-T-Zellen und der TCR-V β ₁₂-Kette erfolgte ebenfalls wie unter VI.13.1 beschrieben. In der Darstellung repräsentiert jeder Punkt die CD4⁺- und TCR-V β ₁₂-Ketten-Expression einer individuellen Zelle. Die Quadrantenmarker wurden anhand von Kontrollfärbungen mit irrelevanten Antikörpern festgelegt (LL = lower left, ungefärbte Zellen; LR = lower right, V β 12-FITC-positive Zellen; UL = upper left, CD4-PE-positive Zellen; UR = upper right, V β 12-FITC-CD4-PE-doppel-positive Zellen).

VII.2.2 Die Immunisierung mit Kollagen Typ II führt bei TCR- β tg-Mäusen zur Entstehung einer Arthritis

Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) wurde durch intradermale Injektion in die Ohrmuscheln und die Schwanzbasis einer Emulsion aus heterologem Kollagen Typ II (CII) und komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) ausgelöst. An Tag 11 und Tag 21 nach der Immunisierung erhielten die Mäuse eine zusätzliche Injektion des Antigens in die Schwanzbasis. Ab Tag 21 wurden die Mäuse alle vier Tage hinsichtlich der Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis beobachtet und der Arthritisindex wie unter VI.13.3 beschrieben ermittelt (Abb. 20).

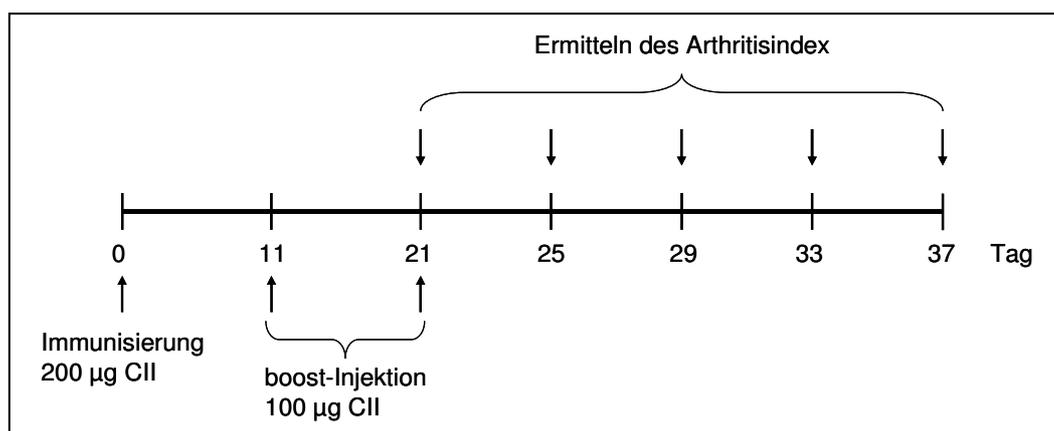


Abb. 20: Immunisierungsschema zur Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

TCR- β tg-Mäuse wurden zur Induktion der CIA durch intradermale Injektion einer Emulsion aus komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) und 200 μ g Kollagen Typ II (CII) immunisiert. Diese Mäuse erhielten an Tag 11 und Tag 21 nach der Immunisierung eine weitere Injektion (boost-Injektion) von 100 μ g CII in CFA in die Schwanzbasis. Ab Tag 21 wurde alle vier Tage jeweils der Arthritisindex ermittelt.

Nach der Immunisierung der TCR- β tg-Mäuse mit CII konnte beobachtet werden, dass der Arthritisindex im Beobachtungszeitraum stetig ansteigt und bei einem Wert von 8 annähernd stabil bleibt (Abb. 21). Alle Mäuse zeigten eine ausgeprägte klinische Symptomatik der CIA.

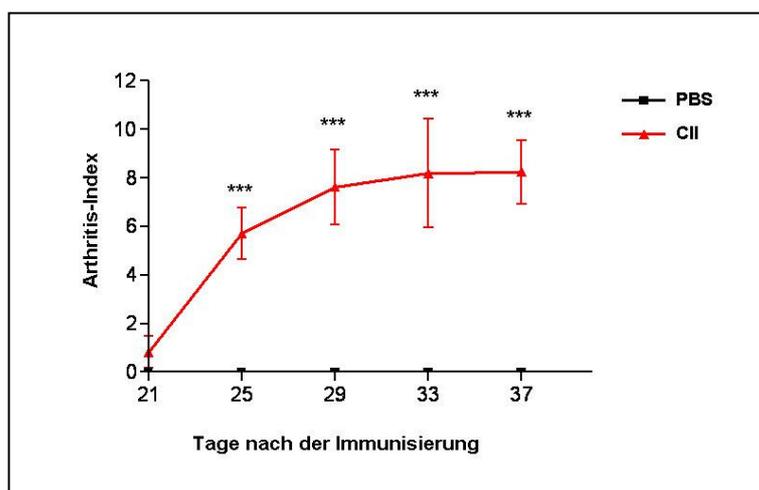


Abb. 21: Entwicklung einer Arthritis nach Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit heterologem Kollagen Typ II

Zur Induktion einer Arthritis wurden TCR- β tg-Mäuse mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert (siehe Abb. 19). Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Kontrolltiere erhielten nach dem gleichen Schema PBS-Injektionen. Die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis wurde über einen Zeitraum von 37 Tagen beobachtet. Die Ausprägung einer Arthritis ist als mittlerer Arthritisindex (\pm SEM) dargestellt (***: $p < 0,001$ vs. PBS-behandelten Mäusen).

In Abbildung 22 ist eine gesunde Hinterpfote einer TCR- β tg-Maus mit schlanken Zehen und dünnen Knöcheln zu sehen. Dargestellt sind ebenfalls die Hinterpfoten von CIA-immunisierten Mäusen in verschiedenen Stadien der Entwicklung einer Arthritis, die von der Schwellung eines einzelnen Zehgelenks (Index = 1) bis hin zu einer ausgeprägten Schwellung der gesamten Pfote reichte (Index = 4).

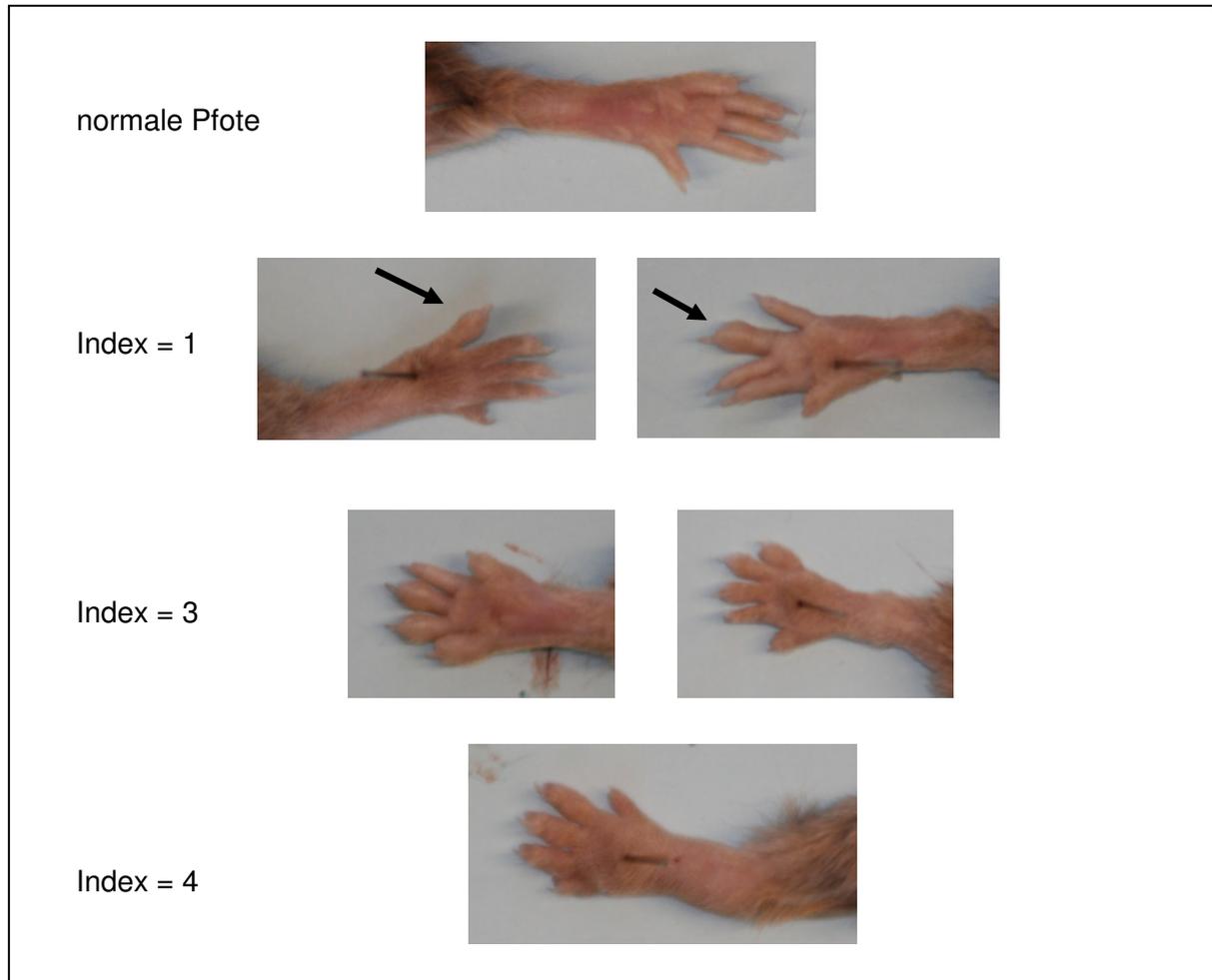


Abb. 22: Klinische Symptome einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Dargestellt sind die Pfoten einer gesunden und einer kranken Maus in verschiedenen, durch den Index beschriebenen Stadien der Entwicklung einer CIA.

VII.2.3 Die Behandlung einer etablierten Kollagen-induzierten Arthritis mit S-Curvularin und Dexamethason führt zu einer Verminderung der Krankheitssymptome

Zur Untersuchung der möglichen therapeutischen Bedeutung des Pilzwirkstoffs S-Curvularin bei inflammatorischen Erkrankungen wurde das Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) bei Mäusen verwendet.

Dazu wurden TCR- β tg-Mäuse an Tag 0 durch intradermale Injektion von 200 μ g CII in die Haut beider Ohrmuscheln und in die Schwanzbasis immunisiert. Diese Mäuse erhielten an Tag 11 und 21 eine boost-Injektion von jeweils 100 μ g CII in die Schwanzbasis. Kontrolltieren wurde jeweils die entsprechende Menge PBS injiziert. Ab Tag 21 wurden die mit CII-immunisierten Tiere entweder mit S-Curvularin (10 mg/kg Körpergewicht) oder Dexamethason (5 mg/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion behandelt. Die Behandlung erfolgte alle zwei Tage. An jedem vierten Tag wurde der Arthritisindex der Mäuse aus allen Behandlungsgruppen ermittelt und die Mäuse zur Organentnahme getötet (siehe auch Abb. 23).

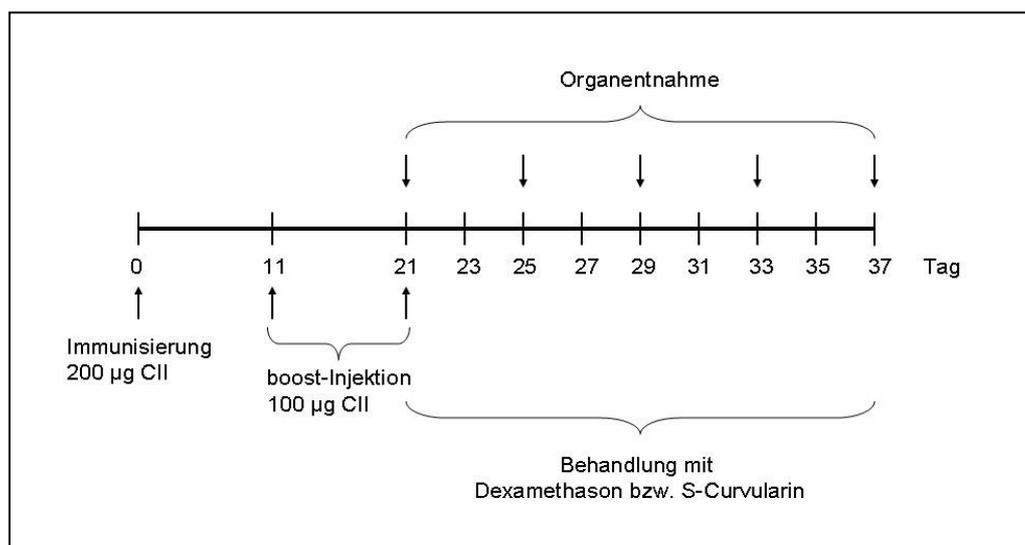


Abb. 23: Immunisierungs- und Behandlungsschema der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

TCR- β tg-Mäuse wurden zur Induktion der CIA durch intradermale Injektion einer Emulsion aus komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) und 200 μ g Kollagen Typ II (CII) immunisiert. Diese Mäuse erhielten an Tag 11 und Tag 21 nach der Immunisierung eine weitere Injektion (boost-Injektion) von 100 μ g CII in CFA in die Schwanzbasis. Kontrollmäuse wurden mit der entsprechenden Menge PBS behandelt. Ab Tag 21 wurde ein Teil der CII-immunisierten Mäuse jeden zweiten Tag mit Dexamethason bzw. S-Curvularin behandelt. Kontrolltieren wurde Lösungsmittel injiziert. Alle vier Tage wurde der Arthritisindex ermittelt und die Tiere zur Organentnahme getötet.

Nach Immunisierung der TCR- β tg-Mäuse mit CII steigt der Arthritisindex im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren im Verlauf des Experiments auf einen Wert von 8 an. Eine Behandlung dieser Tiere mit Dexamethason (CII+Dex) verringerte die klinischen Symptome der Arthritis, was durch einen niedrigeren mittleren Index zum Ausdruck kommt. Die Pfoten dieser Mäuse wurden mit einem durchschnittlich maximalen Wert von 2 bewertet. Diese Wirkung konnte bereits nach zwei Behandlungen mit Dex beobachtet werden. Auch eine Behandlung der immunisierten Tiere mit S-Curvularin (CII+SC) verminderte die Ausprägung der Schwellung im Vergleich zu unbehandelten, immunisierten Tieren deutlich. Jedoch tritt der Effekt im Vergleich zu CII+Dex zeitlich etwas verzögert ein (Abb. 24).

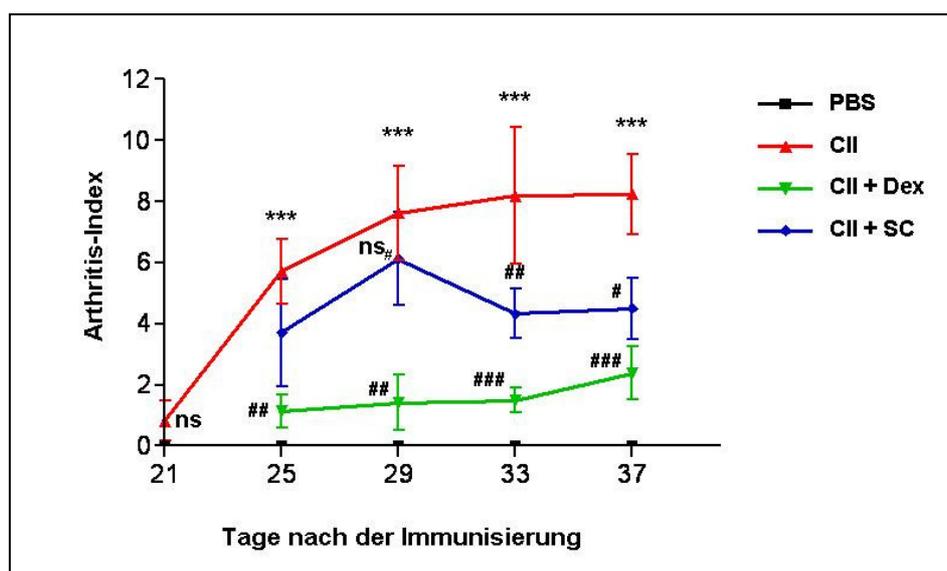


Abb. 24: Wirkung der Behandlung mit S-Curvularin und Dexamethason auf eine etablierte Kollagen Typ II induzierte Arthritis in TCR- β tg-Mäusen

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvularin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt (PBS). Die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis wurde bis Tag 37 nach Immunisierung verfolgt. Dargestellt ist die Ausprägung einer Arthritis als mittlerer Arthritisindex (\bar{x} \pm SEM) (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Mäusen; ###: $p < 0,001$; ##: $p < 0,01$; #: $p < 0,05$; ns#: nicht signifikant verschieden von CII-immunisierten Tieren).

VII.2.4 Analyse der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in peripheren Blutmonozyten und Pfoten von immunisierten TCR- β tg-Mäusen

Zur initialen Untersuchung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von S-Curvularin und Dexamethason im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis sollte deren Effekt auf die mRNA-Expression bekannter pro-inflammatorischer Mediatoren wie z.B. TNF- α und IL-1 β in

peripheren Blutmonozyten und den Pfoten untersucht werden. Dazu wurden TCR- β tg-Mäuse wie unter VII.2.2 beschrieben immunisiert und an Tag 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Anschließend wurde aus den peripheren Blutmonozyten und den Pfoten die RNA isoliert und die mRNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren mittels qRT-PCR-Analysen und den jeweiligen Sonden und zur Normierung der Pol2a-mRNA analysiert. Um die mRNA-Expression der untersuchten Gene in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren zu ermitteln, wurde die mRNA-Expression in den Kontrollmäusen als 1 gesetzt.

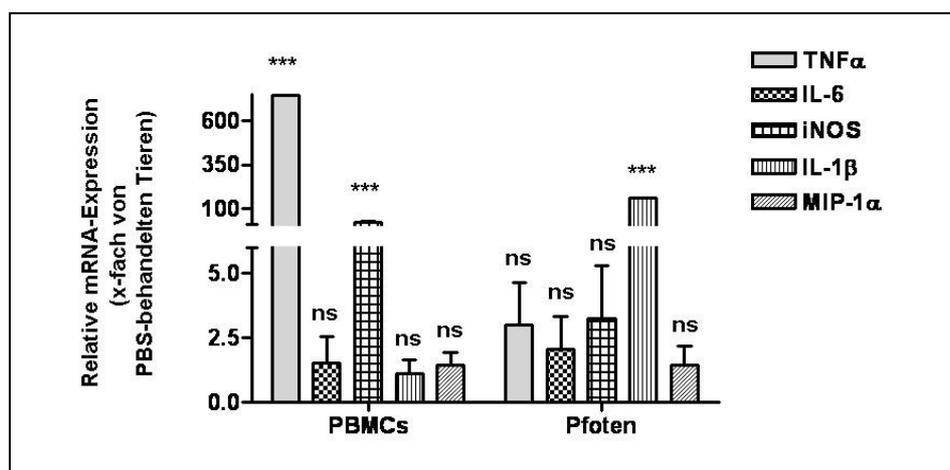


Abb. 25: Analyse der mRNA-Expression in peripheren Blutmonozyten und in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt (PBS). Die Tiere wurden an Tag 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus peripheren Blutmonozyten (PBMCs) und Pfoten aus TCR- β tg-Mäusen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Mengen in unbehandelten Kontrolltieren (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

In den Monozyten des peripheren Blutes konnte eine signifikant erhöhte TNF- α - und iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren detektiert werden. Die mRNA-Menge von IL-6, IL-1 β und MIP-1 α ist nicht signifikant verändert (Abb. 25). Wie in Abbildung 25 zu sehen konnte in den Pfoten ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression nur für IL-1 β nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis macht deutlich, dass diese bekannten pro-inflammatorischen Mediatoren in unterschiedlichen Geweben bzw. Zellen unterschiedlich exprimiert werden.

VII.2.5 Analyse der iNOS-mRNA-Expression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der rheumatoiden Arthritis spielt die Überexpression pro-inflammatorischer Gene, wie die der iNOS, eine wichtige Rolle. Da Glukokortikoide, wie z.B. das etablierte Pharmakon Dexamethason (Dex), als pleiotrop wirkende Hormone viele Nebenwirkungen besitzen, ist es von Bedeutung, neue, die pro-inflammatorische Genexpression hemmende Substanzen für die anti-inflammatorische Therapie zu finden. Zunächst sollte deshalb die Wirkung von S-Curvularin (SC) im Vergleich zu Dex als etabliertes Pharmakon auf die iNOS-mRNA-Expression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis untersucht werden. Dazu wurde das Immunisierungs- und Behandlungsschema wie unter VII.2.3 beschrieben (Abb. 23) verwendet.

Zur Untersuchung der iNOS-mRNA-Expression wurde aus den peripheren Blutmonozyten (periphere blood mononuclear cells, PBMCs), den Pfoten und der Leber die RNA isoliert und die iNOS-mRNA-Expression in qRT-PCR-Experimenten mit einer Sonde gegen die iNOS- und zur Normierung der Pol2a-mRNA analysiert. Um die Expression der iNOS in CII-immunisierten Mäusen im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren zu ermitteln, wurde die iNOS-mRNA-Expression in den Kontrolltieren als 100% gesetzt.

In PBMCs ist die iNOS-mRNA-Expression in CII-behandelten Tieren im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren nur an Tag 25 nach der Immunisierung um den Faktor 15 erhöht. An Tag 29, 33 und 37 nach der Immunisierung konnte kein signifikanter Anstieg der relativen iNOS-mRNA-Menge in CII-behandelten Mäusen detektiert werden (Abb. 26A). Auch in den Pfoten (Abb. 27A) und der Leber (Abb. 28A) der immunisierten Tiere kann eine signifikante Erhöhung der iNOS-mRNA nur an Tag 25 nachgewiesen werden. An den übrigen Tagen ist die iNOS-mRNA-Expression zwischen CII-behandelten Tieren und Kontrolltieren unverändert.

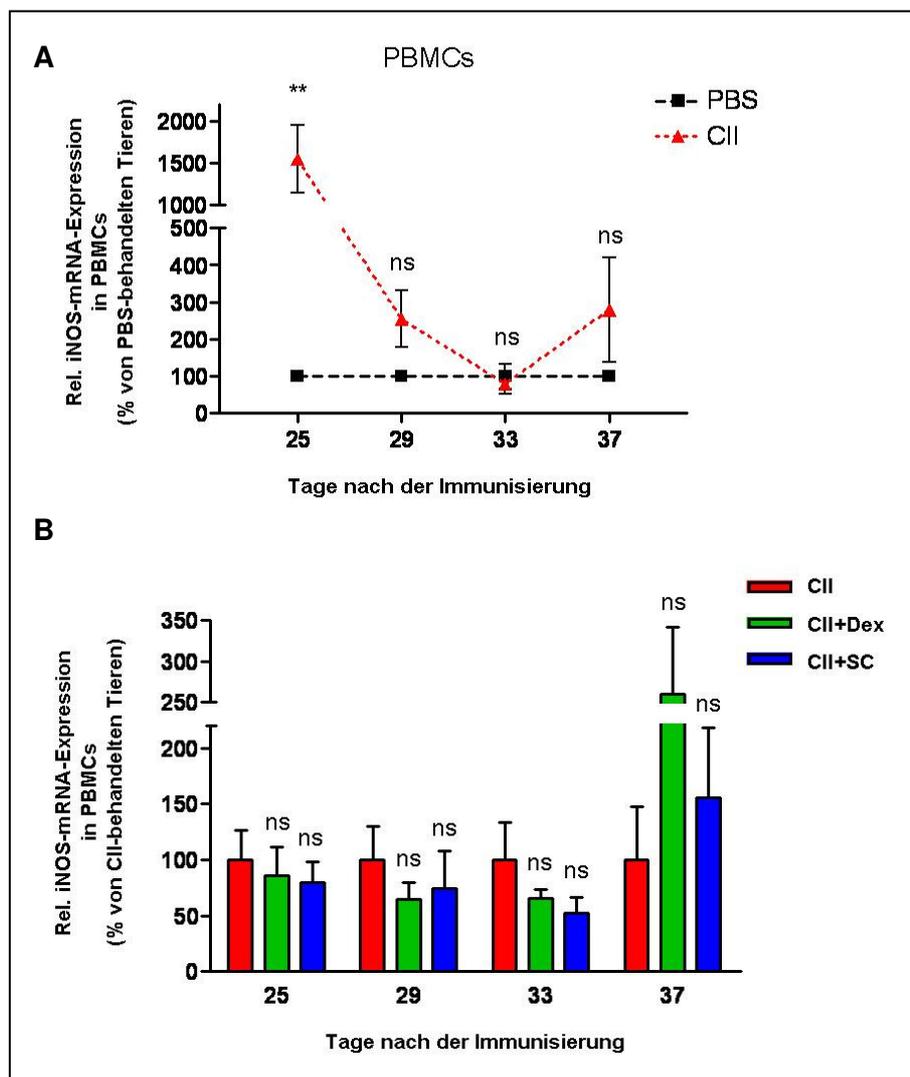


Abb. 26: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in peripheren Blutmonozyten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvarin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt (PBS). Die Tiere wurden an Tag 25, 29, 33 und 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus peripheren Blutmonozyten (PBMCs) aus TCR- β tg-Mäusen.

A) Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Mengen in PBS-behandelten Kontrolltieren (**: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

B) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (CII) (ns: nicht signifikant verschieden von immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren).

Zur Analyse der Effekte der Dex- bzw. SC-Behandlung der CIA auf die iNOS-mRNA-Expression in PBMCs, Pfoten und der Leber wurde zur Auswertung die iNOS-mRNA-Menge in CII-behandelten Tieren als 100% gesetzt.

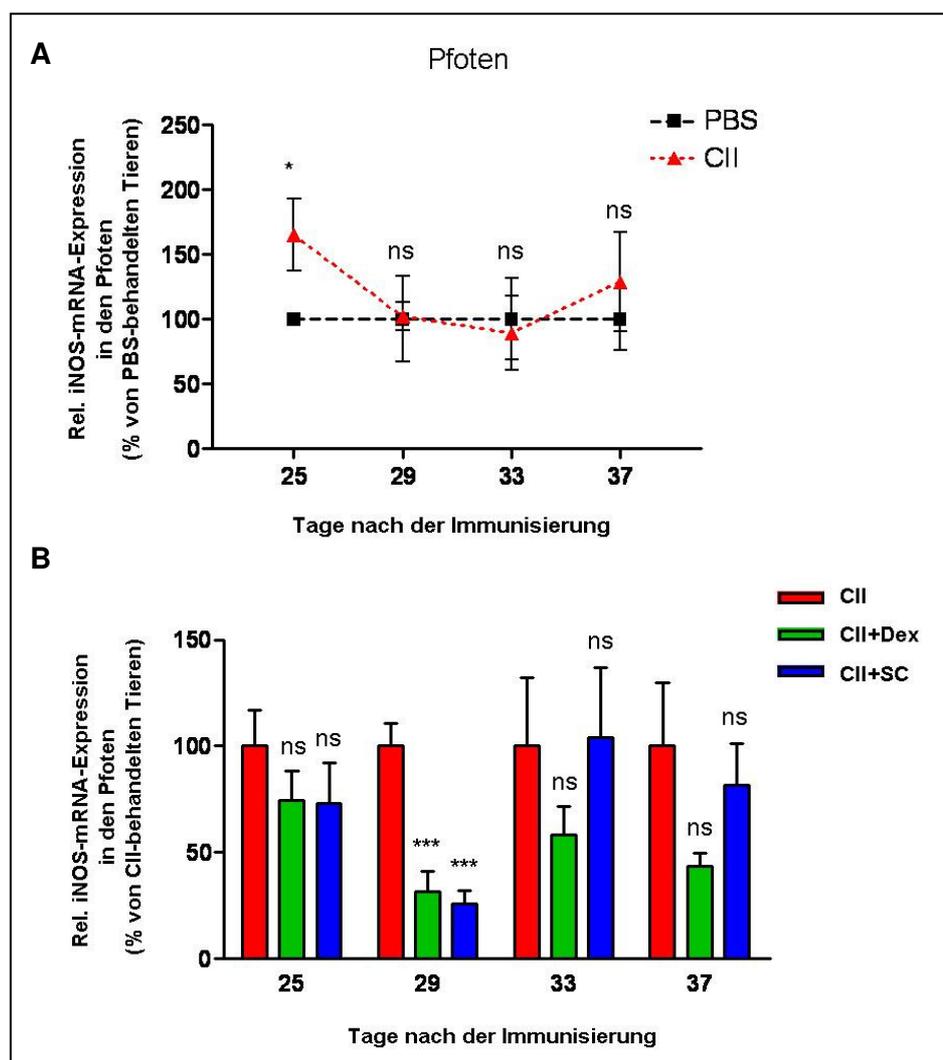


Abb. 27: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvarin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 25, 29, 33 und 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus Pfoten von TCR- β tg-Mäusen.

A) Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Mengen in PBS-behandelten Kontrolltieren (*: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

B) Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (CII) (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren).

Abb. 26B zeigt, dass die iNOS-mRNA-Expression in PBMCs durch eine Behandlung mit CII+Dex und CII+SC im Vergleich zu CII-Kontrolltieren nicht gehemmt wird. Auch in den Leberproben kann kein Einfluss von Dex und SC auf die Expression der CII-induzierte iNOS-mRNA beobachtet werden (Abb. 28B). Ein inhibitorischer Einfluss der beiden Behandlungsarten konnte lediglich an Tag 29 in den Pfoten nachgewiesen werden (Abb. 27 B).

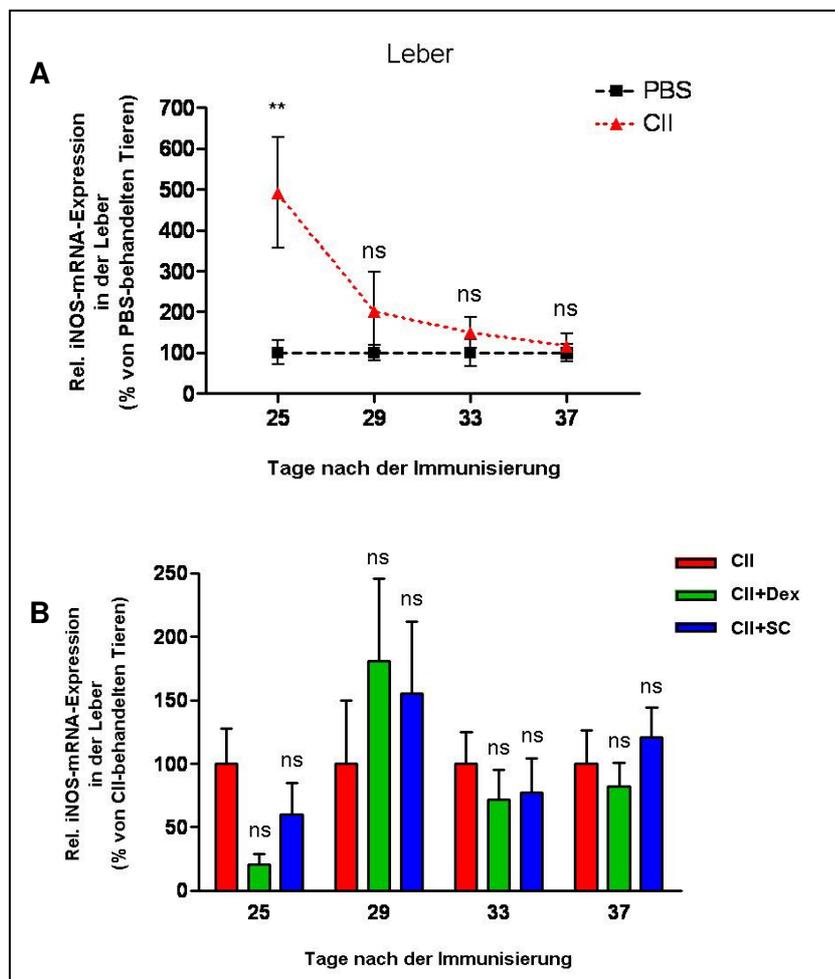


Abb. 28: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in der Leber im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Anstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvularin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 25, 29, 33 und 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus der Leber von TCR- β tg-Mäusen.

A) Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Mengen in PBS-behandelten Kontrolltieren (**: $p < 0,01$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

B) Die Säulen (Mittelwert \pm SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die iNOS-mRNA-Menge in immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (CII) (ns: nicht signifikant verschieden von immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren).

VII.2.6 Analyse der Proteinexpression wichtiger Zytokine und Chemokine im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

Zur parallelen Analyse einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen in den Pfoten von Mäusen wurde das „Mouse Cytokine Array Panel A“ von R&D Systems nach Herstellerangaben verwendet (Abb. 29). Analysiert wurde die Proteinexpression in den Pfoten von Tieren an Tag 37 nach der Immunisierung.

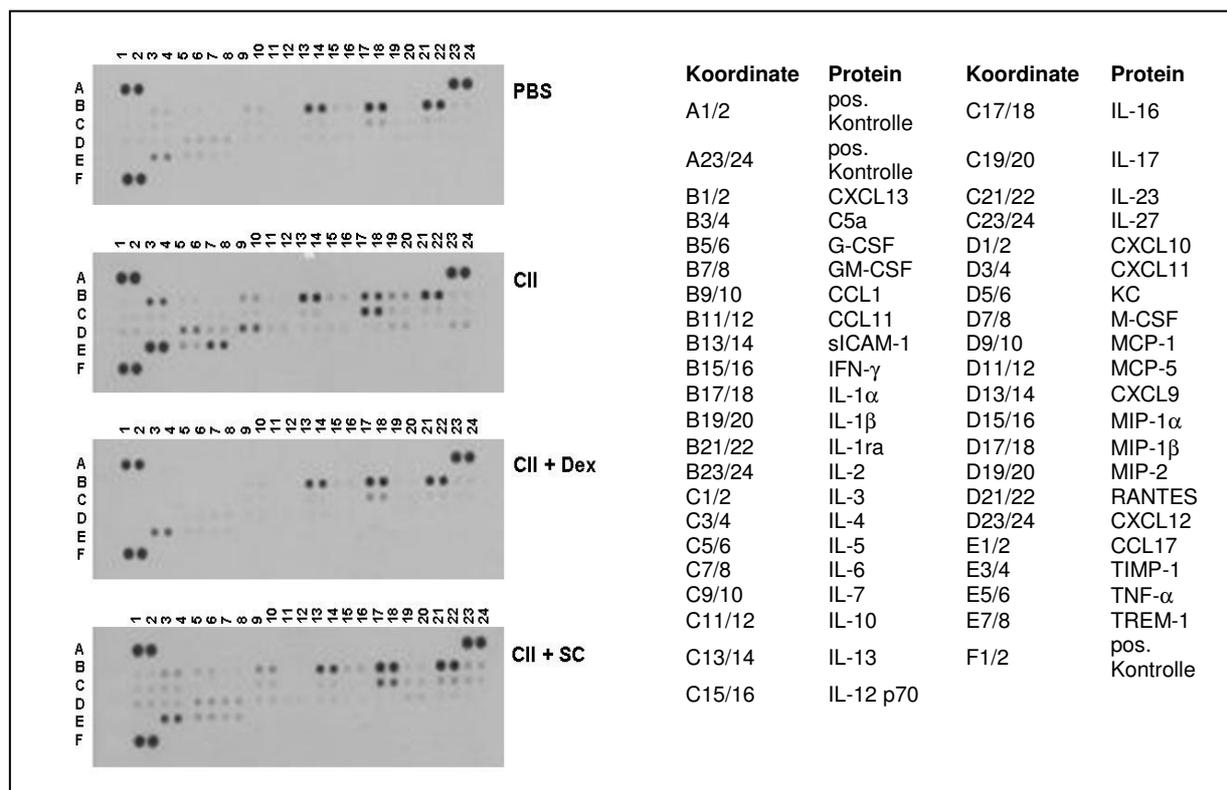


Abb. 29: Darstellung eines Proteome Profiler „Mouse Cytokine Array“ zur Analyse der Proteinexpression in Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvularin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 33 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Gezeigt sind vier Membranen des Proteome Profilers. Analysiert wurden 60 μ g Gesamtproteinextrakt.

Die quantitative Auswertung zeigte, dass eine Vielzahl pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine durch die Immunisierung der TCR- β tg-Mäusen in ihrer Expression induziert wurden (Abb. 29). So führte die Kollagen-Injektion in den Tieren zu einer sieben- bis achtfachen Erhöhung von C5a (complement component 5a) und MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren. Eine signifikante Erhöhung von

MIP-1 α (macrophage inflammatory protein), MIP-1 β , MIP-2, CXCL12 und CCL17 konnte ebenfalls nach einer Immunisierung detektiert werden. Es handelt sich dabei um chemotaktische Proteine, die Immunzellen zu Orten inflammatorischen Geschehens rekrutieren. Durch die Behandlung der CII-induzierten Mäuse mit Dex und SC konnte die erhöhte Expression der Proteine signifikant reduziert werden (Abb. 30A). Die in CII-behandelten Tieren erhöhte Expression des Chemokins CCL17 konnte durch die Gabe von Dex und SC vollständig inhibiert werden.

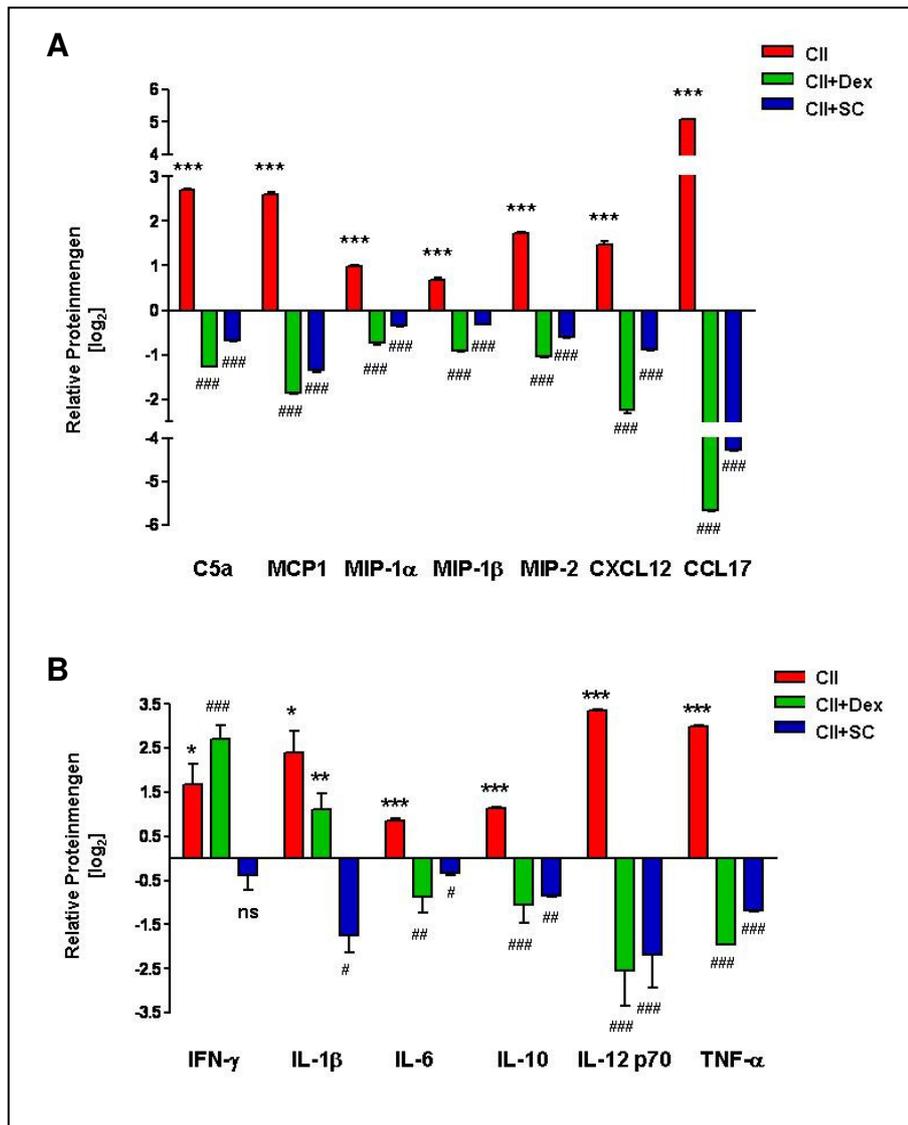


Abb. 30: Quantitative Auswertung des Proteome Profiler zur Analyse der Proteinexpression in Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der in Abb. 37 gezeigten Proteome Profiler mit Proben aus Pfoten im Modell der CIA. Die Quantifizierung wurde mit der Software Quantity One durchgeführt.

A) Darstellung der signifikant regulierten Chemokine

B) Darstellung der signifikant regulierten Zytokine

(*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ vs. PBS-behandelten Kontrolltieren; #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$ vs. Kollagen-induzierten Mäusen)

Die Immunisierung von TCR- β g-Mäusen mit Kollagen hatte ebenfalls unter anderem eine signifikante Erhöhung von IFN- γ , IL-1 β , IL-12p70 und TNF- α zur Folge (Abb. 30B). Es handelt sich bei diesen Proteinen um pro-inflammatorische Zytokine, die eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielen. Eine Behandlung der Tiere mit CII+Dex als auch mit CII+SC führte zu einer signifikanten Hemmung der IL-12p70- und TNF- α -Proteinmenge in den Pfoten. Die Expression von IL-1 β konnte nur durch eine Behandlung der Mäuse mit CII+SC reduziert werden.

VII.2.7 Genexpressionsanalysen in den Pfoten Kollagen-induzierter TCR- β g-Mäuse mittels DNA-Mikroarray-Analysen

Molekulare Untersuchungen zur Entstehung der RA sowie anderer chronisch-inflammatorischer Erkrankungen zeigen, dass ein komplexes Netzwerk pro-inflammatorischer Gene an der Entwicklung dieser Krankheiten beteiligt ist. Die komplexe Pathogenese chronisch-inflammatorischer Erkrankungen erfordert die Analyse der Expression einer Vielzahl von Genen. Zur parallelen Analyse der Genexpression kann die DNA-Mikroarray-Technik verwendet werden. Mit diesem experimentellen Ansatz sollten Markergene identifiziert werden, die anschließend in real-time PCR-Analysen zur Untersuchung des Krankheitsverlaufs der Kollagen-induzierten Arthritis eingesetzt werden können.

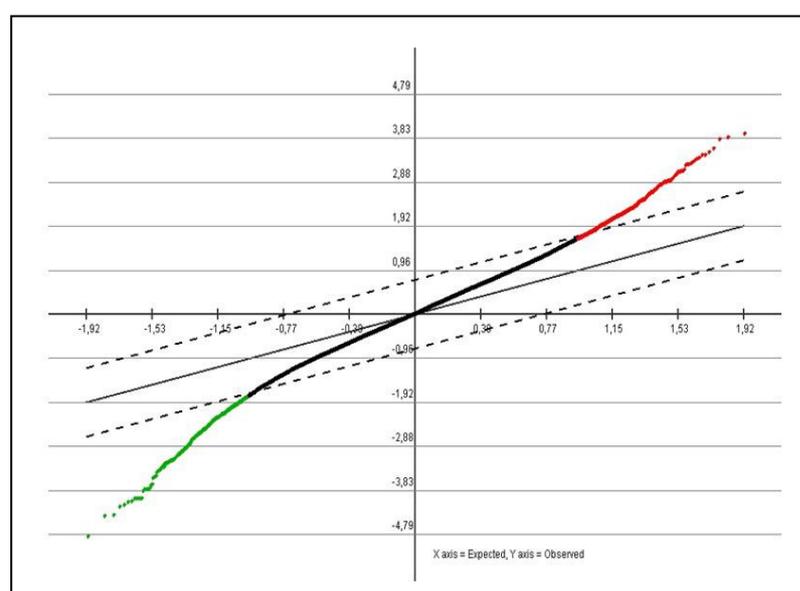


Abb. 31: Beispiel eines SAM-Graphs einer Zwei-Farben-Mikroarray-Analyse

Mikroarrays wurden wie unter VI.11.8 beschrieben ausgewertet. Gezeigt ist ein SAM-Graph als Beispiel einer statistischen Analyse von Zwei-Farben-Mikroarrays. Bei der Analyse wurde der q-Wert < 5% gesetzt. Dargestellt sind: rot = signifikant positiv, grün = signifikant negativ, schwarz = nicht regulierte Gene.

Zunächst wurden TCR- β tg-Mäuse wie unter VII.2.3 beschrieben mit Kollagen (CII) immunisiert und mit Dexamethason (CII+Dex) bzw. S-Curvularin (CII+SC) behandelt. Anschließend wurde die RNA aus den Pfoten der an Tag 33 getöteten Tiere wie unter VI.11.8.1 beschrieben isoliert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die erhaltene fluoreszenzmarkierte und aufgereinigte cDNA wurde dann nach dem in Tabelle 25 beschriebenen Schema mit den Genchips hybridisiert, die 35 852 Sonden, die 25 000 Gene und etwa 38 000 Transkripte repräsentieren. Nach dem Einscannen der Mikroarray-Chips wurden die erhaltenen Daten wie unter VI.11.8.3 beschrieben ausgewertet.

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis einer statistischen Auswertung mehrerer Mikroarrays mit Hilfe des „SAM“ (Significance Analysis of Microarrays)-Programms. Es wird deutlich, dass die größte Anzahl der untersuchten Gene nicht reguliert wird (schwarz). Ein Teil der Gene werden in ihrer Expression hochreguliert (rot), einige werden in ihrer Expression gehemmt (grün). Somit konnte die Annahme, dass die Mehrzahl der Gene in ihrer Expression nicht verändert wird, bestätigt werden.

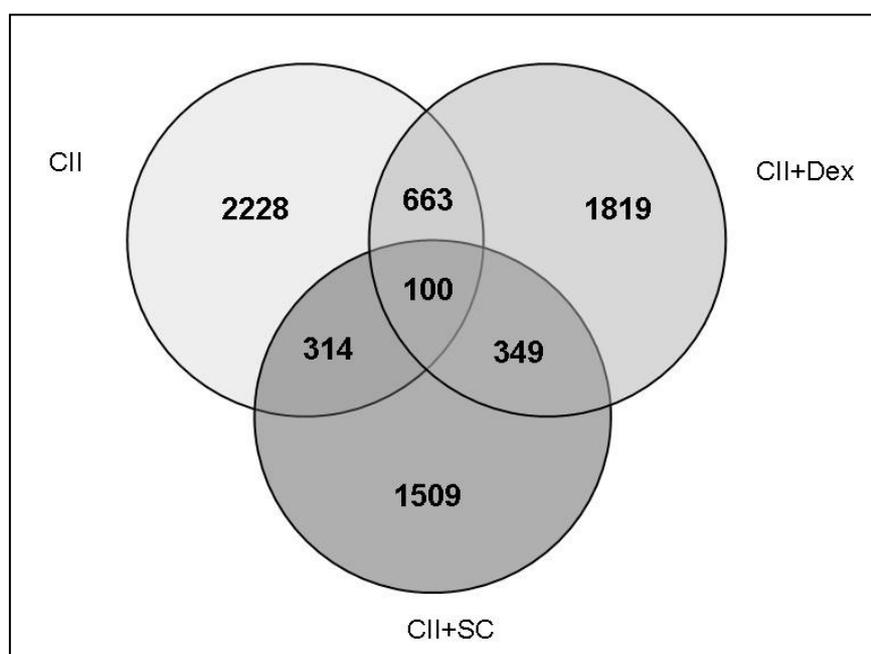


Abb. 32: Schematische Darstellung der Anzahl signifikant regulierter Gene im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvularin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt (PBS). An Tag 33 nach der Immunisierung wurden die Tiere getötet und RNA aus den Pfoten isoliert. Anschließend wurden DNA-Mikroarray-Analysen wie unter VI.11.8.1 beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist die Anzahl signifikant regulierter Gene im Modell der CIA nach Immunisierung mit Kollagen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (CII), nach der Behandlung mit Dexamethason (CII+Dex) und S-Curvularin (CII+SC) im Vergleich zu CII-immunisierten Tieren sowie die Anzahl gemeinsam regulierter Gene.

Die vergleichende Auswertung aller Daten zeigte, dass 2228 Gene nach Immunisierung mit CII im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren in ihrer Expression signifikant (q -Wert $< 5\%$) verändert waren. Die Behandlung von immunisierten Tieren mit Dex führte zu Expressionsänderungen von 1819 Genen, wobei 663 Gene auch nur durch eine Immunisierung mit CII signifikant reguliert wurden. Eine signifikante Änderung von 1509 Genen hatte die Behandlung mit SC nach CII-Injektion zur Folge. Davon konnten 349 Gene ebenfalls durch die Gabe von Dex in ihrer Expression verändert werden, 314 der 1509 Gene wurden allein durch die Injektion von CII verändert. Insgesamt konnten in allen drei Versuchsgruppen 101 Gene gefunden werden, die signifikant reguliert wurden (Abb. 32).

Die Gene, die nach der Auswertung als signifikant angesehen wurden, konnten mit Hilfe der Funktionen des „PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification Systems“ weiter spezifiziert werden. Mit diesem System ist es möglich, Gene anhand ihrer Funktion zu klassifizieren. Des Weiteren können Proteine in Gruppen gleicher Funktion eingeordnet werden, die dann anhand ihrer molekularen Funktion und des biologischen Prozess, an dem sie beteiligt sind, kategorisiert werden.

Zunächst wurden die Gene analysiert, die nach der Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit Kollagen signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren in ihrer Expression verändert waren. Die Gene wurden nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen eingeteilt. Dargestellt sind alle Gruppen, denen 40 oder mehr Gene zugeordnet werden konnten. Wie in Abb. 33 A zu sehen, konnte die Mehrzahl der Gene nicht klassifiziert werden. Etwa 300 Gene sind an Funktionen der Signaltransduktion beteiligt. Die Anzahl der Gene, die in der Immunantwort- und -abwehr involviert sind, beträgt etwa 100. Ein großer Anteil der als signifikant regulierten Gene ist an Prozessen des Nukleinsäure- und Proteinmetabolismus sowie an Entwicklungsprozessen beteiligt.

In Abb. 33 B ist das Ergebnis der Analyse der Gene zu sehen, die nach der Behandlung mit SC im Vergleich zu CII-immunisierten Tiere in ihrer Expression signifikant verändert waren. Dargestellt sind die Gruppen, denen zehn oder mehr Gene zugeordnet wurden. Auch hier konnte die Mehrzahl der Gene nicht klassifiziert werden. Der Gruppe „Signaltransduktion“ konnten 35 Gene zugeordnet werden. Etwa 20 Gene wurden den Prozessen der Immunität und Abwehr zugeteilt. Eine Vielzahl der signifikant regulierten Gene nach der Behandlung mit SC ist ebenfalls an Prozessen des Nukleinsäure- und Proteinmetabolismus sowie an Entwicklungsprozessen beteiligt.

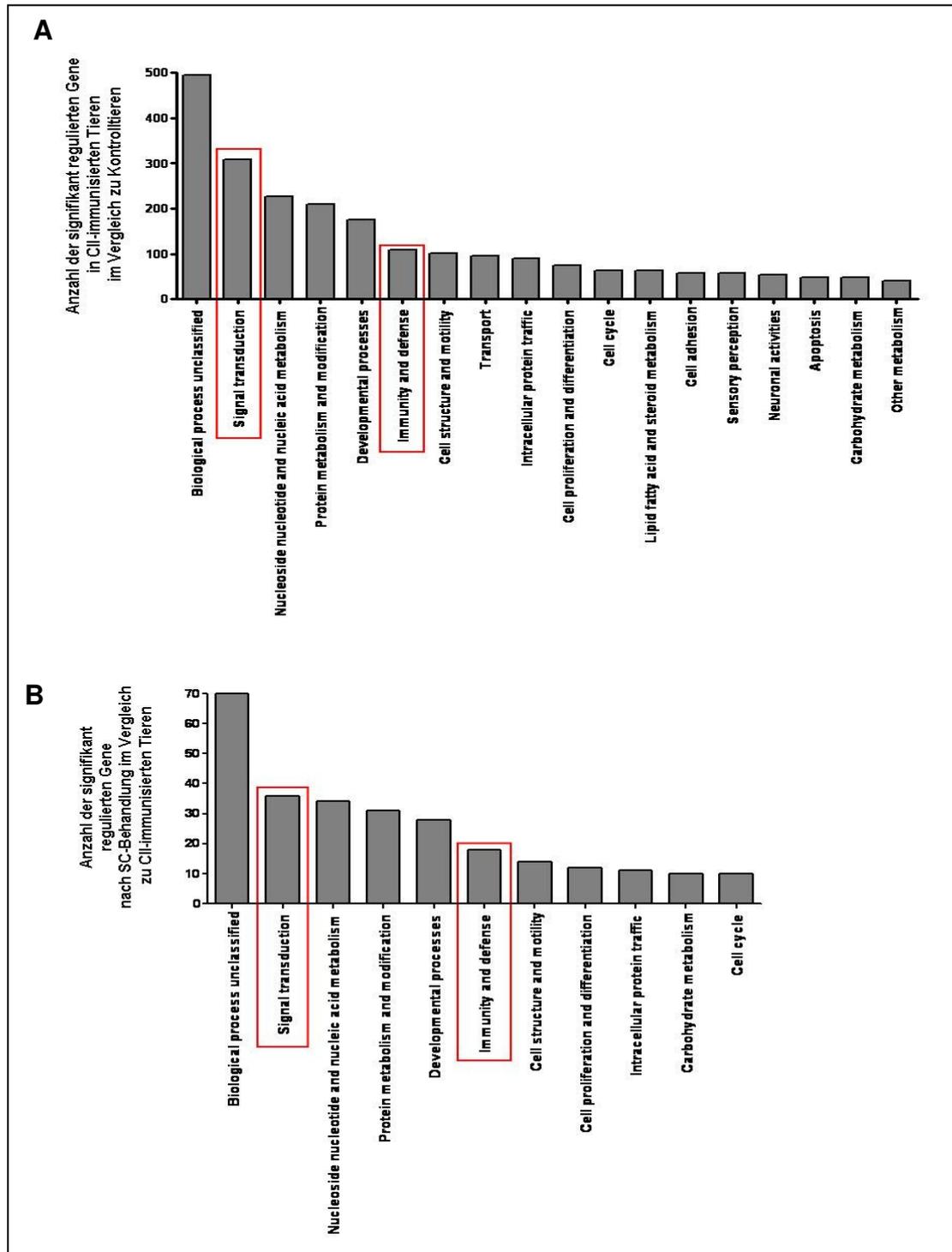


Abb. 33: Einteilung der signifikant regulierten Gene anhand der Beteiligung an biologischen Prozessen

Gezeigt ist die mit dem „PANTHER Classification Systems“ erstellte Einteilung der signifikant regulierten Gene nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen. Rot markiert sind die Kategorien Signaltransduktion sowie Immunität und Abwehr.

A) Einteilung der nach Immunisierung (CII) signifikant veränderter Gene im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren.

B) Einteilung der nach S-Curvaralin-Behandlung (SC) signifikant veränderter Gene im Vergleich zu Kollagen-induzierten Tieren (CII).

Zur Untersuchung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von SC im chronischen Entzündungsmodell der Kollagen-induzierten Arthritis sind solche Gene von Interesse, die nach der Behandlung mit der Pilzsubstanz im Vergleich zu CII-immunisierten Tieren in entgegengesetzter Weise reguliert werden. Deshalb wurden solche Gene näher analysiert, die nach der Injektion von Kollagen in ihrer Expression induziert und nach der Behandlung mit SC gehemmt wurden (siehe Anhang, Tabelle 36).

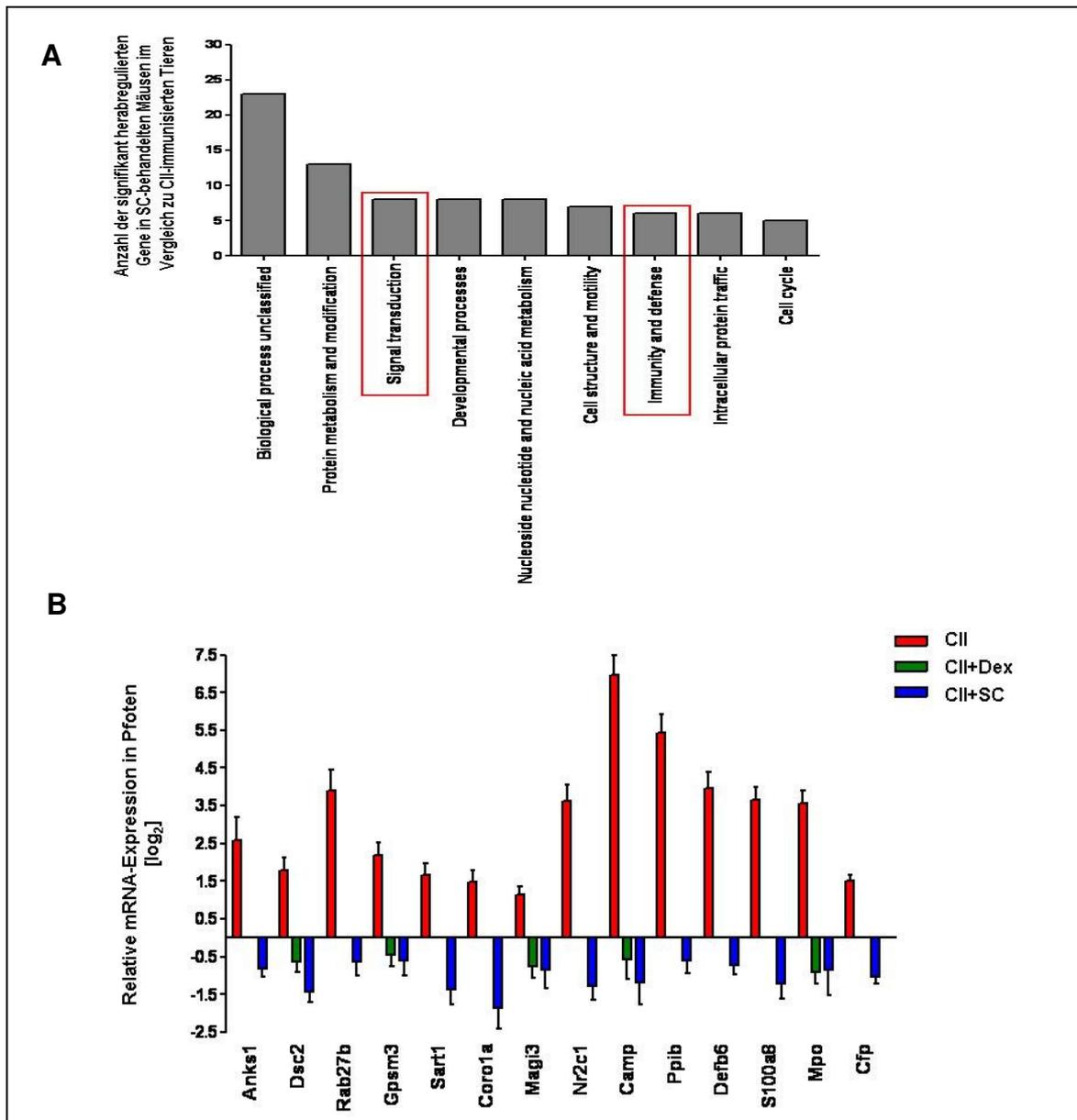


Abb. 34: Darstellung der signifikant herabregulierten Gene nach S-Curvarin-Behandlung (SC) im Vergleich zu CII-behandelten Mäusen

A) Einteilung der nach SC-Behandlung signifikant herabregulierter Gene im Vergleich zu CII-induzierten Tieren. Gezeigt ist die mit dem „PANTHER Classification Systems“ erstellte Einteilung der signifikant regulierten Gene nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen (Rot = Kategorie Signaltransduktion, Immunität/Abwehr).

B) Dargestellt ist die relative mRNA-Expression signifikant herabregulierter Gene nach SC-Behandlung (CII+SC) im Vergleich zu CII- und Dex (CII+Dex)- behandelten Tieren, die an der Signaltransduktion und der Immunität beteiligt sind.

Die PANTHER-Analyse zeigte, dass acht Gene der Kategorie „Signaltransduktion“ und sechs Gene der Gruppe „Immunität und Abwehr“ zugeordnet werden konnte (Abb. 34A). Diese 14 Gene wurden nochmals genauer analysiert und dargestellt (Abb. 34B).

Eine Immunisierung mit CII führt unter anderem zur Induktion der mRNA-Expression einer Vielzahl von Genen, die an der Immunität beteiligt sind. So ist die mRNA-Menge der antimikrobiellen Peptide Camp (cathelicidin antimicrobial peptide) (Zheng *et al.*, 2007), Ppib (peptidylprolyl isomerase B) (De Ceuninck *et al.*, 2003) und Defb6 (defensin beta) (Wehkamp *et al.*, 2007) nach der Immunisierung mit Kollagen in ihrer Expression stark erhöht und kann durch die Injektion von SC in den Pfoten der Mäuse signifikant reduziert werden. Des Weiteren konnte ebenfalls eine starke Induktion der von Granulozyten gebildeten Myeloperoxidase (Mpo) (Maki-Petaja *et al.*, 2008) und des Calcium-bindenden Proteins S100A8 (Frosch *et al.*, 2000), das eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Gelenkerkrankungen einzunehmen scheint, in Kollagen-behandelten Tieren beobachtet werden (Abb. 34B). Die Expression dieser beiden Gene konnte ebenfalls durch die Behandlung mit der Pilzsubstanz SC reduziert werden. Eine signifikante inhibitorische Wirkung von Dexamethason konnte nur bei fünf der ausgewählten Gene beobachtet werden.

Der Effekt der Immunisierung mit CII sowie der Behandlung mit Dexamethason oder S-Curvularin auf die mRNA-Expression von Camp, Mpo, Defb6, Ppib und S100A8 (siehe VII.2.8) wurde anschließend mittels qRT-PCR verifiziert. Wie in Abbildung 35 gezeigt, führte eine Immunisierung der Mäuse zu einer Induktion der untersuchten Gene. Die Camp-, Mpo- und Ppib-mRNA-Expression wurde durch eine Behandlung der Tiere mit S-Curvularin gehemmt, wobei der Effekt der Substanz auf die Camp-mRNA-Menge nicht signifikant war. Durch eine Behandlung mit Dexamethason konnte die CII-induzierte Mpo- und Ppib-mRNA-Expression (Abb. 35 B + D) tendenziell gehemmt werden, wobei die Effekte nicht signifikant waren. Ein Einfluss von S-Curvularin und Dexamethason auf die Defb6-mRNA-Expression konnte nicht detektiert werden (Abb. 35C). Des Weiteren hatte eine Anwendung von Dexamethason keinen Einfluss auf die CII-induzierte Camp-mRNA-Expression in den Pfoten der Tiere (Abb. 35A). Die Expressionsdaten der Mikroarray-Analyse konnten also weitestgehend in qRT-PCR-Experimenten bestätigt werden.

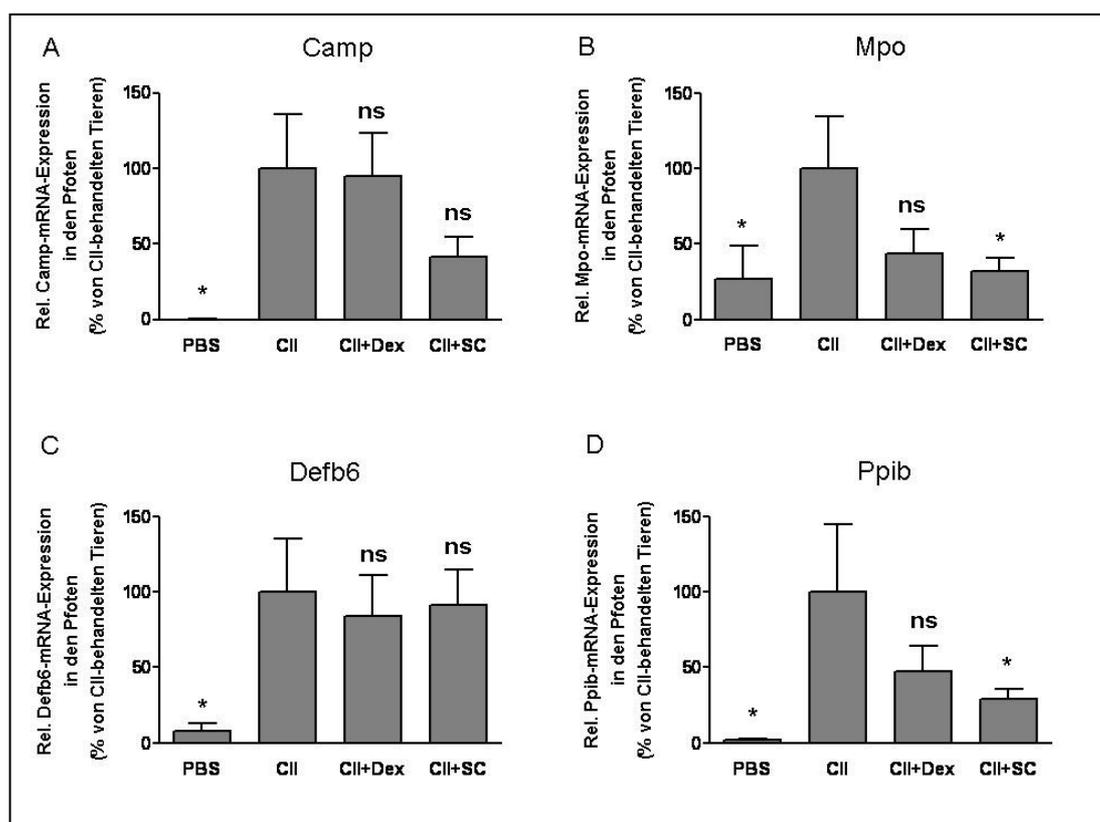


Abb. 35: Analyse der mRNA-Expression von Camp, Mpo, Defb6 und Ppib im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvarin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 33 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus den Pfoten von TCR- β tg-Mäusen. Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative Camp-(A), Mpo- (B), Defb6- (C) und Ppib- (D)-mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Mengen in CII-behandelten Tieren (*: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von CII-behandelten Kontrolltieren).

Des Weiteren wurden solche Gene genauer analysiert, die nach der Immunisierung mit CII in ihrer Expression vermindert und durch eine Behandlung mit Dex bzw. SC induziert wurden (siehe Anhang, Tabelle 37). So konnten sechs Gene identifiziert werden, die anhand des PANTHER Classification Systems in die Gruppen „Signaltransduktion“ und „Immunität und Abwehr“ eingeteilt wurden (Abb. 36A).

Die Ergebnisse zeigten, dass unter anderem die mRNA-Expression von Notch2 (Notch gene homolog 2) und Foxc1 (forkhead box 1) nach Immunisierung der Tiere mit Kollagen im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollmäusen reduziert und durch die Gabe von SC induziert wurde. Des Weiteren konnte eine Hemmung von Gpr34 (G protein-coupled receptor 36) nach der Immunisierung und eine verstärkte Expression nach der Behandlung mit der

Pilzsubstanz beobachtet werden. Bei allen hier aufgeführten Genen konnte ein signifikanter Effekt von Dex nur für Notch2 und Ogn (Osteoglycin) nachgewiesen werden (Abb. 36B).

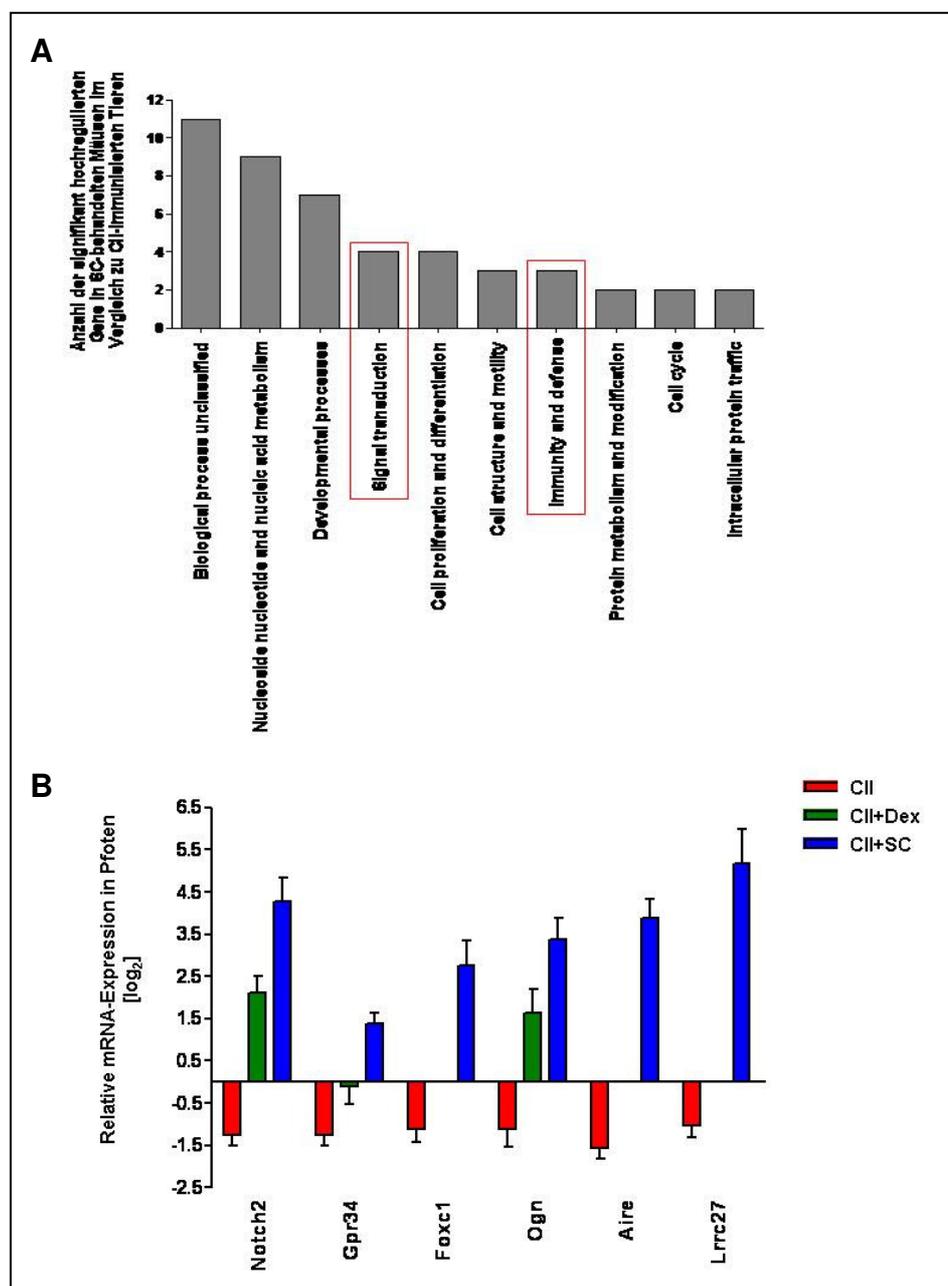


Abb. 36: Darstellung der signifikant hoch regulierten Gene nach S-Curvularin-Behandlung im Vergleich zu CII-behandelten Mäusen

A) Einteilung der nach S-Curvularin-Behandlung signifikant hoch regulierten Gene im Vergleich zu Kollagen-induzierten Tieren. Gezeigt ist die mit dem „PANTHER Classification System“ erstellte Einteilung der signifikant regulierten Gene nach ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen. Rot markiert sind die Kategorien Signaltransduktion sowie Immunität und Abwehr.

B) Dargestellt ist die relative mRNA-Expression signifikant hoch regulierter Gene nach S-Curvularin-Behandlung (CII+SC) im Vergleich zu CII- und Dex (CII+Dex)- behandelten Tieren, die an der Signaltransduktion und der Immunität beteiligt sind.

VII.2.8 Analyse der S100A8-mRNA-Expression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

Die DNA-Mikroarray-Analysen hatten gezeigt, dass das Ca²⁺-bindende Protein S100A8 durch CII in seiner Expression auf mRNA-Ebene erhöht wird und S-Curvularin bzw. Dexamethason dies hemmen. Um diese Daten mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde die mRNA-Expression des als pro-inflammatorischer Mediator wirkenden Proteins S100A8, das von Immunzellen unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert wird, im Modell der CIA untersucht. Dazu wurden qRT-PCR-Experimente mit den gleichen RNA-Proben wie unter VII.2.4 durchgeführt. Hierbei wurde die S100A8-mRNA-Menge in PBS-behandelten Kontrolltieren als 100% gesetzt.

Während des gesamten Behandlungszeitraums führte eine Immunisierung der TCR- β tg-Mäuse mit CII in PBMCs zu einer deutlichen Erhöhung der S100A8-mRNA-Expression im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren. Im Verlauf der Krankheit nimmt die relative S100A8-mRNA-Menge im Vergleich zu Kontrollmäusen jedoch von einer 20-fachen Erhöhung an Tag 25 auf eine 4-fache Erhöhung an Tag 37 ab (Abb. 37A). In den Pfoten der CII-immunisierten Mäuse ist nur an Tag 25 nach der Immunisierung ein signifikanter Anstieg der S100A8-mRNA-Expression detektierbar, wobei die Expression an Tag 29 und 33 tendenziell ebenfalls erhöht ist (Abb. 38A). In der Leber kann ein ähnlicher Verlauf der Expressionsstärke der S100A8-mRNA wie in den PBMCs beobachtet werden. Die S100A8-mRNA-Menge in CII-Tieren ist im Vergleich zu PBS-Mäusen an den Tagen 25, 29 und 33 signifikant erhöht, wobei die relative mRNA-Menge im Verlauf ebenfalls abnimmt (Abb. 39A).

Zur Untersuchung der Effekte von Dex und SC auf eine etablierte Arthritis wurde die relative S100A8-mRNA-Menge in immunisierten, aber unbehandelten Mäusen als 100% gesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in PBMCs beide Substanzen an Tag 25 und 33 keine inhibitorische Wirkung auf die mRNA-Expression von S100A8 im Vergleich zu Kontrolltieren besitzen. An Tag 29 nach der Immunisierung kann die S100A8-mRNA-Menge sowohl von Dex als auch von SC auf etwa 30% reduziert werden. 37 Tage nach der Immunisierung konnte die S100A8-mRNA-Expression durch eine Behandlung mit CII+SC um 80% bezogen auf CII-behandelte Tiere vermindert werden (Abb. 37B).

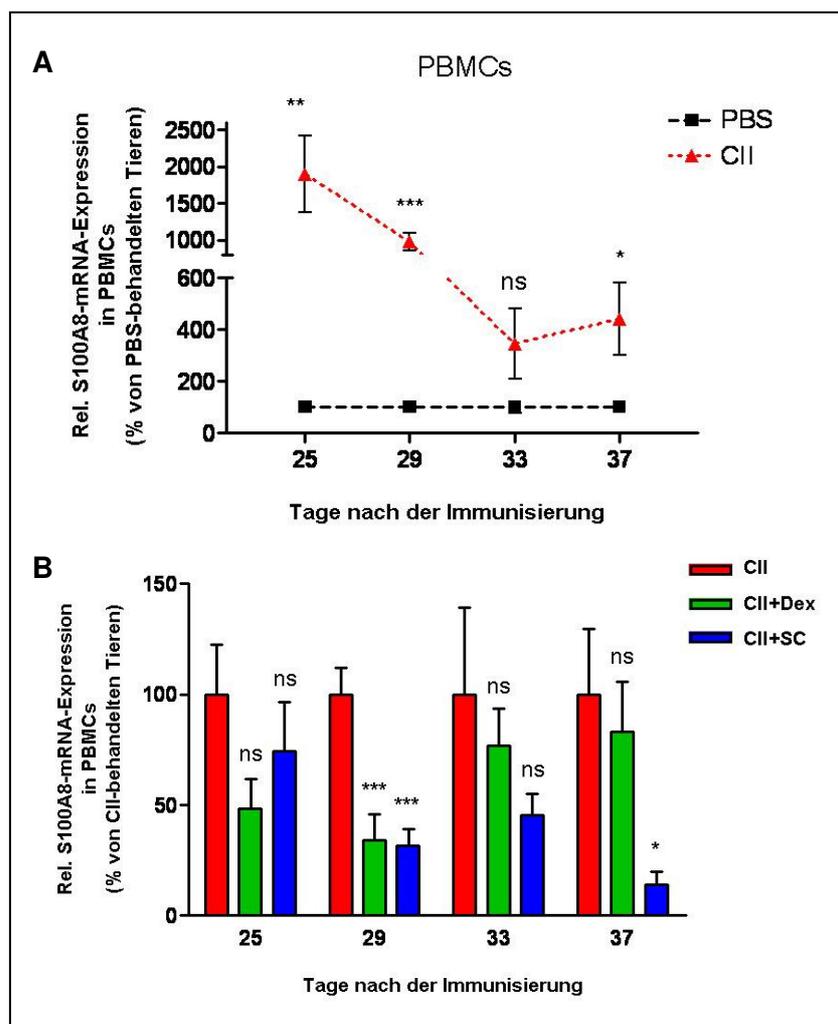


Abb. 37: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in peripheren Blutmonozyten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvularin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 25, 29, 33 und 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus peripheren Blutmonozyten aus TCR- β tg-Mäusen.

A) Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die S100A8-mRNA-Mengen in PBS-behandelten Kontrolltieren (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

B) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren die relativen S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die S100A8-mRNA-Menge in immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (CII) (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren).

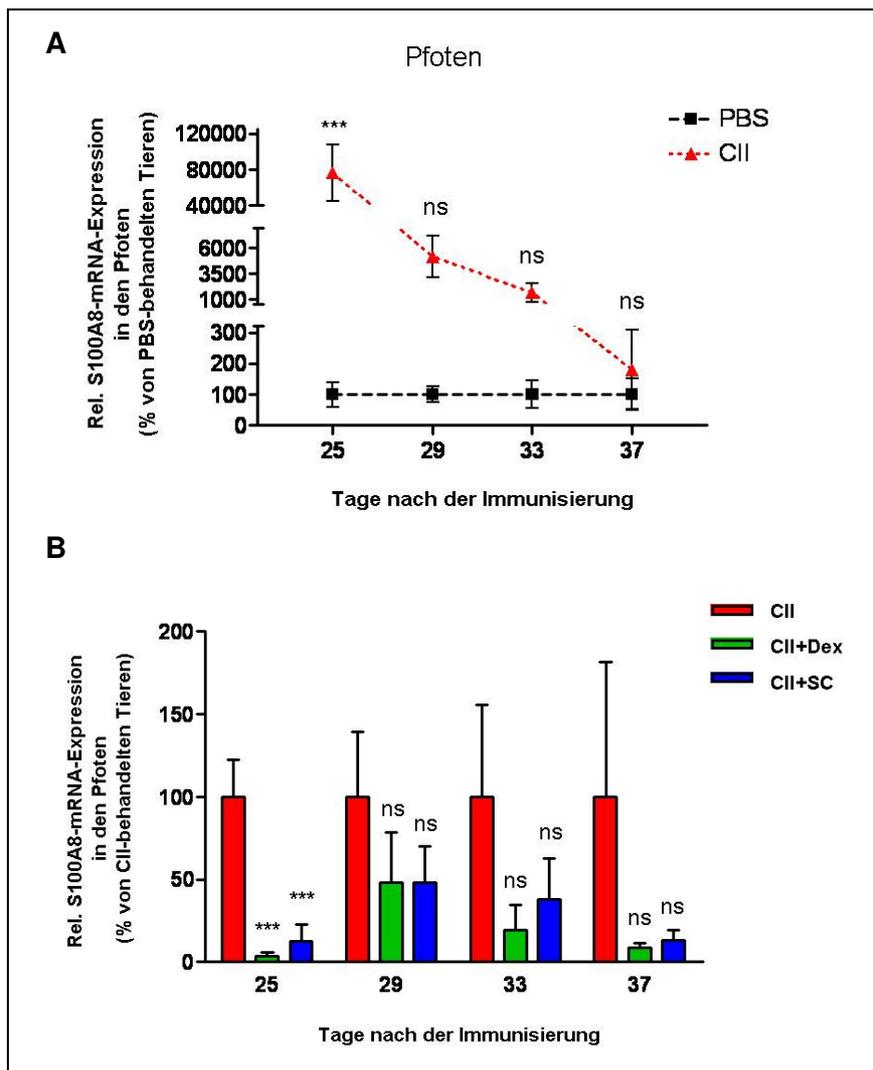


Abb. 38: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvarin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 25, 29, 33 und 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus Pfoten von TCR- β tg-Mäusen.

A) Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die S100A8-mRNA-Mengen in PBS-behandelten Kontrolltieren (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

B) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren die relativen S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die S100A8-mRNA-Menge in immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (CII) (***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren).

In den Pfoten CII-immunisierter und mit Dex- bzw. SC-behandelter TCR- β tg-Mäuse konnte eine signifikante Reduktion der S100A8-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrolltieren nur an Tag 25 nach der Immunisierung detektiert werden. An allen anderen Tagen wurde nur eine tendenzielle Abnahme der S100A8-mRNA-Menge beobachtet (Abb. 38B).

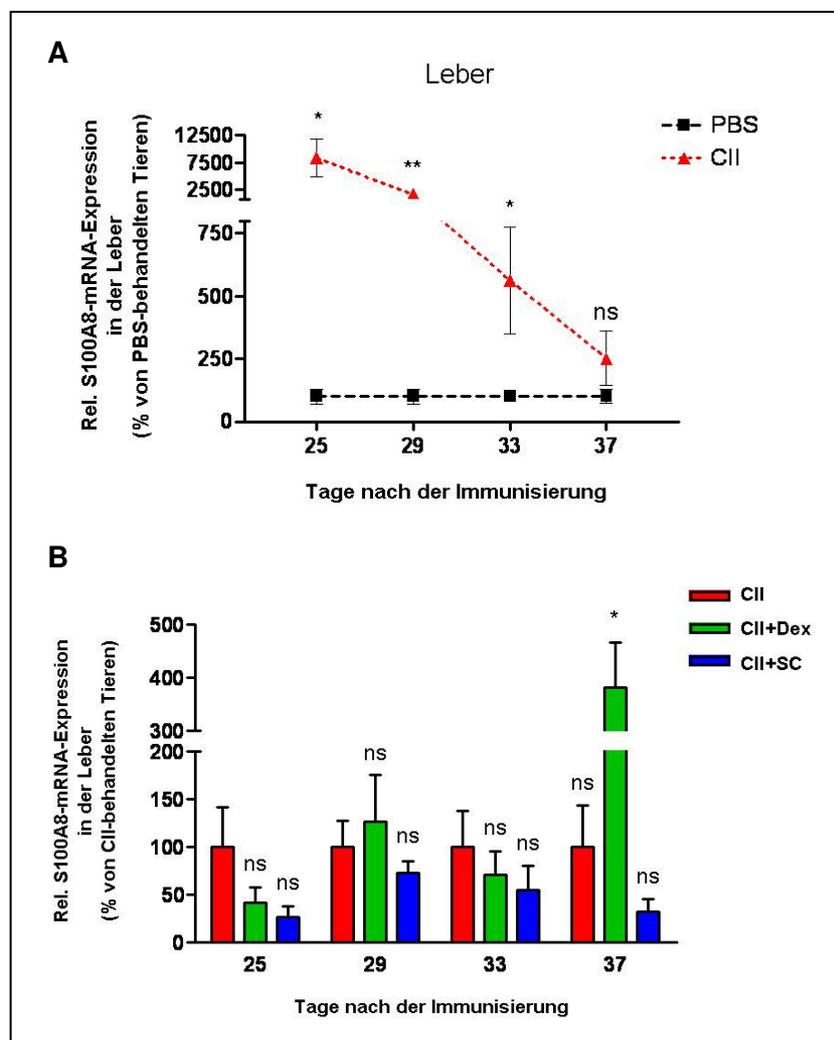


Abb. 39: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in der Leber im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvarin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 25, 29, 33 und 37 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängigen qRT-PCR-Analysen und RNA aus der Leber von TCR- β tg-Mäusen.

A) Die Messpunkte (Mittelwert \pm SEM) entsprechen den relativen S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die S100A8-mRNA-Mengen in PBS-behandelten Kontrolltieren (**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von PBS-behandelten Kontrolltieren).

B) Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren die relativen S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die S100A8-mRNA-Menge in immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren (CII) (*: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant verschieden von immunisierten, unbehandelten Kontrolltieren).

Eine Behandlung von Mäusen mit einer etablierten Arthritis hatte in der Leber keinen Effekt auf die S100A8-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die Behandlung mit Dex führte an Tag 37 nach der Immunisierung sogar zu einer signifikanten Erhöhung der S100A8-mRNA-Menge (Abb. 39B).

VII.2.9 Analyse der S100A8-Proteinexpression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

Um die Wirkung von S-Curvularin (SC) im Vergleich zu Dexamethason (Dex) auf die Proteinexpression im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis zu untersuchen, wurden TCR- β tg-Mäuse wie unter VII.2.3 beschrieben immunisiert (CII) und mit Dex (CII+Dex) bzw. SC (CII+SC) behandelt. Anschließend wurden die Pfoten der an Tag 33 getöteten Tiere zur Herstellung der Zelllysate in Lyse-Puffer mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Die Detektion erfolgte zunächst mittels Western Blot-Analysen und einem monoklonalen Antikörper gegen S100A8. Als Ladungskontrolle wurde ein monoklonaler p38-MAPK-Antikörper verwendet.

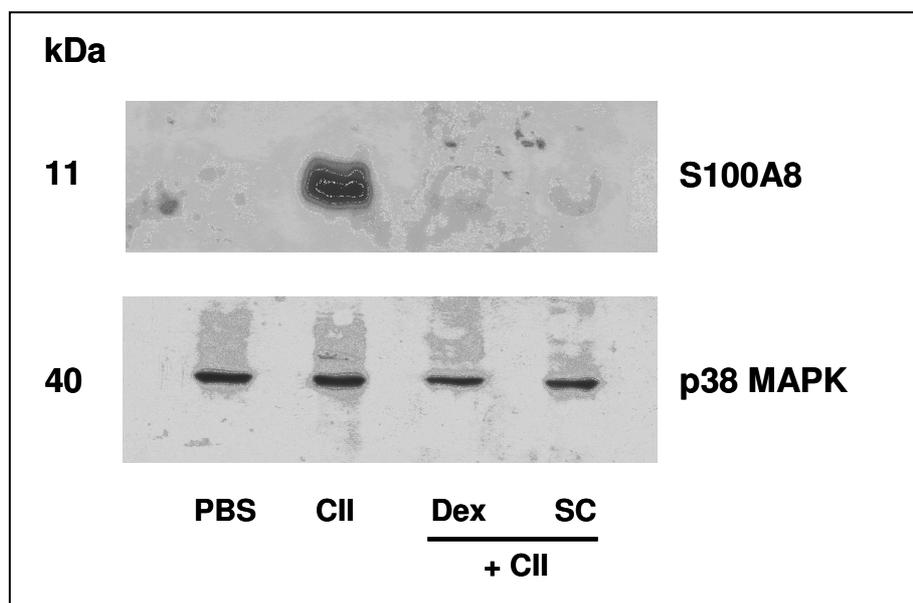


Abb. 40: Analyse der S100A8-Proteinexpression in den Pfoten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis

TCR- β tg-Mäuse wurden mit 200 μ g Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 11 und 21 Tagen erhielten alle Mäuse eine weitere Injektion von jeweils 100 μ g CII in CFA. Ab Tag 21 wurde jeweils acht Mäusen im Abstand von zwei Tagen 5 mg/kg Dexamethason (CII+Dex) oder 10 mg/kg S-Curvularin (CII+SC) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit PBS behandelt. Die Tiere wurden an Tag 33 nach der Immunisierung zur Organentnahme getötet. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot für zwei weitere Western-Blot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen S100A8 und p38-MAPK. Analysiert wurden 60 μ g Gesamtproteinextrakt.

Wie in Abb. 40 zu sehen führte eine Behandlung der CIA mit SC in den Pfoten zu einer deutlichen Reduktion der S100A8-Proteinexpression im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die S100A8-Menge konnte ebenfalls durch die Gabe von Dex vermindert werden.

VII.3 Wirkung von S-Curvularin im akuten LPS-induzierten Entzündungsmodell

Im Gegensatz zu dem Modell der Kollagen-induzierten Arthritis, bei dem es sich um ein chronisches Inflammationsmodell handelt, sollte die Wirkung von S-Curvularin ebenfalls in einem akuten Inflammationsmodell analysiert werden. Dazu wurde das Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Entzündungsmodell verwendet, um Veränderungen der Genexpression in der akuten Phase einer Entzündung untersuchen zu können. Die Injektion von LPS führt in den Mäusen zu einer systemischen Entzündung, die durch eine erhöhte Expression einer Vielzahl von Zytokinen gekennzeichnet ist.

Zur Untersuchung der Wirkung von S-Curvularin im akuten Entzündungsmodell wurden C57BL/6-Mäuse zunächst mit S-Curvularin (10 mg/kg), Dexamethason (5 mg/kg) oder PBS zur Kontrolle durch intraperitoneale Injektion für zwei Stunden vorbehandelt. Anschließend wurde eine akute Inflammation durch die Injektion von LPS (5 mg/kg; i.p.) induziert. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge 0,9%-iger Kochsalzlösung. Nach sechs Stunden wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet. Es wurde die RNA aus peripheren Blutmonozyten, Leber und Milz isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR mit einer Sonde gegen die iNOS-, S100A8- und als Referenz die Pol2a-mRNA analysiert. Zur Auswertung wurden die mRNA-Mengen von LPS-induzierten Mäusen als 100% gesetzt.

Wie in Abb. 41 zu sehen, führte die LPS-Injektion in den untersuchten Zellen und Geweben nur zu einer 4-5fachen Erhöhung der iNOS-mRNA-Expression. In PBMCs als auch in der Milz führte eine Behandlung der Mäuse mit S-Curvularin zu einer signifikanten Reduktion der iNOS-mRNA-Menge (Abb. 41A und C) im Vergleich zu LPS-behandelten Tieren. In der Leber konnte durch die Injektion von S-Curvularin nur tendenziell eine Abnahme der iNOS-mRNA-Expression erzielt werden, wobei der Effekt jedoch nicht signifikant ist (Abb. 41B). Durch die Behandlung der Mäuse mit Dexamethason konnte in PBMCs als auch in der Leber die iNOS-mRNA-Expression signifikant reduziert werden (Abb. 41A und B). Im Gegensatz dazu führte die Gabe von Dexamethason in der Milz zu einer signifikanten Steigerung der iNOS-mRNA-Menge im Vergleich zu LPS-induzierten Tieren (Abb. 41C).

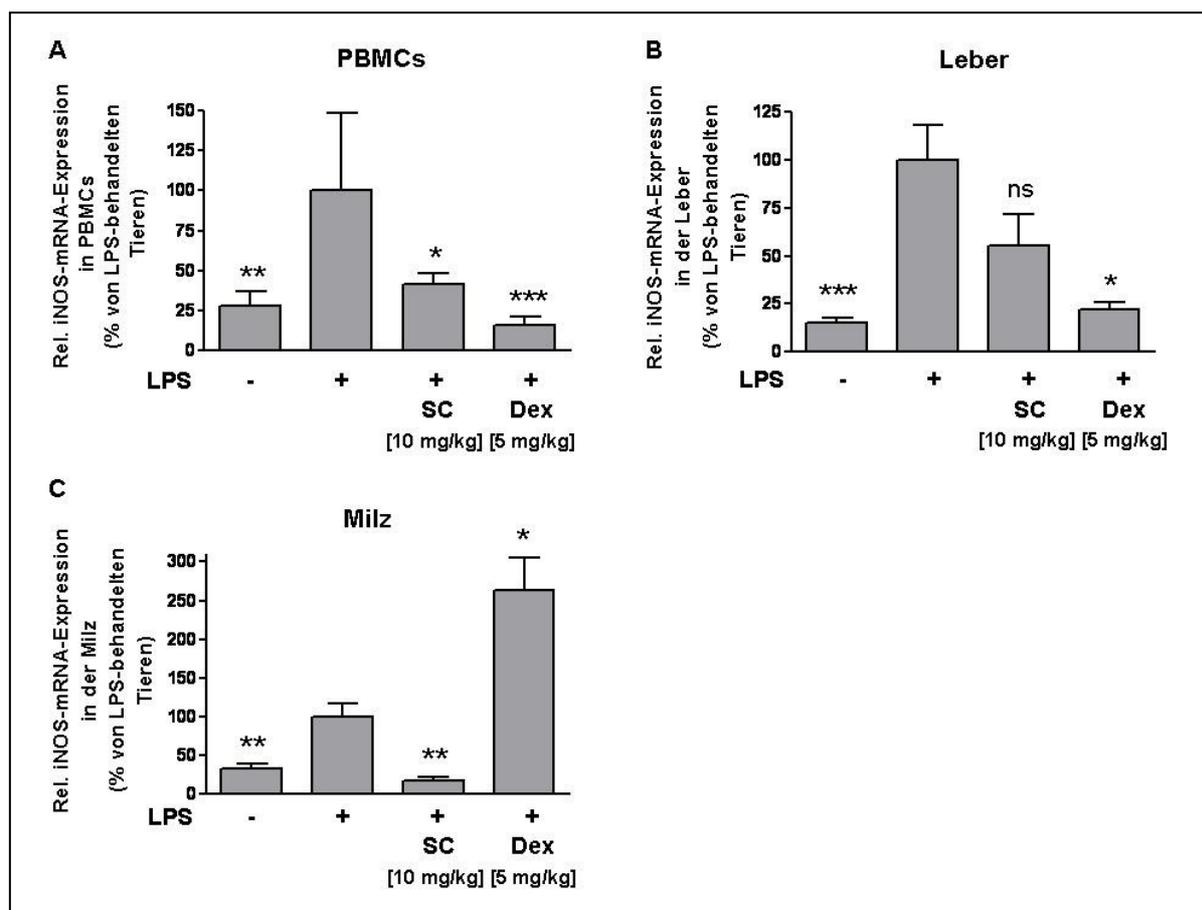


Abb. 41: Analyse der iNOS-mRNA-Expression in PBMCs, Leber und Milz von C57BL/6-Mäusen nach LPS-Injektion

Mäuse wurden mit PBS, S-Curvularin (10 mg/kg; SC) oder Dexamethason (5 mg/kg; Dex) durch i.p. Injektion für vorbehandelt. Zwei Stunden später wurde die Inflammation durch LPS-Injektion (5 mg/kg; i.p.) ausgelöst. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge an 0,9%-iger NaCl. Nach sechs Stunden wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet. Gezeigt ist die Auswertung aus drei unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus PBMCs (A), Leber (B) und Milz (C). Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative iNOS-mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge der LPS-behandelten Tiere (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von LPS-behandelten Tieren).

Als weiterer pro-inflammatorischer Marker sollte die Expression von S100A8 im Modell der akuten Inflammation untersucht werden. Die Injektion von LPS führte in PBMCs als auch in der Leber und der Milz von C57BL/6-Mäusen zu einer signifikanten Induktion der S100A8-mRNA-Expression (Abb. 42). Allerdings hatte eine Behandlung der Mäuse mit S-Curvularin als auch mit Dexamethason keinen signifikanten Effekt auf die S100A8-mRNA-Menge im Vergleich zu LPS-behandelten Tieren (Abb. 42A und B), wobei eine tendenzielle Abnahme in der Leber beobachtet werden konnte. In der Milz konnte die erhöhte S100A8-mRNA-Expression nach LPS-Induktion nach der Behandlung mit S-Curvularin wieder auf

Ausgangsniveau gesenkt werden. Dexamethason hatte in der Milz keine Wirkung auf die Expression der S100A8-mRNA (Abb. 42C).

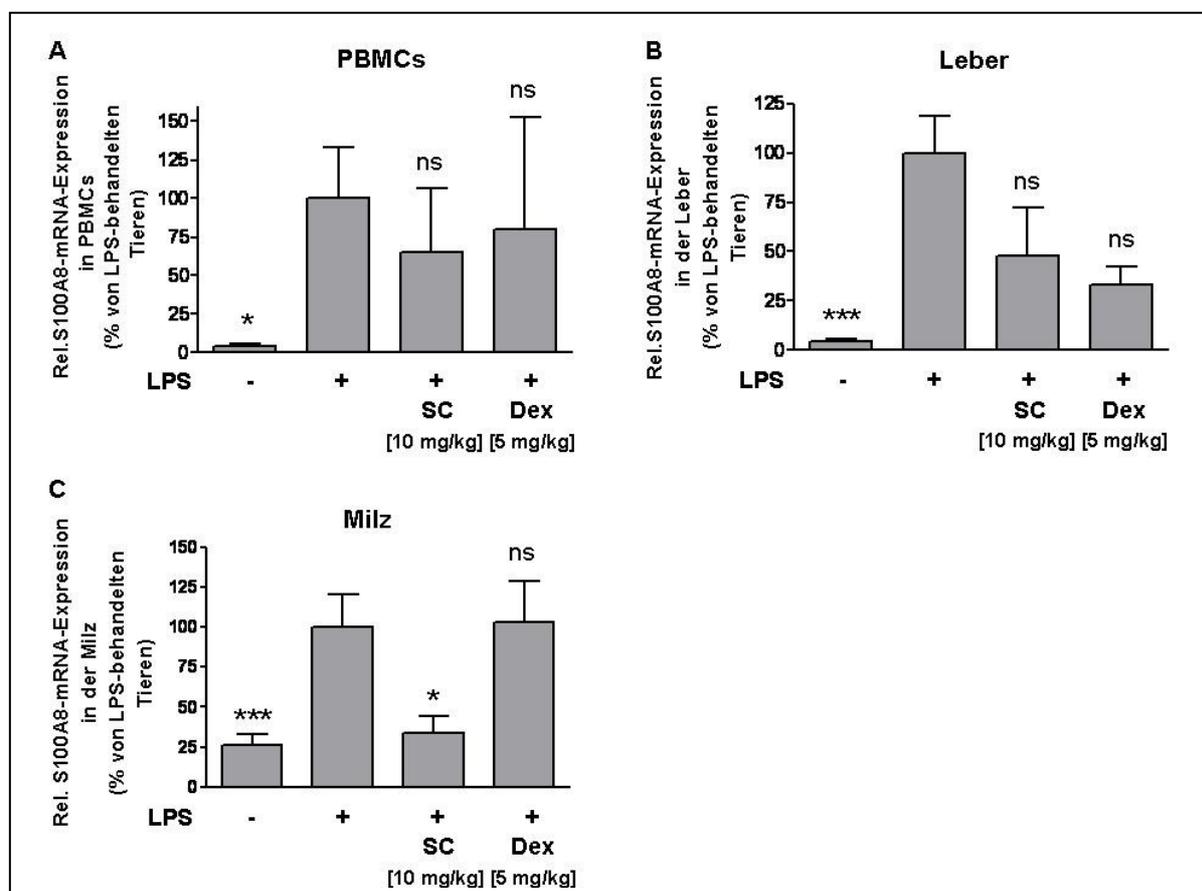


Abb. 42: Analyse der S100A8-mRNA-Expression in PBMCs, Leber und Milz von C57BL/6-Mäusen nach LPS-Injektion

Mäuse wurden mit PBS, S-Curvularin (10 mg/kg; SC) oder Dexamethason (5 mg/kg; Dex) durch i.p. Injektion für vorbehandelt. Zwei Stunden später wurde die Inflammation durch LPS-Injektion (5 mg/kg; i.p.) ausgelöst. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge an 0,9%iger NaCl. Nach sechs Stunden wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet. Gezeigt ist die Auswertung aus drei unabhängigen qRT-PCR-Analysen mit RNA aus PBMCs (A), Leber (B) und Milz (C). Die Säulen (Mittelwert + SEM) repräsentieren relative S100A8-mRNA-Mengen in Bezug auf die mRNA-Menge der mit LPS-behandelten Tiere (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant verschieden von LPS-behandelten Tieren).

VIII. Diskussion

VIII.1 Analyse der iNOS-Expression in humanen C-28/I2-Chondrozyten

VIII.1.1 Die Induktion der iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig

Chondrozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung, dem Wachstum und der Aufrechterhaltung von artikulärem Knorpel (Goldring *et al.*, 2006), indem sie die Synthese und den Abbau von Matrixkomponenten regulieren. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Knorpelzellen unter pathophysiologischen Bedingungen in der Lage sind, eine Vielzahl von Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β zu produzieren und zu sekretieren. Des Weiteren synthetisieren sie Metalloproteinasen (MMPs), Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine und andere pro-inflammatorische Mediatoren, die in hohen Konzentrationen im Gelenk akkumulieren (Goldring *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2007) und die Entzündung aufrechterhalten.

Im Krankheitsbild der RA scheint eine erhöhte iNOS-Expression und die daraus resultierende gesteigerte NO-Bildung in die Pathomechanismen der Krankheit involviert zu sein (Cuzzocrea, 2006; Goldring *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2007; Vuolteenaho *et al.*, 2007), indem es die Regulation der Chondrozytenfunktion (Goldring *et al.*, 2004) und deren Genexpression (Sasaki *et al.*, 1998) beeinflusst. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Regulation der iNOS-Expression in immortalisierten C-28/I2-Chondrozyten als zelluläres Modell der RA untersucht werden.

Um Bedingungen zu imitieren, wie sie im Knorpel zu finden sind, wurden die Zellen neben der Monolayerkultur auch in Alginateperlen (Hauselmann *et al.*, 1992) kultiviert, um ihnen ein drei-dimensionales Wachstum zu ermöglichen. Da Chondrozyten nach ihrer Isolation ihren chondrogenen Charakter verlieren, kann die Alginatekultur zur Redifferenzierung der Knorpelzellen verwendet werden (Chubinskaya *et al.*, 2001; Heyland *et al.*, 2006; Mok *et al.*, 1994). Als Marker der chondrogenen Differenzierung konnten Kollagen II, IX und X nachgewiesen werden (Bonaventure *et al.*, 1994; Petit *et al.*, 1996). Da die iNOS unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur sehr gering exprimiert wird, wurde ihre Expression durch die Zugabe eines Zytokingemischs aus TNF- α , IL-1 β und IFN- γ (Kleinert *et al.*, 2003) induziert. Die Ergebnisse zeigten (Abb. 7A+B), dass in einer subkonfluenten Chondrozytenkultur die iNOS-mRNA-Expression durch eine Behandlung der Zellen mit einem Zytokingemisch nicht oder nur sehr gering induziert werden konnte. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen in Alginateperlen oder als Monolayer kultiviert wurden. Erst unter

superkonfluenten Bedingungen nach sechs Tagen Wachstum konnte unter beiden Kulturbedingungen die iNOS-mRNA- (Abb. 7A+B) und Proteinexpression (Abb. 7C) durch eine Zytokinstimulation um einen ähnlichen Faktor signifikant erhöht werden. Dies bestätigt Beobachtungen von Mais *et al.* (2006), die eine Induzierbarkeit der iNOS-Expression in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) erst nach einer Differenzierungszeit von sieben Tagen nachweisen konnten. Die C-28/I2-Zellen scheinen für die Induktion der iNOS-Expression Signale zu benötigen, die erst während einer längeren Wachstumsdauer entstehen. Da die Zellen nach einer Kultivierungszeit von sechs Tagen in Monolayerkultur („superkonfluent“) ebenfalls ein Netzwerk bilden, sind keine großen Unterschiede in der Induzierbarkeit im Vergleich zur Alginatkultur zu finden. Da die Expression der iNOS auch in Monolayerkultur induziert werden konnte, wurden die Zellen in allen nachfolgenden Experimenten unter diesen Kulturbedingungen inkubiert.

Die verschiedenen Stadien der Knorpelzelldifferenzierung sind durch die Expression unterschiedlicher Gene gekennzeichnet. Eine Erhöhung der Kollagen 2A1 (COL2A1)- und der „sex determining region Y-box 9“ (SOX-9)-Expression stellt dabei einen guten Marker für ausdifferenzierte Zellen dar (Goldring *et al.*, 2006). In den C-28/I2-Zellen konnte ebenfalls eine von der Wachstumszeit abhängige Erhöhung der COL2A1- und SOX9-mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 8). Da diese beiden Gene während der chondrogenen Differenzierung exprimiert werden kann man darauf schließen, dass die Induktion der iNOS-Expression in den verwendeten Knorpelzellen von ihrem Differenzierungsgrad abhängig ist und nur in vollständig ausdifferenzierten Chondrozyten exprimiert wird. Diese Abhängigkeit konnte bereits auch für primäre (Blanco *et al.*, 1995a) und aus hMSC-stammende Chondrozyten (Mais *et al.*, 2006) gezeigt werden.

Es ist bekannt, dass in humanen Zellen für die Induktion der iNOS-Expression ein Zytokingemisch aus TNF- α , IL-1 β und IFN- γ (CM) nötig ist (Kleinert *et al.*, 2003). In den immortalisierten Chondrozyten war dieses komplexe Gemisch ebenfalls für die Induktion der iNOS-Expression notwendig (Abb. 9). Eine Inkubation mit einzelnen Zytokinen oder die Kombination von TNF- α /IL1 β hatte keinen, die Kombination von IFN- γ /IL-1 β und IFN- γ /TNF- α nur einen marginalen Effekt auf die iNOS-mRNA-Expression. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Daten aus primären Chondrozyten (Palmer *et al.*, 1993), in denen eine Inkubation der Zellen mit TNF- α oder IL-1 β alleine zu einer Akkumulation von NO im Kulturmedium führte. Die erhöhten NO-Mengen konnten dabei auf eine verstärkte Expression der iNOS zurückgeführt werden. In aus hMSCs stammenden Chondrozyten führte eine Inkubation mit IL-1 β alleine ebenfalls zu einer Induktion der iNOS-Expression (Mais *et al.*, 2006).

In C-28/I2-Zellen erreichte die iNOS-mRNA-Expression ihr Maximum nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Stunden mit CM, die Proteinexpression ist bei einer sechs-

bis acht-stündigen CM-Behandlung am höchsten (Abb. 10). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die C-28/I2-Zellen nach einer Wachstumszeit von sechs Tagen zur Induktion der iNOS-Expression für sechs Stunden mit CM stimuliert.

VIII.1.2 Regulation der iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten durch NO

Die iNOS-Expression kann in verschiedenen Zellen durch NO selbst reguliert werden. So führte eine Hemmung der iNOS-Enzymaktivität in murinen RAW 264.7-Makrophagen zu einer Erhöhung der LPS/IFN- γ -vermittelten iNOS-Induktion und Promotoraktivität, während NO-Donoren zu einer Reduktion der iNOS-Expression führte (Hinz *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1998; Weisz *et al.*, 1996). In Mesangialzellen der Ratte konnte dagegen durch extern zugeführtes NO die IL-1 β -induzierte iNOS-Expression gesteigert werden (Muhl *et al.*, 1995). Es scheint, dass in diesen Zellen NO seine eigene Biosynthese über einen positiven Rückkopplungsmechanismus erhöht. Für Chondrozyten wurde ebenfalls beschrieben, dass NO die Genexpression beeinflussen kann (Goldring *et al.*, 2004).

In C-28/I2-Chondrozyten hatte eine Hemmung der iNOS durch den Inhibitor Aminoguanidin keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expression, wohingegen die NO-Produktion, die als kumulatives Nitrit in den Kulturüberständen gemessen wurde, signifikant durch Aminoguanidin inhibiert werden konnte (Abb. 11). In den verwendeten Knorpelzellen findet also keine Autoregulation der iNOS-Expression durch NO statt.

VIII.1.3 An der Induktion der iNOS-Expression sind verschiedene Signaltransduktionswege beteiligt

Die Induktion der iNOS-Expression zeigt eine Spezies- und Zelltyp-spezifische Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003). Somit sind unterschiedliche Effekte von spezifischen pharmakologischen oder molekularen Inhibitoren dieser Wege in unterschiedlichen Zellsystemen beschrieben worden (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003).

Für die Zelltyp- und Spezies-spezifische Induktion der iNOS wurde beschrieben, dass die zu den MAP-Kinasen gehörenden extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK) und die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPKs; auch als die auch als c-jun amino-terminale Kinasen - JNK bezeichnet) beteiligt sind (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003). Eine Inhibierung der JNK mit dem direkten JNK-Inhibitor SP600125 hatte keinen Einfluss auf die Zytokin-induzierte iNOS-Expression in den C-28/I2-Zellen (Abb. 12A). Auch eine Hemmung der ERK-Aktivität durch den Inhibitor PD98059, der die Aktivierung der ERK-Kinase und somit die MAPK-Signalkaskade hemmt, zeigte keinen Effekt auf die iNOS-Induktion (Abb. 12A).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Beobachtungen in primären Chondrozyten, in denen eine Hemmung des JNK- oder ERK-Signaltransduktionswegs ebenfalls keinen Einfluss auf die AGE („advanced glycation end products“)-induzierte iNOS-Expression ausübte (Nah *et al.*, 2008).

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, der in den meisten Säugetierzellen an der Regulation der iNOS beteiligt ist, ist der p38-MAPK-Signaltransduktionsweg (Kleinert *et al.*, 2003). Eine pharmakologische Blockierung der p38-MAPK mit SB203580 führte in C-28/I2-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zytokin-induzierten iNOS-mRNA- und Proteinexpression als auch der iNOS-vermittelten NO-Produktion (Abb. 12). Die p38-MAPK scheint also ebenfalls essentiell an der Induktion der iNOS-Expression in den verwendeten immortalisierten Knorpelzellen beteiligt zu sein, was auch schon für primäre humane Chondrozyten beschrieben wurde (Nah *et al.*, 2008). Generell wird angenommen, dass die p38-MAPK-vermittelten Effekte auf die pro-inflammatorische Genexpression hauptsächlich über post-transkriptionelle Mechanismen erfolgt (Clark *et al.*, 2003). Fechir *et al.* (2005) konnten zeigen, dass eine Hemmung der p38-MAPK durch SB203580 oder die Überexpression einer dominant-negativen Mutante der p38-MAPK in humanen DLD1-Zellen die Zytokin-induzierte iNOS-Expression deutlich reduzierte. Da die iNOS-Promotoraktivität in diesen Zellen nicht gehemmt wurde, lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die Regulation der iNOS-Expression durch den p38-MAPK-Signaltransduktionsweg über post-transkriptionelle Mechanismen erfolgt (Fechir *et al.*, 2005). In DLD1-Zellen kann der stabilisierende Effekt der p38-MAPK auf die iNOS-mRNA unter anderem durch die Erhöhung der Expression des RNA-bindenden Proteins Tristetraprolin (TTP) erklärt werden (Fechir *et al.*, 2005; Linker *et al.*, 2005). Es ist möglich, dass ähnliche p38-MAPK-abhängige Regulationsmechanismen an der iNOS-Expression in C-28/I2-Zellen beteiligt sind.

Des Weiteren scheint die Zytokin-vermittelte Induktion der NF- κ B-Aktivität und des JAK2-STAT1 α -Signaltransduktionswegs an der iNOS-Induktion eine Rolle zu spielen (Kleinert *et al.*, 2004; Kleinert *et al.*, 2003). In C-28/I2-Zellen führte eine Inhibierung der JAK2-Aktivierung durch AG490 oder eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Bay11-7082, was die Zytokin-induzierte I- κ B α -Phosphorylierung inhibiert, zu einer deutlichen Abnahme der Zytokin-induzierten iNOS-mRNA- und Proteinexpression sowie der iNOS-vermittelten NO-Produktion (Abb. 12). Gleiche Ergebnisse wurden für die NF- κ B-abhängige iNOS-Expression in humanen primären Chondrozyten beschrieben (Shalom-Barak *et al.*, 1998). In der murinen Chondrozytenzelllinie ADTC5 konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der iNOS-Expression von der JAK2-Aktivität gezeigt werden (Otero *et al.*, 2005). Die Zytokin-induzierte iNOS-Expression in Chondrozyten ist also auch von der Aktivierung des JAK2-STAT1 α - und des NF- κ B-Signaltransduktionswegs abhängig.

VIII.1.4 Analyse der iNOS-Promotoraktivität in C-28/I2-Chondrozyten

Die Expression der iNOS wird sowohl auf transkriptioneller Ebene durch die Modulation der Promotor-Aktivität als auch durch post-transkriptionelle Mechanismen reguliert. Zunächst wurde daher die Aktivierung des iNOS-Promotors in C-28/I2-Zellen analysiert. Dazu wurden C-28/I2-Chondrozyten stabil mit einem Plasmid transfiziert, das ein Konstrukt aus einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen enthielt. In anschließenden qRT-PCR-Analysen war es mit diesem System möglich, die endogene iNOS- getrennt von der Luziferase-mRNA-Expression zu analysieren. Die Stärke der Expression der Luziferase-mRNA stellt dabei ein Maß für die Promotoraktivität dar.

In C-28/I2-Zellen war sowohl eine basale iNOS- als auch Luziferase-mRNA-Expression nach einer Wachstumsdauer von einem Tag nachweisbar, die nach Zytokin-Stimulation jedoch nicht signifikant induziert werden konnte. Nach sechs Tagen in Kultur führte eine Behandlung der C-28/I2-16kb-Zellen mit Zytokinen zu einem signifikanten Anstieg der iNOS- und Luziferase-mRNA-Expression, wobei die Induktionsraten beider mRNAs fast identisch waren (Abb. 13). Da die Expression des Luziferase-Reportergens unter der Kontrolle des iNOS-Promotors steht, kann die Luziferase-mRNA-Expression als indirektes Maß für die Promotoraktivität verwendet werden.

Im Gegensatz zu AKN-1- oder DLD1-Zellen, in denen keine direkte Korrelation der iNOS-Promotoraktivität und der iNOS-mRNA-Expression gefunden werden konnte (de Vera *et al.*, 1996; Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000), scheint in C-28/I2-Zellen die Aktivierung des iNOS-Promotors direkt mit der Induktion der iNOS-mRNA-Expression in C-28/I2-Zellen korreliert zu sein. Somit scheint in C-28/I2-Zellen die transkriptionelle Regulation von größerer Bedeutung zu sein als in allen anderen bisher untersuchten humanen Zellen.

VIII.1.5 Analyse der mRNA-Expression RNA-bindender Proteine

Die Induktion der iNOS-Expression in humanen Zellen nach der Stimulation mit LPS oder Zytokinen ist nicht alleine durch eine Steigerung der Promotoraktivität erklärbar. Die Modulation der mRNA-Stabilität stellt auch bei der Regulation der iNOS einen wichtigen post-transkriptionellen Mechanismus dar. Eine Stabilisierung oder Destabilisierung der mRNA wird dabei durch die Bindung RNA-bindender Proteine an regulatorische Sequenzen, sogenannte AU-reiche Elemente (ARE) in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA, erreicht. Deshalb wurde die Expression der mRNA-bindenden Proteine AUF-1, KSRP, TTP, HuR und PTB in den C-28/I2-Chondrozyten untersucht.

Der „ARE/poly-(U) binding factor 1“ (AUF-1) wurde als ein iNOS-mRNA-destabilisierendes Protein beschrieben (Pautz *et al.*, 2009). In DLD-1-Zellen führte die Überexpression von AUF-1 zu einer Reduktion der iNOS-mRNA- und Proteinexpression, indem es die mRNA-

Stabilität verringerte. Dabei ist die Bindung von AUF-1 an die 3'-UTR der iNOS-mRNA von entscheidender Bedeutung. In C-28/I2-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede in der AUF-1-mRNA-Expression nach unterschiedlichen Wachstumszeiten detektiert werden (Abb. 14E). Eine Zytokinbehandlung der Zellen hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von AUF-1. Durch die Bindung an AREs in der 3'-UTR der iNOS-mRNA könnte AUF-1 in C-28/I2-Chondrozyten unter subkonfluenten Bedingungen zur Destabilisierung der mRNA beitragen. Da nach sechs Tagen Wachstum eine signifikante iNOS-mRNA-Expression nachweisbar ist, ist es möglich, dass stabilisierende RNA-bindende Proteine um die gleiche Bindungsstelle mit AUF-1 konkurrieren und so eine Bindung und die daraus resultierende Destabilisierung der iNOS-mRNA verhindern.

Das „KH-type splicing regulatory protein“ KSRP wurde als ein am Exosom-vermittelten Abbau von ARE-haltigen mRNAs beteiligtes Protein beschrieben (Chen *et al.*, 2001; Gherzi *et al.*, 2004). Eine Destabilisierung der iNOS-mRNA durch KSRP konnte bereits in DLD1-Zellen gezeigt werden. Dabei erfolgt der Abbau der mRNA vermutlich durch eine Zytokin-unabhängige Interaktion von KSRP mit dem Exosom (Linker *et al.*, 2005). Dabei ist eine Bindung von KSRP an die 3'-UTR der iNOS-mRNA essentiell. In den C-28/I2-Zellen zeigten sich nach unterschiedlichen Wachstumszeiten keine Unterschiede in der mRNA-Expression von KSRP. Eine Zytokinbehandlung der Zellen hatte ebenfalls keine Veränderung der KSRP-mRNA-Menge zur Folge (Abb. 14D).

Am exosomalen Abbau der mRNA sind jedoch noch weitere Faktoren wie das mRNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP) beteiligt. Für TTP wurde bisher ein destabilisierender Einfluss auf AU-reiche mRNAs, wie die TNF- α - (Carballo *et al.*, 1998) oder die GM-CSF-mRNA (Carballo *et al.*, 2000), beschrieben. In DLD1-Zellen übt TTP jedoch eine stabilisierende Funktion auf die iNOS-mRNA aus (Fechir *et al.*, 2005). Linker *et al.* (2005) konnten zeigen, dass nach einer Zytokinstimulation der DLD1-Zellen sowohl die TTP-Expression als auch die TTP-KSRP-Interaktion erhöht war. Der stabilisierende Effekt der iNOS-mRNA durch TTP konnte dabei auf eine verminderte Bindung des KSRP-Exosom-Komplexes und eine verstärkte Interaktion von TTP und KSRP zurückgeführt werden. In C-28/I2-Zellen konnte nach einem Tag in qRT-PCR-Analysen keine TTP-mRNA detektiert werden. Erst nach einem sechs-tägigen Wachstum war eine TTP-Expression nachweisbar, die durch eine Stimulation mit Zytokinen um das sechs-fache erhöht werden konnte (Abb. 14A). Das Expressionsmuster der TTP-mRNA korreliert somit also mit der iNOS-Expression. An Tag 1 könnte die Bindung von KSRP durch eine Interaktion mit dem Exosom in C-28/I2-Zellen ebenfalls zu einer Destabilisierung der iNOS-mRNA führen. Die Zytokin-induzierte TTP-Expression in superkonfluenten Zellen könnte also durch die Interaktion mit KSRP zur Stabilität der iNOS-mRNA in den Knorpelzellen beitragen, in dem es den mRNA-Abbau durch das Exosom verringert.

Als weiteres in die Regulation der iNOS-mRNA-Stabilität involviertes Protein wurde das Polypyrimidin-Trakt bindende Protein (PTB) beschrieben. In DLD1-Zellen konnte nach einer Zytokinstimulation eine erhöhte Bindung von PTB an die iNOS-mRNA detektiert werden. Die Überexpression oder die siRNA-vermittelte Hemmung von PTB zeigten, dass PTB die Zytokin-abhängige iNOS-Expression durch seine Bindung an die iNOS-mRNA erhöht (Pautz *et al.*, 2006). Wie schon für TTP beschrieben, konnte eine PTB-mRNA-Expression in C-28/I2-Zellen erst nach einer Kulturzeit von sechs Tagen detektiert werden. In DLD1-Zellen wird PTB Zytokin-unabhängig exprimiert. Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation der Knorpelzellen mit Zytokinen zu einer signifikanten Induktion der PTB-mRNA-Expression (Abb. 14B). Die erhöhte PTB-Expression an Tag 6 könnte also in den C-28/I2-Zellen ebenfalls zu einer Stabilisierung der iNOS-mRNA beitragen.

Das zur „embryonic lethal abnormal vision“(ELAV)-Proteinfamilie zugehörige Protein HuR wurde ebenfalls als stabilisierender Faktor von ARE-haltigen mRNAs beschrieben (Brennan *et al.*, 2001). Eine Interaktion von HuR mit der 3'-UTR der humanen iNOS konnte bereits in DLD-1-Zellen gezeigt werden, in denen die Überexpression des Proteins zu einer Erhöhung der iNOS-Expression führte (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). In späteren Arbeiten konnte schließlich demonstriert werden, dass HuR und KSRP um die gleiche Bindungsstelle in der iNOS-3'-UTR konkurrieren und die Bindung von HuR an die iNOS-mRNA durch Zytokine erhöht wurde (Linker *et al.*, 2005). Es wurde postuliert, dass in unbehandelten DLD-1-Zellen KSRP an die 3'-UTR der iNOS bindet, was zur Rekrutierung des Exosoms und schließlich zum Abbau der mRNA führt. Nach einer Zytokinbehandlung werden die TTP-mRNA-Expression sowie die TTP-KSRP-Interaktion erhöht, was zur Dislokation des Exosoms führt. Dies ermöglicht HuR, an die mRNA zu binden und diese zu stabilisieren. In C-28/I2-Zellen konnte unter subkonfluenten Bedingungen eine um das fünf-fach höhere HuR-mRNA-Expression als in superkonfluenten Zellen nach sechs Tagen Wachstum detektiert werden (Abb. 14C). In superkonfluenten C-28/I2-Chondrozyten hätte man aufgrund der hohen iNOS-Expression eine gesteigerte Expression von HuR im Vergleich zu subkonfluenten Zellen erwartet. Ein stabilisierender Einfluss von HuR scheint in C-28/I2-Zellen nach sechs Tagen Wachstum also eher einer untergeordnete Rolle zu spielen. Stabilisierende Effekte scheinen dabei hauptsächlich von TTP und PTB auszugehen.

VIII.1.6 Einfluss von Glukokortikoiden auf die iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten

Glukokortikoide (GK), die häufig für die Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen wie der RA eingesetzt werden (Morand, 2007), können ebenfalls die iNOS-Expression hemmen. So wird der GK-vermittelte anti-inflammatorische Effekt in der Behandlung von Asthma auf die Hemmung der iNOS-Expression zurückgeführt (Barnes, 1995). Deshalb

wurde die Wirkung von Dexamethason auf die iNOS-Expression ebenfalls in C-28/I2-Chondrozyten untersucht. qRT-PCR-Analysen, Western Blot-Experimente und die Nitritbestimmung zeigten, dass eine Behandlung der Knorpelzellen mit dem potenten GK Dexamethason (Dex) die Zytokin-induzierte iNOS-mRNA- und Proteinexpression als auch die iNOS-vermittelte NO-Produktion nicht verminderte (Abb. 15). Auch eine Inkubation der Zellen mit Prednisolon, einem weiteren GK, hatte in diesen Zellen keinen Effekt auf die iNOS-Expression. Dieses Ergebnis unterstützt Daten von Mais *et al.* (2006). In Studien dieser Arbeitsgruppe hatte Dexamethason ebenfalls keinen Effekt auf die Zytokin-induzierte und von der Differenzierung abhängige NO-Produktion in humanen primären und von hMSC-stammenden Chondrozyten. Die Autoren postulieren eine GK-insensitive iNOS-Expression als chondrogenen Differenzierungsmarker. Im Gegensatz dazu konnte die IL-17-induzierte iNOS-Expression und die iNOS-vermittelte NO-Produktion in primären humanen Chondrozyten durch Dexamethason gehemmt werden (Shalom-Barak *et al.*, 1998).

Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von GKs werden unter anderem durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt. qRT-PCR-Analysen zeigten, dass die Zytokin-induzierte mRNA-Expression von IL-8 und RANTES ebenfalls nicht durch eine Behandlung mit Dexamethason verändert wurde (Abb. 16). IL-8 und RANTES stellen ebenfalls NF- κ B-regulierte Gene dar. Somit kann ein spezifischer Effekt der GKs auf die iNOS-Expression ausgeschlossen werden. Da die untersuchten Gene ebenfalls nicht auf eine Behandlung mit Dexamethason reagieren, scheint es sich dabei also um einen generellen Effekt der Glukokortikoide auf NF- κ B-regulierte Gene zu handeln.

A549/8 oder Ea.hy926-Zellen zeigen GK-abhängige Veränderungen der Genexpression (Kleinert *et al.*, 1996a; Wallerath *et al.*, 1999). Durch RT-PCR-Analysen wurde gezeigt, dass diese Zellen sowohl die Glukokortikoid-Rezeptor (GR)- α - als auch die GR- β -mRNA exprimieren (Abb. 17). In C-28/I2-Zellen konnte jedoch weder die mRNA der α -Isoform des GR, noch die β -Isoform nachgewiesen werden. In C-28/I2-Zellen kann die GK-Resistenz also wahrscheinlich auf das Fehlen der Glukokortikoid-Rezeptor (GR)-mRNA zurückgeführt werden.

VIII.1.7 Die iNOS-Expression in C-28/I2-Chondrozyten wird von S-Curvularin gehemmt

Da die gegenwärtig verfügbaren Therapeutika keine langfristige, nebenwirkungsfreie Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der RA ermöglichen, ist es von Bedeutung, neue Substanzen zu finden, die als potentielle Therapeutika verwendet werden können. Da die lokale, exzessive Bildung von NO eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA einzunehmen scheint, ist es sinnvoll, im Rahmen der Therapie dieser Erkrankung

spezifisch die NO-Synthese durch die iNOS zu hemmen. Mit Hilfe eines molekularen Screeningsystems in einem humanen Zellkulturmodell konnte in früheren Arbeiten die Verbindung S-Curvularin aus einem Pilzextrakt isoliert werden, die die JAK2-STAT1 α -abhängige Genexpression inhibierte. In A549/8-Zellen reduzierte S-Curvularin die Induktion des iNOS-Promotors, der iNOS-mRNA- und Proteinexpression und die Nitritproduktion (Yao *et al.*, 2003).

Auch in C-28/I2-Zellen war es möglich, durch die Behandlung mit S-Curvularin die Zytokin-induzierte iNOS-Expression signifikant zu hemmen (Abb. 18). Es ist anzunehmen, dass die Inhibierung der iNOS-Expression in den Knorpelzellen, wie für A549/8-Zellen beschrieben, durch die Hemmung der Phosphorylierung und somit der Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2 und des Transkriptionsfaktors STAT1 α erzielt wird (Yao *et al.*, 2003).

Weitere Ergebnisse zeigten, dass die Inkubation der Chondrozyten mit Zytokinen ebenfalls zu einer deutlichen Induktion der Expression anderer pro-inflammatorischer Gene, wie TNF- α , COX-2 und CXCL10 führte, die durch eine Behandlung mit S-Curvularin auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich gehemmt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da C-28/I2-Zellen keinen GR exprimieren, können die anti-inflammatorischen Effekte von S-Curvularin nicht durch die Transrepression des aktivierten GR vermittelt werden. Mit S-Curvularin könnte also eine Möglichkeit bestehen, GK-resistente Krankheitsverläufe der RA zu therapieren.

VIII.2 Die Wirkung von S-Curvularin auf die pro-inflammatorische Genexpression im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

VIII.2.1 Die Immunisierung mit Kollagen Typ II führt zur Entstehung einer CIA

Zur Untersuchung der pro-inflammatorischen Genexpression in einem *in vivo*-Modell wurde die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in Mäusen verwendet. Als Mausstamm dienten dabei sogenannte TCR- β tg-Mäuse. Diese Tiere exprimieren die β -Kette eines T-Zellrezeptors, die aus einem Kollagen-arthritogenen T-Zell-Klon isoliert wurde, und zeichnen sich dadurch durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber heterologem Kollagen Typ II (CII) aus (Mori *et al.*, 1992). Um dieses Genmerkmal stabil in einer Mäusepopulation zu erhalten, ist es nötig, die Zuchttiere vor dem Verpaaren auf die Expression des Transgens mittels FACS-Analysen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass mehr als 90% der CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut der Tiere die transgene TCR- β -Kette exprimieren (Abb. 19).

Zur Beurteilung der Schwere der Arthritis wurde der Arthritisindex verwendet. Wie von Mori *et al.* (1992) beschrieben, führte eine Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit heterologem

CII im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren zu einem kontinuierlichen Anstieg des Arthritisindex und bleibt nach etwa 29 Tagen bei einem mittleren Index von 8 annähernd stabil (Abb. 21). Alle Mäuse zeigten dabei eine deutliche klinische Symptomatik der CIA, die von einer Schwellung einzelner Gelenke bis zu einer ausgeprägten Schwellung der gesamten Pfote reichte (Abb. 22). Tiere, deren gesamte Pfote von der Schwellung betroffen war, waren zusätzlich in ihrer Bewegung stark eingeschränkt. Bei allen Tieren konnte zudem noch eine Rötung der Pfote festgestellt werden. Die Schwellung der Pfoten kann dabei auf das Einwandern von Immunzellen in die Gelenke zurückgeführt werden. Die Rötung ist dabei ein zusätzlicher Hinweis auf eine bestehende Entzündung. Da sich die chronische Gelenkentzündung, die durch eine Immunisierung von TCR- β tg-Mäusen mit heterologem CII induziert werden kann, in ihrem Verlauf der rheumatoiden Arthritis beim Menschen sehr ähnlich ist (Trentham, 1982; Wooley *et al.*, 1981), eignet sich die CIA zur Untersuchung der Pathogenese und der zugrunde liegenden Mechanismen der RA. Weiterhin bietet dieses Modell die Möglichkeit, neue anti-inflammatorisch wirkende Substanzen zu analysieren.

VIII.2.2 Therapeutische Ansätze zur Behandlung einer CIA

Bei einer CIA richtet sich die Immunantwort gegen körpereigene Antigene. Das Behandlungsziel ist es, diese Antwort zu vermindern, um Gewebsschäden und Funktionsstörungen zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit stand die Untersuchung einer entzündungshemmenden Therapie im Vordergrund. So sollte der Einfluss des Naturstoffs S-Curvularin auf eine etablierte Arthritis analysiert werden. Um die Effekte von S-Curvularin beurteilen zu können, wurde gleichzeitig das potente Glukokortikoid Dexamethason zur Behandlung der CIA eingesetzt. Die anti-inflammatorische Wirkung der GK kann hauptsächlich auf eine Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, Prostaglandine und NO zurückgeführt werden (Feldmann *et al.*, 1996; Laan *et al.*, 1999). Zusätzlich inhibieren sie das Einwandern von Leukozyten ins Gelenk. Die GKs können also auf vielfältige Weise in das Entzündungsgeschehen eingreifen.

Der Arthritisindex zeigte, dass eine Behandlung mit S-Curvularin zu einer deutlichen Verminderung der Krankheitssymptome führte. Allerdings zeigte Dexamethason eine stärkere Reduktion der Pfortenschwellung. Zusätzlich tritt der maximale Effekt direkt nach Verabreichung der ersten beiden Injektionen ein, wohingegen die Wirkung von S-Curvularin leichten Schwankungen unterliegt (Abb. 24). Die Effekte der Pilzsubstanz treten also im Vergleich zu Dexamethason etwas verzögert ein, sind aber dennoch deutlich vorhanden. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass höhere Dosen der Pilzsubstanz benötigt werden, um maximale Effekte zu erzielen. Die Wirkung von Dexamethason steht im Einklang mit Studien an RA-Patienten, die zeigen, dass die Behandlung mit Glukokortikoiden ebenfalls zur Verminderung der Autoimmunreaktion führt (Laan *et al.*, 1999). Jedoch wird

unter anderem das kardiovaskuläre Risiko durch den Einsatz von GKs erhöht. Deshalb eignen sich GKs nicht für eine langfristige Therapie der RA. S-Curvularin könnte also eine Alternative zur bisherigen RA-Behandlung darstellen. Allerdings muss noch geklärt werden, ob S-Curvularin nach langfristiger Anwendung weniger Nebenwirkungen zeigt als GKs.

VIII.2.3 Analyse der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren im Modell der CIA

Die RA stellt eine multifaktorielle Krankheit dar, die durch eine chronische Entzündung der Gelenke gekennzeichnet ist. Pro-inflammatorische Zytokine gelten deshalb als aussichtsreiche Zielstrukturen zur Entwicklung neuer selektiver entzündungshemmender Substanzen. Die Hemmung ihrer Aktivierung durch z.B. lösliche Rezeptoren oder Antikörper oder die Blockierung der Signaltransduktionswege, die durch die Zytokine aktiviert werden und als Folge die Synthese weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren induzieren, stehen dabei im Mittelpunkt neuerer Untersuchungen (Kavanaugh, 2002; Smolen *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2001). Durch die Beteiligung einer Vielzahl von Zelltypen, pro-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen wie die iNOS und COX-2 erscheint es sinnvoll Verbindungen zu entwickeln, die auf Ebene der Genexpression die Synthese dieser entzündungsrelevanter Mediatoren verringern.

Zur initialen Untersuchung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von S-Curvularin im Vergleich zu Dexamethason wurde zunächst die mRNA-Expression bekannter pro-inflammatorischer Mediatoren in peripheren Blutmonozyten und den Pfoten CII-behandelter Tiere untersucht. qRT-PCR-Analysen ergaben, dass die TNF- α - und iNOS-mRNA-Expression in PBMCs CII-immunisierter Mäuse erhöht ist. Die mRNA-Expression von IL-6, IL-1 β und MIP-1 α war im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren nicht verändert. In den Pfoten, die den Ort des Entzündungsgeschehens darstellen, konnte lediglich eine signifikant induzierte IL-1 β -mRNA-Expression gefunden werden (Abb. 25). Dieses Ergebnis zeigt, dass bekannte pro-inflammatorische Mediatoren in der Pathogenese der CIA in unterschiedlichen Zellen und Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden.

VIII.2.4 Analyse der iNOS-mRNA-Expression im Modell der CIA

Viele verschiedene Studien lassen vermuten, dass NO eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen scheint. So wurde von Farrell *et al.* (1992) berichtet, dass im Serum und der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten erhöhte Nitritmengen nachgewiesen werden konnte. Die NO-Produktion und die iNOS-Expression in den an RA-erkrankten Patienten waren dabei hauptsächlich auf das entzündete Synovium und den Knorpel begrenzt. Dieses Ergebnis konnte 1996 von McInnes *et al.* bestätigt werden. Ueki *et*

al. (1996) konnten außerdem einen Zusammenhang der Serum-NO-Spiegel und der Krankheitsaktivität der RA nachweisen. So konnte eine Verbindung der im Serum gemessenen NO-Mengen mit Parametern wie Morgensteifigkeit, der Anzahl geschwollener Gelenke und den Mengen des CRP gezeigt werden. Außerdem zeigte die Gruppe eine Korrelation der Serum-NO- mit den TNF- α - und IL-6-Mengen. Auch in verschiedenen Tiermodellen konnte eine Beteiligung von NO am Krankheitsprozess gezeigt werden, indem die Gabe von NOS-Inhibitoren die Entwicklung einer Arthritis verzögerte. So hatte z.B. der NOS-Inhibitor L-NMA einen supprimierenden Effekt auf die Entwicklung einer Streptokokken-induzierten Arthritis (McCartney-Francis *et al.*, 1993). Allerdings konnten Studien mit iNOS^{-/-}-Mäusen diese Beobachtungen nicht vollständig bestätigen, da diese immer noch eine Empfindlichkeit gegenüber einer CIA aufwiesen (Visco, 1997). Die Autoren vermuten, dass eine Induktion der iNOS ein nebensächlicher, aber kein verursachender Faktor für den Krankheitsprozess darstellt.

Um einen weiteren Einblick in die Bedeutung von NO in der Aufrechterhaltung einer Entzündung im Hintergrund der RA zu erhalten, wurde die iNOS-mRNA-Expression im Modell der CIA genauer analysiert. qRT-PCR-Analysen zeigten, dass in peripheren Blutmonozyten, den Pfoten und der Leber CII-immunisierter Tiere nur an Tag 25 nach der Immunisierung eine signifikant erhöhte iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte (Abb. 26A, 27A, 28A). An allen übrigen Tagen war die mRNA-Expression der iNOS im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert. Dieser Effekt kann vermutlich auf die an Tag 21 durchgeführte „boost“-Injektion zurückgeführt werden. Durch diese Injektion sollte eine zusätzliche Aktivierung und somit eine Verstärkung der Autoimmunreaktion erreicht werden. In Folge dessen könnte es zu einer Stimulation von T-Zellen, die daraufhin unter anderem Zytokine, Chemokine und pro-inflammatorische Mediatoren bilden, gekommen sein. Zytokine wie TNF- α und IL-1 sind in der Lage, die Expression der iNOS zu induzieren (Lotz *et al.*, 1995). Es könnte sich also um einen kurzfristigen Effekt der überschießenden Immunreaktion handeln. Eine Behandlung der Mäuse mit Dexamethason oder S-Curvularin hatte keine Wirkung auf die iNOS-mRNA-Expression in CII-immunisierten Tieren (Abb. 26B, 27B, 28B). Da die iNOS-mRNA-Expression an Tag 29, 33 und 37 nach der Immunisierung in CII- und PBS-behandelten Kontrolltieren nicht verändert war, wurde keine Wirkung der beiden Substanzen erwartet. Die Induktion der iNOS-Expression an Tag 25 konnte allerdings durch die Verabreichung von Dexamethason oder S-Curvularin nicht normalisiert werden. Die iNOS-mRNA-Expression stellt also keinen guten Marker für die pro-inflammatorische Genexpression im Modell der CIA dar. Die iNOS scheint also bei einer etablierten Arthritis in den untersuchten Geweben und Zellen keine Rolle zu spielen. Allerdings wäre noch zu untersuchen, ob zu früheren Zeitpunkten des Krankheitsmodells eine verstärkte iNOS-Expression nachweisbar ist.

VIII.2.5 Analyse der Proteinexpression im Modell der CIA

VIII.2.5.1 Analyse der Expression von Chemokinen im Modell der CIA

Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei den pathophysiologischen Vorgängen der RA, indem sie Leukozyten zum Ort der Entzündung rekrutieren. In synovialen Gewebe und der synovialen Flüssigkeit von RA-Patienten konnten erhöhte Konzentrationen verschiedener Chemokine nachgewiesen werden (Kanbe *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2001). Obwohl Makrophagen und Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten als die potentesten Produzenten von Chemokinen im Synovium angesehen werden, sind Chondrozyten ebenfalls in der Lage, Chemokine zu produzieren (Hosaka *et al.*, 1994; Iwamoto *et al.*, 2007; Momohara *et al.*, 2007; Villiger *et al.*, 1992).

Um einen Einblick in das komplexe Zusammenspiel der Chemokine in der Pathogenese der RA zu erhalten, wurde mit Hilfe eines „Proteome Profiles“ die Expression verschiedener Chemokine im Modell der CIA analysiert (Abb. 29). Zusätzlich wurde der Einfluss von Dexamethason und S-Curvularin auf die Chemokin-Expression genauer betrachtet. Dabei zeigte sich, dass in den Pfoten die Proteinexpression der „complement component 5a“ (C5a), des „monocyte chemotactic protein 1“ (MCP-1), „macrophage inflammatory protein 1 α “ (MIP-1 α), MIP-1 β und MIP-2 sowie des „stromal cell-derived factor“ (SDF-1; CXCL12) und des „chemokine (C-C motif) ligand“ (CCL17) nach der Immunisierung mit CII signifikant induziert wurde (Abb. 30).

MCP-1 trägt zur Rekrutierung von Monozyten, T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Basophilen bei (Iikuni *et al.*, 2006; Loetscher *et al.*, 1994). Es wird in synovialen Gewebe und der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten hauptsächlich von synovialen Makrophagen in großen Mengen exprimiert (Koch *et al.*, 1992). Eine positive Korrelation der MCP-1-Mengen mit den IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Konzentrationen in Kulturüberständen von Synoviozyten aus RA-Patienten konnte bereits gezeigt werden. Dabei war die MCP-1-mRNA-Expression in kultivierten synovialen Zellen mit IL-1 β und TNF- α stimulierbar (Harigai *et al.*, 1993). MCP-1 führt in Chondrozyten zu einer Stimulation der MMP3-Produktion und zu einer Hemmung der Proteoglykansynthese (Borzi *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2001). Im Modell der CIA konnte die CII-vermittelte Induktion der MCP-1-Proteinexpression durch eine Behandlung mit S-Curvularin und Dexamethason signifikant reduziert werden. Dabei waren die Effekte beider Substanzen vergleichbar (Abb. 30A). Durch die inhibitorische Wirkung von S-Curvularin und Dexamethason auf die MCP-1-Expression könnte also die Infiltration des Gelenks mit Immunzellen verringert werden. Außerdem wäre es möglich, dass eine Behandlung CII-immunisierter Mäuse mit den beiden Substanzen zu einer Reduktion der MMP3-Produktion beiträgt und somit den Knochenabbau verlangsamen könnte. Die S-Curvularin- und Dexamethason-vermittelte Hemmung der MCP-1-Expression könnte zusätzlich einen

steigernden Effekt auf die Proteoglykansynthese ausüben, was ebenfalls in einer Verbesserung der Knochenstruktur resultieren könnte.

MIP-1 α als Beispiel eines von Makrophagen produzierten Proteins trägt zur Aktivierung von Granulozyten bei. Dies führt zu einer akuten, durch Neutrophile gekennzeichnete Entzündung. Des Weiteren kann MIP-1 α die Synthese und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1 aus Fibroblasten und Makrophagen induzieren. In RA-Patienten konnten im Vergleich zu anderen arthritischen Erkrankungen höhere Mengen von MIP-1 α in der synovialen Flüssigkeit nachgewiesen werden. Eine Stimulation isolierter Fibroblasten-ähnlicher Synoviozyten mit LPS und TNF- α führte zu einer Induktion der MIP-1 α -mRNA-Expression (Koch *et al.*, 1994). Im Modell der CIA konnte die Expression von MIP-1 α durch eine Behandlung der CII-immunisierten Mäuse mit dem Naturstoff S-Curvularin als auch mit dem etablierten Pharmakon Dexamethason reduziert werden (Abb. 30A). Eine Hemmung der MIP-1 α -Expression könnte also zu einer Reduktion der Induktion weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren beitragen und auf diese Weise die Gelenkentzündung im Krankheitsbild der RA verbessern.

Ein weiteres Chemokin, dass im Synovium von RA-Patienten exprimiert wird, ist der „stromal cell-derived factor“ (SDF-1) oder CXCL12. CXCL12 stimuliert die Migration von Gedächtniszellen des Immunsystems in das Synovium (Nanki *et al.*, 2000). Es handelt sich dabei um spezialisierte Lymphozyten, die aus aktivierten B-Zellen hervorgehen. Bei wiederholtem Kontakt mit einem Antigen werden sie sofort aktiviert und können innerhalb weniger Stunden eine Immunreaktion auslösen. Pathologische CXCL12-Konzentrationen führen jedoch zum Absterben von humanen Chondrozyten, was von der Aktivität der p38-MAPK abhängig ist (Wei *et al.*, 2006). CXCL12 kann zusätzlich die Freisetzung von MMP-3 in Chondrozyten steigern. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Chemokinen zeigten sich bei CXCL12 die deutlichsten Unterschiede der inhibitorischen Eigenschaften von S-Curvularin und Dexamethason. Obwohl beide Substanzen die CII-induzierte CXCL12-Proteinexpression in den Pfoten reduzierten, war der Effekt des Glukokortikoids um das dreifache stärker (Abb. 30A). Eine Hemmung der CXCL12-Expression könnte bei der RA eine wichtige Rolle einnehmen, indem die Migration von Gedächtniszellen und somit die Autoimmunreaktion abgeschwächt wird.

Die „complement component 5a“ (C5a) als chemoattraktives Protein trägt zur Rekrutierung von Neutrophilen (Becker, 1972; Snyderman *et al.*, 1970) und Makrophagen (Snyderman *et al.*, 1975) bei und kann die Aktivität vieler Zelltypen modulieren. Auf diese Weise kann C5a eine Vielzahl biologischer Funktionen innerhalb und außerhalb des Immunsystems beeinflussen. Im Serum von Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen konnten erhöhte C5a-Konzentrationen nachgewiesen werden (Grant *et al.*, 2002; Woodruff *et al.*, 2002). Im Verlauf der RA werden von aktivierten autoreaktiven B- und T-Zellen Rheumafaktoren und

Autoantikörper produziert, die im Gelenk akkumulieren und Immunkomplexe bilden. Dies führt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Freisetzung von C5a. Der erhöhte C5a-Spiegel rekrutiert und aktiviert Neutrophile und Monozyten, die sich im Synovium und der synovialen Flüssigkeit ansammeln. Aktivierte Neutrophile setzen zusätzlich chemotaktische Moleküle frei, die wiederum zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen wie Monozyten und Makrophagen führt. Diese aktivieren ihrerseits synoviale Fibroblasten, die daraufhin Zytokine, Chemokine und Proteasen bilden. Es kommt zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus, der die Entzündungsreaktion verstärkt und letztendlich zu einem Fortschreiten des Knorpel- und Knochenabbaus in der RA führt. Die Bedeutung von C5a für die Entstehung einer Arthritis wurde bereits in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Eine Deletion von C5 verhinderte die Induktion einer Arthritis durch Kollagen und anti-Glucose-6-Phosphat-Antikörpern (Ji *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis wird durch eine weitere Studie unterstützt, in der die Gabe eines anti-C5-Antikörpers eine CIA verhinderte und die Symptome einer etablierten Erkrankung verbesserte (Wang *et al.*, 1995). Durch die Hemmung der Expression von C5a durch S-Curvularin bzw. Dexamethason im Modell der CIA (Abb. 30A) könnte dieser Mechanismus zu einem frühen Zeitpunkt der Kaskade unterbrochen werden, was zu einer Verminderung der destruktiven Prozesse führen könnte.

Im Modell der CIA hatte eine Behandlung der Mäuse sowohl mit S-Curvularin als auch mit Dexamethason eine inhibitorische Wirkung auf die CII-induzierte Proteinexpression verschiedener Chemokine. Die Effekte beider Substanzen waren dabei nahezu identisch. Eine Therapie mit einer der beiden Substanzen könnte den Krankheitsverlauf der CIA und möglicherweise der RA positiv beeinflussen, indem die Infiltration des Gelenks mit Immunzellen verringert wird. Da Chemokine außerdem die Produktion und Freisetzung von Zytokinen und MMPs stimulieren, könnte ebenfalls der Knorpelabbau und die Ausbildung des Pannus durch eine Behandlung von Patienten mit S-Curvularin reduziert werden.

VIII.2.5.2 Analyse der Expression von Zytokinen im Modell der CIA

Zytokine regulieren ein breites Spektrum von inflammatorischen Prozessen, die in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese der RA stehen. Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinaktivitäten begünstigt die Induktion der Autoimmunität, die chronische Entzündung und somit auch die Gelenkschädigung. Die Analyse der Expression von Zytokinen im Modell der CIA ergab, dass eine Immunisierung mit CII zu einer signifikanten Induktion der Proteinmenge von IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF- α führte (Abb. 30B).

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert, die in entzündetem Synovialgewebe von RA-Patienten zu finden sind. In

isolierten Synoviozyten konnte TNF- α die Produktion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 (Buchan *et al.*, 1988), IL-6 (Hirano *et al.*, 1988), GM-CSF (Haworth *et al.*, 1991) und IL-8 (Brennan *et al.*, 1990) induzieren. In weiteren *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass TNF- α durch die Induktion von proteolytischen Enzymen und Metalloproteinasen sowie durch die Aktivierung von Osteoklasten zum Knorpelabbau (Dayer *et al.*, 1985) und zur Knochenzerstörung (Bertolini *et al.*, 1986) beiträgt. Darüberhinaus stimuliert TNF- α die Produktion und die Freisetzung von Chemokinen, die wiederum Leukozyten aus dem Blut ins Gelenk rekrutieren (Feldmann *et al.*, 2001). Im Modell der CIA führte eine Behandlung mit einem TNF- α -spezifischen Antikörper zu einer Verbesserung der Entzündung und des Knochenabbaus (Williams *et al.*, 1992). Jedoch ist noch nicht vollständig geklärt, ob es sich dabei um direkte oder indirekte Effekte von TNF- α handelt. In der humanen Therapie der RA kommen ebenfalls TNF- α -Antikörper zum Einsatz. So führte z.B. eine Behandlung mit Infliximab zu einer Reduktion der Entzündungssymptome und der CRP-Mengen im Serum (Elliott *et al.*, 1993). Im Modell der CIA konnte die TNF- α -Proteinexpression in den Pfoten durch eine Behandlung mit S-Curvularin signifikant gesenkt werden (Abb. 30B). Es liegt daher nahe, dass die Verabreichung der Pilzsubstanz in den Mäusen ähnlich weitreichende Effekte auf den Krankheitsverlauf der CIA nehmen könnte, wie sie bei der Antikörpertherapie beobachtet werden kann. Des Weiteren könnte durch die SC-vermittelte Hemmung der TNF- α -Expression ebenfalls die Hemmung der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 erklärt werden, die in den Pfoten detektiert werden konnte. Im Gegensatz zu S-Curvularin hatte Dexamethason nur auf die IL-6-Proteinexpression eine inhibitorische Wirkung, wohingegen die IL-1 β -Expression gesteigert wurde (Abb. 30B). Da TNF- α ebenfalls an der Aktivierung von Osteoklasten beteiligt ist, könnte eine Hemmung der TNF- α -Expression zu einer Reduktion des Knorpelabbaus führen.

IL-1 wird genauso wie der natürliche IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) in großen Mengen in der Synovialmembran exprimiert. In *in vitro*-Experimenten induzierte IL-1 die Zytokinproduktion in synovialen Monozyten, die Prostanoid- und MMP-Freisetzung durch Fibroblasten, katabolische Prozesse und die Zytokinproduktion durch Chondrozyten sowie die Knochenabnutzung durch Osteoklasten (Dayer, 2003). Studien mit einem IL-1-Rezeptorantagonist (Anakinra) in der RA-Therapie zeigten eine signifikante, jedoch nur mäßige Unterdrückung der Krankheitsaktivität (Bresnihan *et al.*, 1998). In verschiedenen Tiermodellen der Arthritis konnte die Entzündung als auch die Schädigung des Knorpels durch eine zielgerichtete Interaktion eines Antikörpers mit IL-1 und Rezeptorkomponenten reduziert werden (Joosten *et al.*, 1999; van den Berg *et al.*, 1994). Eine Kreuzung von humanen TNF- α -transgenen und IL-1-defizienten Mäusen führt zu einer Verminderung der Knochenschäden und der Osteoklastenbildung, jedoch nicht zu einer Hemmung der Entzündung (Zwerina *et al.*, 2007). In Studien mit IL-1ra-defizienten Mäusen konnte gezeigt

werden, dass diese Tiere spontan eine Arthritis entwickeln (Nakae *et al.*, 2003). Diese Daten lassen vermuten, dass die Knochen-schädigenden Effekte in der RA hauptsächlich durch IL-1 β , und nicht durch TNF- α verursacht werden. Da Dexamethason eine stimulierende Wirkung auf die IL-1 β -Expression in CII-immunisierten Tieren ausübt, könnte man vermuten, dass die durch IL-1 β -vermittelten Knochen-schädigenden Effekte verstärkt werden. Auf diese Weise könnte auch die Nebenwirkung von GKs, eine Osteoporose zu entwickeln, erklärbar sein. Eine Behandlung mit S-Curvularin führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression von IL-1 β und stellt somit einen Gegensatz zur Wirkung von Dexamethason dar (Abb. 30B). Die unterschiedlichen Effekte der beiden Substanzen lassen vermuten, dass an der Wirkung von S-Curvularin andere Signaltransduktionswege beteiligt sind als bei Dexamethason. Es ist also möglich, dass S-Curvularin keine Knochen-schädigenden Effekte ausübt, wie sie für das Glukokortikoid beschrieben sind.

IL-6 vermittelt unter anderem die Aktivierung von B- und T-Zellen, Makrophagen, Osteoklasten, Chondrozyten und endothelialen Zellen und ist in die akute Phase-Reaktion in der Leber involviert (Kishimoto, 2005). Eine Deletion des IL-6-Gens verhinderte in DBA/1-Mäusen die Induktion einer CIA (Alonzi *et al.*, 1998). Mit dem Einsatz eines anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpers (Tocilizumab) in RA-Patienten konnten Nishimoto *et al.* (2004) eine signifikante Unterdrückung der Entzündung und der klinischen Krankheitsaktivität erzielen. In klinischen Studien konnte durch den Einsatz eines humanisierten IL-6-Rezeptor-Antikörpers ebenfalls eine Verbesserung der Krankheitsaktivität und des Knochenabbaus in RA-Patienten erzielt werden, die nicht auf eine Behandlung mit DMARDs ansprachen (Smolen *et al.*, 2008). Im Modell der CIA konnte die IL-6-Expression durch die Therapie CII-immunisierter Mäuse signifikant von S-Curvularin und Dexamethason gehemmt werden (Abb. 30B). Dies könnte zu einer verminderten Aktivierung von B- und T-Zellen führen, was schließlich in einer schwächeren Immunreaktion resultieren könnte. Da IL-6 ebenfalls an der Aktivierung von Knochen-abbauenden Osteoklasten beteiligt ist, könnte eine Reduktion der IL-6-Menge die Knorpelschädigung bei Gelenkentzündungen verringern.

Bei IL-12 handelt es sich um ein Zytokin, das immunoregulatorische Eigenschaften besitzt (Trinchieri, 2003). Es wird von APCs, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen als Antwort auf bakterielle Produkte und Immunsignale freigesetzt. Es wird angenommen, dass IL-12 durch seine stimulierende Funktion der IFN- γ -Produktion (Chan *et al.*, 1991) und seiner Beteiligung an der Entwicklung der T_H1-Immunantwort (Manetti *et al.*, 1993) eine Rolle bei der Pathogenese der RA spielt. Im Gegensatz zur humanen RA, bei der unterschiedliche Ergebnisse über die Serum-IL-12-Mengen existieren, ist die Rolle von IL-12 im Modell der CIA überzeugender. In DBA/1-Mäusen konnte durch eine Immunisierung mit CII und IL-12 eine schwere Arthritis ausgelöst werden, die mit einer erhöhten IFN- γ -Produktion einherging (Germann *et al.*, 1995). Die Schwere der Arthritis konnte in diesem Modell mit spezifischen

IL-12-Antikörpern abgemildert werden (Malfait *et al.*, 1998), obwohl eine langfristige Therapie die Erkrankung verschlimmerte (Joosten *et al.*, 1997). IL-12 scheint also bei der CIA eine regulatorische Funktion einzunehmen, wobei es in früheren Stadien der Krankheit pro-inflammatorische, zu späteren Zeitpunkten anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist. Da die Zytokinexpression in dieser Arbeit zu einem Zeitpunkt analysiert wurde, in der man von einer etablierten Arthritis ausgehen kann, könnte IL-12 eine anti-inflammatorische Funktion zukommen. Eine Hemmung der IL-12-Expression durch S-Curvularin oder Dexamethason (Abb. 30B) könnte sich durch die Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression durch diese Substanzen erklären. Es muss jedoch noch geklärt werden, inwieweit diese Hemmung einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.

Immunantworten werden aufgrund der produzierten Zytokine als T_H1 - oder T_H2 -Antwort klassifiziert. T_H1 -Antworten, bei denen es sich um Zell-vermittelte Reaktionen handelt, sind durch das Vorhandensein von IL-12 und IFN- γ gekennzeichnet und reagieren antagonistisch zu T_H2 -Antworten. Im Modell der CIA führt die Immunisierung mit CII zu einer T_H1 -Antwort, die sich durch die Produktion von IL-12 und IFN- γ auszeichnet (Terato *et al.*, 1992). In Mäusen, in denen IFN- γ bzw. der IFN- γ -Rezeptor deletiert wurde, verläuft die CIA schneller mit einer deutlich schwereren Ausprägung, obwohl keine IFN- γ -vermittelte Antwort stattfindet (Manoury-Schwartz *et al.*, 1997; Vermeire *et al.*, 1997). Trotz der Vermutung, dass in der Abwesenheit von IFN- γ eine kompensatorische Erhöhung von T_H2 -Zytokinen stattfinden würde, konnte bisher noch keine gesteigerte Expression von T_H2 -Zytokinen in diesem Modell demonstriert werden. Allerdings konnte in den Lymphknoten und in Synoviozyten der IFN- $\gamma^{-/-}$ -Mäuse erhöhte Mengen von IL-1 β detektiert werden. Die Induktion der IL-1 β -Expression scheint für die Entwicklung der CIA also eine wichtige Rolle zu spielen. Die Behandlung der IFN- $\gamma^{-/-}$ -Mäuse mit einem IL-1 β -Antikörper konnte die Inzidenz und die Schwere der Arthritis signifikant reduzieren (Guedez *et al.*, 2001). Insgesamt zeigen diese Studien die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen T_H1 - und T_H2 -Zytokinen, die bei einer Immunerkrankung stattfinden. In den durchgeführten Experimenten konnte eine erhöhte IFN- γ -Expression in den Pfoten CII-immunisierter Mäuse detektiert werden. Die Behandlung mit S-Curvularin hatte keinen Effekt auf die IFN- γ -Menge. Im Gegensatz dazu führte Dexamethason im Vergleich zu CII-immunisierten Tieren zu einer Erhöhung der IFN- γ -Expression (Abb. 30B). Dies könnte zu einer Verstärkung der T_H1 -Antwort und zu einer Aufrechterhaltung der Arthritis führen. Eine Kompensation durch eine verstärkte Expression von T_H2 -Zytokinen kann in diesem Fall vermutlich ausgeschlossen werden.

Ein Zytokin, das anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist, ist IL-10. IL-10 konnte in peripherem Blut und in synovialen Gewebe von RA-Patienten gefunden werden (Cush *et al.*, 1995; Katsikis *et al.*, 1994). Die Beteiligung von IL-10 als ein immunoregulatorisches Zytokin konnte in Tiermodellen gezeigt werden. In Synovialgewebe von CII-immunisierten DBA/1-

Mäusen wurde eine Erhöhung der IL-10-Produktion beschrieben. Ein neutralisierender Antikörper führte zu einem schnelleren Auftreten und zu einem schwereren Verlauf der Arthritis (Kasama *et al.*, 1995). Des Weiteren konnten die Symptome einer etablierten Arthritis durch eine tägliche Behandlung mit IL-10 verbessert werden (Walmsley *et al.*, 1996). Eine Reduktion der IL-10-Expression in S-Curvularin- und Dexamethason-behandelten Mäusen (Abb. 30B) würde die pro-inflammatorischen Prozesse also verstärken. In CII-behandelten Mäusen wäre demnach eine Reduktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zu erwarten gewesen. Die verminderte Expression von IL-10 nach einer Behandlung mit S-Curvularin oder Dexamethason könnte auch durch die Hemmung der pro-inflammatorischen Genexpression durch beide Substanzen erklärbar sein. Da sich pro- und anti-inflammatorische Mediatoren in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen, kann die Senkung der pro-inflammatorischen Genexpression zu einer Reduktion der Expression anti-inflammatorischer Gene führen.

Die Untersuchung der Proteinexpression von Zytokinen und Chemokinen im Modell der CIA zeigt, dass zwischen den einzelnen Proteinen ein komplexes Netzwerk und Interaktionen bestehen. Da einzelne Zytokine teilweise unterschiedliche und zum Teil entgegengesetzte Funktionen in verschiedenen Phasen der Erkrankung zu spielen scheinen, wird die Entwicklung neuer Substanzen für den therapeutischen Einsatz zusätzlich erschwert. Eine Behandlung CII-immunisierter Mäuse mit dem Naturstoff S-Curvularin als auch mit dem etablierten Pharmakon konnte eine Vielzahl der Chemokine und Zytokine im Modell der CIA hemmen. Die beiden Substanzen unterschieden sich in ihrer Wirkung auf die IFN- γ - und IL-1 β -Expression in den Pfoten der Mäuse. Dexamethason hatte auf die Expression dieser beiden Zytokine eine zusätzlich steigernde Wirkung, wohingegen S-Curvularin die IL-1 β -Menge reduzieren konnte. Da IL-1 β der wichtigste Mediator der Knochen-abbauenden Effekte im Krankheitsbild der RA zu sein scheint, könnten diese durch eine Therapie mit S-Curvularin möglicherweise verringert werden. Der Naturstoff hatte auf die IFN- γ -Expression keine Wirkung. Da die Effekte beider Substanzen auf die meisten Zytokine und Chemokine annähernd identisch waren, stellt S-Curvularin eine potentielle Alternative zur Glukokortikoidbehandlung von RA-Patienten dar. Durch S-Curvularin könnte ebenfalls die Möglichkeit bestehen, GK-resistente Krankheitsverläufe zu therapieren.

VIII.2.6 Genexpressionsanalysen in den Pfoten Kollagen-induzierter TCR- β tg-Mäuse mittels DNA-Mikroarray-Analysen

Zur Identifizierung von weiteren Genen, die in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle spielen können, wurden totalgenomische DNA-Mikroarrays mit RNA aus den Pfoten CII-behandelter TCR- β tg-Mäuse durchgeführt. Dieser experimentelle Ansatz ermöglichte die

parallele Analyse der Expression von etwa 25.000 Genen. Die statistische Auswertung mehrerer Analysen ergab, dass die Mehrzahl der Gene nicht reguliert wurde (Abb. 31). Die Immunisierung der TCR- β tg-Mäuse mit CII führte zu einer signifikanten Änderung der Genexpression von 2228 Genen (Abb. 32). Eine Behandlung CII-immunisierter Mäuse mit Dexamethason hatte einen signifikanten Einfluss auf 1819 Gene, S-Curvularin beeinflusste 1509 Gene. 100 Gene wurden unter allen drei Bedingungen signifikant reguliert (Abb. 32). Wie in Abbildung 33 gezeigt, wurden die nach CII-Immunisierung (Abb. 33A) und nach SC-Behandlung (Abb. 33B) signifikant regulierten Gene durch die Annotation mit Hilfe von „Gene ontology“ in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Dabei stimmt die Reihenfolge der Untergruppen in beiden Fällen weitestgehend überein. Von besonderem Interesse waren solche Gene, die nach einer Behandlung mit SC entgegengesetzt zu CII-immunisierten Kontrolltieren exprimiert wurden. Deshalb wurden diese Gruppen nochmals genauer analysiert. Der Fokus lag dabei auf der Analyse von Genen, die an Signaltransduktionsvorgängen oder der Immunantwort beteiligt sind.

Die Immunisierung mit CII führte zu einer signifikanten Induktion des „cathelicidin-related antimicrobial peptide“ *Camp*, das durch eine Behandlung sowohl mit S-Curvularin als auch mit Dexamethason deutlich reduziert werden konnte (Abb. 34 B). Es handelt sich dabei um anti-mikrobielles Peptid, was dem humanen Peptid LL-37 homolog ist. LL-37 wurde zuerst in Neutrophilen identifiziert. Das Cathelicidin stimuliert in Neutrophilen die IL-8 Expression durch die Aktivierung der p38-MAPK und ERK und verstärkt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Zheng *et al.*, 2007). Später konnte die Expression von LL-37 auch in Epithelzellen, Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten und verschiedenen Drüsen nachgewiesen werden (Niyonsaba *et al.*, 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LL-37 nicht nur als endogenes Antibiotikum fungiert, sondern auch Funktionen, wie die Regulation von inflammatorischen Prozessen und der Immunantwort sowie die Rekrutierung von Immun- oder Entzündungszellen zu Orten der Entzündung, ausübt (Niyonsaba *et al.*, 2006). Weiterhin wurde berichtet, dass LL-37 Monozyten, T-Zellen, dendritische Zellen und Keratinozyten stimuliert, was auf eine Beteiligung an der angeborenen und adaptiven Immunantwort schließen lässt (De *et al.*, 2000; Niyonsaba *et al.*, 2005; Niyonsaba *et al.*, 2007). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des Cathelicidins lieferten Studien aus *Camp*-defizienten Mäusen, die gegenüber Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Streptokokken der Gruppe A aufwiesen (Nizet *et al.*, 2001).

Ein weiteres Gen, dessen Expression durch eine Behandlung der Mäuse mit CII stark erhöht wurde, ist die Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase B (*Ppib*), die auch als Cyclophilin B beschrieben ist. Eine Behandlung der Tiere mit S-Curvularin konnte die mRNA-Expression von *Ppib* deutlich reduzieren, wohingegen Dexamethason keinen signifikanten Effekt auf die Expression dieses Gens ausübte (Abb. 34B). Das Protein induziert Chemotaxis in humanen

Neutrophilen und T-Lymphozyten. Es wurde gezeigt, dass in vaskulären glatten Muskelzellen oxidativer Stress mit einer erhöhten Sekretion von Cyclophilin B assoziiert ist. Dies lässt darauf schließen, dass *Ppib* ein wichtiger Mediator der Effekte von ROS auf die vaskuläre Funktion darstellt (Liao *et al.*, 2000). In interstitiellen renalen Fibroblasten konnte eine Verbindung der Cyclophilin B-Expression mit einer interstitiellen Entzündung nachgewiesen werden, was für eine chronische Nierenerkrankung charakteristisch ist (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996). Außerdem stellt Cyclophilin B eine wesentliche Komponente des Knorpels dar. Das Protein kann von MMPs freigesetzt werden, was vermuten lässt, dass *Ppib* eine Rolle in der Pathogenese von arthritischen Erkrankungen spielen könnte (De Ceuninck *et al.*, 2003). Diese Hypothese wird durch das Ergebnis gestützt, dass sein Rezeptor innerhalb des entzündeten Gelenks auf T-Zellen und im Synovium vorhanden ist (De Ceuninck *et al.*, 2003).

Defensine sind ebenfalls endogene Antibiotika mit einer mikrobiziden Wirkung gegen gram-negative und gram-positive Bakterien, Pilzen, Viren und Protozoen (Zaslhoff, 2002). Die Expression einiger Defensine kann durch LPS, IL-1 β und TNF- α stimuliert werden (Russell *et al.*, 1996) und waren in ihrer Expression in *in vivo*-Entzündungsmodellen erhöht. Eine Erhöhung der Defensin-Expression konnte bisher in den Epithelien des Magen-Darm- und Atmungstraktes sowie in der Haut (Harder *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1998) nachgewiesen werden. Die 5'-flankierenden Regionen einer Vielzahl induzierbarer epithelialer Defensine enthalten NF- κ B-Bindungsstellen (Singh *et al.*, 1998) und lassen somit eine Regulation über den NF- κ B-Signaltransduktionsweg vermuten. Neben ihren positiven Eigenschaften in der Immunabwehr können neutrophile Defensine aber auch die Antigen-spezifische Immunantwort erhöhen. Im Modell der CIA konnte eine erhöhte β -Defensin 6 (*Defb6*)-Expression in CII-behandelten Mäusen im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Durch eine Behandlung der Tiere mit S-Curvularin konnte die Expression signifikant reduziert werden. Dexamethason zeigte auch auf die Expression des Defensins keinen Effekt (Abb. 34 B).

Im Krankheitsbild der CIA könnte die Expression von *Camp*, *Ppib* und *Defb6* dazu beitragen, die Entzündung aufrecht zu erhalten. Für alle drei Gene wurde beschrieben, dass sie eine Funktion bei der Immunabwehr einnehmen, in dem sie Immunzellen zu Orten der Entzündung rekrutieren. *Camp* ist außerdem in der Lage, die p38-MAPK und ERK zu aktivieren. Diese beiden Kinasen sind an der Expression vieler pro-inflammatorischer Gene beteiligt. *Camp* könnte also durch diesen Mechanismus sowie durch die verstärkte Bildung von ROS aktiv zu den Entzündungsprozessen im Gelenk beitragen. *Ppib* als wichtiger Bestandteil des Knorpels wird durch MMPs freigesetzt. Da während der Pathogenese der RA eine Erhöhung der MMP-Expression vorzufinden ist, könnte *Ppib* also vermehrt während der Entzündung freigesetzt werden, was wiederum zu einer gesteigerten Chemotaxis von

Neutrophilen und T-Zellen führen kann. Durch seine Fähigkeit, die Antigen-spezifische Immunantwort zu erhöhen, kann *Defb6* ebenfalls zu den pathophysiologischen Vorgängen bei der RA beitragen. Da die Expression einiger Defensine durch TNF- α , IL-1 β oder LPS stimuliert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass die Immunantwort durch diesen Prozess verstärkt wird. Im Hintergrund der RA spielt also nicht die mikrobizide Wirkung dieser Proteine eine Rolle, sondern ihre Fähigkeit, die Immunantwort und das Rekrutieren von Immunzellen zu verstärken. Im Modell der CIA wurde die Expression der drei Gene durch S-Curvularin signifikant gehemmt. Somit könnte durch eine Behandlung mit SC eine Verbesserung der Symptome der CIA erreicht werden, in dem das Einwandern von Immunzellen ins Gelenk vermindert wird.

Eine Immunisierung mit CII führte auch zu einer signifikanten Erhöhung der Expression der Myeloperoxidase (*Mpo*) (Abb. 34B). Die Myeloperoxidase wird in azurophilen Vesikeln neutrophiler Granulozyten gespeichert. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (Harrison *et al.*, 1976). Die gebildeten Hypochloridionen können verschiedene Biomoleküle oxidieren und tragen somit zur Erkennung und Aufnahme apoptotischen Materials durch Phagozyten bei. Mäki-Petäjä *et al.* (2008) konnten zeigen, dass der MPO-Spiegel in RA-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erhöht war. Die MPO-Mengen waren dabei positiv mit den CRP-Mengen und der iNOS-Aktivität, und negativ mit der endothelialen Funktion korreliert. Die Studie zeigte außerdem, dass eine Entzündung möglicherweise durch die Aktivierung der iNOS und einer erhöhten Produktion der MPO entsteht. Die daraus resultierende Entkopplung der eNOS und die Reduktion der NO-Verfügbarkeit führen zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. Diese Daten lassen vermuten, dass eine Hemmung der Inflammation eine entscheidende Rolle bei der Verminderung kardio-vaskulärer Erkrankungen von RA-Patienten spielt. S-Curvularin könnte in diesem Zusammenhang durch die Hemmung der *Mpo*-Expression eine Reduktion des kardio-vaskulären Risikos bei RA-Patienten bewirken.

Die Familie der Calcium-bindenden S100-Proteine ist an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen beteiligt. Zu den Funktionen zählen unter anderem die Regulation der Phosphorylierung von Proteinen, der Ca²⁺-Homöostase, von Enzym-Aktivitäten, Transkriptionsfaktoren und der Entzündungsreaktion. Einige der Proteine üben nach ihrer Sekretion aber auch extrazelluläre Funktionen aus. Für ihre Aktivität ist eine Dimerisierung von entscheidender Bedeutung. Hohe Konzentrationen des S100A8/A9-Heterodimers scheinen für entzündliche Prozesse charakteristisch zu sein. Es agiert als chemotaktisches Molekül, das konstitutiv in Neutrophilen, aktivierten Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Foell *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2003; Ryckman *et al.*, 2003). Der Komplex konnte bereits in Seren von Patienten nachgewiesen werden, die an cystischer Fibrose, RA oder an einer

akuten Entzündung leiden (Kerkhoff *et al.*, 1998; Passey *et al.*, 1999) und wird deshalb als möglicher Biomarker zur Kontrolle der Krankheitsaktivität diskutiert (Foell *et al.*, 2004). Unter entzündlichen Bedingungen wird das Heterodimer aus S100A8/A9 von infiltrierenden Neutrophilen und Monozyten exprimiert und sekretiert (Goebeler *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1992). Die Expression korreliert dabei mit der Krankheitsaktivität verschiedener inflammatorischer Erkrankungen (Brun *et al.*, 1994; Goebeler *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1992). Im Modell der CIA war eine signifikant erhöhte S100A8-mRNA-Expression nach der Immunisierung mit CII nachweisbar, die ebenfalls durch Behandlung mit SC gehemmt wurde. (Abb. 34B). Die CIA ist, genau wie die RA, durch eine Infiltration der Gelenke durch Immunzellen gekennzeichnet. Diese Zellen sekretieren ein Gemisch unterschiedlicher Zytokine, die wiederum die Expression von S100A8 induzieren können. Nach der Sekretion kann S100A8 weitere Immunzellen rekrutieren, was zu einer Verstärkung der Entzündungsprozesse führt. Durch die S-Curvularin-vermittelte Hemmung von S100A8 kann also in die Entzündungsreaktion der RA eingegriffen werden, was zu einer Reduktion der Einwanderung von Immunzellen und möglicherweise zu einer verminderten Ausbildung des Pannus führen könnte.

Eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz scheint der „autoimmune regulator“ AIRE, ein Transkriptionsfaktor, zu spielen (Nagamine *et al.*, 1997). Autoimmunerkrankungen werden durch den Verlust von Mechanismen verursacht, die normalerweise eine Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Geweben aufrechterhalten. Die negative Selektion von selbst-reaktiven Thymozyten, die in der Medulla des Thymus stattfindet, stellt einen Hauptmechanismus der zentralen Toleranz dar (Anderson *et al.*, 2007; Takahama, 2006). Die epithelialen Zellen der Medulla exprimieren unter anderem Gewebespezifische Antigene („tissue-specific antigens“, TSAs) (Kyewski *et al.*, 2006). Während der negativen Selektion erfolgt eine Präsentation der TSAs von den medullären epithelialen Zellen oder von dendritischen Zellen gegenüber sich differenzierenden Thymozyten (Aschenbrenner *et al.*, 2007; Gallegos *et al.*, 2004). Dies führt durch funktionelle Inaktivierung, klonale Teilung oder klonaler Deletion von selbst-reaktiven T-Zellen zur Induktion der Toleranz (Hogquist *et al.*, 2005; Palmer, 2003; Yamagata *et al.*, 2004). Mutationen im humanen AIRE-Gen (*Aire*) führen zum Krankheitsbild der „Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy“ (APECED). Normalerweise wird der Transkriptionsfaktor im Thymus, der Bauchspeicheldrüse und in der Nebennierenrinde exprimiert. AIRE ist dafür verantwortlich, dass Thymus-fremde Selbstantigene von Thymus-Stromazellen exprimiert werden. Die T-Zellen können dann anhand dieser Selbstantigene "lernen", auf welche Antigene sie außerhalb des Thymus nicht reagieren sollten. APECED-Patienten leiden unter mehrfachen Störungen des endokrinen Hormonsystems, chronischer mukokutanen Candidiasis und ektodermaler Dystrophie (Perheentupa, 2006; Peterson *et al.*,

2005). Wie bei APECED-Patienten beobachtet, entwickeln AIRE-defiziente Mäuse Autoantikörper, die spezifisch für viele periphere Gewebe sind. Diese werden im Verlauf der Erkrankung von mononukleären Zellen infiltriert (Jiang *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2005; Ramsey *et al.*, 2002). Im Modell der CIA wurde die Expression von *Aire* durch eine Immunisierung mit CII in seiner Expression vermindert (Abb. 36B). Die Reduktion von AIRE könnte zu einer Abnahme der Expression von TSAs führen und somit die Selbsttoleranz herabsetzen. S-Curvularin war in der Lage, die AIRE-mRNA-Expression signifikant zu erhöhen, was wiederum zu einer geringeren Autoimmunreaktion beitragen könnte.

VII.2.7 Analyse der S100A8-mRNA- und Protein-Expression im Modell der CIA

Als weiterer pro-inflammatorischer Mediator sollte die mRNA-Expression des Calcium-bindenden Proteins S100A8 im Verlauf der CIA analysiert werden. In den durchgeführten Mikroarray-Experimenten konnte bereits eine erhöhte S100A8-Expression in den Pfoten nach der Immunisierung mit CII nachgewiesen werden, die durch die Behandlung der Mäuse mit S-Curvularin, aber nicht mit Dexamethason signifikant gehemmt werden konnte (Abb. 29B). qRT-PCR-Analysen mit RNA aus peripheren Blutmonozyten, der Pfoten und der Leber zeigten, dass die S100A8-mRNA-Expression CII-behandelter Tiere im gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollmäusen erhöht war, wobei in allen untersuchten Geweben bzw. Zellen eine tendenzielle Expressionsabnahme mit der Dauer des Experiments beobachtet werden konnte (Abb. 37A, 38A, 39A). Allerdings führte eine Behandlung der Tiere mit Dexamethason und S-Curvularin nur an einzelnen Tagen zu einer signifikanten Verminderung der S100A8-mRNA-Menge, obwohl generell eine Tendenz zur Reduktion der S100A8-mRNA-Expression zu beobachten war (Abb. 37B, 38B, 39B). Das Fehlen von signifikanten Effekten kann auf die großen Schwankungen der S100A8-mRNA-Expression in den CII-immunisierten Tieren zurückgeführt werden.

Obwohl bereits eine positive Korrelation der S100A8-Expression mit der Schwere der Arthritis in RA-Patienten (Sunahori *et al.*, 2006) als auch im Modell der Antigen-induzierten Arthritis in Mäusen (van Lent *et al.*, 2008) gezeigt werden konnte, konnte dieses Ergebnis im Modell der CIA nicht bestätigt werden. Im Modell der CIA nimmt die S100A8-mRNA-Expression in CII-immunisierten Tieren im Untersuchungszeitraum trotz Zunahme des Arthritisindex ab. Die S100A8-Expression scheint in diesem experimentellen Arthritismodell also negativ mit der Schwere der Erkrankung korreliert zu sein. Während einer Arthritis kommt es zur Infiltration des Gelenks mit Makrophagen (van den Berg *et al.*, 1996). Diese exprimieren und sekretieren nach Stimulation durch pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β das S100A8/A9-Heterodimer. Das Heterodimer induziert in Leukozyten und endothelialen Zellen eine pro-inflammatorische Antwort (Ryckman *et al.*, 2003; Vogl *et al.*, 2004), was zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führt. Die höchste Expression des

S100A8/A9-Heterodimers konnte im Pannus nachgewiesen werden (Kane *et al.*, 2003; Youssef *et al.*, 1999), welcher den Hauptort der Knorpeldestruktion und der Knochenschädigung darstellt. Somit hätte man in den Pfoten CII-behandelter Mäuse die höchste S100A8-mRNA-Expression erwartet. Jedoch konnte nur an Tag 25 eine signifikant erhöhte Expression von S100A8 detektiert werden, die jedoch um das bis zu 10-fache höher war als in der Leber und in PBMCs. Studien von van Lent *et al.* (2008) in S100A9^{-/-}-Mäusen, die zusätzlich auch kein S100A8-Protein exprimieren, konnten die Bedeutung des Heterodimers für die Regulation der Gelenkentzündung bestätigen. So konnte in den von der Gruppe verwendeten Mäusen eine Reduktion der Pfortenschwellung als auch eine Hemmung des MMP-vermittelten Knorpelabbaus beobachtet werden. Eine Hemmung der S100A8-mRNA-Expression durch S-Curvularin könnte den Krankheitsverlauf also deutlich verbessern. Tendenziell kann auch eine Reduktion der S100A8-Expression durch die Behandlung der Mäuse mit SC erzielt werden. Die Effekte von SC sind mit den von Dexamethason verursachten Effekten allerdings meist identisch. Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. In Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit CII zu einer deutlichen Induktion der S100A8-Proteinexpression führte. Durch eine Behandlung dieser Mäuse mit S-Curvularin und Dexamethason konnte die S100A8-Proteinmenge wieder auf das Niveau der PBS-behandelten Kontrolltiere gesenkt werden (Abb. 40).

VIII.3 Die Wirkung von S-Curvularin im akuten LPS-induzierten Entzündungsmodell

S-Curvularin zeigte in den Zellkulturexperimenten mit C-28/I2-Chondrozyten eine deutliche Hemmung der Zytokin-induzierten iNOS-Expression. Im *in vivo*-Modell der Kollagen-induzierten Arthritis führte eine Behandlung der Mäuse mit S-Curvularin zu einer deutlichen Verminderung der Krankheitssymptome und einer Reduktion einer Vielzahl pro-inflammatorischer Mediatoren. Da es sich bei der CIA um ein chronisches Inflammationsmodell handelt sollte die Wirkung von S-Curvularin außerdem im Modell der LPS-induzierten akuten Inflammation untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Dosis von 5 mg/kg LPS in peripheren Blutmonozyten, der Leber und der Milz zu einer signifikanten Induktion der iNOS- und S100A8-mRNA-Expression im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren führte (Abb. 41+42). Durch die Behandlung mit S-Curvularin konnte die LPS-induzierte iNOS-Expression in PBMCs und der Milz deutlich reduziert werden (Abb. 41A+C). Die mRNA-Expression der iNOS erreichte dabei wieder das gleiche Niveau wie in PBS-behandelten Kontrolltieren. In der Leber konnte nur eine tendenzielle Hemmung der iNOS-mRNA-Expression durch S-Curvularin beobachtet

werden (Abb. 41B). Dexamethason führte sowohl in PBMCs als auch in der Leber zu einer signifikanten Reduktion der iNOS-Expression. Wider Erwarten erhöhte die Behandlung mit Dexamethason in der Milz deutlich die Expression der iNOS-mRNA (Abb. 41C). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, in denen Dexamethason auch in der Milz zu einer Hemmung der LPS-induzierten iNOS-Expression führte (nicht gezeigte Daten).

Die LPS-induzierte Expression des Calcium-bindenden Proteins S100A8 wurde durch S-Curvularin und Dexamethason in PBMCs nicht signifikant gehemmt (Abb. 42A), was auf die großen Schwankungen in den Versuchsgruppen zurückgeführt werden kann. In der Leber konnte eine tendenzielle Abnahme der S100A8-mRNA beobachtet werden (Abb. 42B). S-Curvularin führte in der Milz zu einer signifikanten Reduktion der LPS-induzierten Expression von S100A8. Dexamethason hatte in der Milz keine Wirkung auf die S100A8-mRNA-Expression (Abb. 42C). Die Expression von S100A8 wird durch viele Faktoren wie LPS, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β in Makrophagen, Leukozyten und Monozyten (Hu *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000), aber auch in der endothelialen Zelllinie bEND3 (Yen *et al.*, 1997) induziert. Obwohl Glukokortikoide meist als anti-inflammatorische und immunsuppressive Substanzen beschrieben werden, konnte eine zusätzliche Erhöhung der LPS-induzierten S100A8-Expression in murinen Makrophagen und bEND3-Zellen (Hsu *et al.*, 2005) beobachtet werden. Eine Erhöhung der S100A8-mRNA-Expression durch Dexamethason konnte im Modell der akuten Inflammation nicht nachgewiesen werden, wobei auch keine signifikante Reduktion detektiert werden konnte. Die Expression von S100A8 wird durch LPS induziert. Dies führt zu einer Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten, aber nicht zu deren Aktivierung (Cornish *et al.*, 1996). So ermöglichen GKs durch die Erhöhung der S100A8-Expression, eindringende Organismen zu bekämpfen, ohne dass es zu einer Schädigung durch überschießende Abwehrreaktionen kommt. Der synergistische Effekt von LPS und Dexamethason auf die S100A8-Expression könnte bei der durch gram-negative Bakterien ausgelösten Sepsis, bei der hohe endogene Kortikoidkonzentrationen und Endotoxinspiegel zu finden sind, jedoch eine wichtige Rolle spielen. Abhängig von seiner Lokalisation, der intrazellulären Konzentration und der Expression kann S100A8 also pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen.

S-Curvularin ist auch in einem akuten Inflammationsmodell in der Lage, die LPS-induzierte iNOS-Expression deutlich zu reduzieren. Die mRNA-Expression von S100A8 konnte in der Milz signifikant, in PBMCs und der Leber tendenziell durch S-Curvularin gehemmt werden. Dabei waren die von S-Curvularin vermittelten Effekte mit den Veränderungen durch Dexamethason vergleichbar. Die einzige Ausnahme ist bei der mRNA-Analyse in der Milz zu finden, in der das Glukokortikoid keine oder eine induzierende Wirkung auf die iNOS- und S100A8-mRNA-Expression ausübt. Über welche Signaltransduktionswege die Wirkung von

S-Curvularin in diesem Modell vermittelt wird, muss noch genauer untersucht werden. Da sowohl der iNOS- als auch der S100A8-Promotor Bindungsstellen für NF- κ B und AP-1 enthalten, ist eine Regulation über diese Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich.

IX. Zusammenfassung

An der Entwicklung und Aufrechterhaltung chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) ist die Fehlregulation verschiedener pro-inflammatorischer Gene von entscheidender Bedeutung. Bei der RA führt unter anderem eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zu einer gesteigerten NO-Produktion, was schließlich zum Knochenabbau beiträgt. Für eine Therapie der RA werden häufig Glukokortikoide eingesetzt, die jedoch viele Nebenwirkungen zeigen. Um eine mögliche Therapiealternative zu identifizieren, sollten die Effekte des anti-inflammatorisch wirksamen Pilzmetaboliten S-Curvularin in verschiedenen Modellen der RA analysiert werden.

In humanen C-28/I2-Chondrozyten als *in vitro*-Modell der RA führte die Inkubation mit einem Zytokingemisch zu einer Induktion der iNOS-Expression, die vom chondrogenen Differenzierungsgrad der Zellen abhängig war. Entscheidend für die iNOS-Induktion in C-28/I2-Zellen ist hauptsächlich der p38-MAPK-, der JAK-STAT- und der NF- κ B-Signaltransduktionsweg. Eine Inkubation der Zellen mit S-Curvularin führte zu einer deutlichen Hemmung der iNOS-Expression. Dexamethason hatte hingegen keinen Effekt auf die iNOS-Expression, was vermutlich auf die fehlende Expression der Glukokortikoidrezeptor-mRNA zurückgeführt werden kann. Daher können von S-Curvularin abgeleitete Pharmaka möglicherweise auch in Fällen einer Steroidresistenz zur Therapie von RA-Patienten zum Einsatz kommen.

Im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis konnte die anti-inflammatorische Wirkung von S-Curvularin auf mehreren Ebenen bestätigt werden. Die Pilzsubstanz reduzierte sowohl die Schwellung der Pfoten als auch die Expression CII-induzierter pro-inflammatorischer Gene, wie z.B. S100A8, Defb6, Camp und Mpo. Dabei waren die Effekte von S-Curvularin meist deutlicher als in Dexamethason-behandelten Mäusen. Die Analyse von Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-1 β) und Chemokinen (z.B. MCP-1, MIP-1 α) zeigte, dass die CII-induzierte Expression dieser pro-inflammatorischen Mediatoren in den Pfoten der Mäuse durch eine Therapie mit S-Curvularin und Dexamethason wieder reduziert werden konnte, wobei Unterschiede zwischen den Behandlungen beobachtet werden konnte.

Auch im Tiermodell der LPS-induzierten akuten Entzündung wurde die iNOS- und die S100A8-Expression in verschiedenen Geweben S-Curvularin reduziert.

S-Curvularin ist also in der Lage, in verschiedenen Modellen der RA und im akuten Entzündungsmodell die pro-inflammatorische Genexpression effizient zu hemmen und könnte somit in Zukunft eine Rolle in der Therapie der RA einnehmen.

Summary

Dysregulation of the expression of several pro-inflammatory genes is involved in the development and progression of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA). In RA, enhanced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) leads to inappropriate NO production and thereby contributes to joint destruction. Glucocorticoids often used for the treatment of RA, display severe side effects. To identify new possibilities for RA therapy, the effects of the anti-inflammatory fungal compound S-Curvularin was analyzed in different models of RA.

In human C-28/I2 chondrocytes, used as an in vitro model of RA, incubation with a cytokine mixture induced iNOS expression, which was dependent on chondrogenic differentiation. Activation of the p38-MAPK, JAK-STAT1 α and NF- κ B pathway was essential for iNOS induction in C-28/I2 cells. Incubation of the cells with S-Curvularin significantly reduced iNOS expression. Dexamethasone had no effect on iNOS expression which may be due to the absence of the glucocorticoid receptor mRNA. Therefore, pharmaceuticals derived from S-Curvularin may possibly be used in cases of steroid resistance for the treatment of RA patients.

In the animal model of collagen-induced arthritis, the anti-inflammatory properties of S-Curvularin could be confirmed on different levels. The fungal compound was able to reduce the swelling of the paws as well as the expression of collagen-induced pro-inflammatory genes such as S100A8, Defb6, Camp and Mpo. Thereby, the effects of S-Curvularin were more pronounced as in dexamethasone treated mice. Analysis of cytokines (e.g. TNF- α , IL-1 β) and chemokines (e.g. MCP-1, MIP-1 α) revealed that collagen-induced expression of these pro-inflammatory mediators were reduced after treatment with S-Curvularin and Dexamethason in the paws, whereas differences between both treatments could be observed.

Also in the animal model of LPS-induced acute inflammation, iNOS and S100A8 expression was decreased in different tissues after treatment with S-Curvularin.

In conclusion, S-Curvularin has the ability to inhibit pro-inflammatory gene expression efficiently in different models of RA and in acute inflammation. In future, S-Curvularin could play an important role in RA therapy.

X. Literaturverzeichnis

- (1954) A COMPARISON of cortisone and aspirin in the treatment of early cases of rheumatoid arthritis; a report by the Joint Committee of the Medical Research Council and Nuffield Foundation on Clinical Trials of Cortisone, A.C.T.H., and Other Therapeutic Measures in Chronic Rheumatic Diseases. *Br Med J* **1**(4873):1223-1227.
- (1959) A COMPARISON of prednisolone with aspirin on other analgesics in the treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **18**:173-188.
- Adcock, IM, Shirasaki, H, Gelder, CM, Peters, MJ, Brown, CR and Barnes, PJ (1994) The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. *Life sciences* **55**(14):1147-1153.
- Afuwape, AO, Kiriakidis, S and Paleolog, EM (2002) The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histology and histopathology* **17**(3):961-972.
- Aigner, T, Hemmel, M, Neureiter, D, Gebhard, PM, Zeiler, G, Kirchner, T and McKenna, L (2001a) Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis and rheumatism* **44**(6):1304-1312.
- Aigner, T, Zien, A, Gehrsitz, A, Gebhard, PM and McKenna, L (2001b) Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis and rheumatism* **44**(12):2777-2789.
- Akahoshi, T, Wada, C, Endo, H, Hirota, K, Hosaka, S, Takagishi, K, Kondo, H, Kashiwazaki, S and Matsushima, K (1993) Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis and rheumatism* **36**(6):762-771.
- Alamanos, Y and Drosos, AA (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* **4**(3):130-136.
- Almawi, WY and Melemedjian, OK (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *Journal of leukocyte biology* **71**(1):9-15.
- Alonzi, T, Fattori, E, Lazzaro, D, Costa, P, Probert, L, Kollias, G, De Benedetti, F, Poli, V and Ciliberto, G (1998) Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* **187**(4):461-468.
- Anderson, G, Lane, PJ and Jenkinson, EJ (2007) Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* **7**(12):954-963.
- Aschenbrenner, K, D'Cruz, LM, Vollmann, EH, Hinterberger, M, Emmerich, J, Swee, LK, Rolink, A and Klein, L (2007) Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* **8**(4):351-358.
- Bagasra, O, Michaels, FH, Zheng, YM, Bobroski, LE, Spitsin, SV, Fu, ZF, Tawadros, R and Koprowski, H (1995) Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26):12041-12045.
- Bakker, NP, van Erck, MG, Zurcher, C, Faaber, P, Lemmens, A, Hazenberg, M, Bontrop, RE and Jonker, M (1990) Experimental immune mediated arthritis in rhesus monkeys. A model for human rheumatoid arthritis? *Rheumatology international* **10**(1):21-29.
- Bandaletova, T, Brouet, I, Bartsch, H, Sugimura, T, Esumi, H and Ohshima, H (1993) Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide. *Apmis* **101**(4):330-336.
- Barnes, PJ (1995) Nitric oxide and airway disease. *Annals of medicine* **27**(3):389-393.
- Barnes, PJ (1996a) NO or no NO in asthma? *Thorax* **51**(2):218-220.
- Barnes, PJ (1996b) Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* **42**(1):3-10.

- Barnes, PJ and Adcock, IM (1998) Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* **12**(1):221-234.
- Barnes, PJ and Adcock, IM (2003) How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* **139**(5 Pt 1):359-370.
- Bashirullah, A, Cooperstock, RL and Lipshitz, HD (2001) Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13):7025-7028.
- Becker, EL (1972) The relationship of the chemotactic behavior of the complement-derived factors, C3a, C5a, and C567, and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase 1 of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **135**(2):376-387.
- Bertolini, DR, Nedwin, GE, Bringman, TS, Smith, DD and Mundy, GR (1986) Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* **319**(6053):516-518.
- Bickel, M, Cohen, RB and Pluznik, DH (1990) Post-transcriptional regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis in murine T cells. *J Immunol* **145**(3):840-845.
- Bijlsma, JW, Boers, M, Saag, KG and Furst, DE (2003) Glucocorticoids in the treatment of early and late RA. *Annals of the rheumatic diseases* **62**(11):1033-1037.
- Blanco, FJ, Geng, Y and Lotz, M (1995a) Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* **154**(8):4018-4026.
- Blanco, FJ, Ochs, RL, Schwarz, H and Lotz, M (1995b) Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *The American journal of pathology* **146**(1):75-85.
- Blumberg, SN and Fox, DA (2001) Rheumatoid arthritis: guidelines for emerging therapies. *The American journal of managed care* **7**(6):617-626.
- Boers, M, Verhoeven, AC, Markusse, HM, van de Laar, MA, Westhovens, R, *et al.* (1997) Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet* **350**(9074):309-318.
- Bogdan, C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**(10):907-916.
- Bogdan, C, Vodovotz, Y, Paik, J, Xie, QW and Nathan, C (1994) Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *Journal of leukocyte biology* **55**(2):227-233.
- Bohlinger, I, Leist, M, Barsig, J, Uhlig, S, Tiegs, G and Wendel, A (1995) Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* **22**(6):1829-1837.
- Bonaventure, J, Kadhom, N, Cohen-Solal, L, Ng, KH, Bourguignon, J, Lasselin, C and Freisinger, P (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Experimental cell research* **212**(1):97-104.
- Borzi, RM, Mazzetti, I, Cattini, L, Uguccioni, M, Baggiolini, M and Facchini, A (2000) Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to C-X-C and C-C chemokines. *Arthritis and rheumatism* **43**(8):1734-1741.
- Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**:248-254.
- Bredt, DS and Snyder, SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2):682-685.
- Brennan, CM and Steitz, JA (2001) HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**(2):266-277.
- Brennan, FM, Zachariae, CO, Chantry, D, Larsen, CG, Turner, M, Maini, RN, Matsushima, K and Feldmann, M (1990) Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *European journal of immunology* **20**(9):2141-2144.

- Bresnihan, B, Alvaro-Gracia, JM, Cobby, M, Doherty, M, Domljan, Z, *et al.* (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis and rheumatism* **41**(12):2196-2204.
- Bruch-Gerharz, D, Schnorr, O, Suschek, C, Beck, KF, Pfeilschifter, J, Ruzicka, T and Kolb-Bachofen, V (2003) Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *The American journal of pathology* **162**(1):203-211.
- Brun, JG, Cuida, M, Jacobsen, H, Kloster, R, Johannesen, AC, Hoyeraal, HM and Jonsson, R (1994) Sjogren's syndrome in inflammatory rheumatic diseases: analysis of the leukocyte protein calprotectin in plasma and saliva. *Scandinavian journal of rheumatology* **23**(3):114-118.
- Buchan, G, Barrett, K, Fujita, T, Taniguchi, T, Maini, R and Feldmann, M (1988) Detection of activated T cell products in the rheumatoid joint using cDNA probes to Interleukin-2 (IL-2) IL-2 receptor and IFN-gamma. *Clin Exp Immunol* **71**(2):295-301.
- Burnette, WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112**(2):195-203.
- Butler, DM, Malfait, AM, Mason, LJ, Warden, PJ, Kollias, G, Maini, RN, Feldmann, M and Brennan, FM (1997) DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol* **159**(6):2867-2876.
- Caelles, C, Gonzalez-Sancho, JM and Munoz, A (1997) Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* **11**(24):3351-3364.
- Caivano, M (1998) Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. *FEBS Lett* **429**(3):249-253.
- Caldenhoven, E, Liden, J, Wissink, S, Van de Stolpe, A, Raaijmakers, J, Koenderman, L, Okret, S, Gustafsson, JA and Van der Saag, PT (1995) Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **9**(4):401-412.
- Callahan, LF and Pincus, T (1995) Mortality in the rheumatic diseases. *Arthritis Care Res* **8**(4):229-241.
- Canter, JW and Shorb, PE, Jr. (1971) Acute perforation of colonic diverticula associated with prolonged adrenocorticosteroid therapy. *Am J Surg* **121**(1):46-51.
- Cao, M, Westerhausen-Larson, A, Niyibizi, C, Kavalkovich, K, Georgescu, HI, Rizzo, CF, Hebda, PA, Stefanovic-Racic, M and Evans, CH (1997) Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *The Biochemical journal* **324** (Pt 1):305-310.
- Caput, D, Beutler, B, Hartog, K, Thayer, R, Brown-Shimer, S and Cerami, A (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6):1670-1674.
- Carballo, E, Lai, WS and Blakeshear, PJ (1998) Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* **281**(5379):1001-1005.
- Carballo, E, Lai, WS and Blakeshear, PJ (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* **95**(6):1891-1899.
- Cathcart, ES, Hayes, KC, Gonnerman, WA, Lazzari, AA and Franzblau, C (1986) Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **54**(1):26-31.
- Cetkovic-Cvrlje, M, Sandler, S and Eizirik, DL (1993) Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1-induced nitric oxide production by RINm5F cells without decreasing messenger ribonucleic acid expression for nitric oxide synthase. *Endocrinology* **133**(4):1739-1743.

- Chan, SH, Perussia, B, Gupta, JW, Kobayashi, M, Pospisil, M, *et al.* (1991) Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* **173**(4):869-879.
- Charles, IG, Palmer, RM, Hickery, MS, Bayliss, MT, Chubb, AP, Hall, VS, Moss, DW and Moncada, S (1993) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23):11419-11423.
- Chen, CY, Gherzi, R, Ong, SE, Chan, EL, Raijmakers, R, *et al.* (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**(4):451-464.
- Chinje, EC and Stratford, IJ (1997) Role of nitric oxide in growth of solid tumours: a balancing act. *Essays Biochem* **32**:61-72.
- Cho, HJ, Xie, QW, Calaycay, J, Mumford, RA, Swiderek, KM, Lee, TD and Nathan, C (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* **176**(2):599-604.
- Chomczynski, P and Sacchi, N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**(1):156-159.
- Chu, SC, Marks-Konczalik, J, Wu, HP, Banks, TC and Moss, J (1998) Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3):871-878.
- Chubinskaya, S, Huch, K, Schulze, M, Otten, L, Aydelotte, MB and Cole, AA (2001) Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J Histochem Cytochem* **49**(10):1211-1220.
- Clancy, RM, Abramson, SB, Kohne, C and Rediske, J (1997) Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. *J Cell Physiol* **172**(2):183-191.
- Clancy, RM, Amin, AR and Abramson, SB (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis and rheumatism* **41**(7):1141-1151.
- Clark, AR, Dean, JL and Saklatvala, J (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett* **546**(1):37-44.
- Connor, JR, Manning, PT, Settle, SL, Moore, WM, Jerome, GM, Webber, RK, Tjoeng, FS and Currie, MG (1995) Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **273**(1-2):15-24.
- Cope, AP (1998) Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Current opinion in immunology* **10**(6):669-676.
- Corbett, JA, Wang, JL, Sweetland, MA, Lancaster, JR, Jr. and McDaniel, ML (1992) Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. *J Clin Invest* **90**(6):2384-2391.
- Cornish, CJ, Devery, JM, Poronnik, P, Lackmann, M, Cook, DI and Geczy, CL (1996) S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation. *J Cell Physiol* **166**(2):427-437.
- Courtenay, JS, Dallman, MJ, Dayan, AD, Martin, A and Mosedale, B (1980) Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* **283**(5748):666-668.
- Cremer, MA, Rosloniec, EF and Kang, AH (1998) The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* **76**(3-4):275-288.
- Cunha, FQ, Moncada, S and Liew, FY (1992) Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **182**(3):1155-1159.
- Cush, JJ, Splawski, JB, Thomas, R, McFarlin, JE, Schulze-Koops, H, Davis, LS, Fujita, K and Lipsky, PE (1995) Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **38**(1):96-104.

- Cuzzocrea, S (2006) Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. *Curr Pharm Des* **12**(27):3551-3570.
- Da Silva, J, Pierrat, B, Mary, JL and Lesslauer, W (1997) Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* **272**(45):28373-28380.
- Daniliuc, S, Bitterman, H, Rahat, MA, Kinarty, A, Rosenzweig, D and Lahat, N (2003) Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin 4. *J Immunol* **171**(6):3225-3232.
- Dayer, JM (2003) The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* **42 Suppl 2**:ii3-10.
- Dayer, JM, Beutler, B and Cerami, A (1985) Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* **162**(6):2163-2168.
- De Ceuninck, F, Allain, F, Caliez, A, Spik, G and Vanhoutte, PM (2003) High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**(8):2197-2206.
- De Groot, CJ, Ruuls, SR, Theeuwes, JW, Dijkstra, CD and Van der Valk, P (1997) Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(1):10-20.
- de Vera, ME, Shapiro, RA, Nussler, AK, Mudgett, JS, Simmons, RL, Morris, SM, Jr., Billiar, TR and Geller, DA (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3):1054-1059.
- De Vera, ME, Taylor, BS, Wang, Q, Shapiro, RA, Billiar, TR and Geller, DA (1997) Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B. *Am J Physiol* **273**(6 Pt 1):G1290-1296.
- De, Y, Chen, Q, Schmidt, AP, Anderson, GM, Wang, JM, Wooters, J, Oppenheim, JJ and Chertov, O (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* **192**(7):1069-1074.
- Dean, JL, Wait, R, Mahtani, KR, Sully, G, Clark, AR and Saklatvala, J (2001) The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Molecular and cellular biology* **21**(3):721-730.
- Dinarello, CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine & growth factor reviews* **8**(4):253-265.
- Doi, M, Shichiri, M, Katsuyama, K, Ishimaru, S and Hirata, Y (2002) Cytokine-activated Jak-2 is involved in inducible nitric oxide synthase expression independent from NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **160**(1):123-132.
- Dong, Z, Qi, X, Xie, K and Fidler, IJ (1993) Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *J Immunol* **151**(5):2717-2724.
- Dostert, A and Heinzl, T (2004) Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* **10**(23):2807-2816.
- Eberhardt, W, Pluss, C, Hummel, R and Pfeilschifter, J (1998) Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1beta and cAMP in rat mesangial cells. *J Immunol* **160**(10):4961-4969.
- Elenkov, IJ and Chrousos, GP (2002) Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* **966**:290-303.
- Elliott, MJ, Maini, RN, Feldmann, M, Long-Fox, A, Charles, P, et al. (1993) Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis and rheumatism* **36**(12):1681-1690.

- Farrell, AJ, Blake, DR, Palmer, RM and Moncada, S (1992) Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases* **51**(11):1219-1222.
- Fechir, M, Linker, K, Pautz, A, Hubrich, T, Forstermann, U, Rodriguez-Pascual, F and Kleinert, H (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* **67**(6):2148-2161.
- Feldmann, M (1996) What is the mechanism of action of anti-tumour necrosis factor-alpha antibody in rheumatoid arthritis? *International archives of allergy and immunology* **111**(4):362-365.
- Feldmann, M, Brennan, FM and Maini, R (1998) Cytokines in autoimmune disorders. *International reviews of immunology* **17**(1-4):217-228.
- Feldmann, M, Brennan, FM and Maini, RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **14**:397-440.
- Feldmann, M, Brennan, FM, Williams, RO, Cope, AP, Gibbons, DL, Katsikis, PD and Maini, RN (1992) Evaluation of the role of cytokines in autoimmune disease: the importance of TNF alpha in rheumatoid arthritis. *Progress in growth factor research* **4**(3):247-255.
- Feldmann, M and Maini, RN (1999) The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* **38 Suppl 2**:3-7.
- Feldmann, M and Maini, RN (2001) Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* **19**:163-196.
- Felley-Bosco, E, Bender, FC, Courjault-Gautier, F, Bron, C and Quest, AF (2000) Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26):14334-14339.
- Finger, F, Schorle, C, Zien, A, Gebhard, P, Goldring, MB and Aigner, T (2003) Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis and rheumatism* **48**(12):3395-3403.
- Firestein, GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**(6937):356-361.
- Foell, D, Frosch, M, Sorg, C and Roth, J (2004) Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta* **344**(1-2):37-51.
- Forstermann, U (1994) Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung* **44**(3A):402-407.
- Forstermann, U and Kleinert, H (1995a) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**(4):351-364.
- Forstermann, U, Kleinert, H, Gath, I, Schwarz, P, Closs, EI and Dun, NJ (1995b) Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. *Adv Pharmacol* **34**:171-186.
- Forstermann, U, Pollock, JS, Schmidt, HH, Heller, M and Murad, F (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(5):1788-1792.
- Forstermann, U, Schmidt, HH, Kohlhaas, KL and Murad, F (1992) Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: inhibition by transforming growth factor-beta. *Eur J Pharmacol* **225**(2):161-165.
- Frank, S, Madlener, M, Pfeilschifter, J and Werner, S (1998) Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* **111**(6):1058-1064.
- Frosch, M, Strey, A, Vogl, T, Wulffraat, NM, Kuis, W, Sunderkotter, C, Harms, E, Sorg, C and Roth, J (2000) Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **43**(3):628-637.
- Gabriel, SE, Crowson, CS and O'Fallon, WM (1999) Mortality in rheumatoid arthritis: have we made an impact in 4 decades? *The Journal of rheumatology* **26**(12):2529-2533.

- Gabriel, SE, Jaakkimainen, L and Bombardier, C (1991) Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Ann Intern Med* **115**(10):787-796.
- Galea, E, Reis, DJ and Feinstein, DL (1994) Cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from rat astrocytes. *Journal of neuroscience research* **37**(3):406-414.
- Gallegos, AM and Bevan, MJ (2004) Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* **200**(8):1039-1049.
- Ganster, RW, Taylor, BS, Shao, L and Geller, DA (2001) Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15):8638-8643.
- Geller, DA and Billiar, TR (1998) Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* **17**(1):7-23.
- Geller, DA, Lowenstein, CJ, Shapiro, RA, Nussler, AK, Di Silvio, M, *et al.* (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8):3491-3495.
- Geng, Y and Lotz, M (1995) Increased intracellular Ca²⁺ selectively suppresses IL-1-induced NO production by reducing iNOS mRNA stability. *J Cell Biol* **129**(6):1651-1657.
- Germann, T, Szeliga, J, Hess, H, Storkel, S, Podlaski, FJ, Gately, MK, Schmitt, E and Rude, E (1995) Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11):4823-4827.
- Gherzi, R, Lee, KY, Briata, P, Wegmuller, D, Moroni, C, Karin, M and Chen, CY (2004) A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Molecular cell* **14**(5):571-583.
- Ghosh, S, May, MJ and Kopp, EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**:225-260.
- Gilbert, RS and Herschman, HR (1993) "Macrophage" nitric oxide synthase is a glucocorticoid-inhibitable primary response gene in 3T3 cells. *J Cell Physiol* **157**(1):128-132.
- Goebeler, M, Roth, J, Burwinkel, F, Vollmer, E, Bocker, W and Sorg, C (1994) Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection. *Transplantation* **58**(3):355-361.
- Goldring, MB and Berenbaum, F (2004) The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clinical orthopaedics and related research*(427 Suppl):S37-46.
- Goldring, MB, Birkhead, JR, Suen, LF, Yamin, R, Mizuno, S, Glowacki, J, Arbisser, JL and Apperley, JF (1994) Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* **94**(6):2307-2316.
- Goldring, MB and Goldring, SR (2007) Osteoarthritis. *J Cell Physiol* **213**(3):626-634.
- Goldring, MB, Tsuchimochi, K and Ijiri, K (2006) The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry* **97**(1):33-44.
- Gonzalez-Cuadrado, S, Bustos, C, Ruiz-Ortega, M, Ortiz, A, Guizarro, C, Plaza, JJ and Egido, J (1996) Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol* **106**(3):518-522.
- Gough, AK, Lilley, J, Eyre, S, Holder, RL and Emery, P (1994) Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**(8914):23-27.
- Grant, EP, Picarella, D, Burwell, T, Delaney, T, Croci, A, *et al.* (2002) Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J Exp Med* **196**(11):1461-1471.
- Green, SJ, Mellouk, S, Hoffman, SL, Meltzer, MS and Nacy, CA (1990a) Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett* **25**(1-3):15-19.
- Green, SJ, Meltzer, MS, Hibbs, JB, Jr. and Nacy, CA (1990b) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* **144**(1):278-283.

- Guan, Z, Baier, LD and Morrison, AR (1997) p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E2 biosynthesis stimulated by interleukin-1beta. *J Biol Chem* **272**(12):8083-8089.
- Guedez, YB, Whittington, KB, Clayton, JL, Joosten, LA, van de Loo, FA, van den Berg, WB and Rosloniec, EF (2001) Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis and rheumatism* **44**(10):2413-2424.
- Guhaniyogi, J and Brewer, G (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**(1-2):11-23.
- Guo, FH, De Raeve, HR, Rice, TW, Stuehr, DJ, Thunnissen, FB and Erzurum, SC (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17):7809-7813.
- Hall, GM, Spector, TD, Griffin, AJ, Jawad, AS, Hall, ML and Doyle, DV (1993) The effect of rheumatoid arthritis and steroid therapy on bone density in postmenopausal women. *Arthritis and rheumatism* **36**(11):1510-1516.
- Hamid, Q, Springall, DR, Riveros-Moreno, V, Chanez, P, Howarth, P, *et al.* (1993) Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* **342**(8886-8887):1510-1513.
- Hamilton, CD (2004) Infectious complications of treatment with biologic agents. *Current opinion in rheumatology* **16**(4):393-398.
- Harbrecht, BG, Wu, B, Watkins, SC, Billiar, TR and Peitzman, AB (1997) Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock* **8**(6):415-421.
- Harder, J, Meyer-Hoffert, U, Teran, LM, Schwichtenberg, L, Bartels, J, Maune, S and Schroder, JM (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**(6):714-721.
- Harigai, M, Hara, M, Yoshimura, T, Leonard, EJ, Inoue, K and Kashiwazaki, S (1993) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clinical immunology and immunopathology* **69**(1):83-91.
- Harris, ED, Jr. (1990) Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* **322**(18):1277-1289.
- Harrison, JE and Schultz, J (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* **251**(5):1371-1374.
- Haugeberg, G, Uhlig, T, Falch, JA, Halse, JI and Kvien, TK (2000) Bone mineral density and frequency of osteoporosis in female patients with rheumatoid arthritis: results from 394 patients in the Oslo County Rheumatoid Arthritis register. *Arthritis and rheumatism* **43**(3):522-530.
- Hauselmann, HJ, Aydelotte, MB, Schumacher, BL, Kuettner, KE, Gitelis, SH and Thonar, EJ (1992) Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix (Stuttgart, Germany)* **12**(2):116-129.
- Hauselmann, HJ, Oppliger, L, Michel, BA, Stefanovic-Racic, M and Evans, CH (1994) Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett* **352**(3):361-364.
- Hausladen, A and Stamler, JS (1998) Nitric oxide in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18):10345-10347.
- Haworth, C, Brennan, FM, Chantry, D, Turner, M, Maini, RN and Feldmann, M (1991) Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology* **21**(10):2575-2579.
- Hevel, JM, White, KA and Marletta, MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* **266**(34):22789-22791.
- Heyland, J, Wiegandt, K, Goepfert, C, Nagel-Heyer, S, Ilinich, E, Schumacher, U and Portner, R (2006) Redifferentiation of chondrocytes and cartilage formation under intermittent hydrostatic pressure. *Biotechnology letters* **28**(20):1641-1648.

- Hinz, B, Brune, K and Pahl, A (2000) Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **271**(2):353-357.
- Hirai, Y, Migita, K, Honda, S, Ueki, Y, Yamasaki, S, *et al.* (2001) Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life sciences* **68**(8):913-920.
- Hirano, T, Matsuda, T, Turner, M, Miyasaka, N, Buchan, G, *et al.* (1988) Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *European journal of immunology* **18**(11):1797-1801.
- Hogquist, KA, Baldwin, TA and Jameson, SC (2005) Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* **5**(10):772-782.
- Holloway, AF, Rao, S and Shannon, MF (2002) Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol* **38**(8):567-580.
- Holmdahl, R, Jansson, L, Larsson, E, Rubin, K and Klareskog, L (1986) Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis and rheumatism* **29**(1):106-113.
- Hortelano, S, Genaro, AM and Bosca, L (1993) Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Lett* **320**(2):135-139.
- Hosaka, S, Akahoshi, T, Wada, C and Kondo, H (1994) Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **97**(3):451-457.
- Hsu, K, Passey, RJ, Endoh, Y, Rahimi, F, Youssef, P, Yen, T and Geczy, CL (2005) Regulation of S100A8 by glucocorticoids. *J Immunol* **174**(4):2318-2326.
- Hu, SP, Harrison, C, Xu, K, Cornish, CJ and Geczy, CL (1996) Induction of the chemotactic S100 protein, CP-10, in monocyte/macrophages by lipopolysaccharide. *Blood* **87**(9):3919-3928.
- Iikuni, N, Okamoto, H, Yoshio, T, Sato, E, Kamitsuji, S, *et al.* (2006) Raised monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)/CCL2 in cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *Annals of the rheumatic diseases* **65**(2):253-256.
- Iwamoto, T, Okamoto, H, Kobayashi, S, Ikari, K, Toyama, Y, Tomatsu, T, Kamatani, N and Momohara, S (2007) A role of monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 from chondrocytes in rheumatoid arthritis. *The FEBS journal* **274**(18):4904-4912.
- Jackson, SH, Beevers, DG and Myers, K (1981) Does long-term low-dose corticosteroid therapy cause hypertension? *Clin Sci (Lond)* **61 Suppl 7**:381s-383s.
- Jansen, RP (2001) mRNA localization: message on the move. *Nature reviews* **2**(4):247-256.
- Jasin, HE (1985) Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* **28**(3):241-248.
- Ji, H, Gauguier, D, Ohmura, K, Gonzalez, A, Duchatelle, V, *et al.* (2001) Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis. *J Exp Med* **194**(3):321-330.
- Jiang, W, Anderson, MS, Bronson, R, Mathis, D and Benoist, C (2005) Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J Exp Med* **202**(6):805-815.
- Johansson, AC, Sundler, M, Kjellen, P, Johannesson, M, Cook, A, *et al.* (2001) Genetic control of collagen-induced arthritis in a cross with NOD and C57BL/10 mice is dependent on gene regions encoding complement factor 5 and FcγRIIIb and is not associated with loci controlling diabetes. *European journal of immunology* **31**(6):1847-1856.
- Jonat, C, Rahmsdorf, HJ, Park, KK, Cato, AC, Gebel, S, Ponta, H and Herrlich, P (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**(6):1189-1204.
- Joosten, LA, Helsen, MM, Saxne, T, van De Loo, FA, Heinegard, D and van Den Berg, WB (1999) IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* **163**(9):5049-5055.
- Joosten, LA, Lubberts, E, Helsen, MM and van den Berg, WB (1997) Dual role of IL-12 in early and late stages of murine collagen type II arthritis. *J Immunol* **159**(8):4094-4102.

- Joosten, LA, Netea, MG, Kim, SH, Yoon, DY, Oppers-Walgreen, B, *et al.* (2006) IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9):3298-3303.
- Kalbak, K (1972) Incidence of arteriosclerosis in patients with rheumatoid arthritis receiving long-term corticosteroid therapy. *Annals of the rheumatic diseases* **31**(3):196-200.
- Kanbe, K, Takagishi, K and Chen, Q (2002) Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis and rheumatism* **46**(1):130-137.
- Kane, D, Roth, J, Frosch, M, Vogl, T, Bresnihan, B and FitzGerald, O (2003) Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**(6):1676-1685.
- Karin, M (1998) New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* **93**(4):487-490.
- Karupiah, G and Harris, N (1995) Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J Exp Med* **181**(6):2171-2179.
- Kasama, T, Strieter, RM, Lukacs, NW, Lincoln, PM, Burdick, MD and Kunkel, SL (1995) Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* **95**(6):2868-2876.
- Katsikis, PD, Chu, CQ, Brennan, FM, Maini, RN and Feldmann, M (1994) Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* **179**(5):1517-1527.
- Kaur, H and Halliwell, B (1994) Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* **350**(1):9-12.
- Kavanaugh, A (2002) Combination cytokine therapy: the next generation of rheumatoid arthritis therapy? *Arthritis and rheumatism* **47**(1):87-92.
- Kerkhoff, C, Klempt, M and Sorg, C (1998) Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochimica et biophysica acta* **1448**(2):200-211.
- Kimura, H, Hokari, R, Miura, S, Shigematsu, T, Hirokawa, M, *et al.* (1998) Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* **42**(2):180-187.
- Kirwan, JR (1995) The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N Engl J Med* **333**(3):142-146.
- Kishimoto, T (2005) Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* **23**:1-21.
- Kitamura, Y, Takahashi, H, Nomura, Y and Taniguchi, T (1996) Possible involvement of Janus kinase Jak2 in interferon-gamma induction of nitric oxide synthase in rat glial cells. *Eur J Pharmacol* **306**(1-3):297-306.
- Klareskog, L, van der Heijde, D, de Jager, JP, Gough, A, Kalden, J, *et al.* (2004) Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* **363**(9410):675-681.
- Kleinert, H, Euchenhofer, C, Fritz, G, Ihrig-Biedert, I and Forstermann, U (1998a) Involvement of protein kinases in the induction of NO synthase II in human DLD-1 cells. *British journal of pharmacology* **123**(8):1716-1722.
- Kleinert, H, Euchenhofer, C, Ihrig-Biedert, I and Forstermann, U (1996a) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* **49**(1):15-21.
- Kleinert, H, Euchenhofer, C, Ihrig-Biedert, I and Forstermann, U (1996b) In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* **271**(11):6039-6044.

- Kleinert, H, Pautz, A, Linker, K and Schwarz, PM (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **500**(1-3):255-266.
- Kleinert, H, Schwarz, PM and Forstermann, U (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* **384**(10-11):1343-1364.
- Kleinert, H, Wallerath, T, Euchenhofer, C, Ihrig-Biedert, I, Li, H and Forstermann, U (1998b) Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* **31**(2):582-588.
- Kobzik, L, Bredt, DS, Lowenstein, CJ, Drazen, J, Gaston, B, Sugarbaker, D and Stamler, JS (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* **9**(4):371-377.
- Koch, AE, Kunkel, SL, Harlow, LA, Johnson, B, Evanoff, HL, Haines, GK, Burdick, MD, Pope, RM and Strieter, RM (1992) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **90**(3):772-779.
- Koch, AE, Kunkel, SL, Harlow, LA, Mazarakis, DD, Haines, GK, Burdick, MD, Pope, RM and Strieter, RM (1994) Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **93**(3):921-928.
- Koide, M, Kawahara, Y, Nakayama, I, Tsuda, T and Yokoyama, M (1993) Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* **268**(33):24959-24966.
- Kolb-Bachofen, V (1996) Intraislet expression of inducible nitric oxide synthase and islet cell death. *Biochem Soc Trans* **24**(1):233-234.
- Kolb, H and Kolb-Bachofen, V (1992) Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia* **35**(8):796-797.
- Korb, A, Tohidast-Akrad, M, Cetin, E, Axmann, R, Smolen, J and Schett, G (2006) Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **54**(9):2745-2756.
- Korhonen, R, Lahti, A, Hamalainen, M, Kankaanranta, H and Moilanen, E (2002) Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol* **62**(3):698-704.
- Kotake, S, Udagawa, N, Takahashi, N, Matsuzaki, K, Itoh, K, *et al.* (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* **103**(9):1345-1352.
- Kracht, M and Saklatvala, J (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* **20**(3):91-106.
- Kremer, JM, Genovese, MC, Cannon, GW, Caldwell, JR, Cush, JJ, *et al.* (2002) Concomitant leflunomide therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **137**(9):726-733.
- Kroncke, KD, Fehsel, K and Kolb-Bachofen, V (1995) Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(6):327-343.
- Kroncke, KD, Fehsel, K and Kolb-Bachofen, V (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* **113**(2):147-156.
- Kunz, D, Walker, G, Eberhardt, W, Messmer, UK, Huwiler, A and Pfeilschifter, J (1997) Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially regulate interleukin 1beta- and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *J Clin Invest* **100**(11):2800-2809.
- Kunz, D, Walker, G, Eberhardt, W and Pfeilschifter, J (1996) Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1):255-259.
- Kuroda, N, Mitani, T, Takeda, N, Ishimaru, N, Arakaki, R, *et al.* (2005) Development of autoimmunity against transcriptionally unrepresed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* **174**(4):1862-1870.

- Kyewski, B and Klein, L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* **24**:571-606.
- Laan, RF, Jansen, TL and van Riel, PL (1999) Glucocorticosteroids in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* **38**(1):6-12.
- LaDuca, JR and Gaspari, AA (2001) Targeting tumor necrosis factor alpha. New drugs used to modulate inflammatory diseases. *Dermatol Clin* **19**(4):617-635.
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.
- Lahti, A, Jalonen, U, Kankaanranta, H and Moilanen, E (2003) c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one reduces inducible nitric-oxide synthase expression by destabilizing mRNA in activated macrophages. *Mol Pharmacol* **64**(2):308-315.
- Lander, ES, Linton, LM, Birren, B, Nusbaum, C, Zody, MC, *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822):860-921.
- Landewe, RB, Boers, M, Verhoeven, AC, Westhovens, R, van de Laar, MA, *et al.* (2002) COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention. *Arthritis and rheumatism* **46**(2):347-356.
- Langrehr, JM, Hoffman, RA, Billiar, TR, Lee, KK, Schraut, WH and Simmons, RL (1991) Nitric oxide synthesis in the in vivo allograft response: a possible regulatory mechanism. *Surgery* **110**(2):335-342.
- Larsen, A, Dale, K and Eek, M (1977) Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* **18**(4):481-491.
- Leung, DY and Bloom, JW (2003) Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* **111**(1):3-22; quiz 23.
- Liao, DF, Jin, ZG, Baas, AS, Daum, G, Gygi, SP, Aebersold, R and Berk, BC (2000) Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**(1):189-196.
- Lieberman, P, Patterson, R and Kunske, R (1972) Complications of long-term steroid therapy for asthma. *J Allergy Clin Immunol* **49**(6):329-336.
- Linker, K, Pautz, A, Fechir, M, Hubrich, T, Greeve, J and Kleinert, H (2005) Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic acids research* **33**(15):4813-4827.
- Linn, SC, Morelli, PJ, Edry, I, Cottongim, SE, Szabo, C and Salzman, AL (1997) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol* **272**(6 Pt 1):G1499-1508.
- Linscheid, P, Schaffner, A and Schoedon, G (1998) Modulation of inducible nitric oxide synthase mRNA stability by tetrahydrobiopterin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1):137-141.
- Lipsky, PE, van der Heijde, DM, St Clair, EW, Furst, DE, Breedveld, FC, *et al.* (2000) Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* **343**(22):1594-1602.
- Livak, KJ and Schmittgen, TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* **25**(4):402-408.
- Loeser, RF, Carlson, CS, Del Carlo, M and Cole, A (2002) Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis and rheumatism* **46**(9):2349-2357.
- Loetscher, P, Seitz, M, Clark-Lewis, I, Baggiolini, M and Moser, B (1994) Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Faseb J* **8**(13):1055-1060.
- Londei, M, Savill, CM, Verhoef, A, Brennan, F, Leech, ZA, Duance, V, Maini, RN and Feldmann, M (1989) Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the

- synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2):636-640.
- Lotz, M, Blanco, FJ, von Kempis, J, Dudler, J, Maier, R, Villiger, PM and Geng, Y (1995) Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol Suppl* **43**:104-108.
- Lowenstein, CJ, Alley, EW, Raval, P, Snowman, AM, Snyder, SH, Russell, SW and Murphy, WJ (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20):9730-9734.
- Lukert, BP and Raisz, LG (1990) Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med* **112**(5):352-364.
- Luss, H, Li, RK, Shapiro, RA, Tzeng, E, McGowan, FX, *et al.* (1997) Dedifferentiated human ventricular cardiac myocytes express inducible nitric oxide synthase mRNA but not protein in response to IL-1, TNF, IFNgamma, and LPS. *J Mol Cell Cardiol* **29**(4):1153-1165.
- Lyons, CR, Orloff, GJ and Cunningham, JM (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **267**(9):6370-6374.
- MacKendrick, W, Caplan, M and Hsueh, W (1993) Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. *Pediatr Res* **34**(2):222-228.
- MacMicking, JD, Nathan, C, Hom, G, Chartrain, N, Fletcher, DS, *et al.* (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* **81**(4):641-650.
- MacMicking, JD, North, RJ, LaCourse, R, Mudgett, JS, Shah, SK and Nathan, CF (1997) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10):5243-5248.
- Mais, A, Klein, T, Ullrich, V, Schudt, C and Lauer, G (2006) Prostanoid pattern and iNOS expression during chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* **98**(4):798-809.
- Maki-Petaja, KM, Cheriyan, J, Booth, AD, Hall, FC, Brown, J, Wallace, SM, Ashby, MJ, McEniery, CM and Wilkinson, IB (2008) Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *International journal of cardiology*.
- Malfait, AM, Butler, DM, Presky, DH, Maini, RN, Brennan, FM and Feldmann, M (1998) Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin Exp Immunol* **111**(2):377-383.
- Manetti, R, Parronchi, P, Giudizi, MG, Piccinni, MP, Maggi, E, Trinchieri, G and Romagnani, S (1993) Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**(4):1199-1204.
- Manolagas, SC and Weinstein, RS (1999) New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* **14**(7):1061-1066.
- Manoury-Schwartz, B, Chiocchia, G, Bessis, N, Abehsira-Amar, O, Batteux, F, Muller, S, Huang, S, Boissier, MC and Fournier, C (1997) High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* **158**(11):5501-5506.
- Maradit-Kremers, H, Nicola, PJ, Crowson, CS, Ballman, KV and Gabriel, SE (2005) Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis and rheumatism* **52**(3):722-732.
- Markewitz, BA, Michael, JR and Kohan, DE (1993) Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *J Clin Invest* **91**(5):2138-2143.
- McCartney-Francis, N, Allen, JB, Mizel, DE, Albina, JE, Xie, QW, Nathan, CF and Wahl, SM (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* **178**(2):749-754.
- McDougall, R, Sibley, J, Haga, M and Russell, A (1994) Outcome in patients with rheumatoid arthritis receiving prednisone compared to matched controls. *The Journal of rheumatology* **21**(7):1207-1213.

- McInnes, IB, Leung, BP, Field, M, Wei, XQ, Huang, FP, *et al.* (1996) Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* **184**(4):1519-1524.
- McMillan, K, Bredt, DS, Hirsch, DJ, Snyder, SH, Clark, JE and Masters, BS (1992) Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23):11141-11145.
- Meraz, MA, White, JM, Sheehan, KC, Bach, EA, Rodig, SJ, *et al.* (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* **84**(3):431-442.
- Messer, J, Reitman, D, Sacks, HS, Smith, H, Jr. and Chalmers, TC (1983) Association of adrenocorticosteroid therapy and peptic-ulcer disease. *N Engl J Med* **309**(1):21-24.
- Miltenburg, AM, van Laar, JM, de Kuiper, R, Daha, MR and Breedveld, FC (1992) T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset. *Scandinavian journal of immunology* **35**(5):603-610.
- Misquitta, CM, Iyer, VR, Werstiuik, ES and Grover, AK (2001) The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Molecular and cellular biochemistry* **224**(1-2):53-67.
- Mitchell, P and Tollervey, D (2000) mRNA stability in eukaryotes. *Current opinion in genetics & development* **10**(2):193-198.
- Mok, SS, Masuda, K, Hauselmann, HJ, Aydelotte, MB and Thonar, EJ (1994) Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem* **269**(52):33021-33027.
- Momohara, S, Okamoto, H, Iwamoto, T, Mizumura, T, Ikari, K, Kawaguchi, Y, Takeuchi, M, Kamatani, N and Tomatsu, T (2007) High CCL18/PARC expression in articular cartilage and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **34**(2):266-271.
- Morand, EF (2007) Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. *Current opinion in rheumatology* **19**(3):302-307.
- Moreland, LW and Bridges, SL, Jr. (2001) Early rheumatoid arthritis: a medical emergency? *Am J Med* **111**(6):498-500.
- Mori, L, Loetscher, H, Kakimoto, K, Bluethmann, H and Steinmetz, M (1992) Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis. *J Exp Med* **176**(2):381-388.
- Mori, M and Gotoh, T (2000) Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(3):715-719.
- Moriggl, R, Berchtold, S, Friedrich, K, Standke, GJ, Kammer, W, *et al.* (1997) Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Molecular and cellular biology* **17**(7):3663-3678.
- Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA and Coffman, RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**(7):2348-2357.
- Muhl, H and Pfeilschifter, J (1994) Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1 beta-stimulated rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int* **46**(5):1302-1306.
- Muhl, H and Pfeilschifter, J (1995) Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 beta-stimulated rat mesangial cells. *J Clin Invest* **95**(4):1941-1946.
- Mulligan, MS, Hevel, JM, Marletta, MA and Ward, PA (1991) Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14):6338-6342.
- Musial, A and Eissa, NT (2001) Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* **276**(26):24268-24273.
- Nagamine, K, Peterson, P, Scott, HS, Kudoh, J, Minoshima, S, *et al.* (1997) Positional cloning of the APECED gene. *Nature genetics* **17**(4):393-398.

- Nah, SS, Choi, IY, Lee, CK, Oh, JS, Kim, YG, Moon, HB and Yoo, B (2008) Effects of advanced glycation end products on the expression of COX-2, PGE2 and NO in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford, England)* **47**(4):425-431.
- Nakae, S, Saijo, S, Horai, R, Sudo, K, Mori, S and Iwakura, Y (2003) IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10):5986-5990.
- Nanki, T, Hayashida, K, El-Gabalawy, HS, Suson, S, Shi, K, Girschick, HJ, Yavuz, S and Lipsky, PE (2000) Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* **165**(11):6590-6598.
- Nelp, WB (1961) Acute pancreatitis associated with steroid therapy. *Arch Intern Med* **108**:702-710.
- Newton, R, Seybold, J, Kuitert, LM, Bergmann, M and Barnes, PJ (1998) Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem* **273**(48):32312-32321.
- Nishiya, T, Uehara, T, Edamatsu, H, Kaziro, Y, Itoh, H and Nomura, Y (1997) Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras. *FEBS Lett* **408**(1):33-38.
- Niyonsaba, F, Iwabuchi, K, Matsuda, H, Ogawa, H and Nagaoka, I (2002) Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *International immunology* **14**(4):421-426.
- Niyonsaba, F, Nagaoka, I and Ogawa, H (2006) Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Critical reviews in immunology* **26**(6):545-576.
- Niyonsaba, F, Ushio, H, Nagaoka, I, Okumura, K and Ogawa, H (2005) The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* **175**(3):1776-1784.
- Niyonsaba, F, Ushio, H, Nakano, N, Ng, W, Sayama, K, Hashimoto, K, Nagaoka, I, Okumura, K and Ogawa, H (2007) Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* **127**(3):594-604.
- Nizet, V, Ohtake, T, Lauth, X, Trowbridge, J, Rudisill, J, *et al.* (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**(6862):454-457.
- Ohtsuka, M, Konno, F, Honda, H, Oikawa, T, Ishikawa, M, *et al.* (2002) PPA250 [3-(2,4-difluorophenyl)-6-[2-[4-(1H-imidazol-1-ylmethyl) phenoxy]ethoxy]-2-phenylpyridine], a novel orally effective inhibitor of the dimerization of inducible nitric-oxide synthase, exhibits an anti-inflammatory effect in animal models of chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* **303**(1):52-57.
- Otero, M and Goldring, MB (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis research & therapy* **9**(5):220.
- Otero, M, Lago, R, Lago, F, Reino, JJ and Gualillo, O (2005) Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis research & therapy* **7**(3):R581-591.
- Palmer, E (2003) Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**(5):383-391.
- Palmer, RM, Hickery, MS, Charles, IG, Moncada, S and Bayliss, MT (1993) Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **193**(1):398-405.
- Passey, RJ, Xu, K, Hume, DA and Geczy, CL (1999) S100A8: emerging functions and regulation. *Journal of leukocyte biology* **66**(4):549-556.

- Patel, DD, Zachariah, JP and Whichard, LP (2001) CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **98**(1):39-45.
- Pautz, A, Linker, K, Altenhofer, S, Heil, S, Schmidt, N, *et al.* (2009) Similar regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by different isoforms of the RNA-binding protein AUF1. *J Biol Chem* **284**(5):2755-2766.
- Pautz, A, Linker, K, Hubrich, T, Korhonen, R, Altenhofer, S and Kleinert, H (2006) The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is involved in the post-transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase expression. *J Biol Chem* **281**(43):32294-32302.
- Peel, NF, Moore, DJ, Barrington, NA, Bax, DE and Eastell, R (1995) Risk of vertebral fracture and relationship to bone mineral density in steroid treated rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **54**(10):801-806.
- Pelletier, JP, Jovanovic, D, Fernandes, JC, Manning, P, Connor, JR, Currie, MG, Di Battista, JA and Martel-Pelletier, J (1998) Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and rheumatism* **41**(7):1275-1286.
- Pelletier, JP, Jovanovic, DV, Lascau-Coman, V, Fernandes, JC, Manning, PT, Connor, JR, Currie, MG and Martel-Pelletier, J (2000) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis and rheumatism* **43**(6):1290-1299.
- Pelletier, JP, Mineau, F, Ranger, P, Tardif, G and Martel-Pelletier, J (1996) The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **4**(1):77-84.
- Peng, HB, Spiecker, M and Liao, JK (1998) Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J Immunol* **161**(4):1970-1976.
- Perheentupa, J (2006) Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**(8):2843-2850.
- Peterson, P and Peltonen, L (2005) Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *Journal of autoimmunity* **25 Suppl**:49-55.
- Petit, B, Masuda, K, D'Souza, AL, Otten, L, Pietryla, D, *et al.* (1996) Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. *Experimental cell research* **225**(1):151-161.
- Petrovic-Rackov, L and Pejnovic, N (2006) Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* **25**(4):448-452.
- Pfahl, M (1993) Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* **14**(5):651-658.
- Piper, JM, Ray, WA, Daugherty, JR and Griffin, MR (1991) Corticosteroid use and peptic ulcer disease: role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Intern Med* **114**(9):735-740.
- Pujols, L, Mullol, J, Roca-Ferrer, J, Torrego, A, Xaubet, A, Cidlowski, JA and Picado, C (2002) Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(4):C1324-1331.
- Ralston, SH, Todd, D, Helfrich, M, Benjamin, N and Grabowski, PS (1994) Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology* **135**(1):330-336.
- Ramsey, C, Winqvist, O, Puhakka, L, Halonen, M, Moro, A, Kampe, O, Eskelin, P, Pelto-Huikko, M and Peltonen, L (2002) Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Human molecular genetics* **11**(4):397-409.
- Rao, CV (2004) Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res* **555**(1-2):107-119.
- Ratovitski, EA, Alam, MR, Quick, RA, McMillan, A, Bao, C, *et al.* (1999a) Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **274**(2):993-999.

- Ratovitski, EA, Bao, C, Quick, RA, McMillan, A, Kozlovsky, C and Lowenstein, CJ (1999b) An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *J Biol Chem* **274**(42):30250-30257.
- Ray, A and Prefontaine, KE (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2):752-756.
- Raynauld, JP (1997) Cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis: how harmful are corticosteroids? *The Journal of rheumatology* **24**(3):415-416.
- Rider, LG, Hirasawa, N, Santini, F and Beaven, MA (1996) Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is suppressed by low concentrations of dexamethasone in mast cells. *J Immunol* **157**(6):2374-2380.
- Ristimaki, A, Narko, K and Hla, T (1996) Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *The Biochemical journal* **318** (Pt 1):325-331.
- Rodriguez-Pascual, F, Hausding, M, Ihrig-Biedert, I, Furneaux, H, Levy, AP, Forstermann, U and Kleinert, H (2000) Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* **275**(34):26040-26049.
- Roth, J, Teigelkamp, S, Wilke, M, Grun, L, Tummier, B and Sorg, C (1992) Complex pattern of the myelo-monocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation. *Immunobiology* **186**(3-4):304-314.
- Roth, J, Vogl, T, Sorg, C and Sunderkotter, C (2003) Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* **24**(4):155-158.
- Russell, JP, Diamond, G, Tarver, AP, Scanlin, TF and Bevins, CL (1996) Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. *Infection and immunity* **64**(5):1565-1568.
- Ryckman, C, Vandal, K, Rouleau, P, Talbot, M and Tessier, PA (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* **170**(6):3233-3242.
- Saag, KG, Koehnke, R, Caldwell, JR, Brasington, R, Burmeister, LF, Zimmerman, B, Kohler, JA and Furst, DE (1994) Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. *Am J Med* **96**(2):115-123.
- Sambrook, PN, Cohen, ML, Eisman, JA, Pocock, NA, Champion, GD and Yeates, MG (1989) Effects of low dose corticosteroids on bone mass in rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Annals of the rheumatic diseases* **48**(7):535-538.
- Sands, WA, Bulut, V, Severn, A, Xu, D and Liew, FY (1994) Inhibition of nitric oxide synthesis by interleukin-4 may involve inhibiting the activation of protein kinase C epsilon. *European journal of immunology* **24**(10):2345-2350.
- Sasaki, K, Hattori, T, Fujisawa, T, Takahashi, K, Inoue, H and Takigawa, M (1998) Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem* **123**(3):431-439.
- Saura, M, Martinez-Dalmau, R, Minty, A, Perez-Sala, D and Lamas, S (1996) Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells. *The Biochemical journal* **313** (Pt 2):641-646.
- Schini, VB, Durante, W, Elizondo, E, Scott-Burden, T, Junquero, DC, Schafer, AI and Vanhoutte, PM (1992) The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF-beta 1, PDGFAB and PDGFBB in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **216**(3):379-383.
- Schmidt, HH, Pollock, JS, Nakane, M, Gorsky, LD, Forstermann, U and Murad, F (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(2):365-369.
- Schulze-Koops, H, Lipsky, PE, Kavanaugh, AF and Davis, LS (1995) Elevated Th1- or Th0-like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis.

- Modulation by treatment with anti-ICAM-1 correlates with clinical benefit. *J Immunol* **155**(10):5029-5037.
- Shalom-Barak, T, Quach, J and Lotz, M (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* **273**(42):27467-27473.
- Sherman, MP, Aeberhard, EE, Wong, VZ, Griscavage, JM and Ignarro, LJ (1993) Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **191**(3):1301-1308.
- Simon, AK, Seipelt, E and Sieper, J (1994) Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18):8562-8566.
- Singer, II, Kawka, DW, Scott, S, Weidner, JR, Mumford, RA, Riehl, TE and Stenson, WF (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **111**(4):871-885.
- Singh, K, Balligand, JL, Fischer, TA, Smith, TW and Kelly, RA (1996) Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha. *J Biol Chem* **271**(2):1111-1117.
- Singh, PK, Jia, HP, Wiles, K, Hesselberth, J, Liu, L, *et al.* (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25):14961-14966.
- Smolen, JS, Beaulieu, A, Rubbert-Roth, A, Ramos-Remus, C, Rovensky, J, Alecock, E, Woodworth, T and Alten, R (2008) Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* **371**(9617):987-997.
- Smolen, JS and Steiner, G (2003) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* **2**(6):473-488.
- Snyderman, R, Phillips, J and Mergenhagen, SE (1970) Polymorphonuclear Leukocyte Chemotactic Activity in Rabbit Serum and Guinea Pig Serum Treated with Immune Complexes: Evidence for C5a as the Major Chemotactic Factor. *Infection and immunity* **1**(6):521-525.
- Snyderman, R, Pike, MC, McCarley, D and Lang, L (1975) Quantification of mouse macrophage chemotaxis in vitro: role of C5 for the production of chemotactic activity. *Infection and immunity* **11**(3):488-492.
- St Clair, EW, Wilkinson, WE, Lang, T, Sanders, L, Misukonis, MA, Gilkeson, GS, Pisetsky, DS, Granger, DI and Weinberg, JB (1996) Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* **184**(3):1173-1178.
- Stichtenoth, DO, Fauler, J, Zeidler, H and Frolich, JC (1995) Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. *Annals of the rheumatic diseases* **54**(10):820-824.
- Stichtenoth, DO and Frolich, JC (1998) Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* **37**(3):246-257.
- Stocklin, E, Wissler, M, Gouilleux, F and Groner, B (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383**(6602):726-728.
- Stokes, DG, Liu, G, Coimbra, IB, Piera-Velazquez, S, Crowl, RM and Jimenez, SA (2002) Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis and rheumatism* **46**(2):404-419.
- Stuart, JM, Huffstutter, EH, Townes, AS and Kang, AH (1983) Incidence and specificity of antibodies to types I, II, III, IV, and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by ¹²⁵I-radioimmunoassay. *Arthritis and rheumatism* **26**(7):832-840.
- Stuart, JM, Townes, AS and Kang, AH (1985) Type II collagen-induced arthritis. *Ann N Y Acad Sci* **460**:355-362.
- Stuehr, DJ, Cho, HJ, Kwon, NS, Weise, MF and Nathan, CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17):7773-7777.

- Sunahori, K, Yamamura, M, Yamana, J, Takasugi, K, Kawashima, M, *et al.* (2006) The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **8**(3):R69.
- Swantek, JL, Cobb, MH and Geppert, TD (1997) Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Molecular and cellular biology* **17**(11):6274-6282.
- Takahama, Y (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* **6**(2):127-135.
- Taskiran, D, Stefanovic-Racic, M, Georgescu, H and Evans, C (1994) Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* **200**(1):142-148.
- Taylor, PC, Peters, AM, Paleolog, E, Chapman, PT, Elliott, MJ, McCloskey, R, Feldmann, M and Maini, RN (2000) Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **43**(1):38-47.
- Terato, K, Hasty, KA, Reife, RA, Cremer, MA, Kang, AH and Stuart, JM (1992) Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* **148**(7):2103-2108.
- Thornton, FJ, Schaffer, MR, Witte, MB, Moldawer, LL, MacKay, SL, Abouhamze, A, Tannahill, CL and Barbul, A (1998) Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3):654-659.
- Towbin, H, Staehelin, T and Gordon, J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (Reading, Mass)* **24**:145-149.
- Trentham, DE (1982) Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **25**(8):911-916.
- Trentham, DE (1988) Collagen arthritis in rats, arthritogenic lymphokines and other aspects. *International reviews of immunology* **4**(1):25-33.
- Trentham, DE, Townes, AS and Kang, AH (1977) Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* **146**(3):857-868.
- Trinchieri, G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**(2):133-146.
- Ueki, Y, Miyake, S, Tominaga, Y and Eguchi, K (1996) Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **23**(2):230-236.
- van't Hof, RJ, Hocking, L, Wright, PK and Ralston, SH (2000) Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology (Oxford, England)* **39**(9):1004-1008.
- van de Loo, FA, Arntz, OJ, van Enckevort, FH, van Lent, PL and van den Berg, WB (1998) Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis and rheumatism* **41**(4):634-646.
- van den Berg, WB, Joosten, LA, Helsen, M and van de Loo, FA (1994) Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* **95**(2):237-243.
- van den Berg, WB and van Lent, PL (1996) The role of macrophages in chronic arthritis. *Immunobiology* **195**(4-5):614-623.
- van der Velden, AW and Thomas, AA (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**(1):87-106.
- van Lent, PL, Grevers, L, Blom, AB, Sloetjes, A, Mort, JS, Vogl, T, Nacken, W, van den Berg, WB and Roth, J (2008) Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **67**(12):1750-1758.
- Venter, JC, Adams, MD, Myers, EW, Li, PW, Mural, RJ, *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**(5507):1304-1351.

- Ventura, JJ, Roncero, C, Fabregat, I and Benito, M (1999) Glucocorticoid receptor down-regulates c-Jun amino terminal kinases induced by tumor necrosis factor alpha in fetal rat hepatocyte primary cultures. *Hepatology* **29**(3):849-857.
- Verhoeven, AC and Boers, M (1997) Limited bone loss due to corticosteroids; a systematic review of prospective studies in rheumatoid arthritis and other diseases. *The Journal of rheumatology* **24**(8):1495-1503.
- Vermeire, K, Heremans, H, Vandeputte, M, Huang, S, Billiau, A and Matthys, P (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* **158**(11):5507-5513.
- Villiger, PM, Terkeltaub, R and Lotz, M (1992) Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. *J Immunol* **149**(2):722-727.
- Vodovotz, Y, Bogdan, C, Paik, J, Xie, QW and Nathan, C (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **178**(2):605-613.
- Vogl, T, Ludwig, S, Goebeler, M, Strey, A, Thorey, IS, *et al.* (2004) MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood* **104**(13):4260-4268.
- Voll, RE and Kalden, JR (2005) Do we need new treatment that goes beyond tumor necrosis factor blockers for rheumatoid arthritis? *Ann N Y Acad Sci* **1051**:799-810.
- Voulgari, PV (2008) Emerging drugs for rheumatoid arthritis. *Expert opinion on emerging drugs* **13**(1):175-196.
- Vuolteenaho, K, Moilanen, T, Knowles, RG and Moilanen, E (2007) The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* **36**(4):247-258.
- Wallerath, T, Witte, K, Schafer, SC, Schwarz, PM, Prellwitz, W, *et al.* (1999) Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23):13357-13362.
- Walmsley, M, Katsikis, PD, Abney, E, Parry, S, Williams, RO, Maini, RN and Feldmann, M (1996) Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **39**(3):495-503.
- Wang, Y, Kristan, J, Hao, L, Lenkoski, CS, Shen, Y and Matis, LA (2000) A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* **164**(8):4340-4347.
- Wang, Y, Rollins, SA, Madri, JA and Matis, LA (1995) Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19):8955-8959.
- Watson, WC, Townes, AS and Kang, AH (1986) Immunopathogenic mechanisms in type II collagen autoimmune arthritis. *Pathol Immunopathol Res* **5**(3-5):297-304.
- Wehkamp, J, Schmid, M and Stange, EF (2007) Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology* **23**(4):370-378.
- Wei, L, Sun, X, Kanbe, K, Wang, Z, Sun, C, Terek, R and Chen, Q (2006) Chondrocyte death induced by pathological concentration of chemokine stromal cell-derived factor-1. *The Journal of rheumatology* **33**(9):1818-1826.
- Weinblatt, ME, Keystone, EC, Furst, DE, Moreland, LW, Weisman, MH, Birbara, CA, Teoh, LA, Fischkoff, SA and Chartash, EK (2003) Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis and rheumatism* **48**(1):35-45.
- Weisz, A, Cicatiello, L and Esumi, H (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *The Biochemical journal* **316** (Pt 1):209-215.
- White, KA and Marletta, MA (1992) Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **31**(29):6627-6631.
- Wilkinson, MF and Shyu, AB (2001) Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays* **23**(9):775-787.

- Williams, RO, Feldmann, M and Maini, RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20):9784-9788.
- Wolfe, F, Mitchell, DM, Sibley, JT, Fries, JF, Bloch, DA, *et al.* (1994) The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **37**(4):481-494.
- Woodruff, TM, Strachan, AJ, Dryburgh, N, Shiels, IA, Reid, RC, Fairlie, DP and Taylor, SM (2002) Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. *Arthritis and rheumatism* **46**(9):2476-2485.
- Wooley, PH, Luthra, HS, Stuart, JM and David, CS (1981) Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* **154**(3):688-700.
- Wright, K, Ward, SG, Kolios, G and Westwick, J (1997) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by interleukin-13. An inhibitory signal for inducible nitric-oxide synthase expression in epithelial cell line HT-29. *J Biol Chem* **272**(19):12626-12633.
- Wu, B, Li, P, Liu, Y, Lou, Z, Ding, Y, *et al.* (2004) 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22):8348-8353.
- Xie, QW, Whisnant, R and Nathan, C (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **177**(6):1779-1784.
- Xu, K and Geczy, CL (2000) IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *J Immunol* **164**(9):4916-4923.
- Yamagata, T, Mathis, D and Benoist, C (2004) Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells. *Nat Immunol* **5**(6):597-605.
- Yamamoto, Y and Gaynor, RB (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* **107**(2):135-142.
- Yamasaki, K, Edington, HD, McClosky, C, Tzeng, E, Lizonova, A, Kovesdi, I, Steed, DL and Billiar, TR (1998) Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* **101**(5):967-971.
- Yao, Y, Hausding, M, Erkel, G, Anke, T, Forstermann, U and Kleinert, H (2003) Sporogen, S14-95, and S-curvularin, three inhibitors of human inducible nitric-oxide synthase expression isolated from fungi. *Mol Pharmacol* **63**(2):383-391.
- Yen, T, Harrison, CA, Devery, JM, Leong, S, Iismaa, SE, Yoshimura, T and Geczy, CL (1997) Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* **90**(12):4812-4821.
- Youssef, P, Roth, J, Frosch, M, Costello, P, Fitzgerald, O, Sorg, C and Bresnihan, B (1999) Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *The Journal of rheumatology* **26**(12):2523-2528.
- Yuan, GH, Masuko-Hongo, K, Sakata, M, Tsuruha, J, Onuma, H, Nakamura, H, Aoki, H, Kato, T and Nishioka, K (2001) The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* **44**(5):1056-1070.
- Yui, Y, Hattori, R, Kosuga, K, Eizawa, H, Hiki, K and Kawai, C (1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* **266**(19):12544-12547.
- Zachariae, H (1999) Renal toxicity of long-term cyclosporin. *Scandinavian journal of rheumatology* **28**(2):65-68.
- Zasloff, M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**(6870):389-395.
- Zhang, H, Chen, X, Teng, X, Snead, C and Catravas, JD (1998) Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter in aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **55**(11):1873-1880.
- Zhang, Z, Jones, S, Hagood, JS, Fuentes, NL and Fuller, GM (1997) STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* **272**(49):30607-30610.

-
- Zheng, Y, Niyonsaba, F, Ushio, H, Nagaoka, I, Ikeda, S, Okumura, K and Ogawa, H (2007) Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *The British journal of dermatology* **157**(6):1124-1131.
- Zwerina, J, Redlich, K, Polzer, K, Joosten, L, Kronke, G, *et al.* (2007) TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(28):11742-11747.

XI. Anhang

Tabelle 37: Signifikant herabregulierte Gene nach S-Curvularin-Behandlung (CIA_SC) im Vergleich zu CII-immunisierten (CIA) und Dexamethason-behandelten (CIA_Dex) Tieren

Name_Co_CIA	Entrez	gene name	description	q-Value Co_CIA	MW Co_CIA	SEM Co_CIA	q-Value CIA_Dex	MW CIA_Dex	SEM CIA_Dex	q-Value CIA_SC	MW CIA_SC	SEM CIA_SC
ENSMJSG00000001128	18636	Pfc	Properdin (Factor P) (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P11680]	0.000	2.838	0.340	0.059	0.529	0.119	0.094	0.492	0.065
ENSMJSG00000001578	67458			0.000	9.955	3.732	ns	ns	ns	0.000	0.642	0.391
ENSMJSG00000000597	22025	Nr2c1	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1, orphan receptor, TR2-11; nuclear receptor subfamily 2, group H, member 1. [Source:RefSeq,Acc:NM_011629]	0.000	12.481	4.031	0.220	0.593	0.132	0.000	0.410	0.109
ENSMJSG000000007739	12464	Cd4	T-complex protein 1, delta subunit (TCP-1-delta) (CCT-delta) (A45). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P80315]	1.585	3.474	0.920	ns	ns	ns	0.917	0.545	0.074
ENSMJSG000000007892	685298			2.029	12.687	4.397	ns	ns	ns	0.000	0.472	0.156
ENSMJSG000000009360	17523	Mpo	Myeloperoxidase precursor (EC 1.11.1.7) (MPO). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P11247]	0.000	11.746	3.274	ns	ns	ns	0.000	0.551	0.328
ENSMJSG000000017588	16875	Krt1-c29	keratin complex-1, acidic, gene C29, keratin complex-1, gene C29. [Source:RefSeq,Acc:NM_010668]	2.029	2.010	0.294	ns	ns	ns	0.000	0.216	0.034
ENSMJSG000000017969	19223	Ptgis	Prostaglycin synthase (EC 5.3.99.4) (Prostaglandin I2 synthase). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:O35074]	0.392	10.067	3.493	ns	ns	ns	0.098	0.482	0.084
ENSMJSG000000018593	20692	Sparc	SPARC precursor (Secreted protein acidic and rich in cysteine) (Osteonectin) (ON) (Basement membrane protein BM-40). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P07214]	0.000	3.383	0.736	0.218	0.573	0.077	0.000	0.515	0.154
ENSMJSG000000020262	110532		adenosine deaminase, RNA-specific, B1. [Source:RefSeq,Acc:NM_130895]	0.000	4.378	0.755	ns	ns	ns	2.884	0.619	0.152
ENSMJSG000000020453	58218	Zfp278	zinc finger protein 278; transcription factor (MAZ-related) MAZR; POZ-AT hook-zinc finger protein. [Source:RefSeq,Acc:NM_019574]	0.000	16.918	6.277	ns	ns	ns	0.000	0.462	0.144
ENSMJSG000000021484	66890	Lman2	Vesicular integral-membrane protein VIP36 precursor (Lectin, mannose-binding 2). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9DBH5]	0.000	2.445	0.317	0.000	0.383	0.058	0.096	0.486	0.067
ENSMJSG000000021763	-			0.000	4.112	1.113	2.707	0.693	0.094	0.194	0.522	0.133
ENSMJSG000000021993	1E+08	Mipep	mitochondrial intermediate peptidase. [Source:RefSeq,Acc:NM_027436]	3.444	10.568	3.739	ns	ns	ns	0.000	0.305	0.080
ENSMJSG000000022123	64929	SCEL_MO USE	Sciellin. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9EQG3]	0.504	4.627	1.418	ns	ns	ns	3.549	0.604	0.123
ENSMJSG000000022651	245195		resistin-like gamma, RELMgamma. [Source:RefSeq,Acc:NM_181596]	0.223	13.575	5.325	ns	ns	ns	0.000	0.237	0.081
ENSMJSG000000024099	72900	Ndufv2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, mitochondrial precursor (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9D6J6]	0.095	10.354	3.438	ns	ns	ns	0.098	0.483	0.086
ENSMJSG000000024219	224650	Anks1	Ankyrin repeat and SAM domain containing protein 1. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P59672]	0.740	5.973	3.166	ns	ns	ns	3.467	0.570	0.091
ENSMJSG000000024331	13506	Dsc2	Desmocollin 2A/2B precursor (Epithelial type 2 desmocollin). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P55292]	0.000	3.482	0.843	ns	ns	ns	0.000	0.369	0.078
ENSMJSG000000024511	80718	Rab27b	Ras-related protein Rab-27B. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q99F68]	0.000	14.844	6.980	1.144	0.640	0.132	3.209	0.640	0.172
ENSMJSG000000024738	98170	Hspa5bp1	heat shock 70kDa protein 5 binding protein 1. [Source:RefSeq,Acc:NM_133804]	0.000	10.627	4.166	0.000	0.411	0.158	0.166	0.493	0.100
ENSMJSG000000024812	21873	Tjp2	Tight junction protein ZO-2 (Zonula occludens 2 protein) (Zona occludens 2 protein) (Tight junction protein 2). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9Z0U1]	3.165	3.689	0.908	3.976	0.815	0.153	0.537	0.528	0.093
ENSMJSG000000025151	94275	Maged1	Melanoma-associated antigen D1 (MAGE-D1 antigen) (Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog) (Dlxn-1). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9QYH9]	0.195	2.150	0.254	ns	ns	ns	0.000	0.360	0.063
ENSMJSG000000025402	17937	Nab2	NGF1-A binding protein 2 (EGR-1 binding protein 2). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q61127]	0.000	21.747	11.195	ns	ns	ns	0.000	0.367	0.093
ENSMJSG000000025738	214931			0.000	15.717	8.699	2.707	0.949	0.248	1.277	0.567	0.128
ENSMJSG000000025793	15239	Hgs	HGF-regulated tyrosine kinase substrate. [Source:RefSeq,Acc:NM_008244]	0.000	132.763	62.481	2.707	0.701	0.149	3.549	0.607	0.130

Name_Co_CIA	Entrez	gene name	description	q-Value Co_CIA	MW Co_CIA	SEM Co_CIA	q-Value CIA_Dex	MW CIA_Dex	SEM CIA_Dex	q-Value CIA_SC	MW CIA_SC	SEM CIA_SC
ENSMJSG00000025823	12304	Cai	Protein disulfide isomerase A4 precursor (EC 5.3.4.1) (Protein ERp72) (ERp72). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P08003]	1.758	5.465	1.709	0.000	0.526	0.168	2.848	0.583	0.092
ENSMJSG00000026790	18286	Odf2	outer dense fiber of sperm tails 2. [Source:RefSeq,Acc:NM_013615]	2.722	2.309	0.438	2.965	0.748	0.115	0.000	0.453	0.123
ENSMJSG00000028834	269275	Aocr1c		0.000	15.920	4.696	ns	ns	ns	2.647	0.582	0.099
ENSMJSG00000027593	19383	Raly	RNA-binding protein Raly (hnRNP associated with lethal yellow protein) (Maternally expressed hnRNP C-related protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q64012]	1.775	7.357	3.940	ns	ns	ns	3.375	0.564	0.080
ENSMJSG00000027951	56417	Adar	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase (EC 3.5.4.-) (DRADA) (RNA adenosine deaminase 1). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q99MU3]	0.199	2.747	0.527	ns	ns	ns	0.717	0.548	0.125
ENSMJSG00000027953	19729	Rga	recombination activating gene 1 gene activation. [Source:RefSeq,Acc:NM_009057]	0.664	2.085	0.310	ns	ns	ns	0.000	0.331	0.024
ENSMJSG00000027983	71519	Cyp2u1	Weakly similar to RAT cytochrome P-450B type E. [Source:Uniprot/SPTREMBL,Acc:Q8B1M3]	4.561	3.310	1.288	0.494	0.795	0.279	3.549	0.612	0.142
ENSMJSG00000028357	16552	Kif12	Kinesin-like protein KIF12. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9D2Z8]	0.000	7.874	3.450	ns	ns	ns	4.111	0.584	0.089
ENSMJSG00000028523	67344			1.319	5.388	1.984	ns	ns	ns	0.706	0.604	0.204
ENSMJSG00000028968	-			2.917	2.471	0.605	0.000	0.292	0.052	0.000	0.400	0.133
ENSMJSG00000029213	27784	Commd8	COMM domain containing 8; IMAGE-1958590. [Source:RefSeq,Acc:NM_178599]	1.536	2.919	0.786	ns	ns	ns	0.440	0.515	0.082
ENSMJSG00000029687	14066	Ezh2	Enhancer of zeste homolog 2 (ENX-1). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q61188]	0.000	17.178	7.123	ns	ns	ns	3.318	0.710	0.251
ENSMJSG00000029863	12366	Casp2	Caspase-2 precursor (EC 3.4.22.-) (CASP-2) (ICH-1 protease) (NEDD2 protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P29594]	1.644	2.289	0.462	1.383	0.721	0.150	0.000	0.572	0.212
ENSMJSG00000030707	12721	Coro1a	Coronin 1A (Coronin-like protein p57) (Coronin-like protein A) (CLIPINA) (Tryptophan aspartate-containing coat protein) (TACO). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:O89053]	2.458	2.785	0.690	ns	ns	ns	0.000	0.274	0.121
ENSMJSG00000030782	21804	Tgfb1f1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1. [Source:RefSeq,Acc:NM_009385]	0.126	8.381	2.879	ns	ns	ns	0.000	0.588	0.309
ENSMJSG00000031250	64103	Tnmd	Tenomodulin (TeM) (mTeM) (Chondromodulin-I like protein) (ChM1L) (mChM1L) (Myodulin) (Tendin). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9EP64]	0.195	5.868	2.049	ns	ns	ns	1.515	0.625	0.194
ENSMJSG00000031851	66566			0.352	5.845	1.988	4.192	0.987	0.248	1.865	0.622	0.158
ENSMJSG00000032383	19035	Ppib	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor (EC 5.2.1.8) (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin B) (S-cyclophilin) (SCYLP) (CYP-S1). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P24369]	0.000	43.257	17.507	0.000	0.678	0.299	4.753	0.653	0.163
ENSMJSG00000033429	73724	Mcee	1110007A04Rik protein (Similar to methylmalonyl CoA epimerase). [Source:Uniprot/SPTREMBL,Acc:Q9D116]	3.444	2.097	0.391	ns	ns	ns	3.297	0.584	0.071
ENSMJSG00000033941	-			0.000	10.456	4.364	0.229	0.550	0.084	0.000	0.568	0.188
ENSMJSG00000034686	432763			0.000	4.597	1.103	ns	ns	ns	0.163	0.557	0.163
ENSMJSG00000034786	106512	Gpsm3	G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans). [Source:RefSeq,Acc:NM_134116]	0.000	4.602	1.197	ns	ns	ns	3.078	0.659	0.211
ENSMJSG00000035606	16716		kyphoscoliosis. [Source:RefSeq,Acc:NM_024291]	0.000	61.029	45.747	ns	ns	ns	4.888	0.625	0.139
ENSMJSG00000035836	71773			0.778	8.046	4.797	ns	ns	ns	0.000	0.420	0.118
ENSMJSG00000036484	-			0.000	3.491	0.761	0.494	0.728	0.203	0.000	0.423	0.132
ENSMJSG00000036622	74772	ATY1_MOUSE	Probable cation-transporting ATPase 1 (EC 3.6.3.-) (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9CTG6]	0.000	32.279	14.792	ns	ns	ns	0.000	0.235	0.068
ENSMJSG00000037692	230793			3.165	2.268	0.478	1.465	0.637	0.096	0.000	0.353	0.094
ENSMJSG00000037960	68480			0.778	2.955	0.716	ns	ns	ns	0.000	0.295	0.110

Name_Co_CIA	Entrez	gene name	description	q-Value Co_CIA	MW Co_CIA	SEM Co_CIA	q-Value CIA_Dex	MW CIA_Dex	SEM CIA_Dex	q-Value CIA_SC	MW CIA_SC	SEM CIA_SC
ENSMUSG000000383357	12796	Camp	Cathelin-related antimicrobial peptide precursor (Cramp) (Cathelin-like protein) (CLP). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P51437]	0.000	124.574	53.814	ns	ns	ns	0.000	0.437	0.217
ENSMUSG00000039148	20227	Sart1	squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 1. [Source:RefSeq,Acc:NM_016882]	0.250	3.183	0.716	3.768	0.731	0.166	0.000	0.368	0.119
ENSMUSG00000039233	70430	Tboe	tubulin-specific chaperone e; progressive motor neuropathy. [Source:RefSeq,Acc:NM_178337]	0.225	3.028	0.622	ns	ns	ns	0.000	0.439	0.112
ENSMUSG00000039377	15284	Hlx	Homeobox protein HLX1. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q61670]	0.054	5.841	2.266	1.144	0.720	0.150	0.094	0.482	0.109
ENSMUSG00000040220	104346	Gas8	Growth-arrest-specific protein 8 (Growth arrest-specific 11). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q60779]	0.000	3.345	0.853	ns	ns	ns	0.000	0.440	0.066
ENSMUSG00000040935	242726	Padi6	Protein-arginine deiminase type V (EC 3.5.3.15) (Peptidylarginine deiminase V) (Arginine deiminase-like protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q8K3V4]	0.000	4.835	1.374	3.768	0.795	0.190	0.000	0.427	0.119
ENSMUSG00000041632	218506	Mrps27	mitochondrial ribosomal protein S27. [Source:RefSeq,Acc:NM_173757]	0.000	3.544	0.759	ns	ns	ns	0.000	0.516	0.186
ENSMUSG00000041769	-			0.000	11.230	5.102	ns	ns	ns	1.865	0.650	0.184
ENSMUSG00000042510	212439			1.585	6.580	3.472	ns	ns	ns	2.357	0.630	0.171
ENSMUSG00000043982	170654	Krtap16.4	keratin associated protein 16-4. [Source:RefSeq,Acc:NM_130873]	0.450	6.594	2.258	0.000	0.531	0.151	0.000	0.228	0.074
ENSMUSG00000044272	-			0.130	15.135	8.077	ns	ns	ns	0.194	0.611	0.228
ENSMUSG00000044705	384703	Olf670	Olfactory receptor GA_x6K02T2PBJ9-7589577-7588639. [Source:Uniprot/SPTREMBL,Acc:Q7TRP3]	2.722	7.862	4.240	0.000	0.487	0.122	4.111	0.628	0.148
ENSMUSG00000046947	57869	Adek2	adeF domain containing kinase 2; EST AA408112. [Source:RefSeq,Acc:NM_178873]	0.000	10.795	5.470	ns	ns	ns	0.585	0.665	0.232
ENSMUSG00000047356	332578		lipocalin. [Source:RefSeq,Acc:NM_178036]	1.194	4.088	1.320	ns	ns	ns	0.000	0.442	0.139
ENSMUSG00000048077	-			1.758	2.489	0.485	ns	ns	ns	4.888	0.628	0.135
ENSMUSG00000049013	368202		epidermis-specific serine protease-like. [Source:RefSeq,Acc:NM_001001860]	0.000	8.508	2.532	ns	ns	ns	0.440	0.571	0.174
ENSMUSG00000049357	271508	Q8CDF1		4.413	6.728	1.927	ns	ns	ns	1.243	0.592	0.142
ENSMUSG00000049372	258522			0.096	3.244	0.782	0.683	0.865	0.257	0.350	0.518	0.111
ENSMUSG00000049641	215031	Vgll2	vestigial like 2 homolog. [Source:RefSeq,Acc:NM_153786]	2.029	4.189	1.315	0.000	4.744	1.487	1.243	0.704	0.301
ENSMUSG00000050158	258468	Olf165	olfactory receptor 165; olfactory receptor MOR279-1; GA_x54KRFPKG5P-15855164-15854223. [Source:RefSeq,Acc:NM_146466]	2.531	2.844	0.840	ns	ns	ns	3.704	0.604	0.123
ENSMUSG00000050756	116746	Defb6	defensin beta 6. [Source:RefSeq,Acc:NM_054074]	2.663	15.603	5.197	ns	ns	ns	3.704	0.600	0.104
ENSMUSG00000051390	81630	Kifc1	Zinc finger protein 297 (BING1 protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9Z0G7]	1.049	4.694	1.600	ns	ns	ns	0.000	0.488	0.157
ENSMUSG00000051445	-	Krtap14	keratin associated protein 14; keratin-associated protein 14. [Source:RefSeq,Acc:NM_013707]	1.685	13.158	6.738	0.000	0.688	0.308	4.240	0.702	0.210
ENSMUSG00000052146	666274	Rps10	40S ribosomal protein S10. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P09900]	2.458	9.105	2.988	ns	ns	ns	3.467	0.709	0.201
ENSMUSG00000052170	-			1.251	25.989	11.408	ns	ns	ns	0.350	0.587	0.179
ENSMUSG00000052429	15469	Hrmt12	Protein arginine N-methyltransferase 1 (EC 2.1.1.-). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q9JIF0]	0.973	3.056	0.718	ns	ns	ns	0.000	0.473	0.176
ENSMUSG00000052539	99470		membrane-associated guanylate kinase-related (MAGI-3). [Source:RefSeq,Acc:NM_133853]	4.280	2.235	0.327	ns	ns	ns	0.094	0.552	0.213
ENSMUSG00000054728	218194	Phacr1	Similar to Q9H4T4 like (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL,Acc:Q80VL9]	0.000	9.429	3.782	0.000	0.542	0.220	4.240	0.644	0.144
ENSMUSG00000054828	-			0.450	14.825	9.562	0.246	0.722	0.203	3.704	0.659	0.178
ENSMUSG00000054905	20863	CYT1_MO USE	Stefin 1. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P35173]	0.664	3.214	0.741	1.465	0.682	0.094	0.000	0.363	0.041

Name_Co_CIA	Entrez	gene name	description	q-Value Co_CIA	MW Co_CIA	SEM Co_CIA	q-Value CIA_Dex	MW CIA_Dex	SEM CIA_Dex	q-Value CIA_SC	MW CIA_SC	SEM CIA_SC
ENSMJSG00000056054	20201	S100a8	Calgranulin A (Migration inhibitory factor-related protein 8) (MRP-8) (P8) (Leukocyte L1 complex light chain) (Chemotactic cytokine CP-10) (Pro-inflammatory S100 cytokine). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P27005]	0.000	12.507	3.522	ns	ns	ns	0.000	0.431	0.142
ENSMJSG00000057729	19152	Prtn3	Myeloblastin precursor (EC 3.4.21.76) (Proteinase 3) (PR-3). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q61096]	0.000	8.242	3.663	ns	ns	ns	2.884	0.707	0.227
ENSMJSG00000058013	52398	D5Ertd606e	Septin 8. [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q8CHH9]	0.000	17.621	7.076	0.000	0.566	0.167	0.000	0.158	0.046
ENSMJSG00000058706	68364	Q9DCK6		0.000	9.868	3.329	ns	ns	ns	0.455	0.521	0.112
ENSMJSG00000059234	-			0.778	45.543	27.835	ns	ns	ns	0.000	0.437	0.127
ENSMJSG00000061121	-			1.585	8.781	2.991	ns	ns	ns	0.000	0.454	0.135
ENSMJSG00000061139	-			0.000	3.498	0.791	2.707	2.486	0.451	0.699	0.530	0.096
ENSMJSG00000061232	1E+08	H2-D1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain precursor (H-2K(B)). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:P01901]	0.000	11.546	3.693	ns	ns	ns	0.000	0.437	0.104
ENSMJSG00000062955	-			0.000	18.761	4.918	0.000	16.443	7.135	0.091	0.649	0.233
ENSMJSG00000063083	-			0.000	65.484	23.789	ns	ns	ns	0.000	0.547	0.172
ENSMJSG00000063427	-			0.000	4.450	1.129	ns	ns	ns	0.461	0.673	0.248
ENSMJSG00000064205	-			0.195	2.400	0.474	0.414	0.581	0.088	0.000	0.357	0.088
ENSMJSG00000064246	12654	Chi3l1	Chitinase-3 like protein 1 precursor (Cartilage glycoprotein-39) (GP-39) (BRP39 protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT,Acc:Q61362]	0.000	18.239	8.029	ns	ns	ns	0.194	0.528	0.142
ENSMJSG00000064251	-			0.352	4.575	1.722	ns	ns	ns	4.888	0.619	0.124

Tabelle 38: Signifikant hochregulierte Gene nach S-Curvularin-Behandlung (CIA_SC) im Vergleich zu CII-immunisierten (CIA) und Dexamethason-behandelten (CIA_Dex) Tieren

Name_Co_CIA	Entrez	gene name	description	q-Value Co_CIA	MW Co_CIA	SEM Co_CIA	q-Value CIA_Dex	MW CIA_Dex	SEM CIA_Dex	q-Value CIA_SC	MW CIA_SC	SEM CIA_SC
ENSMUSG00000035011	16269	Zbtb7	Zinc finger and BTB domain containing protein 7 (Leukemia/lymphoma related factor). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:O88939]	0.000	0.218	0.040	ns	ns	ns	0.000	4.278	1.105
ENSMUSG00000025750	-	Q9D9W9		0.000	0.249	0.056	0.300	5.474	1.755	0.814	7.123	2.665
ENSMUSG00000054397	-			0.000	0.285	0.101	0.082	1.034	0.470	4.111	3.058	0.876
ENSMUSG00000028868	242687	Wastl2	WAS protein family, member 2. [Source:RefSeq;Acc:NM_153423]	0.000	0.294	0.081	ns	ns	ns	0.000	14.256	4.249
ENSMUSG00000030699	21389	Tbx6	T-box transcription factor TBX6 (T-box protein 9). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P70327]	0.000	0.326	0.074	ns	ns	ns	0.285	8.348	3.082
ENSMUSG00000054591	-	Obox4	OBOX4 (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q8VHG5]	0.000	0.333	0.117	ns	ns	ns	0.157	33.009	17.136
ENSMUSG00000022390	20286			0.000	0.335	0.111	ns	ns	ns	0.000	4.741	1.522
ENSMUSG00000000731	11834	Aire	Autoimmune regulator (Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy protein homolog) (APECED protein homolog). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9Z0E3]	0.000	0.338	0.066	ns	ns	ns	3.771	14.883	5.348
ENSMUSG00000056978	66438	HPC2_MOUSE	Hepodin 2 precursor. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q80T19]	0.000	0.339	0.039	0.083	4.307	1.226	2.729	2.218	0.471
ENSMUSG00000056837	19820	Rnf12	RING finger protein 12 (LIM domain interacting RING finger protein) (RING finger LIM domain-binding protein) (R-LIM). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9WTV7]	0.000	0.345	0.100	ns	ns	ns	0.000	11.128	3.835
ENSMUSG00000021716	67288			0.000	0.346	0.077	ns	ns	ns	1.561	4.256	1.649
ENSMUSG00000026577	66352	Blzf1	basic leucine zipper nuclear factor 1; basic leucine zipper nuclear factor 1-like. [Source:RefSeq;Acc:NM_025505]	0.000	0.353	0.124	0.000	13.500	5.429	0.537	5.075	1.413
ENSMUSG00000063659	30928	Zfp238	Zinc finger protein 238 (Zfp-238) (Transcriptional repressor RP58) (58 kDa repressor protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9WUK6]	0.000	0.356	0.103	ns	ns	ns	1.376	3.088	0.768
ENSMUSG00000022749	67581			0.050	0.369	0.081	ns	ns	ns	0.131	34.118	25.312
ENSMUSG0000007564	51792	Ppp2r1a	alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2, serine/threonine protein phosphatase A subunit type 2A; protein phosphatase PP2A. [Source:RefSeq;Acc:NM_016891]	0.000	0.369	0.070	ns	ns	ns	0.000	3.794	1.093
ENSMUSG00000053150	-			0.000	0.388	0.106	1.300	17.693	10.289	2.357	6.493	2.541
ENSMUSG00000022667	57781	Cd200r1	Cell surface glycoprotein OX2 receptor precursor (CD200 cell surface glycoprotein receptor). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9ES57]	0.000	0.410	0.049	0.000	3.616	0.742	1.843	6.069	2.192
ENSMUSG00000011254	66628	Q9D999		0.000	0.419	0.173	ns	ns	ns	0.983	3.852	1.084
ENSMUSG00000027878	18129	Notch2	Neurogenic locus notch homolog protein 2 precursor (Notch 2) (Molch B). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:O35616]	0.094	0.420	0.083	2.592	4.342	1.307	0.000	19.585	9.098
ENSMUSG00000040229	23890	Gpr34	Probable G protein-coupled receptor GPR34. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9R1K6]	0.000	0.422	0.083	0.287	0.923	0.309	1.056	2.593	0.495
ENSMUSG00000041144	100042162			0.049	0.423	0.085	0.216	0.645	0.205	0.220	4.087	1.236
ENSMUSG00000033963	70979	Q80Y40		0.089	0.432	0.099	0.494	5.304	2.194	1.539	5.048	2.119
ENSMUSG00000027456	228765	Sdcbp2	Syntenin 2 (Syndecan binding protein 2). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q99JZ0]	0.000	0.433	0.106	ns	ns	ns	0.896	2.538	0.353
ENSMUSG00000020890	14919	Gucy2e	Guanylyl cyclase GC-E precursor (EC 4.6.1.2) (Guanylate cyclase 2E). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P52785]	0.311	0.435	0.103	ns	ns	ns	0.224	55.111	46.515
ENSMUSG00000010104	-			0.092	0.443	0.076	ns	ns	ns	0.960	3.907	1.174
ENSMUSG0000003037	17274	Rab8b	Ras-related protein Rab-8A (Oncogene c-mel). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P56258]	0.052	0.447	0.140	ns	ns	ns	0.000	40.645	19.641
ENSMUSG00000035923	17878	Myf6	Myogenic factor 6 (Myf-6) (Herculin). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P15375]	0.132	0.452	0.092	ns	ns	ns	1.509	2.983	0.722
ENSMUSG00000051721	238037			0.311	0.452	0.083	ns	ns	ns	0.896	4.856	2.104
ENSMUSG00000052374	11472	Actn2	Alpha-actinin 2 (Alpha actinin skeletal muscle isoform 2) (F-actin cross linking protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q8J191]	0.597	0.454	0.100	ns	ns	ns	0.102	45.550	31.257
ENSMUSG00000031097	21953	Tnni2	Troponin I, fast skeletal muscle (Troponin I, fast-twitch isoform). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P13412]	0.127	0.457	0.098	1.300	5.295	1.874	0.345	3.566	0.967
ENSMUSG00000050295	17300	Foxc1	Forkhead box protein C1 (Forkhead-related protein FKHL7) (Forkhead-related transcription factor 3) (FREAC-3) (Transcription factor FKH-1) (Mesoderm/mesenchyme forkhead 1) (MF-1). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q61572]	0.191	0.457	0.110	ns	ns	ns	1.843	6.728	3.511
ENSMUSG00000021390	18295	Ogn	Mimecan precursor (Osteoglycin). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q62000]	0.051	0.458	0.148	0.568	3.087	1.486	0.992	10.345	4.491
ENSMUSG00000019718	67217			0.311	0.466	0.086	ns	ns	ns	3.375	5.325	2.514
ENSMUSG00000037687	-	Apob	Apolipoprotein B (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q61318]	0.088	0.470	0.158	ns	ns	ns	1.646	14.193	8.973
ENSMUSG00000016308	22209	Ube2a	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase A) (Ubiquitin carrier protein A) (HR6A) (mHR6A). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q8Z255]	0.162	0.477	0.115	0.000	25.760	9.126	0.000	6.567	1.479
ENSMUSG00000022175	65107	Lrp10	Low-density lipoprotein receptor-related protein 10 precursor. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q7TQH7]	0.280	0.485	0.092	0.000	0.446	0.098	3.078	2.950	0.793
ENSMUSG00000063967	-			0.195	0.486	0.069	ns	ns	ns	2.922	4.099	1.117
ENSMUSG00000015980	76612	Q9D622		0.616	0.491	0.106	ns	ns	ns	0.161	36.194	26.962
ENSMUSG00000024078	74196			0.497	0.497	0.115	ns	ns	ns	0.537	6.815	3.284
ENSMUSG000000057034	-			0.127	0.497	0.159	ns	ns	ns	0.636	9.841	3.330
ENSMUSG00000048767	-			0.504	0.499	0.092	ns	ns	ns	0.000	15.196	5.720

XII. Publikationen

Originalarbeiten

Schmidt N, Pautz A, Art J, Rauschkolb P, Jung M, Erkel G, Goldring MB, Kleinert H.

Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes (Biochemical Pharmacology, 2010)

Schmidt N., Pautz A., Art J., Erkel G., Kleinert H.

Significant effects of S-Curvularin isolated from *Penicillium spec.* 9-93 on pro-inflammatory gene expression in a murine model of collagen-induced arthritis (in preparation)

Pautz A., Linker K., Altenhöfer S., Heil S., Schmidt N., Art J., Knauer S., Stauber R., Sadri N., Pont A., Schneider RJ., Kleinert H.

Similar regulation of human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by different isoforms of the RNA binding protein AUF-1 (Journal of Biological Chemistry, 2009)

Pautz A., Rauschkolb P., Schmidt N., Art J., Oelze M., Wenzel P., Forstermann U., Daiber A., and Kleinert H.

Effects of nitroglycerin- or pentaerythrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts - evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects (Physiological Genomics, 2009)

Abstracts

N. Schmidt, J. Art, A. Pautz, P. Rauschkolb, G. Erkel, T. Anke, U. Förstermann and H. Kleinert (2009) S-Curvularin inhibits pro-inflammatory gene expression in different models of rheumatoid arthritis. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1] 379:179

N. Schmidt, A. Pautz, K. Linker, G. Erkel and H. Kleinert (2008) Regulation of human iNOS expression in C-28/I2 chondrocytes. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology [Suppl 1] 377:73

N. Schmidt, A. Pautz, K. Linker, G. Erkel, T. Anke, U. Förstermann and H. Kleinert (2007) New anti-inflammatory fungal compounds inhibit human iNOS expression in the model of RA. 12. NO-Forum der Gesellschaft für NO-Forschung, Mainz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadine Schmidt, geb. Graf
Geburtsdatum: 27.12.1980
Geburtsort: Rockenhausen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1987-1991 Astrid Lindgren-Grundschule Langmeil/Imsbach
1991-2000 Wilhelm Erb-Gymnasium Winnweiler

Hochschulbildung

2000-2006 Studium der Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern
2005-2006 Diplomarbeit im Fachbereich der Technischen Universität Kaiserslautern in der Abteilung Mikrobiologie
2006-2009 Promotion am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
seit 2009 Wissenschaftliche Angestellte der Universitätsmedizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Abteilung Kardiovaskuläre Physiologie