

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Multiparameter-Untersuchungen zur Heterogenität der synovialen Entzündungsreaktion
bei Gonarthrose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Hannah Labinsky
aus Bad Soden am Taunus

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

Widmung

Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Multiparameter Analysis Identifies Heterogeneity in Knee Osteoarthritis Synovial Responses

Hannah Labinsky, Paul M. Panipinto, Kaytlyn A. Ly, Deric K. Khuat, Bhanupriya Madarampalli, Vineet Mahajan, Jonathan Clabeaux, Kevin MacDonald, Peter J. Verdin, Jane H. Buckner, Erika H. Noss

Arthritis & Rheumatology, 2019, doi:10.1002/art.41161

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>IV</u>
<u>2</u>	<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>V</u>
<u>3</u>	<u>Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>VI</u>
<u>4</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
<u>5</u>	<u>Literaturdiskussion.....</u>	<u>3</u>
<u>5.1</u>	<u>Arthrose</u>	<u>3</u>
<u>5.2</u>	<u>Entzündungsprozesse in Arthrose-Gelenken.....</u>	<u>4</u>
<u>5.3</u>	<u>Technische Voraussetzungen für die durchflusszytometrische Analyse synovialer Gewebeproben</u>	<u>5</u>
<u>5.4</u>	<u>Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen</u>	<u>6</u>
<u>5.5</u>	<u>Einführung in die wesentlichen synovialen Zellpopulationen</u>	<u>6</u>
<u>5.6</u>	<u>Phänotypische Charakterisierung synovialer hämatopoetischer Immunzellen ..</u>	<u>7</u>
<u>5.6.1</u>	<u>Makrophagen</u>	<u>7</u>
<u>5.6.2</u>	<u>Neutrophile Granulozyten</u>	<u>8</u>
<u>5.6.3</u>	<u>T-Zellen.....</u>	<u>9</u>
<u>5.6.4</u>	<u>B-Zellen</u>	<u>9</u>
<u>5.6.5</u>	<u>Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)</u>	<u>9</u>
<u>5.7</u>	<u>Synoviale hämatopoetische Immunzellen und Arthrose</u>	<u>10</u>
<u>5.8</u>	<u>Phänotypische Charakterisierung von synovialen Fibroblasten.....</u>	<u>10</u>
<u>5.9</u>	<u>Synoviale Fibroblasten und Arthrose</u>	<u>11</u>
<u>5.10</u>	<u>Interleukin-6 und Arthrose.....</u>	<u>12</u>
<u>5.11</u>	<u>Stratifizierung von Arthrose-Patienten</u>	<u>12</u>
<u>6</u>	<u>Material und Methoden.....</u>	<u>13</u>
<u>6.1</u>	<u>Material</u>	<u>13</u>
<u>6.2</u>	<u>Patientenrekrutierung.....</u>	<u>13</u>
<u>6.3</u>	<u>Synovialgewebe.....</u>	<u>14</u>
<u>6.4</u>	<u>Enzymatische Zersetzung des Synovialgewebes</u>	<u>14</u>
<u>6.5</u>	<u>Bestimmung der Zellzahl</u>	<u>15</u>
<u>6.6</u>	<u>Durchflusszytometrie</u>	<u>16</u>

6.6.1	Messprinzip.....	16
6.6.2	Färbung von Oberflächenantigenen	17
6.6.3	Färbung von intrazellulärem IL-6	18
6.6.4	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	18
6.7	<u>Gewinnung von Gewebekultur-Überständen</u>	19
6.8	<u>Multiplex-Analyse der Kulturüberstände</u>	19
6.9	<u>Statistische Auswertung.....</u>	22
7	<u>Ergebnisse</u>	23
7.1	<u>Überblick über den Versuchsaufbau</u>	23
7.2	<u>Überblick über die synovialen Zellpopulationen.....</u>	24
7.3	<u>Etablierung der Kultivierungsbedingungen</u>	25
7.3.1	Definieren der Gewebemenge	25
7.3.2	Übernacht kultivierung mit Monensin	28
7.4	<u>Optimierung der enzymatischen Gewebezersetzung</u>	31
7.4.1	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Zellausbeute und Zellviabilität	32
7.4.2	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die durchflusszytometrische Messung der zellulären Zusammensetzung	33
7.4.3	Zelltyp-spezifische Feinabstimmung der enzymatischen Gewebezersetzung	35
7.5	<u>Die zelluläre Zusammensetzung der Synovialis bei Gelenkarthrose</u>	43
7.5.1	Synoviale hämatopoetische Zellen, Endothelzellen und mesenchymale Zellen	43
7.5.2	Analyse der synovialen hämatopoetischen Zellen	44
7.5.3	Analyse der synovialen Fibroblasten	46
7.6	<u>Synoviale IL-6-Produktion.....</u>	49
7.6.1	Die Diversität der synovialen IL-6-Produktion	49
7.6.2	IL-6-Produktion in synovialen Fibroblasten	52
7.6.3	IL-6-Produktion in anderen Zellen.....	53
7.6.4	Korrelationsanalysen zur Untersuchung der IL-6-Antwort.....	56
7.7	<u>Clusteranalysen zur Stratifizierung der synovialen Entzündungsantwort.....</u>	58
8	<u>Diskussion.....</u>	60
8.1	<u>Die synoviale Entzündungsantwort bei Kniegelenksarthrose.....</u>	60
8.2	<u>Methodische Aspekte der Studie</u>	60
8.3	<u>Korrelationsanalysen zur Untersuchung potentieller zellulärer Interaktionen..</u>	61
8.4	<u>Synoviale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und Arthrose</u>	61

<u>8.5</u>	<u>Die synoviale IL-6-Produktion bei Kniegelenksarthrose.....</u>	<u>62</u>
<u>8.6</u>	<u>Die IL-6-Antwort bei Arthrose und rheumatoider Arthritis im Vergleich.....</u>	<u>63</u>
<u>8.7</u>	<u>Korrelations- und Clusteranalysen zur Stratifizierung der synovialen Entzündungsantwort.....</u>	<u>64</u>
<u>8.8</u>	<u>Limitationen der Studie.....</u>	<u>64</u>
<u>8.9</u>	<u>Ausblick.....</u>	<u>65</u>
<u>9</u>	<u>Zusammenfassung.....</u>	<u>66</u>
<u>10</u>	<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>IV</u>
<u>11</u>	<u>Anhang.....</u>	<u>XIV</u>

1 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin (engl. <i>allophycocyanin</i>)
BMI	Körpermasseindex (engl. <i>body mass index</i>)
CFD	Komplementfaktor D, Adipsin (engl. <i>complement factor D</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, Begriff für Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FMO-Kontrolle	„Fluoreszenz minus Eins“-Kontrolle (engl. <i>fluorescence minus one control</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP-10/CXCL10	Interferon-induzierbares Protein 10/ CXC-Motiv-Chemokinligand 10
IQR	Interquartilsabstand (engl. <i>interquartile range</i>)
Koll P	Kollagenase P
LPS	Lipopolysaccharid
MCAM	Melanomzell-Adhäsionsmolekül (engl. <i>melanoma cell adhesion molecule</i>)
MCP-1/CCL2	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1/CC-Chemokinligand 2
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
Op	Operation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
RBP4	Retinol-Bindungsprotein 4
r_s	Spearman-Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Demographische Daten der rekrutierten Arthrose-Patienten	13
Tabelle 2:	Zusammenfassung der sechs verschiedenen getesteten Verdaubedingungen.....	31
Tabelle 3:	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Färbung von Oberflächenmarkern	36
Tabelle 4:	Korrelationen zwischen synovialen Zellpopulationen.....	49
Tabelle 5:	Gerätschaften und Einwegmaterial	XIV
Tabelle 6:	Puffer und Medien.....	XV
Tabelle 7:	Weitere Reagenzien.....	XVI
Tabelle 8:	Liste der für durchflusszytometrische Untersuchungen eingesetzten Reagenzien.....	XVII

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung des Legendplex-Assay-Prinzips.....	21
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	23
Abbildung 3:	Gating-Strategie zur Unterscheidung von hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen und mesenchymalen Zellen	24
Abbildung 4:	Der Einfluss der Gewebemenge auf die Zellausbeute	25
Abbildung 5:	Der Einfluss der Gewebemenge auf die technische Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Messung der prozentualen zellulären Zusammensetzung.....	26
Abbildung 6:	Der Einfluss der Gewebemenge auf die technische Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Messung von hämatopoetischen und mesenchymalen Oberflächenmarkern	27
Abbildung 7:	Der Einfluss von Monensin auf die zelluläre Ausbeute	28
Abbildung 8:	Der Einfluss von Monensin auf die zelluläre Zusammensetzung.....	30
Abbildung 9:	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Zellausbeute und Zellviabilität.....	33
Abbildung 10:	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die durchflusszytometrische Messung der zellulären Zusammensetzung.....	34
Abbildung 11:	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die CD4-Färbung	38
Abbildung 12:	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die NK-Zell-Färbung	40
Abbildung 13:	Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Färbung von mesenchymalen Zellen	41
Abbildung 14:	Zellausbeute, Zellviabilität und zelluläre Zusammensetzung	43
Abbildung 15:	Analyse der synovialen hämatopoetischen Zellen	45
Abbildung 16:	Identifikation von Fibroblasten-Populationen	47
Abbildung 17:	Korrelationen zwischen synovialen Fibroblasten-Populationen und hämatopoetischen Immunzellen	48
Abbildung 18:	Die Diversität der synovialen IL-6-Produktion	51
Abbildung 19:	IL-6-Produktion in synovialen Fibroblasten	53
Abbildung 20:	IL-6-Produktion in anderen Zellen.....	55
Abbildung 21:	Korrelationsanalysen zur Untersuchung der IL-6-Antwort.....	57
Abbildung 22:	Clusteranalysen zur Stratifizierung der synovialen Entzündungsantwort	59

4 Einleitung

Arthrose (engl. Osteoarthritis) ist die häufigste Gelenkerkrankung. Unter anderem bedingt durch mechanische Abnutzung, führt sie zu irreversibler Zerstörung von Gelenkstrukturen.

Die degenerativen Veränderungen werden häufig durch entzündliche Aktivierung der Gelenkhaut begleitet. Diese verstärkt Knorpelschäden und beeinträchtigt die Gelenkfunktion. Verschiedene Zelltypen, insbesondere hämatopoetische Immunzellen und Fibroblasten, sind an den entzündlichen synovialen Veränderungen beteiligt.

Neuere Untersuchungen von Gelenkflüssigkeit (Synovia) und Gelenkhaut (Synovialis) arthrotischer Gelenke lieferten Hinweise darauf, dass die Entzündung in der Gelenkhaut (Synovialitis) bei verschiedenen Patienten inhomogen verläuft [1-22]. Diese Inhomogenität zeigte sich radiographisch beispielsweise durch variables Gewebsvolumen und Vaskularität [2, 3, 5, 8, 11-16, 18-22]. Histologisch ergaben sich unterschiedliche Immuninfiltrate sowie Gewebshyperplasie, Fibrose und Gewebszerfall [9, 17]. Analysen der Synovialflüssigkeit zeigten eine variable Zytokinantwort [1].

Die Aktivierung entzündlicher Signalwege führt zur Produktion einer Vielzahl verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. Die IL-6-Expression stellte sich in vergangenen Arbeiten als besonders variabel heraus [3, 6, 7, 10, 23]. Sowohl die Rolle dieses Zytokins bei der synovialen Entzündungsantwort als auch ihr zellulärer Ursprung sind bislang noch nicht vollständig geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Heterogenität der entzündlichen synovialen Gewebereaktion in Arthrose-Gelenken mithilfe von Multiparameter-Analysen zu erforschen. Als Untersuchungsmaterial dienten die bei Kniegelenkersatz-Operationen entnommenen Synovialmembranen von 35 Patienten mit Arthrose im späten Erkrankungsstadium. Der zelluläre Aufbau des Gewebes und intrazelluläres Interleukin-6 (IL-6) sollten durchflusszytometrisch *ex vivo* gemessen werden. In Kultur freigesetzte lösliche Proteine sollten mittels Multiplex-ELISA-Technik bestimmt werden.

Einleitung

Um die zelluläre Zusammensetzung des Gewebes zu untersuchen, ist es notwendig, die Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen. Im Rahmen der Arbeit sollte die enzymatische Gewebezersetzung abhängig vom untersuchten Zelltyp optimiert werden. In einem Zeitalter, in dem mit Untersuchungstechniken wie Durchfluss- und Massenzytometrie Einzelzell-Phänotypisierungen von synovialen Gewebe durchgeführt werden, ist es von erheblicher Bedeutung, einen effizienten und zuverlässigen Gewebeverlauf zu etablieren. Dies bildet die Grundvoraussetzung für verlässliche Untersuchungsergebnisse.

Mithilfe der durchflusszytometrisch erhobenen Daten in Kombination mit einer begrenzten Auswahl an klinischen Patienteninformationen sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die synovialen Gewebereaktionen in Arthrose-Gelenken mittels Korrelationsanalysen zu untersuchen, potenzielle Zell-Zell-Interaktionen zu identifizieren und Patientencluster zu definieren.

5 Literaturdiskussion

5.1 Arthrose

Arthrose ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die zu progressiver Knorpel- und Knochenzerstörung unter Beeinträchtigung von gelenknahen Strukturen wie Gelenkkapseln, Muskeln, Sehnen und Bändern führt. Prinzipiell kann jedes Gelenk im menschlichen Körper betroffen sein [24]. In Deutschland sind Knie- und Hüftgelenke am häufigsten arthrotisch verändert [25].

In frühen Stadien verläuft eine Arthrose des Kniegelenks (Gonarthrose) häufig asymptomatisch [26]. Bei Fortschreiten der Erkrankung treten dann zunächst Beschwerden bei Gelenkbelastungen und im späten Stadium sogar in Ruhe auf. Die Patienten erleiden neben Gelenkschmerzen auch Funktionsstörungen, Steifigkeit, Stellungsveränderungen und knackende Gelenkgeräusche bei Bewegung. Bei vielen Patienten führen die Arthrose-Beschwerden zunehmend zu körperlicher Beeinträchtigung in Alltag und Beruf [27].

Umfangreiche Angaben zur Prävalenz von Arthrose in Deutschland wurden in „Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)“ des Robert Koch-Instituts veröffentlicht: In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz von Arthrose für Frauen 22,3 % und für Männer 18,1 %. Das Alter [28-30] stellt neben dem weiblichen Geschlecht [29, 31], genetischen Faktoren [32-34], Adipositas [35-38] und Gelenkverletzungen [39] einen elementaren Risikofaktor für die Erkrankungswahrscheinlichkeit dar. Während bei unter 30-Jährigen eher selten Arthrose diagnostiziert wird, leiden fast die Hälfte der Frauen und rund ein Drittel der Männer zwischen 70 und 79 Jahren an einer Form von Gelenkarthrose [40].

Nicht nur die sozialen, sondern auch die wirtschaftlichen Auswirkungen sind erheblich. Verursacht werden sie durch die hohe Anzahl an ambulanten und stationären Therapien, Rehabilitation, Arbeitsunfähigkeit und Frühberentungen [41]. Unter der mit dem demografischen Wandel einhergehenden Verschiebung von akuten hin zu chronischen Erkrankungen wird die Krankheitsbelastung der

Literaturdiskussion

Bevölkerung durch Arthrose in Industrienationen voraussichtlich stetig weiter zunehmen.

Trotz hoher Prävalenz, steigender Inzidenz und den immensen gesellschaftlichen Auswirkungen ist die Anzahl an Therapieansätzen für die Betroffenen überschaubar. Noch immer mangelt es an Therapiekonzepten, die den Krankheitsprogress aufzuhalten in der Lage sind.

Ein entscheidender Grund hierfür ist, dass unser Verständnis von den der Erkrankung zugrunde liegenden pathomechanistischen zellulären und molekularen Vorgängen begrenzt ist. Die langjährige Lehrmeinung, dass Arthrose als rein degenerative Erkrankung anzusehen ist, bei der Gelenkschäden ausschließlich Folge von mechanischer Abnutzung sind, gilt mittlerweile als überholt. Es zeichnet sich zunehmend ab, dass es sich bei Arthrose um eine divers verlaufende Erkrankung handelt, bei der vielfältige klinische, epidemiologische, strukturelle und genetische Risikofaktoren eine Rolle spielen [1, 4, 17, 42-44].

5.2 Entzündungsprozesse in Arthrose-Gelenken

Arthrose führt zu Aktivierung und Zerstörung der unterschiedlichen Gewebetypen im und am Gelenk. So ist nicht nur der die Knochenenden überziehende Knorpel betroffen. Auch die Gelenkhaut (Synovialis), welche die Gelenkkapsel von innen auskleidet, und die Synovialflüssigkeit (Synovia), zeigen sich zumindest bei einem Teil der Patienten entzündlich verändert. In den letzten Jahren lieferten Studien zur Gen- und Proteinexpression in der Synovialis und Synovia aus Arthrose-Gelenken Hinweise auf das Vorhandensein unterschiedlicher Erscheinungsformen der Erkrankung und unterstützten damit die These, dass es sich bei Arthrose um eine heterogene Erkrankung handelt [1, 4, 17, 44]. Synovialitis war dabei charakterisiert durch die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege, Volumenzunahme des Gewebes und gesteigerte Vaskularisierung [2, 3, 5, 8, 11-16, 18-22]. Das Vorhandensein von Entzündung im Gelenk korrelierte mit schlechten Behandlungsergebnissen, Progression der Gelenkschädigung und Beeinträchtigung der Gelenkfunktion [2, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 45-47].

Literaturdiskussion

Physiologisch besteht die Synovialis aus einer dünnen Lage Fibroblasten mit Makrophagen (Deckzellschicht oder engl. *lining layer*) über locker strukturiertem Bindegewebe (Subintima oder engl. *sublining layer*). In der gesunden *sublining layer* befinden sich wenige Leukozyten, u.a. Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen [48-50]. Signalstoffe, die bei Gewebeschädigung ausgeschüttet werden, transformieren das Gewebe, indem sie das Einwandern verschiedener Leukozytenpopulationen und die Aktivierung und Proliferation der gewebeständigen Fibroblasten und Makrophagen bewirken. Dabei wird die Produktion und Freisetzung pro-inflammatorischer Signalmoleküle und Matrix zerstörender Proteinase angeregt, was wiederum die Gelenkschädigung vorantreibt [20, 21].

Synovialitis tritt auch in frühen Erkrankungsstadien auf und ist mit Symptomen wie Schmerzen und Schwellung assoziiert. Mit Voranschreiten der Erkrankung steigt ihre Prävalenz an [51]. Diese Beobachtungen bieten Anhalt dafür, dass sie zugleich Ursache und Folge in der Arthrose-Pathogenese sein kann.

Die genaue Prävalenz entzündlicher Gelenkveränderungen bei Arthrose ist schwer abzuschätzen. Makroskopische Darstellungen mittels Arthroskopie, Ultraschall und Magnetresonanztomographie zeigen, dass bei etwa der Hälfte der Patienten bereits in frühem Krankheitsstadium zumindest zeitweilig Synovialitis festzustellen ist [11-14]. In histologischen Untersuchungen wurden in allen untersuchten Patienten pathologische Veränderungen im Synovialgewebe gefunden. Hierbei wurden vier verschiedene Phänotypen der arthrotisch veränderten Synovialis identifiziert: hyperplastisch, inflammatorisch, fibrotisch und reich an Detritus [9, 17]. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass synoviale Entzündung heterogen verläuft und zumindest bei einem Teil der Patienten den Krankheitsprogress fördert.

Genauere Untersuchung der entzündlichen Gewebereaktion kann dabei helfen, neue Erkenntnisse über die Pathogenese zu gewinnen und Arthrose-Patienten nach Krankheitsmechanismen zu stratifizieren.

5.3 Technische Voraussetzungen für die durchflusszytometrische Analyse synovialer Gewebeprobe

Multiparameter-Durchflusszytometrie ist eine beliebte Methode zur phänotypischen Analyse der zellulären Zusammensetzung von Gewebeprobe. Die recht neu

Literaturdiskussion

entwickelte CyTOF-Technologie, also die Kombination aus Durchfluss- und Massenzytometrie, ermöglicht noch umfangreichere Studien auf diesem Gebiet [52]. Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist in beiden Fällen ein zuverlässiges Protokoll zur Isolierung der Zellen aus dem Gewebeverband. Dabei sollte der Gewebeverdau zum einen ausreichende Zellviabilität und Zellausbeute, zum anderen aber auch Intaktheit der Oberflächenantigene gewährleisten. Bei der enzymatischen Gewebezersetzung kommen zur Spaltung der extrazellulären Matrix Proteinase wie Kollagenase und Dispase zum Einsatz [53-57]. Da durch den Einsatz von Proteinase aber Oberflächenproteine von den Zellen abgetrennt werden können, was zur Folge haben kann, dass die betroffene Zelle der durchflusszytometrischen Analyse entgeht, ist eine genaue Überprüfung des Verdauprotokolls von großer Bedeutung. Beispielsweise wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass Dispase die Expression einer Vielzahl von Oberflächenmolekülen auf murinen hämatopoetischen Immunzellen reduziert [53].

5.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellen

Durchflusszytometrisch kann die Phänotypisierung von Zellen anhand der Messung von intrazellulär und auf der Oberfläche exprimierten Proteinen erfolgen. Oberflächenmoleküle werden dabei mit den zwei Buchstaben „CD“ bezeichnet, die für „*cluster of differentiation*“ oder übersetzt für „Differenzierungsgruppe“ stehen. Die Analyse zellspezifisch exprimierter Moleküle erlaubt die phänotypische Charakterisierung der zellulären Architektur unterschiedlicher Gewebetypen.

5.5 Einführung in die wesentlichen synovialen Zellpopulationen

Im Synovialgewebe sind im Wesentlichen folgende drei Zellpopulationen zu finden: hämatopoetische Immunzellen, Endothelzellen und mesenchymale Zellen. Die grundsätzliche Aufgabe hämatopoetischer Immunzellen liegt in der Immunabwehr. Endothelzellen sind Bestandteil der Gefäßwände. Mitunter regulieren sie die Gefäßpermeabilität. Mesenchymale Zellen bilden als ortsständige Zellen das Bindegewebe. Fibroblasten machen den größten Anteil der Bindegewebszellen aus [58].

Literaturdiskussion

Die grundsätzliche phänotypische Unterscheidung der drei Zelltypen kann anhand der Expression der zwei Oberflächenmoleküle CD45 und CD31 erfolgen. Hämatopoetische Immunzellen exprimieren das Oberflächenmolekül CD45, während Endothelzellen CD31 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Mesenchymale Zellen exprimieren weder CD45 noch CD31.

Innerhalb der CD45⁻CD31⁻ mesenchymalen Zellfraktion kann anhand der Expression von CD146, auch bekannt als Melanomzell-Adhäsionsmolekül oder MCAM, eine kleine Gruppe von gefäß-assoziierten mesenchymalen Zellen (z.B. Perizyten) eingeteilt werden. CD45⁻CD31⁻CD146⁺ Zellen regulieren den vaskulären Tonus. Die übrigen CD45⁻CD31⁻CD146⁻ Zellen konnten in Transkriptionsanalysen überwiegend als synoviale Fibroblasten identifiziert werden [56, 59].

CD45, das allgemeine Leukozytenantigen, wird von allen Leukozyten auf der Zelloberfläche präsentiert und kann somit als Zellmarker für die hämatopoetischen Zellreihen genutzt werden. Auf Lymphozyten werden verschiedene Isoformen des CD45-Moleküls exprimiert (z.B. CD45RA und CD45RO). CD45 wirkt bei der Aktivierung von T-Zellen mit [60].

Bei CD31 handelt es sich um das Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsprotein, welches, wie aus dem Namen abzuleiten ist, von Thrombozyten und Endothelzellen, aber auch von einigen hämatopoetischen Immunzellpopulationen exprimiert wird. Es fungiert u.a. als Signalmolekül, Adhäsions- und Junctionsprotein. Auf der Endothelzelloberfläche reguliert es die vaskuläre Permeabilitätsbarriere [61].

5.6 Phänotypische Charakterisierung synovialer hämatopoetischer Immunzellen

Analog zum peripheren Blut und anderen Gewebetypen können innerhalb der synovialen hämatopoetischen Immunzellen (CD45⁺) anhand verschiedener Oberflächenmarker weitere Subpopulationen unterschieden werden.

5.6.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Ihre Hauptaufgabe ist das Abräumen von beschädigten und infizierten Zellen durch Phagozytose. Über die Antigenpräsentation tragen sie zudem zur Aktivierung von T-Lymphozyten bei.

Literaturdiskussion

Da viele der auf Makrophagen präsentierten Oberflächenmarker auch von anderen Zelltypen exprimiert werden, wird zur Bestimmung von Makrophagen häufig eine Kombination aus verschiedenen Oberflächenmolekülen, wie beispielsweise CD11b, HLA-DR, CD14 und CD206, genutzt.

CD11b (Mac-1) ist die Integrin alpha-M-Kette eines Komplement-Rezeptors und wird von Monozyten und Makrophagen, aber auch von dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert [62]. Die Hauptfunktionen des Moleküls liegen in der Zelladhäsion sowie in der Erkennung und Phagozytose von komplementmarkiertem Material [63-65].

HLA-DR ist die Abkürzung für den humanen Leukozytenantigen-DR-Isotyp und ist vor allem auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, also Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, zu finden. Die physiologische Funktion besteht in der Antigenpräsentation und Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor. Das HLA-DR-Molekül ist unter anderem an Transplantatabstoßungsreaktionen beteiligt und mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen assoziiert [66].

CD14 ist Teil des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors und wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen präsentiert [67]. Die Erkennung von LPS auf der Oberfläche eines gram-negativen Bakteriums führt zur Eliminierung des Erregers durch Phagozytose.

CD206 ist ein Mannose-Rezeptor und wird von Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen exprimiert. Die Bindung von potentiell pathogenen Mikroorganismen zählt zu den Hauptfunktionen des Moleküls [68-72].

5.6.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie migrieren als erstes in infiziertes Gewebe und führen dort durch Phagozytose und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies zur schnellen Bekämpfung der Infektion [73].

CD66b ist ein Oberflächenmarker von neutrophilen Granulozyten [74]. In der Literatur finden sich vielfältige Hinweise auf mögliche Funktionen des Moleküls. Bisher ist ihre Relevanz *in vivo* allerdings noch nicht geklärt [74, 75]. Unter anderem führt die Stimulation des Rezeptors zur Freisetzung von prä-formiertem Interleukin-8 (IL-8) [75].

5.6.3 T-Zellen

T-Zellen sind Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie werden anhand des T-Zell-Rezeptorteils CD3 identifiziert. Dieser interagiert mit dem oben beschriebenen antigenpräsentierenden HLA-DR-Molekül (siehe 5.6.1) und führt bei Erkennung eines Fremdantigens und Ko-Stimulation zur T-Zell-Aktivierung. CD3⁺ T-Zellen können in CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt werden. Bei CD4 und CD8 handelt es sich um die Ko-Rezeptoren des T-Zell-Rezeptors.

CD4⁺ T-Zellen unterstützen als T-Helferzelle vom Typ 1 (Th1) die zelluläre Immunantwort, als T-Helferzelle vom Typ 2 (Th2) leisten sie Beitrag zur humoralen, also antikörpervermittelten, Immunantwort [76, 77]. Für Zellen einer weiteren identifizierten T-Helferzellpopulation, die Th-17-Zellen, ist eine Rolle im Pathomechanismus verschiedener Autoimmunerkrankungen nachgewiesen [78].

Die Hauptfunktion der CD8⁺ T-Zellen liegt in der Eliminierung erregerbefallener Zellen und Tumorzellen [79].

Wie in Abschnitt 5.5 erwähnt, präsentieren T-Lymphozyten abhängig vom Reifezustand und Aktivierungsgrad bestimmte Isoformen des CD45-Moleküls. CD45RA ist auf naiven T-Zellen zu finden, während CD45RO von T-Gedächtniszellen und T-Effektorzellen exprimiert wird [80, 81].

5.6.4 B-Zellen

B-Zellen gehören wie die T-Zellen zum adaptiven Immunsystem. Ihre Hauptaufgabe ist die Antikörperproduktion. CD20 ist ein Antigen der B-Lymphozyten und findet sich (außer auf Stamm- und Plasmazellen) auf fast allen Reifungsstadien der B-Lymphozyten [82-84]. Es soll in die Aktivierung von B-Zellen involviert sein [85]. Die Blockade des CD20-Moleküls stellt einen wichtigen therapeutischen Ansatz bei etlichen hämato-onkologischen und autoimmunen Erkrankungen dar [86]. Neben CD20 exprimiert ein Großteil der reifen B-Zellen auch das HLA-DR-Molekül, welches die B-Zelle zur Antigenpräsentation und Interaktion mit T-Zellen befähigt.

5.6.5 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Trotz ihres lymphogenen Ursprungs zählen NK-Zellen zum angeborenen Immunsystem. Ihre Hauptfunktionen sind die Produktion von Zytokinen und die direkte Eliminierung von Zielzellen [87].

Die Charakterisierung von NK-Zellen aus dem peripheren Blut erfolgt über die Oberflächenmarker CD16 und CD56 und das Fehlen des T-Zell-Rezeptorteils CD3

Literaturdiskussion

[87]. Dabei können anhand der relativen Stärke der Expression zwei NK-Zell-Hauptpopulationen unterschieden werden: CD3⁻CD16⁺CD56^{schwach} und CD3⁻CD16^{schwach/-}CD56^{hoch} [88, 89].

Bei CD16 handelt es sich um den Fc gamma-Rezeptor III. Der Fc-Teil von Antikörpern stellt die Zielstruktur dieses Oberflächenmoleküls dar. Durch einen antikörpervermittelten Mechanismus trägt er zur Lyse von opsonierten Zellen bei [90].

CD56 ist eine Isoform des neuralen Zelladhäsionsmoleküls und wird von NK-Zellen, aber auch von Neuronen exprimiert. Welche Rolle dieses Protein bei den Immunabwehrmechanismen der NK-Zellen spielt, ist letztlich nicht geklärt [91].

5.7 Synoviale hämatopoetische Immunzellen und Arthrose

In der Literatur ist das Vorkommen zahlreicher hämatopoetischer Zelltypen beschrieben. Makrophagen und T-Zellen [92-110] bildeten die größeren Anteile, aber auch B-Zellen [17, 96, 98, 101, 104-108, 111-114], Mastzellen [115-125], dendritische Zellen [102, 106, 126, 127], Neutrophile [94, 100, 104, 105, 108, 113] und NK-Zellen [128] wurden detektiert [102, 115, 129].

In arthrotischer Gelenkhaut finden sich sowohl CD4⁺ T-Helferzellen als auch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (siehe 5.6.3).

Der Fokus der meisten Studien lag bisher auf den CD4⁺ T-Zellen. Allerdings war auch die Verteilung und Funktion der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der Gelenkarthrose Gegenstand mehrerer Arbeiten. In verschiedenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen den Krankheitsverlauf von Arthrose beeinflussen [130-133]. Der Knockout beider T-Zell-Subtypen reduzierte die Gelenkschädigung in Mausmodellen für Arthrose [134, 135].

5.8 Phänotypische Charakterisierung von synovialen Fibroblasten

In früheren Arbeiten wurden Oberflächenmarker wie Podoplanin, CD73, CD90 und CD34 und CD248 genutzt, um Fibroblasten in verschiedenen Geweben zu charakterisieren [136, 137].

Literaturdiskussion

Podoplanin ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches von unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem auch von tumorassoziierten Fibroblasten, exprimiert wird [138]. Es gibt Hinweise darauf, dass es zur Motilität von Fibroblasten beiträgt [139].

Bei CD73 handelt es sich um eine Nukleotidase, also ein Enzym, das Nukleotide in Nukleoside umwandelt [140-142]. Dabei gebildetes Adenosin hat mitunter anti-inflammatorische Effekte. In Tumorzellen führt es zu Tumorwachstum [143, 144]. CD73 wird von Fibroblasten exprimiert. Es wurde aber beispielsweise auch schon auf T-Zellen gefunden [145].

CD90 (Thy-1-Antigen) ist ein Oberflächenmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie. Neben Fibroblasten exprimieren unter anderem auch hämatopoetische Stammzellen, Nervenzellen und T-Zellen das Protein CD90. Es werden am ehesten zelltypspezifische Funktionen angenommen [146]. In Fibroblasten bewirkt es Wundheilung und Fibrose [147-149].

Bei CD34 handelt es sich um ein Adhäsionsprotein hämatopoetischer Vorläuferzellen [150]. Weiterhin wird es durch Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert [151, 152]. Obgleich das Protein regelhaft zur Phänotypisierung von Fibroblasten eingesetzt wird, ist seine Rolle noch nicht eindeutig geklärt.

CD248 (Endosialin) ist ein Oberflächenmarker und Adhäsionsprotein von Fibroblasten und Perizyten [153]. Die genaue Funktion in Fibroblasten ist bislang noch unbekannt [154].

5.9 Synoviale Fibroblasten und Arthrose

Während die verschiedenen hämatopoetischen Zellpopulationen bereits in einer Vielzahl von Publikationen Erwähnung fanden, wurden synoviale Fibroblasten bisher als weitgehend homogene Zellgruppe betrachtet.

Verschiedene Studien zeigten eine erhöhte Expression von CD90 und CD34 (siehe 5.8) in der synovialen Subintima (*sublining layer*) bei Arthrose und rheumatoider Arthritis [56, 59, 137, 155-157]. In zwei neueren Arbeiten wurden phänotypisch unterschiedliche Fibroblasten-Populationen mit spezifischen mRNA-Signaturen sowie funktionellen und anatomischen Unterschieden in der Synovialis von Patienten mit rheumatoider Arthritis beschrieben [56, 59]. Die *In-vitro*-Analyse der Zellgruppen deutete darauf hin, dass die CD34⁻CD90⁺ und CD34⁻CD90⁻ Zellen als Modulatoren der Osteoklastogenese fungieren, während die CD34⁺ Zellen hohe Mengen an IL-6

Literaturdiskussion

freisetzen [56]. Die Rolle unterschiedlicher Fibroblasten-Populationen in der Entstehung und dem Krankheitsverlauf von Arthrose wurde bislang nicht untersucht.

5.10 Interleukin-6 und Arthrose

In mehreren Studien wurde ein breites Expressionsspektrum an pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in Arthrosegelenken gefunden. Mit bis zu 10.000-fachen Expressionsunterschieden zeigte sich besonders die IL-6-Produktion als äußerst variabel [3, 23]. Zudem wurden bei Arthrose erhöhte IL-6-Expressionslevel in Serum und Synovialflüssigkeit festgestellt, sodass hohe diagnostische Aussagekraft für das Interleukin anzunehmen ist [3]. IL-6 in Arthrosegelenken korrelierte positiv mit Schmerz und radiologischer Progression der Erkrankung [10, 16]. Zudem wurde gezeigt, dass die Blockade des Zytokins die Gelenkschädigung in einem Mausmodell für Arthrose reduzierte [158].

Die Literaturrecherche zu der Frage, welche Zellen das IL-6 bei synovialen Entzündungsreaktionen bilden, ergab uneinheitliche Ergebnisse. Bereits vor mehr als einem viertel Jahrhundert wurden große Mengen an IL-6 mRNA in synovialen Fibroblasten gefunden [159]. Andere Studien zeigten, dass innerhalb der hämatopoetischen Zellen hauptsächlich die Makrophagen, aber auch T-Zellen IL-6 produzierten. In einer Veröffentlichung wurden sogar die Plasmazellen als wichtige Quelle für IL-6 herausgestellt [160]. Ein Schwerpunkt dieser Studie war es deshalb, die Höhe der IL-6-Produktion und die Produktionsquellen des Zytokins in der 35 Patienten umfassenden Kohorte zu vergleichen, um zu einem besseren Verständnis der Komplexität der synovialen IL-6-Produktion beizutragen.

5.11 Stratifizierung von Arthrose-Patienten

In der Vergangenheit wurden Arthrose-Patienten beispielsweise nach klinischen und radiologischen Merkmalen gruppiert [161].

In anderen Studien wurden durch umfangreiche Analyse von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Synovialflüssigkeit von Arthrose-Gelenken multiple Patientencluster identifiziert, die Heterogenität der Entzündungsvorgänge widerspiegeln [1, 162].

Beide Ansätze leisteten einen Beitrag zur Entschlüsselung der komplexen Entzündungsvorgänge in arthrotisch veränderten Gelenken.

6 Material und Methoden

6.1 Material

Eine Auflistung von verwendeten Gerätschaften, Einwegmaterial, Reagenzien und die Beschreibung der Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer und Medien finden sich in Tabellen im Anhang dieser Arbeit (Tabellen 5-7). In einer weiteren Tabelle, ebenfalls im Anhang, ist eine Liste aller für durchflusszytometrische Versuche verwendeten Reagenzien mit Informationen zur jeweils eingesetzten Verdünnung (Tabelle 8).

6.2 Patientenrekrutierung

Die Studie wurde unter Zustimmung der Ethikkommission des Benaroya Research Institute am Virginia Mason Medical Center (Seattle, Washington, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt.

Rekrutiert wurden Patienten, die sich im Virginia Mason Medical Center einer Kniegelenkersatz-Operation unterzogen.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der demographischen Daten der Patienten.

Tabelle 1: Demographische Daten der rekrutierten Arthrose-Patienten

Demographische Daten	
Anzahl an Patienten	35
Alter (in Jahren, Mittelwert \pm SD)	65,39 \pm 8,33
Geschlecht (männlich/weiblich)	12/23
BMI (kg/m ² , Mittelwert \pm SD)	32,47 \pm 7,72
Ethnie (Weiße/Afroamerikaner/Asiaten)	32/1/2
Fallzahl/Chirurg (drei Chirurgen 1/2/3)	12/12/11

6.3 Synovialgewebe

Gelenkhautgewebe von Arthrose-Patienten wurde von drei unterschiedlichen Chirurgen während Kniegelenkersatz-Operationen entnommen. Die Anzahl an Operationen war gleichmäßig zwischen den drei Chirurgen aufgeteilt (Tabelle 1). Der Chirurg traf die Wahl der anatomischen Region für die Probeentnahme. Direkt im Anschluss an die Entnahme wurde das Gewebe gekühlt per Kurierdienst ins Labor ausgeliefert. Noch am Operationstag wurde es dort mit einem Skalpell in ca. 100 mg große Gewebeproben zerteilt. Das Gewicht jeder einzelnen Probe wurde durch Wiegen kontrolliert und dokumentiert (durchschnittlich $106 \text{ mg} \pm 31,5 \text{ mg}$). Über Nacht wurden die Proben in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 1 % fetalem Rinderserum (FBS), L-Glutamin, Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Gentamicin), $50 \mu\text{M}$ 2-Mercaptoethanol und Aminosäuren in 6-Loch-Platten kultiviert (1 Gewebestück pro Loch).

Für ELISA-Untersuchungen bestimmte Proben (3 Proben pro Spender) wurden für 24 h bis zur Entnahme von Kulturüberständen in oben beschriebenem Kulturmedium kultiviert.

Für durchflusszytometrische Analysen bestimmte Proben (12 Proben pro Verdauansatz und Spender) wurden in Kulturmedium (s.o.) unter Zusatz von Monensin ($10 \mu\text{M}$) über Nacht (14-16 h) vorbehandelt. Monensin ist ein Proteintransport-Inhibitor, der das Freisetzen intrazellulär produzierter Proteine verhindert und somit Zytokine wie das IL-6 durchflusszytometrisch nachweisbar macht.

6.4 Enzymatische Zersetzung des Synovialgewebes

Ziel des enzymatischen Gewebeverdaus war die Freisetzung intakter Zellen unter möglichst vollständiger Zersetzung der extrazellulären Matrix.

Dafür wurden zwölf Gewebeproben (ca. 1200 mg Gewebe) je Gewebeverdau-Ansatz und Spender zunächst mechanisch mit einer Schere zerkleinert und im Anschluss bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Enzymcocktail zersetzt. Zum Einsatz kamen dabei verschiedene Enzyme (siehe Tabelle 2).

Material und Methoden

Als Basismedium für den Gewebeverdau diente DMEM plus 50 µg/ml DNase. DNase hydrolysiert Esterbindungen von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Molekülen und zerteilt die langen Ketten dadurch in kleinere Untereinheiten, sogenannte Oligonukleotide. Dispase und Kollagenase P sind Proteasen, die Proteine der Extrazellulären Matrix wie beispielsweise Kollagene spalten. Liberase™ TL ist ein Enzymgemisch aus Kollagenase und Thermolysin.

Die verschiedenen, in dieser Arbeit getesteten Verdauprotokolle unterschieden sich in Volumen und Zusammensetzung der Enzymcocktails sowie der zeitlichen Gesamtlänge des Verdaus:

Verdau-Ansätze 1-3: 8-800 µg/ml Dispase, 400 µg/ml Kollagenase P (Koll P), Medium wurde bis zur vollständigen Gewebezersetzung alle 15 min erneuert (ca. 2 h Gesamtlänge);

Verdau-Ansätze 4+5: 100 µg/ml Liberase™ TL, 30 min oder 60 min Gesamtlänge ohne Medium-Erneuerung;

Verdau-Ansatz 6: 400 µg/ml Kollagenase P, 60 min Gesamtlänge ohne Medium-Erneuerung.

Sich aus dem Gewebeverband lösende Zellen wurden in 20 ml kaltes DMEM (+ 10 % FBS, 5 mM EDTA, 10 µM Monensin) überführt. Durch Filtern (70 µm Maschenweite) wurden Gewebetrümmer von der Zellsuspension getrennt.

Nach sechsminütiger Zentrifugation der Zellen bei 300xg und Raumtemperatur (RT) erfolgte die Depletion roter Blutzellen durch vorsichtiges, einminütiges Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer (Alfa Aesar Red Blood Cell Lysis Buffer, Thermo Fisher Scientific, unverdünnt, bei RT).

6.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl vitaler synovialer Zellen wurde lichtmikroskopisch mithilfe einer Zählkammer bestimmt. Zunächst wurde ein definiertes Volumen aus der Zellsuspension entnommen und in einem bestimmten Verhältnis (1:2 – 1:40) mit Trypanblau gefärbt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der intakte Zellmembranen nicht passieren kann und aus diesem Grund nur beschädigte Zellen dunkelblau färbt. 10 µl der Zellsuspension wurden in die Zählkammer überführt und die Gesamtzahl intakter Zellen bestimmt.

Material und Methoden

Zuerst wurden hierfür die nicht angefärbten Zellen in dem in 16 Einzelquadrate aufgeteilten Großquadrat der Zählkammer ausgezählt. Die Gesamtzahl intakter Zellen wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl in 4 Quadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen (ml)} \times 10^4 \text{ (Kammerkonstante)}}{4}$$

6.6 Durchflusszytometrie

6.6.1 Messprinzip

Durchflusszytometrie beschreibt eine Messtechnik zum Nachweis von zellulären Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Das Prinzip funktioniert wie folgt: An Antikörper (Ak) gekoppelte Fluorochrome binden spezifisch an Zielantigene auf oder in den zu untersuchenden Zellen. Bei der Analyse intrazellulärer Antigene werden die Zellen vor der Inkubation mit den Antikörpern fixiert und permeabilisiert.

Die mit Antikörpern markierten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einem monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet. Der Laserstrahl regt die Fluorochrome an, sodass sie Photonen aussenden, die wiederum detektiert werden. Durch (quantitative) Analyse emittierter Photonen werden Anzahl und Art der Fluorochrome und somit die gebundenen Oberflächen- oder intrazellulären Antigene gemessen.

Der Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die gleichzeitige Analyse verschiedener zellulärer Antigene und somit die Phänotypisierung von Zellsuspensionen. Messungen von Vorwärts- (*Forward Scatter/FSC*) und Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter/SSC*) ermöglichen zudem die Darstellung von Zellvolumen (FSC) und Granularität (SSC) der analysierten Zellen.

6.6.2 Färbung von Oberflächenantigenen

Eine Auflistung der für die durchflusszytometrischen Färbungen verwendeten Reagenzien mit Angaben zur Verdünnung der Antikörper befindet sich im Anhang (siehe Tabelle 8). Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass negative und positive Populationen sicher voneinander zu unterscheiden waren.

Die Proben wurden nach jeder Inkubation zweimal gewaschen, um ungebundene Antikörper und Reagenzien zu entfernen.

Zunächst wurden zwischen $0,5 \times 10^5$ und 5×10^5 synoviale Zellen pro Färbung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) aufgenommen, in eine Vertiefung einer 96-Loch-U-Boden-Platte überführt und zentrifugiert ($300 \times g$, 4°C , 4 min).

Zur Lebend-Tot-Differenzierung wurde das Zellpellet in $20\ \mu\text{l}$ einer 1:150-Verdünnung des Viabilitätsfarbstoffes Zombie Aqua™ (verdünnt in PBS-Puffer) resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur vor Licht geschützt inkubiert. Zombie Aqua™ ist ein fixierbarer Lebend-Tot-Farbstoff, der beschädigte Zellmembranen passieren kann und intrazellulär durch kovalente Aminbindungen fixiert bleibt. So wurden tote und beschädigte Zellen markiert und konnten bei der durchflusszytometrischen Analyse ausgeschlossen werden.

Unspezifische Antikörperbindungsstellen, sogenannte Fc-Rezeptoren, wurden durch Human TruStain FcX™-Lösung (Fc Receptor Blocking Solution) abgeschirmt. Auf diese Weise wurde eine unspezifische Bindung von Fc-Fragmenten der Fluorochrom-markierten Antikörper an Fc-Rezeptoren auf Zelloberflächen verhindert. Dafür wurden $15\ \mu\text{l}$ der 1:20 in FACS-Puffer (PBS, 2 % FBS, 1 mM EDTA) verdünnten Lösung zu den Zellen gegeben und die Probe für 15 min bei 4°C vor Licht geschützt inkubiert. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper zur Färbung von Oberflächenantigenen wurden den Proben im Anschluss ohne zwischengeschalteten Waschschrift direkt beigefügt und die Probe für 20 Minuten bei 4°C vor Licht geschützt inkubiert ($15\ \mu\text{l}$, Antikörper-Liste mit Verdünnung im Anhang).

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Waschen von ungebundenen Antikörpern befreit. Dafür wurde zu jeder Probe $200\ \mu\text{l}$ FACS-Puffer hinzugegeben und die Probe bei $300 \times g$ und 4°C für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss über einem Waschbecken abgeschüttet. Reste des Überstandes wurden durch vorsichtiges Ausklopfen der umgedrehten Platte auf einem sauberen

Material und Methoden

Papiertuch entfernt. Zur möglichst vollständigen Befreiung von ungebundenen Antikörpern wurde der Waschvorgang ein zweites Mal wiederholt.

Im Anschluss wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und für die Messung in ein Teströhrchen mit Rundboden überführt.

6.6.3 Färbung von intrazellulärem IL-6

Die Lebend-Tot-Differenzierung, Fc-Rezeptor-Blockade und die Färbung von Oberflächenmolekülen wurden zunächst wie in 6.6.2 beschrieben durchgeführt.

Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte unter Verwendung der Reagenzien des *Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Sets* (eBioscience™). Die Probe wurde in Fixierungspuffer fixiert (4°C, 30 min), zweimal durch Hinzufügen von 200 µl FACS-Puffer, Zentrifugation (300xg, 4 °C, 4 min) und Abschütten des Überstandes gewaschen und anschließend permeabilisiert (4°C, 45 min). Das im Fixierungspuffer enthaltene Formaldehyd verhinderte durch Quervernetzung von Proteinen, dass intrazelluläre Proteine, u.a. Zytokine, vor der Färbung aus der Zelle ausgeschleust wurden. Im Permeabilisierungspuffer (1:10 verdünnt in FACS-Puffer) war Saponin enthalten, welches mit membranständigem Cholesterin wechselwirkt und dabei die Zellmembran durchlöchert. Nach erneutem Waschen (Hinzufügen von 200 µl FACS-Puffer, Zentrifugation bei 300xg, 4 °C, 4 min und Abschütten des Überstandes) wurden die Zellen mit PE-gekoppelten anti-IL-6 oder Isotyp-Kontrollantikörpern (1:10-Verdünnung in Permeabilisierungspuffer, BioLegend) bei 4 °C für 45 min inkubiert. Durch die im Permeabilisierungsschritt entstandenen Poren konnten nun die Fluorochrom-konjugierten Antikörper nach intrazellulär gelangen und das IL-6 im Zytoplasma markieren. Ungebundene Antikörper-Lösung wurde in zwei Waschsritten (Hinzufügen von 200 µl Permeabilisierungspuffer, Zentrifugation bei 300xg, 4 °C, 4 min und Abschütten des Überstandes) entfernt. Die Probe wurde in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und für die Messung in ein Teströhrchen mit Rundboden überführt.

6.6.4 Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Alle durchflusszytometrischen Messungen für diese Arbeit wurden mit dem CytoFLEX S Flow Cytometer von Beckman Coulter durchgeführt. Dieses Zytometer

Material und Methoden

verfügte über vier Laser. Zeitgleich konnten bis zu 13 unterschiedliche Fluorochrome detektiert werden.

Die Kompensation wurde mittels Einzelfärbungen von Zellen (Viabilitätsfarbstoff) und Kompensationspartikeln, engl. *beads*, (alle Primärantikörper) durchgeführt. Bei einer Kompensation bei durchflusszytometrischen Analysen handelt es sich um eine Korrektur des Messsignals. Sie ist notwendig, weil ein Fluorochrom nicht nur eine bestimmte Wellenlänge emittiert, sondern ein größeres Spektrum von Wellenlängen um einen Maximalwert herum aussendet und somit gleichzeitig in mehreren Kanälen des Durchflusszytometers gemessen wird [163].

Die gemessenen Daten wurden mit der Kaluza® Software (Beckman Coulter) ausgewertet. Die IL-6⁺ Population wurde durch Isotypkontrollen identifiziert. Alle anderen markerpositiven Populationen wurden durch „Fluoreszenz minus Eins“-Kontrollen, engl. *fluorescence minus one controls (FMO-Kontrollen)* abgegrenzt.

6.7 Gewinnung von Gewebekultur-Überständen

Drei Gewebeproben pro Spender à ca. 100 mg wurden in 2 ml Zellkulturmedium auf DMEM-Basis (siehe Tabelle 6) bei 37 °C in 6-Loch-Zellkulturplatten (1 Gewebestück pro Vertiefung) inkubiert. Nach 24 h wurde vorsichtig je 1 ml Überstand aus jeder Vertiefung entnommen und bei - 20 °C bis zur Testung eingefroren.

6.8 Multiplex-Analyse der Kulturüberstände

Die Konzentrationen von Adiponektin, Adipsin, Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, Interleukin-10 (IL-10), Interferon-induzierbarem Protein 10 (IP-10 oder CXCL10), Leptin, Melanomzell-Adhäsionsprotein 1 (MCP-1 oder CCL2), Retinol-bindendem Protein 4 (RBP4), Resistin und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) aus den Synovialgewebe-Überständen wurden mithilfe der LEGENDplex™-Technologie (BioLegend), einem auf der Technik der Durchflusszytometrie basierendem Multiplex-ELISA, bestimmt. Der Versuch wurde in Orientierung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Die eingesetzten Reagenzien entstammten dem Versuchskit.

Material und Methoden

Das Prinzip des Assays ist wie folgt: Es kommen Partikel (engl. *beads*) zweier Größen zum Einsatz, die durchflusszytometrisch durch Darstellung von Vorwärts- (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC) unterschieden werden können. Die Partikel beider Größen kommen je in sechs bzw. sieben verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (Allophycocyanin/APC) vor, sodass insgesamt dreizehn verschiedene Partikel-Typen unterschieden werden können. Partikel eines Typs sind an Antikörper mit der gleichen Antigenbindungsstelle gekoppelt. Bei Inkubation mit Zellen binden die an Partikel gekoppelten Antikörper spezifisch an ihr Antigen auf der Zelloberfläche. Insgesamt enthält das Versuchskit dreizehn verschiedene Partikel-Antikörper-Konjugate, sodass dreizehn unterschiedliche Adipokine gemessen werden können.

Waschpuffer, Partikelmischung und Standard-Cocktail sowie die Standard-Verdünnungen wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Zellkulturüberstände wurden auf Eis aufgetaut und 1:100 mit Assay-Puffer verdünnt. Je 12,5 µl Puffer, Probenverdünnung oder Standard, Partikelgemisch und biotinylierte Detektionsantikörper wurden in eine V-Boden-Mikroplatte mit 96 Löchern gegeben. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach 2 h wurde jedem Loch 12,5 µl Streptavidin-Phycoerythrin (PE) hinzugefügt. Erneut wurden die Proben für 30 min vor Licht geschützt auf dem Schüttler inkubiert, sodass das Streptavidin-PE an das Biotin der Detektionsantikörper binden konnte. Anschließend wurden 200 µl Waschpuffer pro Loch hinzugegeben, die Platte bei 1000xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. In zwei weiteren Waschrufen wurden ungebundene Reagenzien von den Partikeln entfernt. Die Probe wurde schließlich in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung wurde am gleichen Tag durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des im Versuchskit enthaltenen Auswert-Programms. Die Zytokin-Konzentrationen wurden über Standardkurven für jedes lösliche Protein ermittelt und auf das Probengewicht normalisiert (pg/ml/mg Gewebe).

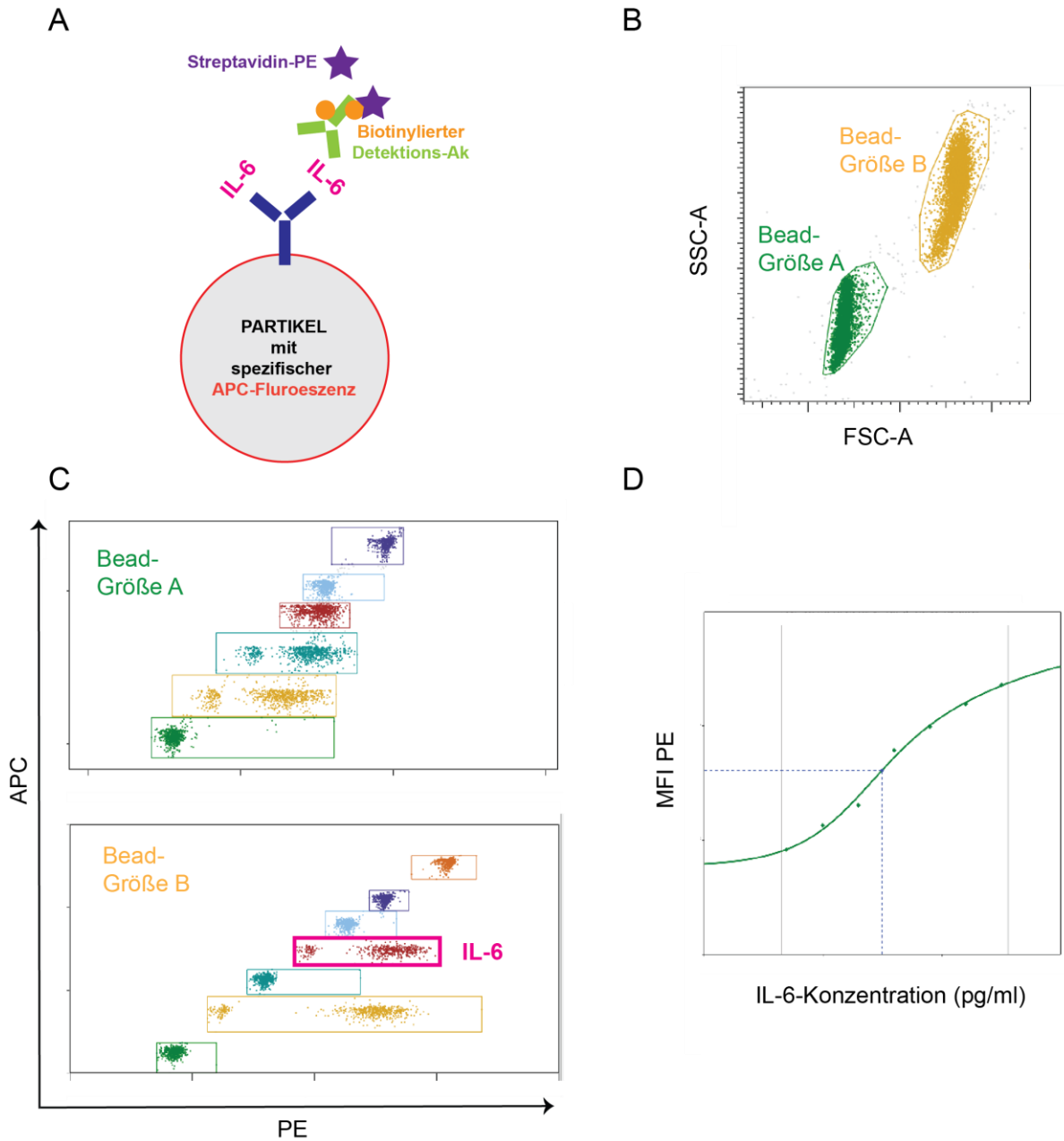


Abbildung 1: Darstellung des Legendplex-Assay-Prinzips

(A) Schematische Darstellung des Assay-Prinzips am Beispiel des IL-6-Nachweises. (B) Darstellung von Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC) zur Unterscheidung der beiden unterschiedlich großen Partikel-Populationen. (C) Darstellung von APC gegen PE zur Unterscheidung der insgesamt dreizehn Partikel-Typen. Die Unterscheidung der Partikel erfolgte anhand der unterschiedlichen intrinsischen APC-Fluoreszenzen. (D) Darstellung der Standardkurve zur Ermittlung der Konzentration des Zytokin, hier am Beispiel von IL-6.

6.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden im Programm GraphPad Prism 7 durchgeführt.

Weil die Ergebnisse der Versuche zur Etablierung der Versuchsbedingungen und zu den Vergleichen der unterschiedlichen Verdaubedingungen weitgehend normalverteilt waren, wurden sie mit dem Mittelwert \pm Standardabweichung zusammengefasst und mittels parametrischer Tests statistisch bewertet (t-Test, einfaktorielle Varianzanalyse mit Mehrfachvergleichen).

Alle übrigen Ergebnisse der Untersuchungen zur zellulären Zusammensetzung des Synovialgewebes, IL-6-Produktion und Heterogenität der Entzündungsantwort wurden mit dem Median und dem Interquartilsabstand (IQR, 25.-75. Perzentile) zusammengefasst und mittels non-parametrischer Testverfahren (Kruskal-Wallis-Test mit der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche, Spearman-Korrelation) statistisch bewertet.

P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Genaue Angaben zum jeweils verwendeten Test finden sich im Untertext der entsprechenden Abbildungen.

Die Clustering-Analysen wurden mithilfe des internet-basierten Programms ClustVis (biit.cs.ut.ee/clustvis/30) durchgeführt.

7 Ergebnisse

7.1 Überblick über den Versuchsaufbau

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Synovialitis in Arthrose-Gelenken heterogen verläuft [1-22]. Ursächlich hierfür können Unterschiede in zugrunde liegenden Krankheitsprozessen sein.

Ziel dieser Arbeit war die phänotypische Analyse der Heterogenität synovialer Gewebereaktionen mittels durchflusszytometrischer *Ex vivo*-Charakterisierung sowie Multianalyt-ELISA-Untersuchungen nach zeitlich begrenzter Kultivierung von intaktem Gewebe (Abbildung 2). Die Kombination der oben genannten experimentellen Ansätze erlaubte die gleichzeitigen Messungen der zellulären Zusammensetzung und Expression löslicher Proteine sowie die Zusammenführung der Daten in Cluster-Analysen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Zytokin IL-6 gelegt, denn aus früheren Arbeiten war bekannt, dass die Expression von IL-6 in geschädigten Gelenken stark variiert und mit dem Ausmaß der Gelenkschädigung assoziiert ist [3, 6, 7, 10, 23].

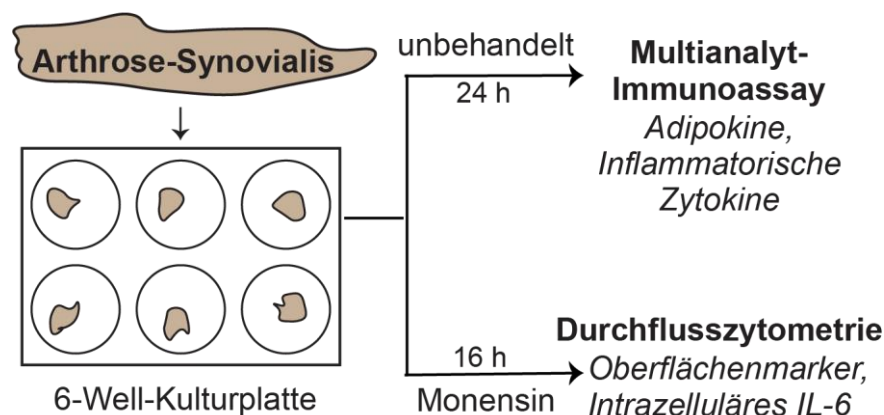


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Synovialgewebe wurde in Proben von ca. 100 mg portioniert und in 6-Loch-Platten kultiviert. Nach 24 h wurde von drei unbehandelten Proben pro Spender Überstand abgenommen und in jedem Überstand die Konzentration von Adipokinen, Zytokinen und Chemokinen durchflusszytometrisch in einem Multianalyt-Immunoassay bestimmt. Weitere zwölf Proben pro Gewebeverdauer-Ansatz und Spender wurden über Nacht (ca. 16 h) mit dem Proteintransport-Inhibitor Monensin (10 μ M) behandelt. Nach ca. 16 h wurden die zwölf Gewebeproben gesammelt, mechanisch zerkleinert und enzymatisch zersetzt, um die synovialen Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Die Expression von Oberflächenmarkern und intrazellulärem IL-6 wurde anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

7.2 Überblick über die synovialen Zellpopulationen

Im Synovialgewebe sind im Wesentlichen drei verschiedene Zellpopulationen zu finden:

hämatopoetische Zellen (CD45⁺), Endothelzellen (CD45⁻CD31⁺) und mesenchymale Zellen (CD45⁻CD31⁻). Die Unterscheidung dieser drei Zellgruppen erfolgte durchflusszytometrisch in einem sogenannten Plot, einer zweidimensionalen Darstellung der Zellen anhand der Expression zweier Parameter, in diesem Fall der Oberflächenmarker CD31 und CD45. CD31 markierte dabei die Endothelzellen und CD45 die hämatopoetischen Zellen (siehe 5.5).

Die Eingrenzungsstrategie (engl. *Gating*) zur Unterscheidung der drei Zellgruppen wurde an einem untersuchten Spender beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt. Die Synovialis des dargestellten Spenders enthielt 35,3 % CD45⁺ hämatopoetische Zellen (blau), 3,4 % CD45⁻CD31⁺ Endothelzellen (grün) und 61,0 % CD45⁻CD31⁻ mesenchymale Zellen (rot). Die Farbkodierung wurde auch in den folgenden Abbildungen beibehalten.

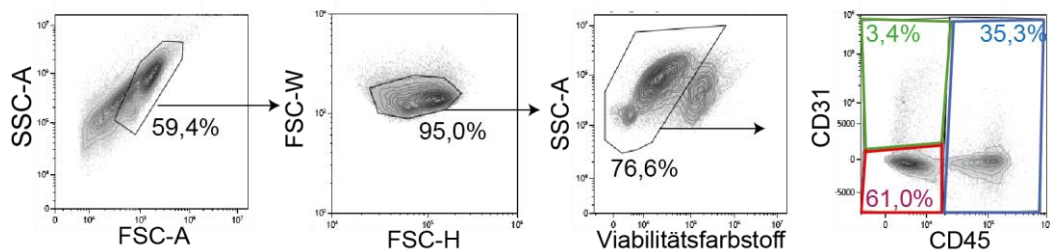


Abbildung 3: Gating-Strategie zur Unterscheidung von hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen und mesenchymalen Zellen

Durch Darstellung von Zellgröße (Vorwärtsstreuung = FSC-A) gegen Granularität (Seitwärtsstreuung = SSC-A) konnten synoviale Zellpopulationen unter Ausschluss von Zelltrümmern identifiziert werden. Sogenannte Doubletten, also aneinander haftende Zellen, wurden in der FSC-Weite (FSC-W)/FSC-Höhe (FSC-H)-Grafik ausgeschlossen. Die Einzelzellen wurden in der SSC-A/Viabilitätsfarbstoff (Zombie Aqua™)-Grafik dargestellt und die nicht gefärbten, also vitalen, Zellen ausgewählt. Schließlich wurden die drei großen synovialen Zellpopulationen anhand der Expression von CD31 und CD45 unterschieden: CD45⁺ hämatopoetische Zellen (blau), CD45⁻CD31⁺ Endothelzellen (grün) und CD45⁻CD31⁻ mesenchymale Zellen (rot).

7.3 Etablierung der Kultivierungsbedingungen

7.3.1 Definieren der Gewebemenge

Zunächst wurde die Menge an Synovialgewebe definiert, die nötig war, um die prozentualen Anteile der drei großen Zellpopulationen akkurat zu bestimmen. Hierfür wurde das Synovialgewebe eines Spenders mechanisch in Gewebeproben von je ca. 100 mg zerteilt. Aus diesen Gewebestücken wurden nun zufällig Proben ausgewählt und für jeden Versuch in je zweimal 4, 8 und 12 Proben (ca. 400, 800 und 1200 mg) zusammengefasst (Replikate). Das Gewebe jedes Versuchsansatzes wurde getrennt voneinander enzymatisch zersetzt und die Zellausbeute bestimmt (siehe 6.5). Wie erwartet, nahm die Zellzahl linear mit der Gewebemenge zu (Abbildung 4B).

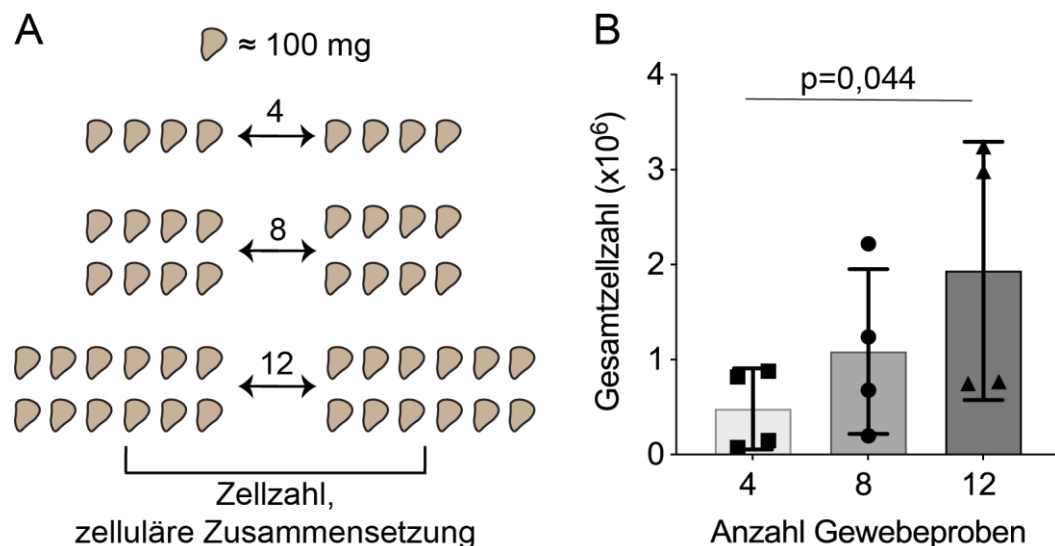


Abbildung 4: Der Einfluss der Gewebemenge auf die Zellausbeute

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Für den Versuch wurde das Synovialgewebe eines Spenders in ca. 100 mg schwere Proben zerteilt und in Gruppen von je zweimal 4, 8 und 12 Proben (Replikate) zusammengefasst. (B) Das Gewebe jedes Versuchsansatzes wurde getrennt voneinander enzymatisch zersetzt (Verdau-Protokoll 1, 800 $\mu\text{g/ml}$ Dispase, für 2 h) und die Zellausbeute nach Trypanblau-Exklusion manuell mithilfe einer Zählkammer bestimmt.

Statistik in (B): Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, $n=4$ (Messdaten der Replikate gemittelt). Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer, einfaktorierlicher Varianzanalyse mit wiederholten Messungen. Der Unterschied der Zellausbeute zwischen 4 und 12 Gewebeproben war statistisch signifikant, $p=0,044$.

Zur Bestimmung des Einflusses der Gewebemenge auf die Zuverlässigkeit bei der Analyse der zellulären Zusammensetzung wurden die Replikate jedes Versuchsansatzes voneinander subtrahiert.

Ergebnisse

Überraschenderweise führten alle Versuchsansätze zu relativ zuverlässigen Ergebnissen bezüglich der grundsätzlichen zellulären Zusammensetzung des Gewebes. Untersucht wurden die prozentualen Anteile von CD45⁺ hämatopoetischen Zellen, CD45⁻CD31⁺ Endothelzellen und CD45⁻CD31⁻ mesenchymalen Zellen (Abbildung 5).

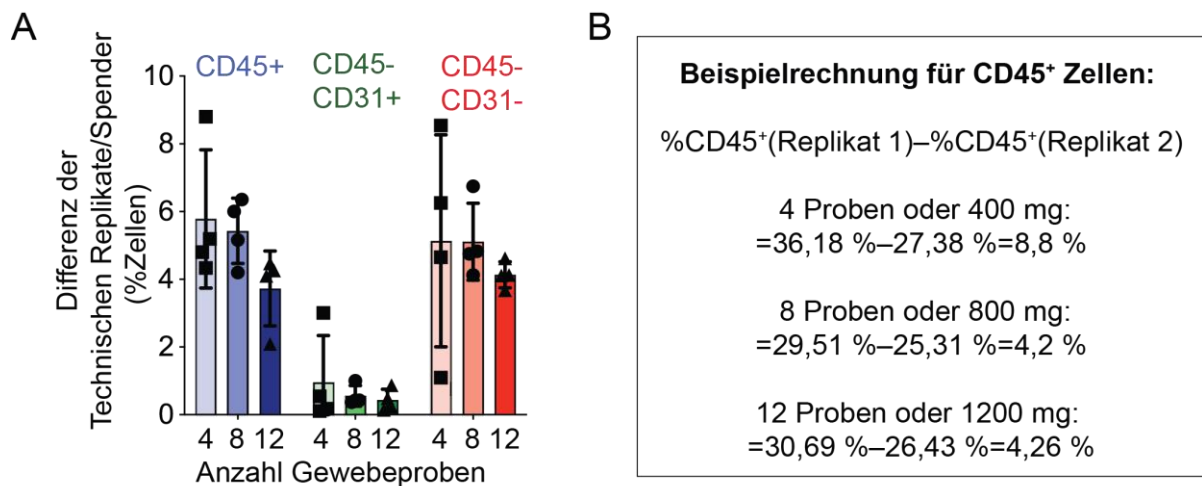


Abbildung 5: Der Einfluss der Gewebemenge auf die technische Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Messung der prozentualen zellulären Zusammensetzung

Synovialgewebe eines Spenders wurde in ca. 100 mg große Proben zerteilt. Je zweimal 4, 8 und 12 Proben wurden zusammengefasst und die Replikate getrennt voneinander enzymatisch zersetzt (Verdau-Protokoll 1, 800 µg/ml Dispase, für 2 h). (A) Die prozentualen Anteile von hämatopoetischen Zellen (CD45⁺), Endothelzellen (CD45⁻CD31⁺) und mesenchymalen Zellen (CD45⁻CD31⁻) wurden durchflusszytometrisch bestimmt und die Replikate jedes Versuchsansatzes voneinander subtrahiert. (B) Exemplarische Darstellung des Rechenwegs am Beispiel der CD45⁺ hämatopoetischen Zellen. Statistik in (A): Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, n=4. Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer, einfaktorier Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

Im nächsten Schritt wurden bei gleichem Versuchsaufbau auch die hämatopoetischen (Abbildung 6A+B) und mesenchymalen Zellmarker (Abbildung 6C+D) untersucht.

Erneut zeigte sich selbst bei Analyse der technischen Replikate des 400 mg-Versuchsansatzes (4 Proben) mit einer mittleren Differenz < 10 % wenig Expressionsvarianz der analysierten Oberflächenmarker.

Obwohl die Unterschiede bei vier untersuchten Spendern keine statistische Signifikanz erreichten, führte eine höhere Gewebemenge tendenziell zu geringerer Expressionsvarianz. Aus diesem Grund wurden für alle folgenden

Ergebnisse

durchflusszytometrischen Analysen je zwölf Gewebeproben untersucht.

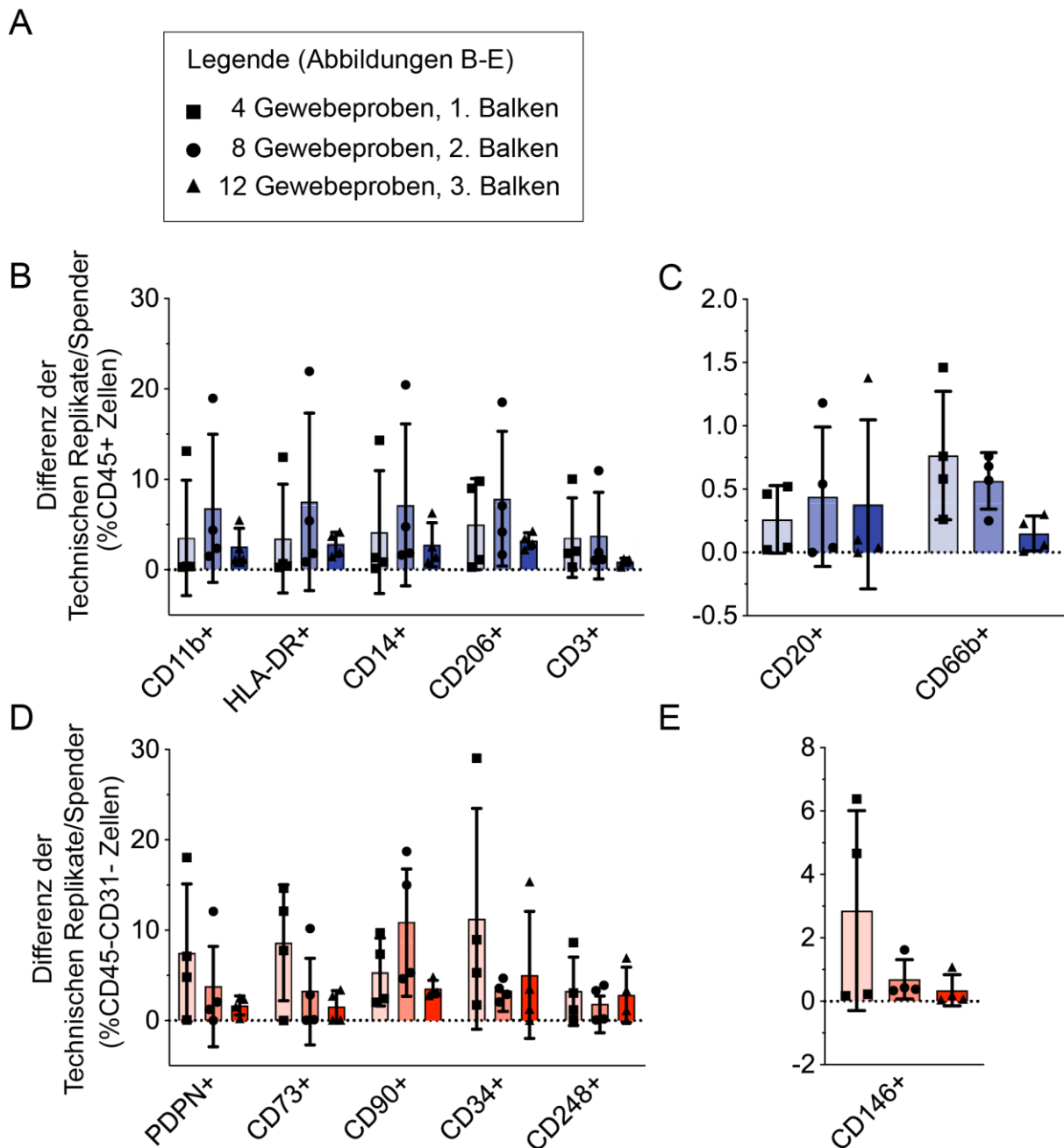


Abbildung 6: Der Einfluss der Gewebemenge auf die technische Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Messung von hämatopoetischen und mesenchymalen Oberflächenmarkern

Synovialgewebe eines Spenders wurde in ca. 100 mg große Proben zerteilt. Je zweimal 4, 8 und 12 Proben wurden zusammengefasst und die Replikate getrennt voneinander enzymatisch zersetzt.

(A) Legende für die Abbildungen B-E. Die Expression von hämatopoetischen (B+C, Vor-Gate CD45⁺) und mesenchymalen Zellmarkern (D+E, Vor-Gate CD45⁻CD31⁻) wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Replikate jedes Versuchsansatzes voneinander subtrahiert. Panel C+E wurden wegen abweichender Skalierung getrennt von den Hauptgraphen B+D dargestellt.

Zuordnung von Oberflächenmarkern und Zelltypen: hämatopoetische Immunzellen (CD45⁺); Makrophagen CD11b, HLA-DR, CD14, CD206; Neutrophile CD66b, (CD11b);

Ergebnisse

B-Zellen CD20, HLA-DR; T-Zellen CD3; mesenchymale Zellen (CD45⁺CD31⁻): Perizyten CD146; Fibroblasten Podoplanin (PDPN), CD73, CD90, CD34, CD248.

Statistik: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, n=4. Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer, einfaktorier Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

7.3.2 Übernachtkultivierung mit Monensin

Um das sekretorische Protein IL-6 für durchflusszytometrische Analysen zugänglich zu machen, wurden alle für durchflusszytometrische Untersuchungen bestimmten Gewebeproben mit dem Proteintransport-Inhibitor Monensin (10 μ M) über Nacht vorbehandelt. Um sicherzugehen, dass die Übernachtkultur und Vorbehandlung mit Monensin die zelluläre Zusammensetzung des Synovialgewebes dabei nicht verfälschte, wurden die Zellausbeute und Zusammensetzung aus frischem Gewebe an Tag 0 (Tag der Gewebeentnahme) und aus mit Monensin vorbehandeltem Gewebe an Tag 1 verglichen. Die Übernachtkultur mit Monensin reduzierte die Zellausbeute um etwa ein Drittel (Abbildung 7B).

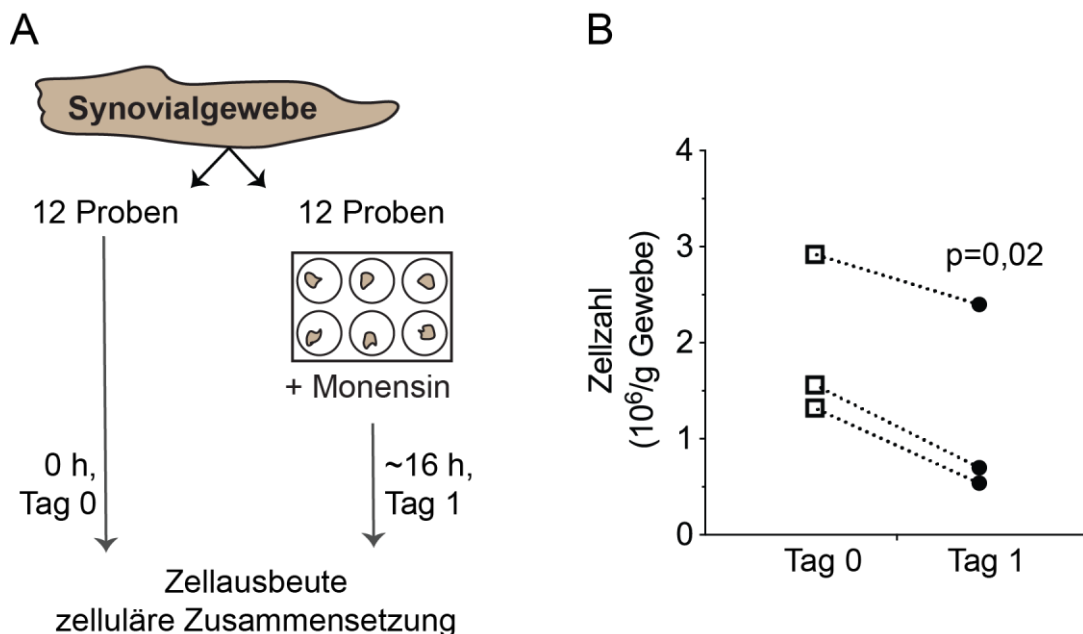


Abbildung 7: Der Einfluss von Monensin auf die zelluläre Ausbeute

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Je zwölf ca. 100 mg schwere Gewebeproben pro Spender wurden an Tag 0 und Tag 1 nach Übernachtkultivierung mit Monensin (10 μ M) enzymatisch zersetzt (Verdau-Protokoll 1, 800 μ g/ml Dispase, für 2 h). An beiden Tagen wurde die Zellausbeute manuell auf einer Zählkammer nach Trypanblau-Exklusion bestimmt. Statistik in (B): Anwendung des t-Tests zur statistischen Auswertung, n=3. Der Unterschied der Zellausbeute zwischen Tag 0 und Tag 1 erreichte statistische Signifikanz, p=0,02.

Ergebnisse

Die genauere Analyse der zellulären Zusammensetzung zeigte aber, dass der Zellverlust weder die Hauptpopulationen (Abbildung 8B) noch ihre spezifischen Untergruppen disproportional beeinträchtigte (Abbildung 8C+D).

Insgesamt blieb die generelle zelluläre Zusammensetzung durch die Monensin-Vorbehandlung weitgehend unverfälscht. Die Varianz war bei Normierung auf Tag 0 in kleineren Zellpopulationen wie den CD45⁺CD66b⁺ Neutrophilen (Abbildung 8B), CD45⁺CD3⁺ T-Zellen, CD45⁺CD20⁺ B-Zellen und CD45⁻CD31⁻CD146⁺ Perizyten (Abbildung 8C) sichtbar größer, erreichte aber bei n=3 Wiederholungen keine statistische Signifikanz. Somit konnte der gewählte *Ex-vivo*-Versuchsansatz für die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine validiert werden.

Ergebnisse

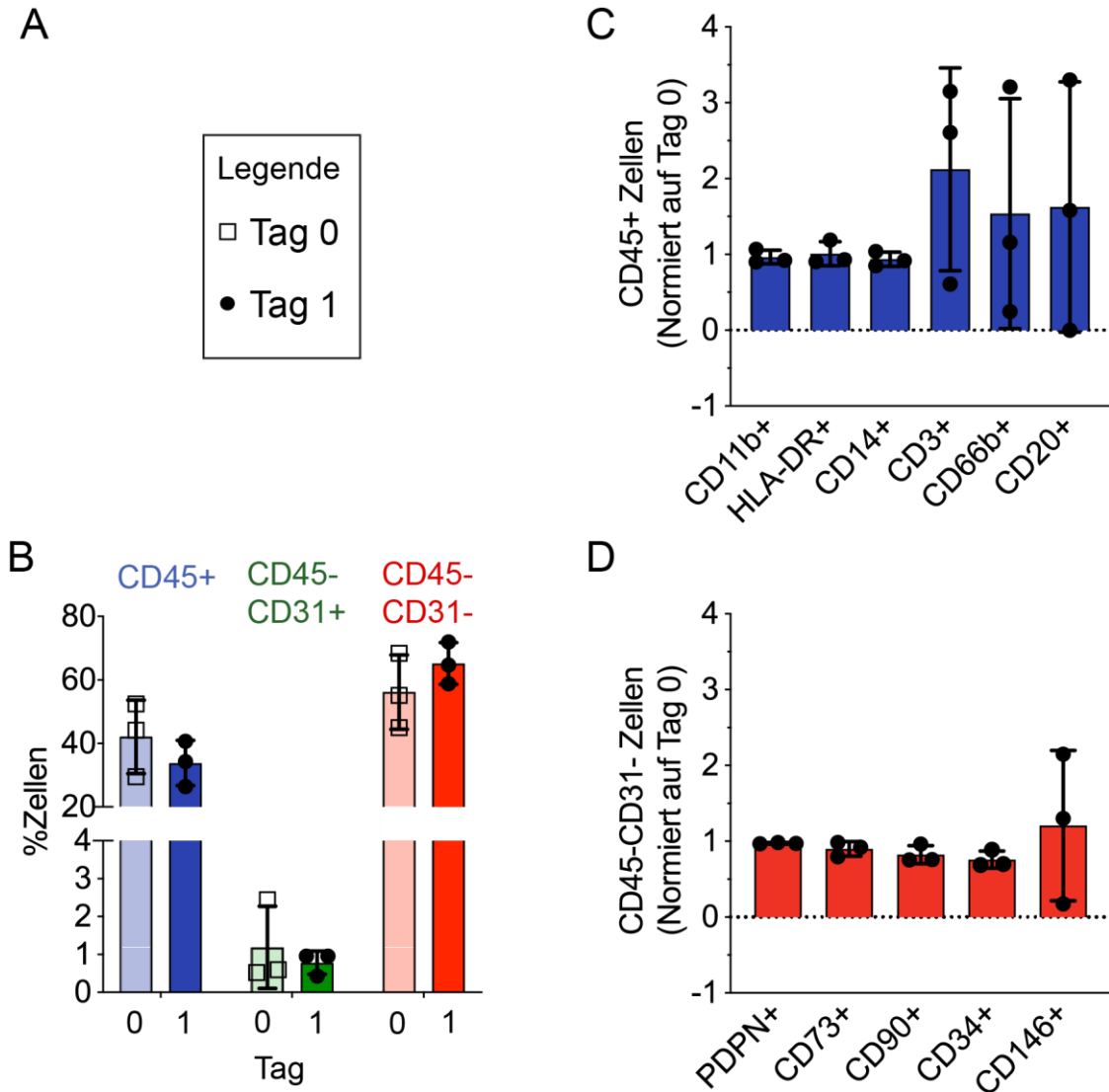


Abbildung 8: Der Einfluss von Monensin auf die zelluläre Zusammensetzung

Je zwölf ca. 100 mg schwere Gewebeproben pro Spender wurden an Tag 0 und Tag 1 nach Übernachtkultivierung mit Monensin (10 μ M) enzymatisch zersetzt (Verdau-Protokoll 1, 800 μ g/ml Dispase, für 2 h). Durch Färbung wurde die Expression von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Legende für Abbildung B. (B) Vergleich der absoluten prozentualen Anteile von CD45⁺ hämatopoetischen Zellen, CD45⁻CD31⁺ Endothelzellen und CD31⁻CD45⁻ mesenchymalen Zellen an Tag 0 (blass gefärbte Balken, Datenpunkte=Quadrate) und Tag 1 (kräftig gefärbte Balken, Datenpunkte=Kreise). (C+D) Die auf Tag 0 normierten prozentualen Anteile der hämatopoetischen (C, Vor-Gate CD45⁺) und mesenchymalen Zellmarker (D, Vor-Gate CD45⁻CD31⁻) sind dargestellt.

Zuordnung von Oberflächenmarkern und Zelltypen: hämatopoetische Immunzellen (CD45⁺): Makrophagen CD11b, HLA-DR, CD14; Neutrophile CD66b, (CD11b); B-Zellen CD20, HLA-DR; T-Zellen CD3; Endothelzellen (CD45⁻CD31⁺): CD31; mesenchymale Zellen (CD45⁻CD31⁻): Perizyten CD146; Fibroblasten Podoplanin (PDPN), CD73, CD90, CD34.

Statistik: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, n=3. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels t-Test (B) und parametrischer, einfaktorier Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche (C+D). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

7.4 Optimierung der enzymatischen Gewebezersetzung

Um das Herauslösen der Zellen aus der extrazellulären Matrix zu erleichtern, wurde der enzymatische Gewebeverdaue gegenüber der alleinigen mechanischen Zersetzung bevorzugt. Enzymatische Gewebezersetzung kann den durchflusszytometrischen Nachweis von Oberflächenmolekülen durch deren Abspaltung verhindern. Eine wesentliche methodische Zielsetzung dieser Arbeit war deshalb die Optimierung des enzymatischen Gewebeverdaus für die durchflusszytometrische Analyse einer Vielzahl von Oberflächenmolekülen verschiedener Zelltypen. Getestet wurden sechs Protokolle, die allesamt in früheren Studien synovialer oder mesenchymaler Zellen zur Anwendung gekommen waren (Tabelle 2) [53-57, 164].

Alle sechs Enzymcocktails enthielten 50 µg/ml DNase, unterschieden sich aber hinsichtlich zwischenzeitlicher Erneuerung des Verdaumediums, der Gesamtdauer des Verdaus und weiterer Enzymzusätze.

Tabelle 2: Zusammenfassung der sechs verschiedenen getesteten Verdaubedingungen

Ansatz Nr.	Enzyme*			Wechsel Medium	Dauer Verdaue Stunden
	Dispase (µg/ml)	Kollagenase P	Liberase™ TL		
1	800	+	-	+	1-2
2	80	+	-	+	1-2
3	8	+	-	+	1-2
4	-	-	+	-	0.5
5	-	-	+	-	1
6	-	+	-	-	1

**DNase in allen Versuchsansätzen*

Die ersten drei Gewebeverdaue-Ansätze (1 bis 3) waren an Protokolle zur Extraktion fibroblastischer retikulärer Zellen aus Lymphknoten angelehnt und enthielten neben Kollagenase P die Protease Dispase in unterschiedlichen Konzentrationen [164]. In 15-minütigen Abständen wurde das Verdaumedium bis hin zur vollständigen Gewebezersetzung nach etwa 2 h erneuert.

Ergebnisse

Die Verdauansätze 4 bis 6 ähnelten früheren Protokollen zur Zersetzung von Synovialgewebe [53-55]. Hier wurde das Gewebe ohne Enzym-Erneuerung für eine begrenzte Zeit verdaut. In den Ansätzen 4 und 5 kam der käuflich erwerbliche Enzymcocktail Liberase™ TL aus Kollagenase und Thermolysin zum Einsatz. Die zeitliche Gesamtlänge des Verdaus war auf 30 min in Ansatz 4 bzw. auf 60 min in Ansatz 5 begrenzt. In Verdauansatz 6 wurde Kollagenase P bei einer Verdaudauer von 60 min ohne Dispase- und Liberase-Zusätze getestet.

7.4.1 Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Zellausbeute und Zellviabilität

Der Einsatz von Dispase in hoher Konzentration in Kombination mit Enzym-Erneuerung und längerer Gesamtdauer des Verdaus in Ansatz 1 steigerte die Zellausbeute verglichen mit den übrigen Verdaubedingungen (Ansätze 2-6) signifikant (Abbildung 9A). Durch Gewebezersetzung mit der höchsten Dispase-Konzentration (Protokoll 1) wurden durchschnittlich $1,8 \times 10^6$ Zellen pro Gramm Gewebe isoliert, mehr als doppelt so viele wie durch Anwendung aller anderen Protokolle (2-6).

Eine Ursache für die höhere zelluläre Ausbeute in Verdauansatz 1 lag in der erreichten höheren Zellviabilität (Abbildung 9B). Sie war in Verdauansatz 1 mit durchschnittlich 62,1 % am größten und nach enzymatischer Zersetzung mit nur 8 µg/ml Dispase (3), Liberase™ (4+5) und Kollagenase P (6) signifikant geringer.

Ergebnisse

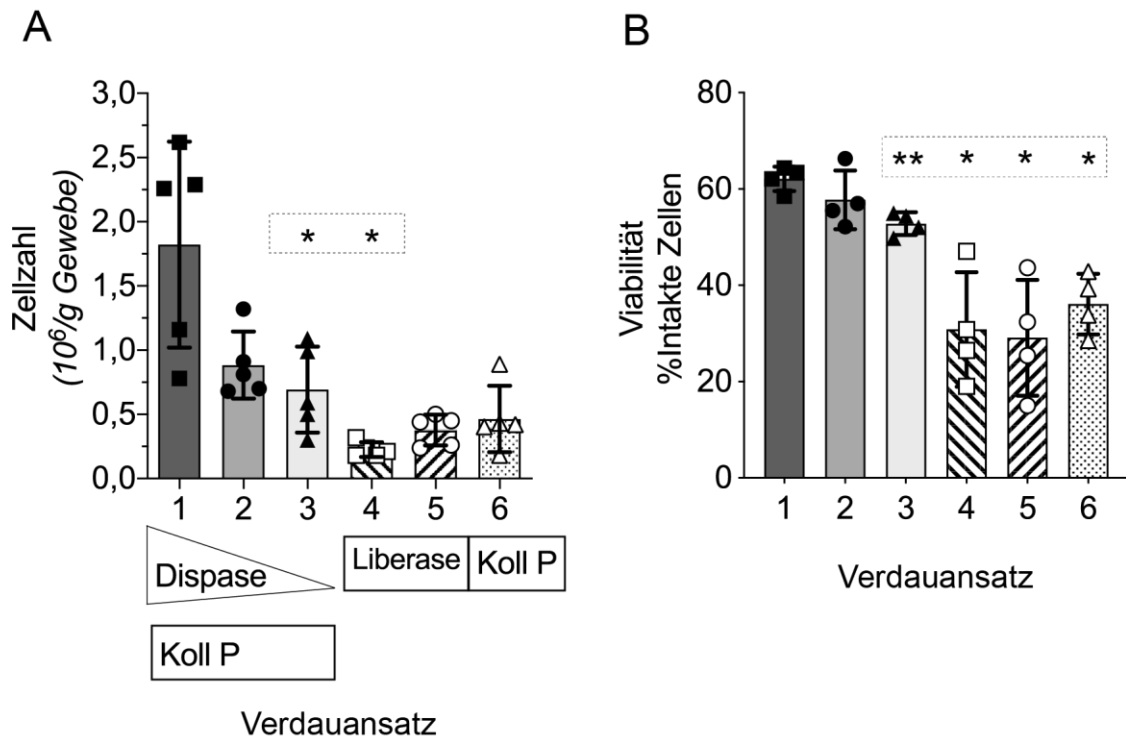


Abbildung 9: Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Zellausbeute und Zellviabilität

Ca. 1200 mg Gewebe pro Verdauungsansatz und Spender wurde nach sechs verschiedenen Protokollen enzymatisch zersetzt. (A) Die Zahl intakter Zellen/g Gewebe wurde nach Trypanblau-Exklusion manuell mithilfe einer Zählkammer bestimmt (siehe 6.5). (B) Die Zellviabilität wurde im Anschluss durch Färbung mit dem fixierbaren Viabilitätsfarbstoff Zombie Aqua™ durchflusszytometrisch gemessen.

Eine schematische Darstellung der Protokolle der Verdauungsansätze 1-6 befindet sich unter Graph A (siehe auch Tabelle 2), Koll P = Kollagenase P.

Statistik: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, A: n=5, B: n=4. Der Unterschied bei der Anzahl an Wiederholungen ergab sich daraus, dass die Viabilitätsfärbung in einem der gezeigten Versuchsansätze nicht auswertbar war. Ein Versuch musste von den folgenden durchflusszytometrischen Analysen ausgeschlossen werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer, einfaktorieller Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche. Die p-Werte beschreiben jeweils die Signifikanz des Unterschieds zu Verdauungsansatz 1. * p<0,05, ** p<0,01.

7.4.2 Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die durchflusszytometrische Messung der zellulären Zusammensetzung

Erwartungsgemäß waren auch die absoluten Zahlen der hämatopoetischen Zellen (CD45⁺, blau), Endothelzellen (CD45⁻CD31⁺, grün) und mesenchymalen Zellen (CD45⁻CD31⁻, rot) in Ansatz 1 am höchsten (Abbildung 10A). Allerdings wurden bei Vergleich der verschiedenen Verdauungsansätze keine Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Anteile der drei Zellgruppen gefunden (Abbildung 10B). Dies zeigte,

Ergebnisse

dass die hier untersuchten Zellpopulationen der Synovialis durch Anwendung aller untersuchten Verdauprotokolle adäquat isoliert werden konnten.

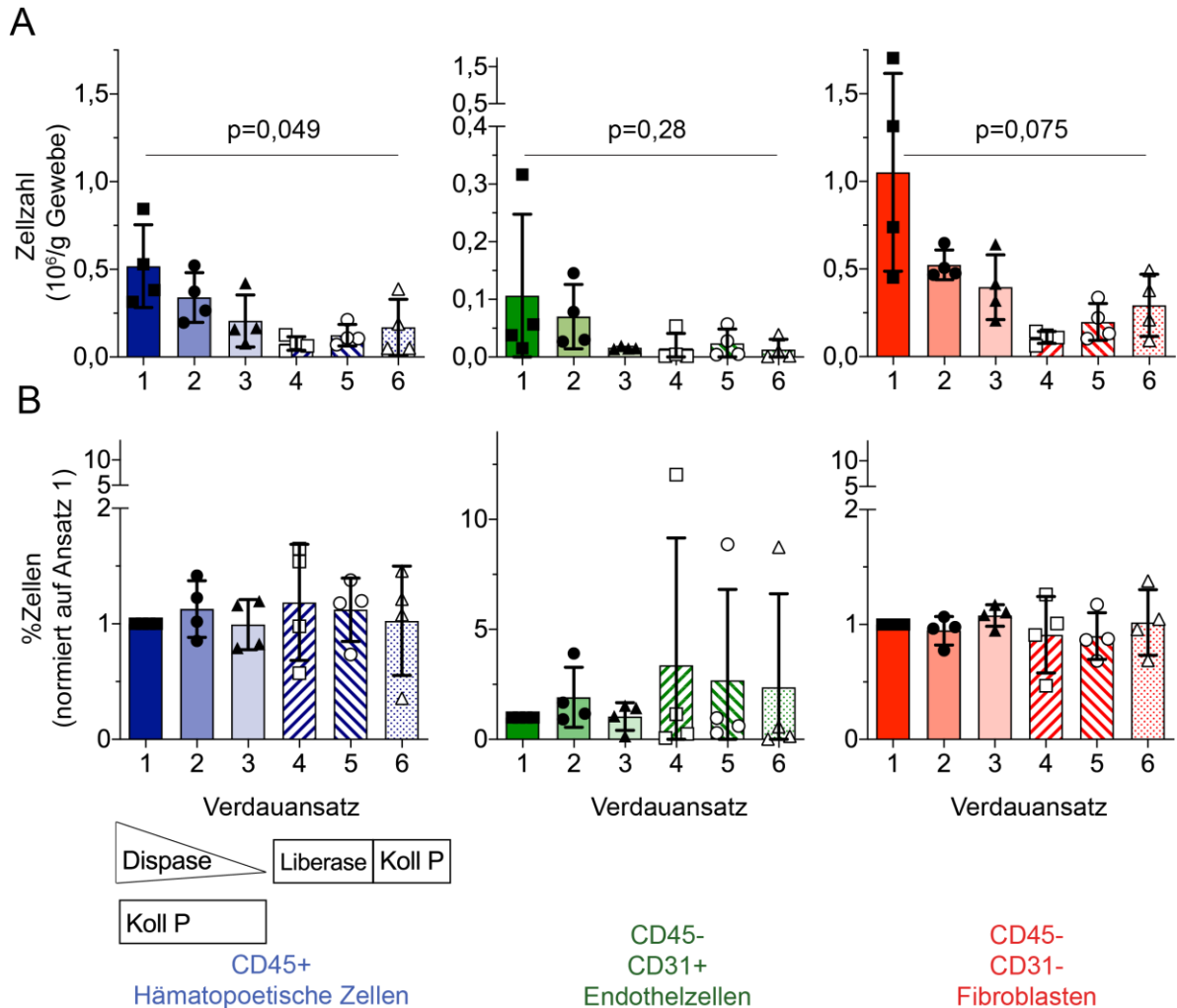


Abbildung 10: Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die durchflusszytometrische Messung der zellulären Zusammensetzung

Synovialgewebe von vier Spendern wurde nach sechs verschiedenen Verdauprotokollen enzymatisch zersetzt. Nach Bestimmung von Zellausbeute und Zellviabilität wurden die absoluten Zahlen (A) und prozentualen Anteile (B) von CD45⁺ hämatopoetischen Zellen, CD45⁻CD31⁺ Endothelzellen und CD45⁻CD31⁻ mesenchymalen Zellen bestimmt. Der prozentuale Anteil (B) wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellzahl der unterschiedlichen Populationen (A) wurde aus der manuell gemessenen Zelldichte und den durchflusszytometrisch bestimmten prozentualen Anteilen berechnet. Der prozentuale Anteil der drei Zelltypen (B) wurde auf Verdauansatz 1 (Dispase 800 µg/ml, für 2 h) normiert.

Eine schematische Darstellung der Protokolle der Verdauansätze 1-6 befindet sich unter Graph B der hämatopoetischen Zellen (siehe auch Tabelle 2), Koll P = Kollagenase P.

Statistik: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, n=4. Die statistische Auswertung erfolgte mittels parametrischer, einfaktorier Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche. Die Unterschiede zwischen Verdauansatz 1 und den anderen Verdaubedingungen (2-6) erreichten im Einzelnen keine statistische Signifikanz. Gezeigt sind die p-Wert-Zusammenfassungen über alle Verdaubedingungen. Die nicht gezeigten p-Werte in (B) sind alle größer als 0,2.

Ergebnisse

7.4.3 Zelltyp-spezifische Feinabstimmung der enzymatischen Gewebezersetzung

Anschließend wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Gewebezersetzungen auf die Färbung der Oberflächenmarker für durchflusszytometrische Analysen getestet.

Die Anwendung von Proteasen birgt die Gefahr der Abspaltung von Oberflächenmarkern. Gleichzeitig ist das Herauslösen der Zelle aus dem Gewebeverband durch Zerschneiden von Bestandteilen der extrazellulären Matrix essenziell. Weil verschiedene Zelltypen im Synovialgewebe unterschiedlich lokalisiert sind und verschiedene Oberflächenmarker Unterschiede in Aufbau und Stabilität aufweisen, war anzunehmen, dass zelltypspezifische Verdauprotokolle den durchflusszytometrischen Nachweis der einzelnen Zellpopulationen verbessern können.

Für viele der untersuchten Marker wie z.B. CD8, CD45RA, CD45RO, CD11b, CD14, HLA-DR und CD206 (siehe 5.5 - 5.6) ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (Tabelle 3).

Ergebnisse

Tabelle 3: Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Färbung von Oberflächenmarkern

Synovialgewebe von n=3-5 Spendern wurde auf sechs verschiedene Weisen enzymatisch zersetzt (siehe Tabelle 2, ca. 1200 mg Gewebe pro Verdauansatz). Die hier aufgelisteten Oberflächenmarker wurden im Anschluss durchflusszytometrisch gefärbt.

Zuordnung von Oberflächenmolekülen und Zelltypen: mesenchymale Zellen (CD45⁻CD31⁻):

Perizyten CD146; Fibroblasten Podoplanin (PDPN), CD73, CD90, CD34, CD248; hämatopoetische Immunzellen (CD45⁺): Makrophagen CD11b, HLA-DR, CD14, CD206; Neutrophile CD66b, (CD11b); B-Zellen CD20, HLA-DR; T-Zellen CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO; NK-Zellen CD16, CD56.

Statistik: Darstellung der absoluten prozentualen Werte (nicht normiert). **Statistisch signifikante Unterschiede** (in der Tabelle fett gedruckt und unterstrichen) wurden mittels parametrischer, einfaktorierter Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche ermittelt. Als Referenz diente immer *der Verdauansatz mit dem durchschnittlich größten prozentualen Anteil* des jeweils untersuchten Zellmarkers (kursiv gedruckt).

Oberflächenmarker	Vor-Gate	Verdauansatz					
		1	2	3	4	5	6
		%Oberflächenmarker					
Fibroblasten							
Podoplanin	CD31 ⁻ CD45 ⁻	82,63	71,9	74,6	51,87	62,7	50,46
CD73		79,58	64,77	66,57	29,64**	35,37	28,63
CD90		54,08	46,23	48,0	46,46	26,67	19,75
CD34		30,9	26,0	24,43	7,78	7,16	4,88*
CD146		4,34	3,21	1,87**	1,85	0,65*	0,50**
CD248		7,76	15,43	11,87	13,05	15,27	17,29
Hämatopoetische Zellen							
CD11b	CD45 ⁺	76,22	74,37	76,92	77,9	75,36	80,81
HLA-DR		75,31	74,74	76,71	76,87	74,7	80,31
CD14		73,96	70,73	72,03	72,83	69,85	76,65
CD206		65,06	69,38	70,39	59,15	52,61	54,01
CD3		13,93	15,53	14,05	15,32	17,14	12,0
CD20		1,99	1,55	1,22	0,55	0,78	0,56
CD66b		2,2	2,84	2,9	6,3	5,8	4,91
T-Zellen							
CD4	CD45 ⁺ CD11b ⁻ CD20 ⁻ CD3 ⁺	0,91***	28,41**	57,32	53,84	41,38	56,44
CD8		31,87	35,23	38,2	38,66	40,35	39,65
CD45RA		25,28	27,66	29,33	39,8	40,11	33,61
CD45RO		78,76	77,05	74,69	67,27	67,7	69,69
NK-Zellen							
CD16	CD45 ⁺ CD11b ⁻ CD20 ⁻ CD3 ⁻	25,83	28,96	29,05	39,48	38,65	36,26
CD56		4,13	12,6*	17,22**	57,37	50,77	36,13

* p<0.05 ** p<0.01 ***p<0.001
einfaktorielle Varianzanalyse mit wiederholten Messungen

Während die Oberflächenmarker von Makrophagen von den untersuchten Verdaubedingungen unbeeinflusst blieben, wurde die Färbung anderer Zellpopulationen, unter ihnen CD4⁺ T-Helferzellen, NK-Zellen und Fibroblasten, durch die Art des Gewebeerdaus beeinflusst.

Die Reduktion der Dispase-Konzentration verbesserte den Nachweis des T Zell-Ko-Rezeptors CD4 (siehe 5.6.3) signifikant, wie in den Beispiel-Plots in Abbildung 11 dargestellt ist.

Ergebnisse

Abhängig von der Verdaubedingung wurden die durchschnittlichen Anteile CD4⁺ Zellen in Prozent (Abbildung 11A+C) und die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für CD4 (Abbildung 11D) verglichen. Mit der MFI lässt sich der pro Zelle gebundene Fluoreszenzfarbstoff darstellen. Somit ist der Wert indirekt ein Maß für die Expression der von den fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch gebundenen Oberflächenmoleküle pro Zelle. Die Verdauansätze mit niedriger Dispase-Konzentration (3), Liberase™ für 30 min (4) und Kollagenase P ohne Dispase (6) brachten ähnliche Prozente für CD4⁺ Zellen hervor. Höhere Dispase-Zusätze verschlechterten die CD4-Färbung signifikant. Die MFI für CD4 war im Kollagenase P-Ansatz (6) am höchsten. Sowohl der Zusatz von Dispase als auch von Thermolysin (Komponente von Liberase™) verringerten die Signalstärke.

Ergebnisse

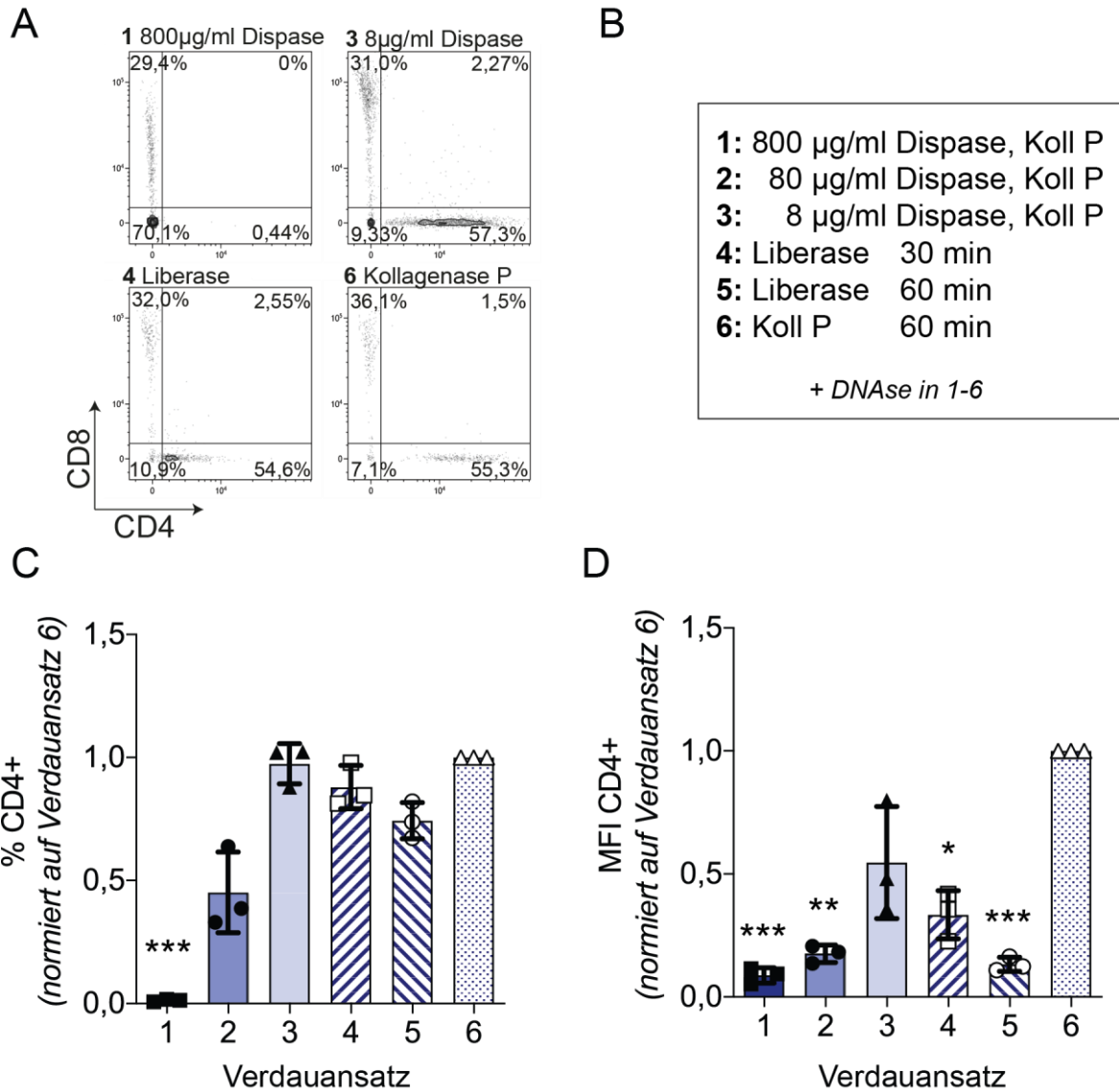


Abbildung 11: Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die CD4-Färbung

Synovialgewebe von $n=3$ Spendern wurde auf sechs verschiedene Weisen enzymatisch zersetzt und die herausgelösten Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen gefärbt. (A) Dargestellt sind repräsentative CD4/CD8-Färbungen der nach unterschiedlichen Verdauprotokollen isolierten Zellen eines Spenders (Vor-Gate CD45⁺CD3⁺). (B) Auflistung der sechs Verdauprotokolle (siehe auch Tabelle 2), Koll P = Kollagenase P.

(C+D) Der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen (C) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (D) von CD4 wurden durchflusszytometrisch gemessen (Vor-Gate CD45⁺CD3⁺). Die Ergebnisse in beiden Graphen sind auf Verdauansatz 6 normiert dargestellt.

Statistik in C+D: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, $n=3$. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels parametrischer, einfaktorierlicher Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche ermittelt. Die p-Werte beschreiben die Signifikanz des Unterschieds zu Verdauansatz 6. * $p=0,025$ ** $p=0,0006$ *** $p<0,0001$.

Ergebnisse

NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und dienen der Zytokinproduktion und Zelllyse (siehe 5.6.5). Sie bilden im Blut und vielen anderen menschlichen Gewebetypen zwei Hauptpopulationen mit den Phänotypen CD3⁻CD16⁺CD56^{schwach} und CD3⁻CD16^{schwach/-}CD56^{hoch} aus [87, 89, 91]. Die Färbung der beiden synovialen NK-Zell-Populationen wurde bei Vergleich mit den CD4⁺ T-Zellen durch andere Verdaubedingungen begünstigt. Zellen mit dem Phänotyp CD16⁺CD56^{schwach} konnten in allen Verdau-Ansätzen gemessen werden, am besten bei Gewebezersetzung mit Liberase™ für 30 min (4) (Abbildung 12A+C). Die Detektion von Zellen mit dem Phänotyp CD16^{schwach/-}CD56^{hoch} gestaltete sich hingegen schwieriger (Abbildung 12A+D). Die Liberase-Ansätze (4+5) ergaben die besten Färbungsbedingungen für diese Zellgruppe, während der Zusatz von Dispase die Detektion fast gänzlich verhinderte.

Ergebnisse

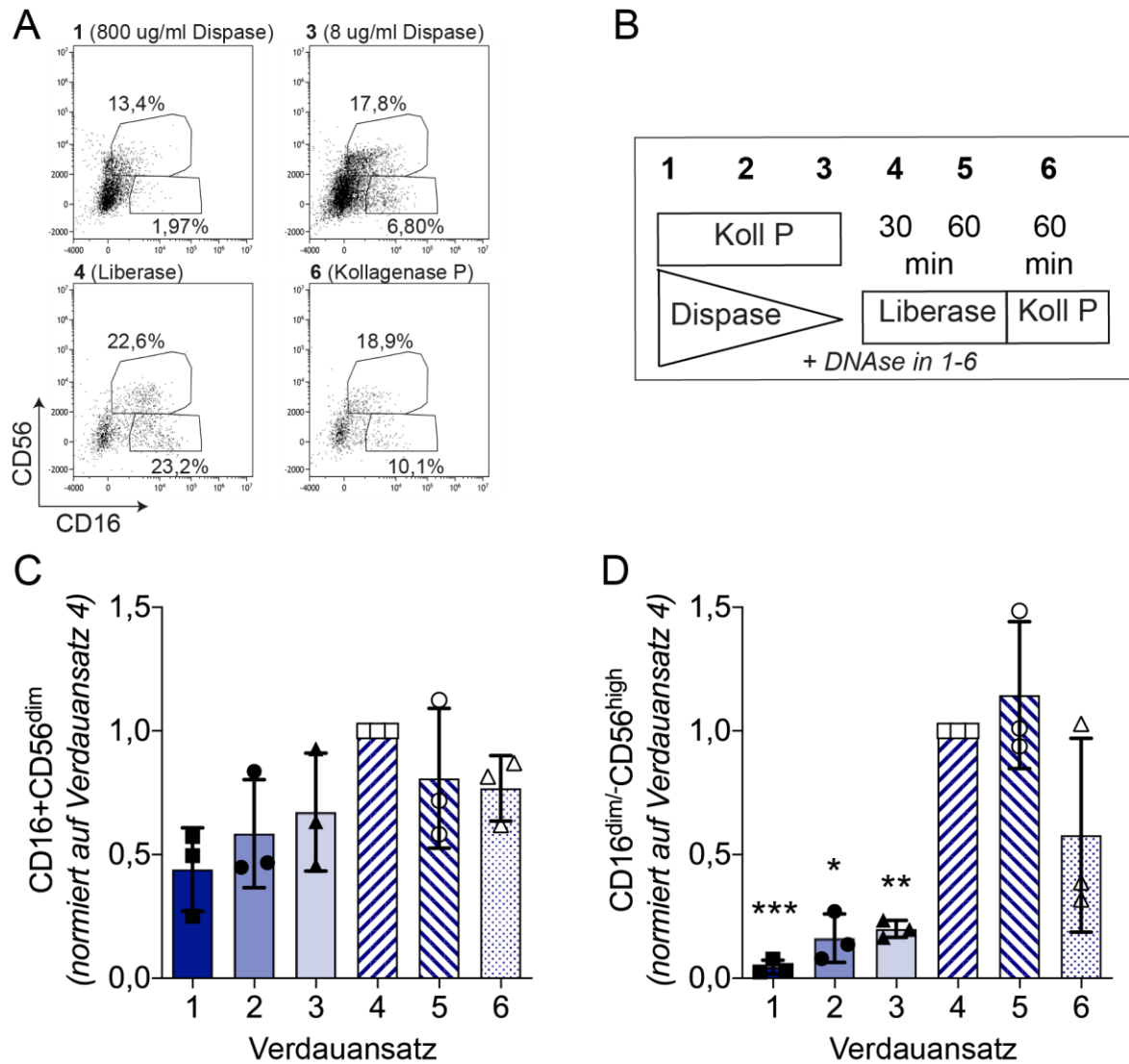


Abbildung 12: Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die NK-Zell-Färbung

Synovialgewebe von $n=3$ Spendern wurde auf sechs verschiedene Weisen enzymatisch zersetzt und die herausgelösten Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen gefärbt. (A) Dargestellt sind repräsentative CD16/CD56-Färbungen der durch unterschiedliche Verdaubedingungen isolierten Zellen eines Spenders (Vor-Gate: CD45+CD3⁻CD20⁻CD11b⁻). (B) Schematische Darstellung der sechs Gewebeerdau-Protokolle (siehe Tabelle 2), Koll P = Kollagenase P. Der prozentuale Anteil der NK-Zellen mit dem Phänotyp CD16⁺CD56^{schwach} (C) und der prozentuale Anteil der NK-Zellen mit dem Phänotyp CD16^{schwach}/CD56^{hoch} (D) wurden durchflusszytometrisch gemessen (Vor-Gate CD45+CD3⁻CD11b⁻CD20⁻). Die Ergebnisse in beiden Graphen sind auf Verdauansatz 4 (Liberase 30 min) normiert dargestellt.

Statistik in C+D: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, $n=3$. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels parametrischer, einfaktorier Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche ermittelt. (C+D) Die p-Werte beschreiben die Signifikanz des Unterschieds zu Verdauansatz 4.

* $p=0,016$ ** $p=0,0099$ *** $p<0,0001$

Im Gegensatz zu der Färbung von T- und NK-Zellen erleichterte ein aggressiverer, dispase-lastiger Gewebeerdau die Messung der mesenchymalen Zellmarker CD146, CD34, CD73 und CD90 (Abbildung 13 und 2.7). Bei Vergleich der

Ergebnisse

Färbungsergebnisse, besonders für CD146, wurde ein Titrationseffekt für Dispase deutlich (Abbildung 13C).

Tendenziell begünstigten höhere Dispase-Konzentrationen den Nachweis der meisten der in dieser Studie untersuchten Oberflächenmarker von Fibroblasten (Tabelle 3).

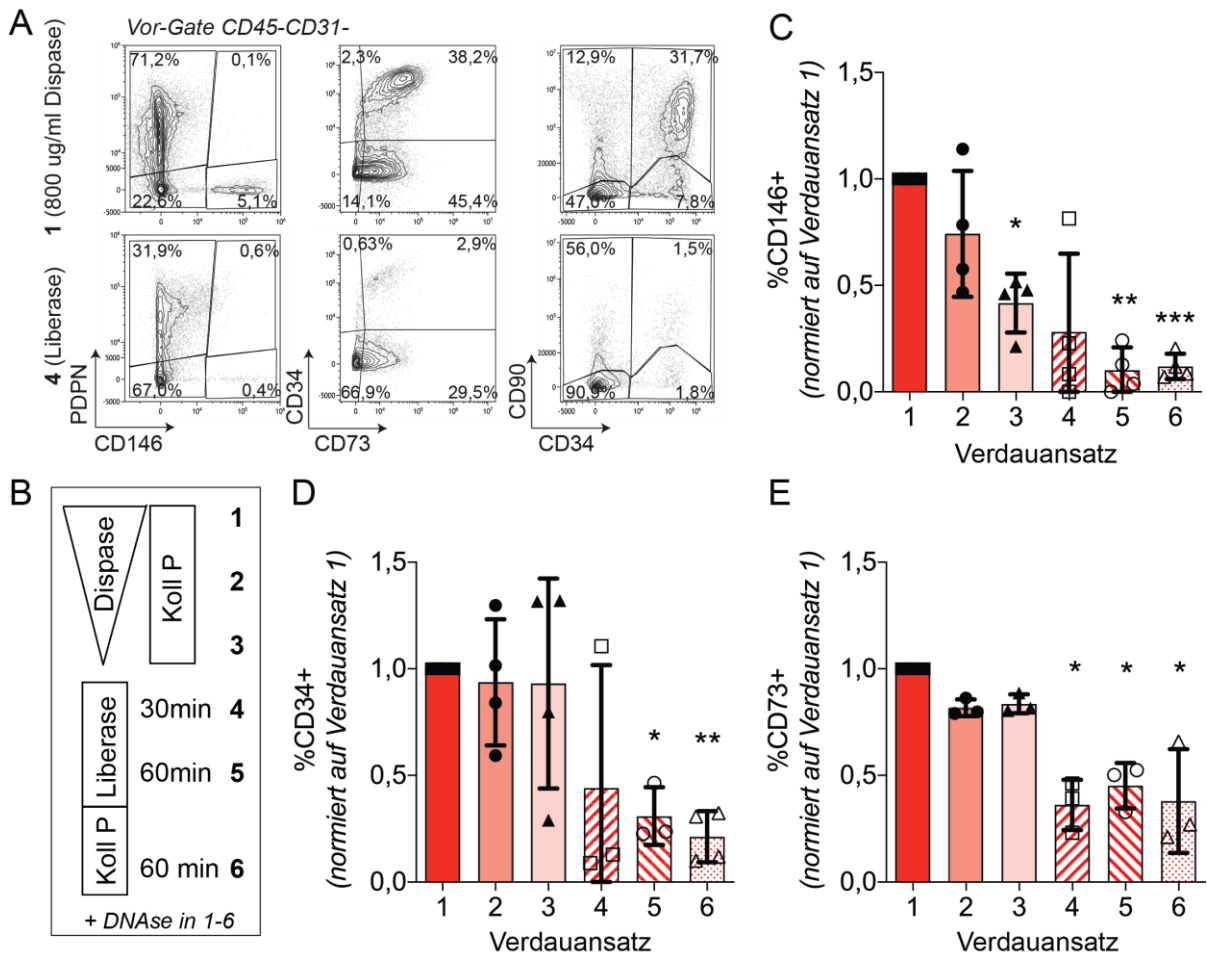


Abbildung 13: Der Einfluss der enzymatischen Gewebezersetzung auf die Färbung von mesenchymalen Zellen

Synovialgewebe von n=3-4 Spendern wurde auf sechs verschiedene Weisen enzymatisch zersetzt. Die herausgelösten Zellen wurden für durchflusszytometrische Untersuchungen gefärbt. (A) Dargestellt sind repräsentative CD146/PDPN, CD73/CD44 und CD34/CD90-Färbungen eines Spenders nach Gewebezersetzung mit Protokoll 1 (obere Reihe) und Protokoll 4 (untere Reihe) (Vor-Gate CD45⁻CD31⁻). (B) Schematische Darstellung der sechs Gewebezersetzung-Protokolle (siehe auch Tabelle 2), Koll P = Kollagenase P. Der prozentuale Anteil CD146 (C), CD34 (D) und CD73 (E) positiver mesenchymaler Zellen wurde nach Gewebezersetzung mit den sechs verschiedenen Verdauungsprotokollen durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse in den drei Graphen sind auf Verdauungsansatz 1 (800 µg/ml Dispase, für 2 h) normiert dargestellt.

Statistik: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichungen, n=3-4. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels multifaktorieller Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche ermittelt. (C+D) Die p-Werte beschreiben die Signifikanz des Unterschieds zu Verdauungsansatz 1. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p = 0,0003

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sorgfältige Optimierung der Gewebeverdau-Protokolle die Voraussetzung für verlässliche durchflusszytometrische *Ex-vivo*-Messung darstellt. Für diese Studie wurden die Protokolle 1+3 ausgewählt: Hohe Dispase-Konzentrationen (1) wurden für die Analyse der hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen verwendet. Geringe Dispase-Konzentrationen (3) kamen für die Untersuchung von T-Zellen zur Anwendung, da hierdurch insgesamt das beste Gleichgewicht aus CD4-Detektion, Zellausbeute und Kosten erzielt werden konnte. Auf weiterführende NK-Zell-Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

7.5 Die zelluläre Zusammensetzung der Synovialis bei Gelenkarthrose

7.5.1 Synoviale hämatopoetische Zellen, Endothelzellen und mesenchymale Zellen

Der folgende Abschnitt zeigt die durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung des Synovialgewebes von 35 Arthrose-Patienten.

Die pro Gramm gewonnene Zellzahl variierte mit Werten zwischen $0,2-4,2 \times 10^6/g$ Gewebe stark zwischen den 35 untersuchten Spendern (Median $1,41$ (Interquartilsabstand $1,67$) $\times 10^6/g$ Gewebe) (Abbildung 14A).

Trotz großer Patient-zu-Patient-Variabilität bildeten die mesenchymalen Zellen insgesamt die größte Gruppe ($59,9$ ($16,6$) %). Knapp 40 % der Zellen waren hämatopoetische Zellen ($37,8$ (16) %) und ca. 2 % Endothelzellen ($2,11$ ($2,23$) %) (Abbildung 14C).

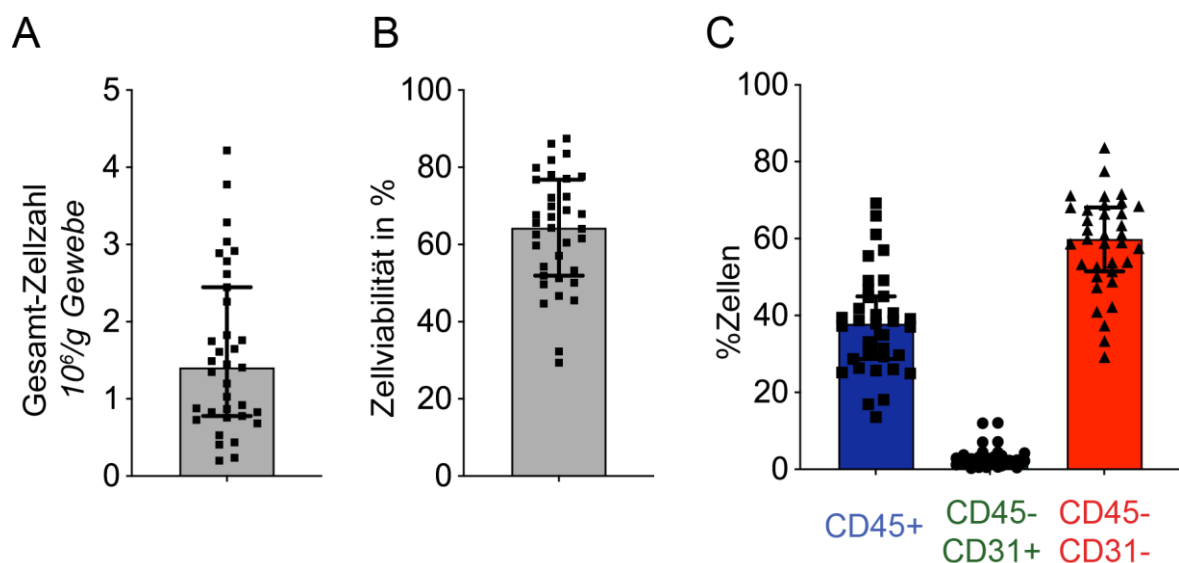


Abbildung 14: Zellausbeute, Zellviabilität und zelluläre Zusammensetzung

Synovialgewebe von $n=35$ Spendern wurde nach Verdauprotokoll 1 ($800 \mu g/ml$ Dispase, für 2 h) enzymatisch zersetzt. (A) Die Anzahl intakter Zellen nach Trypanblau-Exklusion wurde manuell mithilfe einer Zählkammer bestimmt. Gezeigt ist die Zellausbeute $\times 10^6/g$ Gewebe aller untersuchten Spender. (B) Die Zellviabilität in Prozent wurde durchflusszytometrisch durch Färbung der Zellen mit einem fixierbaren Viabilitätsfarbstoff (Zombie Aqua™, BioLegend) gemessen. (C) Der prozentuale Anteil an hämatopoetischen Zellen (CD45+, blau), Endothelzellen (CD45-CD31+, grün) und Fibroblasten (CD45-CD31-, rot) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A-C) Darstellung von Median und Interquartilsabstand, $n=35$.

7.5.2 Analyse der synovialen hämatopoetischen Zellen

7.5.2.1 Hämatopoetische Zellpopulationen

Genauere durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass innerhalb der hämatopoetischen Zellen (CD45⁺) die CD11b⁺HLA-DR⁺ Zellen (hauptsächlich Makrophagen) die größte Gruppe bildeten (71,4 (29,7) %), gefolgt von den T-Zellen (CD3⁺, 10,8 (14,3) %), Neutrophilen (CD11b⁺HLA-DR⁺CD66b⁺, 2,22 (2,49) %), einer weiteren myeloiden CD11b⁺HLA-DR⁻ Zellpopulation (1,1 (1,13) %) und B-Zellen (CD20⁺HLA-DR⁺, 0,31 (1,14) %). Eine CD45⁺, aber für die übrigen Marker negative Zellpopulation, wurde ebenfalls nachgewiesen (6,59 (9,6) %). Diese Zellgruppe beinhaltete wahrscheinlich verschiedene andere durch die Auswahl an Oberflächenmarkern nicht erfasste Immunzellen, wie z.B. Mastzellen und NK-Zellen sowie Zellen, deren Oberflächenmarker durch die enzymatische Gewebeverdauung abgespalten wurden (Abbildung 15A).

7.5.2.2 T-Zellen

Bei Analyse der hämatopoetischen Zellpopulationen (siehe 7.5.2.1) fiel eine überraschend hohe Spender-zu-Spender-Variabilität des prozentualen Anteils CD3⁺ T-Zellen auf (Abbildung 15A, 0-42,6 %). Zwar ist die Rolle von T-Zellen in der Pathogenese von Arthrose bisher nicht ausreichend verstanden, doch deuten Tiermodelle darauf hin, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen den Krankheitsprogress nach Gelenkschädigung vorantreiben [134, 135]. Diese Studie diente unter anderem dazu, T-Zellen aus der Synovialis arthrotischer Gelenke phänotypisch zu charakterisieren. Wie erwartet, machten CD4⁺ T-Helferzellen (58,9 (17,71) %) im Vergleich zu CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (29,9 (16,04) %) den größeren Anteil aus (Abbildung 15B). Die meisten CD4⁺ T-Zellen exprimierten den T-Gedächtniszell/Effektorzell-Marker CD45RO (91,2 (9,04) %, Abbildung 15C). Zwar handelte es sich auch bei der Mehrheit der CD8⁺ T-Zellen um T-Gedächtniszellen (61,28 (26,59) % CD8⁺CD45RO⁺), doch war der Anteil der CD45RA⁺ T-Zellen (21,47 (20,01) %) und der CD45RO/RA doppelt positiven Zellen (4,85 (11,44) %) deutlich höher als bei den CD4⁺ T-Zellen. CD45RA wird als Oberflächenmolekül von naiven T-Zellen exprimiert.

Ergebnisse

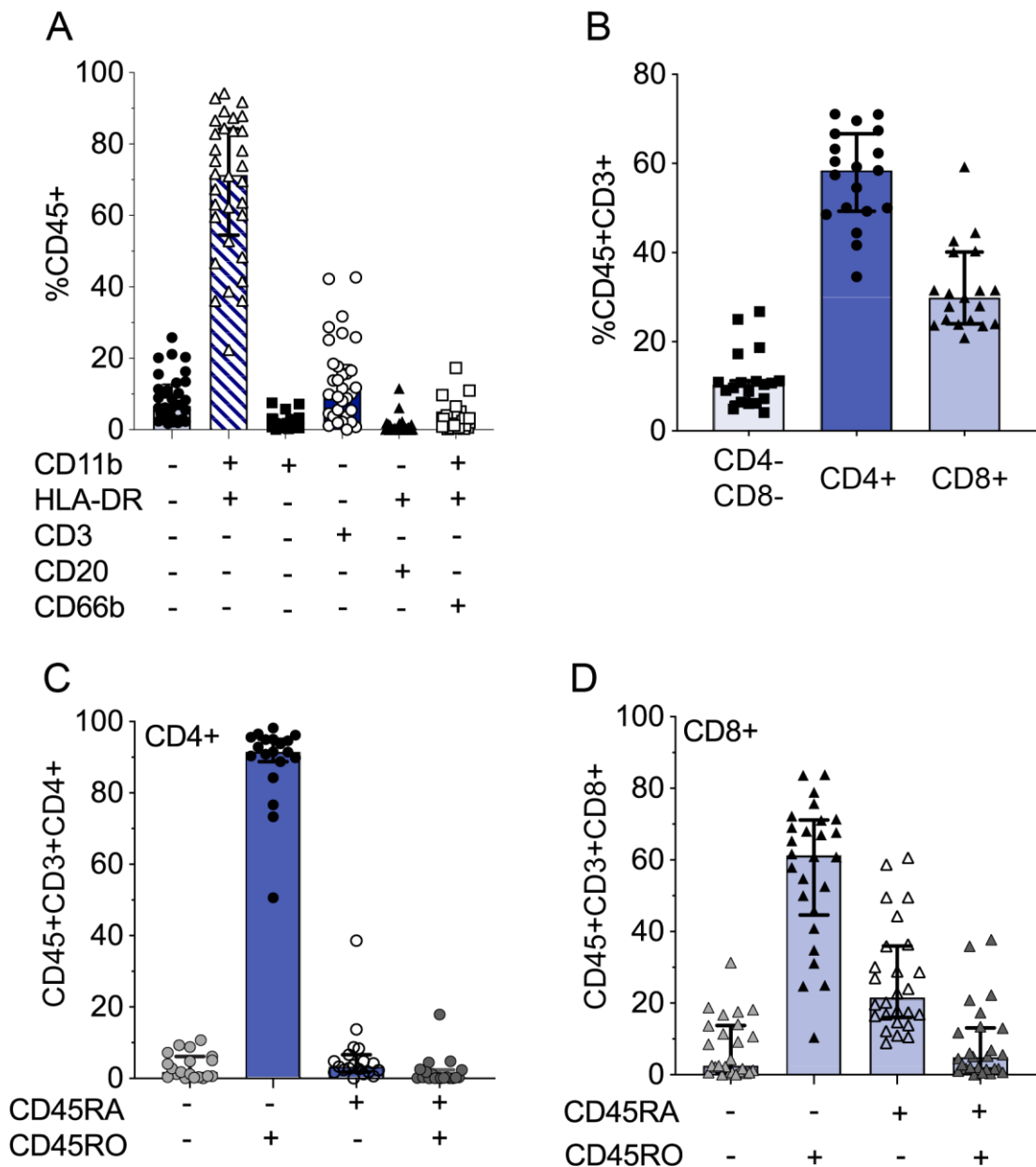


Abbildung 15: Analyse der synovialen hämatopoetischen Zellen

Synovialgewebe wurde nach Verdauprotokoll 1 (800 µg/ml Dispase, für 2 h) enzymatisch zersetzt. (A) Der prozentuale Anteil verschiedener hämatopoetischer Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist die myeloische (CD11b, HLA-DR), T-Zell- (CD3), B-Zell- (CD20) und neutrophile (CD66b) Oberflächenmarker-Expression (n=32, Verdau-Ansatz 1, Vor-Gate CD45+). (B) Darstellung des prozentualen Anteils von CD4+ T-Helfer-Zellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen (n=19, Verdau-Protokoll 3, 8 µg/ml Dispase, für 2 h, Vor-Gate CD45+CD3+). (C+D) Die Expression von CD45RA (naive T-Zellen) und CD45RO (T-Gedächtnis-/Effektorzellen) auf CD4+ (C, n=19, Vor-Gate CD45+CD3+CD4+) und CD8+ (D, n=26, Vor-Gate CD45+CD3+CD8+) T-Zellen ist gezeigt (Verdau-Protokoll 3, 8 µg/ml Dispase). Der Unterschied der Anzahl an Wiederholungen (n=19 versus n=26) resultierte daraus, dass in den ersten Versuchen die T-Zell-Analyse nach Gewebezersetzung mit Verdau-Protokoll 1 (800 µg/ml Dispase) versucht worden war. Sobald feststand, dass der hohe Dispase-Anteil die CD4-Färbung störte, wurde zu Verdau-Protokoll 3 gewechselt.

(A-D) Darstellung von Median und Interquartilsabstand.

Ergebnisse

7.5.3 Analyse der synovialen Fibroblasten

7.5.3.1 Identifikation von Fibroblasten-Populationen

Verglichen mit Erkenntnissen über synoviale hämatopoetische Zellen bei Gelenkarthrose ist über die mesenchymalen Zellen (CD45⁻CD31⁻) bedeutend weniger bekannt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die synovialen Fibroblasten aus Arthrose-Gelenken, die den Hauptteil der mesenchymalen Zellpopulation ausmachten, besser zu charakterisieren.

Dafür wurden zunächst Gefäß-assoziierte mesenchymale Zellen (z.B. Perizyten) anhand der Expression von CD146, auch bekannt als Melanomzell-Adhäsionsmolekül oder MCAM, durchflusszytometrisch dargestellt. CD45⁻CD31⁻CD146⁺ Zellen regulieren den vaskulären Tonus und bildeten eine anteilmäßig kleine Untergruppe der CD45⁻CD31⁻ Zellen (2 (3,2) %). Die übrigen CD146⁻ Zellen (98 (3,2) %), in Transkriptionsanalysen überwiegend als synoviale Fibroblasten identifiziert [56, 59], konnten mittels durchflusszytometrischer Analyse der Expression von Podoplanin (PDPN), CD73, CD90 und CD34 (siehe 5.8) in sieben Fibroblasten-Subpopulationen unterteilt werden (Abbildung 16). Eingeschlossen wurden dabei die Zellpopulationen, deren prozentuale Anteile über alle Spender gemittelt > 1 % ergaben (Cut-off-Wert).

Die überwiegende Mehrheit der Zellen war PDPN⁺CD73⁺. Die differenzielle Expression von CD90 und CD34 führte zur Aufspaltung in weitere Untergruppen. Die größte Gruppe der PDPN⁺CD73⁺ Zellen war CD90⁻CD34⁻ (32,4 (29,2) %), gefolgt von CD90⁺CD34⁺ (20,0 (17,6) %), CD90⁺CD34⁻ (16,7 (24,1) %) und CD90⁻CD34⁺ (2,68 (5,42) %) Zellen. Zwei PDPN⁺CD73⁻ Zellgruppen wurden identifiziert: Eine war CD90⁻CD34⁻ (5,23 (15,4) %), die andere CD90⁺CD34⁻ (1,48 (2,28) %). Ebenfalls nachgewiesen wurde eine Zellpopulation von signifikanter Größe, die keine der untersuchten Oberflächenmarker exprimierte (8,28 (6,93) %). Diese Gruppe beinhaltete möglicherweise weitere nicht identifizierte Fibroblasten-Populationen und/oder Zellen, deren Oberflächenmarker während der enzymatischen Gewebezersetzung abgespalten worden waren.

Ergebnisse

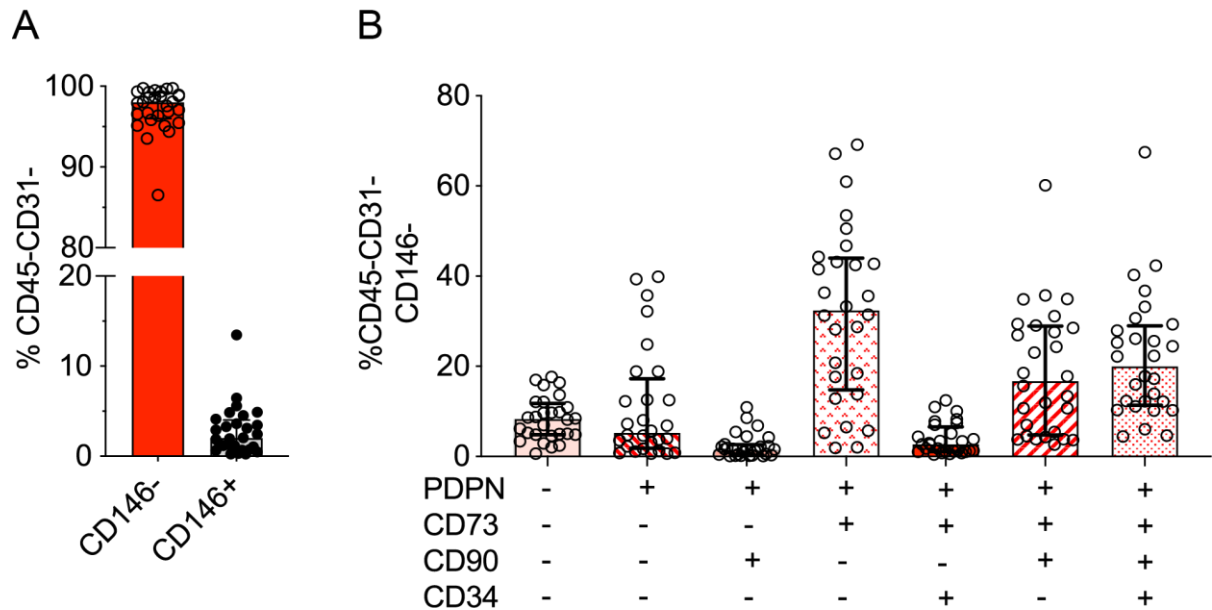


Abbildung 16: Identifikation von Fibroblasten-Populationen

Synovialgewebe wurde nach Verdauprotokoll 1 (800 µg/ml Dispase, für 2 h) enzymatisch zersetzt. (A) Der prozentuale Anteil der CD146⁺ und CD146⁻ mesenchymalen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Vor-Gate CD45-CD31⁻). (B) Anhand der Expression von Podoplanin (PDPN), CD73, CD90 und CD34 wurden in der Baumanalyse-Darstellung (engl. *tree analysis plot*) des durchflusszytometrischen Auswertprogramms Kaluza verschiedene Fibroblasten-Populationen identifiziert (Vor-Gate CD45-CD31⁻CD146⁻). Dargestellt wurden all die Zellpopulationen, die mehr als 1 % der Gesamtpopulation ausmachten (Cut-Off-Wert).

(A+B) Darstellung von Median und Interquartilsabstand, n=28.

7.5.3.2 Hinweise auf Funktionen der Fibroblasten-Populationen

Zur Aufdeckung möglicher funktioneller Aspekte der verschiedenen Fibroblasten-Populationen wurden die einzelnen Zellgruppen auf Assoziationen mit nicht-mesenchymalen Zellpopulationen hin untersucht. Signifikante Korrelationen wurden zwischen den zwei größten mesenchymalen und hämatopoetischen Populationen gefunden (Abbildung 17). PDPN⁺CD73⁺CD90⁻CD34⁻ Zellen korrelierten positiv mit CD45⁺CD11b⁺HLA-DR⁺ Zellen (überwiegend synoviale Makrophagen) und negativ mit CD45⁺CD3⁺ T-Zellen (Abbildung 17A+B).

Da sich die synoviale Deckzellschicht (*lining layer*) aus dicht gepackten Makrophagen und Fibroblasten zusammensetzt, legte diese Beobachtung nahe, dass es sich bei der PDPN⁺CD73⁺CD90⁻CD34⁻ Subpopulation um Deckzellen (*lining cells*) handelte.

Im Gegensatz dazu korrelierten PDPN⁺CD73⁺CD90⁺CD34⁺ positiv mit T-Zellen und negativ mit synovialen Makrophagen (Abbildung 17C+D). Die Korrelation mit T-Zellen

Ergebnisse

deutete darauf hin, dass diese Fibroblasten-Population eher in der inneren Schicht der Synovialis (*sublining layer*) lokalisiert war.

Die hier dargestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien, die mittels histologischen [155, 157] und Immunfluoreszenz-Techniken [56, 59, 137, 156, 165] hohe Expression von CD90 und CD34 in der Innenschicht der Synovialis (*sublining layer*) von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose zeigten.

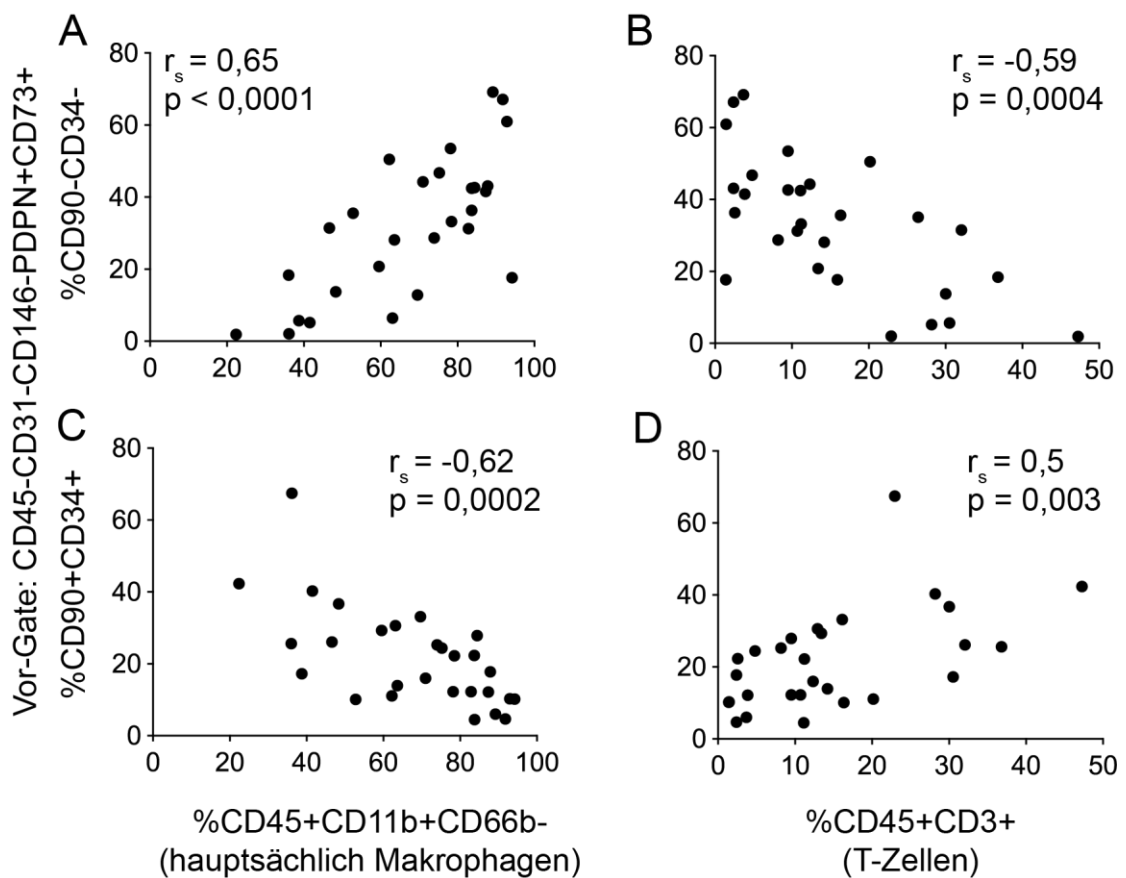


Abbildung 17: Korrelationen zwischen synovialen Fibroblasten-Populationen und hämatopoetischen Immunzellen

Synovialgewebe wurde nach Verdauprotokoll 1 (800 µg/ml Dispase, für 2 h) enzymatisch zersetzt. Die durchflusszytometrisch gemessenen und die in der Baumanalyse-Darstellung (engl. *tree analysis plot*) des durchflusszytometrischen Auswertprogramms Kaluza identifizierten CD45-CD31-CD146-PDPN+CD73+CD90-CD34- (A+B) und CD45-CD31-CD146-PDPN+CD73+CD90+CD34+ (C+D) Fibroblasten-Populationen korrelierten invers mit den CD45+D11b+CD66b- Makrophagen und CD45+CD3+ T-Zellen.

Statistik: n=28, Korrelationsanalyse nach Spearman, Spearman-Korrelationskoeffizient r_s und p-Werte in der Abbildung.

Ergebnisse

Weitere Korrelationsanalysen offenbarten mögliche Interaktionen von Fibroblasten-Populationen, Endothelzellen, Perizyten, T- und B-Zellen, Makrophagen sowie markerneгатiven hämatopoetischen Zellen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Korrelationen zwischen synovialen Zellpopulationen

Darstellung der statistisch signifikanten Korrelationen ($p < 0,05$) zwischen mesenchymalen (Vor-Gate CD45⁺CD31⁺CD146⁻) und nicht-mesenchymalen Zellpopulationen.

Zur statistischen Auswertung wurde die Korrelationsanalyse nach Spearman angewandt, $n=32$. Die obere Zahl jeder Zelle zeigt den Spearman-Korrelationskoeffizienten r_s . Die untere Zahl zeigt den p-Wert.

Aus Platzgründen in der Abbildung fehlend:

CD45⁺CD11b⁻CD3⁻CD20⁻CD66b⁻: markerneгатive hämatopoetische Zellen

CD45⁺CD11b⁺CD3⁻CD20⁻CD66b⁻: (hauptsächlich) Makrophagen

		%CD45-CD31-CD146-						
PDPN		-	+	+	+	+	+	+
CD73		-	-	-	+	+	+	+
CD90		-	-	+	-	-	+	+
CD34		-	-	-	-	+	-	+
%Synoviale Zellen	CD45-CD31+ r_s	0,39						
	Endothelzellen p	2,9e-2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CD45-CD31-CD146+ r_s		-0,37					
	Perizyten p	n.s.	3,8e-2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CD45+CD3+ r_s			0,65	-0,62			0,50
	T-Zellen p	n.s.	n.s.	5,0e-5	1,7e-4	n.s.	n.s.	3,2e-3
	CD45+CD20+ r_s			0,41				
B-Zellen p	n.s.	n.s.	2,1e-2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
CD45+CD11b- r_s			0,57	-0,56			0,46	
CD3-CD20-CD66b- p	n.s.	n.s.	5,8e-4	9,4e-4	n.s.	n.s.	7,6e-3	
CD45+CD11b+ r_s			-0,69	0,65			-0,59	
CD3-CD20-CD66b- p	n.s.	n.s.	1,1e-5	5,6e-5	n.s.	n.s.	3,8e-4	

n.s. = nicht signifikant

7.6 Synoviale IL-6-Produktion

7.6.1 Die Diversität der synovialen IL-6-Produktion

Hohes IL-6 in synovialem Gewebe ist mit starken Schmerzen und Gelenkschädigung assoziiert [6, 10, 16, 46]. Gleichzeitig variiert die IL-6-Produktion zwischen Arthrose-

Ergebnisse

Patienten erheblich. Frühere Studien zeigten, dass die IL-6-Spiegel in der Synovialflüssigkeit bis zu 10.000-fache Unterschiede aufwiesen. Während es bei einigen Patienten kaum nachweisbar war, erreichten die synovialen IL-6-Spiegel anderer Patienten Höhen wie bei rheumatoider Arthritis [3].

Um ein besseres Verständnis für Diversität der IL-6-Freisetzung zu gewinnen, wurde die synoviale IL-6-Produktion in dieser Studie durchflusszytometrisch *ex vivo* gemessen. Zur Kontrolle der durchflusszytometrischen intrazellulären IL-6-Bestimmung wurde die Freisetzung aus intaktem Gewebe jedes Spenders zusätzlich mittels Multiplex-Assays gemessen. Die durchflusszytometrisch bestimmte Gesamtzahl der IL-6⁺ Zellen pro Spender korrelierte mit der IL-6-Freisetzung aus intaktem Gewebe des gleichen Spenders (Abbildung 18B). Diese Korrelation validierte den durchflusszytometrischen intrazellulären Zytokinnachweis als geeigneten methodischen Ansatz.

Zwar produzierten alle der hier untersuchten Zelltypen IL-6, doch schwankte der Anteil der IL-6⁺ Zellen bzw. ihre mittlere Fluoreszenzintensität erheblich zwischen Spendern und Zelltypen (Abbildung 18).

Bei den meisten Spendern war der prozentuale Anteil der IL-6⁺ Zellen bei den Fibroblasten (13,6 (19,6) %) höher als bei den hämatopoetischen Zellen (4,44 (17,4) %) und Endothelzellen (3,74 (19,6) %) (Abbildung 18D). Allerdings verhielt sich dies in einem kleinen Anteil der Spender (6 aus 32) umgekehrt. Hier war der Anteil der hämatopoetischen CD45⁺IL-6⁺ Zellen größer.

Auch die Anzahl an IL-6⁺ Fibroblasten ($0,74 \times 10^5$ ($2,6 \times 10^5$)) war verglichen mit den hämatopoetischen Immunzellen ($0,16 \times 10^5$ ($0,96 \times 10^5$)) und Endothelzellen ($0,0094 \times 10^5$ ($0,96 \times 10^5$)) am höchsten (Abbildung 18E).

Zudem erreichte die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) pro Zelle bei den Fibroblasten verglichen mit den hämatopoetischen Immunzellen ca. dreimal höhere Werte (Abbildung 18F).

Zusammenfassend bestätigte diese Analyse zum einen die enorme Variabilität der synovialen IL-6-Produktion und zeigte zum anderen, dass die synovialen Fibroblasten eine wichtige Quelle für IL-6 darstellen.

Ergebnisse

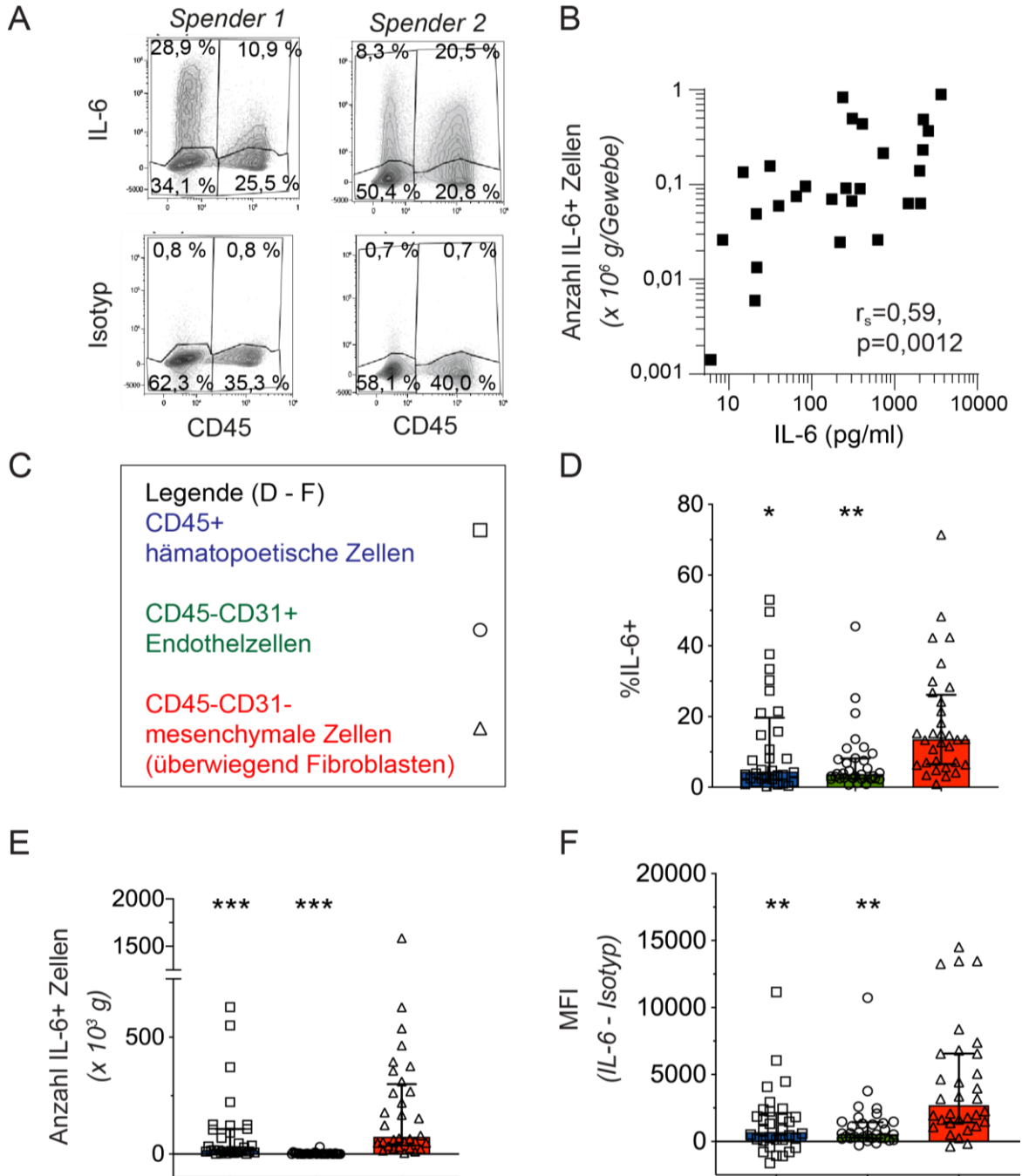


Abbildung 18: Die Diversität der synovialen IL-6-Produktion

Synovialgewebe wurde nach Verdauprotokoll 1 (800 μ g/ml Dispase, für 2 h) enzymatisch zersetzt. CD45 und CD31 sowie intrazelluläres IL-6 wurden für durchflusszytometrische Untersuchungen gefärbt.

(A) Darstellung zweier repräsentativer intrazellulärer IL-6-Färbungen der CD45+ hämatopoetischen Immunzellen und CD45-CD31- mesenchymalen Zellen (obere Reihe: IL-6 Färbung, untere Reihe: Isotyp-Kontrollen). (B) Aus synovialen Gewebekulturen freigesetztes IL-6 korrelierte positiv mit der durchflusszytometrisch gemessenen und aus der Gesamtzelldichte jedes Spenders berechneten Anzahl an IL-6+ Zellen ($n=27$, Korrelationskoeffizient r_s nach Spearman). (C) Legende für D-F. (D) Der prozentuale Anteil an IL-6+ CD45+ hämatopoetischen Immunzellen, CD45-CD31+ Endothelzellen und CD45-CD31- mesenchymalen Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen.

(E) Die Anzahl an IL-6+ Zellen der drei synovialen Hauptpopulationen wurde aus dem durchflusszytometrisch gemessenen prozentualen Anteil und der Zelldichte berechnet. (F) Die mittlere

Ergebnisse

Fluoreszenzintensität für IL-6 wurde durch Subtraktion des Hintergrundsignals (Isotyp) berechnet und zwischen den drei synovialen Hauptpopulationen verglichen.

Statistik: (D-F) Darstellung von Median und Standardabweichung, n=32.

Zur statistischen Auswertung wurden die Korrelationsanalyse nach Spearman (B) und der Kruskal-Wallis-Test mit der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche (D-F) angewandt.

* p=0,016, ** p<0,0006, *** p<0,0001.

7.6.2 IL-6-Produktion in synovialen Fibroblasten

Bei genauerer Betrachtung der IL-6-Produktion der verschiedenen Fibroblasten-Populationen fiel auf, dass zwar alle Subtypen IL-6 exprimierten, der prozentuale Anteil aber am höchsten in den folgenden PDPN⁺CD73⁺ Populationen war: CD90⁻CD34⁻, CD90⁺CD34⁻ und CD90⁺CD34⁺. Diese Ergebnisse spiegelten die zuvor beschriebene relative Häufigkeit der verschiedenen Fibroblasten-Populationen wider (Abbildung 19). Allerdings erreichte die IL-6-Produktion pro Zelle (mittlere Fluoreszenzintensität) höhere Werte innerhalb den wahrscheinlich aus der *sublining layer* stammenden PDPN⁺CD73⁺CD90⁺CD34⁺ Zellen verglichen mit den wahrscheinlich aus der *lining layer* stammenden PDPN⁺CD73⁺CD90⁻CD34⁻ Zellen. Insgesamt deuteten die Ergebnisse also auf einen IL-6-Gradienten und somit auf zusätzliche Komplexität der IL-6-Antwort innerhalb der Synovialis in Arthrosegelenken hin.

Ergebnisse

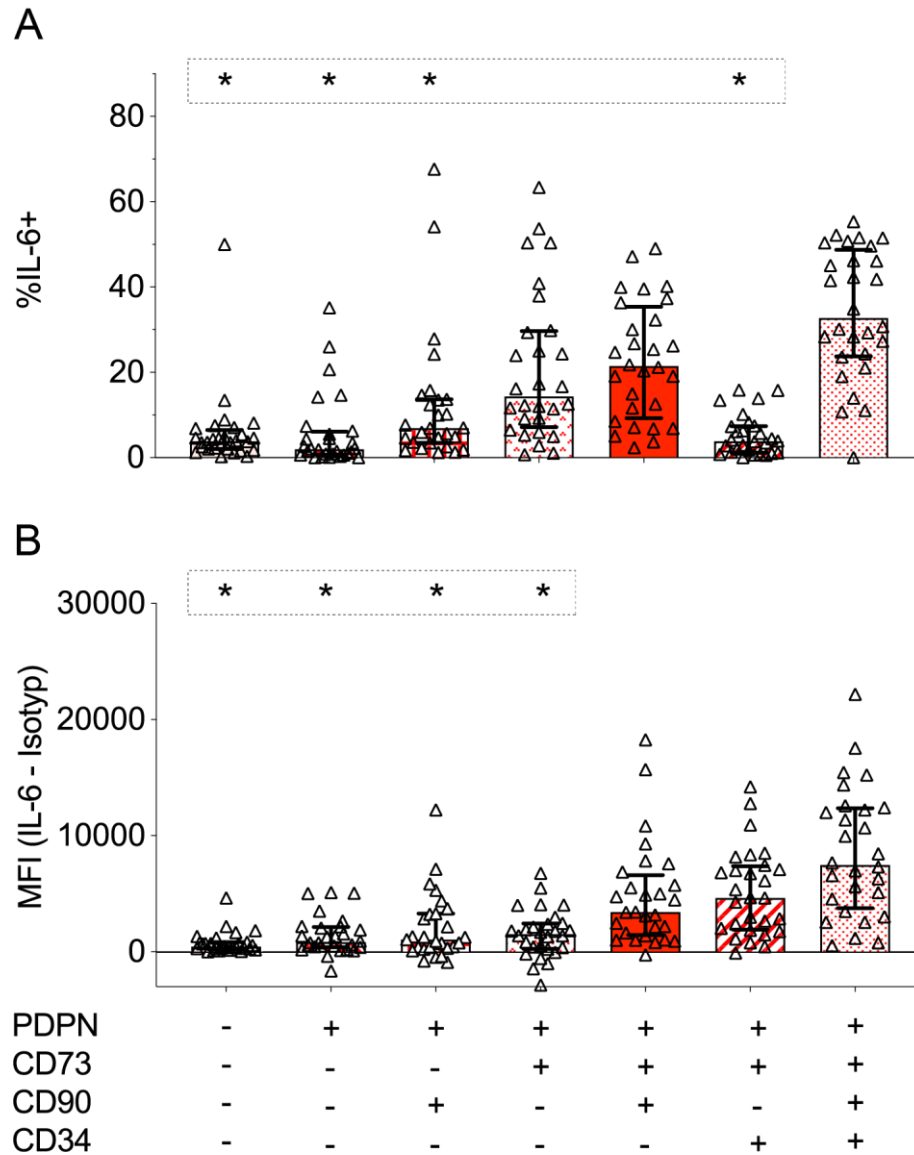


Abbildung 19: IL-6-Produktion in synovialen Fibroblasten

Synovialgewebe wurde nach Verdauprotokoll 1 zersetzt (800 µg/ml Dispase, für 2 h). Mesenchymale Oberflächenmarker und intrazelluläres IL-6 wurden für durchflusszytometrische Untersuchungen gefärbt.

(A) Der prozentuale Anteil an IL-6⁺ Fibroblasten-Populationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Vor-Gate CD45⁻CD31⁻CD146⁻). (B) Die mittlere Fluoreszenzintensität für IL-6 wurde durch Subtraktion des Hintergrundsignals (Isotyp) berechnet und zwischen den verschiedenen Hauptpopulationen verglichen (Vor-Gate CD45⁻CD31⁻CD146⁻).

Statistik: Darstellung von Median und Interquartilsabstand, n=28. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und der Dunnett-Methode für Mehrfachvergleiche. * p < 0,0001

7.6.3 IL-6-Produktion in anderen Zellen

Auch CD45⁺ hämatopoetische Immunzellen trugen erheblich zur IL-6-Produktion bei (Abbildung 18). Makrophagen (CD11b⁺CD66b⁻) und, überraschenderweise, Neutrophile (CD66b⁺) wiesen den größten prozentualen Anteil IL-6⁺ Zellen auf

Ergebnisse

(Abbildung 20A). Der Anteil der IL-6⁺ T-Zellen (CD3⁺) und B-Zellen (CD20⁺) war signifikant geringer. Interessanterweise war die IL-6-Produktion pro Zelle (mittlere Fluoreszenzintensität) in Makrophagen (CD11b⁺CD66b⁻) und neutrophilen Granulozyten (CD66b⁺) vergleichbar und damit fünfmal höher als in Lymphozyten (Abbildung 20B). Eine genauere Betrachtung der Anzahl an IL-6⁺ Zellen zeigte allerdings, dass der Beitrag der Neutrophilen am Gesamt-IL-6 eher als gering einzuschätzen war. Ähnlich verhielt es sich bei den Endothelzellen. Auch sie trugen als anteilmäßig kleine Zellpopulation wenig zur gesamten IL-6-Produktion bei.

Adipozyten stellen ebenfalls eine mögliche Quelle für IL-6 dar. Da Adipozyten durch enzymatische Gewebezersetzung geschädigt werden, konnten sie in dieser Studie nicht direkt durchflusszytometrisch erfasst werden. Korrelationsuntersuchungen zeigten, dass weder der Körpermasseindex (BMI) noch in Gewebekulturen freigesetztes Leptin mit der IL-6-Produktion korrelierten (Abbildung 20C+D), was eine wesentliche Beteiligung der Adipozyten an der IL-6-Antwort unwahrscheinlich machte.

Ergebnisse

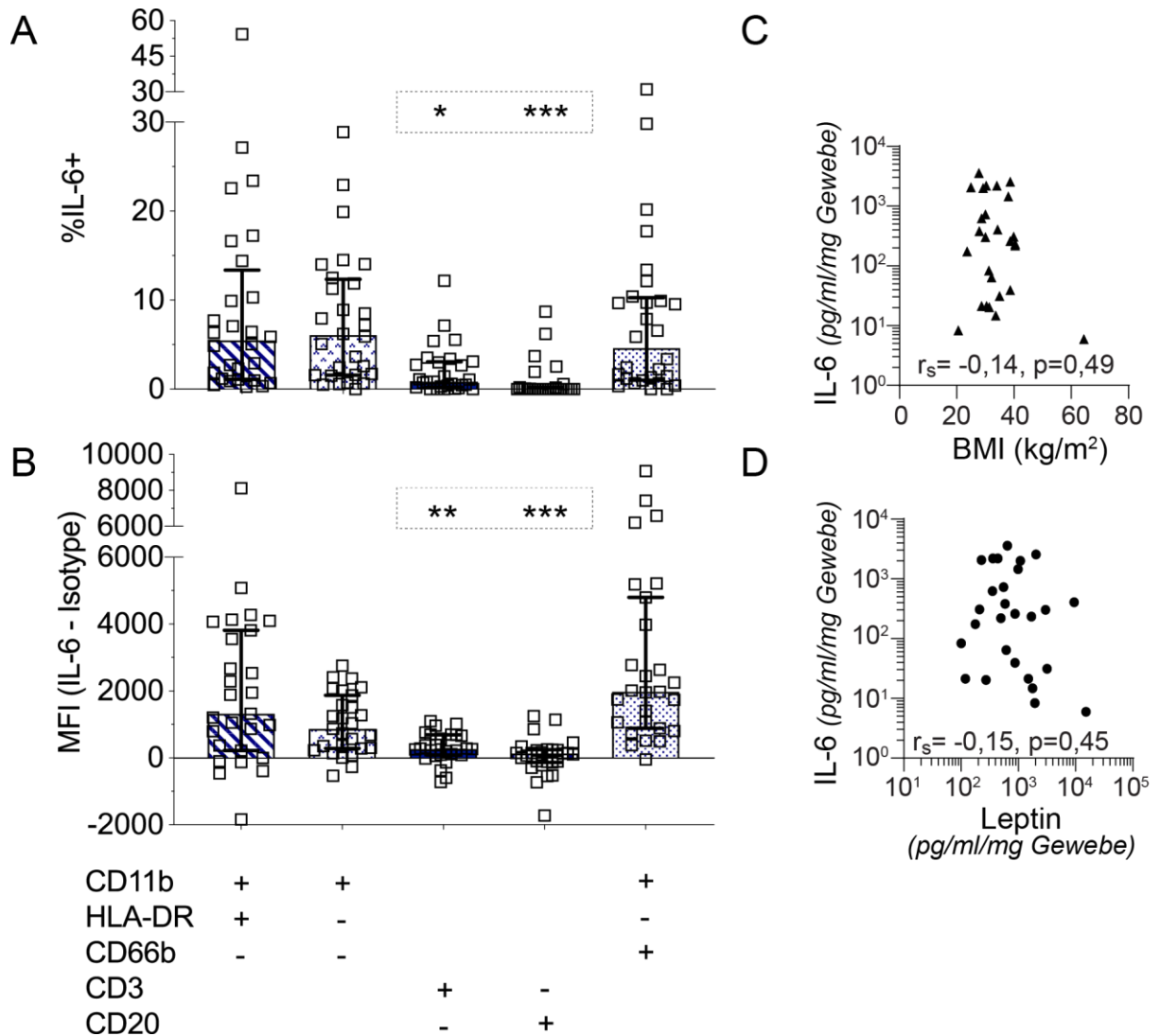


Abbildung 20: IL-6-Produktion in anderen Zellen

Synovialgewebe wurde nach Verdauprotokoll 1 enzymatisch zersetzt (800 µg/ml Dispase, für 2 h). Hämatopoetische Oberflächenmarker und intrazelluläres IL-6 wurden für durchflusszytometrische Untersuchungen gefärbt.

(A) Der prozentuale Anteil IL-6⁺ hämatopoetischer Populationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Vor-Gate CD45⁺). (B) Die mittlere Fluoreszenzintensität für IL-6 wurde durch Subtraktion des Hintergrundsignals (Isotyp) berechnet und zwischen den verschiedenen Hauptpopulationen verglichen (Vor-Gate CD45⁺). (C+D) Die Freisetzung von IL-6 aus intakten Gewebekulturen korrelierte nicht mit dem Körpermassenindex (BMI) und der Leptin-Freisetzung.

Zuordnung von Oberflächenmarkern und CD45⁺ hämatopoetischem Zelltyp (A+B): Makrophagen CD11b, HLA-DR; Neutrophile CD66b, CD11b; T-Zellen CD3; B-Zellen CD20.

Statistik: (A+B) Darstellung von Median und Interquartilsabstand, n=28. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und der Dunn-Test für Mehrfachvergleiche.

* p=0,007 ** p=0,004 *** p<0,0001.

(C+D) n=28. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Korrelationsanalyse nach Spearman. Darstellung von Korrelationskoeffizient r_s und p-Wert. Die Ergebnisse waren nicht signifikant.

Ergebnisse

7.6.4 Korrelationsanalysen zur Untersuchung der IL-6-Antwort

Zusätzlich zu IL-6 wurden zwölf weitere lösliche Zytokine, Adipokine und Chemokine mittels Multiplex-ELISA-Technik untersucht. Korrelationsanalysen ergaben Assoziationen zwischen einigen der untersuchten Moleküle (Abbildung 21).

IL-6 war am stärksten mit IL-8, aber auch direkt mit Komplementfaktor D (CFD), IL-10, CCL2 und CXCL10 assoziiert. Ein zusätzliches Expressionsnetzwerk wurde durch TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und Resistin gebildet. Dieses war durch CCL2 und IL-10 indirekt mit IL-6 verlinkt (Abbildung 21A).

Zudem war die IL-6-Freisetzung mit weiteren Mediatoren, der synovialen Gesamtzellzahl und der Zellzahl spezifischer synovialer Populationen assoziiert (Abbildung 21B+C). Eine hohe Gesamtzellzahl korrelierte positiv mit der Freisetzung von IL-6, IL-8, IL-10 und CFD, aber nicht mit anderen Mediatoren wie TNF- α und CCL2 (Abbildung 21B). Es wurden keine positiven Korrelationen mit Adiponektin und Leptin gefunden.

Mit wenigen Ausnahmen korrelierten IL-6, IL-8, IL-10 und CFD mit der Zunahme der Zellzahl verschiedener synovialer Zellpopulationen (Abbildung 21C). Die Anzahl der T-Zell-dominierenden CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ T-Zellen zeigte keine Assoziation mit der IL-6-Freisetzung. IL-6 korrelierte hingegen positiv mit steigender Anzahl an Fibroblasten, Makrophagen, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und naiven CD4⁺ T-Zellen. Die IL-10-Freisetzung korrelierte am besten mit der T-Zell-Gesamtzahl und spezifisch mit der CD8⁺ T-Zell-Population. Zuletzt zeigten sich Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4) mehr noch als CCL2 als Marker für erhöhte T-Zell- und T-Zell-assoziierte Fibroblasten-Zellzahlen (Abbildung 21C).

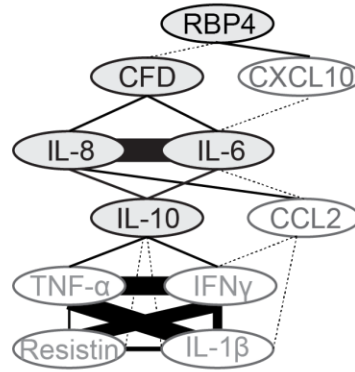
Diese Daten bieten Anhalt dafür, dass spezifische Gruppen von löslichen Mediatoren dafür genutzt werden können, Vorhersagen über Aspekte der synovialen zellulären Zusammensetzung wie zum Beispiel über die Zelldichte und T-Zell-Anreicherung zu treffen.

Ergebnisse

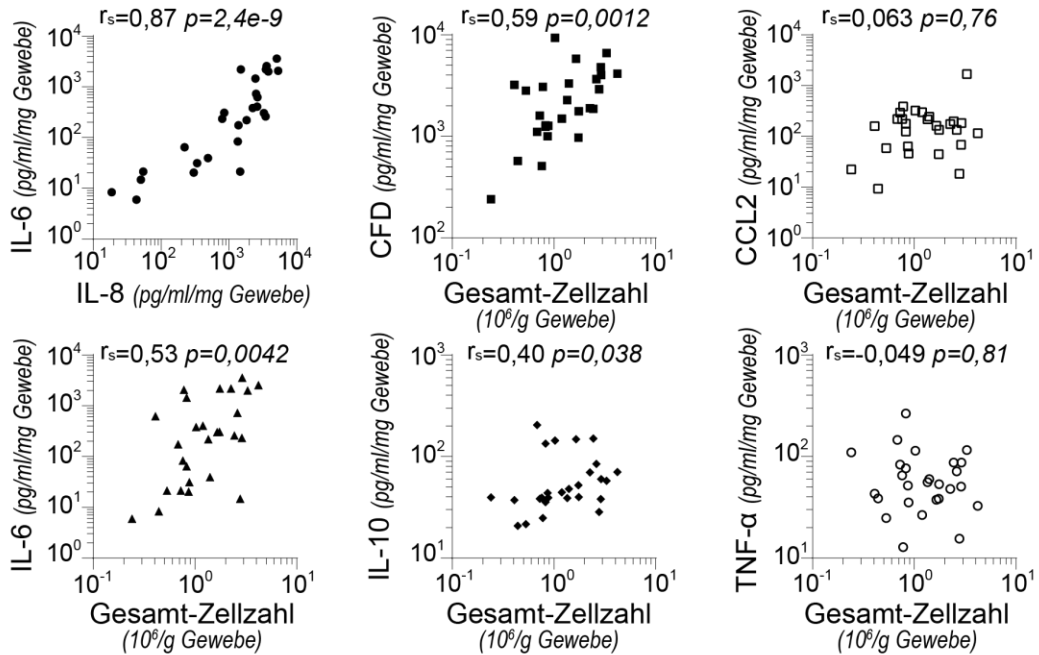
A

Korrelationsanalysen
(Mediatoren aus synovialen Gewebekulturen)

..... $p < 5 \times 10^{-2}$ ■■■■ $p < 1 \times 10^{-5}$
 ——— $p < 1 \times 10^{-2}$ ■■■■ $p < 1 \times 10^{-6}$
 ——— $p < 1 \times 10^{-3}$ ■■■■ $p < 1 \times 10^{-8}$



B



C

Zellzahl	T-Zellen																	
	Gesamt-Zellzahl	CD45-CD31- CD146-	CD45+	CD11b+DR+ CD3-CD20-CD68b-	PDPN+CD73+ CD90-CD34-	CD11b-DR- CD20-CD68b-	PDPN+CD73- CD90+CD34+	CD3+	CD11b-CD20-CD68b-	CD3+CD8+	CD3+CD8+ CD45RA-RO+	CD3+CD8+ CD45RA+RO-	CD3+CD8+ CD45RA+RO+	CD3+CD4+	CD3+CD4+ CD45RA-RO+	CD3+CD4+ CD45RA+RO-	PDPN+CD73+ CD90+CD34+	CD45-CD31- CD146+
IL-6	0,53 4,2e-3	0,49 8,9e-3	0,46 1,4e-2	0,43 2,4e-2	0,51 7,9e-3	0,52 5,6e-3	0,50 1,0e-2	0,45 1,8e-2	0,62 5,0e-3	0,53 2,0e-2	0,59 8,4e-3	0,54 1,8e-2	0,25 3,9e-1	0,26 3,7e-1	0,46 9,8e-2	0,40 4,3e-2	0,37 5,9e-2	0,11 5,7e-1
IL-8	0,45 1,8e-2	0,41 3,2e-2	0,46 1,5e-2	0,47 1,4e-2	0,40 4,1e-2	0,53 4,3e-3	0,52 6,2e-3	0,44 2,2e-2	0,72 5,0e-4	0,61 5,3e-3	0,68 1,4e-3	0,60 7,0e-3	0,46 9,5e-2	0,44 1,1e-1	0,61 2,0e-2	0,34 8,4e-2	0,26 2,0e-1	0,030 8,8e-1
CFD	0,59 1,2e-3	0,56 2,2e-3	0,55 2,7e-3	0,64 3,0e-4	0,51 8,0e-3	0,32 1,1e-1	0,38 5,2e-2	0,30 1,2e-2	0,55 1,5e-2	0,53 2,0e-2	0,53 2,1e-2	0,61 5,9e-3	0,45 1,1e-1	0,43 1,3e-1	0,66 1,2e-2	0,23 2,6e-1	0,093 6,4e-1	-0,005 9,8e-1
IL-10	0,41 3,8e-2	0,30 1,3e-1	0,37 6,0e-2	0,29 1,4e-2	0,17 4,1e-1	0,46 1,5e-2	0,47 1,5e-2	0,48 1,0e-2	0,62 4,7e-3	0,64 3,1e-3	0,44 5,7e-2	0,32 1,9e-2	0,26 3,7e-1	0,27 3,5e-1	0,29 3,1e-1	0,23 2,5e-1	0,29 1,4e-1	0,25 2,1e-1
RBP4	0,24 2,2e-1	0,28 1,6e-1	0,13 5,1e-1	0,11 5,7e-1	0,19 3,4e-1	0,51 6,1e-3	0,53 2,6e-3	0,44 2,0e-2	0,49 3,3e-2	0,42 7,4e-2	0,53 1,9e-2	0,44 6,3e-2	0,41 1,4e-1	0,32 2,6e-1	0,60 2,6e-2	0,36 7,3e-2	0,22 2,7e-1	-0,068 7,4e-1
CCL2	0,063 7,6e-1	0,089 6,6e-1	0,060 7,7e-1	0,080 6,9e-1	-0,02 9,3e-1	0,23 2,5e-1	0,22 2,8e-1	0,17 4,0e-1	0,43 6,4e-2	0,42 7,5e-2	0,48 3,9e-2	0,41 8,5e-2	0,24 4,0e-1	0,30 3,0e-1	0,35 2,2e-1	0,028 8,9e-1	0,13 5,2e-1	0,011 9,6e-1

Abbildung 21: Korrelationsanalysen zur Untersuchung der IL-6-Antwort

Die Freisetzung von zwölf löslichen Mediatoren aus über 24 h kultivierten Gewebeproben wurde mittels Multiplex-ELISA-Technik untersucht. Dargestellt sind die löslichen Proteine, die direkt und

Ergebnisse

indirekt mit dem Zytokin IL-6 korrelierten. Die Zellzahlen der synovialen Zellpopulationen wurden nach Gewebeerddau (Verdau-Protokoll 1, 800 µg/ml Dispase, für 2 h) aus den durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteilen und der nach Trypanblau-Exklusion manuell in einer Zählkammer bestimmten Zelldichte jedes Spenders ermittelt. Für die T-Zell-Analyse wurde Gewebe nach Verdau-Protokoll 3 (8 µg/ml Dispase, für 2 h) zersetzt.

(A) Das Diagramm demonstriert die positiven Korrelationen zwischen löslichen Mediatoren. Die Dicke der Linien/Balken repräsentiert die Höhe p-Werte. n=27. (B) Darstellung der Korrelationen zwischen IL-6 und IL-8 sowie zwischen CFD, CCL2, IL-6, IL-10 und TNF-α mit der Gesamt-Zellzahl (10⁶/g Gewebe).

(C) Die Tabelle zeigt die Stärke der Korrelationen zwischen der Zellzahl verschiedener synovialer Populationen und löslichen Mediatoren. Die obere Zahl jeder Zelle zeigt den Korrelationskoeffizienten nach Spearman, r_s . Die untere Zahl zeigt den p-Wert. Die Intensität der Grünfärbung repräsentiert die Höhe des Spearman-Korrelationskoeffizienten.

Statistik: Die statistische Auswertung erfolgte mittels Korrelationsanalyse nach Spearman, n=19-27. Darstellung von Korrelationskoeffizient r_s und p-Wert.

7.7 Clusteranalysen zur Stratifizierung der synovialen Entzündungsantwort

Schließlich wurden in dieser Arbeit die durchflusszytometrisch erhobenen Informationen über synoviale Zellpopulationen und die IL-6-Produktion mit den mittels Multiplex-ELISA Daten zur Freisetzung löslicher Mediatoren und einer begrenzten Anzahl an klinischen Daten in hierarchischen Clusteranalysen vereint, um spezifische Entzündungsmuster zu identifizieren. In der Tat wurden drei große Cluster gefunden (Abbildung 22, , engl. *Heatmap*). Cluster 1 war am stärksten mit T-Zellen und T-Zell-assoziierten Zytokinen wie IL-10, IFN-γ und TNF-α assoziiert, während Cluster 2 und 3 eher mit Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺CD66b⁻CD3⁻CD20⁻) korrelierten. Cluster 2 wies die höchsten prozentualen Anteile an Makrophagen und der wahrscheinlich in der *lining layer* anzutreffenden PDPN⁺CD73⁺CD90⁻CD34⁻ Fibroblasten-Population auf. Ein Subcluster 2 war zudem mit erhöhter Adiponektin-Expression assoziiert. Im Gegensatz dazu korrelierte Cluster 3 am ehesten mit erhöhter Zelldichte und der IL-6- und IL-8-Antwort.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Cluster mit klinischen Unterschieden korrelierten (Abbildung 22, unten). Zwar erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz, doch wurde der Trend einer Assoziation von Cluster 2 mit dem weiblichen Geschlecht (p=0,078) und Cluster 3 mit früheren operativen Gelenkeingriffen wie Arthroskopien oder Gelenkersatz (p=0,052) sichtbar. Obwohl noch genauere Untersuchungen zur Bestätigung der Ergebnisse nötig sind, bieten die Ergebnisse Anhalt dafür, dass genaue Phänotypisierung der synovialen Entzündungsmuster bei Gelenkarthrose hilfreich dafür sein kann, Patienten zu

Ergebnisse

stratifizieren und langfristig Einblicke in die Heterogenität der Pathogenese zu gewinnen.

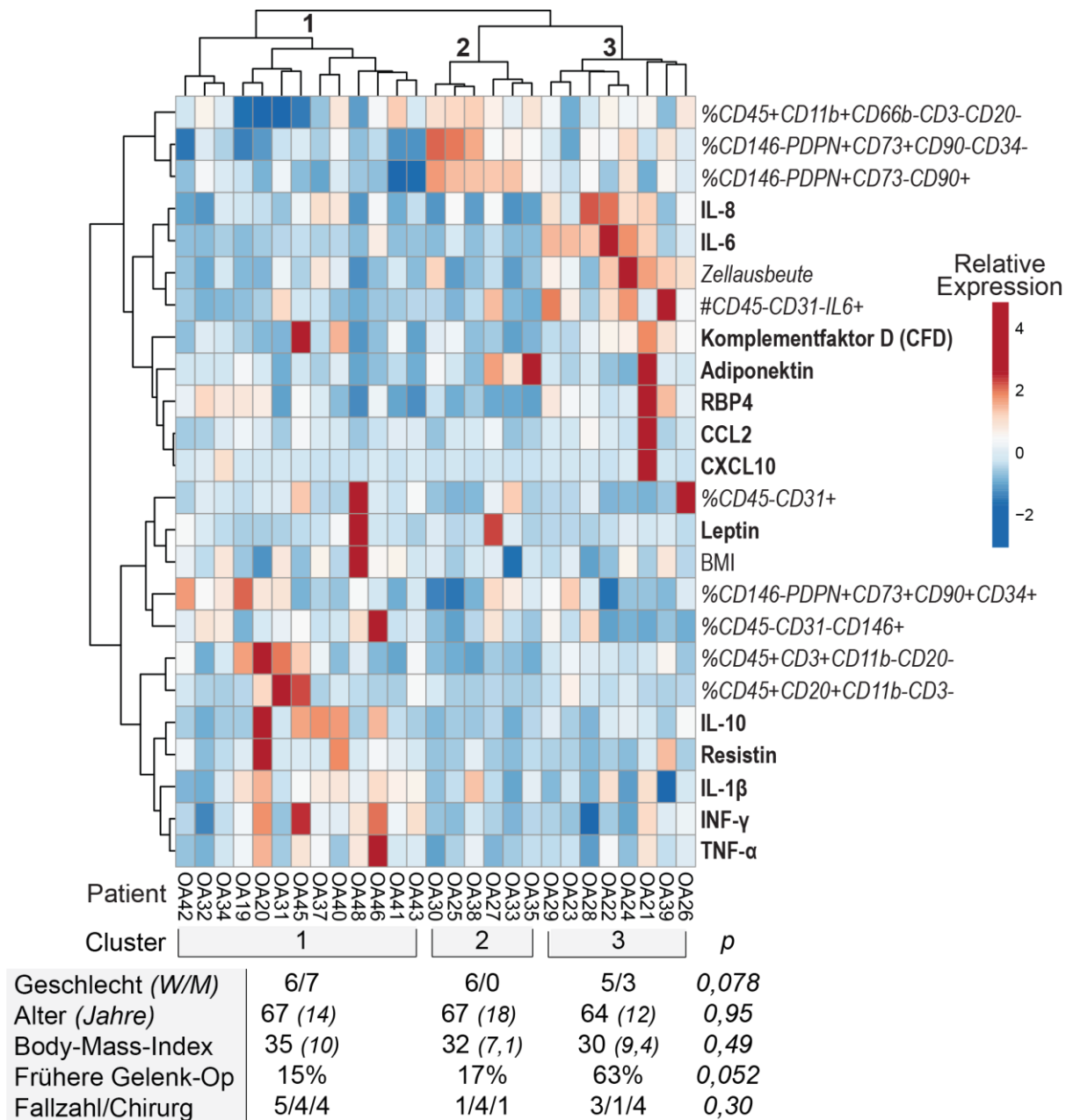


Abbildung 22: Clusteranalysen zur Stratifizierung der synovialen Entzündungsantwort

Die durchflusszytometrisch ermittelten Daten zur zellulären Zusammensetzung der Synovialis wurden mit den mittels Multiplex-ELISA erhobenen Informationen über die Freisetzung **löslicher Proteine** (fett gedruckt) und dem BMI in einer hierarchischen Clusteranalyse vereint. Die Analyse wurde mit dem Internet-basierten Programm *ClustVis* durchgeführt. Eine begrenzte Anzahl an klinischen Daten ist, nach den zuvor identifizierten Patientenclustern aufgetrennt, unter der *Heatmap* dargestellt.

Statistik: Die kontinuierlichen Variablen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und die kategorialen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet, n=27.

8 Diskussion

8.1 Die synoviale Entzündungsantwort bei Kniegelenksarthrose

Entzündung im Synovialgewebe ist mit Schmerzen und Gelenkzerstörung assoziiert. Dabei variiert die Entzündungsantwort stark zwischen Patienten [2, 3, 7, 10, 11, 13, 16, 45, 46]. Wie die Heterogenität der Entzündungsantwort die Krankheitsentstehung und den Progress von Arthrose beeinflusst, ist bislang nicht bekannt. Eine Ursache hierfür ist, dass die zellulären und molekularen Mechanismen der synovialen Entzündungsantwort weitestgehend unverstanden sind. In dieser Studie wurde die Heterogenität der synovialen Entzündungsreaktion in Multiparameteranalysen mittels Durchflusszytometrie und ELISA-Technik untersucht. Dabei wurden neue Erkenntnisse über die Pathogenese von Arthrose und über methodische Aspekte bei der Untersuchung der Synovialis im Allgemeinen gewonnen.

8.2 Methodische Aspekte der Studie

Bei der Methodik fiel die Wahl auf die Durchflusszytometrie, weil sie der Standard-Immunohistochemie in quantitativen Aspekten der Zellidentifizierung überlegen ist. Voraussetzung für valide durchflusszytometrische Untersuchungen von Zellen aus Gewebeverbänden ist die Überführung des Gewebes in eine Einzelzellsuspension, also der Gewebeverdau. Ein Verdauprotokoll ist dann geeignet, wenn es effektive Gewebezersetzung ohne signifikanten Verlust von Zellviabilität und Oberflächenmarkern gewährleistet. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Effektivität des Gewebeverdaus maßgeblich vom untersuchten Zelltyp abhängt (Abbildungen 9-13, Tabelle 3). Insbesondere stellte sich die durchflusszytometrische Untersuchung von T-Zellen und Fibroblasten mit dem gleichen Protokoll als schwierig heraus. Ähnliche Beobachtungen machte auch das *Accelerating Medicines Partnership (AMP) Network*, das sich nach Testung verschiedener Verdauprotokolle für die Kombination aus einem kommerziellen mechanischen Dissoziationssystem und enzymatischem Verdau mit Liberase™ TL entschied [54].

Eine Stärke dieser Studie ist, dass sie die Bedeutung von gründlichen Untersuchungen zur Beeinflussung von Zellausbeute und Stabilität der Oberflächenmoleküle durch die Wahl des Gewebeverdau-Protokolls betont.

8.3 Korrelationsanalysen zur Untersuchung potentieller zellulärer Interaktionen

Darüber hinaus wird aufgezeigt, dass Korrelationsanalysen dazu eingesetzt werden können, potentielle zelluläre Interaktionen aufzuspüren. Beispielsweise wurden zwei bedeutende PDPN⁺CD73⁺ Fibroblasten-Populationen gefunden (Abbildungen 16+17). Diese Populationen korrelierten invers mit CD45⁺CD11b⁺CD3⁻CD20⁻CD66b⁻ Zellen, hauptsächlich Makrophagen, und CD45⁺CD3⁺ T-Zellen. Die Korrelationen bieten Anhalt dafür, dass es sich bei den CD90⁻CD34⁻ Zellen um Fibroblasten der synovialen Deckzellschicht, der *lining layer*, (positive Korrelation mit Makrophagen) und bei den CD90⁺CD34⁺ Zellen um Fibroblasten des darunterliegenden Bindegewebes, der *sublining layer*, (positive Korrelation mit T-Zellen) handelt.

Unterstützt werden diese Schlussfolgerungen durch unabhängige histologische Studien, welche die Anreicherung von CD90 und CD34 exprimierenden Zellen in der *sublining layer* des Synovialgewebes von Patienten mit Arthrose und rheumatoider Arthritis zeigten [56, 59, 137, 155-157]. Kürzlich veröffentlichte *Ex-vivo*-Untersuchungen offenbarten zudem eine besondere Rolle der beschriebenen Subpopulationen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis [56, 59]. Welche Funktion die Fibroblasten-Subtypen im Krankheitsverlauf von Arthrose haben, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht.

Obwohl diese Studie nur eine kleine Patientenkohorte umfasste, wurden zahlreiche potenzielle Zell-Interaktionen gefunden (Abbildungen 17, Tabelle 4). Eine Ausweitung der Analyse kann zu einem besseren Verständnis der Rolle von Zellnischen in der Pathologie des Synovialgewebes beitragen.

8.4 Synoviale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und Arthrose

Des Weiteren zeigten die Korrelationsanalysen potenzielle Unterschiede der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Kompartimente auf. Auffällig war die hohe Variabilität des prozentualen T-Zell-Anteils zwischen Patienten (Abbildung 15). Frühere Studien zeigten ebenfalls variable lymphozytäre Zellverbände in der *sublining layer* des Synovialgewebes von Arthrose-Patienten [129]. Im Einklang mit bereits veröffentlichten Untersuchungen [129, 131, 133, 166] waren die CD4⁺ im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen vorherrschend. Allerdings wies die CD8⁺ T-Zellpopulation größere Expressionsunterschiede von CD45RA (Marker für naive T-Zellen) und CD45RO (Marker für T-Gedächtnis-/Effektorzellen) auf (Abbildung 15D). Zudem

Diskussion

korrelierte die Anzahl an CD8⁺ T-Zellen stärker mit der Freisetzung von zahlreichen pro-inflammatorischen und regulatorischen Molekülen aus intaktem Gewebe (IL-6, IL-8, CFD, IL-10, RBP4, CCL2, Abbildung 21).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zur Pathogenese von Arthrose beitragen. Beide T-Zell-Subtypen zeigten hierbei einen Th1-Phänotyp [130-133]. Der Knockout von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen reduzierte in beiden Fällen die Gelenkschädigung in Mausmodellen für Arthrose [134, 135].

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse erweitern die Sichtweise auf T-Zellen in der Arthrose-Pathogenese. Überraschend war beispielsweise die Korrelation der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10. Bislang sind sowohl die zelluläre Quelle von IL-10 als auch die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der Gelenkarthrose noch nicht eindeutig geklärt. Von der beschriebenen Korrelation lässt sich weder auf die zytotoxische T-Zelle als Produktionsort für IL-10 schließen, noch ist sie beweisend für anti-inflammatorische Funktionen dieses Zelltyps. Allerdings deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die Rollen der T-Zell-Subpopulationen womöglich komplexer sind als bisher angenommen und weiterer Untersuchung bedürfen.

8.5 Die synoviale IL-6-Produktion bei Kniegelenksarthrose

Diese Studie bietet die bis dato detaillierteste Untersuchung von synovialer IL-6-Produktion. IL-6 stellt mit 10.000-fachen Expressionsunterschieden eines der am variabelsten exprimierten pro-inflammatorischen Zytokine bei Gelenkverletzungen dar [3, 23]. Die Ergebnisse dieser Studie liefern Anhalt dafür, dass eine Ursache für die beträchtlichen Expressionsunterschiede zwischen Patienten in der Diversität der IL-6 produzierenden Zelltypen liegt (Abbildung 18). Insgesamt produzierten die Fibroblasten am meisten IL-6. Bei einer Handvoll der Patienten dominierten die hämatopoetischen Immunzellen (hauptsächlich Makrophagen). Die hier beschriebene Komplexität der IL-6-Produktion deutet darauf hin, dass genauere Definition der IL-6-Level und -Produktionsquellen hilfreich bei der Einschätzung davon sein kann, wie das Zytokin den Krankheitsverlauf beeinflusst.

8.6 Die IL-6-Antwort bei Arthrose und rheumatoider Arthritis im Vergleich

Die IL-6-Produktion in Patienten mit rheumatoider Arthritis steht schon lange im Interesse der Forschung. Da eine erhöhte IL-6-Produktion in Serum, Synovialflüssigkeit und verschiedenen Gewebetypen, unter anderem dem Synovialgewebe, nachgewiesen werden konnte, wird angenommen, dass IL-6 eine pathomechanistische Rolle bei der rheumatoiden Arthritis einnimmt [167, 168]. Eine Blockade des IL-6-Rezeptors (IL-6-R) durch Tocilizumab, einen blockierenden IL-6-R-Antikörper, bietet einen zugelassenen und wirksamen Therapieansatz für die rheumatoide Arthritis nach erfolglosem Therapieversuch mit Methotrexat und mindestens einem TNF-alpha-Blocker [169].

Im Einklang mit früheren Studien zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die Produktion von IL-6 in der Synovialis von Patienten mit Kniegelenkarthrose variabel ist [3, 6, 7, 10, 23]. Bei einem Teil der untersuchten Patienten war die IL-6-Produktion durchflusszytometrisch kaum nachweisbar. Bei anderen hingegen erreichten die synovialen IL-6-Spiegel ähnliche Höhen wie bei rheumatoider Arthritis.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die Annahme, dass IL-6 nicht nur bei autoimmunen Erkrankungen mit Gelenkbeteiligung wie der rheumatoiden Arthritis, sondern zumindest bei einem Teil der Patienten mit Kniegelenksarthrose pathomechanistisch involviert ist.

In vorangegangenen Studien waren bereits erhöhte IL-6-Expressionslevel in Serum und Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten gezeigt worden [3]. Bei Arthrose ist IL-6 mit Gelenkschmerzen und radiologischer Progression assoziiert [10, 16].

Die Blockade von IL-6 verminderte Gelenkschäden in einem Mausmodell für Arthrose [158]. In einem Rattenmodell für Gelenkarthrose wurde eine Abnahme der zentralen Schmerzsensibilisierung und eine verbesserte Gewichtsbelastung in Funktionstests durch den Einsatz von Tocilizumab beobachtet [170].

Unlängst wurde in einer französischen randomisierten kontrollierten klinischen Studie der Phase III der Effekt von Tocilizumab auf den Krankheitsverlauf von Arthrose der Interphalangeal- und Metacarpophalangealgelenke untersucht [171]. Bislang sind die Studienergebnisse noch unveröffentlicht.

Diskussion

Gerade in Hinblick auf unerwünschte Wirkungen wie beispielsweise erhöhte Infektionsgefahr durch Blockade von IL-6 bleibt abzuwarten, wie der Einsatz von anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpern bei einer nicht-systemisch verlaufenden Erkrankung wie der Gelenkarthrose hinsichtlich des Risiko-Nutzen-Verhältnisses zu bewerten ist. Die in dieser Studie gezeigte Variabilität und Komplexität der IL-6-Antwort lässt zudem vermuten, dass nicht alle Arthrose-Patienten gleichermaßen von einer IL-6-Blockade profitieren können.

8.7 Korrelations- und Clusteranalysen zur Stratifizierung der synovialen Entzündungsantwort

Weiterhin wird aufgezeigt, welches großes Potential in der Kombination verschiedener Datentypen in Korrelations- und Clusteranalysen für die Untersuchung der synovialen Entzündungsantwort liegt (Abbildung 21+22). In Clusteranalysen separierten sich die Patienten weitgehend in T-Zell/Lymphozyt- (1) und myeloische (2-3) Gruppen. Insbesondere Cluster 3 war dabei mit hoher IL-6- und IL-8-Produktion assoziiert. Erste Ergebnisse bieten Anhalt dafür, dass die verschiedenen Cluster unterschiedliche klinische Patientenphänotypen widerspiegeln: Cluster 2 stand mit dem weiblichen Geschlecht in Zusammenhang und Cluster 3 mit früherer Gelenkarthroskopie und –arthroplastik (Abbildung 22).

Es bleibt noch zu klären, ob die beschriebenen Patientengruppen besser definiert und dem Krankheitsverlauf und klinischen Phänotypen zugeordnet werden können.

8.8 Limitationen der Studie

Einige limitierende Aspekte dieser Studie sind zu nennen. Die Notwendigkeit der Zersetzung und Kultivierung des synovialen Gewebes für durchflusszytometrische und ELISA-Untersuchungen birgt das Risiko der Veränderung zellulärer Phänotypen. Die Probenauswahl kann die Studienergebnisse zusätzlich beeinflusst haben. Vorangehende Arthrose- und Rheumatoide Arthritis-Studien zeigten bei drei bis vier ultraschallgesteuerten Gelenkhaut-Punktionen [9, 172] oder ca. 150 mg Gewebe [54] gute Reproduzierbarkeit von histologischen Untersuchungen und RNA-Sequenzierungen. In dieser Studie zeigte sich wenig Variabilität bei Untersuchung von ca. vier Proben à ~100 mg Gewebe. Generell wurden aber größere

Diskussion

Gewebemengen (12 Proben/ ~1200 mg) untersucht, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und Fehler zu vermeiden.

Ein größerer Störfaktor dieser Arbeit ist, dass die anatomische Region der Gewebeentnahme nicht kontrolliert wurde. Dies ist problematisch, da synoviale Entzündung potenziell ungleichmäßig im Gewebe verteilt sein kann. Dagegenzuhalten ist, dass synoviale Entzündung in späten Krankheitsstadien der Arthrose generell umfangreicher, und damit einhergehend, auch gleichmäßiger verteilt ist. Zudem zeigten sich keine Korrelationen von Patientengruppen und den operierenden Chirurgen (Abbildung 22).

Schließlich ist bekannt, dass sich der synoviale Befund bei Fortschreiten der Erkrankung verändert [17, 44]. Eine sinnvolle Ergänzung der hier präsentierten Untersuchung kann deshalb ein Vergleich von frühen und späten Erkrankungsstadien sowie das Hinzuziehen zusätzlicher klinischer Variablen und radiologischer Befunde sein.

8.9 Ausblick

Abgesehen von den oben dargestellten Limitationen zeigt diese Studie, dass Multiparameter-Analysen der synovialen Entzündungsreaktion Einblicke in Patientenheterogenität liefern können und damit ein potenziell hilfreiches Werkzeug für die zukünftige Patientenversorgung darbieten. Weiterführende Phänotypisierung kann dabei helfen, ein besseres Verständnis der synovialen Entzündungsreaktion zu gewinnen. Langfristig können so womöglich Biomarker entwickelt werden, mit denen Patientengruppen identifiziert werden können, die von neuen Therapieansätzen profitieren.

9 Zusammenfassung

Entzündliche Aktivierung der Gelenkhaut (Synovialitis) in Arthrose-Gelenken ist häufig, verstärkt Knorpelschäden und beeinträchtigt die Gelenkfunktion.

Vorangehende Untersuchungen der Synovialflüssigkeit und histologische Analysen des Synovialgewebes arthrotischer Gelenke lieferten Hinweise darauf, dass Synovialitis bei verschiedenen Patienten inhomogen verläuft.

Ziel dieser Studie war die Phänotypisierung der entzündlichen synovialen Gewebereaktion bei Gonarthrose mittels Multiparameter-Analyse. Als Untersuchungsmaterial diente Synovialgewebe von 35 Arthrose-Patienten, das bei Kniegelenkersatz-Operationen entnommen worden war. Die zelluläre Zusammensetzung der Gelenkhaut und Produktion löslicher Proteine durch synoviale Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie und Multiplex-ELISA untersucht.

Tests zur Optimierung des enzymatischen Gewebeverdaus zeigten, dass aggressivere Zersetzung die Zellausbeute und die Färbung von Fibroblasten für durchflusszytometrische Analysen verbesserte, die Färbung von CD4 auf T-Zellen und CD56 auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) hingegen negativ beeinflusste.

Analysen der zellulären Zusammensetzung der Synovialis ergaben eine hoch variable Infiltration von T-Zellen (0-43 %). Zudem wurden Fibroblasten-Subpopulationen gefunden, die mit verschiedenen hämatopoetischen Zellgruppen wie Makrophagen und T-Zellen korrelierten.

Die Menge an synovialen IL-6 variierte beträchtlich zwischen Spendern. Alle nachgewiesenen Zellpopulationen trugen zur IL-6-Produktion bei, insgesamt dominierten aber die Fibroblasten. Innerhalb der mesenchymalen Zellgruppe stellten die CD90 und CD34 exprimierenden Subpopulationen die stärksten IL-6-Produzenten dar.

Die Freisetzung von IL-6, IL-8, Komplementfaktor D (CFD) und IL-10 korrelierte positiv mit der Zelldichte im Gewebe. Darüber hinaus waren hohe Anzahlen an CD8⁺ T-Zellen mit der Freisetzung von Retinol-bindendem Protein 4 (RBP4) und CCL2-Produktion assoziiert.

Zusammenfassung

Die Kombination aus Durchflusszytometrie- und Multiplex-Daten diene schließlich dazu, mittels Cluster-Analysen patientenspezifische Entzündungscluster zu identifizieren.

Diese Studie präsentiert einen neuartigen Ansatz zur Phänotypisierung der synovialen Entzündungsreaktion bei Gonarthrose. Weiterführende Untersuchungen können dabei helfen, neue Erkenntnisse über die der Arthrose zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen und Patientenheterogenität zu gewinnen. Längerfristig kann dies die Entwicklung von Arthrose-Biomarkern und patientenspezifischen Therapieansätzen vorantreiben.

10 Literaturverzeichnis

1. Beekhuizen M, et al. An explorative study comparing levels of soluble mediators in control and osteoarthritic synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(7):918-922.
2. Cuellar VG, Cuellar JM, Kirsch T, Strauss EJ. Correlation of Synovial Fluid Biomarkers With Cartilage Pathology and Associated Outcomes in Knee Arthroscopy. *Arthroscopy*. 2016;32(3):475-485.
3. Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther*. 2000;6(2):71-79.
4. Knoop J, et al. Identification of phenotypes with different clinical outcomes in knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(11):1535-1542.
5. Lambert C, et al. Gene expression pattern of cells from inflamed and normal areas of osteoarthritis synovial membrane. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(4):960-968.
6. Larsson S, Englund M, Struglics A, Lohmander LS. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1906-1914.
7. Livshits G, et al. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):2037-2045.
8. Ma CH, et al. Genes relevant with osteoarthritis by comparison gene expression profiles of synovial membrane of osteoarthritis patients at different stages. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(3):431-439.
9. Minten MJM, et al. Exploring longitudinal associations of histologically assessed inflammation with symptoms and radiographic damage in knee osteoarthritis: combined results of three prospective cohort studies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(1):71-79.
10. Stannus O, et al. Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(11):1441-1447.
11. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(5):361-367.
12. Bevers K, Bijlsma JW, Vriezekolk JE, van den Ende CH, den Broeder AA. The course of ultrasonographic abnormalities in knee osteoarthritis: 1 year follow up. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(10):1651-1656.
13. Guermazi A, et al. Synovitis in knee osteoarthritis assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) is associated with radiographic tibiofemoral osteoarthritis and MRI-detected widespread cartilage damage: the MOST study. *J Rheumatol*. 2014;41(3):501-508.
14. Krasnokutsky S, et al. Quantitative magnetic resonance imaging evidence of synovial proliferation is associated with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(10):2983-2991.
15. Liao W, Li Z, Wang H, Wang J, Fu Y, Bai X. Proteomic analysis of synovial fluid: insight into the pathogenesis of knee osteoarthritis. *Int Orthop*. 2013;37(6):1045-1053.

Literaturverzeichnis

16. Neogi T, et al. Association of Joint Inflammation With Pain Sensitization in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(3):654-661.
17. Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(5):633-640.
18. Philp AM, Davis ET, Jones SW. Developing anti-inflammatory therapeutics for patients with osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(6):869-881.
19. Ritter SY, et al. Proteomic analysis of synovial fluid from the osteoarthritic knee: comparison with transcriptome analyses of joint tissues. *Arthritis Rheum.* 2013;65(4):981-992.
20. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* 2012;51(2):249-257.
21. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(11):625-635.
22. Song Z, Zhang C, He L, Sui Y, Lin X, Pan J. Uncovering transcription factor and microRNA risk regulatory pathways associated with osteoarthritis by network analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(4):902-906.
23. Watt FE, et al. Acute Molecular Changes in Synovial Fluid Following Human Knee Injury: Association With Early Clinical Outcomes. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(9):2129-2140.
24. Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil.* 2006;85(11 Suppl):2-11, 12-14.
25. Robert Koch-Institut R, M. Arthrose. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 54. 2013:17.
26. Spector TD, Dacre JE, Harris PA, Huskisson EC. Radiological progression of osteoarthritis: an 11 year follow up study of the knee. *Ann Rheum Dis.* 1992;51(10):1107-1110.
27. Robert Koch-Institut R, M. Arthrose. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 54. 2013:9.
28. Felson DT, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000;133(8):635-646.
29. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(1):5-15.
30. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull.* 2013;105:185-199.
31. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(9):769-781.
32. Chapman K, et al. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2008;17(10):1497-1504.
33. Evangelou E, et al. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1710-1721.
34. Palotie A, et al. Predisposition to familial osteoarthrosis linked to type II collagen gene. *Lancet.* 1989;1(8644):924-927.

Literaturverzeichnis

35. Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(4):433-439.
36. Jiang L, et al. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2012;79(3):291-297.
37. Richette P, et al. Benefits of massive weight loss on symptoms, systemic inflammation and cartilage turnover in obese patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):139-144.
38. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(4):507-515.
39. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(1):24-33.
40. Robert Koch-Institut F, J., Rabenberg, M., Scheidt-Nave, C. Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen, Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt.* 2013:680.
41. Robert Koch-Institut R, M. Arthrose. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 54. 2013:22-24.
42. Cibrian Uhalte E, Wilkinson JM, Southam L, Zeggini E. Pathways to understanding the genomic aetiology of osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2017;26(R2):R193-R201.
43. Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(2):160-167.
44. van Spil WE, et al. Clusters within a wide spectrum of biochemical markers for osteoarthritis: data from CHECK, a large cohort of individuals with very early symptomatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(7):745-754.
45. Roemer FW, et al. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(10):1804-1809.
46. Stannus OP, Jones G, Blizzard L, Cicuttini FM, Ding C. Associations between serum levels of inflammatory markers and change in knee pain over 5 years in older adults: a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(4):535-540.
47. Sturmer T, Brenner H, Koenig W, Gunther KP. Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(2):200-205.
48. Singh JA, Arayssi T, Duray P, Schumacher HR. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(7):785-790.
49. Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J.* 2011;5:100-106.
50. Smith MD, et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(4):303-307.
51. Torres L, et al. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1033-1040.
52. Matos TR, Liu H, Ritz J. Research Techniques Made Simple: Experimental Methodology for Single-Cell Mass Cytometry. *J Invest Dermatol.* 2017;137(4):e31-e38.

Literaturverzeichnis

53. Autengruber A, Gereke M, Hansen G, Hennig C, Bruder D. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012;2(2):112-120.
54. Donlin LT, et al. Methods for high-dimensional analysis of cells dissociated from cryopreserved synovial tissue. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):139.
55. Hagman DK, et al. Characterizing and quantifying leukocyte populations in human adipose tissue: impact of enzymatic tissue processing. *J Immunol Methods*. 2012;386(1-2):50-59.
56. Mizoguchi F, et al. Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nat Commun*. 2018;9(1):789.
57. Ogata Y, et al. Purified Human Synovium Mesenchymal Stem Cells as a Good Resource for Cartilage Regeneration. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129096.
58. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 2009:116-117.
59. Croft AP, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature*. 2019;570(7760):246-251.
60. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*. 1997;75(5):430-445.
61. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):253-259.
62. Chen J, et al. The role of CD11b in phagocytosis and dendritic cell development. *Immunol Lett*. 2008;120(1-2):42-48.
63. Faridi MH, Altintas MM, Gomez C, Duque JC, Vazquez-Padron RI, Gupta V. Small molecule agonists of integrin CD11b/CD18 do not induce global conformational changes and are significantly better than activating antibodies in reducing vascular injury. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3696-3710.
64. Oldenburg R, et al. Mycobacterial Phenolic Glycolipids Selectively Disable TRIF-Dependent TLR4 Signaling in Macrophages. *Front Immunol*. 2018;9:2.
65. Zhou H, et al. Antagonism of Integrin CD11b Affords Protection against Endotoxin Shock and Polymicrobial Sepsis via Attenuation of HMGB1 Nucleocytoplasmic Translocation and Extracellular Release. *J Immunol*. 2018;200(5):1771-1780.
66. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):340-352.
67. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993;14(3):121-125.
68. Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol*. 2014;1(1).
69. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):465-479.
70. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(2):81-93.
71. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012;92(6):1177-1186.
72. Suzuki Y, et al. Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):13129.

Literaturverzeichnis

73. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*. 1992;13(5):169-172.
74. Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr MA, Grunert F, Haslett C, Dransfield I. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur J Immunol*. 1996;26(12):2924-2932.
75. Schroder AK, Uciechowski P, Fleischer D, Rink L. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum Immunol*. 2006;67(9):676-682.
76. Bottomly K. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol Today*. 1988;9(9):268-274.
77. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-173.
78. Harrington LE, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-1132.
79. Koszinowski UH, Reddehase MJ, Jonjic S. The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections. *Curr Opin Immunol*. 1991;3(4):471-475.
80. Morimoto C, et al. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol*. 1985;134(6):3762-3769.
81. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR, Schlossman SF. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol*. 1985;134(3):1508-1515.
82. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*. 1987;70(5):1316-1324.
83. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980;125(4):1678-1685.
84. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15(9):450-454.
85. Riley JK, Sliwowski MX. CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol*. 2000;27(6 Suppl 12):17-24.
86. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:140-174.
87. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-2438.
88. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136(12):4480-4486.
89. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-640.
90. Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*. 1997;6(6):655-661.
91. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169(6):2233-2238.
92. Andreu JL, Trujillo A, Alonso JM, Mulero J, Martinez C. Selective expansion of T cells bearing the gamma/delta receptor and expressing an unusual repertoire in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991;34(7):808-814.

Literaturverzeichnis

93. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(9):1263-1267.
94. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(6):R187.
95. Cannons JL, Karsh J, Birnboim HC, Goldstein R. HPRT- mutant T cells in the peripheral blood and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(10):1772-1782.
96. Diaz-Torne C, et al. Absence of histologic evidence of synovitis in patients with Gulf War veterans' illness with joint pain. *Arthritis Rheum.* 2007;57(7):1316-1323.
97. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(12):870-875.
98. Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Teitge RA, Miller PR, An T, Negendank WG. Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis. *Magn Reson Imaging.* 1995;13(2):177-183.
99. Helbig B, Gross WL, Borisch B, Starz H, Muller-Hermelink HK. Characterization of synovial macrophages by monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1988;76:61-66.
100. Hogg N, Palmer DG, Revell PA. Mononuclear phagocytes of normal and rheumatoid synovial membrane identified by monoclonal antibodies. *Immunology.* 1985;56(4):673-681.
101. Kraan MC, Haringman JJ, Post WJ, Versendaal J, Breedveld FC, Tak PP. Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38(11):1074-1080.
102. Lindblad S, Hedfors E. Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30(10):1081-1088.
103. Mitchell A, et al. LILRA5 is expressed by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis, selectively induces pro-inflammatory cytokines and IL-10 and is regulated by TNF-alpha, IL-10 and IFN-gamma. *Eur J Immunol.* 2008;38(12):3459-3473.
104. Ogdie A, et al. Identification of broadly discriminatory tissue biomarkers of synovitis with binary and multicategory receiver operating characteristic analysis. *Biomarkers.* 2010;15(2):183-190.
105. Pessler F, et al. The synovitis of "non-inflammatory" orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1184-1187.
106. Pettit AR, Ahern MJ, Zehntner S, Smith MD, Thomas R. Comparison of differentiated dendritic cell infiltration of autoimmune and osteoarthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2001;44(1):105-110.
107. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis.* 1988;47(4):300-307.
108. Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(2):156-162.
109. Scanzello CR, et al. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(8):1040-1048.

Literaturverzeichnis

110. Smith MD, O'Donnell J, Highton J, Palmer DG, Rozenbils M, Roberts-Thomson PJ. Immunohistochemical analysis of synovial membranes from inflammatory and non-inflammatory arthritides: scarcity of CD5 positive B cells and IL2 receptor bearing T cells. *Pathology*. 1992;24(1):19-26.
111. Da RR, Qin Y, Baeten D, Zhang Y. B cell clonal expansion and somatic hypermutation of Ig variable heavy chain genes in the synovial membrane of patients with osteoarthritis. *J Immunol*. 2007;178(1):557-565.
112. Fonseca JE, Edwards JC, Blades S, Goulding NJ. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. *Arthritis Rheum*. 2002;46(5):1210-1216.
113. Pessler F, et al. A histomorphometric analysis of synovial biopsies from individuals with Gulf War Veterans' Illness and joint pain compared to normal and osteoarthritis synovium. *Clin Rheumatol*. 2008;27(9):1127-1134.
114. Shiokawa S, Matsumoto N, Nishimura J. Clonal analysis of B cells in the osteoarthritis synovium. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(8):802-805.
115. Bridges AJ, et al. Human synovial mast cell involvement in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Relationship to disease type, clinical activity, and antirheumatic therapy. *Arthritis Rheum*. 1991;34(9):1116-1124.
116. Buckley MG, Gallagher PJ, Walls AF. Mast cell subpopulations in the synovial tissue of patients with osteoarthritis: selective increase in numbers of tryptase-positive, chymase-negative mast cells. *J Pathol*. 1998;186(1):67-74.
117. Ceponis A, et al. Expression of stem cell factor (SCF) and SCF receptor (c-kit) in synovial membrane in arthritis: correlation with synovial mast cell hyperplasia and inflammation. *J Rheumatol*. 1998;25(12):2304-2314.
118. Damsgaard TE, Sorensen FB, Herlin T, Schiøtz PO. Stereological quantification of mast cells in human synovium. *APMIS*. 1999;107(3):311-317.
119. Dean G, Hoyland JA, Denton J, Donn RP, Freemont AJ. Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *Br J Rheumatol*. 1993;32(8):671-675.
120. Fritz P, Reiser H, Saal JG, Hadam M, Müller J, Wegner G. Analysis of mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis by an avidin-peroxidase staining. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1984;47(1):35-45.
121. Gotis-Graham I, McNeil HP. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum*. 1997;40(3):479-489.
122. Gruber B, Poznansky M, Boss E, Partin J, Gorevic P, Kaplan AP. Characterization and functional studies of rheumatoid synovial mast cells. Activation by secretagogues, anti-IgE, and a histamine-releasing lymphokine. *Arthritis Rheum*. 1986;29(8):944-955.
123. Kopicky-Burd JA, et al. Characterization of human synovial mast cells. *J Rheumatol*. 1988;15(9):1326-1333.
124. Nakano S, et al. Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2007;26(8):1284-1292.
125. Pu J, Nishida K, Inoue H, Asahara H, Ohtsuka A, Murakami T. Mast cells in osteoarthritic and rheumatoid arthritic synovial tissues of the human knee. *Acta Med Okayama*. 1998;52(1):35-39.

Literaturverzeichnis

126. Cauli A, Pitzalis C, Yanni G, Awad M, Panayi GS. CD1 expression in psoriatic and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(6):666-673.
127. Lebre MC, Jongbloed SL, Tas SW, Smeets TJ, McInnes IB, Tak PP. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am J Pathol*. 2008;172(4):940-950.
128. Kummer JA, et al. Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;73(1):88-95.
129. de Lange-Brokaar BJ, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(12):1484-1499.
130. Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol*. 2000;27(5):1128-1135.
131. Haynes MK, Hume EL, Smith JB. Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids. *Clin Immunol*. 2002;105(3):315-325.
132. Ishii H, Tanaka H, Katoh K, Nakamura H, Nagashima M, Yoshino S. Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(4):277-281.
133. Li YS, Luo W, Zhu SA, Lei GH. T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. *Front Immunol*. 2017;8:356.
134. Hsieh JL, et al. CD8+ T cell-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 exacerbated osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):19951-19970.
135. Shen PC, et al. T helper cells promote disease progression of osteoarthritis by inducing macrophage inflammatory protein-1gamma. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(6):728-736.
136. Malhotra D, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol*. 2012;13(5):499-510.
137. Middleton J, et al. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol*. 2005;206(3):260-268.
138. Ugorski M, Dziegiel P, Suchanski J. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res*. 2016;6(2):370-386.
139. Suchanski J, et al. Podoplanin increases the migration of human fibroblasts and affects the endothelial cell network formation: A possible role for cancer-associated fibroblasts in breast cancer progression. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184970.
140. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(5):673-694.
141. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013;19(6):355-367.
142. de Andrade Mello P, Coutinho-Silva R, Savio LEB. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol*. 2017;8:1526.
143. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 2017;36(3):293-303.

Literaturverzeichnis

144. Zhang B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology*. 2012;1(1):67-70.
145. Chen S, et al. CD73 expression on effector T cells sustained by TGF-beta facilitates tumor resistance to anti-4-1BB/CD137 therapy. *Nat Commun*. 2019;10(1):150.
146. Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors*. 2009;35(3):258-265.
147. Fries KM, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;72(3):283-292.
148. Saalbach A, Aneregg U, Bruns M, Schnabel E, Herrmann K, Haustein UF. Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities. *J Invest Dermatol*. 1996;106(6):1314-1319.
149. Zhou Y, Hagood JS, Murphy-Ullrich JE. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am J Pathol*. 2004;165(2):659-669.
150. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380-1389.
151. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*. 1991;3(2):175-184.
152. Fina L, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75(12):2417-2426.
153. MacFadyen JR, et al. Endosialin (TEM1, CD248) is a marker of stromal fibroblasts and is not selectively expressed on tumour endothelium. *FEBS Lett*. 2005;579(12):2569-2575.
154. Christian S, et al. Endosialin (Tem1) is a marker of tumor-associated myofibroblasts and tumor vessel-associated mural cells. *Am J Pathol*. 2008;172(2):486-494.
155. Bauer S, et al. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R171.
156. Ekwall AK, et al. The tumour-associated glycoprotein podoplanin is expressed in fibroblast-like synoviocytes of the hyperplastic synovial lining layer in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):R40.
157. Miyake K, et al. Inflammatory cytokine-induced expression of vasohibin-1 by rheumatoid synovial fibroblasts. *Acta Med Okayama*. 2009;63(6):349-358.
158. Latourte A, et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(4):748-755.
159. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 1990;144(9):3347-3353.
160. Doss F, et al. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. *Scand J Rheumatol*. 2007;36(2):136-139.
161. Tran G, Hensor EM, Ray A, Kingsbury SR, O'Connor P, Conaghan PG. Ultrasound-detected pathologies cluster into groups with different clinical outcomes: data from 3000 community referrals for shoulder pain. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):30.
162. Heard BJ, et al. Intraarticular and systemic inflammatory profiles may identify patients with osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(8):1379-1387.

Literaturverzeichnis

163. Luttmann WB, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. *Der Experimentator: Immunologie* 2014. 89 p.
164. Fletcher AL, et al. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med.* 2010;207(4):689-697.
165. Kurth TB, Dell'accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1289-1300.
166. Moradi B, et al. Unicompartmental and bicompartmental knee osteoarthritis show different patterns of mononuclear cell infiltration and cytokine release in the affected joints. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(1):143-154.
167. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(3):232-234.
168. Rubbert-Roth A, Furst DE, Nebesky JM, Jin A, Berber E. A Review of Recent Advances Using Tocilizumab in the Treatment of Rheumatic Diseases. *Rheumatol Ther.* 2018;5(1):21-42.
169. Navarro-Millan I, Singh JA, Curtis JR. Systematic review of tocilizumab for rheumatoid arthritis: a new biologic agent targeting the interleukin-6 receptor. *Clin Ther.* 2012;34(4):788-802 e783.
170. Lin Y, Liu L, Jiang H, Zhou J, Tang Y. Inhibition of interleukin-6 function attenuates the central sensitization and pain behavior induced by osteoarthritis. *Eur J Pharmacol.* 2017;811:260-267.
171. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris H-LR. Effect of the Interleukin-6 Receptor Antagonist Tocilizumab in Patients With Hand Osteoarthritis (TIDOA). NCT02477059. 2018;2019(November 24).
172. Humby F, et al. Use of ultrasound-guided small joint biopsy to evaluate the histopathologic response to rheumatoid arthritis therapy: recommendations for application to clinical trials. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(10):2601-2610.

11 Anhang

Tabelle 5: Gerätschaften und Einwegmaterial

	Produkt	Hersteller
Gerätschaften		
	Inkubator	Thermo Fisher Scientific
	beheizbares Schüttelwasserbad	Benchmark Scientific
	Reagenzglasschüttler	Benchmark Scientific
	Zentrifuge Sorvall™ Legend™ XTR	Thermo Fisher Scientific
	Lichtmikroskop Eclipse TS2	Nikon
	Durchflusszytometer CytoFLEX S	Beckman Coulter
Einwegmaterial		
	Skalpelle	Avantor®, VWR
	Zellkulturplatten (6- und 96-Loch) CELLSTAR®	Greiner BIO-ONE
	Reaktionsgefäße, 2ml, Eppendorf®	Avantor®, VWR
	Zentrifugenröhrchen, 50 ml, Falcon®	Avantor®, VWR
	Zellsiebe, Porengröße 70 µm	Genesee Scientific
	Durchflusszytometrie-Röhrchen, 5 ml, Falcon®	Avantor®, VWR

Tabelle 6: Puffer und Medien

Die Puffer und Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und sterilfiltriert. Bis zur Verwendung wurden sie bei 4 °C gelagert.

	Reagenz	Dosierung	Hersteller
FACS-Puffer			
	PBS, 10x	1x, 500 ml Gesamt-Volumen	Thermo Fisher Scientific
	FBS	2 %	BenchMark™
	EDTA	1 mM	Thermo Fisher Scientific
Gewebeverdau-Auffangmedium			
	DMEM	20 ml	gibco®
	FBS	10 %	BenchMark™
	EDTA	5 mM	Thermo Fisher Scientific
	Monensin	10 µM	Sigma-Aldrich
Kulturmedium (Gewebeproben für Multiplex-Zytokinanalysen)			
	DMEM	500 ml Gesamt-Volumen	gibco®
	FBS	1 %, 50 ml	BenchMark™
	L-Glutamin 100 x	1x, 5 ml	gibco®
	Penicillin/Streptomycin, 100x	1x, 5ml	gibco®
	Gentamicin, 1000x	1x, 0,5 ml	gibco®
	2-Mercaptoethanol	0,5 ml	gibco®
	essenzielle Aminosäuren, 50x	1x, 10 ml	gibco®
	nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	1x, 5 ml	gibco®
Kulturmedium (Gewebeproben für durchflusszytometrische Analysen)			
	DMEM	500 ml Gesamt-Volumen	gibco®
	FBS	1 %, 50 ml	BenchMark™
	L-Glutamin 100 x	1x, 5 ml	gibco®
	Penicillin/Streptomycin, 100x	1x, 5ml	gibco®
	Gentamicin, 1000x	1x, 0,5 ml	gibco®
	2-Mercaptoethanol	0,5 ml	gibco®
	essenzielle Aminosäuren, 50x	1x, 10 ml	gibco®
	nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	1x, 5 ml	gibco®
	Monensin	10 µM	BioLegend

Tabelle 7: Weitere ReagenzienEC-Nr. = engl. *Enzyme Commission Number*, internationales Klassifikationssystem für Enzyme

	Reagenz	Dosierung	Hersteller
	Trypanblau	--	gibco® by Life Technologies
	Erythrozyten-Lysepuffer	--	Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific
Für die Gewebezersetzung eingesetzte Enzyme			
Verdaumedium	DMEM	--	gibco®
	DNase (EC-Nr. 3.1.21.1)	50 µg/ml	Roche
	Kollagenase P (EC-Nr. 3.4.24.3)	400 µg/ml	Roche
	Dispase (EC-Nr. 3.4.24.4)	8-800 µg/ml	Roche
	Liberase™ TL	100 µg/ml	Sigma-Aldrich
Versuchskits			
	Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set	--	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific
	LEGENDplex™ human Adipokine Kit	--	BioLegend

Tabelle 8: Liste der für durchflusszytometrische Untersuchungen eingesetzten Reagenzien

ANTIGEN	FLUOROCHROM	KLON	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
Allgemeine Reagenzien				
Zellviabilität	Zombie Aqua™		BioLegend	1:150
CD16/CD32/CD64 (Human Fc Rezeptor Blockade)	--	3G8/FUN- 2/10.1	BioLegend	1:20
Panel für mesenchymale Zellen				
CD45	FITC	HI30	BioLegend	1:30
Podoplanin (PDPN)	APC	NZ1.3	BioLegend	1:30
CD90 (Thy1)	BV605	5E10	BioLegend	1:30
CD34	BV660	561	BioLegend	1:30
CD146	Pe-Cy7	P1H12	BioLegend	1:30
CD31	A700	WM59	BioLegend	1:30
CD31	Pacific Blue™	WM59	BioLegend	1:30
CD248	BV421	B1/35	BD Biosciences	1:30
CD73	APC-Cy7	AD2	BioLegend	1:30
IL-6	PE	UV4	BioLegend	1:10
Ratte IgG1 Isotyp	PE	MRG1-58	BioLegend	1:10
Panel für hämatopoetische Zellen				
CD45	FITC	HI30	BioLegend	1:30
CD11b	BV660	ICRF44	BioLegend	1:30
HLA-DR	BV605	L234	BioLegend	1:30
CD3	A700	UCHT1	BioLegend	1:30
CD20	APC-Cy7	2H7	BioLegend	1:30
CD206	BV421	15-2	BioLegend	1:30
CD66b	A647	G10F5	BioLegend	1:30
IL-6	PE	UV4	BioLegend	1:10
Ratte IgG1 Isotyp	PE		BioLegend	1:10
Panel für T-Zellen				
CD45	FITC	HI30	BioLegend	1:30
CD11b	BV660	ICRF44	BioLegend	1:30
CD20	BV660	2H7	BioLegend	1:30
CD3	A700	UCHT1	BioLegend	1:30
CD8	BV605	SK1	BioLegend	1:30
CD4	PE	RPA-T4	BioLegend	1:30
CD45RA	A647	HI100	BioLegend	1:30
CD45RO	PE-Cy7	UCHL1	BioLegend	1:30
CD16	PerCP-Cy5.5	B37.1	BioLegend	1:30
CD56	BV421	HCD56	BioLegend	1:30
Andere				
CD14	APC-Cy7	HCD14	BioLegend	1:30

Danksagung

Lebenslauf von Hannah Labinsky

Geboren: 15.04.1993
in Bad Soden am Taunus

Familienstand: ledig



Schulbildung

1999–2003 Grundschule Limeschule Wehrheim
2003–2012 Gymnasium Christian-Wirth-Schule Usingen,
Abiturnote 1,0

Studium

seit 10/2012 Medizin, JGU Mainz,
09/2014 Note 1,5 im 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
10/2018 Note 2,0 im 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
11/2019 Note 1,0 im 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

Famulaturen:

03/2016 Hochtaunuskliniken Usingen (Allg. Innere Medizin)
09/2016-10/2016 Uniklinik Freiburg, Rheumatologie/Immunologie
02/2017 und 03/2018 Praxisfamulaturen: Pneumologie und Allgemeinmedizin

Praktisches Jahr:

19/11/2018-30/06/2019 Chirurgie und Wahlfach Anästhesiologie am
GPR Rüsselsheim (Lehrkrankenhaus Uniklinik Mainz)
Seit 01/07/2019 Innere Medizin an der Uniklinik Münster
11/08/2019-16/08/2019 Teilnahme an der „Rheuma Summer School“ in
Düsseldorf

Wissenschaftliche Erfahrung

- | | |
|-----------------|--|
| 07/2015-03/2017 | Wissenschaftliche Hilfskraft im Forschungslabor in der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz |
| 03/2017-02/2018 | Visiting Scientist in der Forschungsgruppe von Erika Noss, M.D., Ph.D., Division of Rheumatology, University of Washington, Seattle, USA |

Konferenzbeiträge

- | | |
|---------|---|
| 10/2016 | DGfI-Kongress in Hamburg, Postertitel:
<i>The Costimulatory Molecules CD80 and CD86 Orchestrate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells.</i> ,
Labinsky H., Schlöder J., Jonuleit H. |
| 10/2018 | American College of Rheumatology Meeting, Chicago, Postertitel: <i>Synovial Inflammation Identifies Patients Clusters in Osteoarthritis</i> ,
Labinsky H. et al. |

Publikationen

- | | |
|---------|---|
| 11/2019 | <i>Multiparameter Analysis Identifies Heterogeneity in Knee Osteoarthritis Synovial Responses</i> ,
Arthritis & Rheumatology
Labinsky H. et al. |
|---------|---|

Stipendien

- | | |
|-----------|---|
| seit 2013 | Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes |
|-----------|---|

Sprachen

- | | |
|-------------|-----------------|
| Deutsch | Muttersprache |
| Englisch | sehr gut |
| Französisch | Grundkenntnisse |