

# Etablierung eines *in vitro* Testsystems für die rheumatoide Arthritis zur Testung therapeutisch relevanter Wirkstoffe

Heike Smolian<sup>1,2</sup>, Susann Thiele<sup>2</sup>, Hansjörg Kolkenbrock<sup>3</sup>, Josef Zacher<sup>4</sup>, Wilhelm Aicher<sup>5</sup>, Olaf Schultz<sup>2</sup>, Gerd R. Burmester<sup>2</sup>, Michael Sittinger<sup>2</sup>

<sup>1</sup>TransTissue Technologies GmbH, D-Berlin, <sup>2</sup>Labor für Tissue Engineering, Universitätsklinikum Charité, D-Berlin, <sup>3</sup>Microparticles Inc., D-Berlin, <sup>4</sup>Klinik für Orthopädie, Klinikum Buch, D-Berlin, <sup>5</sup>Orthopädische Universitätsklinik, Forschungslaboratorien, Universität D-Tübingen.

#### Zusammenfassung

In unserer Arbeitsgruppe Tissue Engineering wurde ein dreidimensionales (3D) in vitro Modell für die rheumatoide Arthritis (RA) (in vitro Pannus) etabliert mit dem Ziel, ein standardisiertes in vitro Testsystem zur Analyse der Wirkung von Pharmaka und verschiedener biologischer Wirkstoffe zu entwickeln. Der modifizierte in vitro Pannus besteht aus 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen, die mit humanen RA-Synovialzellkulturen interagieren.

Die interaktiven 3D-Co-Kulturen bestehen aus definierten rheumatoiden Synovialzellpopulationen, die durch Aufzentrifugieren in direkten Kontakt mit den Chondrozyten-Pelletkulturen gebracht wurden. Während der Co-Kultivierung konnte anhand histochemischer Färbungen deutlich eine Invasion der RA-Synovialzellpopulationen in die Matrix der Chondrozyten-Pelletkulturen beobachtet werden. Die Genexpressionsanalyse zeigte eine Reduzierung der Kollagen Typ II-Expression in den Chondrozyten während der zweiwöchigen Co-Kultur mit RA-Synovialzellen.

Diese interaktiven Co-Kulturen ermöglichen die Untersuchung einzelner Zellpopulationen und ihrer Wechselwirkungen im System. Das etablierte Kulturmodell eröffnet zahlreiche Möglichkeiten, die Daten aus den Tiermodellen für die RA zu ergänzen und könnte sich als ein in vitro Testsystem für die Untersuchung neuer therapeutischer Strategien in einem experimentellen System eignen. Summary: Establishment of an *in vitro* model for rheumatoid arthritis as test system for therapeutical substances In our Tissue Engineering group a 3D in vitro model for rheumatoid Arthritis (in vitro pannus) was established with the aim to develop a standardized drug-screening test to analyze the effects of drugs and different biological substances. The advanced model consists of chondrocyte pellet cultures interacting with rheumatoid arthritis (RA) synovial cell cultures.

To establish interactive 3D co-cultures defined rheumatoid arthritis synovial cell populations were centrifuged directly on chondrocyte pellet cultures. Histochemical stainings during time of co-culture revealed obvious invasion by RA synovial cell populations into the chondrocyte matrix.

Gene expression analysis showed a downregulation of collagen type II expression in chondrocytes within 2 weeks after coculture with RA synovial cells.

Those interactive co-cultures allow the study of single cell populations as well as the cellular interactions in this system under in vitro conditions. Thus, the established co-culture model may be suitable for routine screening tests, which can be useful in supplementing animal experiments in basic research and drug testing.

Keywords: rheumatoid arthritis (RA), in vitro pannus model, chondrocytes, co-culture model

#### **1** Einleitung

#### 1.1 Die rheumatoide Arthritis

Rheumatische Erkrankungen nehmen in den Krankheitsstatistiken der Bundesrepublik Deutschland immer einen der ersten drei Plätze ein. Etwa die Hälfte aller Erwachsenen klagen über wenigstens ein rheumatisches Symptom; bei 20% derjenigen Personen, die einen Arzt aufsuchen, ist eine rheumatische Störung diagnostizierbar und 20-30% der Arbeitsunfähigkeitsfälle sind auf Krankheiten des Bewegungsapparates und des Bindegewebes zurückzuführen. Analgetika und Antirheumatika sind seit vielen Jahren die am häufigsten verordneten Medikamente und werden von etwa 7-8% der Bevölkerung eingenommen.

Die rheumatoide Arthritis (RA, chronische Polyarthritis) ist der Prototyp einer chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankung. Obwohl die RA im Rahmen der rheumatischen Erkrankungen einen geringen Anteil von weniger als 10% hat, gehört sie zu den schwersten Erkrankungen des Bewegungssystems. So sind bei einer Krankheitsdauer von 10-20 Jahren bis zu 70% der Patienten erwerbsunfähig.

Zur Entstehung der RA existieren mehrere Hypothesen. Während bei der RA einerseits Autoimmun-Mechanismen (vermittelt durch T-Zellen) zugrunde liegen, wird von anderer Seite die Theorie von der RA als bakterielle oder virale Infektion befürwortet. Entzündungsreaktionen in der Gelenkinnenhaut, der Synovialmembran, führen im Verlauf der Krankheit zur Bildung eines sog. Pannusgewebes, welches Knorpel- und Knochengewebe invadiert und schließlich zerstört (Abb. 1).

Zelluläre Interaktionen führen dabei zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Entzündungsvermittler) und Wachstumsfaktoren, die unter physiologischen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Matrixbildung und -abbau aufrecht erhalten. Bei der rheumatoiden Ar1999). Im Prozess der Matrixdegradation wirken verschiedenartige Enzymsysteme zusammen, wobei der Matrixabbau hauptsächlich durch die auch als Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichneten Enzyme vermittelt wird. Dabei handelt es sich um eine Familie proteolytischer Enzyme, die verschiedene Matrixproteine mit unterschiedlicher Spezifität abbauen, wobei



Abb. 1: Darstellung der entzündlichen Gelenksveränderungen bei der rheumatoiden Arthritis (RA) (rechte Seite) im Vergleich zum gesunden Gelenk (linke Seite).

thritis wird dieses Gleichgewicht durch die übermäßige Produktion proinflammatorischer Zytokine zugunsten der Matrixdegradation verschoben. Dadurch wird offenkundig, dass das Gleichgewicht zwischen protektiven und destruktiven Zytokinen wichtiger für die resultierende Zerstörung ist, als die absoluten Spiegel destruktiver Mediatoren (van den Berg, 1999). Die pathologischen Prozesse weisen eine hohe Komplexität auf, wodurch es nicht möglich ist, die Expression eines einzelnen Zytokins mit dem Ablauf der Gelenkdestruktion zu korrelieren.

Durch die überschießende Produktion dieser Zytokine kommt es in der rheumatoiden Synovialmembran zu Aktivierungen, die wiederum zur Freisetzung von matrixabbauenden Enzymen aus synovialen Zellen führt (Nagase und Woessner, man die Subfamilien Kollagenasen, Stromelysine und Gelatinasen unterscheidet.

Die meisten MMPs werden von einer Vielzahl von Zellen als inaktive Proenzyme (proMMPs) sezerniert und anschließend durch verschiedene Proteinasen wie Plasmin oder durch aktive MMPs über einen Stufenmechanismus aktiviert. Dabei ist ihre Aktivität abhängig vom Vorhandensein eines Zn<sup>2+</sup>-Ions im aktiven Zentrum. Ca<sup>2+</sup> dient zu ihrer Stabilisierung (Werb, 1993). Zur Familie der MMPs gehören Gelatinase A (MMP-2) - vorwiegend von Fibroblasten und fibroblasten-ähnlichen Zellen sekretiert (Stetler-Stevenson, 1996; Fassina et al., 1996) - und Gelatinase B (MMP-9) - hauptsächlich von Leukozyten produziert (Watanabe et al., 1993; Declaux et al., 1996). Die Expression der meisten proMMPs unterliegt einer strengen Regu-

lierung durch verschiedene Stimulatoren wie Zytokine. Wachstumsfaktoren und Hormone. Allerdings wird die Produktion von proMMP-2 nicht von diesen reguliert, abgesehen von Transforming Growth Factor (TGF)-B. Somit ist in der Aktivierung ein Schlüsselschritt für die Kontrolle der enzymatischen Aktivität der MMP-2 zu sehen. Während die Aktivierung der latenten 92 kDa-proMMP-9 zur aktiven 85 kDa-Form durch eine Vielzahl von Proteinasen wie z.B. Stromelysin erfolgt, wird proMMP-2 durch Plasmamembran gebundene Metalloproteinasen, sog. Membran-Typ MMPs (MT-MMPs), aktiviert (Sato et al., 1994; Will und Hinzmann, 1995; Pei, 1999; Kolkenbrock et al., 1999; Llano et al., 1999). Diese Aktivierung erfolgt durch Abspaltung eines N-terminalen Peptids und führt zu einer 62 kDa-Form von MMP-2, die sich autokatalytisch in die vollaktive 59 kDa-Form überführt. In Fibroblasten wurden verschiedene Signalwege für die Aktivierung von MMP-2 gefunden (Gervasi et al., 1996; Li et al., 1997; Li et al., 1998). Besonders ist Concanavalin A - ein Lectin, das spezifisch an Glykoproteine der Zelloberfläche bindet - bekannt für die proteolytische Aktivierung von MMP-2 und findet aus diesem Grund breite Anwendung bei der Untersuchung der MMP-Aktivierung (Overall und Sodeck, 1990).

An diesen Vorgängen bei der rheumatoiden Arthritis sind mehrere Zellpopulationen beteiligt: Makrophagen- und Fibroblasten-ähnliche Zellen sind die vorherrschende Zellgruppe einer normalen Synovialmembran. Aktivierte Endothelzellen sind für die Gefäßneubildung des Pannusgewebes von großer Bedeutung, während die Anhäufung von T-Zellen als lokale Reaktion auf ein bisher unbekanntes Antigen gedeutet werden kann. Knorpelzellen (Chondrozyten) sind als Produzenten der Knorpelmatrix von Bedeutung für regenerative Vorgänge. Die Bedeutung der Knorpelmatrix für das invasive Verhalten der Synovialmembran liegt u.a. in der Gegenwart von Matrixbestandteilen, die eine Zelladhäsion an den Gelenkknorpel ermöglichen. Die Anlagerung von inflammatorischen Zellen an Matrixbestandteile kann Zellaktivierungsvorgänge auslösen, die dann zur Freisetzung matrixabbauender Enzyme führen. Wichtige neuere Erkenntnisse betreffen die Wechselwirkungen von Zellen und Zellprodukten, ins-



besondere Zytokinen, mit der extrazellulären Matrix (Gilat et al., 1996; Schonherr und Hausser, 2000).

### 1.2 Das in vitro Pannusmodell

Für die Pathogenese der RA gibt es nach wie vor kein ideales Modell.

Neben den etablierten experimentellen Arthritiden (z.B. kollageninduzierte A., Adjuvans-A.) wenden mehrere Forschergruppen das SCID-Maus-System mit implantiertem Synovialgewebe an (z.B. Sack et al., 1993; Geiler et al., 1994; Kaul et al., 1995; Lehmann et al., 2000; Pap et al., 2000; Pap et al., 2001), um die Interaktionen zwischen Pannus- und Knorpelgewebe direkt zu studieren. Eine wichtige Neuerung stellten außerdem Untersuchungen an HLA-DR4-CD4 transgenen Mäusen dar (Sonderstrup et al., 1999). Die genannten Ansätze (Houri und O'Sullivan, 1995; Joe et al., 1999) können nicht auf Versuchstiere verzichten, die jedoch als Tiermodelle nur eingeschränkt auf die humane Pathologie übertragbar sind.

Die etablierten konventionellen Zellkultursysteme bieten den Vorteil, definierte Versuchsparameter unter standardisierten und leicht reproduzierbaren Bedingungen zu analysieren. Allerdings sind sie mit einer Dedifferenzierung der Zellen, also dem Verlust ihrer typischen Eigenschaften verbunden und somit nicht in der Lage, die komplexen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen der in vivo Verhältnisse widerzuspiegeln. Weiterhin stellen die an humanem Operationsmaterial oder zweidimensionalen Zellkulturen gewonnenen Daten stets nur die Momentaufnahme eines langfristigen Prozesses dar. Daher besteht die Notwendigkeit, die bisherigen Tiermodelle durch Langzeitstudien mit humaner Synovialmembran und humanem Knorpel zu ergänzen.

Auch aus diesem Grund hat in den letzten Jahren das Fachgebiet des *Tissue Engineering* rasch an Bedeutung gewonnen (Langer und Vacanti, 1993; Caplan, 2000; Hollinger et al., 2000). Die Techniken des *Tissue Engineering* ermöglichen heute die Entwicklung komplexer *in vitro* Gewebemodelle. Unterschiedliche Zelltypen können getrennt oder gemeinsam dreidimensional gezüchtet werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Zellkulturen können beim *Tissue Engineering* die Zellen ihre eigene gewebetypische extrazelluläre Matrix ausbilden, so dass deren Funktion bei zellulären Interaktionen erhalten bleiben kann (Sittinger, 1996).

# 1.3 Potential zur Einsparung von Tierversuchen

In unserer Arbeitsgruppe Tissue Engineering an der Medizinischen Klinik der Charité Berlin wurde ein in vitro Modell zum Studium destruktiver Gelenkerkrankungen etabliert, der sog. in vitro Pannus (Schultz et al., 1997). Dieses neu entwickelte Kulturmodell basiert auf einer interaktiven Co-Kultur unterschiedlicher Zellpopulationen (z.B. Chondrozyten und synoviale Zellen), die in einer dreidimensionalen Matrix, die der spezifischen zellulären Mikroumgebung entspricht, kultiviert werden. So lassen sich wesentliche zelluläre Wechselwirkungen beim Prozess der Matrixdestruktion bei der rheumatoiden Arthritis unter in vitro Bedingungen simulieren und untersuchen. Schwerpunkt der weiterführenden Arbeiten lag auf der Etablierung eines in vitro Testsystems zur Analyse der Wirkung von verschiedenen biologischen Wirkstoffen wie Zytokinen, Differenzierungsfaktoren oder Hemmstoffen proteolytischer Enzyme, die bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielen. Mit der Realisierung dieses Vorhabens ergäbe sich ein durchaus bedeutendes Potential zur Einsparung von Tierversuchen, die im Bereich der Grundlagenforschung und gegebenenfalls im Rahmen präklinischer Studien zur Arzneimittelentwicklung durchgeführt werden.

#### 2 Material und Methoden

# 2.1 Synovialgewebe und Isolierung der Synovialzellen

Die synovialen Zellen wurden aus humanen entzündlichen Synovialmembranen gewonnen, die bei orthopädisch-rekonstruktiven Eingriffen von Patienten mit definierter RA entfernt wurden. Um die Zellen aus dem Gewebeverband zu isolieren, wurden die RA-Synovialgewebe enzymatisch mit Kollagenase CLS II (Biochrom KG, Berlin, Deutschland), Kollagenase P (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und Hyaluronidase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) für 3-4 Stunden verdaut. Die isolierten RA-Synovialzellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen eines dichten Zellrasens 4-7 Tage kultiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen dann in flüssigem Stickstoff bei –196°C kryokonserviert.

Als vorstellbarer Standard für die Synovialzellkomponente des *in vitro* Modells der RA wurden zwei SV40T antigen transfizierte Zelllinien geprüft. Die Zelllinie HSE wurde als Prototyp für RA-Fibroblasten getestet. Die Linie K<sub>4</sub>IM, gewonnen aus gesunden Synovialfibroblasten, wurde als Kontrollpopulation untersucht. Für die geplante Testung im *in vitro* Pannusmodell wurde ein ausreichendes Reservoir dieser Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Die Monolayerkulturen der synovialen RA-Zellen und Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 100 Einheiten/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FBS) (alle Biochrom KG, Berlin, Deutschland) kultiviert.

### 2.2 Isolierung von Chondrozyten und Präparation der 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen

Für die Gewinnung artikulärer Chondrozyten wurde Gelenkknorpel vom Schwein mit einer Enzymlösung aus Kollagenase CLS II (Biochrom KG, Berlin, Deutschland), Kollagenase P (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und Hyaluronidase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zum Verdau der extrazellulären Matrix für 16-18 Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Die isolierten Knorpelzellen wurden in Zellkulturmedium RPMI 1640, supplementiert mit Penicillin/Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FBS) (alle Biochrom KG, Berlin, Deutschland), aufgenommen und mit einer Zelldichte von 2 Millionen/ml pro Vertiefung in 48er Multiwellplatten (Costar, USA) eingesät. Durch Sedimentation der Zellen und nach 1-2 Tagen einsetzender Matrixneusynthese kommt es zur Bildung der 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen. Die Kultur dieser Pelletkulturen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FBS) (alle Biochrom KG, Berlin, Deutschland). Zusätzlich wurde dem Medium 50 µg/ml L-Ascorbinsäure-2-phosphat (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zur Unterstützung der Matrixsynthese zugesetzt.

# 2.3 Präparation interaktiver 3D-Co-Kulturen

Nach 2-3 wöchiger Kultivierung der Chondrozyten zu stabilen 3D-Pelletkulturen in den 48er Multiwellplatten wurde das überstehende Kulturmedium aus den Vertiefungen entfernt. Auf jede 3D-Chondrozyten-Pelletkultur wurde jeweils 1 ml einer Zellsuspension mit 1 Million Synovialzellen/ml Kulturmedium pipettiert und die Platten für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. 3D-Co-Kulturen wurden mit RA-Synovialzellen und den beiden SV40T antigen transfizierten Zelllinien HSE und K, IM hergestellt. Die Kultivierung erfolgte auch hier mit Zellkulturmedium RPMI 1640, supplementiert mit Penicillin/Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FBS) (alle Biochrom KG, Berlin, Deutschland).

#### 2.4 Histochemie

#### und Immunhistochemie

Mit Hilfe der Histochemie kann der chemische Aufbau der einzelnen Zell- und Co-Kultur-Gewebestrukturen ermittelt und eine Beziehung zwischen der Struktur und den sich dort abspielenden molekularen Vorgängen hergestellt werden. Dafür wurden von den zu untersuchenden Kulturen Gefrierschnittpräparate von 6 µm Dicke auf aminoalkylsilan-beschichteten Objektträgern angefertigt.

Histochemische Färbungen: Für eine Übersicht über die Zellverteilung in den Gewebeschnitten diente die Hämatoxilin/ Eosin-Färbung, bei der Zellkerne und saure Matrixbestandteile blau und alle übrigen Strukturen in verschiedenen Tonabstufungen rot angezeigt werden (Romeis und Böck, 1989).

Zur histochemischen Darstellung der Kollagensynthese in den 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen wurde die Azanfärbung nach Haidenhain und für den Nachweis von Proteoglykanen (Mukopolysacchariden) als Bestandteile der Knorpelmatrix die Färbung mit Alcianblau angewendet (beide Romeis und Böck, 1989).

Immunhistochemische Färbungen: Für die immunhistochemische Charakterisierung der RA-Synovialzellen und Zelllinien HSE und K<sub>4</sub>IM wurden diese Zellpopulationen für 24 Stunden jeweils in *Chamber-Slides* (Costar, USA) kultiviert und anschließend die Zellen in Aceton/ Methanol fixiert. Nach Blockierung der Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und der Proteine mit

10% Ziegen-Serum in PBS wurden die Zellpräparate in einer feuchten Kammer bei 37°C mit den primären monoklonalen Antikörpern (AK) inkubiert. Dabei wurde auf Fibroblasten mit Mouse Anti-Human Fibroblast-AK (clone 5B5, DAKO M0877), auf Makrophagen mit Mouse Anti-Human Macrophage CD 163 (clone Ber-MAC3, DAKO M0794) bzw. Mouse Anti-Human Macrophage CD68 (clone EBM11, DAKO M0718), auf Endothelzellen mit Mouse Anti-Human CD31 (clone JC/70A, DAKO M0823) und auf T-Zellen mit Mouse Anti-Human CD3 (clone T3-4B5, DAKO M0756) (alle DAKO, Hamburg, Deutschland) getestet. Negativkontrollen wurden mit Mouse IgG1-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Nacheinander erfolgte die Inkubation mit Polymer-Konjugat und AEC-Substrat. Als Detektionssystem diente die EnVision HRP-Methode (DAKO, Hamburg, Deutschland). Die Kerngegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt.

Die Neusynthese extrazellulärer Matrix durch die Chondrozyten wurde immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und Kollagen Typ II (beide DCP Biermann, Deutschland) und der EnVision-Methode (DAKO, Hamburg, Deutschland) untersucht. Die Gefrierschnitte wurden mit Aceton/Mehanol fixiert und unspezifische Bindungsstellen mit 10% Ziegen-Serum in PBS und Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgeblockt. Es folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern bei 37°C über 90 min und anschließend mit dem Polymer-Konjugat und AEC-Substrat. Die Präparate wurden in Hämatoxylin 10 min lang gegengefärbt.

#### 2.5 Aktivierungs- und Stimulierungsexperimente

Substanzen: Concanavalin A (ConA), Genistein, Indomethacin, Monensin, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Natrium-ortho-Vanadat wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. A 23187, Cytochalasin D, Gö 6983, Herbimycin A, Lavendustin A, Rapamycin, Staurosporin und Wortmannin wurden von Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA) eingesetzt.

Die RA-Synovialzellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und nach der 3. Passage in 24er Well-Platten (Costar, USA) umgesetzt. Die so erhaltenen RA-

Synovialfibroblasten wurden für weitere 48 Stunden kultiviert, um eine Zelldichte von 80-90% Konfluenz zu erreichen. Zum Zeitpunkt der Behandlung wurde das Zellkulturmedium vollständig aus den Vertiefungen der Platte entfernt und der Zellrasen zweimal mit warmem PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen. Alle Aktivierungs- und Stimulierungsexperimente wurden in serumfreiem Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 0,2 % Lactalbumin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Zu den RA-Synovialfibroblasten wurden anschließend pro Vertiefung 0,4 ml serumfreies Medium mit verschiedenen Substanzen pipettiert. Nach 20 Minuten wurden 100 µl serumfreies Medium mit ConA (100 µg/ml) bzw. Cytochalasin D (5 µg/ml) hinzugegeben und die RA-Synovialfibroblasten für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Zu den Kontrollkulturen wurde das entsprechende Volumen serumfreies Medium ohne Substanzen hinzugefügt. Anschließend wurden die Mediumproben gesammelt und unmittelbar mittels Gelatin-Zymographie analysiert.

#### 2.6 Gelatin-Zymographie

Die Zymographie, eine Form der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE), ist eine Standardmethode, um in Überständen von Zellkulturen die Aktivitäten latenter und aktiver Enzyme zu untersuchen. Im Fall der Enzym-Substrat-Zymographie wird dem Gel ein dem Enzym entsprechendes Substrat - hier Gelatin - zugegeben, welches vom Enzym Gelatinase gespalten wird.

Die SDS-PAGE wurde mit 8% igem Polyacrylamid-Trenngel unter Zugabe von 0,2% (w/v) Gelatin als Substrat durchgeführt. Jeweils 8 µl des Zellkulturüberstandes wurden mit Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 2x 10 min in 2,5% TritonX100 und 1x in Puffer gewaschen und anschließend über Nacht in 1% TritonX100 bei 37°C inkubiert. Nach der Enzyminkubation wurden die Gele 10 min in 43% Ethanol und 7% Essigsäure fixiert, dann für 1 Stunde in 0,25% Coomassie Brilliant Blau-250 in 43% Ethanol und 7% Essigsäure angefärbt und anschließend 2x 10 min in 40% Ethanol und 7% Essigsäure entfärbt. Die Bereiche mit gelatinolytischer Aktivität waren durch Negativfärbung gekennzeichnet. Die Gele wurden fotografisch dokumentiert.



## 2.7 "Real-time" PCR

Mit den beim "National Center for Biotechnology" (ncbi) vorhandenen Daten für Gensequenzen und den Computerprogrammen "MegAlign" und "PrimerSelect" wurden Schweine-spezifische Primer für ausgewählte knorpel-signifikante Gene entwickelt. Dafür wurde Gesamt-RNA aus 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen (Schwein) sowie aus RA-Synovialzellen in Monolayer-Kultur (Human) isoliert. Für die Quantifizierung der Genexpression mittels "real-time PCR" wurde die Gesamt-RNA aus interaktiven 3D-Co-Kulturen (Schwein und Human) über den Zeitraum der Co-Kultivierung gewonnen.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den beschriebenen Proben erfolgte einschließlich DNase-Verdau mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland), um gegebenenfalls durch Debris mit DNA von toten Zellen hervorgerufene Kontaminationen zu vermeiden. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde die isolierte RNA mittels RT-PCR überprüft. Für die anschließenden Genexpressions-Analysen wurden DNA-Kopien (c-DNA) der isolierten m-RNA mittels Reverser Transkription erstellt. Die erhaltene c-DNA wurde bei –20°C gelagert.

Die molekularbiologischen Untersuchungen ausgewählter Gene im Verlauf der Co-Kultivierung von 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen (Schwein) mit RA-Synovialzellen (Human) erfolgten anhand "real-time" PCR mit dem *LightCycler* (Roche).

#### 2.8 Detektionsprinzip für das Hybridisationssonden-Format des *LightCyclers*

(Quelle: Roche Molekular Biochemicals, 2000).

Die drei essentiellen Komponenten für die Anwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide als Hybridisationssonden sind zwei unterschiedliche Oligonukleotide (markiert) und das Amplifikationsprodukt. Oligo 1 trägt eine Fluorescein-Markierung am 3`-Ende, Oligo 2 einen anderen Farbstoff (z.B. LCRed640) am 5`-Ende. Die Sequenzen beider Oligos sind so gewählt, dass sie am amplifizierten DNA-Fragment hybridisieren. Wenn die Sonden in dieser Orientierung hybridisieren, sind beide Fluoreszenzfarbstoffe in räumlicher Nähe zueinander positioniert. Fluorescein wird durch gefiltertes Licht der emittierenden Diode angeregt und emittiert grünes Fluoreszenzlicht einer etwas höheren Wellenlänge. Sind beide Farbstoffe nebeneinander positioniert, regt diese emittierte Energie den Farbstoff LCRed640 auf der zweiten hybridisierten Sonde an, welcher dadurch rotes Fluoreszenzlicht einer noch höheren Wellenlänge emittiert.

Dieser Energietransfer wird Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt und wird hauptsächlich vom räumlichen Abstand zwischen beiden Farbstoffmolekülen beeinflusst. Beträgt die Distanz mehr als fünf Nukleotide, sinkt die Effizienz des Energietransfers. Die steigende Fluoreszenzintensität ist

### **3** Ergebnisse

# 3.1 Charakterisierung und Standardisierung der eingesetzten Zellpopulationen

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Zusammensetzung von RA-Synovialzellpopulationen nach der ersten Passage zeigte, dass synoviale Fibroblasten den Hauptanteil der adhärenten, aus RA-Synovialgewebe isolierten Zellpopulationen bildeten, während das Vorhandensein von Makrophagen (CD68+ bzw. CD163+) nur in einigen Präparationen bestätigt werden konnte. Vereinzelt wurden die kaum adhärierenden T-Zellen (CD3+) oder auch Endothelzellen (CD31+) nachgewiesen.

Für die Standardisierung der RA-Zellpopulation wurde ein umfangreicher Vor-



Abb. 2: Immunhistochemische Färbung eines Pools von humanen RA-Synovialzellen in Monolayerkultur: A: anti-Fibroblasten (Fibroblast+), B: anti-Makrophagen (CD68+), C: anti-Endothel-Zellen (CD31+), D: Negativkontrolle.

proportional zur Anzahl der DNA-Kopien, die - bedingt durch die PCR-Reaktion - kontinuierlich ansteigt. Oligo 2 muss, um nicht als Primer zu fungieren, am 3'-Ende phosphoryliert vorliegen. Durch die fehlende freie 3'-OH-Gruppe kann die Kopplung der komplementär zur Matrize passenden dNTP's von der Polymerase nicht vorgenommen werden. Die Sonden sind so zu wählen, dass sie innerhalb des Bereichs, der durch die Primer amplifiziert wird, entweder an den Senseoder an den Antisense-Strang der Matrize hybridisieren. Die Hybridisation eines Sondenpaares entspricht dann der Amplifikation eines doppelsträngigen c-DNA-Moleküls. Die Folge ist ein der DNA-Amplifikation proportionaler Anstieg der Reporter-Fluoreszenz, die während der Reaktion "online" detektiert wird.

Die Automatisierung des Verfahrens erlaubt somit einen weitaus höheren Probendurchsatz, erfordert jedoch auch einen hohen apparativen Aufwand und den Einsatz zusätzlicher Oligonukleotidsonden. rat von RA-Synovialzellen verschiedener Patienten aufgebaut, aus dem nach Bedarf definierte Zellpools nach bestimmten Auswahlkriterien für das Gewebematerial zusammengestellt werden konnten. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis einer immunhistochemischen Untersuchung eines solchen RA-Zellpools.

Für die Gewährleistung standardisierter Bedingungen wurden als Synovialzellkomponente zwei humane SV40T antigen transfizierte und dadurch immortalisierte synoviale Zelllinien aus RA-Patientenmaterial (HSE) bzw. Synovialgewebe eines gesunden Spenders (K, IM) beurteilt. Die Zelllinie HSE, vorher charakterisiert als Prototyp für RA-Fibroblasten mit aggressiv-invasivem Verhalten und einer Expression der für RA-Synovialfibroblasten tvpischen Moleküle, wurde im Vergleich mit RA-Synovialzellen untersucht. Die synoviale Zelllinie K, IM wurde als negative Kontrollzellpopulation ohne invasives Verhalten, also zur Simulation des nicht erkrankten Zustandes, getestet (Haas et al., 1997).



Abb. 3: Histochemische Färbungen von Gewebegefrierschnitten: Nativer Schweineknorpel gefärbt mit Azan (A) und Alcianblau (C); 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen (Schwein) - 21 d in Kultur - gefärbt mit Azan (B) und Alcianblau (D).

Bei der immunhistochemischen Markierung der Zelllinien HSE und  $K_4$ IM zeigte sich bei HSE ein positives Signal mit dem Fibroblasten-Antikörper, ebenso bei  $K_4$ IM. Die Färbungen mit CD68 für Makrophagen hingegen waren bei beiden Linien negativ (nicht gezeigt). homogene, aber auch sehr dichte Verteilung innerhalb der Pelletkulturen auf und zeigten den runden, für Knorpelzellen spezifischen Phänotyp während der gesamten Kultivierungsphase. Die 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen waren unter konventionellen Bedingungen in den verwende-



Abb. 4: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II mit anti-human-Antikörper: Nativer Schweineknorpel: A: Kollagen Typ I (-), B: Kollagen Typ II (+) und C: Negativkontrolle; 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen (Schwein) -12 d in Kultur: D: Kollagen Typ I (-), E: Kollagen Typ II (+) und F: Negativkontrolle.

#### 3.2 Chondrozyten

Während der Kultivierung der 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen wurde beobachtet, dass nach 1 bis 2 Tagen die Matrixbildung einsetzte und nach 2 bis 3 Wochen ein knorpelartiger Gewebeverband vorlag. Die isolierten Chondrozyten wiesen eine ten Kulturplatten über mehr als 10 Wochen stabil.

Die Größe der 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen entsprach im Durchmesser der Vertiefung einer 48er Well-Platte, die Höhe der Pelletkulturen betrug nach 3 Wochen ca. 1 mm.



Abb. 5: Histochemische Alcian-Färbung nach 5 Wochen interaktiver Co-Kultur: A: 3D-Chondrozyten-Pelletkultur mit RA-Synovialzellen; B: 3D-Chondrozyten-Pelletkultur mit Zellen der Linie HSE; C: Kontrolle 3D-Chondrozyten-Pelletkultur.

Die Neusynthese der Bestandteile der Chondrozytenmatrix wurde anhand histochemischer und immunhistochemischer Färbungen verfolgt.

Histochemische Färbungen von Gewebegefrierschnitten solcher Chondrozyten-Pelletkulturen nach verschiedenen Zeitpunkten in Kultur zeigten deutlich die Synthese einer Matrix durch die Blaufärbung des neu gebildeten Gesamtkollagens mit Azan sowie der Proteoglykane mit Alcianblau. Dabei wurde eine zunehmende Strukturierung der Matrix beobachtet. Bei Referenzfärbungen von nativem Knorpel aus Ursprungsgeweben war die Färbeintensität vergleichbar (Abb. 3).

Immunhistochemisch konnte Kollagen Typ II als Bestandteil der neu synthetisierten extrazellulären Matrix in den 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen identifiziert werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Chondrozyten Kollagen Typ II - charakteristisch für Gelenkknorpel -, aber nicht Kollagen Typ I synthetisierten (Abb. 4).

### 3.3 Interaktive 3D-Co-Kulturen aus Chondrozyten-Pelletkulturen und Synovialzellen

Zur Analyse histomorphologischer Veränderungen hinsichtlich der Invasion der RA-Synovialzellen in die Chondrozyten-Matrix eignete sich die Histochemie.

Es wurden 3D-Co-Kulturen aus Chondrozyten-Pelletkulturen mit RA-Synovialzellen bzw. Zellen der Linien HSE (invasiv-aggressiv) und  $K_4IM$  (gesundes Synovialgewebe) während der Co-Kultivierung anhand histochemischer Färbungen mit Alcianblau untersucht.

Bei Co-Kulturen aus 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen und verschiedenen RA-Synovialzellpopulationen bzw. Zellen der Linie HSE zeigte sich in beiden Fällen deutlich eine Invasion dieser Populationen in die Matrix der Chondrozyten-Pelletkulturen, wodurch deren Struktur sogar teilweise verändert bzw. fragmentiert wurde (Abb. 5). Der Vergleich erfolgte mit einem Kontroll-Pellet, das parallel ohne Co-Kultivierung mit RA-Synovialzellen gezüchtet wurde. Dagegen wurde bei Zellen der Linie K IM (gesundes Synovialgewebe) kein invasives Verhalten beobachtet, und somit könnten diese Zellen als negative Kontrollpopulation zur Simulierung des nicht erkrankten Zustandes eingesetzt werden.



# 3.4 Gelatin-Zymographie

Untersuchungen bezüglich der Wirkung einzelner Substanzen auf das Co-Kultursystem und seine Komponenten können anhand der Methode der Gelatin-Zymographie durchgeführt werden. Diese ist eine Methode zur biochemischen Substratanalyse proteolytischer Enzyme, in diesem Fall der Matrix-Metalloproteinasen Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) als wesentliche Effektormoleküle in der Gelenkdestruktion.

Die proteolytische Gelatinaseaktivität der 3D-Co-Kulturen wird maßgeblich durch die RA-Synovialzellkomponente bestimmt und wurde mit der Gelatin-Zymographie qualitativ ermittelt.

Mit dieser Methode wurden in Proben von verschiedenen RA-Synovialzellpopulationen (RA-Synovialfibroblasten von 16 Patienten) zwei verschiedene Gelatinasespezies identifiziert, welche die inaktiven Formen von Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) repräsentieren. Die zymographische Analyse dieser Kulturüberstände zeigte, dass RA-Synovialfibroblasten wie alle Fibroblasten eine starke Sekretion von proMMP-2 (72 kDa) (Kolkenbrock et al., 1994) aufweisen und in geringerem Masse proMMP-9 (Kolkenbrock et al., 1991) sekretieren (Abb. 6).

In einem weiteren Schritt wurden zur Untersuchung des Mechanismus der Sezernierung und Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen proMMP-2 und proMMP-9 bei RA-Synovialfibroblasten eine Reihe von Aktivierungs- und Stimulierungsversuchen durchgeführt. Die Signalübertragung von der Zellmembran ins Zellinnere verläuft über Phosphorylierungen, wobei den Protein-Kinasen (Enzyme, die Phosphorgruppen auf Proteine übertragen) eine besondere Rolle zukommt. Das Zusammenspiel von Phosphorylierung von Proteinen durch Protein-Kinasen und Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatasen dient der Regulierung vieler wichtiger Zellprozesse. Es wurde nun getestet, ob und welche Einflüsse die Zugabe ausgewählter Substanzen wie Lectine oder Inhibitoren auf die Ausschüttung und den Aktivierungsmechanismus von proMMP-2 bzw. proMMP-9 haben.

Für diese Untersuchungen wurden die RA-Synovialfibroblasten eingesetzt, die aus dem Synovialgewebe eines polyarthri-



Abb. 6: Gelatin-Zymographische Analyse von Kulturüberständen humaner rheumatoider Arthritis (RA). Synovialfibroblasten 16 verschiedener Patienten. Die Zellen stammen von unterschiedlichen betroffenen Gelenken: H: Hand; K: Knie; Sh: Schulter; El: Ellenbogen; Sp: Sprunggelenk.

tischen Kniegelenkes (K3) gewonnen wurden. Die Eigenschaften von K3 wurden mit denen eines Pools aus allen in Abbildung 6 gezeigten RA-Synovialfibroblasten verglichen. Bei den untersuchten Reaktionen traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen von K3 und dem Pool von RA-Synovialfibroblasten auf. Daher sind hier ausschließlich unsere Ergebnisse mit den Zellen von K3 gezeigt.

# 3.6 Effekte von Ionophoren (Ionenkanalbildner)

Für das Natrium-Ionophor Monensin wurde beschrieben, dass es die MMP-2-Aktivierung in normalen Hautfibroblasten konzentrations- und zeitabhängig induziert. Die stärkste Aktivierung von MMP-2 wurde nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Monensin für 48 Stunden beobachtet (Li et al., 1997). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Li et al. konnten wir keine aktive Form von



Abb. 7: Stimulation von HT-1080 und humanen RA-Synovialfibroblasten. A: HT-1080: Spur 1: Kontrolle; Spur 2: PMA (5 ng/ml); Spur 3: ConA (20  $\mu$ g/ml); Inkubationszeit 24 h; 8 % SDS-Polyacrylamidgel. B: RA-Synovialfibroblasten: Spur 1: Kontrolle; Spur 2: PMA (5 ng/ml), Inkubationszeit 24 h; 10 % SDS-Polyacrylamidgel.

#### **3.5** Effekte von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Phorbolester)

Phorbolester wurde beschrieben, in unterschiedlichen Zelltypen die Sekretion von MMP-9 zu erhöhen und die Aktivierung von proMMP-2 zu induzieren, z.B. in der Fibrosarkoma-Zelllinie HT1080 (Gervasi et al., 1996). Unbehandelte HT1080-Zellen sekretieren pro-MMP-2 und etwas schwächer proMMP-9 (Abb. 7A). Nach Stimulierung der HT1080-Zellen mit PMA war proMMP-9 wesentlich erhöht und etwa die Hälfte der sekretierten MMP-2 lag in der aktiven 64 kDa-Form vor. Weiterhin war eine schwache Bande der vollständig aktiven 62 kDa-Form präsent. Im Gegensatz zu diesen Resultaten mit HT1080-Zellen zeigte PMA keinerlei Effekt auf die Sekretion von MMP-9 und die Aktivierung von MMP-2 in RA-Synovialfibroblasten (Abb. 7B).

MMP-2 nach 24 bzw. 48 Stunden bei Monensin-Konzentrationen von 0,5; 1,0; 5 und 10 µM detektieren (nicht gezeigt). Außerdem beobachteten wir anstatt der Aktivierung der MMP-2 durch Monensin bei einer Konzentration von 1 mM eine verminderte MMP-2-Sekretion. Zusätzlich inhibierte Monensin bei dieser Kon-



Abb. 8: Effekte von Monensin auf RA-Synovialfibroblasten. Spur 1: Kontrolle; Spur 2: ConA (20  $\mu$ g/ml); Spur 3: Cytochalasin D (1  $\mu$ M); Spur 4: Monensin (1  $\mu$ M); Spur 5: Monensin und ConA; Spur 6: Monensin und Cytochalasin D; Inkubationszeit 24 h.



zentration die ConA- und Cytochalasin Dvermittelte MMP-2-Aktivierung sowie die MMP-9-Ausschüttung (Abb. 8).

Das Kalzium-Ionophor A 23187 zeigte bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M einen geringen inhibierenden Effekt auf die Sekretion von MMP-2 und eine deutliche Hemmung auf die MMP-9-Sekretion. Bei Behandlung von RA-Synovialfibroblasten mit ConA oder Cytochalasin D in Anwesenheit von 0,1  $\mu$ M A 23187 wurde die Aktivierung von MMP-2 vollständig aufgehoben (Abb. 9).



Abb. 9: Effekte von A23187 auf RA-Synovialfibroblasten. Spur 1: Kontrolle; Spur 2: ConA (20  $\mu$ g/ml); Spur 3: Cytochalasin D (1  $\mu$ M); Spur 4: A 23187 (0.1  $\mu$ M); Spur 5: A23287 und ConA; Spur 6: A23187 und Cytochalasin D; Inkubationszeit 24 h.

# 3.7 Effekte von Natrium-ortho-Vanadat

Über den Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Natrium-ortho-Vanadat wurde berichtet, dass er die Aktivierung von MMP-2 in humanen Hautfibroblasten in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration induziert. Das Maximum dieses stimulatorischen Effektes wurde bei 100  $\mu$ M ortho-Vanadat und einer Inkubationszeit von 48 Stunden beobachtet (Li et al., 1998). Bei der Inkubation von RA-Synovialfibroblasten mit ortho-Vanadat (10-100  $\mu$ M) für 24 und 48 Stunden konnten wir keine signifikante Aktivierung von MMP-2 feststellen. Jedoch war bei einer Natrium-ortho-Vanadatkonzentration von 100  $\mu$ M die



Abb. 10: Effekte von Natrium-ortho-Vanadat auf RA-Synovialfibroblasten. Spur 1: Kontrolle;

Spur 2: 10  $\mu$ M ortho-Vanadat; Spur 3: 20 mM ortho-Vanadat; Spur 4: 50  $\mu$ M ortho-Vanadat; Spur 5: 100  $\mu$ M ortho-Vanadat; Inkubationszeit 48 h.

Menge der sekretierten proMMP-2 eindeutig reduziert und die Ausschüttung von MMP-9 vollständig unterbunden (Abb. 10).

# 3.8 Effekte von Inhibitoren der Protein-Kinasen

Protein-Kinasen spielen eine herausragende Rolle in der zellulären Signalübertragung. Daher haben wir den Einfluss einiger Inhibitoren für ein breites Spektrum von Protein-Kinasen sowie sehr spezifischer Inhibitoren bestimmter Protein-Kinasen untersucht.

Genistein (25 µg/ml), ein Inhibitor der Protein-Tyrosin-Kinasen, konnte die ConA- und Cytochalasin D-induzierte Aktivierung von MMP-2 nicht unterbinden, aber inhibierte die Sekretion von MMP-9. Folglich zeigte Herbimycin A (5 mg/ml), ein anderer Inhibitor von Protein-Tyrosine-Kinasen (Lawrence and Niu, 1998), ebenfalls keine signifikante Hemmung der MMP-2-Aktivierung (Abb. 11).



Abb. 11: Effekte von Protein Tyrosin- Kinase Inhibitoren auf RA-Synovialfibroblasten. Spur 1: Kontrolle; Spur 2: ConA (20  $\mu$ g/ml); Spur 3: Cytochalasin D (1  $\mu$ M); Spur 4: Genistein (25  $\mu$ g/ml); Spur 5: Genistein und ConA; Spur 6: Genistein und Cytochalasin D; Spur 7: Herbimycin A (5  $\mu$ g/ml); Spur 8: Herbimycin A und ConA; Spur 9: Herbimycin A und Cytochalasin D; Inkubationszeit 24 h.

Im Gegensatz zu den Inhibitoren der Protein-Tyrosin-Kinasen konnte Staurosporin (0,1  $\mu$ M), ein Breitband-Inhibitor für Protein-Kinasen, sowohl die Sekretion von MMP-9 als auch den MMP-2-ak-



Abb. 12: Effekte von Staurosporin auf RA-Synovialfibroblasten. Spur 1: Kontrolle; Spur 2: ConA (20  $\mu$ g/ml); Spur 3: Cytochalasin D (1  $\mu$ M); Spur 4: Staurosporin 0.1 $\mu$ M); Spur 5: Staurosporin und ConA; (0.2  $\mu$ M) Spur 6: Staurosporin und Cytochalasin D; (0.3  $\mu$ M) Inkubationszeit 24 h. tivierenden Effekt von Cytochalasin D und ConA unterdrücken (Abb. 12).

Gö 6983 (1  $\mu$ M), ein potenter und spezifischer Inhibitor des Protein-Kinase C Isoenzymes (mit Ausnahme von PKC<sub>µ</sub>), ebenso wie Lavendustin A (1  $\mu$ g/ml), ein Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), zeigten weder einen Einfluss auf die Sekretion von proMMP-2 und proMMP-9, noch konnten sie die ConA- und Cytochalasin D-induzierte Aktivierung von proMMP-2 unterbinden (nicht gezeigt).

Rapamycin (50 nM), welches die Phosphorylierung und Aktivierung von p70S6-Kinase inhibiert, beeinflusste nicht die Sekretion von MMP-2 and MMP-9 und inhibierte nicht die ConA- oder Cytochalasin D-vermittelte Aktivierung von MMP-2 (Abb. 13). Wortmannin (200 nM), ein spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-kinase), zeigte ebenfalls keinen inhibierenden Effekt auf die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 bzw. die MMP-2-Aktivierung (nicht gezeigt).



Abb. 13: Effekte von Rapamycin auf RA-Synovialfibroblasten. Spur 1: Kontrolle; Spur 2: ConA (20  $\mu$ g/ml); Spur 3: Cytochalasin D (1  $\mu$ M); Spur 4: Rapamycin (50 nM); Spur 5: Rapamycin und ConA; Spur 6: Rapamycin und Cytochalasin D; Inkubationszeit 24 h.

#### 3.9 Effekte von Indomethacin

Es wurde beschrieben, dass Indomethacin (5 µg/ml), ein Inhibitor der Cyclooxygenasen I und II, die Monensin-induzierte Aktivierung von MMP-2 in humanen Hautfibroblasten unterdrückt (Li et al., 1997). In unseren Untersuchungen hatte Indomethacin keinen Effekt auf die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 und konnte auch nicht die ConA- oder Cytochalasin D-vermittelte Aktivierung von proMMP-2 unterbinden (nicht gezeigt).

Eine Zusammenfassung der Einflüsse der verschiedenen getesteten Substanzen auf die Sekretion bzw. Aktivierung von proMMP-2 und proMMP-9 bei RA-Synovialfibroblasten ist in der Tabelle 1 dargestellt: -

Tab. 1: Zusammenfassung der Effekte von verschiedenen Substanzen auf die Sekretion von MMP-2 and MMP-9 und die Aktivierung von MMP-2.

Substanz	Spezifikation		Effekt auf		
		MMP-2		MMP-9	
		Sekretion	Aktivierung	Sekretion	
PMA	Aktivator für Protein- Kinase C	0	0	0	
Gö 6983	Inhibitor für Protein- Kinase C	0	0	0	
Lavendustin A	EGFR-Inhibitor	0	0	0	
Rapamycin	Inhibitor p70S6 Kinase Aktivierung	0	0	0	
Wortmannin	Inhibitor für PI3- Kinase	0	0	0	
Genistein	Inhibitor für Protein- Tyrosin-Kinasen	0	0	Ļ	
Herbimycin A	Inhibitor für Protein- Tyrosin-Kinasen	0	0	ţ	
Orthovanadat	Inhibitor für Tyrosin- Phosphatase	$\downarrow$	n.b.	ţ	
Staurosporin	Inhibitor für Protein- Kinasen	0	ţ	ţ	
Indomethacin	Cyclooxygenase- Inhibitor	0	0	0	
Monensin	Na+-Ionophor	↓ ↓	Ļ	↓ I	
A 23187	Ca <sup>2+</sup> -Ionophor	(↓)	Ļ	ţ	

0: kein Effekt, 1: inhibiert, n.b.: nicht bestimmt

#### 3.10 "Real-time PCR"

Um die genetische Expression wichtiger RA-Mediatoren im *in vitro* Pannusmodell zu analysieren, wurden einige charakteristische Gene ausgewählt, wobei vor allem Gene, die für den Auf- und Abbau der Chondrozyten-Matrix von Bedeutung sind, herausgestellt wurden.

Da sich das *in vitro* Pannusmodell aus Chondrozyten vom Schwein und humanen RA-Synovialzellen zusammensetzt, war es mit der Entwicklung spezies-spezifischer Primer-Paare möglich, die Genexpression beider Zellarten unabhängig voneinander zu analysieren. Im Vordergrund stand die Analyse der Expression bestimmter Gene der Chondrozyten unter dem Einfluss der interaktiven Co-Kultur mit RA-Synovialzellen.

Die Auswahl der Gene für die knorpelspezifische Primerentwicklung wurde hauptsächlich durch die im "*National Center for Biotechnology*" (ncbi) verfügbaren Gensequenzen für das Schwein limitiert, da diese nicht im selben Umfang wie humane Sequenzen zur Verfügung stehen. Es wurden markante, ausreichend sequenzierte Gene (mindestens 200 Basenpaare) ausgewählt (Tab. 2).

Da aufgrund unterschiedlicher Probenqualität und -menge stark variierende Ergebnisse erzielt werden können, ist für eine solche Analyse neben der Quantifizierung der Zielsequenz ein relativierender Faktor (Referenz- oder "*housekeeping*"-Gen) unverzichtbar. Hierbei handelt es sich um Gene, die von jeder Zelle konstitutiv exprimiert werden. Durch Amplifikation eines solchen Transkripts ist die Beurteilung der Probenqualität gegeben. Gleichzeitig kann man hierdurch ein Maß für die gesamte Genexpression im betreffenden Gewebe erhalten (Foss, 1998).

Nach der beschriebenen Methode wurden 7 Primer-Paare für knorpel-spezifische Gene bzw. "housekeeping"-Gene des Schweins entwickelt (Tab. 3) und auf Schweine-spezifische Anlagerung untersucht. Als Matrize wurde c-DNA aus Schweine-Chondrozyten-Pelletkulturen und zur Kontrolle c-DNA aus humanen RA-Synovialzellen eingesetzt.

#### 3.11 LightCycler

Für die "real-time PCR"-Analyse mit dem *LightCycler* (Roche) wurden die Gene für ß-Actin als Referenzgen und den charakteristischen Knorpelmarker Kollagen Typ II als Zielgen ausgewählt. Für diese beiden Sequenzen wurden zusätzlich Hybridisations-Sonden im *LightCycler*-Format etabliert (Tab. 4).

Die Sonden wurden mit einer durchschnittlichen Länge von 23 Basenpaaren (bp) und einem GC-Gehalt von 65-70% entwickelt (vgl. Primer: 20 bp mit 50% G/C-Gehalt).

Für die Etablierung der Hybridisationssonden wurde der Reaktionsansatz im Anschluss an den PCR-Lauf einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Hierdurch ist es möglich, die unter den gewählten PCR-Bedingungen gebildeten Amplifikate zu identifizieren und die Spezifität der Sonden zu beurteilen. In Abbildung 14 ist die relative Lage der verwendeten Primer und Sonden dargestellt.

Die zu untersuchenden Proben setzten sich zu unterschiedlichen Anteilen aus humaner und Schweine c-DNA zusammen. Mit Hilfe des Gens für  $\beta$ -Actin vom Schwein wurde der Anteil an Schweine c-DNA in den Proben auf eine äquivalente Konzentration eingestellt, da nur Gene der Chondrozyten untersucht werden sollten. Somit erfolgte die Quantifizierung nicht direkt durch Amplifikation von Standardreihen, sondern die Expression eines gewählten Genes wurde mit Hilfe einer indirekten Quantifizierung analysiert.

Die Produkte der "real-time" PCR wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anhand der Laufstrecke im Gel waren deutlich die unterschiedlichen Fragmentgrößen der ß-Actin- (308 bp) und Kollagen Typ II-Amplifikate (276 bp) zu erkennen. Die 1:10-Verdünnungsreihen für β-Actin- und Kollagen Typ II-PCR zeigten eindeutig Abstufungen in der Bandenintensität bzw. keine Banden für die Negativkontrollen. Die Amplifikate der β-Actin-PCR zeigten Abstufungen, die sich in den berechneten Ct-Werten widerspiegelten. Als Ct-Wert (threshold cycle) wird der Zyklus, bei dem der erste signifikante Anstieg des Fluoreszenz-Signals erfasst wird, bezeichnet. Dieser steht in proportionalem Zusammenhang mit der Ausgangsmatrizenanzahl.

Bei einer hundertprozentigen Effektivität der Reaktion werden 3,5-4,0 Zyklen



Biologische Funktion	Markergen	Auswirkungen auf	Literatur
Matrixaufbau	KollageneTyp II, X, XI	↑ Zug- u. Stoßfestigkeit des Knorpels	van den Berg et al., 1999
	Aggrecan	↑ Wasserspeicher- kapazität Knorpol	van den Berg
	Glycosamino- glycan	↑ Wasserspeicher- kapazität Knorpel	Ayad et al., 1998
destruktive Zytokine	IL-1-α, IL-1-β, IL-17, TNF-α, LIF	↓ Matrix-Produktion ↑ Abbau von Matrixbestandteilen	van den Berg et al.,1999 Villinger et al.,1998 Slot et al., 2000
regulatorische Zytokine	IL-4 , IL -10, IL-13, IL-6, IL-18	↓ Produktion destruktiver Zytokine ↑ inhibitorische Effekte auf destruktive Zytokine	van den Berg et al., 1999 Adolphe et al., 2000
Wachstums- faktoren	TGF-β, FGF-2, IGF-1, PDGF, BMP-2	↑ synthetische Aktivität der Zellen ↑ Entkopplung von Entzündung und Knorpelabbau	van den Berg et al., 1999
proteolytische Enzyme	MMP-1, MMP-8, MMP-13 (Kollagenasen)	↑ Knorpelabbau	van den Berg et al., 1999 Chubinskaya et al., 1999
	MMP-2 (Gelatinase A)	↑ Knorpelabbau	Chubinskaya et al., 1999
	MMP-3 (Stromelysin)	↑ Knorpelabbau	van den Berg et al., 1999
	MMP-14 (MT1-MMP)	† Knorpelabbau	Chubinskaya et al., 1999
"house keeping"- (Referenz- Gene)	β-Actin	∱Zellbewegung	Foss et al., 1998
	HPRT	↑ GMP-u. IMP- Bildung	Foss et al., 1998
↑ - fördert, ↓ - hem	imt		



Abb. 14: Lage der verwendeten Primer und Hybridisations-Sonden. Das phosphorylierte 3`-Ende der LCRed640-markierten Sonde liegt nur wenige, durchschnittlich 10 bp vom 3`-Ende des for-primers entfernt, allerdings auf dem Gegenstrang. Das 3`-Ende des rev-primers ist demgegenüber viel weiter vom 5`-Ende der Fluorescein-markierten Sonde entfernt, als aus der Abbildung ersichtlich wird. Diese Anordnung erlaubt den Sondenmolekülen nach jedem Denaturierungszyklus einen längeren Zeitraum für ihre Hybridisierung mit den Amplifikaten. benötigt, um die Anzahl der Kopien um einen Exponenten zu erhöhen (Kreuzer et al., 1999). Die Kollagen Typ II-PCR war effizienter (4,84) als die  $\beta$ -Actin-PCR (6,48). Die aus der PCR-Kinetik generierten Daten waren somit nur vergleichbar, wenn sie auf die jeweilige Effizienz bezogen wurden.

Um den Verlauf der Kollagen Typ II-Expression über den Zeitraum der Co-Kultivierung von 10 Tagen zu verfolgen, wurden die Ct-Werte einer Probe jeweils ins Verhältnis gesetzt ( $Ct_{\beta-Actin}/Ct_{KollagenTypII}$ ) und über den Zeitraum der Co-Kultivierung aufgetragen (Abb. 15).

Die Chondrozyten in der Co-Kultur mit RA-Synovialzellen zeigten eine deutliche Verminderung der Kollagen Typ II-Genexpression, wobei die prozentuale Abnahme im Vergleich zur Kontrolle - Chondrozyten-Pelletkultur mit 100% Kollagen Typ II-Genexpression - innerhalb von 9 Tagen bis zu 26% betrug (Abb. 16). Diese Tendenz war bei Chondrozyten-Pelletkulturen, die nicht co-kultiviert wurden, nicht zu beobachten. Die Genexpression für  $\beta$ -Actin wurde über den gesamten Zeitraum der Co-Kultur nachgewiesen und wurde als unverändert vorausgesetzt, da es sich hierbei um ein sog. "*housekeeping*-Gen" handelt.

Auch die makroskopischen Beobachtungen bestätigten einen negativen Einfluss der Co-Kultivierung mit RA-Synovialzellen auf die Chondrozytenmatrix. Bei Chondrozyten-Pelletkulturen, die als Kontrolle zur Testreihe ohne RA-Synovialzellen kultiviert wurden, war eine kontinuierliche Zunahme der Konsistenz und des Ausmaßes der Kulturen zu beobachten, nicht aber bei den Co-Kulturen.

#### **4** Diskussion

Das Ziel unseres experimentellen Ansatzes bestand darin, die Einschränkungen der etablierten Krankheitsmodelle und konventionellen Zellkulturtechniken zu vermeiden und ein *in vitro* Testsystem zur Untersuchung pathogenetischer Mechanismen bei destruktiven Gelenkerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) zu etablieren. Um die Vorgänge bei der rheumatoiden Arthritis zu simulieren, wurden artikuläre Chondrozyten und RA-Synovialzellen gemeinsam, d.h. interaktiv kultiviert. Maßgebliches Untersuchungsziel war die Zerstörung des Knorpelgewebes als Endstadium bei der RA.



Eine dreidimensionale interaktive Zellkultur mit synovialen Zellen und Chondrozyten wurde zur Untersuchung zellulärer Wechselwirkungen genutzt, wobei die Invasivität und das Degradationsverhalten synovialer Zellen in einer Chondrozyten-Matrix und die Genexpression für z.B. Kollagen Typ II untersucht wurden.

Anforderungen an das *in vitro* Pannusmodell wie Kulturen definierter Zellzahl und Größe und spezifischer funktioneller Eigenschaften führten zu einer interaktiven 3D-Co-Kultur aus Chondrozyten-Pelletkulturen mit darauf zentrifugierten definierten RA-Synovialzellen. Dieses System zeichnet sich durch den Verzicht auf Trägermaterial (z.B. Fibringel) für die Zellen aus und erlaubt somit eine einfache Handhabung der beiden Zellkomponenten im größeren Maßstab.

Die rheumatoiden synovialen Zellen wurden aus humanen entzündlichen Synovialmembranen gewonnen, die bei orthopädisch-rekonstruktiven Eingriffen bei Patienten mit manifester rheumatoider Arthritis entfernt wurden. In der Literatur (Firestein, 1990) wurde die Zusammensetzung von Zellsuspensionen unmittelbar nach der Isolation aus RA-Synovialgeweben beschrieben mit etwa 20% Makrophagen, einer zweiten größeren Population von Zellen mit fibroblasten-ähnlichem Aussehen, 30-50% T-Zellen. Die Kultur der adhärenten RA-Synovialzellen dieser Primärkulturen über mehrere Passagen resultiert in einer nahezu homogenen Kultur aus RA-Fibroblasten, da T-Zellen nicht adhärieren und Makrophagen nicht replikationsfähig sind. Unsere Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen von RA-Synovialzellen und -fibroblasten bestätigten diese Aussagen, auch wenn in unseren RA-Synovialzellkulturen der Anteil an Makrophagen wesentlich geringer als der an fibroblasten-ähnlichen Zellen war.

In den vorangegangenen Arbeiten (Schultz et al., 1997) wurden einerseits RA-Synovialzellen aus der Primärkultur sowie zum anderen fibroblasten-artige RA-Zellen aus höheren Kulturpassagen in Co-Kultur mit Chondrozyten getestet. Die Untersuchungen zeigten vergleichbare Resultate beider Zellpopulationen bezüglich des Einflusses auf die Matrixdegradation. Damit eine recht ursprüngliche Zusammensetzung der Zellen erhalten bleibt, wurde von uns festgelegt, dass die RA-Synovialzellen bereits nach der ersten KulTab. 3: Etablierte Primer-Paare für Referenzgene bzw. Chondrozyten-Markergene des Schweins.

RNA	f/r	X-mer	AccNr. aus ncbi	Länge bp	5`→ 3`
β-Actin	for rev	24 20	U07786	308	ctgaccgactacctcatgaagatc
HPRT	for rev	21 22	AF143818	280	gtagccctctgtctgctcaag
Aggrecan	for rev	20 19	AF201722	241	gacagtgacctggctgag
Koll.Typll	for rev	21 19	AF201724	276	gagacaggtgctgcaagtctt catccgtgccaggagttcc
IL-6	for rev	19 20	M80258	258	gccaaaggtgatgccacct
MMP-1	for rev	22 22	X54724	202	cccaaggacatccacagatcct gcatcaactttgttgccaatcc
MMP-3	for rev	23 22	AF069641	240	gatgtacaaccaggttacccaag ggaacccaaatgcttcaaagac

Primerentwicklung benutzten Seguenz im National Center for Biotechnology (ncbi).

Tab. 4: Hybridisations-Sonden im *LightCycler*-Format für β-Actin (Referenzgen) und Kollagen Typ II (Markergen) des Schweins.

RNA	Markierung	5`→ 3`	
β-Actin	LC-Red640 (Y)	Y ccgtggtggtgaagctgtagccc p	
	Fluorescein (X)	atgtcccgcacgatctcccgctc X	
Koll. Typ II	LC-Red640 (Y)	Y ctcgcctcgttcaccagcaggtcc p	
	Fluorescein (X)	agccagatggcccaggagcaccc X	



Abb. 15: Expression von Kollagen Typ II in den porcinen Chondrozyten. Während der Co-Kultivierung von 3D-Chondrozyten-Pelletkultur mit RA-Synovialzellen: ■ Co-Kultur, ◆ Chondrozyten-Pelletkultur als Kontrolle.



Abb. 16: Prozentualer Vergleich der Expression von Kollagen Typ II in den porcinen 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen ohne und während der Co-Kultivierung mit RA-Synovialzellen: einfarbige Balken: Co-Kultur (Abnahme Expression von Kollagen Typ II), ster-Balken: Chondrozyten-Pelletkultur als Kontrolle (Expression von Kollagen Typ II wurde als konstant 100% festgelegt).

turpassage bis zum weiteren Einsatz konserviert werden.

Im Fall einer ausreichenden Zellzahl für einen größeren Testansatz könnten Zellen aus dem Gewebematerial von Einzelpatienten verwendet werden. Jedoch sind für diese Ansätze die Aussagen auf einen individuellen Krankheitsverlauf beschränkt. Somit stellte sich hierbei die Frage der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf ein allgemeines Krankheitsbild der RA.

Diese beiden Überlegungen und die Notwendigkeit hoher Zellzahlen für das Testsystem führten zu der Entscheidung Zell-Pools nach gewählten Kriterien aufzubauen und zusammenzustellen und dann für die Untersuchungen am *in vitro* Pannusmodell einzusetzen.

Für die Verwendung als standardisierte Synovialzellkomponente wurde eine humane SV40T antigen transfizierte Synovialfibroblasten-Linie aus RA-Patientenmaterial getestet (Haas et al., 1997). Von Dr. W. Aicher (Universität Tübingen) wurde die Zelllinie HSE als Prototyp für RA-Fibroblasten mit aggressiv-invasivem Verhalten charakterisiert und von uns im Vergleich mit RA-Synovialzellpopulationen als Synovialzellkomponente in den Co-Kulturen untersucht. Eine weitere SV40T antigen transfizierte humane Synovialfibroblasten-Linie K, IM, gewonnen aus gesundem Synovialgewebe, wurde erfolgreich als Negativkontrolle getestet.

Humaner Gelenkknorpel war nur über operative rekonstruktive Eingriffe verfüg-

bar und somit zumeist arthrotisch, also nicht geeignet für die Knorpelkomponente des in vitro Pannus. Alternativ war die Beschaffung von qualitativ gleichbleibendem Knorpel vom Schwein im notwendigen Umfang unproblematisch. Da die Zusammensetzung der Matrix von Schweine- und humanem Gelenkknorpel sehr ähnlich ist (Frye et al., 1996), wurde der Knorpel vom Schwein für die Isolierung der Chondrozyten zur Entwicklung des künstlichen Knorpelgewebes verwendet. Dadurch war es möglich, die bei der dreidimensionalen Kultur von Chondrozyten notwendigen hohen Zellzahlen zu gewährleisten. Diese sind essentiell für die Differenzierung der Zellen, um eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix auszubilden.

Die Fixierung der Zellen in einem Trägermaterial wie Fibringel ist verbunden mit einer komplizierten und aufwändigen Handhabung bei der Herstellung dieser Kulturen im großen Maßstab. Die Variante der Pelletkultur bietet die Möglichkeit 3D-Kulturen von Knorpelzellen mit hoher Zelldichte einfach herzustellen. Es sollten dafür geeignete Kulturgefäße gewählt werden, die den Ansprüchen an eine sichere, einfache Handhabung, breite Einsatzmöglichkeiten sowie minimale Kontaminationsgefahr Rechnung tragen. Nach Testung verschiedener Kulturbehältnisse hatte sich die 48er Well-Platte als geeignetes Kulturgefäß für diese 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen herausgestellt.

Optimale Kulturzeiten für die Matrixpräformation der Knorpelkomponente sollten festgelegt werden, und es wurde beobachtet, dass nach 1 bis 2 Tagen die Neubildung einer Chondrozyten-Matrix einsetzte. Histochemische und immunhistochemische Analysen der 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen belegten eine knorpelartige Konsistenz der Pelletkulturen nach 2-3 Wochen. Die Ergebnisse der Färbungen mit Alcianblau und Azan zeigten deutlich die Neubildung von Proteoglykanen (Lohmander, 1988; Toole, 1991) und Gesamt-Kollagen als Grundsubstanz des Knorpels. Weiterhin war deutlich eine zunehmende charakteristische Strukturierung der extrazellulären Matrix um die Chondrozyten erkennbar (Poole, 1997). Die Neusynthese von Kollagen Typ II als Hauptbestandteil der Chondrozyten-Matrix (Muir, 1979; Kühn, 1987) wurde anhand der positiven immunhistochemischen Färbung belegt. Im Gegensatz dazu konnte Kollagen Typ I, charakteristisch für Faserknorpel (Kühn, 1987), nicht nachgewiesen werden. Parallel wurden Gewebegefrierschnitte von nativem Schweineknorpel angefärbt. Bei Vergleich des künstlichen Knorpelgewebes in Form der Pelletkulturen mit dem nativen Knorpel konnten wir feststellen, dass die 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen eine repräsentative Knorpelkomponente für das in vitro Pannusmodell darstellen.

Die Herstellung der Co-Kulturen sollte ebenfalls mit einer unkomplizierten Handhabung beider Komponenten des Systems verbunden sein und zum anderen der Ersatz der Fibringelmatrix durch die Vermeidung artifizieller Effekte eine verbesserte Reproduzierbarkeit des Modells gewährleisten. Die 48er Well-Platten boten den Vorteil, dass sie zum einen als Kulturgefäße für die 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen geeignet waren und anschließend für die Co-Kultivierung der Chondrozyten-Pelletkulturen mit den RA-Synovialzellen bzw. Zellen der Linien HSE bzw. K, IM weiter eingesetzt werden konnten. Der direkte Kontakt der Chondrozytenkomponente mit den RA-Synovialzellen war dabei von enormer Bedeutung, was in diesem System durch das direkte Aufzentrifugieren der Synovialzellsuspension auf die 3D-Chondrozyten-Pelletkultur gewährleistet wurde. Die Analyse der Wechselwirkungen zwischen 3D-Chondrozyten-Pelletkulturen und verschiedenen RA-



Synovialzellpopulationen bzw. der Zelllinie HSE konnte ein vergleichbares invasives Verhalten der RA-Synovialzellen und der Linie HSE in die Chondrozyten-Matrix aufzeigen, die mit einer Fragmentierung bzw. der Zerstörung der Matrix einherging. Für die als Negativkontrolle getestete humane Synovialfibroblasten-Linie K<sub>4</sub>IM wurde keine Invasion dieser Zellen in die Chondrozytenmatrix beobachtet. Somit könnte diese Linie den nicht erkrankten Gewebezustand simulieren und als negative Kontrollpopulation im *in vitro* Pannus eingesetzt werden.

In dem von uns etablierten in vitro Pannusmodell werden humane Zelllinien mit Chondrozyten vom Schwein interaktiv kultiviert, was durchaus zu einer kritischen Betrachtung führen könnte. Bei den Linien HSE und K IM handelt es sich nicht um immunologisch relevante Zellen, so dass wir Interaktionen, die durch das Zusammenbringen von Zellen zweier unterschiedlicher Spezies hervorgerufen werden könnten, ausschließen. So handelt es sich bei der invasiven Wirkung von HSE auf die Chondrozytenmatrix - unsere Positivkontrolle - nicht um eine spezies-spezifische Wechselwirkung zwischen den beiden Zellpopulationen. Gefestigt wird dieses Ergebnis von der entgegengesetzten Wirkung der K, IM-Zellen auf die Matrix der Chondrozyten-Pelletkulturen keine Invasion als Negativkontrolle bei der Simulierung von RA.

Aufbauend auf unserem ursprünglichen Modell von Schultz et al. (1997) steht damit ein in vitro Modell zur Verfügung, an dem unter reproduzierbaren Bedingungen und unkomplizierter Handhabung relevante zelluläre Wechselwirkungen wie vor allem die Matrixdegradation in der Pathogenese der RA untersucht werden können. Auch andere Arbeitsgruppen arbeiten intensiv an in vitro Modellen für die rheumatoide Arthritis (D'Andrea et al., 1998; Kurz et al., 1999; Neidhart et al., 2000), wobei der unterschiedliche Aufbau der Modelle, z.B. basierend auf Kollagenschwämmen (Neidhart et al., 2000) sowie das vielfältige "read out", z.B. Lipidperoxidation (Kurz et al., 1999) zu einer breiten Palette von Erkenntnissen führt.

Die Entwicklung geeigneter "*read out"-*Systeme war eine zweite wichtige Zielstellung des Projektes. So sollten z.B. die histomorphologischen Veränderungen zur Evaluierung der Zellinvasion anhand histochemischer und immunhistochemischer Färbungen analysiert werden sowie biochemische Substratanalysen von proteolytischen Enzymen als wesentliche Effektormoleküle der Matrixdegradation angewendet werden. Die Untersuchung der Expression von gewebecharakteristischen Genen, proteolytischen Enzymen und deren Inhibitoren oder wesentlichen proinflammatorischen Zytokinen mittels konventioneller und "real time" PCR sollten einen zentralen Ansatz bei der Entwicklung des "*read out*" darstellen.

Im Prozess der Gelenkdestruktion spielen neben Zytokinen wie IL-1ß und TNFα auch die proteolytischen Enzyme MMP-2 und MMP-9 (Gelatinasen) eine wesentliche Rolle. Mittels der Enzym-Substrat-Zymographie, einer Form der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, wurden die enzymatischen Aktivitäten der eingesetzten und zu testenden Zellpopulationen bestimmt und untersucht, welche Effekte durch Zugabe ausgewählter Substanzen wie Lectine oder Protein-Kinase-Inhibitoren hervorgerufen werden. Anders als normale humane Fibroblasten, die nur MMP-2 sekretieren, produzieren die RA-Synovialfibroblasten beide Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9). Diesbezüglich ähneln die RA-Synovialfibroblasten humanen malignen Fibrosarkoma-Zelllinien wie HT1080 (Gervasi et al., 1996).

Gö6983, ein Inhibitor der Protein-Kinase C, sowie PMA, ein Aktivator dieser Kinase, hatten keinen Effekt auf die Sekretion bzw. Aktivierung von MMP-9 in RA-Synovialfibroblasten. Dieses Ergebnis zeigt, dass in den RA-Synovialfibroblasten die Produktion von MMP-9 nicht über den Signalweg der Protein-Kinase C verläuft, wie für andere Fibroblastenarten beschrieben wurde (Gervasi et al., 1996; Park et al., 2000). Von den anderen getesteten Substanzen zeigte keine den Effekt, die Sekretion von MMP-9 zu erhöhen. während der Protein-Kinase-Inhibitor Staurosporin, die Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren Genistein und Herbimycin A, das Natrium-Ionophor Monensin, das Kalzium-Ionophor A 23187 und der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Natriumortho-Vanadat die MMP-9-Ausschüttung hemmten.

Um zu analysieren, welcher Weg der Signalübertragung in den RA-Synovialfibroblasten zu einer Aktivierung von MMP-2 führt, haben wir den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Signalwege der ConA- bzw. Cytochalasin D-vermittelten MMP-2-Aktivierung untersucht. Dabei stellten wir keinen Unterschied im Verhalten der ConA- oder Cytochalasin D-stimulierten RA-Synovialfibroblasten fest. Unsere Ergebnisse verstärken die Erkenntnisse, dass in Monolayer-Kulturen verschiedener Fibroblastentypen eine Vielzahl verschiedener Signalwege für die Aktivierung von MMP-2 ablaufen. In humanen Hautfibroblasten kann die Aktivierung von MMP-2 über einen Cyclooxygenaseabhängigen Signalweg mit Monensin induziert werden (Li et al., 1997), was wir für RA-Synovialfibroblasten nicht zeigen konnten. Der Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin, der in humanen Hautfibroblasten den MMP-2-aktivierenden Effekt von Monensin unterbindet, hatte in RA-Synovialfibroblasten keinen Einfluss auf die Aktivierung von MMP-2 durch ConA oder Cytochalasin D. Weiterhin wurde für humane Hautfibroblasten beschrieben, dass die durch Monensin oder Natriumortho-Vanadat induzierte Aktivierung von MMP-2 durch Genistein oder Herbimycin A blockiert werden kann. Beide Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren zeigten jedoch keinen signifikanten Effekt auf die ConA-/Cytochalasin D-vermittelte MMP-2-Aktivierung in RA-Synovialfibroblasten. Auch Wortmannin, ein PI3-Kinase-Inhibitor (Kurata et al., 2000), und Rapamycin, ein spezifischer Inhibitor der p70S6-Kinase, konnten die Aktivierung von MMP-2 in RA-Synovialfibroblasten nicht inhibieren. Abgesehen von der Identifizierung einer besonderen Protein-Kinase oder einem der bekannten Signalübertragungswege, zeigte der Effekt der Inkubation mit Staurosporin, einem Inhibitor für Protein-Kinasen, dass diese notwendig sind, um MMP-2 zu aktivieren. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass es eine Vielzahl von Signalwegen für die Sekretion der Gelatinasen und die Aktivierung von MMP-2 gibt, und dass die für einen Zelltyp gegebene Signalübertragung nicht zwingend in einem andern aktiv ist.

Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war es, Genexpressionsanalysen am *in vitro* Pannusmodell für die RA mittels quantitativer "real-time" PCR durchzuführen. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich Menge und Verlaufskinetik wichtiger RA-Mediatoren sowohl beim Krankheitsverlauf als auch während einer



medikamentösen Behandlung verfolgen. Durch Integration dieser Methode in ein automatisiertes Verfahren kann der Verlauf einer PCR-Reaktion "*online*", d.h. während der Reaktion ("*real-time*") am Monitor verfolgt werden.

Im Mittelpunkt stand hierbei die Transkriptionskontrolle der Chondrozyten während der Co-Kultivierung mit RA-Synovialzellen.

Die Beurteilung der Probenqualität und die Bestimmung der Expression relevanter Gene in Chondrozyten des Schweins im in vitro Pannusmodell erfolgte anhand einer indirekten Quantifizierung über die Expression eines sog. Referenz- oder "housekeeping"-Gens, in diesem Fall β-Actin. Für humanes ß-Actin wurde ein Pseudogen beschrieben (Ponte et al., 1984), dessen Sequenz Homologien mit der des humanen 
ß-Actin-Gens aufweist. β-Actin-Pseudogene für Schwein sind unseres Wissens nicht publiziert, aber natürlich kann man das Vorkommen solcher Pseudogene nicht ausschließen. Um spezies-spezifische "real time"-PCR-Signale zu erhalten, wurden Hybridisationssonden entwickelt (Tab. 4), die spezifisch an c-DNA des Schweins binden, nicht jedoch an humaner c-DNA. Zudem weisen diese Sonden gegenüber dem humanen B-Actin-Pseudogen kaum Homologie auf. Somit ist β-Actin ein geeignetes Referenzgen für die LightCycler-PCR, trotz etwaiger Pseudogene, wie auch gerade für das TaqMan-System beschrieben wurde (Kreuzer et al., 1999).

Für die Etablierung dieser Hybridisationssonden im *LightCycler*-Format wurde der Reaktionsansatz im Anschluss an den PCR-Lauf einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Hierdurch konnten die im Verlauf der PCR gebildeten Amplifikationsprodukte identifiziert und die Sonden auf ihre Spezifität getestet werden.

Mit Hilfe der entwickelten Schweinespezifischen Primer und Hybridisationssonden für die Gene von β-Actin und Kollagen Typ II konnte gezeigt werden, dass die "real-time PCR" eine indirekte Quantifizierung der Genexpression im in vitro Pannusmodell ermöglicht. Durch die Co-Kultivierung der Chondrozyten-Pelletkulturen mit RA-Synovialzellen wurde die Expression vom Gen für Kollagen Typ II als charakteristischem Knorpelmarker deutlich herabreguliert. Es steht damit eine Methode zur Verfügung, molekularbiologische Modulationen durch pharmazeutisch relevante Substanzen im in vitro Pannusmodell zu untersuchen.

Die weitere Zielsetzung dieses Projektes besteht in der technischen Umsetzung unserer Erkenntnisse, um standardisierte Verfahren für Routineuntersuchungen zur Verfügung zu stellen. Damit ergäbe sich ein beachtliches Potential, Tierversuche im Bereich der Grundlagenforschung und



Abb. 17: Darstellung einer Vielzahl von Möglichkeiten zur Untersuchung krankheitsrelevanter zellulärer Interaktionen und Einsatzmöglichkeiten des entwickelten *in vitro* Pannusmodells.

eventuell präklinischer Studien im Rahmen der Arzneimittelentwicklung einzusparen.

# 4.1 Potential zur Einsparung von Tierversuchen

Es ist sehr schwierig, bestimmte Tierversuche vollständig durch Alternativmethoden zu ersetzen, aber beispielsweise stellte die Bundesregierung zur Förderung der Erforschung von Ersatzmethoden zum Tierversuch im Jahr 2000 rund 9,5 Millionen DM aus Bundesmitteln zur Verfügung.

Die Zahl der benötigten Versuchstiere ist zwar seit 1989, dem Beginn der amtlichen Datenerhebung über für Versuchszwecke eingesetzte Wirbeltiere, von 2,6 Millionen Tieren 1989 auf 1,5 Millionen 1997 bzw. 1,53 Millionen 1998 stark gesunken, aber immer noch beträchtlich.

Zur Entwicklung oder Prüfung von Arzneimitteln wurden 1997 etwa 49 % (also 733.000) und 1998 ca. 45% (entspricht 687.000) der eingesetzten Versuchstiere herangezogen; für Versuchsvorhaben im Bereich der Grundlagenforschung wurden 1997 319.000 (21%) und 1998 386.000 (25%) aller Tiere eingesetzt.

Der Vorteil unseres Kulturmodells ist in der schnellen Analyse des Wirksamkeitsprofils der Substanz unter in vitro Bedingungen, die wichtige Aspekte der humanen Pathologie reflektieren, zu sehen. Dieses Modell soll weiterführend zu einem in vitro Assay entwickelt werden, mit dem die Wirkung von Pharmaka, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hemmstoffen proteolytischer Enzyme untersucht werden kann. So wäre es möglich, die entsprechenden aufwändigen tierexperimentellen Untersuchungen schon in frühen Untersuchungs- und Entwicklungsstadien zu ergänzen bzw. sogar zu reduzieren. Die "High Throughput"-Umsetzung des in vitro Pannus würde nicht nur der Ablösung von Tierversuchen im allgemeinen dienen, sondern hätte insbesondere eine Kosteneinsparung bei den Testserien, den Wegfall der kostspieligen Tierhaltung und eine Verkürzung der Testdauer zum Ziel.

Weiterhin könnte das entwickelte Modell für eine Vielzahl anderer Untersuchungen krankheitsrelevanter zellulärer Interaktionen eingesetzt werden (Abb. 17). Es bietet die Möglichkeit, über die Untersuchungen zur RA hinaus auch andere pathogenetisch relevante zelluläre Interak-



tionen in einer definierten extrazellulären Matrix zu simulieren oder die Zell-Zellund Zell-Matrix-Interaktionen bei Morphogenese, Regeneration und funktioneller Differenzierung bestimmter Gewebe zu analysieren. Weitere Forschungsschwerpunkte, bei denen das Modell der interaktiven Zellkulturen eine wesentliche Rolle spielen kann, sind die Untersuchung degenerativer und traumatischer Gelenk- und Knochenschäden als Grundlage für ein Gelenkinfektionsmodell der Lyme-Borreliose. Zudem ergeben sich zahlreiche Ansatzpunkte im Bereich des Tissue Engineering, d.h. der klinischen Anwendung von in vitro hergestellten "künstlichen" Geweben in Kombination mit geeigneten biokompatiblen Matrixstrukturen vor allem zur Unterstützung regenerativer Vorgänge und zum Einsatz in der rekonstruktivplastischen Chirurgie.

#### Literatur

- Adolphe, M. and Demignod, S. (2000). (no title available). *Bull Acad Natl Med 184* (3), 593-600.
- Ayad, S., Boot-Handfort, R. P., Humphries, M. J. et al. 1998). *The extracellular matrix*. Academic Press.
- Caplan, A. I. (2000). Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Eng* 6, 1-8.
- Chubinskaya, S., Kuettner, K. E. and Cole, A. A. (1999). Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab Invest 79 (12)*, 1669-77.
- D'Andrea, P., Calabrese, A. and Grandolfo, M. (1998). Intercellular calcium signalling between chondrocytes and synovial cells in co-culture. *Biochem J 329*, 681-687.
- Declaux, D., Delacourt, C., d'Ortho, M. et al. (1996). Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 288-295.
- Fassina, G., Paglialunga, G., Fontanini, G. et al. (1996). Expression of mRNA for gelatinase A and TIMP-2 in cell cultures and tissue samples derived from breast and lung carcinomas. *Int. J. Oncol.* 8, 253-261.
- Firestein, G. S., Alvaro-Gracia, J. M. and Maki, R. (1990). Quantitative analysis

of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol 144*, 3347-3353.

- Foss, D. L., Baarsch, M. J. and Murtaugh, M.P. (1998). Regulation of HPRT, GAPDH and  $\beta$ -Actin m-RNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol 9 (1)*, 67-78.
- Frye, C., Yocum, D., Tuan, R. et al. (1996). An in vitro model for studying mechanisms underlying synoviocyte-mediated cartilage invasion in rheumatoid atrhritis. *Pathol Oncol Res* 2(3), 157-166.
- Geiler, T., Keyßer, G., Heer, A. et al. (1993). Interactions between synovial cells and cartilage: a new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal cartilage in SCID-MICE. *Arthritis Rheum 39 (suppl.9)*, 35 (Abstract).
- Gervasi, D. C., Avraham, R., Dehem, M. et al. (1996). Carbohydrate-Mediated Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Normal Human Fibroblasts and Fibrosarcoma Cells. *Biochem Biophys Res Comm* 228, 530-538.
- Gilat, D., Cahalon, L., Hershkooviz, R. and Lider, O. (1996). Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix. *Immunology today 17*, 16-20.
- Haas, C., Aicher, W. K., Dinkel, A. et al.(1997). Charakterization of SV40T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintain expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol Int 16*, 241-247.
- Hollinger, J. O., Winn, S. and Bonadio, J. (2000). Options for tissue engineering to address challenges of the aging skeleton. *Tissue Eng* 6, 341-50.
- Houri, J. M. and O'Sullivan, F. X. (1995). Animal models in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 7(3), 201-205.
- Joe, B., Griffiths, M. M., Remmers, E. F. and Wilder, R. L. (1999). Animal models of rheumatoid arthritis and related inflammation. *Curr Rheumatol Rep 1*, 139-48.
- Kaul, R., Sharma, A., Lisse, J. R. and Christadoss, P. (1995). Human recombinant IL-2 augments immunoglobulin and induces rheumatoid factor production by rheumatoid arthritis lymphocytes engrafted into severe combined immunodeficient mice. *Clin Immunol Immunopathol* 74(3), 271-282.

- Kolkenbrock, H., Ali, H., Hecker-Kia, A. et al. (1991). Characterization of gelatinase from human rheumatoid synovial fluid cells. *Eur J Clin Chem Clin Biochem 29*, 499-505.
- Kolkenbrock, H., Hecker-Kia, A., Orgel, D. et al. (1994). Activity of ternary gelatinase A-TIMP-2-matrix-metalloproteinases complex. *Biol Chem Hoppe-Seyler 375*, 589-595.
- Kolkenbrock, H., Essers, L., Ulbrich, N. and Will, H. (1999). Biochemical characterization of the catalytic domain of membrane-type 4 matrix metalloproteinase. *Biol Chem* 380, 1103-1108.
- Kreuzer, K. A., Lass, U., Landt, O. et al. (1999). Highly sensitive and specifc fluorescenc reverse transcription-PCR assay for pseudogene-free detection of  $\beta$ -actin transcripts as quantitativ reference. *Clinical Chemistry* 2, 297-300.
- Kühn, K. (1987). *The classical collagens: Types I, II, and III*. Academic Press.
- Kurata, H., Thant, A., Matsuo, S. et al. (2000). Constitutive activation of MAP kinase kinase (MEK1) is critical and sufficient for the activation of MMP-2. *Exp Cell Res 254*, 180-188.
- Kurz, B., Steinhagen, J. and Schünke, M. (1999). Articular chondrocytes ans synoviocytes in a co-culture system: influence on reaktive oxygen species-induced cytotoxicity and lipid peroxidation. *Cell Tissue Res* 296, 555-563.
- Langer, R. and Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science 260*, 920-926.
- Lawrence, D. and Niu, J. (1998). Protein kinase inhibitors: The tyrosine-specific protein kinases. *Pharmacol Ther* 77, 81-114.
- Lehmann, J., Jungel, A., Lehmann, I. et al. (2000). Grafting of fibroblasts isolated from the synovial membrane of rheumatoid arthritis (RA) patients induces chronic arthritis in SCID mice-A novel model for studying the arthritogenic role of RA fibroblasts in vivo. J Autoimmun 15, 301-313.
- Li, L., Akers, K., Eisen, A. Z. and Seltzer, J. L. (1997). Activation of gelatinase A (72-kDa type IV collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. *Exp Cell Res 232*, 322-330.
- Li, L., Eisen, A. Z., Sturman, E. and Seltzer, J. L. (1998). Protein tyrosine phosphorylation in signalling pathways leading to the activation of gelatinase A: activation of gelatinase A by treatment



with the protein tyrosine phosphate inhibitor sodium orthovanadate. *Biochim Biophys Acta 1405*, 110-120.

- Llano, E., Pendas, A., Freije, J. et al. (1999). Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors. *Cancer Res 59*, 2570-2576.
- Lohmander, S. (1988). Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin Rheumatol 2(1)*, 37-62.
- Muir, H. (1979). Adult articular cartilage. In Freeman (Hrsg.), *Biochemistry* Vol. 2 (145-214). London: Pitman.
- Nagase, H. and Woessner, J. F. (1999). Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Neidhart, M., Gay, R. and Gay, S. (2000). Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis&Rheum 43 (8)*, 1719-1728.
- Overall, C. M. und Sodeck, J. (1990). Concanavalin A produces a matrix-degradative phenotype in human fibroblasts. Induction endogenous activation of collagenase, 72-kDa gelatinase, and Pump-1 is accompanied by the supression of of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 265, 21141-21151.
- Pap, T., van der Laan, W. H., Aupperle, K. R. et al. (2000). Modulation of fibroblast-mediated cartilage degradation by articular chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 2531-2536.
- Pap, T., Aupperle, K. R., Gay, S. et al. (2001). Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum* 44, 676-81.
- Park, M. J., Park, I. C., Hur, J. H. et al. (2000). Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett 290(3)*, 201-204.
- Pei, D. (1999). Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. J Biol Chem 274, 8925-8932.

- Poole, C. A. (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat 191*, 1-13.
- Ponte, P., Ng, S. Y., Engel, J. et al. (1984).
  Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res 12 (3)*, 1687-1696.
- Romeis, B. and Böck, P. (Hrsg.) (1989). *Mikroskopische Techniken*. 17. Ausgabe, München: Urban & Schwarzenberg.
- Sack, U., Kuhn, H., Ermann, J. and Emmrich, F. (1993). Cartilage destruction in the human/murine SCID Mouse Arthritis. *Arthritis Rheum 36 (suppl 9)*, 34 (Abstract).
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y. et al. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.
- Schonherr, E. and Hausser H. J. (2000). Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 7, 89-101.
- Schultz, O., Keyszer, G., Zacher, J. et al. (1997). Development of *in vitro* model system for destructive joint diseases. *Arthritis Rheum* 40, 1420-1428.
- Sittinger, M., Bujia, J., Rotter, N. et al. (1996). Tissue engineering and autologous transplant formation: Practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 17, 237-242.
- Slot, O., Brunner, N. and Stephens, R. W. (2000). Marker of erosive progression in RA. Ann Rheum Dis 59 (8), 656.
- Sonderstrup, G., Cope, A. P., Patel, S. et al. (1999). HLA class II transgenic mice: models of the human CD4+ Tcell immune response. *Immunol Rev* 172, 335-43.
- Stetler-Stevenson, W. G., Hewitt, R. and Corcoran, M. (1996). Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Cancer Biol.* 7, 147-154.
- Toole, B. P. (1991). Proteoglycans and Hyaluronan in Morphogenesis and Differentiation. In Hay, E.D. (Hrsg.), *Cell Biology of Extracellular Matrix* (305). New York: Plenum Press.
- van den Berg, W. B. (1999). The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthtritis. *Z Rheumatol 58*, 136-141.

- Villiger, P. (1998). Zytokine und rheumatische Erkrankungen. Verlag Hans Huber.
- Watanabe, H., Nakanishi, I., Yamashita, K. et al. (1993). Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci 104*, 991-999.
- Werb, Z. (1993). Proteinases and Matrix Degradation. In W.N. Kelley, E.D. Harris, S. Ruddy, C.B. Sledge (Hrsg.), *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company.
- Will, H. and Hinzmann, B. (1995). cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem 231*, 602-608.

# Danksagung

Dieses Projekt wurde von der Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (set), D-Mainz, finanziert.

### Korrespondenzadresse

Dipl.-Chem. Heike Smolian TransTissue Technologies GmbH Tucholskystrasse 2 D-10117 Berlin e-mail: heike.smolian@transtissue.com

