

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie

Direktor: Professor Dr. B. J. Pichler

**Hypoxie-Bildgebung mittels Positronen-Emissions-
Tomographie in der Diagnostik und im
Therapiemonitoring experimenteller Arthritis**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Günthör, Philipp

aus

Tettnang

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. J. Pichler
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Henes

Tag der Disputation: 17.05.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	9
Formelverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung.....	14
1.1 Die Rheumatoide Arthritis.....	14
1.1.1 Klinik und Immunpathogenese der rheumatoiden Arthritis	14
1.1.2 Die Bedeutung von Hypoxie in der RA	26
1.2 Murine Modelle der experimentellen RA.....	31
1.3 Bildgebende Verfahren in der Diagnostik der RA	34
1.4 Die Positronen-Emissions-Tomographie in der RA	36
1.4.1 Technische Aspekte der Positronen-Emissions-Tomographie	36
1.4.2 Aktueller Stellenwert der PET-Bildgebung in der RA	40
1.4.3 Möglichkeiten der PET-Bildgebung zur Detektion von Hypoxie im Allgemeinen und in der RA	41
1.5 Grundlagen der diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie .	45
1.6 Bedeutung und Möglichkeiten der pharmakologischen Modulation des MAPK-Signalweges in der RA	47
1.7 Ziele und Fragestellung der Arbeit.....	52
1.7.1 Vergleichende Analyse der Hypoxie-PET-Tracer [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR in der experimentellen RA	52
1.7.2 Validierung des therapeutischen Potenzials individueller Inhibitoren der p38-MAPK und dessen Monitoring mit dem Hypoxie-Tracer [¹⁸ F]FMISO	53
2. Material und Methoden	54
2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	54
2.2 Versuchstiere.....	54
2.3 Induktion des Anti-GPI-Modells der RA	55
2.4 MAPK-Inhibitoren und Therapieapplikation	55
2.5 Bildgebende Verfahren	57
2.5.1 Herstellung der Radiotracer.....	57
2.5.2 Vorbereiten der Versuchstiere für PET und MRT	58
2.5.3 PET-Messung und Bildrekonstruktion.....	59
2.5.4 Auswertung der PET-Daten.....	60

2.5.5	MRT-Messung	61
2.5.6	Auswertung der diffusionsgewichteten MRT-Sequenzen	61
2.6	Biodistributionsanalyse	61
2.7	Autoradiographie	62
2.8	Histologie	62
2.9	Immunhistochemie.....	63
2.9.1	Pimonidazol-Immunhistochemie	63
2.9.2	P38-MAPK-Immunhistochemie.....	67
2.10	Statistik	67
2.10.1	Vergleich der Hypoxie-Tracer [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR	68
2.10.2	Therapiestudie mit MAPK-Inhibitoren	69
3.	Ergebnisse.....	70
3.1	Vergleich von OSEM 2D- und OSEM 3D-rekonstruierten Datensätzen	70
3.2	Vergleichende Analyse der Hypoxie-PET-Tracer [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR im Verlauf der Anti-GPI-induzierten experimentellen Arthritis <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i>	71
3.2.1	Klinische und histologische Validierung der Arthritis.....	71
3.2.2	Dynamische <i>in vivo</i> [¹⁸ F]FMISO- und [¹⁸ F]β-FAZDR-PET-Messungen im Verlauf der Anti-GPI-induzierten RA.....	73
3.2.3	Quantifizierung und Vergleich der [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR Aufnahme (65 Minuten <i>post injectionem</i>)	78
3.2.4	<i>Ex vivo</i> [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR Biodistribution.....	83
3.2.5	<i>Ex vivo</i> [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR Autoradiographie.....	90
3.2.6	<i>Ex vivo</i> Pimonidazol-Immunhistochemie	91
3.2.7	Sequentielles [¹⁸ F]FMISO-PET/MRT	94
3.3	Diffusionsgewichtete MRT-Messungen	95
3.4	Validierung des therapeutischen Potenzials individueller Inhibitoren der p38-MAPK und dessen Monitoring mit [¹⁸ F]FMISO	97
3.4.1	P38-MAPK-Immunhistochemie in Anti-GPI-induzierter RA.....	97
3.4.2	Therapeutischer Effekt der MAPK-Inhibitoren auf die Gelenkschwellung im Verlauf der Anti-GPI-induzierten RA	97
3.4.3	<i>In vivo</i> [¹⁸ F]FMISO-PET im Therapiemonitoring der MAPK-Inhibitoren.....	100
3.4.4	Histologische Analyse von arthritischen Tieren unter Therapie mit PBS, ML 3595 oder LN 950	105
4.	Diskussion	107
4.1	Vergleichende Analyse der Hypoxie-PET-Tracer [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR in der experimentellen RA	107

4.2	Validierung des therapeutischen Potenzials individueller Inhibitoren der p38-MAPK und dessen Monitoring mit dem Hypoxie-Tracer [¹⁸ F]FMISO	120
5.	Zusammenfassung	129
6.	Literaturverzeichnis.....	131
7.	Veröffentlichungen.....	165
8.	Erklärung zum Eigenanteil.....	166
9.	Danksagung	167

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Stufenschema der RA-Pathogenese.....	17
Abbildung 2:	Ausgewählte pathophysiologische Mechanismen in der chronischen Arthritis.....	26
Abbildung 3:	Datenakquisition im PET.....	37
Abbildung 4:	Tissue Fraction Effect	39
Abbildung 5:	Strukturformeln der Nitroimidazoltracer (A) [¹⁸ F]FMISO, (B) [¹⁸ F]FAZA und (C) [¹⁸ F]β-FAZDR	45
Abbildung 6:	Logarithmierte Diffusions-Signalintensität in Abhängigkeit vom <i>b</i> -Wert des Gradientenfeldes	47
Abbildung 7:	Schema des MAPK-Signalweges	50
Abbildung 8:	Studiendesign für die MAPK-Therapiestudie	57
Abbildung 9:	Herstellung von [¹⁸ F]β-FAZDR	58
Abbildung 10:	Vergleich von OSEM 2D, OSEM 2D* und OSEM 3D rekonstruierten Datensätzen aus [¹⁸ F]FMISO-PET Akquisitionen.....	71
Abbildung 11:	Verlauf der Gelenkschwellung, Tag 0, 1, 3, 6 und 8 nach Arthritis- oder Kontrollserum-Injektion.....	72
Abbildung 12:	Histologische Merkmale der Anti-GPI-induzierten Arthritis im Vergleich zu Kontrolltieren, 8 Tage nach Antikörper-Injektion.....	73
Abbildung 13:	TACs von dynamischen PET-Scans im Gelenk für Arthritis (rot)- und Kontrolltiere (grau), Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion	75
Abbildung 14:	TAC von dynamischem [¹⁸ F]β-FAZDR-PET-Scan im Gelenk für Arthritis (rot)- und Kontrolltiere (grau), Tag 6 nach Arthritisinduktion, 0-7200 Sekunden nach Tracerinjektion	76
Abbildung 15:	Differenz der Aktivität in %ID/cc zwischen Arthritis- und Kontrollgelenk während dynamischem PET-Scan, Tag 6 nach Arthritisinduktion.....	77
Abbildung 16:	Ratio der Aktivität in %ID/cc zwischen Arthritis- und Kontrollgelenk während dynamischem PET-Scan, Tag 6 nach Arthritisinduktion.....	78
Abbildung 17:	Quantifizierung der Radiotracer-Aufnahme im Gelenk, Tag 1,3,6 und 8 nach Arthritisinduktion für Arthritis- und Kontrollgelenke	79
Abbildung 18:	Ganzkörper-PET zum Zeitpunkt 65 Minuten <i>p.i.</i>	80

Abbildung 19:	Korrelation von %ID/cc zu Gelenkdurchmesser bei Arthritis- und Kontrolltieren.....	82
Abbildung 20:	[¹⁸ F]FMISO-Biodistribution, Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion für Arthritis- und Kontrolltiere.....	86
Abbildung 21:	[¹⁸ F]β-FAZDR-Biodistribution, Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion für Arthritis- und Kontrolltiere.....	89
Abbildung 22:	Autoradiographie-Bilder für (A) [¹⁸ F]β-FAZDR (Tag 6) und (B) [¹⁸ F]FMISO (Tag 8) injizierte Tiere.....	90
Abbildung 23:	H&E-gefärbte Autoradiographie-Schnitte zur Beurteilung der Tracerverteilung im Gewebe für [¹⁸ F]FMISO-Autoradiographie, Tag 8 nach Arthritisinduktion.....	91
Abbildung 24:	Repräsentative Pimonidazol-Immunhistochemie, Tag 6 nach Arthritisinduktion.....	92
Abbildung 25:	Pimonidazol-Anreicherung in arthritischer Knochenneubildung und Isotyp-Kontrolle.....	93
Abbildung 26:	Pimonidazol-Immunhistochemie, Tag 8 nach Arthritisinduktion, Säure-Dekalzifizierungsprotokoll.....	93
Abbildung 27:	Pimonidazol-Immunhistochemie, Tag 1 nach Arthritisinduktion.....	94
Abbildung 28:	Sequentiell aufgenommenes [¹⁸ F]FMISO-PET/MR, Tag 8 nach Arthritisinduktion mit (A) T2-Anatomiesequenz, (B) fusioniertem PET/MRT, (C) [¹⁸ F]FMISO-PET und (D) H&E-gefärbte Histologie.....	95
Abbildung 29:	Parametrische ADC-Karte und Fusion mit T2-gewichtetem Anatomiebild bei einem Anti-GPI-injizierten Tier, Tag 6 nach Arthritisinduktion.....	96
Abbildung 30:	p38-MAPK Immunhistochemie.....	97
Abbildung 31:	Gelenkdurchmesser (mm) von Arthritistieren nach Anti-GPI-Injektion (Tag 0-7/8), unter Therapie mit (A) ML 3595 (B) Skepinone-L und (C) LN 950.....	99
Abbildung 32:	Gelenkdurchmesser (mm) von Kontrolltieren nach Kontrollserum-Injektion (Tag 0-7/8), unter Therapie mit (A) ML 3595 oder (B) Skepinone-L.....	100
Abbildung 33:	Quantifizierung der [¹⁸ F]FMISO-Aufnahme im Gelenk an Tag 3 nach Arthritisinduktion (Therapie Tag 7), für (A) ML 3595-Arthritis (B) Skepinone-L-Arthritis (C) LN 950 (D) ML 3595-Kontrolle und (E) Skepinone-L-Kontrolle.....	101
Abbildung 34:	Quantifizierung der [¹⁸ F]FMISO-Aufnahme im Gelenk an Tag 6 nach Arthritisinduktion (Therapie Tag 10), für (A) ML 3595-Arthritis (B) Skepinone-L-Arthritis (C) LN 950 (D) ML 3595-Kontrolle und (E) Skepinone-L-Kontrolle.....	102

Abbildung 35: Repräsentative [¹⁸ F]FMISO-PET-Bilder von arthritischen Gelenken an Tag 6 nach Arthritisinduktion, für die Therapie mit (A) ML 3595 (B) Skepinone-L und (C) LN 950	103
Abbildung 36: Repräsentative H&E Färbung von Gelenken, 8 Tage nach Arthritisinduktion, für (A) PBS-Therapie, (B) ML 3595 – Therapie mit 7% reduzierter Gelenkschwellung, (C) ML 3595 –Therapie mit 20% reduzierter Gelenkschwellung und (D) LN 950-Therapie	106
Abbildung 37: 3-Gewebe-Modell (4 Kompartimente) der Tracerverteilung ..	112
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Tracerverteilung in den jeweiligen Kompartimenten im Verlauf der PET-Messung in (A) Arthritis- und (B) Kontrollgelenken	113
Abbildung 39: Möglicher Zusammenhang der im Rahmen der MAPK-Therapiestudie erfassten Parameter	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vergleich des CIA und Anti-GPI Modells.....	34
Tabelle 2:	Protokoll für Entkalkung mit EDTA.....	64
Tabelle 3:	Protokoll für Entkalkung mit Ameisensäure.....	65
Tabelle 4:	Färbeprotokoll für Pimonidazol-Immunhistochemie	65
Tabelle 5:	Vergleich der Sensitivität/Spezifität in % für [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR, Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion.....	81
Tabelle 6:	Pearson-Korrelationsquotient r zwischen Gelenkdurchmesser und Traceraufnahme für [¹⁸ F]FMISO und [¹⁸ F]β-FAZDR.....	83
Tabelle 7:	Pearson-Korrelationsquotient r zwischen Gelenkdurchmesser und [¹⁸ F]FMISO-Traceraufnahme für MAPK-Inhibitor oder PBS-therapierte Gruppen	104
Tabelle 8:	Prozentuale Zu- oder Abnahme vom Mittelwert der PBS-Therapiegruppe für Einzelgelenke von Tieren unter ML 3595-Therapie, Tag 6 nach Arthritisinduktion	105

Formelverzeichnis

Formel 1:	Standardfehler der Differenz	68
Formel 2:	95 %-Konfidenzintervall der Differenz	68
Formel 3:	Standardfehler des Quotienten	69
Formel 4:	95 %-Konfidenzintervall des Quotienten	69

Abkürzungsverzeichnis

%ID/cc	Prozent der injizierten Dosis/Kubikzentimeter
%ID/g	Prozent der injizierten Dosis/Gramm
[¹⁸ F]FAZA	[¹⁸ F]Fluorazomyzin-Arabinosid
[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ F]Fluordesoxyglucose
[¹⁸ F]FLT	[¹⁸ F]Fluorothymidin
[¹⁸ F]FMISO	[¹⁸ F]Fluormisonidazol
[¹⁸ F]HX4	[¹⁸ F]Flortanidazol
[¹⁸ F]β-FAZDR	[¹⁸ F]Fluorazomyzin-β-Deoxyribose
ACPA	Anti-citrulliniertes Protein/Peptid-Antikörper
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADC	<i>Apparent Diffusion Coefficient</i>
AIA	<i>Adjuvans-induced Arthritis</i>
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CD4+	<i>Cluster of Differentiation 4-positiv</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvans</i>
CFOV	<i>Center of the Field of View</i>
CIA	<i>Collagen-induced Arthritis</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom-P
DAMP	<i>Damage-associated molecular Pattern</i>
DWI	<i>Diffusion-weighted Imaging</i>
DMARD	<i>Disease-modifying antirheumatic Drugs</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUSP	<i>Dual-Specificity MAPK Phosphatases</i>
DZ	Dendritische Zellen
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Protein Kinase</i>
EULAR	<i>European League against Rheumatism</i>
FIH	<i>Factor inhibiting HIF</i>
FLS	<i>Fibroblast-like Synoviocytes</i>
FOV	<i>Field of View</i>

FWHM	<i>Full Width at half Maximum</i>
GLUT1	Glukose-Transporter 1
GPI	Glukose-6-Phosphat Isomerase
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HPLC	<i>High-Performance liquid Chromatography</i>
HRE	<i>Hypoxia-responsive Elements</i>
Ig	Immunglobulin
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
IK	Immunkomplex
IKK	<i>Inhibitor of NF-κB-Kinase</i>
I κ B	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
JAK	Januskinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
kBq	Kilobequerel
keV	Kiloelektronenvolt
LOR	<i>Line of Response</i>
MAK	Membran-Angriffs Komplex
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MAPKK	MAPK-Kinasen
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinasen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	mikro-RNA
MK2	MAPKAP Kinase 2
MKP-1	MAPK Phosphatase-1
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NF- κ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-Cells</i>
OSEM	<i>Ordered Subset Expectation Maximization</i>
OSG	Oberes Sprunggelenk
<i>p.i.</i>	<i>Post injectionem</i>
PAD	Peptid-Arginin-Deiminase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular Pattern</i>
PDE-4	Phosphodiesterase-4
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHD	<i>HIF Prolyl-Hydroxylase Domain-containing Enzymes</i>

PPR	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PSF	<i>Point Spread Function</i>
PTPN 22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22</i>
PVE	Partialvolumeneffekt
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG-1	<i>Recombination-activating Gene 1</i>
RF	Rheumafaktor
ROI	<i>Region of Interest</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SE	<i>Shared Epitope</i>
STIA	<i>K/BxN Serum Transfer-induced Arthritis</i>
TAC	<i>Time Activity Curve</i>
TAK	<i>TGF-β-activated Kinase</i>
TBW	Totales Körperwasser
Th	T-Helferzellen
TIMPS	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
UA	Undifferenzierte Arthritiden
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VOI	<i>Volume of Interest</i>

1. Einleitung

1.1 Die Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Klinik und Immunpathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine gelenkbetonte Autoimmunerkrankung, die mit einer Prävalenz von 0,5-1 % in der Weltbevölkerung auftritt. Es sind 3x mehr Frauen als Männer betroffen und die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit dem Alter zu [1]. Unbehandelt führt die RA bei 30 % der Betroffenen innerhalb von 2 Jahren zur Arbeitsunfähigkeit [2].

Die Erkrankung ist durch eine symmetrische erosive Polyarthritits gekennzeichnet und beginnt meist mit Schmerzen, Schwellung und Morgensteifigkeit in den kleinen Fingergelenken. Hinzu kommen häufig eine Tendosynovitis und ein allgemeines Krankheitsgefühl, da die RA eine systemische Erkrankung ist. In fortgeschrittenen Stadien können das gesamte Achsenskelett sowie eine Vielzahl extraartikulärer Organe befallen sein. Häufig ist eine schubförmige Verlaufsform, in 10-15 % kommt es zu einem malignen Verlauf mit generalisierter Vasculitis [3].

Die RA wird heute immer mehr als ein pathophysiologisch sehr heterogenes Krankheitsbild verstanden. Dies macht individuelle Diagnose- und Therapieansätze notwendig. Im Folgenden werden daher die wichtigsten Mechanismen der RA-Entstehung dargestellt.

Die bekannteste genetische Assoziation mit der RA ist das *Human Leucocyte Antigen* (HLA) (bis zu 35 % der genetischen Suszeptibilität) [4; 5]. Von HLA-Genen kodierte Moleküle, darunter der sog. *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-2, spielen eine zentrale Rolle in der Interaktion von angeborenem und adaptivem Immunsystem. Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie Makrophagen, Dendritische Zellen (DZ) und B-Lymphozyten präsentieren über den MHC-2-Komplex zuvor prozessierte Antigene an T-Zellen. Der MHC-2-Komplex ist somit zentral für die Aktivierung des Immunsystems und maßgeblich für die Un-

terscheidung zwischen fremd und körpereigen. Die erste beschriebene Assoziation der RA mit dem HLA-*antigen D Related* (DR)-Gen reicht bis 1976 zurück [6]. 1987 wurde die Assoziation der Arthritis mit einer bestimmten Aminosäuresequenz auf dem HLA-DR β -*chain 1* (HLA-DRB1)-Genlocus entdeckt, dem sog. *Shared Epitope* (SE) [7]. Diese SE-Sequenz ist allen HLA-Suszeptibilitätsallelen gemein und kodiert für einen Teil der Peptid-Bindungstasche des MHC-2. Weitere genetische Assoziationen, die in jüngerer Zeit charakterisiert wurden, sind z.B. Mutationen im Gen *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22* (PTPN 22), welches regulierend in den T-Zell-Rezeptor Signalweg involviert ist [8]. Die Konkordanz von nur 15 % zwischen genetisch gleichen Zwillingen weist jedoch darauf hin, dass neben der genomischen auch epigenetische Veränderungen und Umwelteinflüsse eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen müssen [9].

Mindestens zwei Entitäten des „Syndroms RA“ werden heute klar unterschieden: Die Anti-citrulliniertes Protein/Peptid-Antikörper (ACPA)-positiven (ca. 80 % der Fälle, populationsunabhängig) und ACPA-negativen Formen der RA [5]. Die ACPA sind sehr heterogene Antikörper (AK) und wurden bereits 1998 gefunden [10]. Sie sind gegen multiple Antigene gerichtet und dabei unterschiedlich stark (z.B. AK gegen α -Enolase und Vimentin) oder schwach (z.B. AK gegen Fibrinogen und Kollagen-II) mit SE-Allelen assoziiert. Die Bedeutung dieser Autoantikörper gewinnt immer mehr an Evidenz. Zunächst zeigte sich, dass sowohl die HLA- als auch die PTPN 22-Assoziationen ausschließlich bei ACPA-positiver Arthritis zu finden sind und dabei auch nur für das Vorhandensein dieser Autoantikörper prädisponieren, nicht für das Auftreten der Erkrankung an sich [11; 12]. Auch Nikotinkonsum, ein seit den 80er-Jahren bekannter Umweltfaktor für RA [13], geht nur mit ACPA-positiver RA einher [14; 15]. Im Weiteren entdeckte man, dass diese Antikörper auch direkt pathogen wirken, z.B. durch die Aktivierung von Osteoklasten [16] und synovialen Mastzellen [17]. ACPA können bis zu 5 Jahre vor dem Ausbruch der Erkrankung nachgewiesen werden [18; 19], was auf ein Kontinuum von einer präsynovialen Phase zur synovialen Entzündung hinweist („Reifung“ der ACPA-Antwort [17]). Durch noch unbekannte Stimuli kommt es 6-12 Monate vor Ausbruch der klinischen Symp-

tome zur Erweiterung der Zielantigene (*Epitope Spreading*) [20] sowie Veränderungen in Titer [21], Avidität [22] und Isotyp [23] der Antikörper.

Ein heute weit verbreitetes Modell der RA-Pathogenese, das die genannten Risikofaktoren und die Rolle der ACPA integriert, wurde von Klareskog *et al.* vorgeschlagen (Abbildung 1) [14; 24]. Nikotinkonsum kann dosisabhängig über die Aktivierung von Peptid-Arginin-Deiminase (PAD)-Enzymen zur Citrullinierung von Peptiden führen (posttranslationale Modifikation von Arginin-Residuen zu Citrullin). Die so modifizierten Proteine werden von Zellen der angeborenen Immunität (z.B. DZ) bei genetisch suszeptiblen Menschen im Kontext des SE prozessiert und an T-Zellen präsentiert. Die Citrullinierung erhöht die Affinität der Bindung des Proteins an das SE bis zu 100-fach [25]. Bei dieser SE-positiven Population kommt es so nach der Interaktion mit autoreaktiven T-Zellen zur aberranten Produktion von ACPA [14; 26]. Während bis zu 1/3 der ACPA-positiven RA auf Rauchen als initialen Stimulus zurückgeführt wird [27], sind andere Fälle mit chronischer Periodontitis assoziiert. Mikroben wie *Porphyromonas gingivalis* besitzen ein PAD-Enzym und citrullinieren Fibrinogen sowie α -Enolase [28].

Inwieweit die T-Zelle eine Rolle bei der initialen Immunstimulation spielt ist noch nicht gänzlich geklärt [29]. Sowohl bei gesunden SE-positiven Personen als auch RA-Patienten konnte eine Aktivierung von T-Zellen durch citrullinierte Peptide gezeigt werden [30; 31]. Im Thymus wurde bisher keine Citrullinierung nachgewiesen, autoreaktive T-Zellen entgehen also unter Umständen der dort stattfindenden negativen Selektion während der Zellreifung [29]. Das erwähnte Risikogen PTPN 22 verhindert möglicherweise zusätzlich die effektive negative Selektion von T-Zellen [32].

Nach dieser initialen Immunstimulation kommt es durch einen unspezifischen *Second Strike*, etwa ein Trauma oder eine Infektion, zur Citrullinierung von Proteinen in Gelenken [24; 33]. Aus sich dort befindlichen Zelltrümmern werden zunächst intrazellulär citrullinierte Peptide frei, diese werden vom Immunsystem erkannt. Im Weiteren werden zusätzlich extrazelluläre Proteine der Synovialis durch freigesetzte PAD-Enzymen (v.a. PAD-2 und -4) citrulliniert (z.B. Kollagen

und Fibrinogen) [9]. Diese Citrullinierung von Peptiden in entzündeten Geweben ist zunächst nicht spezifisch für die RA, die aberrante humorale Antwort durch ACPA in Verbindung mit dem SE triggert jedoch die Arthritis in dafür suszeptiblen Individuen [34; 35].

Im nächsten Schritt kommt es zur Bildung von Immunkomplexen (IK) [9]. Lösliche IK aus der Zirkulation (gefördert durch erhöhte ACPA-Titer sowie *Epitope Spreading* (s.o.)) führen zu einer Steigerung der vaskulären Permeabilität im Gelenk und dadurch zu mehr Influx von ACPA. Diese können dort direkt an citrullinierte Antigene binden, was über den alternativen und klassischen Weg der Komplementaktivierung sowie die direkte Aktivierung von z.B. Makrophagen (über deren Fc-Rezeptoren), den Hauptstimulus für die weiteren Vorgänge darstellt. Für die Ablagerung von IK ist das Gelenk mit seiner speziellen Gefäßstruktur sowie durch mechanische Faktoren prädisponiert [36]. Aktivierte Makrophagen generieren eine Entzündungsreaktion mit Auftreten von Neoantigenen, welche dann im Lymphknoten von DZ an autoreaktive T-Zellen präsentiert werden [24].

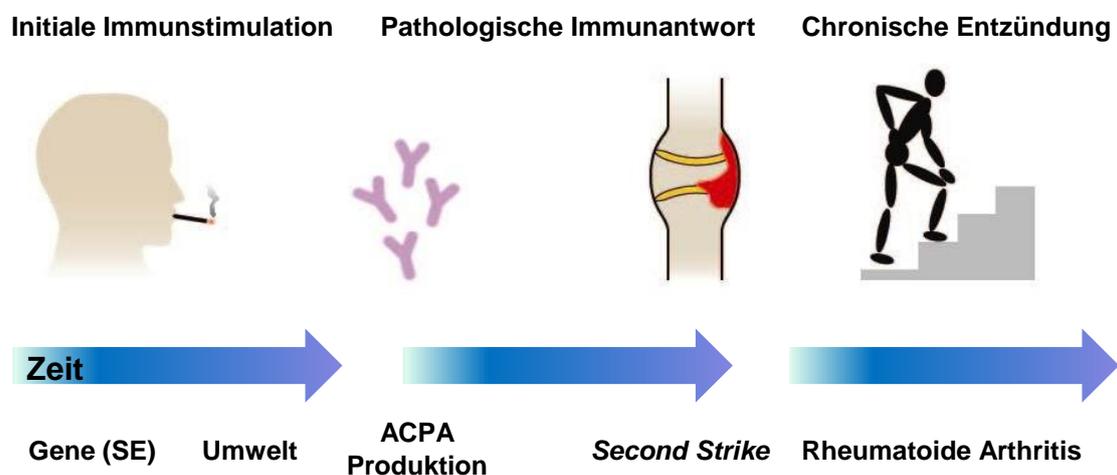


Abbildung 1: Stufenschema der RA-Pathogenese. Adaptiert nach Klareskog *et al.*, 2008 [24]. Veröffentlichung mit Genehmigung von Annual Reviews, Inc., vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc..

Da es häufig zu unspezifischen Traumata kommt, muss der Zeitpunkt des Übergangs von der präsynovialen Phase zur manifesten RA von zusätzlichen Mechanismen getriggert sein. Dies könnte mit dem oben genannten *Epitope*

Spreading sowie einem erhöhten ACPA-Titer zusammenhängen [17]. Andere Trigger könnten Veränderungen im Mikrobiom des Darms sein, die das angeborene Immunsystem sensibilisieren und damit den Schwellenwert zur Ausbildung einer manifesten RA heruntersetzen [9]. Tiermodelle der RA geben hierauf ebenfalls Hinweise. Haltung der Versuchstiere in einer bakterienfreien Umwelt führte in einer Studie zu weniger oder keiner Gelenkbeteiligung [37]. Eine besondere Rolle spielen hierbei die *Toll-like Rezeptoren* (TLR), die u.a. auf die Differenzierung der T-Zell-Population Einfluss nehmen (s.u.) [38]. Nicht alle Faktoren, die zu einer Manifestation der RA beitragen, sind bereits geklärt. So wurden auch Autoantikörper gegen nicht-citrullinierte Antigene gefunden, z.B. gegen Glucose-6-Phosphat Isomerase [39] sowie der klassische Rheumafaktor [29; 40].

Nach diesen initialen Vorgängen werden Autoimmunprozesse in Gang gesetzt, die synergistisch zur Aufrechterhaltung, Progression und schließlich zur Chronifizierung der Entzündung mit einer irreversiblen Zerstörung des Gelenks beitragen. Die *Membrana synovialis*, die alle echten Gelenke auskleidet, besteht normalerweise aus bis zu vier Zellschichten organisierter Intima sowie einer mehr amorphen Subintima [41]. In der Intima finden sich zwei dominierende Zelltypen: Typ A-Synoviozyten (*Macrophage-like*) und Typ B-Synoviozyten oder *Fibroblast-like Synoviocytes* (FLS) [41]. FLS kontrollieren die Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit sowie der Extrazellulärmatrix der Synovialis. Die Struktur der Intima ist relativ durchlässig, um den Nährstofftransport vom Serum an den Knorpel gewährleisten zu können. Dies könnte jedoch in der Anfangsphase der Entzündung eine Ablagerung von IK begünstigen [41]. In der manifesten RA verändert sich diese Architektur grundlegend. Die Intima verdickt sich auf bis zu 20 Zellreihen und bildet zusammen mit der zellreichen Subintima (inflammatorisches Infiltrat bestehend aus Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen) an der Knorpel-Synovialis-Grenze den sog. Pannus, dem ein semiautonomer Phänotyp zugeschrieben wird (gleich einem lokal invasiven Tumor) [42]. Nicht einzelne Zelltypen oder Mutationen sind entscheidend, vielmehr tragen genetische Veränderungen, dysregulierte Zytokinnetzwerke

sowie die Interaktionen multipler Zellen dazu bei, dass die präsynoviale Phase in eine klinische Arthritis übergeht.

Die wichtigsten Komponenten der synovialen Entzündung wie Zytokin- und Zellinteraktionen werden im Folgenden besprochen. Dies ist sowohl für die Beurteilung dieser Mechanismen mittels molekularer Bildgebung, als auch für das Verständnis der Modulation der Inflammation durch spezifische Inhibitoren wichtig.

Zytokine fördern nicht nur die Autoimmunität (auch schon in der präsynovialen Phase [43]), sie halten durch Integration von zellulären und humoralen Prozessen auch die chronische Inflammation aufrecht [44; 45]. Das Zytokinmuster im entzündeten Gelenk ändert sich über die Zeit. In der sehr frühen Phase dominieren v.a. Interleukin (IL)-4, IL-13 und IL-15 [46]. Im weiteren Verlauf wird dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-6 und IL-1 eine zentrale Bedeutung zugeschrieben. TNF- α wird von Synovialzellen exprimiert, darunter Monozyten, FLS, Lymphozyten und Osteoblasten. Die Wirkungen dieses Zytokins sind vielfältig: Lokale Effekte wie Leukozyten- und Endothelaktivierung bzw. Förderung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen, Aktivierung von FLS und DZ, Suppression von anti-inflammatorischen regulatorischen T (T_{reg})-Zellen, Vermittlung der Knochenerosion durch Osteoklastenaktivierung und -differenzierung. Auch systemische Effekte der chronischen Entzündung wie Kachexie, Dyslipidämie, Arteriosklerose [47] und neuropsychologische Veränderungen werden durch TNF mediert [44; 48]. Die Überexpression von TNF führt zur spontanen erosiven Arthritis im experimentellen Mausmodell [49]. Es wurden jedoch auch Modelle unabhängig von TNF generiert [50]. Die Bedeutung des Zytokins zeigt sich auch durch den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Anti-TNF-Medikamenten, die heute den Grundstein der modernen RA-Therapie bilden (vgl. 1.6) [48]. Am effektivsten ist eine frühzeitige Unterbrechung TNF-geförderter autoimmunologischer Prozesse, wobei ein Teil der Patienten jedoch nicht auf eine Anti-TNF-Therapie anspricht (ca. 1/3) [48].

IL-6 vermittelt neben lokaler Leukozytenaktivierung und AK-Produktion auch systemische Effekte z.B. in der Leber die Entzündungsanämie und die Akute-

Phase Antwort. Auch IL-6-Antagonisten werden erfolgreich in der humanen RA eingesetzt [51]. IL-1 fördert u.a. die Aktivierung von Leukozyten, Endothelzellen und Chondrozyten [44]. Mäuse, denen der endogene IL-1-Rezeptorantagonist fehlt, entwickeln eine spontane erosive Arthritis [52]. Grundlegende Prinzipien der Zytokin-Interaktion in der Inflammation sind [44]:

- **Hierarchie:** In Studien mit Zellkulturen aus humanen arthritischen Gelenken wurde gezeigt, dass eine Inhibition von TNF auch andere pro-inflammatorische Zytokine blockiert, weshalb eine Dominanz von TNF angenommen wird [53].
- **Synergismus:** In experimenteller Arthritis konnte gezeigt werden, dass auf die Knorpeldegradation IL-17 per se synergistisch mit TNF wirkt und nicht auf TNF angewiesen ist [54]. Zudem kann IL-17 unabhängig von TNF zu einer Verschlechterung der experimentellen Arthritis führen [55] sowie die Abhängigkeit der Erkrankung von IL-1 aufheben [56].
- **Ambivalenz:** *Transforming Growth Factor* (TGF)- β vermittelt ambivalente (oder *pleiotrope*) Effekte. Ohne IL-6 induziert es in Zellkulturen anti-inflammatorische T_{reg}-Zellen, mit IL-6 jedoch pro-inflammatorische Th17 Zellen [57].
- **Dysbalance:** Auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-11 und IL1-Rezeptor-Antagonist sind in Kulturen aus synovialen RA-Zellen nachgewiesen, jedoch in ungenügender lokaler Konzentration [44; 58].

Von den zellulären Komponenten in der Subintima stellen T-Lymphozyten zwischen 30-50 % aller Zellen dar [41]. Davon sind die Mehrheit *Cluster of Differentiation* 4-positive (CD4+) Gedächtniszellen [59]. Durch T-Zell-Transfer kann im Tiermodell die Arthritis auf gesunde Tiere übertragen werden [59]. Oligoklonalität von in der Synovialis gefundenen T-Zellen sowie das Vorhandensein von Keimzentren im Gelenk sprechen für eine andauernde B-Zell/T-Zell Interaktion [5; 60].

Mindestens 4 Untergruppen von CD4+ T-Zellen sind an der Pathogenese der RA beteiligt. Dabei wurde klassischerweise ein *Shift* der Balance zwischen T-Helferzellen (Th)1- und Th2-Zellen als Motor der Arthritis und die RA als Th1-

vermittelte Erkrankung angesehen. Dieses Paradigma änderte sich zuletzt und die Wechselwirkungen zwischen T_{reg} und Th17-Zellen rückten mehr in den Fokus [45]. Der Th1 Phänotyp entwickelt sich unter dem Einfluss von IL-12 und IL-18 und produziert Interferon (IFN)- γ , IL-2 sowie pro-inflammatorische Zytokine (TNF u.a.) [61]. In etablierter humaner RA findet sich ein prädominanter Th1-Phänotyp [62; 63]. Paradoxerweise sind die Spiegel von IFN- γ in der humanen RA-Synovialis niedrig und die *in vivo* Funktion des Zytokins unklar [44]. Th17-Zellen entstehen unter dem Einfluss von TGF- β , IL-1 und IL-6 [64]. Sie exprimieren IL-17, IL-21 (autokrine Stimulation und Wirkung u.a. auf T- und B-Zellen), IL-22 und TNF [65]. Die Wirkungen von IL-17 in der Synovitis sind vielfältig [65]. Wichtig zu nennen ist die Induktion von Monozyten- und Neutrophileninfiltration, die Induktion von IL-6 und IL-8 in Fibroblasten sowie die Förderung der Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMP), IL-1 und TNF in Makrophagen [66]. IL-17 trägt entscheidend zur Knochen- und Knorpeldestruktion bei und kann synergistisch mit TNF- α wirken (z.B. auf DZ). Th17-Zellen sind sowohl pro-inflammatorisch als auch pro-autoimmun, da sie die Bildung von Keimzentren fördern [67].

Die komplexe Biologie von Th1 und Th17-Zellen ist Gegenstand intensiver Forschung und hochinteressant für die Entwicklung individueller Therapieansätze. In experimenteller muriner Arthritis führt eine Überexpression von IL-17 zu Gelenkentzündung, Knochenerosion und Knorpelverlust [56]. IL-17-Defizienz und der therapeutische Einsatz von IL-17-Antagonisten wirken suppressiv auf die Inflammation [68; 69]. Bei Depletion des IFN- γ -Rezeptor wird jedoch eine Verschlechterung der Arthritis beobachtet [70]. In der Literatur werden unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Relevanz der einzelnen T-Zell-Untergruppen für die frühe bzw. etablierte RA berichtet. Leipe *et al.* fanden eine gute Korrelation von Th17 und IL-17-Leveln mit der Krankheitsaktivität in früher und etablierter humaner RA [71]. Ein für mögliche individualisierte Therapieansätze immens wichtiger Aspekt ist die Plastizität von Th17-Zellen. Diese können sich in einen Th1 und einen gemischten Phänotyp Th1/Th17 umwandeln (jedoch nicht umgekehrt) und u.a. IFN- γ produzieren. Es wird vermutet, dass im Verlauf der Erkrankung eine Plastizität zu diesen Phänotypen eintritt [72]. Die Abhängigkeit

der Arthritis bzw. die Dominanz einer bestimmten T-Zell-Gruppe könnte sich also je nach Patient, Krankheitsstadium und Phänotyp der RA unterscheiden [66]. Ein ähnliches Muster wurde in experimenteller autoimmuner Uveitis bereits gezeigt [73]. Ein Wirkverlust von TNF-Inhibitoren könnte also durchaus durch vermehrte IL-17-Abhängigkeit der Arthritis erklärbar sein [66]. Daher fordern einige Autoren einen doppelten Therapieansatz [74]. In humaner RA konnten bereits erste Erfolge mit IL-17-Inhibitoren erzielt werden [75].

Regulatorische T-Zellen werden in der Peripherie von TGF- β stimuliert und unterdrücken eine überschießende T-Zell Antwort. Sie sind somit wichtige anti-inflammatorische Zellen [59]. Trotz vermehrter (und *in vitro* funktionsfähiger [76]) T_{reg} in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten [62] sind diese Regulationsmechanismen in der Inflammation beeinträchtigt. Von APZ ausgeschüttete Zytokine (z.B. TNF, IL-6) sowie eine dauerhafte Stimulation des T-Zell-Rezeptor bewirken eine Resistenz von aktivierten Effektor-T-Zellen und beeinträchtigen direkt die Funktion der T_{reg} [59]. In chronischen Entzündungen kann ein Teil der T_{reg} wiederum Plastizität unterliegen und sogar zu pro-inflammatorischen IL-17-produzierenden Zellen differenzieren bzw. die Differenzierung von Th17-Zellen fördern [59].

Circa 5 % der synovialen Zellen sind B-Lymphozyten. Sie sind unter anderem in ektopen Keimzentren im Gelenk organisiert [60], hier findet eine klonale Vermehrung und Antigen-spezifische Reifung statt [41]. Sie produzieren T-Zell abhängig ACPA [77] und sind auch in der Perpetuierung der Erkrankung wichtig. Dies zeigt sich durch den erfolgreichen therapeutischen Einsatz des CD-20 Antikörpers *Rituximab* [78]. Weitere wichtige Funktionen der B-Zelle bestehen in Zytokinproduktion und Antigenpräsentation [5], wobei die B-Zellen auch für die vollständige Aktivierung der T-Zelle notwendig sind [79].

Makrophagen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und wichtig in der akuten wie auch chronischen Inflammation [80]. Über sog. *Pattern-Recognition Rezeptoren* (PPR), z.B. den TLR, erkennen sie Antigene von eindringenden Pathogenen (*Pathogen-associated molecular Pattern* (PAMP)) oder endogene

Antigene (*Damage-associated molecular Pattern* (DAMP)) z.B. aus Zelltrümmern. Makrophagen phagozytieren das Fremdmaterial und präsentieren entsprechend prozessierte Antigene über MHC-2 anderen Immunzellen [80]. In humanem Gewebe sind vor allem TLR-2 und TLR-4 vermehrt aktiviert. Diese Rezeptoren erkennen endogene Liganden wie z.B. das Matrixprotein Tenascin-C, welches in humanen RA-Makrophagen über TLR-4 zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt [81]. Darüber hinaus tragen eine direkte T-Zell-Makrophagen-Interaktion, kontinuierlich gebildete IK sowie erst kürzlich entdeckte mikro-RNA (miRNA) zu einer kontinuierlichen Makrophagenaktivierung bei [5]. Der jeweils vorherrschende Makrophagen-Subtyp (pro-inflammatorische *M1*-Zellen oder anti-inflammatorische *M2*-Zellen) determiniert im Tiermodell den Übergang von akuter (*M2*-dominanter) zu chronischer (*M1*-dominanter) RA [82] (diese strenge dichotome Aufteilung wird jedoch, analog zu den T-Zellen, fortlaufend erweitert). Pro-inflammatorische Makrophagen produzieren Zytokine (u.a. TNF, IL-1 und IL-6), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie eine Reihe von proteolytischen Enzymen [83]. In einer Studie mit RA-Patienten korrelierte eine Reduktion der Makrophagenpopulation gut mit dem Therapieerfolg, unabhängig von der Art der Therapie [84].

Auch die residenten Synoviozyten sind während der Inflammation verändert und tragen zur Bildung des Pannus bei [42]. Die FLS werden einerseits von lokalen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-17 physiologischerweise stimuliert (*Passive Responders*, u.a. über die Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-Cells* (NF- κ B) [85]). Andererseits sind aber auch Mutationen im Genom der FLS gezeigt worden [41] (*Imprinted Aggressors*, u.a. im Apoptose-induzierenden p53-Gen [86]). Diese Mutationen sind entweder primär vorhanden (als genetische Suszeptibilität) oder sekundär das Resultat einer chronischen Exposition gegenüber pro-inflammatorischen Zytokinen. Diese können sogar epigenetische Veränderungen hervorrufen, wodurch die FLS experimentell auch ohne weiteren inflammatorischen Stimulus eine RA induzieren können (*imprinted*) [87]. In der Summe nehmen die FLS einen aggressiven, autonomen,

invasiven, semimalignen Phänotyp an [88], mit typischen Tumor-Eigenschaften wie reduzierter Kontaktinhibition, gesteigerter Migration und sogar Metastasierung im Sinne einer Ausbreitung der Erkrankung in bislang gesunde Gelenke [89]. Dies hat bedeutende Konsequenzen für die RA-Therapie, da allein immunsuppressive Therapien nicht an diese Mutationen in den FLS „heranreichen“ [88]. Der wichtigste pathogene Mechanismus von aktivierten FLS ist die Degradation von Knorpelgewebe. Cadherin-11 ist ein Adhäsionsmolekül, welches für die Integrität und strukturelle Anordnung von FLS wichtig ist. Cadherin-11-defiziente Mäuse sind geschützt vor Knorpelschaden, erleiden jedoch gleichartige Knochenerosionen wie Wildtyp-Tiere und zeigen eine chaotische Synovialstruktur [90]. Der Mechanismus der Knorpeldegradation ist ein gutes Beispiel für die oben beschriebenen Prinzipien der Interaktion von Zytokinen und Zellen: IL-1 und IL-17 wirken als Mediatoren synergistisch und unabhängig voneinander auf Chondrozyten und versetzen diese in einen katabolen oder gar apoptotischen Zustand mit Ausschüttung von knorpeldegradierenden Enzymen wie MMP [44]. IL-1 verursachte Tiermodelle der RA zeigen eine rapide Knorpeldegradation [91]. Außerdem wirken die Zytokine indirekt über die Aktivierung von FLS, welche, abhängig vom Signalweg der *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), ebenfalls MMP produzieren. Dabei herrscht eine Dysbalance zu knorpelprotektiven Faktoren wie den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPS) [88].

Im Fokus der Lebensqualität des Patienten steht zentral die Knochenerosion und -destruktion [92]. Interessanterweise findet sich ein klares anatomisches Verteilungsmuster für diese Veränderungen [93], z.B. am Ansatz von Sehnen [94]. Knochenerosionen treten bereits wenige Wochen nach Krankheitsbeginn auf und betreffen nach 6 Monaten 50 % der Patienten [95]. Die Schwere der Knochenzerstörung ist sowohl mit der Schwere der Synovitis als auch der intraossären Osteitis assoziiert. Selbst wenn eine erfolgreiche Anti-RA-Therapie eine klinisch apparente Synovitis supprimiert, können subklinische Inflammation und Osteitis weiterhin eine fortlaufende Knochenschädigung triggern. Im Gegensatz zur degenerativen Arthrose (aber auch der Psoriasisarthritis) kommt es dabei im Verlauf nicht zu reaktiven Knochenanbauten und Reparaturversuchen

[92]. Forschungen im Bereich der Osteoimmunologie stellen den Knochensubstanz-resorbierenden Osteoklasten und dessen Vorläufer ins Zentrum des pathophysiologischen Geschehens. Blutuntersuchungen bei RA-Patienten weisen darauf hin, dass TNF für die Migration von Osteoklasten-Vorläuferzellen in die Peripherie wichtig ist [96]. Die Funktion der knochenbauenden Osteoblasten wird dabei unterdrückt und die Balance zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau geht verloren [97]. Ein zentraler Mediator der Differenzierung der Osteoklasten ist *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), welcher von FLS und aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird [98]. Er mediiert die Differenzierung von Osteoklasten und deren Invasion ins Periost [99]. IL-1 verstärkt die Expression des entsprechenden Rezeptors (RANK) auf Osteoklasten [92]. Es finden sich auch anti-osteoklastogene Zytokine in der Synovialis (IFN- γ , IL-33 u.a.), die Balance ist jedoch zu Gunsten des Knochenabbaus verschoben [92]. ACPA erkennen citrulliniertes Vimentin auf Osteoklasten-Vorläuferzellen und verstärken deren autokrine TNF-Produktion, ein Beispiel für die direkte Pathogenität der Antikörper [16]. Abbildung 2 gibt eine schematische Übersicht über Zell- und Zytokininteraktionen in der chronischen Arthritis.

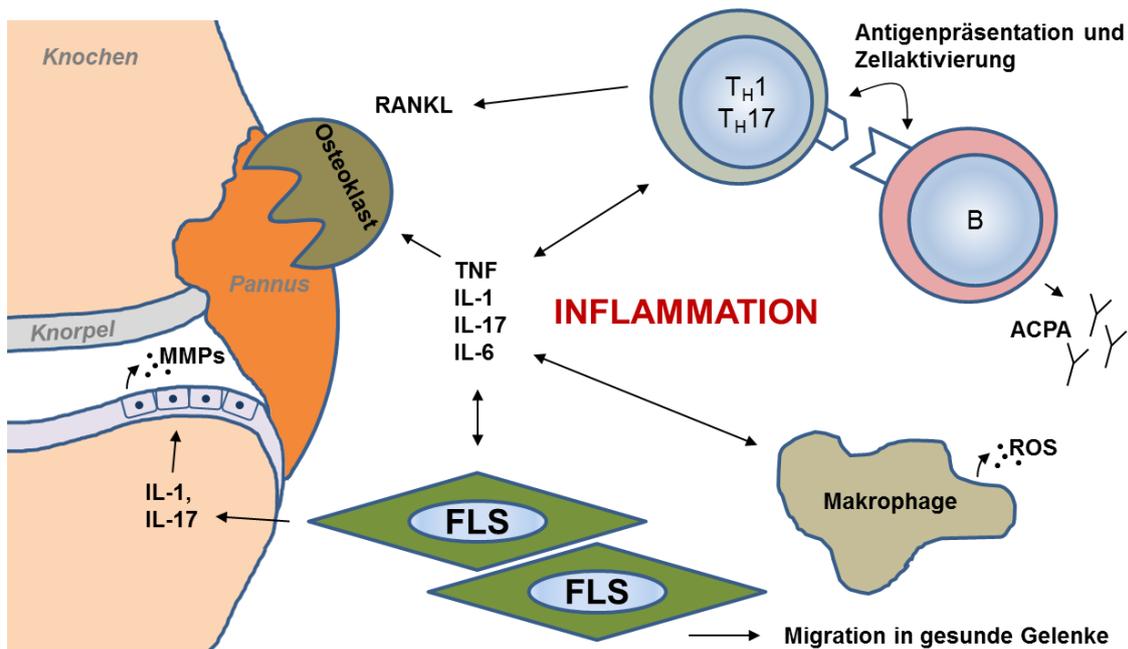


Abbildung 2: Ausgewählte pathophysiologische Mechanismen, welche zur irreversiblen Knorpel- und Knochendestruktion führen. Zudem kommt es durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine u.a. zur Aktivierung und Migration von Leukozyten, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, systemischen Entzündungseffekten und Supprimierung antiinflammatorischer Mechanismen. Pfeil = Aktivierung von Zellen oder Sekretion von Zytokinen.

1.1.2 Die Bedeutung von Hypoxie in der RA

Durch die Proliferation von Fibroblasten sowie die Infiltration von Entzündungszellen kommt es zu einer Hyperplasie der Synovialis (Pannus). Diese Gewebeexpansion, chronische Gefäßverschlüsse durch Fibrose und Thrombose sowie eine gesteigerte metabolische Aktivität der Entzündungszellen können zu einem relativen Mangel an Sauerstoff führen (Hypoxie) [100-102]. Hypoxie ist ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf. Die chronische Hypoxie ist dabei zu unterscheiden von akuten Veränderungen durch Gefäßverschlüsse. Hypoxie gilt als wichtiges Charakteristikum von inflammatorischen Prozessen wie Arteriosklerose, Diabetes mellitus und RA [103]. Sie ist seit Langem auch als Merkmal von Tumoren bekannt [104].

Schon 1970 wurde die arthritische Synovialis, verglichen mit arthrotischen oder traumatischen Läsionen, als hypoxisch charakterisiert [105]. Zwischenzeitlich haben direkte pO₂-Messungen mit hochsensitiven Mikroelektroden einen hypoxischen Sauerstoff-Partialdruck (pO₂) von 2-4 % in der RA im Vergleich zu 9-12

% bei nicht-RA Läsionen ergeben [106]. Es lässt sich eine klare Korrelation zwischen Hypoxie und dem Grad der synovialen Inflammation nachweisen [107]. Einer erfolgreichen RA-Therapie, z.B. durch TNF-Inhibition, folgt wiederum auch ein Anstieg des synovialen pO₂ [108].

Im Folgenden sollen die Wechselwirkungen von Hypoxie und Inflammation allgemein und speziell in der RA dargestellt werden. Aktuelle Übersichtsarbeiten zur Hypoxie in der RA stammen von Konisti *et al.* [101] sowie von Muz *et al.* [109]. Man geht davon aus, dass Hypoxie einen entscheidenden Anteil an der Perpetuierung von Inflammation, Angiogenese, zellulärer Infiltration sowie Gelenkdestruktion hat. Dies geschieht u.a. direkt über Zielgene des wichtigsten Vermittlers von Hypoxie in der Zelle, dem heterodimeren Transkriptionsfaktor *Hypoxia-inducible Factor* (HIF). HIF wird von Makrophagen aus arthritischen Gelenken deutlich vermehrt exprimiert, verglichen mit gesunden Gelenken oder arthrotischen Läsionen [110]. HIF besteht aus 2 Untereinheiten, dem O₂-sensitiven HIF- α und dem konstitutiv exprimierten HIF- β . Unter normalem Sauerstoffangebot wird HIF von den O₂-abhängigen Enzymen *HIF Prolyl-Hydroxylase Domain-containing Enzymes* (PHD) und *Factor inhibiting HIF* (FIH) hydroxyliert und abgebaut. Bei geringem pO₂ (ca. <6 %) kann HIF im Zytoplasma akkumulieren, translokiert in den Nukleus und aktiviert Transkriptionsfaktoren, sog. *Hypoxia-responsive Elements* (HRE). Die Isoform HIF-1 α scheint dabei zu dominieren und ubiquitär exprimiert zu sein, die Isoform HIF-2 α mehr gewebespezifisch vorzukommen [101; 111]. HIF-induzierte Gene regulieren u.a. den zellulären Energiemetabolismus (z.B. zur anaeroben Glykolyse) sowie die Neoangiogenese. Ziel ist die Optimierung der Homöostase von Zellen und Geweben unter sauerstoffarmen Bedingungen [112]. Dazu gehören Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Angiopoietin sowie das Transportprotein Glukose-Transporter 1 (GLUT1) [101]. Der pro-angiogene VEGF wird in der RA vermehrt induziert [113], die neu gebildeten Gefäße bleiben jedoch unreif, was das Paradox von fortwährender Hypoxie trotz Gefäßneubildung erklärt [114].

Ebenso verstärkt HIF pro-inflammatorische Mechanismen wie die Expression der schon erwähnten TLR in DZ [115]. HIF unterliegt außerdem über den

MAPK-Signalweg einer positiven Regulation mit dem pro-inflammatorischen IL-33 [116]. In T-Zellen kann HIF das Überleben sowie die Differenzierung der Zellen in einen Th17-Phänotyp fördern [117]. Die pathophysiologische Bedeutung von HIF in der RA ist evident. Cramer et. al zeigten im murinen RA-Modell mit HIF-1 α -defizienten Makrophagen weniger Gelenkschwellung und Aggregation von myeloiden Zellen [118]. HIF-2 α -defiziente Tiere sind ebenfalls geschützt vor experimenteller RA [119]. Neben den direkten Wirkungen über Zielgene des HIF wirkt Hypoxie auch durch oxidativen Schaden und die Bildung von ROS pro-inflammatorisch [101].

In FLS wurde gezeigt, dass einige pro-inflammatorische Enzyme wie MMP-3 exklusiv von HIF reguliert werden, andere wie MMP-1 und IL-8 zusätzlich von NF- κ B [120]. Auch die anti-apoptotischen Effekte von HIF-1 α in Neutrophilen sind abhängig von NF- κ B [121]. Dies weist auf die pathophysiologisch hoch relevante Wechselwirkung von Hypoxie und klassisch inflammatorischen Signalwegen wie NF- κ B und MAPK hin. Dieser *Cross-Talk* ist deshalb so wichtig, da die Vorgänge im inflammatorischen *Microenvironment* essentiell für das Verständnis der Inflammation sind und mögliche diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte bieten [122].

Der NF- κ B-Signalweg kontrolliert Mediatoren wie TNF, IL-6, IL-8, verschiedene Chemokine, pro-angiogene Faktoren (u.a. VEGF) und MMP. In der Arthritis wird NF- κ B einerseits von diesen Zytokinen, zellulären Stimuli und TLR-Liganden aktiviert [123]. Andererseits führt auch Hypoxie zur Aktivierung von NF- κ B und reguliert durch HIF-abhängige und HIF-unabhängige Mechanismen die chronisch persistierende Entzündung in der RA. Ziel dieses Synergismus ist wieder ein optimiertes Zellüberleben und Apoptoseinhibition in hypoxischen Regionen [124]. Die Depletion von HIF führt in myeloiden Zellen direkt zu einer Verminderung der NF- κ B-mRNA [121]. Mäuse mit Überexpression von HIF-1 α in Keratinozyten zeigen eine erhöhte NF- κ B-Aktivität und erhöhte Expression von NF- κ B-Zielgenen [125]. HIF-unabhängig wird NF- κ B über die oben genannten O₂-sensitiven PHD sowie FIH reguliert. In Normoxie hydroxylieren und deaktivieren PHD-1 und PHD-3 die *Inhibitor of NF- κ B-Kinase* (IKK), was über die Stabilisie-

rung von *Inhibitor of NF- κ B* (I κ B) dazu führt, dass die NF- κ B-Aktivierung gehemmt wird. In Hypoxie wird IKK dagegen enthemmt, I κ B phosphoryliert sowie degradiert und damit basales NF- κ B stabilisiert [126; 127].

Auch der HIF-Signalweg kann unter normoxischen Bedingungen von inflammatorischen Stimuli aktiviert werden. Dies erlaubt die Transkription von inflammatorischen Zytokinen schon bevor eine Hypoxie auftritt. Große Bedeutung wird dabei der Regulation von HIF-1 α durch NF- κ B-Stimuli zugeschrieben, etwa Lipopolysaccharid (LPS), TNF, ROS oder IL-18 [124]. LPS bindet z.B. an den oben schon erwähnten TLR-4. Dies aktiviert NF- κ B, welches durch direkte Bindung an den HIF-Promotor [128] eine erhöhte Transkription von HIF-mRNA vermittelt [129-131]. In humanen Monozyten ist eine hypoxische Umgebung alleine nicht suffizient um die Transkription von HIF-1 α -mRNA zu stimulieren [129]. Rius *et al.* zeigten *in vivo*, dass vielmehr eine basale NF- κ B-Aktivierung für die Regulation der Expression von HIF-mRNA sowohl in Normoxie als auch bei Hypoxie essentiell ist und dieser vorausgeht [132; 133]. In synovialen Fibroblasten wurde gezeigt, dass IL-1 β und TNF eine gesteigerte HIF-Expression auch durch den MAPK-Signalweg in Normoxie bewirken können [134]. Neueste Untersuchungen in T-Zellen lassen darauf schließen, dass für eine volle HIF-Proteinexpression sowohl die Stimulation der Transkription als auch Hypoxie notwendig ist [135]. Interessanterweise fanden Jantsch *et al.*, dass die Aktivierung des HIF-Signalweges in DZ durch normoxische TLR-Stimulation zu einem anderen Expressionsmuster der HIF-Zielgene führt als bei Aktivierung in Hypoxie [136].

Nizet *et al.* stellten ein sehr anschauliches Modell vor, wie der pathophysiologische Synergismus und die gegenseitige Abhängigkeit von HIF und NF- κ B in myeloiden Zellen zur perfekten Nutzung der Zellfunktionen und Ausbildung einer Inflammation im Detail funktionieren könnte [112]. Myeloide Zellen sind dabei unter hypoxischen Bedingungen vermehrt aktiviert (z.B. erhöhte Expression von TNF) und gehen effektiver gegen Pathogene vor [137]. Die optimale Nutzung der durch HIF vermittelten Mechanismen gelingt jedoch nur durch eine zusätzliche Steigerung der Aktivität des HIF-Signalweges durch NF- κ B. Hypoxie

scheint dabei auch die weitere Wanderung von Makrophagen zu unterbinden, was eine Akkumulation im entzündeten Gewebe erklären könnte [100].

Im Gegensatz zur bisher ausgeführten pro-inflammatorischen Bedeutung von HIF zeigt die pharmakologische Inhibition von PHD (und damit die Simulierung von Hypoxie) jedoch überraschenderweise in einigen Krankheitsmodellen einen anti-inflammatorischen Effekt. Neuere Untersuchungen ergaben, dass es stark vom Entzündungsstimulus sowie vom Zelltyp abhängig ist, ob von Hypoxie angestoßene Vorgänge insgesamt zu pro- oder anti-inflammatorischen Effekten führen. In Studien mit Zellkulturen wurde nur basale sowie TNF- α induzierte NF- κ B-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen vermehrt gefunden [126; 138; 139]. Stimuliert von LPS oder IL-1 β wird NF- κ B in Hypoxie gehemmt [122; 139]. In muriner hypoxischer Kolitis [140] wirkt sowohl HIF (führt zur Induktion von Muzinen sowie T_{reg} [141]) als auch NF- κ B (durch die Hemmung von IL-1-induziertem NF- κ B [122] sowie die Förderung von anti-apoptotischem basalem NF- κ B [142]) insgesamt anti-inflammatorisch und daher protektiv für die mukosale Barriere. HIF-Defizienz in epithelialen Zellen verschlechtert [143], PHD-Inhibition dagegen verbessert den Krankheitsverlauf der experimentellen Kolitis [144; 145]. Denkbar ist dabei auch eine gewisse Dynamik, wobei NF- κ B in akuten Entzündungen pro-, in chronischen Entzündungen anti-inflammatorisch wirken könnte [146]. Außerdem wirkt HIF in Tierexperimenten protektiv bei Myokardischämie, arteriellen Gefäßschäden und in normoxischen Lungenschäden [111; 147; 148]. In Tumoren stehen dagegen die durch HIF vermittelten Mechanismen der Immunresistenz sowie die Adaption von Tumorzellen an die hypoxische Umgebung im Vordergrund [149]. Hier könnte sich eine gegen HIF gerichtete Therapie positiv für den Krankheitsverlauf auswirken [150].

In der RA gibt es neben den erwähnten HIF-*Knock-out*-Studien erste Erfolge im Tiermodell durch die Inhibition der HIF-Translokation in den Nukleus [151]. Jedoch bedarf der beschriebene alternative Ansatz einer PHD-Inhibition und damit der Unterstützung einer Normalisierung des hypoxischen Gelenks durch bestimmte HIF-Gene weiterer Erforschung [101]. In gesundem humanem Knorpelgewebe wurde für HIF z.B. eine protektive Wirkung festgestellt [152].

1.2 Murine Modelle der experimentellen RA

Es existieren mehrere Formen der experimentellen RA im Maus- und Rattenmodell, die sich in der Art der Induktion der Autoimmunität, der Suszeptibilität von bestimmten Tierstämmen gegenüber dem Immunstimulus und den beteiligten Zellen und Mediatoren unterscheiden.

Das am häufigsten verwendete und beschriebene Modell der induzierten RA ist das *Collagen-induced Arthritis* (CIA)-Modell [153], welches schon 1980 für Mäuse entwickelt wurde. Durch die Immunisierung mit Rinder- oder Hühner-Kollagen-II kommt es innerhalb von ca. 3 Wochen zu einer von T- und B-Zellen abhängigen Immunreaktion gegen Kollagen-II, welches spezifisch auf Knorpeloberflächen vorkommt (vgl. Tabelle 1).

Neben der induzierten RA existieren auch Modelle der spontanen RA in genetisch veränderten Tieren [154]. Ein Beispiel ist das K/BxN-Modell der RA, welches 1996 beschrieben wurde [155; 156]. Mäuse mit transgenem T-Zell-Rezeptor für bovine RNase werden hierbei mit NOD-Mäusen gekreuzt, welche anfällig für Autoimmunerkrankungen sind. Die Tiere der F1-Generation entwickeln innerhalb von 3 Wochen eine symmetrische periphere Polyarthritits. Dabei kommt es zu einer von T- und B-Zellen abhängigen Autoimmunität mit Bildung von Autoantikörpern gegen das ubiquitär vorkommende Antigen Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI) [157]. Die Entwicklung der Arthritis ist dabei ausschließlich abhängig vom MHC-II-Allel I-A^{g7}, denn die autoreaktiven T-Zellen erkennen ein Fragment der GPI exklusiv in diesem MHC-Kontext [158]. Dieser Mechanismus hat entsprechend Ähnlichkeiten mit der Entwicklung der Autoimmunität in der humanen RA (vgl. 1.1.1). 2003 wurden Antikörper gegen GPI auch in humaner RA identifiziert [39], kürzlich auch gegen zyklisches citrulliniertes GPI [159]. Interessanterweise lässt sich in humaner RA eine Korrelation von vermehrten extraartikulären Manifestationen mit erhöhten Anti-GPI-Titern feststellen [160].

Die genannten Arthritismodelle beinhalten sowohl die Phase der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort (Antikörper-Produktion), als auch die darauf folgende sogenannte Effektorphase [161], sind dabei aber auf bestimmte susceptible Tierstämme angewiesen. Um die Rolle der beteiligten Mediatoren während

der einzelnen Phasen zu differenzieren, ist es möglich, antikörperhaltiges Serum aus K/BxN-Mäusen in eine Reihe von Mausstämmen passiv zu übertragen, das sog. *K/BxN Serum Transfer-induced Arthritis* (STIA) oder Anti-GPI-Modell [162]. Die injizierten Tiere entwickeln innerhalb weniger Tage mit großer Reproduzierbarkeit Anzeichen einer RA, v.a. an Pfoten und Sprunggelenken [158]. Eine Reihe von *Knock-out*-Studien zeigten die für dieses Modell wichtigen Zelltypen und Mediatoren (zusammengestellt in Referenz [162] und [154]). Die Ansammlung von Neutrophilen korreliert mit frühen Zeichen der Arthritis und ist unabdingbar für die Initiierung als auch die Aufrechterhaltung der Inflammation [163]. Ebenso scheinen Makrophagen essentiell für die Entwicklung der Arthritis zu sein [164]. Degranulierende Mastzellen können in der Synovialis bereits nach 1 Stunde nachgewiesen werden [165]. Jedoch scheint die Abhängigkeit des Modells von Mastzellen zwischen verschiedenen Mausstämmen zu variieren [161]. Weitere Studien zeigten die Bedeutung des alternativen Komplementweges und bestimmter Komplementfaktoren, des Membran-Angriffs Komplexes (MAK) sowie des Fc γ RIII-Rezeptors auf Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen in Anti-GPI-induzierter Arthritis [166].

Bereits 1 Tag nach Injektion der AK können leichte histologische Zeichen einer Inflammation sowie eine vermehrte Ansammlung proliferierender Zellen im Gelenk nachgewiesen werden [167]. Auf der Basis von Studien mit Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die eine rasche Lokalisierung von Anti-GPI-Immunglobulin (Ig)G in die distalen Gelenke zeigten [168], publizierten Wipke *et al.* 2004 ein bisher akzeptiertes Stufenmodell zur Entstehung der Anti-GPI-Arthritis [169]. Dabei führt die Bindung von Anti-GPI-AK an zirkulierendes Antigen zur Erkennung dieser löslichen Immunkomplexe durch den Fc γ RIII- Rezeptor auf Blut-Neutrophilen. Im Zusammenspiel mit perivaskulär lokalisierten Mastzellen kommt es zu einer massiven, wenn auch zunächst transienten Permeabilitätsstörung und AK können vermehrt direkt die Gelenkhöhlen erreichen. Anti-GPI-AK, die ihr Antigen auf der Knorpeloberfläche binden, setzen den alternativen Komplementweg in Gang, was zur Produktion von Komplementfaktor C5a führt. C5a aktiviert dann eine Reihe von Entzündungszellen wie Neutrophile, Mastzellen, Makrophagen sowie Endothelzellen und stimuliert die Produktion

von pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF und IL-1. Die Autoren geben hierfür einen Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden nach AK-Injektion an [163]. Diese Vorgänge sind reversibel und die Arthritis bleibt transient wenn keine weiteren Injektionen der AK erfolgen. Interessant ist die Frage, wie ein ubiquitäres Antigen wie GPI (Vorkommen im Zytoplasma aller Zellen, in der Blutbahn und auf Knorpeloberflächen) zu einer gelenkbetonten Erkrankung führt [170]. Gründe hierfür sind spezifische Charakteristika der Blutgefäße im Gelenk (z.B. vermehrte Expression vasoaktiver Amin-Rezeptoren [36]) und ein Fehlen von Inhibitoren des alternativen Komplementweges in der Gelenkhöhle [170]. Mit dem Anti-GPI-Modell der RA lässt sich also gezielt die Effektorphase der Inflammation untersuchen [171]. Entsprechend kann es auch in T- und B-Zell-defizienten *Recombination-activating Gene 1 (RAG-1)–Knock-out*-Mausstämmen ausgelöst werden, wobei T-Zellen dann im Verlauf der Arthritis eine Rolle spielen [154; 172]. So können IL-17-produzierende T-Zellen die Arthritis im Tierexperiment verstärken [173].

Interessant ist die unterschiedliche Abhängigkeit des Modells von wichtigen pro-inflammatorischen Zytokinen. IL-1 ist absolut essentiell zur Arthritisentwicklung im Anti-GPI-Modell. Die Abhängigkeit von TNF ist jedoch sehr variabel und hängt möglicherweise mit Umweltfaktoren zusammen. Ji *et al.* sehen hier eine Parallele zu Anti-TNF-Therapie resistenten Patientenkollektiven [174]. Eine IL-6-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Arthritisentwicklung in muriner RA [162], IL-17 zeigt pro-inflammatorische Effekte [175], ist jedoch nicht obligat. Die Wahl des Mausstranges spielt ebenfalls eine Rolle in der Krankheitsentstehung. So entwickeln Mäuse mit BALB/c-Hintergrund früher (nach 1 Tag) und stärker eine Anti-GPI-Arthritis als C57BL/6-Tiere (nach circa 3 Tagen) [176]. Tabelle 1 gibt in Anlehnung an Referenz [177] einen Vergleich des CIA und Anti-GPI Modells anhand ausgewählter Charakteristika.

Tabelle 1: Vergleich des CIA und Anti-GPI Modells (Auswahl), adaptiert nach Christensen *et al.*, 2016 [177] (Keine formale Genehmigung des Verlags zur Veröffentlichung notwendig (Stand 3/2018)).

Arthritismodell	CIA	Anti-GPI/STIA
Antigen	Kollagen II	Glukose-6-Phosphat Isomerase
Kinetik	Entwicklung innerhalb von ca. 3 Wochen	Entwicklung innerhalb von 1-3 Tagen
Beteiligte Zelltypen	Monozyten, Granulozyten, T- Zellen, B-Zellen	Monozyten, Granulozyten, T-Zellen (nicht in Induktionsphase)
Beteiligte Zytokine	TNF, IL-1, IL-17, IL-6	IL-1, IL-17, TNF (variabel)

1.3 Bildgebende Verfahren in der Diagnostik der RA

Bildgebende Verfahren werden zur Erforschung, Stratifizierung, Aktivitätsbeurteilung und im Therapiemonitoring der RA eingesetzt. Die in der Klinik regelhaft zur Verfügung stehenden Methoden sind die klassische konventionelle Radiographie, die Sonographie, die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie nuklearmedizinische Methoden wie die Szintigraphie. Die Diagnose der RA wird häufig durch eine Kombination aus klinischen und Bildgebungs-Parametern gestellt. Die vom *American College of Rheumatology* (ACR) 2010 neu entwickelten Klassifikationskriterien basieren auf dem gesicherten Vorhandensein einer Synovitis, dem Ausschluss einer alternativen Diagnose und dem Erreichen eines gewissen *Score*. Sie sind nicht als Diagnosekriterien entwickelt worden [178]. Die Sensitivität und Spezifität dieser Kriterien hängt stark vom Endpunkt der Studien ab, z.B. Beginn der Therapie mit *Disease-modifying antirheumatic Drugs* (DMARD) oder dem Nachweis von Erosionen. Generell werden die Kriterien als sehr sensitiv (ca. 80 % bei Endpunkt „Beginn von DMARD-Therapie“) angesehen. Immer noch wird ein Teil

der frühen undifferenzierten Arthritiden (UA), welche dann zur RA fortschreiten, nicht erkannt. Aufgrund des Einschluss von serologischen Parametern (Vorhandensein von ACPA oder RF) in die Kriterien ist die Sensitivität besonders schlecht bei sogenannten „seronegativen“ Patienten (nur ca. 16 %) [179]. Hauptkritikpunkt der aktuellen ACR 2010-Kriterien ist die Spezifität, welche in Studien, je nach Endpunkt, deutlich unter der Sensitivität liegt. Dies kann zu einer Übertherapie führen, die vor allem bei teuren und nebenwirkungsreichen Biologika wie TNF-Blockern bedeutsam ist. Wichtig wäre es, die Spezifität weiter zu verbessern und die Kriterien für UA-Patienten mit Risiko für einen erosiven Verlauf (auch wenn sie nicht formal die ACR-Kriterien erfüllen) zu verfeinern, da auch diese Patienten von einer möglichst frühzeitigen Therapie profitieren. Die vorhandenen Kriterien können also bisher zur Diagnose nur in Zusammenspiel mit einer ausführlichen Differentialdiagnostik sowie dem Miteinbeziehen zusätzlicher prognostischer Faktoren genutzt werden [179].

Hieraus wird deutlich, dass Bildgebung, obwohl kein eigenständiger Teil der ACR-Kriterien, einen entscheidenden Beitrag leisten kann. 2013 wurden daher erstmals von der *European League against Rheumatism* (EULAR) Empfehlungen zum Nutzen von bildgebenden Verfahren auf Basis der aktuellen klinischen Evidenzlage vorgestellt [180]. Zusammenfassend stellen bisher vor allem Magnetresonanztomographie (MRT) und Sonographie Methoden dar, welche in folgenden Punkten wertvoll und der klinischen Untersuchung überlegen sind bzw. diese ergänzen:

- Sensitive Detektion von Gelenkinflammation (auch in vorliegender klinischer Remission) sowie Gelenkzerstörung, damit verbesserte und frühere Diagnose
- Voraussicht einer Progression von einer UA zu einer RA und Prognose eines erosiven Krankheitsverlaufs
- (Subklinische) Veränderungen bei Therapiegabe (Therapiemonitoring)

Die Autoren geben jedoch ebenfalls an, dass in Zukunft der Fokus noch stärker auf die Erkennung subklinischer Vorgänge gelegt werden muss [180]. Damit wird die Bedeutung von molekularer Bildgebung in der RA deutlich. Molekulare

Prozesse und Veränderungen sind enorm wichtig für die Individualisierung der Therapie (Therapie-Stratifizierung) sowie die kurzfristige Beurteilung eines Therapieansprechens, da die zugrunde liegenden Immunprozesse (wie unter 1.1.1 ausgeführt) zwischen einzelnen Individuen erheblich differieren können [181]. Weiterhin kann molekulare Bildgebung in der Erforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze eine Rolle spielen [182].

1.4 Die Positronen-Emissions-Tomographie in der RA

1.4.1 Technische Aspekte der Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Verfahren, welches funktionelle Informationen von molekularen Zuständen und Prozessen im Körper liefert, im Gegensatz zu morphologischen Informationen einer CT oder MRT. Dabei ermöglicht die PET die zeitliche und räumliche Zuordnung von Stoffwechselprozessen oder –zuständen sowie die Visualisierung und Quantifizierung der Verteilung von Rezeptoren im Gewebe. Die PET ermittelt die Information aus der Verteilung von sog. Tracern im Körper. Ein Tracer ist ein radioaktiv markiertes Molekül, welches in spezifische Stoffwechselforgänge oder Zellzustände eingebunden wird oder als Rezeptorligand fungiert, ohne die biologischen Prozesse zu verändern. Grundlagen dieses Einsatzes radioaktiver Verbindungen als Tracer wurden schon 1923 von De Hevesy entwickelt [183]. Der Positronen-Emissions-Tomograph erstellt eine Abbildung der Verteilung der Radioaktivität und gibt somit nicht-invasiv Einblick in molekulare Vorgänge im Körper. Mit *in vivo* Bildgebungsverfahren wie der PET sind longitudinale Studien durch die repetitive Messung des immer gleichen Tieres oder Patienten möglich, was die Beobachtung individueller Entwicklungen z.B. einer Erkrankung in einem Organismus ermöglicht und im präklinischen Setting unter anderem den Vorteil von stark reduzierten Versuchstierzahlen bietet [184].

In der PET werden als Tracer radioaktive Nuklide verwendet, die einen Positronen (β^+)-Zerfall durchlaufen. Dabei wird ein Proton in ein Neutron umgewandelt, wobei vom Kern ein Positron sowie ein Neutrino emittiert werden. Nach einer Wanderung von Energie- bzw. Isotopabhängig wenigen Zehntel-

Millimetern bis Millimetern (sog. *Positron Range*) hat das Positron fast seine gesamte kinetische Energie verloren und es kommt zu einer Annihilationsreaktion mit einem Elektron. Die hierbei freigesetzte Energie wird in Form von 2 Photonen mit jeweils 511 Kiloelektronenvolt (keV) in die entgegengesetzte Richtung in einem Winkel von 180° abgegeben. Einige dieser Photonenpaare verbleiben innerhalb des PET-Detektorrings, der aus einer bestimmten Anzahl von Detektorblöcken besteht (Abbildung 3). Die beiden zur gleichen Zeit von einem Photon getroffenen Detektoren zeichnen eine Koinzidenz auf, was die räumliche Zuordnung der Photon-Emission auf einer *Line of Response* (LOR) zwischen den Detektoren erlaubt. Durch geeignete Szintillatorkristalle werden die 511 keV Photonen gestoppt und in sichtbares Licht umgewandelt, was wiederum durch einen *Photomultiplier* in ein analoges elektrisches Signal umgewandelt und verstärkt wird. Reihen von Koinzidenzen parallel angeordneter LOR über einen gewissen Zeitraum werden in ein sog. Sinogramm histogrammiert und über die gesamten 360° des Detektorrings aufgetragen. Geeignete Rekonstruktionsalgorithmen (s.u.) generieren hieraus ein 3D-Bild.

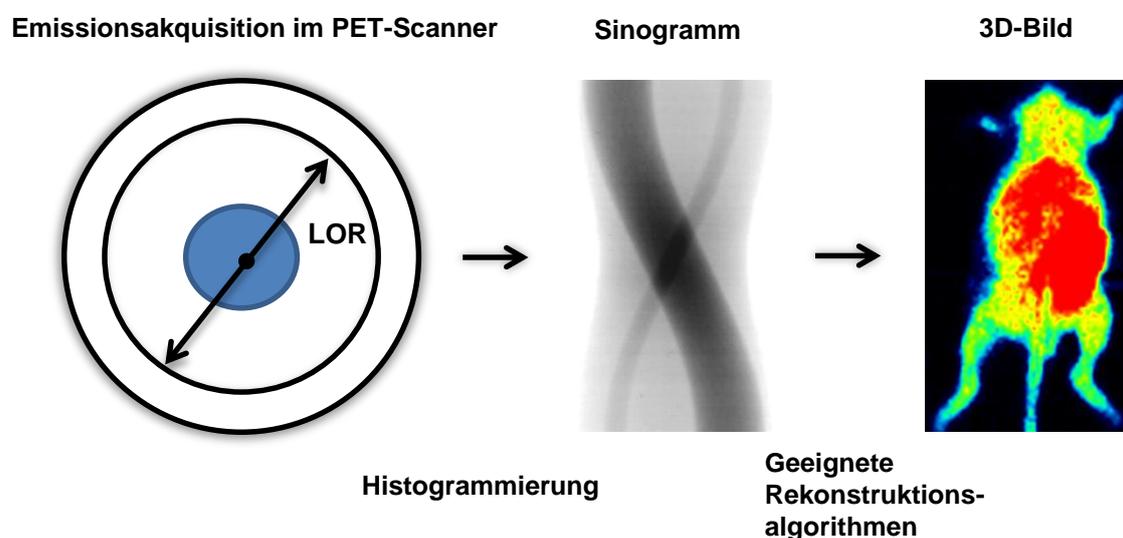


Abbildung 3: Datenakquisition in der PET. Adaptiert nach Fahey *et al.*, 2002 [185], Veröffentlichung mit Genehmigung des Verlags, © Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc..

Verschiedene technische und physikalische Effekte können zu einem Rauschen (*Noise*) im späteren Bild beitragen und verschlechtern das *Signal-to-Noise* Verhältnis [186; 187]. Beispielsweise führen Compton-Interaktionen zu einer Erhö-

hung des Hintergrunds durch Streuung und außerdem zu einem Verlust von Counts auf der richtigen LOR (Schwächung). Zufällige Koinzidenzen (zunehmend bei höherer injizierter Tracerdosis) und multiple Events (z.B. durch 2 gleichzeitig detektierte Annihilationsprozesse) tragen ebenfalls zu einem schlechteren *Signal-to-Noise* Verhältnis bei. Hinzu kommen physikalische Eigenschaften des Detektors (z.B. Detektionseffizienz und statistische Fluktuationen des Szintillators). Es müssen entsprechend geeignete Korrekturen durchgeführt werden, u.a. die Schwächungskorrektur durch einen Transmissions-scan z.B. mittels einer Kobalt-Quelle [188], eine Streuungskorrektur sowie eine Normalisierung zum Ausgleich der Detektoreffizienz.

Die räumliche Auflösung des Scanners wird als *Blurring* (Unschärfe) einer Punktquelle gemessen (*Point Spread Function* (PSF)) und als *Full Width at half Maximum* (FWHM) dieser Funktion angegeben. Die Auflösung wird dabei u.a. von der Lokalisation der Punktquelle im *Field of View* (FOV) des Scanners bestimmt [189]. Außerdem ist sie abhängig von physikalischen Faktoren (z.B. *Positron Range* und nicht linear emittierte Annihilationsphotonen), technischen Faktoren (Größe und Breite der Detektoren) sowie dem Rekonstruktionsalgorithmus [187; 190; 191]. Generell wird die beste räumliche Auflösung in der Mitte des FOV erreicht, da an den Seiten des Scanners zusätzliche Effekte (z.B. *Depth of Interaction*) hinzukommen und die PSF breiter wird.

Essentiell ist bei der Auswertung von präklinischen PET-Daten zu beachten, dass es ab einer Objektgröße von kleiner als 3x der FWHM zum sog. Partialvolumeneffekt (PVE) kommt. Der PVE beschreibt 2 Phänomene, welche die wahre Menge an Radioaktivität in der beobachteten Struktur verfälschen und so besonders im präklinischen Setting zu Quantifizierungs- und Vergleichbarkeitsproblemen führen können [192]. Das eine Phänomen führt zu Unschärfe und scheinbarer Vergrößerung kleiner aktivitätsreicher Strukturen, da es zu einem *Spill-out* von Aktivität aus Bereichen höherer Aktivität in Bereiche niedrigerer Aktivität kommt. Dabei wird die eigentliche Aktivität in der Struktur unterschätzt (umgekehrt als *Spill-in* bezeichnet). Der Effekt des PVE nimmt zu, je kleiner die beobachtete Struktur ist. Das zweite Phänomen ist der sog. *Tissue Fraction Effect*. Besteht das Signal in einem Bildvoxel aus unterschiedlichen Aktivitätsni-

veaus (z.B. durch unterschiedliche anatomische Strukturen), wird die resultierende Aktivität gemittelt (Abbildung 4). Dies führt ebenfalls zu *Spill-out* und Verfälschung der dargestellten Strukturen.

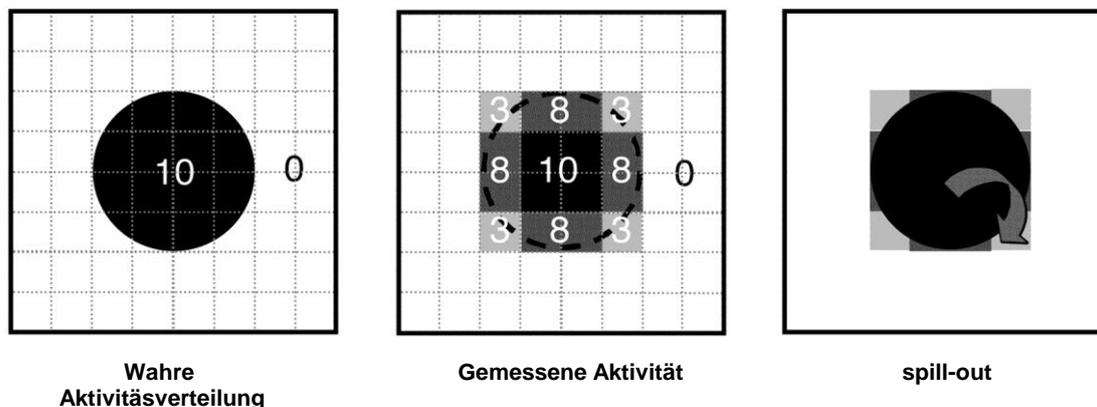


Abbildung 4: *Tissue Fraction Effect*. Adaptiert nach Soret *et al.*, 2007 [192], Veröffentlichung mit Genehmigung des Verlags, © Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc..

Eine Korrektur für den PVE kann z.B. über die Koregistrierung der PET-Bilder mit Strukturaufnahmen (z.B. CT/MRT) erfolgen [193]. Außerdem kann durch *ex vivo*-Aktivitätsmessungen mittels eines γ -Counters der Einfluss des PVE abgeschätzt werden.

Ein wesentlicher Punkt der Datenakquisition bei der PET ist der Unterschied zwischen einem 2D- und einem 3D-Akquisitionsverfahren [185; 187]. Im (zuerst entwickelten) 2D-Verfahren werden nur bestimmte LOR, also bestimmte Detektorpaare, zur Rekonstruktion einer Bildebene zugelassen. In einer strikten 2D-Aufnahme sind dies nur die im jeweiligen Detektorring erfassten Koinzidenzen, was früher mechanisch durch das Einbringen von Blei-Septen erfolgte. Eine 3D-Aufnahme bedeutet grundsätzlich, dass die PET-Daten nicht als parallele Datensätze organisiert und keine Septen vorhanden sind. Jeder Detektor kann mit jedem Detektor koinzidieren und man erhält eine erhöhte Sensitivität der Messung von echten Koinzidenzen. Gleichzeitig werden jedoch auch falsche Koinzidenzen (z.B. gestreute Events) vermehrt detektiert, was geeignete Korrekturverfahren notwendig macht. Die Sensitivitätserhöhung im Vergleich zu 2D-Verfahren ist dabei nicht homogen sondern fällt zu den Grenzen des FOV hin stark ab. Wie oben beschrieben hängt auch die räumliche Auflösung vom Re-

konstruktionsalgorithmus ab, wobei ein 3D-Algorithmus hier in gewissen Grenzen mathematisch zulässt, die Auflösung individuell über das FOV zu bestimmen. Der in dieser Arbeit verwendete PET-Scanner akquiriert grundsätzlich im 3D-Modus. Durch ein nachträgliches *Fourier Rebinning* (FORE), können die obliquen Sinogramme einer 3D-Aufnahme in parallele transversale 2D-Datensätze transformiert und mit entsprechenden 2D-Algorithmen rekonstruiert werden. Dies bedeutet zwar einen Verlust der Sensitivität, hat aber den Vorteil einer massiv verkürzten Berechnungszeit.

Zusammengefasst werden durch Anwendung geeigneter Korrekturen (wie z.B. Schwächungskorrektur, Normalisierung) und unter Berücksichtigung von PVE sowie der Wahl eines geeigneten Akquisitions- und Rekonstruktionsalgorithmus eine quantitative Analyse der Distribution des Radiotracers im Gewebe möglich.

1.4.2 Aktueller Stellenwert der PET-Bildgebung in der RA

Aktuell gibt es mehrere Ansätze, Entzündungsvorgänge in der RA molekular mittels PET darzustellen. Am besten untersucht ist hierbei die Visualisierung eines erhöhten Zellmetabolismus bei einer Entzündungsreaktion mit dem Tracer [¹⁸F]Fluordesoxyglucose (FDG). [¹⁸F]FDG ist ein Glukoseanalogon, das in aktiv metabolisierenden Zellen akkumuliert und somit die gesamtmetabolische Aktivität in der Synovitis abbildet [194]. Sowohl präklinisch in einer Reihe von Mausmodellen [195] als auch in klinischen Studien wurde die erhöhte Akkumulation von [¹⁸F]FDG im arthritischen Gelenk gezeigt und mit MRT-Untersuchungen korreliert [196]. Studien wiesen außerdem eine positive Korrelation von [¹⁸F]FDG-PET mit anderen Entzündungsmarkern wie CRP und dem MMP-3-Level im entzündeten Gelenk nach [197]. [¹⁸F]FDG-PET kann die Beteiligung asymptomatischer Gelenke, inklusive auch der sog. Hochrisiko-Läsionen im Atlantookzipital-Gelenk sensitiv darstellen [198]. In Verbindung mit der morphologischen Information des CT ist die [¹⁸F]FDG-PET/CT in bestimmten anatomischen Gebieten (z.B. Lumbalwirbelsäule) der MRT überlegen [194]. Neueste Studien fanden zudem eine gute Korrelation der [¹⁸F]FDG-PET mit dem Therapieansprechen bei verschiedenen Biologika [199; 200]. Elzinga *et al.* zeigten, dass die PET-Ergebnisse 2 Wochen nach Anti-TNF-Therapie (*Infliximab*) mit

der klinischen Aktivität 22 Wochen nach Therapiebeginn korrelieren [201]. Auch der Einsatz von kombiniertem [^{18}F]FDG-PET und MR wurde bereits erfolgreich in der RA evaluiert [202].

Andere PET-Tracer, die bisher in der RA eingesetzt wurden, konnten ebenfalls erfolgreich eine subklinische Arthritisaktivität detektieren. Der Makrophagen-Tracer [^{11}C]PK11195 ist dabei dem MRT in der Prädiktion von Arthritisexazerbationen sogar leicht überlegen. Gent *et al* [203]. Kneilling *et al.* zeigten, dass auch die Dynamik früher Mechanismen der RA mittels nicht-invasiver PET-Bildgebung erforscht werden können. Die vor allem durch Hypoxie vermittelte Angiogenese stand im Fokus der Studie. Mit dem Radiotracer [^{18}F]Galacto-RGD konnte die $\alpha\beta 3$ -Integrin-Aktivierung als frühes Zeichen der Angiogenese in experimenteller RA nachgewiesen werden [204; 205].

1.4.3 Möglichkeiten der PET-Bildgebung zur Detektion von Hypoxie im Allgemeinen und in der RA

Die Visualisierung von hypoxischem Gewebe hat heutzutage vor allem in der Onkologie eine große Bedeutung erlangt, da die Hypoxie als ein Charakteristikum von Tumoren gilt und das Vorhandensein hypoxischer Areale in Tumoren mit einem aggressiveren Tumorphänotyp, einer schlechteren Prognose und Resistenz gegenüber Radiotherapien einhergeht [206]. Die nicht-invasive Visualisierung hypoxischer Areale hat daher vor allem in der Stratifizierung von Patienten und der Radiotherapieplanung eine wichtige Funktion [207]. Zwei unterschiedliche Tracergruppen haben sich in Forschung und Klinik durchgesetzt, die Fluor-18 (^{18}F) markierten Nitroimidazole und die Kupfer-64 (^{64}Cu) markierten Diacetyl-bis-N-Methylthiosemicarbazon (^{64}Cu -ATSM)-Analoge [207].

Nitroimidazol-Verbindungen wurden schon in den 50er Jahren als antibiotisch wirksam in anaeroben Bakterien gefunden [208]. Seit Chapman *et al.* Anfang der 80er-Jahre die ersten Autoradiographie-Studien mit [^{11}C]Misonidazol durchführten [209] wurden eine Vielzahl von Verbindungen entwickelt [207]. Ihnen gemeinsam ist der Mechanismus der Retention in hypoxischen Bereichen. Nitroimidazole diffundieren (in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie) durch Zellmemb-

ranen und werden dort von intrazellulären Nitroreduktasen einer Einzelelektronen-Reduktion unterzogen. Diese hat als Produkt ein freies anionisches Radikal. Bei ausreichendem O₂-Angebot in der Zelle wird die Reaktion aufgrund der höheren Affinität von Elektronen zu O₂ rückgängig gemacht und das Nitroimidazol diffundiert aus der Zelle. Bei Sauerstoffmangel erfolgen jedoch subsequeunte Reduktionsreaktionen und die Bindung des Nitroimidazols über Thiolgruppen an zelluläre Makromoleküle [210; 211]. Diese Bindung findet zum überwiegenden Teil intrazellulär statt [212] und kann aufgrund der notwendigen Reduktaseaktivität auch nur in vitalen Zellen erfolgen. Man geht üblicherweise von einem O₂-Partialdruck unter 10 mmHg zur ausreichenden Bindung der Nitroimidazole aus [213]. Das Redoxpotential des Nitroimidazols muss dafür unter dem des Sauerstoffs liegen, darf jedoch auch nicht zu gering sein, um eine Hypoxie-spezifische Bindung zu gewährleisten [214]. Theoretisch kommen jedoch auch Reaktionen z.B. mit Zweielektronen-Reduktasen (z.B. Diaphorase) vor, welche die Sauerstoffabhängigkeit der Bindung umgehen und so zu einer unspezifischen Bindung führen können [211]. Die Bindung der Nitroimidazole an die zellulären Makromoleküle wird grundsätzlich als sehr stabil angesehen, es gibt jedoch für bestimmte Tracer auch Studien, die eine teilweise Reversibilität nicht ausschließen [215; 216].

Die bisher am besten untersuchte Nitroimidazolverbindung ist [¹⁸F]Fluormisonidazol ([¹⁸F]FMISO) (Abbildung 5A). Die Bindung von [¹⁸F]FMISO in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe wurde in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen belegt [217]. [¹⁸F]FMISO hat einen Oktanol/Wasser-Partitionskoeffizienten (*p*) von 0,41, diffundiert somit frei durch das Gewebe, kann die Zellmembranen penetrieren und equilibriert nach ausreichender Zeit in normoxischem Gewebe mit dem Volumen des totalen Körperwassers (TBW) [218]. Die initiale Verteilung von [¹⁸F]FMISO ist abhängig von der Perfusion der Gewebe, nach einer bestimmten Zeit ist die Verteilung jedoch von einer selektiven Retention in hypoxischen Bereichen bestimmt [213]. Normoxisches Gewebe equilibriert mit dem Plasma und hat daher im Idealfall einen Blut/Gewebe-Quotient von 1 [219]. Aufgrund des rein diffusiven Transports und den in hypoxischen Geweben weiten Distanzen zwischen Blutgefä-

ßen [220], stellt sich dieses Gleichgewicht, je nach Studie oder Autoren, zwischen einer Stunde [221] und zwei Stunden [222] nach Tracerinjektion ein. Aufgrund des relativ hohen Partitionskoeffizienten ist die endgültige [^{18}F]FMISO-Anreicherung nicht durch Perfusion limitiert [213]. Dies bestätigt sich durch die Aufnahme des Tracers in intraluminalen anaeroben Bakterien im Darm [223]. Die Nitroimidazole, inklusive [^{18}F]FMISO, werden größtenteils im Urin ausgeschieden. Es kommt jedoch bei [^{18}F]FMISO aufgrund der relativen Lipophilie zum Metabolismus in der Leber und somit zu einer erhöhten hepatischen Traceraufnahme. Mehrere Studien wiesen markierte Metaboliten von [^{18}F]FMISO in Plasma und Urin nach, was unter Umständen die Spezifität der Tracerbindung beeinträchtigen kann [224; 225]. Andere Autoren gehen jedoch von keiner für die Bildgebung bedeutsamen Menge an Metaboliten aus [223; 226]. Wichtig für die Spezifität ist die Stabilität der ^{18}F -Bindung, was für [^{18}F]FMISO gezeigt wurde [227].

Eine aktuelle Übersicht über bislang durchgeführte klinische Studien unter Verwendung von [^{18}F]FMISO gibt Referenz [207]. In einer Studie mit Kopf-Hals-Tumoren war die [^{18}F]FMISO-PET prädiktiver für das Patientenüberleben als die [^{18}F]FDG-PET [228]. In diesen Tumoren lässt sich auch eine gute Korrelation von [^{18}F]FMISO-PET mit invasiven pO_2 -Messungen nachweisen [229]. Mehrere Studien zeigten außerdem eine gute Korrelation der Verteilung von [^{18}F]FMISO im Gewebe mit immunhistochemischen Methoden wie dem Nitroimidazol Pimonidazol, welches aufgrund seines identischen Bindungsmechanismus häufig zur *ex vivo* Bestätigung von *in vivo* [^{18}F]FMISO-PET-Messungen verwendet wird [230; 231]. In humanen Gliomen konnte auch eine Korrelation der [^{18}F]FMISO-Aufnahme mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie des HIF-Zielgens VEGF-Rezeptor-1 bestätigt werden [232]. Interessanterweise scheint die Stärke dieser Korrelationen jedoch vom Tumortyp abhängig zu sein. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen [^{18}F]FMISO-Aufnahme und pO_2 -Messungen in humanen Weichteilsarkomen [233] sowie zwischen [^{18}F]FMISO-Aufnahme und Surrogatmarkern für Hypoxie (z.B. GLUT1) in Patienten mit Lungenkarzinom [234]. Für humane Zervixkarzinome ist zudem keine Korrelation von Pimonidazol und pO_2 -Messungen nachgewiesen [235].

Zusammengefasst muss die Hypoxie-Bildgebung in jeder Krankheitsentität, inklusive der RA, separat validiert werden und von manchen Autoren wird der Einsatz von [^{18}F]FMISO als „universeller“ Hypoxie-Tracer angezweifelt [222]. In der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie in Tübingen wurde bereits gezeigt, dass im murinen passiven K/BxN-Modell (Anti-GPI) eine direkte Quantifizierung von Hypoxie mittels [^{18}F]FMISO in etablierter RA möglich ist [236]. Es wurde dabei eine gute Korrelation der *in vivo* PET-Messungen mit *ex vivo* Biodistributions- und Autoradiographie-Analysen gezeigt.

Kritik am [^{18}F]FMISO-PET kam bisher vor allem aufgrund des geringen Kontrasts zwischen hypoxischem und normoxischem Gewebe auf. Dafür wurde der relativ hohe Partitionskoeffizient des Tracers und infolge dessen die langsame Auswaschung von [^{18}F]FMISO aus normoxischem Gewebe verantwortlich gemacht. Der am häufigsten verfolgte Ansatz zur Verbesserung des Kontrasts ist bisher die Entwicklung hydrophilerer Verbindungen wie z.B. [^{18}F]Fluorazomycin-Arabinosid ([^{18}F]FAZA) [223], in welchem die Nitroimidazol-Verbindung mit Arabinose in α -Konfiguration verbunden ist (Abbildung 5B). [^{18}F]FAZA weist einen Partitionskoeffizienten von 0,27 auf und wird deutlich schneller über die Niere ausgeschieden als [^{18}F]FMISO. [^{18}F]FAZA wurde bereits erfolgreich in klinischen Studien mit Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt [237]. Obwohl nur wenige Studien beide Tracer in demselben Modell vergleichen, zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse für [^{18}F]FAZA bezüglich des Tumor/Muskel Kontrasts. Sowohl ein im Vergleich zu [^{18}F]FMISO verbesserter [238; 239], als auch ein schlechterer Tumor/Muskel Kontrast wurde gezeigt [240]. Im murinen Arthritismodell war der Kontrast zwischen entzündetem Gelenk und gesundem Kontrollgelenk mit [^{18}F]FMISO und [^{18}F]FAZA in etwa gleich gut [236].

[^{18}F]FMISO und [^{18}F]FAZA gelangen beide durch passive Diffusion in das Gewebe. Daher gab es Bestrebungen zur Entwicklung von Nitroimidazoltracern, die aktive Transportmechanismen nutzen könnten, um somit die Gewebeaufnahme und den Kontrast zu erhöhen. [^{18}F]FAZA ist zwar ein Nukleosidanalagon, allerdings mit einer unnatürlichen Verknüpfung des Imidazolrings mit Ara-

binose in α -Konfiguration. Um möglicherweise Nucleosidtransporter für den Transport in die Zelle nutzen zu können, wurde die β -Konfiguration in Verknüpfung mit einer (Deoxy-) Ribose synthetisiert (Abbildung 5C) [241]. Für [^{18}F]Fluorazomycin- β -Deoxyribose ([^{18}F] β -FAZDR) wurde bereits eine bessere Tumor/Muskel-Ratio in Luft-, im Vergleich zu Sauerstoff-verdampfter Isofluran-Narkose und damit eine Abhängigkeit der Traceraufnahme vom $p\text{O}_2$ gezeigt [242]. Für die Riboseform des Tracers ([^{18}F] β -5-FAZR) wurde bereits eine Interaktion mit dem Nucleosidtransporter hCNT3 nachgewiesen [243].

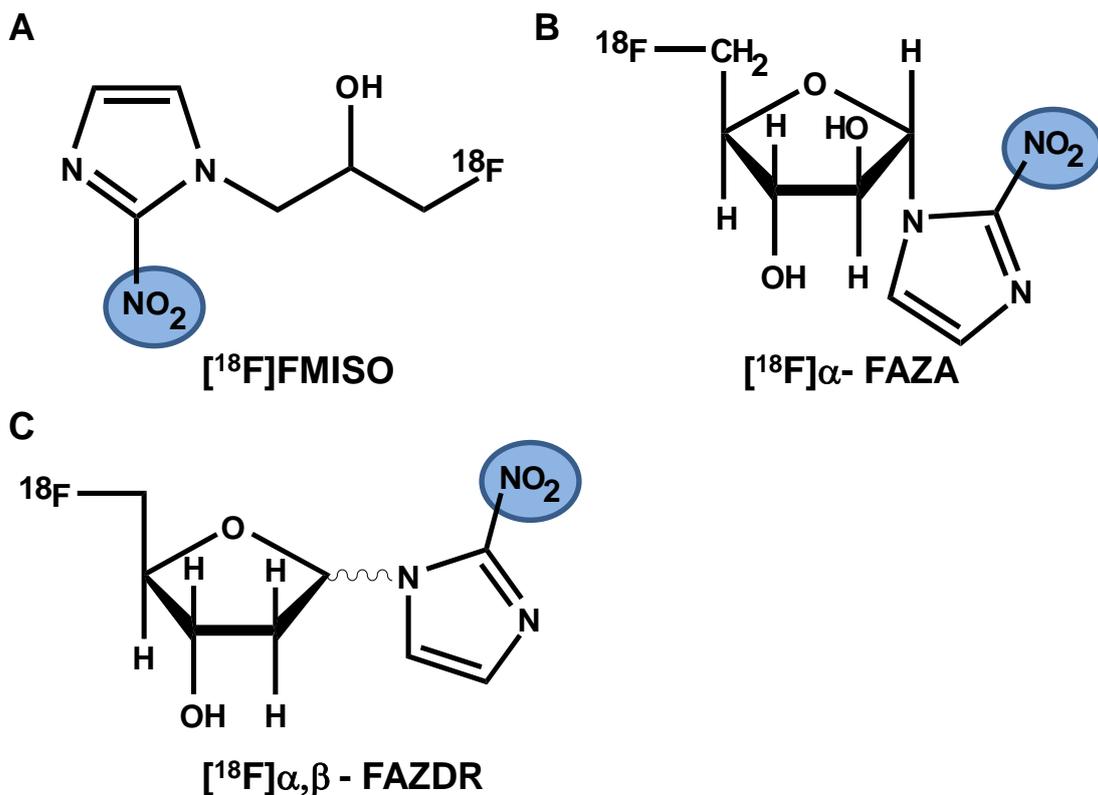


Abbildung 5: Strukturformeln der Nitroimidazoltracer (A) [^{18}F]FMISO, (B) [^{18}F]FAZA (Nitroimidazol + Arabinose) und (C) [^{18}F] β -FAZDR (Nitroimidazol + Deoxyribose). Blau hinterlegt ist die in hypoxischen Zellen reduzierte Nitrogruppe.

1.5 Grundlagen der diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) basiert auf dem Prinzip des Kernspins von Atomkernen mit ungerader Nucleonenzahl (meist Wasserstoffkerne). Diese rotieren um die eigene Achse (*Spin*) und erzeugen aufgrund der rotierenden

Ladung ein geringes Dipolmoment [244]. Die ansonsten ungerichtet im Gewebe liegenden Wasserstoffkerne werden nun vom starken Magnetfeld des MR-Tomographen parallel oder, in geringerem Maße, antiparalell ausgerichtet und rotieren (oder „präzessieren“) in der sog. Lamorfrequenz um den Vektor des Magnetfeldes. Es entsteht eine Längsmagnetisierung. Durch senkrecht darauf eingebrachte kurze Hochfrequenzimpulse in der Lamorfrequenz kippt der Magnetisierungsvektor in die Transversalebene (die Spins werden „angeregt“ sowie synchronisiert bzw. „in Phase“ gebracht) und die entstehende Transversalmagnetisierung wird mittels einer Empfangsspule messbar, das MRT-Signal. Gewebespezifisch kommt es mit einer bestimmten Zeitkonstante zur „Relaxierung“ dieses Zustands, einerseits zurück in den ursprünglichen Längsvektor (T1 oder longitudinale Relaxation), andererseits de-synchronisieren die Spins in der Transversalebene, was zum Verlust des MRT-Signals führt (T2 oder transversale Relaxation). Durch unterschiedliche Messsequenzen kann der Bildkontrast mehr auf T1- oder T2- bedingten Gewebeunterschieden basieren, man spricht von T1- oder T2-Wichtung [244]. Eine relativ neue Sequenz legt der Stärke des Messsignals die Diffusion von Wassermolekülen in einem bestimmten Zeitraum innerhalb eines Gewebes zu Grunde. Diese Diffusions-gewichteten Bilder (*Diffusion-weighted Imaging* (DWI)) werden bisher vor allem in der Schlaganfalldiagnostik und Onkologie eingesetzt, erste Studien wurden jedoch auch schon mit RA-Patienten durchgeführt [245]. Technisch wird zwischen dem oben beschriebenen Anregungsimpuls und der Signalaufnahme ein Gradientenimpuls-Paar geschaltet [246]. Der erste Impuls bringt die Spins außer Phase während der zweite sie wieder re-synchronisiert. In dem Maße, wie Wassermoleküle sich im Gewebe bewegt haben, können nicht mehr alle Spins re-synchronisiert werden, das Signal wird schwächer. Abhängig von der Stärke und Dauer des Gradientenimpulses wird für eine bestimmte Diffusionskonstante ein bestimmter Signalverlust gemessen. Diese „Empfindlichkeit“ des Systems auf die Diffusion wird als *b*-Wert bezeichnet [244]. Die Beweglichkeit der Wassermoleküle hängt dabei von der Anzahl der Wassermoleküle ab, der (Zell-)Dichte und Struktur des Gewebes, der Temperatur, der Intaktheit von Zellmembranen sowie der vorhandenen Perfusion und intravaskulären „Diffusion“. Zur Vergleichbarkeit

und Quantifizierung der DWI wird aus dem Verlust der Signalintensität mehrerer (mindestens jedoch zweier) b -Werte der sog. *Apparent Diffusion Coefficient* (ADC) ermittelt. Er ist ein Maß für die Diffusion im Gewebe und wird auf einer parametrischen Karte dargestellt. Ermittelt wird der ADC vereinfacht gesagt als Steigung der Signalintensität in Abhängigkeit vom b -Wert. In Abbildung 6 (logarithmierte Darstellung) ist der ADC höher für Normalgewebe als für Gewebe mit eingeschränkter Diffusion, z.B. Tumorgewebe, welches mit einer erhöhten Zelldichte einhergeht. Typischerweise hat diese Kurve 2 Phasen. Die Schwächung des Signals bereits bei niedrigen b -Werten (0-100 s/mm^2) wird hauptsächlich der Perfusion und der sich schnell bewegenden intravaskulären Fraktion zugeschrieben, höhere b -Werte repräsentieren mehr die interstitielle Diffusion [246].

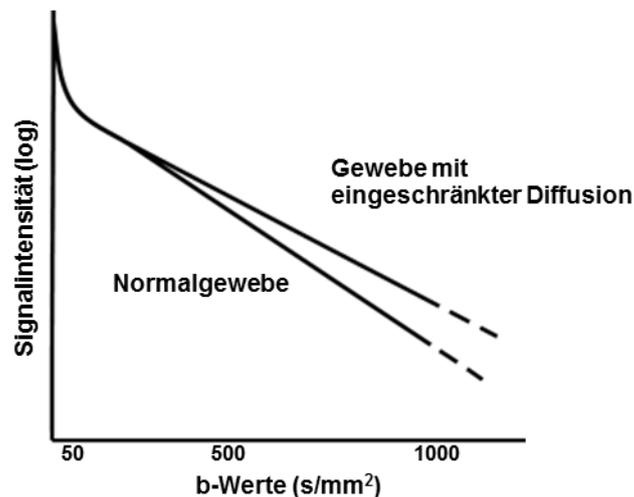


Abbildung 6: Logarithmierte Diffusions-Signalintensität in Abhängigkeit vom b -Wert des Gradientenfeldes für Normalgewebe und Gewebe mit eingeschränkter Diffusion z.B. Tumor, welches eine geringere Steigung und daher niedrigeren ADC aufweist. Adaptiert nach Attariwala *et al.*, 2013 [247], Veröffentlichung mit Genehmigung des Verlags, © John Wiley and Sons.

1.6 Bedeutung und Möglichkeiten der pharmakologischen Modulation des MAPK-Signalweges in der RA

Ziel der RA-Therapie ist nicht nur die Unterdrückung und Verlangsamung der Krankheitsprogression, sondern auch eine dauerhafte Remission der Krankheitsaktivität. Nur durch eine anhaltende Kontrolle der Inflammation lässt sich eine irreversible Gelenkzerstörung vermeiden [248]. Seit Mitte der 80er-Jahre

ist Methotrexat (MTX) als First-Line-Therapie der RA in Gebrauch [249], dessen Einsatz jedoch einen unspezifischen immunsuppressiven Ansatz darstellt [250]. Zusätzlich stehen seit ca. 15 Jahren die Biologika zur Verfügung, die im Standard-Therapieregime bei Versagen konventioneller MTX-Therapie, in schweren Fällen aber auch zur First-Line-Therapie eingesetzt werden [251]. Man unterscheidet neutralisierende Anti-Zytokin-Antikörper (z.B. gegen TNF: *Infliximab*), lösliche Zytokin-Rezeptoren (z.B. TNF-Rezeptor: *Etanercept*) und Anti-Rezeptor-Antikörper (z.B. gegen CD20: *Rituximab*) [248]. Wie bereits besprochen, zeigen ca. 40 % der Patienten unter den am meisten eingesetzten TNF-Inhibitoren keine oder nur eine geringe Verbesserung der Krankheitsaktivität [252]. Die Remissionsrate lag 2010 insgesamt weiterhin unter 30 % [253]. Ein gemeinsamer Nachteil der bisher eingesetzten Biologika ist deren molekulare Größe, was eine parenterale Applizierung notwendig macht. 2012 wurde mit *Tofacitinib*, einem Inhibitor der Januskinase (JAK), erstmals ein Medikament aus der Klasse der neu entwickelten *Small-Molecule Inhibitors* zugelassen. Diese Pharmaka zielen auf die Inhibition von Proteinkinasen in Signalwegen *downstream* der Zytokin-Rezeptoren ab und haben den Vorteil der oralen Applikation. Im Fokus stehen pro-inflammatorisch wirkende Kinasen wie die Familien der JAK oder MAPK (aktuell besprochen in Referenz [254]). Da das Therapieziel die Suppression der Immunantwort ist, sind Infektionen bei allen genannten Medikamenten die größte Gefahr, dazu kommen klassenspezifische Nebenwirkungen wie Anämie bei JAK-Inhibitoren oder eine Haut- und Neurotoxizität wie z.B. bei den Inhibitoren der MAPK-Familie.

MAPK waren eine der ersten Proteinkinasen, die vor 20 Jahren in den Fokus der RA-Therapie rückten [255]. MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen, die in 3 Gruppen unterteilt werden, die *Extracellular Signal-regulated Protein Kinase* (ERK), die *c-Jun N-Terminal Kinase* (JNK), sowie die p38-MAPK, jeweils mit ihren Isoformen. *Upstream* der MAPK stehen die MAPK-Kinasen (MAPKK o. MKK) und die MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK o. MKKK) (Abbildung 7). Eine zweifache Phosphorylierung der MAPK führt zu ihrer vollständigen Aktivierung. Welche MAPK aktiviert wird, hängt jedoch vom jeweiligen Stimulus ab. Mitoge-

ne und proliferative Stimuli aktivieren MKK-1 und MKK-2, welche auf ERK-1/2 wirken, Stress-Stimuli oder inflammatorische Zytokine aktivieren JNK über MKK-4 und MKK-7, oder p38 über MKK-3 und MKK-6 [256; 257]. Alle MAPK sind in der RA-Synovialis aktiv und spielen eine Rolle in der Arthritis [258]. Besondere Bedeutung wird der p38-MAPK beigemessen [259], da sie auf die Expression einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF, IL-1 und IL-18 wirkt sowie deren zelluläre Effekte vermittelt [260; 261]. Außerdem ist diese Kinase wichtig für die Wirkung von RANKL auf Osteoklasten [262].

P38-Inhibition reduzierte *in vitro* die Zytokin-Produktion in FLS [263]. *In vivo* zeigten eine große Zahl von präklinischen Studien in Ratten- und Mausmodellen der RA einen anti-inflammatorischen Effekt einer p38-Inhibition [249]. Die α -Isoform ist dabei wahrscheinlich am wichtigsten und wird in Endothel und synovialer Intima exprimiert [264]. ERK wird hauptsächlich durch proliferative Stimuli aktiviert und kontrolliert beispielsweise in FLS die Produktion von Prostaglandin nach Stimulation mit *Epidermal Growth Factor* (EGF) [265]. JNK ist vor allem in Knochen- und Knorpeldegradation wichtig [266; 267]. Han *et al.* zeigten, dass JNK essentiell für die Bildung von MMP-1 und MMP-13 nach IL-1-Stimulation in FLS ist. Außerdem zeigte sich bei selektiver JNK-Inhibition nur ein moderater Einfluss auf die Entzündung, jedoch ein massiver Rückgang der Knochendestruktion in einem Rattenmodell der RA [268].

Die MAPK-Signalwege sind mit Hypoxie-abhängigen Signalwegen eng verbunden. P38 und ERK werden in Hypoxie aktiviert und regulieren die Funktion von HIF-1 [269; 270]. HIF wiederum fördert die Aktivierung von p38 in humanen FLS [116]. Abbildung 7 gibt einen schematischen Überblick über den MAPK-Signalweg.

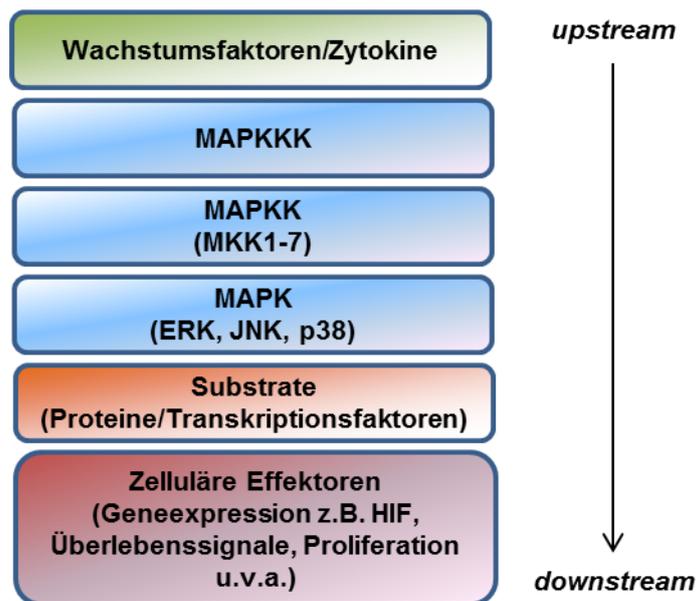


Abbildung 7: Schema des MAPK-Signalweges. Adaptiert nach Kumar *et al.*, 2003 [255], Veröffentlichung mit Genehmigung des Verlags, © Springer Nature.

Eine Übersicht zum aktuellen Stand der Entwicklung in der MAPK-Therapie geben Paunovic *et al.* [249]. Die p38-Inhibitoren können in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Zum einen sind Adenosintriphosphat (ATP)-kompetitive Inhibitoren zu nennen, die an der ATP-Bindungsstelle der MAPK ansetzen und deren Bindungspotential daher u.a. vom zellulären ATP-Spiegel abhängt [271]. Älteste Referenzsubstanz, die erfolgreich im CIA-Modell eingesetzt wurde, ist SB203580. Aufgrund der Imidazol-Ringstruktur und des subsequents Abbaus durch Cytochrom-P (CYP) Enzyme in der Leber kam es jedoch zu lebertoxischen Nebenwirkungen [272]. Eine weitere Inhibitor-Klasse bindet allosterisch, also nicht kompetitiv, wie z.B. das bis in Phase 2-Studien angewandte BIRB-796 [249]. Beide genannten Inhibitoren wurden später als sehr unselektiv charakterisiert, da sie neben p38 auch noch JNK und andere Kinasen inhibieren [273; 274]. Diese Unselektivität der Inhibitoren wurde teilweise für ihre toxischen Effekte verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund wurden immer selektivere Inhibitoren entwickelt [275], auch mit dem Ziel, die genaue Funktion von p38 besser verstehen zu können. Diese neue Generation (*Second Generation*) von Inhibitoren nimmt dafür mehrere sog. *Selectivity Hotspots* der p38-MAPK in Anspruch, die nicht über eine Reihe von Kinasen konserviert sind und somit die Selektivität stark erhöhen [274]. Bisheriger Höhepunkt dieser Entwicklung stellt

die Dibenzosuberone-Klasse mit ihrem Vertreter Skepinone-L dar, einem ATP-kompetitiven Inhibitor [276], welcher 2 *Selectivity Hotspots* nutzt. Einer wird durch ein Glycin-Residuum an der Kinase (Gly110) vermittelt, welches eine zusätzliche hydrophobe Bindung mit dem Inhibitor erlaubt und in dieser Form nur in 9 % der Kinasen vorkommt (*Glycin-Flip*) [273]. Im Weiteren nutzt Skepinone-L das sog. *Gatekeeper Residuum* (Threonin106), welches den Zugang zu einer hydrophoben Tasche tiefer in der Kinase kontrolliert [273; 276]. Hinzu kommt eine für die Selektivität der Bindung vorteilhafte verbesserte Rigidität des Inhibitors [277]. Nur das mit der α -Isoform zu 75 % sequenzidentische p38 β weist noch eine relevante Bindung auf. Skepinone-L reduziert in aktivierten humanen Monozyten die Bildung von TNF, IL-1 und IL-10. Bei Exposition mit LPS führt es zu einer um 77 % reduzierten TNF-Ausschüttung. Außerdem inhibiert es *in vitro* effektiv die Wirkung von p38 in Thrombozyten und verhindert somit deren Aktivierung [278]. Diese p38-spezifischen *Selectivity Hotspots* werden von mehreren neueren Inhibitoren benutzt, wie z.B. *SCIO-469 (Talmapimod)* [279; 280], *VX-702* [281; 282] und *Pamapimod* [275].

Die genannten spezifischen Inhibitoren waren in präklinischen Studien überaus erfolgreich, jedoch wurde in der RA während Phase-2 Studien nicht mehr als eine transiente Reduktion des C-reaktiven Proteins (CRP) erreicht [283]. Hamaker *et al.* geben einen Überblick über möglichen Gründe für das Versagen der p38-Inhibitoren in der humanen RA [284]. Eine Erkenntnis neuerer Studien ist dabei die Tatsache, dass die Kinase über negative Feedback-Mechanismen reguliert wird, vor allem mediiert durch *Dual-Specificity MAPK Phosphatases* (DUSP) [285]. Ein bekanntes Beispiel ist die Induktion von MAPK Phosphatase-1 (MKP-1), auch genannt DUSP-1, welche p38 selbst und JNK durch Dephosphorylierung deaktiviert und durch p38 und ERK induziert wird [285]. Die Hemmung von p38 führt also u.U. zu einer erhöhten JNK-Aktivität. P38 inhibiert auch die MAPKKK *TGF- β -activated Kinase* (TAK), welche neben p38 noch JNK und NF- κ B-Signalwege aktiviert [286]. Bei p38-Inhibition ist eine verstärkte Inflammation über diese Signalwege möglich. Außerdem sind antiinflammatorische Funktionen von p38 bekannt, wie z.B. die Produktion von IL-10 [287; 288]. Einige Autoren schlagen deshalb vor, den Fokus auf Targets

downstream der Kinase zu legen [289]. Ein Beispiel ist die *MAPK-activated Protein Kinase 2* (MK2), eine Kinase, welche von p38 phosphoryliert wird und für die Expression von TNF wichtig ist. MK2-defiziente Mäuse waren gegen CIA resistent [290]. Alternativ könnte über die Hemmung von Enzymen *upstream* der p38 die negativen Feedback-Mechanismen umgangen werden, ein Ansatz der ebenfalls schon in experimenteller RA erfolgreich war [284; 291]. Ein weiterer Ansatz stellt die duale Inhibition mehrerer pro-inflammatorischer Signalwege oder Kinasen dar. In Studien wurde eine pro-inflammatorische Rolle der Phosphodiesterase (PDE)-4 in der RA belegt [292; 293]. Eine duale p38/PDE-4-Hemmung wurde bereits erfolgreich in muriner chronischer Atemwegserkrankung evaluiert [294], zudem war der duale Inhibitor ML 3595 in einem Rattenmodell der chronischen Arthritis der Wirkung eines selektiven p38-Inhibitors überlegen [295].

Schlussendlich muss bei der deutlichen Diskrepanz zwischen präklinischer und klinischer Therapieeffizienz von p38 Inhibitoren die generelle Frage nach der Übertragbarkeit von Tierstudien auf den Menschen gestellt werden. Dabei differieren die Expressionsmuster der Kinasen zwischen verschiedenen RA-Modellen [296]. Es wurde bereits gezeigt, dass Anti-RA-Therapien in unterschiedlichen Tiermodellen unterschiedliche Effektstärken aufzeigen [297].

1.7 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll die Möglichkeiten des Einsatzes molekularer Bildgebung in entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wie der RA weiterentwickeln und dabei auch einen Beitrag zum Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen in experimenteller Anti-GPI-induzierter Arthritis leisten. Dazu wurden 2 Ansätze verfolgt:

1.7.1 Vergleichende Analyse der Hypoxie-PET-Tracer [¹⁸F]FMISO und [¹⁸F]β-FAZDR in der experimentellen RA

- Ist mit den Radiotracern [¹⁸F]FMISO und [¹⁸F]β-FAZDR eine frühzeitige sensitive und spezifische Detektion einer Anti-GPI-induzierten RA mög-

lich? Erlauben die Radiotracer die Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung (Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion)?

- Können die *in vivo* PET-Ergebnisse mittels *ex vivo* Pimonidazol-Immunhistochemie, Autoradiographie und Biodistributionsanalysen bestätigt werden?
- Bieten diffusionsgewichtete MRT-Messungen einen zusätzlichen Nutzen in der Evaluation der experimentellen RA?

1.7.2 Validierung des therapeutischen Potenzials individueller Inhibitoren der p38-MAPK und dessen Monitoring mit dem Hypoxie-Tracer [¹⁸F]FMISO

- Vergleich des therapeutischen Potentials verschiedener Klassen von MAPK-Inhibitoren: der duale p38/PDE-4-Inhibitor ML 3595 [295], der hochselektive p38-Inhibitor Skepinone-L [276] und der p38/JNK 3-Inhibitor LN 950 [295; 298; 299]. Mit welchem Inhibitor ist eine Suppression der Arthritisaktivität in Anti-GPI-induzierter RA möglich?
- Ist mittels [¹⁸F]FMISO-Hypoxie-PET ein verlässliches Therapiemonitoring von p38-MAPK-Therapie in experimenteller RA möglich?

2. Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

<u>Typ</u>	<u>Firma</u>
Cellstar Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Safe Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipetten 50 ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
Objekträger Super-Frost (Plus)	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
37 °C Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Vortex-Genie 2	Scientif Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Zentrifuge: Mikro 220R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Waage: Kern 572	Sartorius AG, Göttingen, D
Feinwaage: ME235S	Sartorius AG, Göttingen, D
pH-Meter	Mettler Toledo, Schwerzenbach, CH

2.2 Versuchstiere

Weibliche BALB/c Mäuse wurden von Charles River Laboratories International Inc. (Wilmington, MA, USA) bezogen. Die Haltung erfolgte in der Tierhaltung der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie oder im Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Tübingen. Die Experimente wurden unter Einhaltung der Richtlinien des Tierschutzkommi-

tees des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt (R12/12). Die Tiere waren zu Beginn der Experimente durchschnittlich 20 g schwer. Das Alter der Tiere zu Beginn der Experimente betrug durchschnittlich 8-9 Wochen, für die Therapiestudie mit MAPK-Inhibitoren 11-15 Wochen.

2.3 Induktion des Anti-GPI-Modells der RA

Antikörperhaltiges Serum wurde von K/BxN Tieren aus eigener Zucht bezogen (Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Universität Tübingen), 1:1 verdünnt mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Life Technology Corp., Grand Island, NY, USA), aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Kontrollserum wurde durch retrobulbäre Venenpunktion von Wildtyp C57BL/6 Tieren mittels einer Kapillare (0,8 mm Innendurchmesser, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D) gewonnen und nach Zentrifugation ebenfalls 1:1 mit PBS verdünnt und bei -80 °C gelagert. Grundsätzlich wurden zur Arthritisinduktion 200 µL Anti-GPI- oder Kontrollserum intraperitoneal (*i.p.*) in weibliche Wildtyp BALB/c Mäuse injiziert. Die Gelenkschwellung wurde täglich mittels eines mechanischen Messgerätes (Oditest, KODJ0305, Kroeplin GmbH, Schluechtern, D) gemessen.

2.4 MAPK-Inhibitoren und Therapieapplikation

Die verwendeten MAPK-Inhibitoren wurden im Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Tübingen (Prof. Stefan Laufer) entwickelt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Koeberle *et al.* zeigten ein sehr gutes Selektivitätsprofil für Skepinone-L (K_D p38 α : 1,5 nM) sowie eine potente Inhibition der p38-MAPK (p38-Enzymassay IC_{50} : 5 nM; Vollblutassay IC_{50} : 40 nM) [276]. ML 3595 zeigte eine IC_{50} von 500 nM in einem p38-Enzymassay und eine IC_{50} von 200 nM für PDE-4 in U937-Zellen [295]. Für LN 950 wurde eine IC_{50} von 11 nM in einem p38-Enzymassay gefunden [299]. Zusätzlich besteht bei LN 950 eine inhibitorische Komponente gegenüber JNK 3 (persönliche Kommunikation, Prof. Stefan Laufer, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Tübingen).

Die Inhibitoren wurden bei 4 °C gelagert und täglich 30 mg/kg (0,6 mg/20 g Maus) als Therapie pro Maus appliziert. Als Kontrolle wurde PBS verabreicht.

Die Inhibitoren wurden nach folgendem Schema verdünnt:

- 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- 10 % Cremophor EL (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- 80 % Aqua dest.

Ein Volumen von 100 µL/Maus wurde 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und täglich verabreicht. An Tag 1 der Therapiegabe von Skepinone-L wurde kein Cremophor EL für die Verdünnung verwendet und der Inhibitor nur in 5 % DMSO gelöst. Die *p.o.* Applikation erfolgte am wachen Tier oder bei kurzer Narkose (vgl. 2.5.2). Das Studiendesign war auf eine prophylaktische Therapiegabe ausgelegt mit einem Therapiebeginn 3 Tage vor Arthritis- oder Kontrollserum-Injektion bis 7 bzw. 8 Tage nach Krankheitsinduktion (Abbildung 8). Für den Inhibitor LN 950 wurde keine extra Kontrollgruppe mitgeführt. Nach Ende der Studie wurden die Tiere unter tiefer Narkose mittels zervikaler Dislokation geopfert und Proben für histologische Untersuchungen entnommen. Für die Therapie mit Skepinone-L und ML 3595 wurde dieselbe PBS-Vergleichsgruppe verwendet, daher werden für diese Inhibitoren identische Vergleichswerte angegeben (wenn notwendig als PBS 1 gekennzeichnet, vgl. Tabelle 7, 3.4.3). Aufgrund des zeitlichen Abstandes der Versuchsdurchführung wurde für die Therapie mit LN 950 eine eigene PBS-Vergleichsgruppe mitgeführt (wenn notwendig als PBS 2 gekennzeichnet, vgl. Tabelle 7, 3.4.3).

Aufgrund eines Therapiefehlers an Tag 7 in der Skepinone L-Gruppe werden im Folgenden nur Ergebnisse bis zu diesem Tag dargestellt. Versehentlich wurde einer nicht identifizierten Kontrolle der ML 3595-Therapiegruppe an Tag 2 nach Arthritisinduktion keine Therapie appliziert. Aufgrund der geringen Standardabweichung der Gruppe in den folgenden PET-Messungen hatte dies jedoch keine Konsequenz.

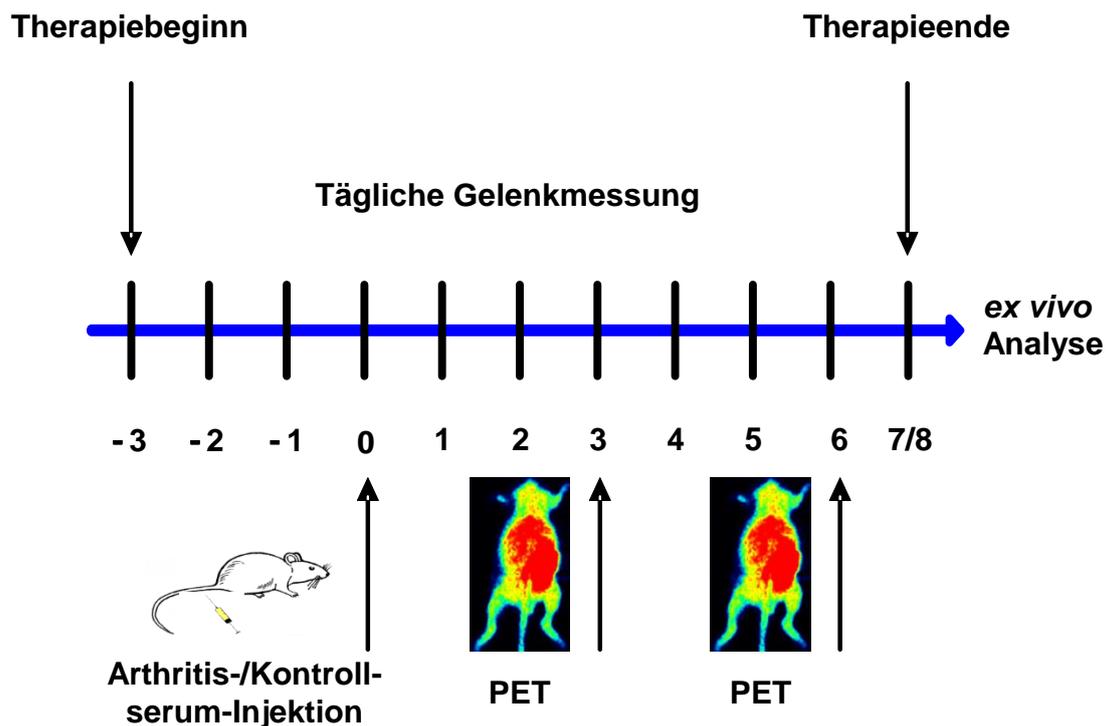


Abbildung 8: Studiendesign für die MAPK-Therapiestudie. Start der Therapiegabe an Tag -3 bis Tag 7/8, GPI-Serum- oder Kontrollserum-Injektion an Tag 0 sowie PET-Messungen an Tag 3 und 6 nach RA-Induktion.

2.5 Bildgebende Verfahren

2.5.1 Herstellung der Radiotracer

Die verwendeten Radiotracer wurden in der Radiopharmazie der Universität Tübingen synthetisiert (Herr PD Dr. Gerald Reischl). Im Folgenden ist der Produktionsprozess der Tracer gekürzt beschrieben.

[¹⁸F]β-FAZDR wurde in einem automatisierten System (TRACERlab FXF-N, GE Healthcare, Münster, D) synthetisiert. ¹⁸F wurde als [¹⁸F]Fluorid in einem PETtrace Zyklotron (GE Healthcare, Uppsala, S) hergestellt. [¹⁸F]Fluorid wurde auf einen Anionentauscher adsorbiert (Sep-Pak Light, Accell Plus QMA, Waters GmbH, Eschborn, D) und mit einem Mix aus Acetonitril, Wasser, Natriumkarbonat und Kryptofix 2.2.2 (Merck, Darmstadt, D) eluiert. Die Lösung wurde unter Vakuum (ca. 12 mbar) bei 70 °C (7 min) und 120 °C (7 min) getrocknet. Die Markierung erfolgte in 1 mL DMSO bei 70 °C mit 5 mg der Vorläufersubstanz

(Abbildung 9 links). Danach folgten die Hydrolyse mit 0,2 N NH_4OH und die Neutralisation mit 0,2 N wässrigem NaH_2PO_4 . Ungebundenes ^{18}F Fluorid wurde durch eine Aluminiumkartusche (SEP-PAK light, Alumina N, Waters, Milford, MA, USA) entfernt. Die Kartusche wurde mit *High-Performance liquid Chromatography* (HPLC)-Eluens gespült und die kombinierten Fraktionen auf eine HPLC-Säule (Luna C18(2) 250 x 10 mm, 5 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, D) zur Trennung aufgetragen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min hatte das Produkt eine Retentionszeit von 19–20 min ($k' = 6,8$), detektiert mittels UV (220 nm) und Radiodetektor. Ungefähr 4-5 mL des Produkts wurden gesammelt, durch einen 0,22 μm -Filter (Millex-GS, Millipore, Bedford, MA, USA) steril gefiltert und im Anschluss einer Qualitätsprobe unterzogen.

Der Referenztracer ^{18}F FMISO wurde nach Standardprotokoll synthetisiert, wie zuvor beschrieben [300].

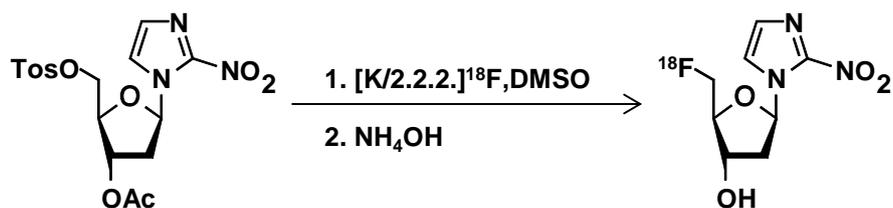


Abbildung 9: Herstellung von ^{18}F β-FAZDR (rechts).

2.5.2 Vorbereiten der Versuchstiere für PET und MRT

Die Tiere wurden mittels 1,5 % Isofluran (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf, D) verdampft mit Luft (20/21 % O_2 (Rest N_2), Westfalen AG, Münster, D) narkotisiert (Narkoseeinheit/Vernebler: Landmark, Vetland Medical Sales & Services L.L.C., Louisville, KY, USA). Zur Injektion des Tracers wurde ein intravenöser (*i.v.*) Zugang in die Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) des jeweiligen Tieres gelegt. Der Katheter wurde konstruiert aus einer Insulinspritze (BD U-40 Insulin, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D), die mit einer sterilen heparinierten NaCl-Lösung gefüllt wurde, einem Schlauch (High-Med-PE, 0,28 mm Innendurchmesser, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, D) sowie einer Nadel (Microlance™ 3, 30 G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D). Vor der Katheterisierung wurde der Schlauch des Katheters stets gespült, um verbleibende

Luft zu entfernen. Bei längerem Verbleib der Tiere in Narkose wurde Augensalbe (Corneregel, Dr. Mann Pharma GmbH, Berlin, D) angewendet, um das Austrocknen der Hornhaut zu verhindern.

Für die Messungen im PET oder MRT wurde die Temperatur der Tiere mittels einer rektalen Sonde mit einem digitalen Rückkoppelsystem konstant gehalten. Die Versuchstiere wurden in der Mitte des *Field of View* (FOV) im PET-Scanner platziert. Im MRT diente eine Lokalisierungs-Sequenz für die korrekte Platzierung der Tiere im FOV. Die Narkose wurde während der gesamten Messung aufrechterhalten.

2.5.3 PET-Messung und Bildrekonstruktion

Der hier verwendete *Inveon* PET-Scanner (Siemens Molecular Imaging Inc., Knoxville, TN, USA) besteht aus 4 Reihen mit jeweils 16 Blockdetektoren [188]. Damit wird ein FOV von 10 cm transaxial und 12,7 cm axial erreicht. Die räumliche Auflösung hängt vom verwendeten Rekonstruktionsalgorithmus sowie der Position innerhalb des FOV ab. Sie ist bei dem in dieser Arbeit verwendeten Rekonstruktionsalgorithmus bis zu einem radialen Abstand von 1,5 cm vom *Center of the FOV* (CFOV) unter 1,5 mm FWHM in der tangentialen und radialen Richtung [190; 191].

Zur Reduktion der Messzeit wurden dynamische und statische Messungen durchgeführt. Dynamische Messungen dienen zur Ermittlung der Tracerkinetik und werden simultan zur Tracerinjektion gestartet. Die Messzeiten variierten je nach Fragestellung zw. 5400 und 7200 Sekunden (Akquisitionseinheiten: 5x 60 Sekunden; 11x 300 Sekunden; 3-6x 600 Sekunden). Bei statischen Messungen wird nach der Applikation des Tracers bis zum Beginn der Messung eine sogenannte Traceraufnahme-Zeit (*uptake*) abgewartet. Währenddessen verbleiben die Mäuse in Narkose. Anschließend wird eine Messung von 600 Sekunden gestartet. Sowohl bei dynamischen als auch bei statischen Messungen wurde nach der Emissionsmessung eine zusätzliche Transmissionsmessung für die Schwächungskorrektur mit Hilfe einer Kobalt-Quelle durchgeführt (803 Sekunden). Die Rohdaten der Messungen wurden mithilfe der Software *Inveon Acquisition Workplace* (Siemens Molecular Imaging Inc., Erlangen, D) akquiriert sowie

in zweidimensionale Sinogramme histogrammiert. Die Bildrekonstruktion erfolgte mit dem Algorithmus *Ordered Subset Expectation Maximization* (OSEM).

OSEM ist ein iterativer Algorithmus, das heißt er geht initial von einer pauschalen Annahme der Tracerverteilung aus und nähert sich dann durch eine bestimmte Anzahl Iterationen den gemessenen Rohdaten im Sinogramm an [187]. Die Bilddaten wurden mit einer Pixelgröße von 0,78 x 0,78 mm in einer 128 x 128-Matrix rekonstruiert.

Im Rahmen der Tracervergleichsstudie wurden PET-Messungen an den Mess- tagen 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion durchgeführt. Zu beachten ist, dass hierfür aufgrund technischer Einschränkungen nicht immer dieselben Tiere bzw. Versuchsgruppen benutzt werden konnten. Aufgrund geringer Standardabweichungen in den Ergebnissen sowohl der Gelenkmessung (vgl. 3.2.1) als auch Quantifizierung der Traceraufnahme (vgl. 3.2.3) wird dies jedoch im Folgenden nicht im Einzelnen aufgeschlüsselt.

2.5.4 Auswertung der PET-Daten

Die PET-Daten wurden mithilfe der Software PMOD (PMOD Technologies Ltd., Adliswil, CH) ausgewertet. Hierzu wurde eine standardisierte *Region of Interest* (ROI) von stets 2,7 mm Durchmesser über dem oberen Sprunggelenk (OSG) der Mäuse angelegt. 3 zweidimensionale ROI übereinander platziert ergaben ein *Volume of Interest* (VOI), aus welchem die mittlere Radioaktivität in Kilobekquerel (kBq)/cm³ ermittelt wurde. Für die Quantifizierung der Traceranreicherung wurde aus den dynamischen Messungen der Wert verwendet, der dem mittleren Zeitpunkt der statischen Messung entsprach. Zur Ermittlung der Tracerkinetik konnten die Zeiteinheiten (*Frames*) der dynamischen Messungen aufsummiert und eine Zeitaktivitätskurve (*Time Activity Curve* (TAC)) erstellt werden. Alle erhobenen Daten wurden zerfallskorrigiert. Die gemessene Aktivität des VOI in kBq/cm³ wurde auf die injizierte Aktivität korrigiert und in *Prozent der injizierten Dosis pro cm³* (%ID/cc) umgerechnet.

2.5.5 MRT-Messung

Die MRT-Messungen erfolgten mit einem 7 Tesla MRT-Scanner (ClinScan, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, D). Die Tiere wurden analog zu den PET-Messungen während der gesamten Messzeit unter Isofluran/Luft-Narkose gehalten. Mit Hilfe einer Lokalisierungsmessung konnten die Tiere mittig im FOV des Scanners platziert werden, danach folgte die Akquisition einer konventionellen T2-Anatomie-Sequenz. Diffusionsgewichtete Sequenzen wurden für die *b*-Werte 0, 150, 300, 600 und 1000 aufgenommen. Vor oder nach den MRT-Messungen erfolgte sequentiell eine PET-Messung wie oben beschrieben (2.5.3).

2.5.6 Auswertung der diffusionsgewichteten MRT-Sequenzen

Die Berechnung der parametrischen ADC-Karten erfolgte mit Hilfe von MATLAB (Release 2010a, MathWorks GmbH, Ismaning, D). Die dafür notwendigen Applikationen wurden von Dr. Jonathan Disselhorst (Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die ADC-Karten wurden in PMOD manuell mit einer T2-Anatomie oder PET-Messung koregistriert und visuell beurteilt. 3 übereinander liegende ROI von je 2,7 mm Durchmesser wurden über dem Bereich der höchsten ADC-Werte gelegt. Der mittlere ADC-Wert wird in $10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ angegeben.

2.6 Biodistributionsanalyse

Die Biodistributionsanalyse ist ein *ex vivo* Verfahren zur Feststellung der Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen Organen und kann u.a. zur Validierung der PET-Ergebnisse herangezogen werden. Die zur Biodistribution vorgesehene Tiere wurden sofort nach Beendigung der PET-Messungen mittels zervikaler Dislokation geopfert. Sogleich erfolgte die Entnahme von Organen (Blut, Sprunggelenke beidseitig, Pfoten beidseitig, Leber, Niere, Milz, Muskel) in 5 ml-Röhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, D). Da eine weitere histologische Verarbeitung geplant war, wurden die Gelenke und Pfoten in 4,5 % pH-neutralem Formaldehyd (SAV LP GmbH, Flintsbach, D) fixiert. Die Proben wurden mit einem

γ -Counter (Wizard 1480, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen und die erhaltenen Counts anhand eines Standards (Mittelwert aus 5x500 μ L Wasser mit bekannter Aktivität) auf Isotopzerfall und Gewicht normiert. Die Ergebnisse wurden als %ID/g berechnet. Das Gewicht der Organe wurde vor jeder Auswertung auf Plausibilität überprüft.

2.7 Autoradiographie

Die Autoradiographie ist ein *ex vivo* Verfahren, mit dem die Verteilung der Radioaktivität in einem Gewebeschnitt untersucht werden kann. Zur Autoradiographie vorgesehene Tiere wurden sofort nach Beendigung der PET-Messungen mittels zervikaler Dislokation geopfert. Die Gelenke von Arthritis- und Kontrolltieren wurden in Tissue-Tek (Tissue-Tek Cryomold, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL) eingebettet. Nach Kühlung und Fixation mit einem Kältespray (Solidofix-Kältespray, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) wurden die Blöcke auf einem Kryotom (Leica CM1850, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) durchschnittlich 20 μ m dick geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte auf einer Phosphor-Platte (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) für ca. 24 Stunden belichtet und auf einem Phosphor-Imager (STORM, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA; Software: Storm Scanner Control Version 5.01) mit einer Pixelgröße von 50 μ m ausgelesen. Die Autoradiographie wurde mit der Software ImageJ (Version 1.42q, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) analysiert.

2.8 Histologie

Nach Abschluss der *in vivo* Untersuchungen wurden bestimmte Tiere für eine histologische Auswertung verwendet. Hierzu wurden die Sprunggelenke in 4,5 % Formaldehyd fixiert und dekalzifiziert. Für alle Versuche, ausgenommen immunhistologische Färbungen (vgl. 2.9), wurde die Entkalkung für 10 Tage in 10 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) bei 56 °C durchgeführt. Im histologischen Labor der Universitätshautklinik Tübingen erfolgte die Einbettung der Proben in Paraffin. Auf einem Rotationsmikrotom

(RM 2235, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) wurden 3-5 µm Gewebeschnitte hergestellt. Danach wurde eine konventionelle Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung nach Standardprotokoll durchgeführt [45]. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte mittels eines NanoZoomers (NanoZoomer 2.0-HT C9600, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, D). Die Proben der MAPK-Inhibitor Studie wurden vom Pathologischen Institut der Universität Tübingen (Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend, Frau Dr. Ursula Kohlhöfer) gefärbt und beurteilt.

2.9 Immunhistochemie

2.9.1 Pimonidazol-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung mittels Pimonidazol dient dem *ex vivo* Nachweis von hypoxischen Gewebearealen und wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von Hypoxie in experimenteller RA eingesetzt [119; 301]. Pimonidazol ist eine Nitroimidazolverbindung, die sich nach demselben Prinzip wie die bereits oben beschriebenen PET-Tracer in Zellen mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg anreichert. Dabei geht sie mit Thio-Gruppen von Proteinen eine stabile, kovalente Verbindung ein [302]. Die Verteilung von Pimonidazol im Gewebe kann durch immunhistochemische Methoden auf Paraffin- oder Kryoschnitten sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde das Hypoxyprobe™-1 Plus Kit verwendet (Hypoxyprobe Inc., Burlington, MA, USA), welches neben dem Antigen Pimonidazol den monoklonalen IgG-Primärantikörper *FITC-conjugated Mouse monoclonal Primary Antibody* (FITC-Mab1) sowie den Sekundärantikörper *Rabbit anti-FITC conjugated with Horseradish Peroxidase* (Sek.-AK) enthält. Um die Spezifität der Bindung des Primärantikörpers zu demonstrieren, wurde ein Maus-Anti-Human HLA-IgG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) in der gleichen Stoffmenge als Isotyp-Kontrolle verwendet. Wie vom Hersteller veranschlagt wurden pro Maus 1,5 mg Pimonidazol in einem Volumen von 150 µL gelöst und *i.p.* injiziert. Nach einer Aufnahmezeit von 50 Minuten wurde das Tier mittels zervikaler Dislokation geopfert und die Gelenke für eine spätere Erstellung von Paraffinschnitten in For-

maldehyd fixiert. Mit dem unter 2.8 beschriebenen Vorgehen zur Entkalkung der Gewebe zeigte sich keine Pimonidazol-Färbung der Schnitte, möglicherweise aufgrund der langen Zeit der einwirkenden Hitze auf Pimonidazoladdukte. Pimonidazol wurde zwar bislang nicht als hitzelabil beschrieben, für andere Antigene kann jedoch schon die normale Paraffin-Schmelztemperatur von 60 °C schädlich sein [303]. Es wurden daher im Rahmen dieser Arbeit zwei Protokolle entwickelt, die bei einer kurzen Entkalkungszeit sowohl am Mikrotom schneidbare Gelenke als auch zufriedenstellende Färbeargebnisse ermöglichen sollten. Die Zeit zwischen Entwässerung der Proben und Einbettung in Paraffin wurde minimiert, da ausgetrocknete Gewebe eine erhöhte unspezifische Bindung aufweisen. Das Färbeprotokoll (Tabelle 4) ist eine Abwandlung des Protokolls unter Referenz [304] und wurde in Bezug auf möglichst geringe unspezifische Bindung sowohl des Primär- als auch des Sekundärantikörpers optimiert.

Protokoll 1: Entkalkung auf Basis von EDTA

Die schonendste Entkalkung ohne Gewebeerlust wird mit dem Chelator EDTA erreicht [305]. Der Chelator arbeitet in einem alkalischen pH-Bereich optimal, aufgrund möglicher Alkalin-sensibler Verbindungen wurde in dieser Arbeit jedoch ein Bereich von pH 7,2-7,4 konstant gehalten.

Tabelle 2: Protokoll für Entkalkung mit EDTA.

Schritt	Zeitdauer	Vorgang
1	40-50 h	Fixierung in 4,5 % Formaldehyd
2	Bis zu 7 d	Entkalkung in 20 % EDTA-Lösung im 37 °C Inkubator, täglicher Wechsel, pH 7,2-7,4

Protokoll 2: Entkalkung auf Basis von Ameisensäure

Eine schnellere, jedoch aggressivere Dekalzifizierung ist mit Hilfe von Säuren möglich. Bei zu langer Einwirkung kann es zu Gewebeschäden und Verlust von nukleären Antigenaddukten kommen [305]. Eine relativ schwache und scho-

nende Säure ist die Ameisensäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D). Säuren können auch zur Oberflächendekalzifizierung während des Schneidens benutzt werden.

Tabelle 3: Protokoll für Entkalkung mit Ameisensäure

Schritt	Zeitdauer	Vorgang
1	40-50 h	Fixierung in 4,5 % Formaldehyd
2	Bis zu (max.) 12 h	Entkalkung in 10 % Ameisensäure

Danach wurden die Gewebe bis zur Entwässerung in 70 % Ethanol (SAV LP, Flintsbach, D) gelagert und auf eine erneute Verweildauer in Formaldehyd verzichtet. Die anschließende Färbung wurde mit Ausnahme der Antikörperverdünnungen für beide Dekalzifizierungsprotokolle nach Tabelle 4 durchgeführt.

Hierzu verwendete Puffer wurden wie folgt hergestellt:

- Waschpuffer und Antikörperverdünnungspuffer *Tris buffered Saline* (TBS): Tris Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D); NaCl; KCL; pH 7.4
- Proteinase K-Verdünnungspuffer Tris-EDTA-Puffer (TE) [306]: Tris Base; EDTA; Triton X-100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D); pH 8.0

Tabelle 4: Färbeprotokoll für Pimonidazol-Immunhistochemie. Adaptiert nach [304].

Schritt	Zeitdauer	Vorgang
1	2x5 min	Deparaffinieren in Xylol/Clear-Rite 3 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA)
2	2x3 min	Deparaffinieren in 100 % Ethanol

3	je 1x3 min	Deparaffinieren in 95 %, 70 %, 50 % Ethanol
4		Einzeichnen der Schnitte mit Wachsstift (DAKO Pen, Dako Denmark, Glostrup, DK)
5	15 min	Endogener Peroxidase-Block mit 3 %-H ₂ O ₂ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
6	2x5 min	Waschen in TBS + 20 % Tween (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) (Im Folgenden TBS-T genannt)
7	15 min in 37 °C Inkubator	Antigen- <i>Retrieval</i> mit Proteinase-K (Roche, Mannheim, D), 20 µg/ml in TE-Puffer, pH 8.0
8	2x5 min	Waschen in TBS-T
9	15 min	Protein-Block mit DAKO Blocking Solution (DAKO North America, Capinteria, CA, USA) (danach nicht waschen)
10	Über Nacht (4 °C)	Inkubation des Primär-AK in TBS + 1 % BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) Verdünnung 1:50-1:200
11	2x5 min	Waschen in TBS-T
12	45 min bei RT	Inkubation des Sekundär-AK in TBS Verdünnung 1: 200-1:400
13	2x5 min	Waschen in TBS-T
14	2-5 min, je nach Färbeintensität	Inkubation mit Diaminobenzidin (DAKO North America, Capinteria, CA, USA)
15	3x2 min	Waschen in TBS-T

16	2 min	Gegenfärbung in Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Merck, Darmstadt, D)
17	10 min	„Bläuen“ der Schnitte unter laufendem Wasser
18	je 2x5 min	Dehydrierung mit 95 % und 100 % Ethanol
19	2x5 min	Dehydrierung mit Xylol
20		Eindecken der Schnitte mit Eukitt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)

2.9.2 P38-MAPK-Immunhistochemie

Zusätzlich wurde eine Immunhistochemie an Schnitten aus der MAPK-Therapiestudie (PBS-Therapiegruppe) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler *Rabbit-anti-Mouse*-Antikörper (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) appliziert, der gegen phosphorylierte und unphosphorylierte Formen der p38 α -, β - und γ -MAPK gerichtet ist. Als Sekundärantikörper wurde ein *Goat-anti-Rabbit-IgG*-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D) benutzt. Das Protokoll der Entkalkung entsprach der üblichen Prozessierung unter 2.8, das Färbeprotokoll wurde analog zu 2.9.1 durchgeführt (Tabelle 4), mit einer Primär- und Sekundärantikörper-Konzentration von 1:100.

2.10 Statistik

Folgende statistische Analyse wurde mit freundlicher Hilfe von Herrn Prof. Martin Eichner (Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, Universität Tübingen) geplant und erstellt. Die Berechnung erfolgte mit der Software JMP (Version 11.2.0, 64 Bit, SAS Institute, La Jolla, CA, USA) sowie Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Grundsätzlich wurde zur Analyse der Gelenkdurchmesser und der Radiotraceraufnahme das arithmetische Mittel beider Gelenke einer Maus gebildet. War nur ein Gelenk

geschwollen, so wurde nur dieses in die Auswertung miteinbezogen. Die dadurch entstehende leichte Verzerrung in der Streuung der Grundgesamtheit wurde in Kauf genommen. Abweichungen von dieser Regel wurden als solche gekennzeichnet.

Für die Messungen von Gelenkdurchmesser und Traceraufnahme wurde durch Vergleich von Medianen und Mittelwerten der Gruppen das Vorliegen einer Normalverteilung angenommen. Dargestellt sind der Mittelwert der Gruppe (mit n =Anzahl der Mäuse) mit Standardabweichung. Für die Biodistributionsanalysen wurde die Normalverteilung abgelehnt. Dargestellt sind hier Mediane mit Minimum und Maximum.

2.10.1 Vergleich der Hypoxie-Tracer [^{18}F]FMISO und [^{18}F]β-FAZDR

Unter Annahme von normalverteilten Daten wurde aus den gruppenabhängigen Mittelwerten und Standardabweichungen mittels Normalverteilungsfunktion errechnet, welcher Anteil der Werte unter (=Kontrolle bzw. Maß für die Spezifität) oder über (=Arthritis bzw. Maß für die Sensitivität) einem bestimmten Schwellenwert liegt. Dieser Schwellenwert wurde so gewählt, dass die Sensitivität gleich der Spezifität war. So wurde die empirische Sensitivität und Spezifität ermittelt, mit der ein Radiotracer an einem bestimmten Beobachtungszeitpunkt das Merkmal „Arthritis“ detektiert. Zur Berechnung wurden hier alle Einzelgelenke sowie der aus diesen Daten errechnete Mittelwert mit Standardabweichung verwendet.

Zur quantitativen Analyse der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde das Konfidenzintervall der Differenz zwischen den Mittelwerten (Im Bsp. Gruppe „A“ und Gruppe „B“) berechnet. Hierzu wurde zunächst das 97,5 %-Quantil der t -Verteilung (t^*) mit (n_1+n_2-2) Freiheitsgraden ermittelt und dann nach Gleichung 1 und 2 vorgegangen (vgl. [307]):

$$\begin{aligned} \text{Standardfehler (SE) der Differenz } \Delta_{(\text{Mean A}-\text{Mean B})} (SE_{\Delta}) \\ = \sqrt{(SE_A)^2 + (SE_B)^2} \end{aligned} \quad (1)$$

Dann:

$$95\% - \text{Konfidenzintervall von } \Delta = (\Delta - t^* * SE_{\Delta}) \text{ bis } (\Delta + t^* * SE_{\Delta}) \quad (2)$$

Beinhaltete das Konfidenzintervall der Differenz die Zahl „0“, wurde das Ergebnis als nicht signifikant gewertet. Im Gegensatz dazu bedeutet ein signifikantes Ergebnis auf dem 5 %-Niveau, dass die Differenz zu 95 % nicht „0“ ist. Wo p-Werte angegeben sind, wurden diese mit einem T-Test auf ungleiche Varianz ermittelt. Das α -Fehlerniveau wurde bei 0,05 festgelegt. Ein signifikant unterschiedliches Ergebnis wurde in Graphiken mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zur Analyse von Quotienten (Ratios) zwischen zwei Gruppen-Mittelwerten (Im Bsp. Gruppe „A“ und Gruppe „B“) wurde nach Gleichung 1 und 2 (vgl. [307]) vorgegangen:

$$\begin{aligned} \text{Standardfehler (SE) des Quotienten } Q_{(\text{Mean A/Mean B})} (SE_Q) \\ = Q * \sqrt{\frac{(SE_A)^2}{A^2} + \frac{(SE_B)^2}{B^2}} \end{aligned} \quad (3)$$

Dann:

$$95\% - \text{Konfidenzintervall von } Q = (Q - t^* * SE_Q) \text{ bis } (Q + t^* * SE_Q) \quad (4)$$

Zur Analyse von Korrelationen wurden ebenfalls alle Einzelgelenke separat einbezogen. Es wurde ein Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt. Der Vergleich zweier Korrelationskoeffizienten wurde nach Sachs *et al.* durchgeführt [308].

2.10.2 Therapiestudie mit MAPK-Inhibitoren

Zum Vergleich der Varianzen der Therapiegruppen wurden alle Einzelgelenke mit einbezogen. Es wurde ein Bartlett's-Test auf Varianzgleichheit durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 galt als signifikantes Ergebnis und die Nullhypothese der Varianzgleichheit wurde abgelehnt.

Differenzen zwischen Gruppen-Mittelwerten und die Analyse von Korrelationen wurden analog zu 2.10.1 berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich von OSEM 2D- und OSEM 3D-rekonstruierten Datensätzen

Bei der MAPK-Inhibitor Therapiestudie zeigten sich nach einer OSEM 2D-Rekonstruktion mit *Inveon Aquisition Workplace* (16 Subsets, 4 Iterationen, FORE [188]) deutliche Zeichen eines *Spill-over*-Effektes durch die Anreicherung des Tracers in der Blase, welches zu Auslöschungsphänomenen des PET-Signals in den Gelenken führte (Abbildung 10A). Entsprechend hoch stellte sich die Standardabweichung der ID/cc dar, wenn die ROI in den Bereich des OSG gelegt wurden (Abbildung 10B). Daher wurde derselbe Datensatz ebenfalls mit OSEM 2D* (entwickelt von Dr. Martin Judenhofer, Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Universität Tübingen) und OSEM 3D (2 Iterationen [188]) rekonstruiert. OSEM 2D* verwendet weniger LOR zur Rekonstruktion der Tracerverteilung, was zu einer deutlichen Verbesserung der Bildqualität und der Quantifizierung der Daten führte. Nach Rekonstruktion mit dem OSEM 3D-Algorithmus zeigten sich wie erwartet höhere Werte für die Quantifizierung in den ROIs. Außerdem verschwanden die Auslöschungsphänomene aufgrund des dreidimensionalen Rekonstruktionsansatzes des Algorithmus. Abbildung 10 verdeutlicht, dass die Wahl des Rekonstruktionsverfahrens die Resultate der Studie sowie die Analyse der Daten (im speziellen die Effekte der Therapie) beeinflussen kann. Aufgrund der dargelegten Charakteristika der verschiedenen Akquisitionsverfahren (Standardabweichung der %ID/cc, Rekonstruktionsdauer) wurde für diese Arbeit durchgehend der Algorithmus OSEM 2D* genutzt.

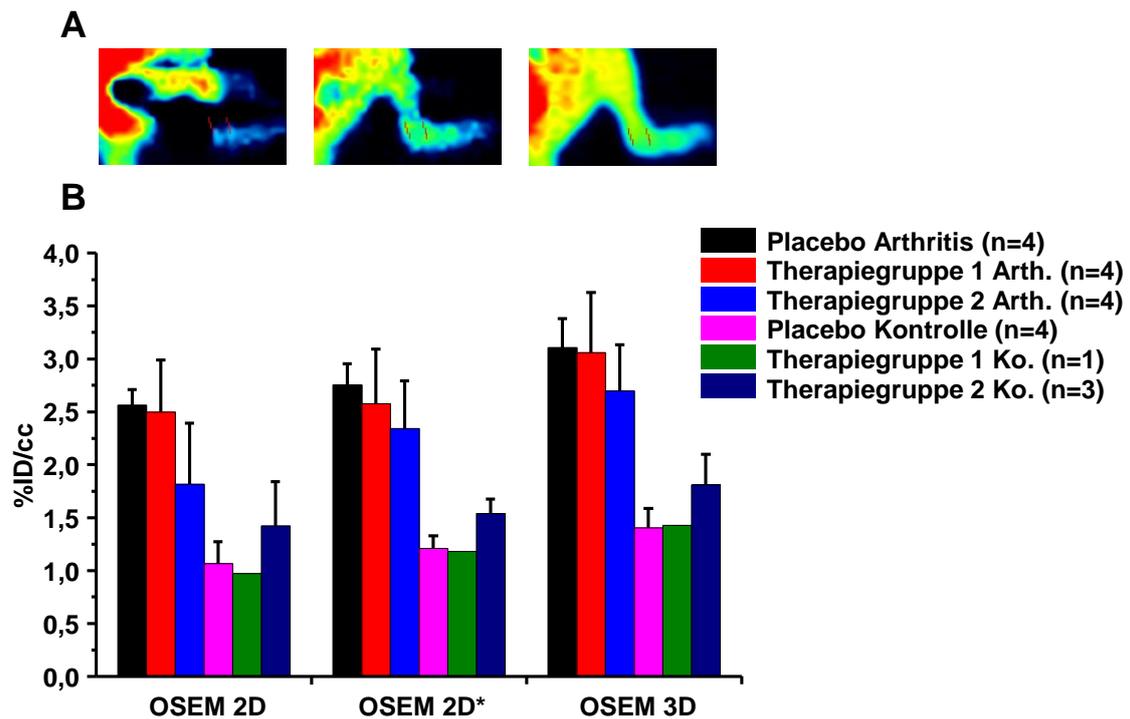


Abbildung 10: Vergleich von OSEM 2D, OSEM 2D* und OSEM 3D rekonstruierten Datensätzen aus $[^{18}\text{F}]$ FMISO-PET Akquisitionen, (A) repräsentative $[^{18}\text{F}]$ FMISO-PET-Bilder nach OSEM 2D- (Links), OSEM 2D*- (Mitte) und OSEM 3D-Rekonstruktion (Rechts), (B) Quantifizierung der PET Daten in %ID/cc im oberen Sprunggelenk, Tag 6 nach Arthritisinduktion. Arth. = Arthritis, Ko. = Kontrolle

3.2 Vergleichende Analyse der Hypoxie-PET-Tracer $[^{18}\text{F}]$ FMISO und $[^{18}\text{F}]$ β -FAZDR im Verlauf der Anti-GPI-induzierten experimentellen Arthritis *in vivo* und *ex vivo*

3.2.1 Klinische und histologische Validierung der Arthritis

Nach Injektion der Anti-GPI-Autoantikörper kam es innerhalb von 24 Stunden zu klinisch sichtbarer Schwellung an Pfoten und Sprunggelenken der Versuchstiere. Abbildung 11 zeigt die Gelenkdurchmesser (mm), in Abhängigkeit der Zeit nach Arthritis- oder Kontrollserum-Injektion für Tiere aus den $[^{18}\text{F}]$ β -FAZDR/ $[^{18}\text{F}]$ FMISO-Vergleichsstudien. Der Krankheitsverlauf entspricht dem in früheren Arbeiten publizierten Verlauf der Arthritis [167]. Die maximale Gelenkschwellung als Surrogat einer maximalen Entzündungsreaktion wurde an Tag 6

nach Arthritisinduktion gemessen, danach gingen die Werte aufgrund von fallenden Antikörpertitern wieder leicht zurück.

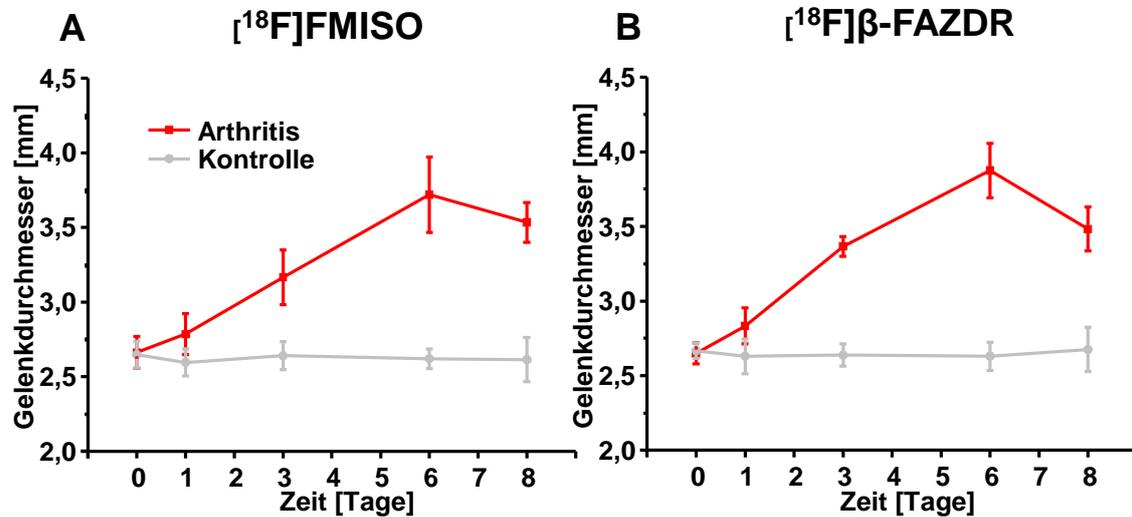


Abbildung 11: Verlauf der Gelenkschwellung, Tag 0, 1, 3, 6 und 8 nach Arthritis- (rot) oder Kontrollserum-Injektion (grau) für (A) mit [¹⁸F]FMISO (Arthritis n=6-10; Kontrolle n=4-9) und (B) mit [¹⁸F]β-FAZDR (Arthritis n=3-6; Kontrolle n=3-5) gemessene Tiere.

Abbildung 12 zeigt die wesentlichen histologischen Merkmale der Arthritis, im Vergleich zu einem Kontrolltier, 8 Tage nach Anti-GPI-Injektion.

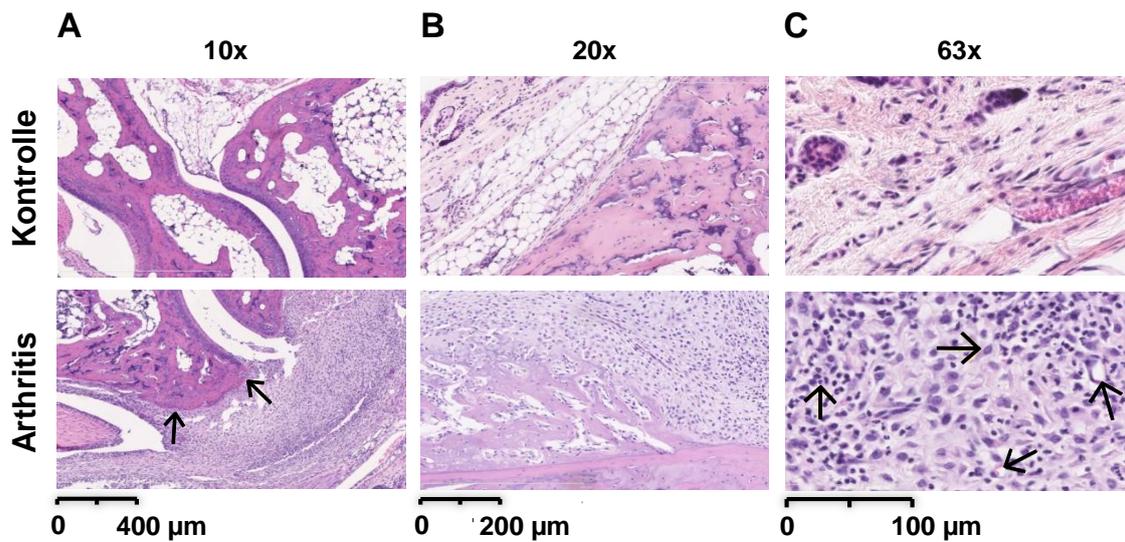
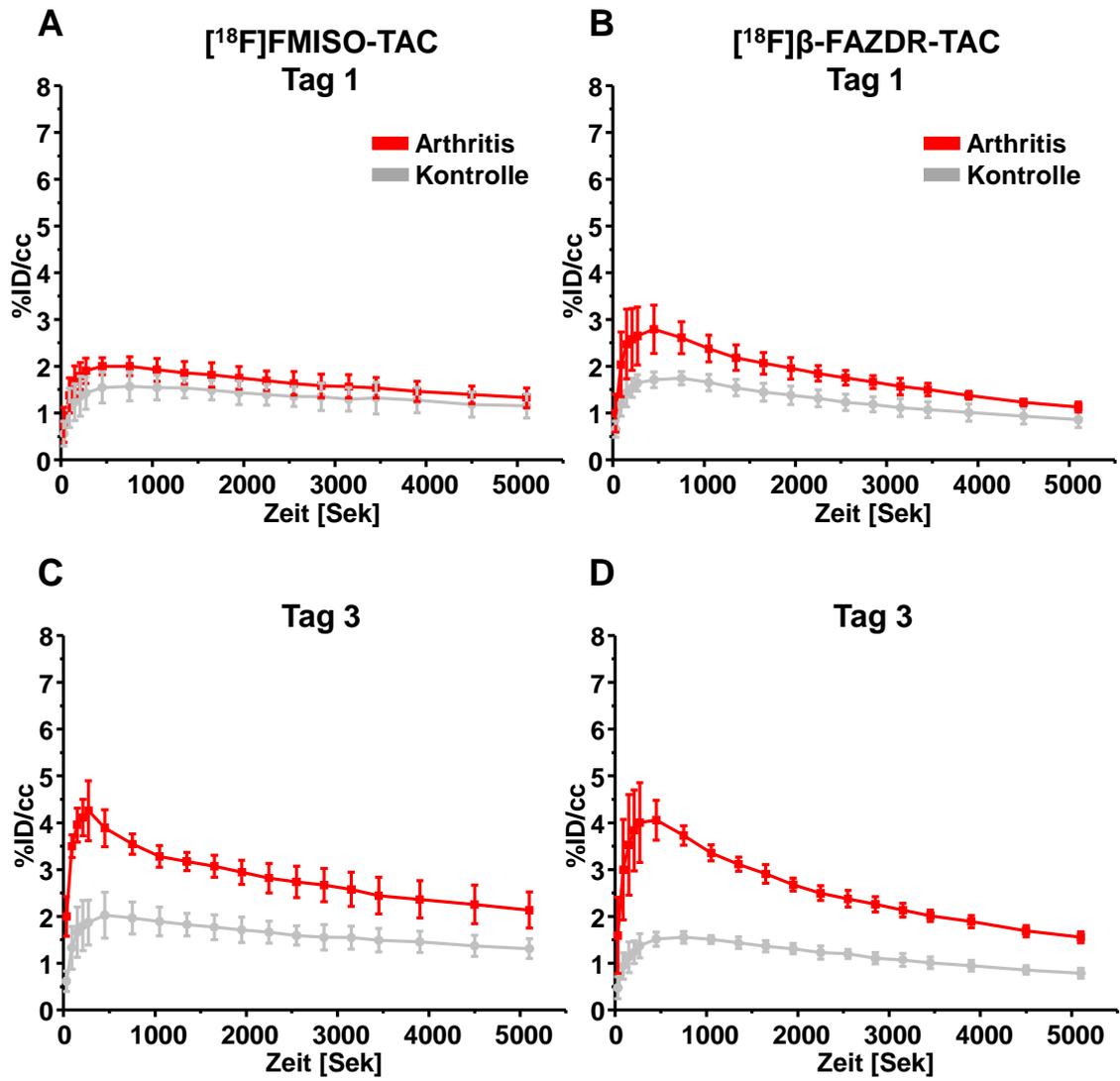


Abbildung 12: Histologische Merkmale der Anti-GPI-induzierten Arthritis (untere Reihe) im Vergleich zu Kontrolltieren (obere Reihe), 8 Tage nach Antikörper-Injektion, mit (A) Pannusbildung und Knorpelerosion (B) Knochenneuf ormation und (C) Neovaskularisation und inflammatorischem Infiltrat.

3.2.2 Dynamische *in vivo* [^{18}F]FMISO- und [^{18}F]β-FAZDR-PET-Messungen im Verlauf der Anti-GPI-induzierten RA

Dynamische Messungen wurden an allen Messtagen durchgeführt (Tag 1, 3, 6 und 8 nach Anti-GPI-Injektion). Abbildung 13 zeigt die Zeit-Aktivitätskurven (TACs) der dynamischen PET-Messungen von [^{18}F]FMISO und [^{18}F]β-FAZDR in den ROIs über dem OSG. Dargestellt ist der Zeitraum 0-90 Minuten nach Tracerinjektion, an den Messtagen 1, 3, 6 und 8.



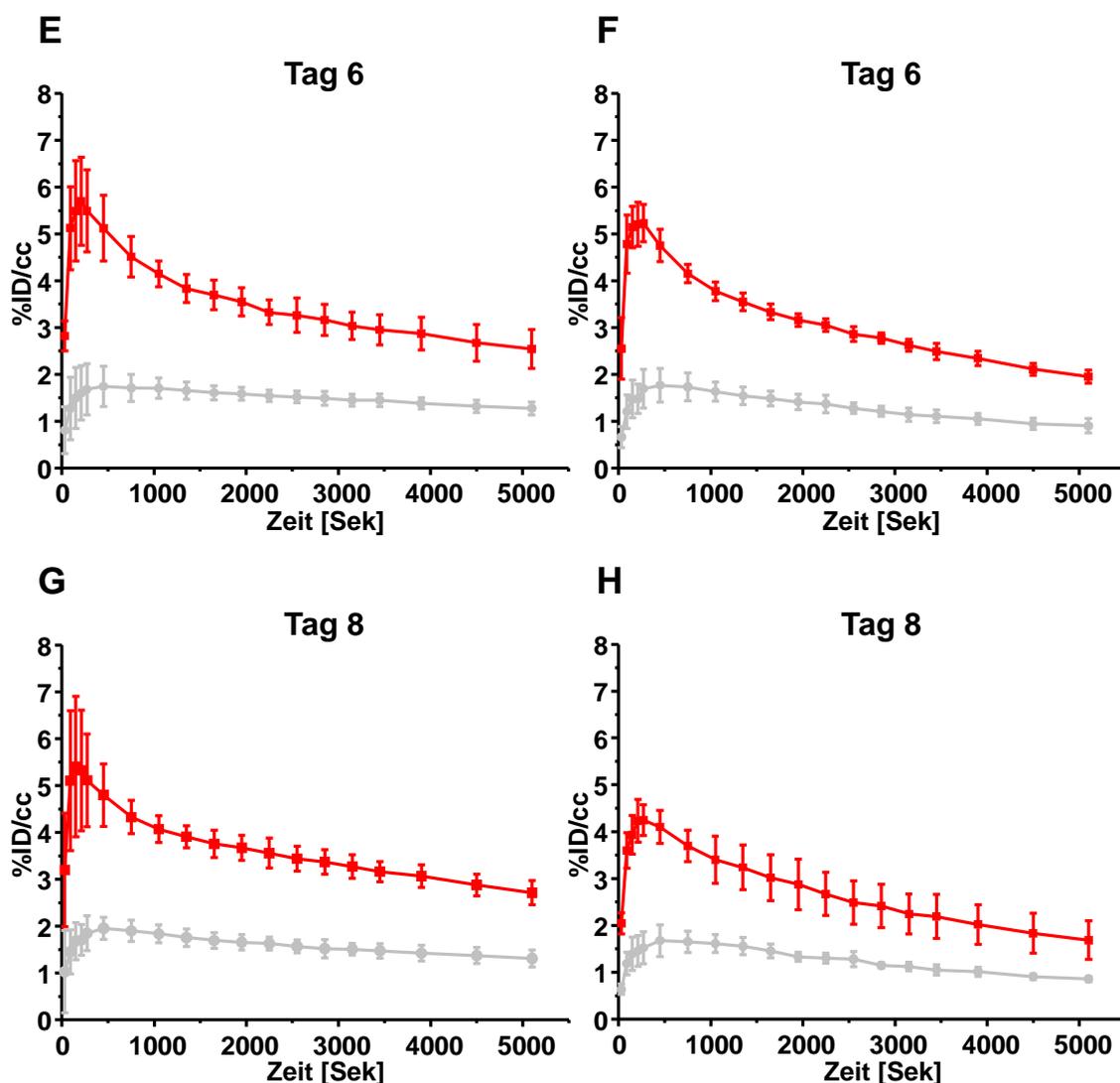


Abbildung 13: TACs von dynamischen PET-Scans im Gelenk von Arthritis (rot)- und Kontrolltiere (grau), Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion. %ID/cc, 0-5400 Sekunden nach Tracerinjektion für (A, C, E, G) $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (Tag 1 Arthritis (GPI): n=4, Kontrolle (Ko): n=4; Tag 3 GPI: n=5, Ko: n=4; Tag 6 GPI: n=5, Ko: n=5; Tag 8 GPI: n=6, Ko: n=3) und für (B, D, F, H) $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ (Tag 1 GPI: n=5, Ko: n=5; Tag 3 GPI: n=6, Ko: n=6; Tag 6 GPI: n=4, Ko: n=4; Tag 8 GPI: n=3, Ko: n=4).

Für beide Tracer wurde sowohl in Arthritis- als auch in Kontrollgelenken die höchste Traceranreicherung einige Minuten nach Tracerinjektion gemessen, gefolgt von einer kontinuierlichen exponentiellen Auswaschkinetik. Von Tag 3 an zeigte sich in den arthritischen Gelenken bei beiden Tracern ein hoher Aktivitätspeak in den ersten Minuten nach Tracerinjektion. Die höchsten Werte wurden dabei für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ an Tag 6 und 8, für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ an Tag 6 er-

reicht. Interessanterweise war die gemessene Aktivität des initialen Peaks ab Tag 3 für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ und $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ vergleichbar. Für den neu entwickelten Hypoxie-Tracer $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ ließ sich die TAC der Arthritis-induzierten Tiere schon 1 Tag nach Anti-GPI-Induktion deutlich von der TAC der Kontrolltiere unterscheiden, die einen geringeren initialen Aktivitätspeak zeigte.

$[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ zeigte an jedem Messtag eine raschere Auswaschung (*Clearance*), sowohl aus Arthritis- als auch Kontrollgelenken. Auffallend ist, dass für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ ausschließlich an Tag 8 eine Varianz in den Aktivitätskurven nach dem initialen Peak zu beobachten ist. Zur besseren Beurteilung der Tracerkinetik von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ wurden an Tag 6 auch dynamische Messungen über 2 Stunden durchgeführt (Abbildung 14).

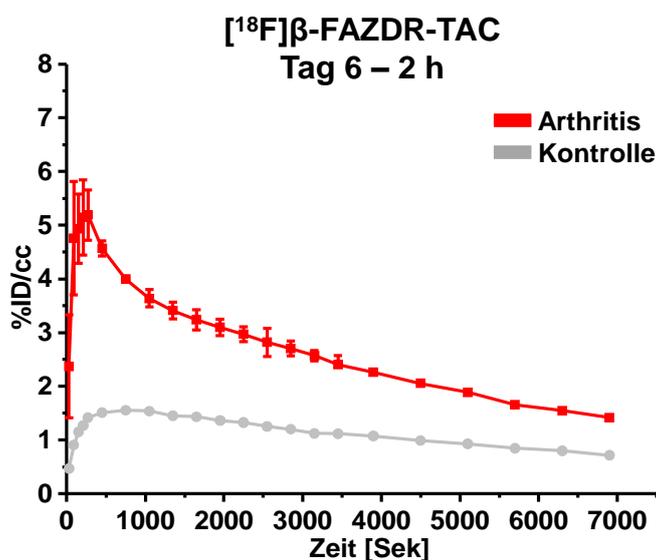


Abbildung 14: TAC von dynamischem $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ -PET-Scan im Gelenk für Arthritis (rot)- und Kontrolltiere (grau), Tag 6 nach Arthritisinduktion. %ID/cc, 0-7200 Sekunden nach Tracerinjektion (Arthritis: n=2, Kontrolle: n=2).

Zum Ende der Messzeit (Zeitraum zwischen 90 Minuten und 2 Stunden) blieb das Verhältnis der Auswaschkinetik zwischen Arthritis- und Kontrollgelenk konstant. Um dieses Verhältnis besser zu verstehen, wurde die Differenz zwischen der Aktivität im arthritischen und gesunden Gelenk mit ihrem jeweiligen Konfidenzintervall errechnet (Abbildung 15). Es fällt auf, dass dieses für beide Tracer über die gesamte Messzeit gesehen leicht abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass aus dem arthritischen Gelenk eine raschere Auswaschung der Aktivität

erfolgt als aus dem gesunden Gelenk. Dieser Effekt scheint jedoch zum Ende der Messzeit abzunehmen, da die Kurve der Differenzen abflacht.

Zum Vergleich wurden auch die Quotienten zwischen der Aktivität in Arthritis- und Kontrollgelenk über die Zeit bestimmt (Abbildung 16). Aufgrund der geringer werdenden Differenzen bei Vorliegen einer Auswaschkinetik bleiben die Quotienten schon ab einem frühen Zeitpunkt nach Tracerinjektion konstant.

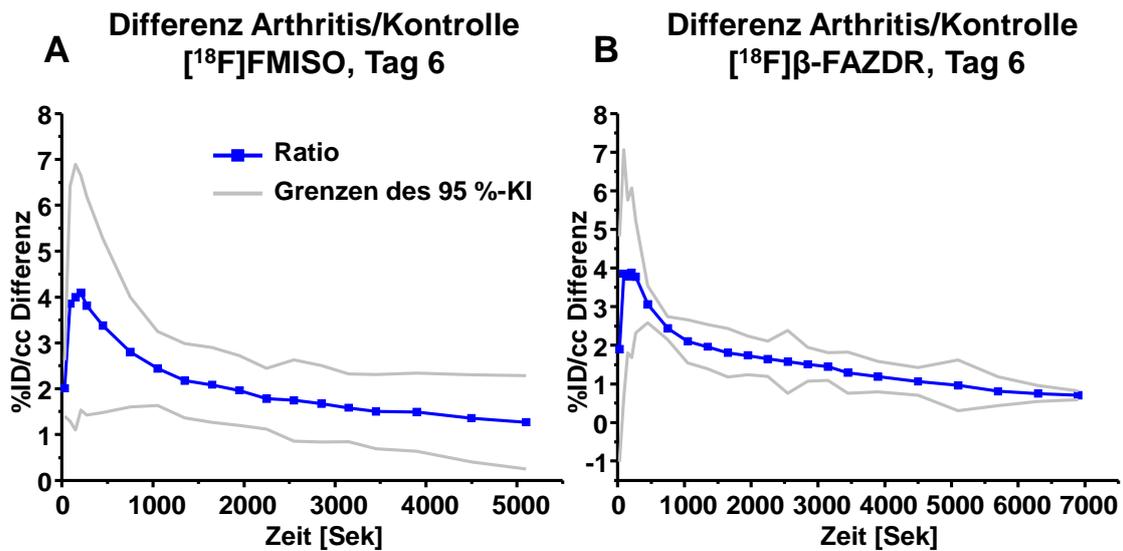


Abbildung 15: Differenz der Aktivität in %ID/cc zwischen Arthritis- und Kontrollgelenk während dynamischen PET-Scans, Tag 6 nach Arthritisinduktion, (A) 0-5400 Sekunden nach Tracerinjektion für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (Arthritis: $n=5$, Kontrolle: $n=5$), (B) 0-7200 Sekunden nach Tracerinjektion für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ (Arthritis: $n=2$, Kontrolle: $n=2$). CAVE: Unterschiedliche Skalierung der Y-Achse.

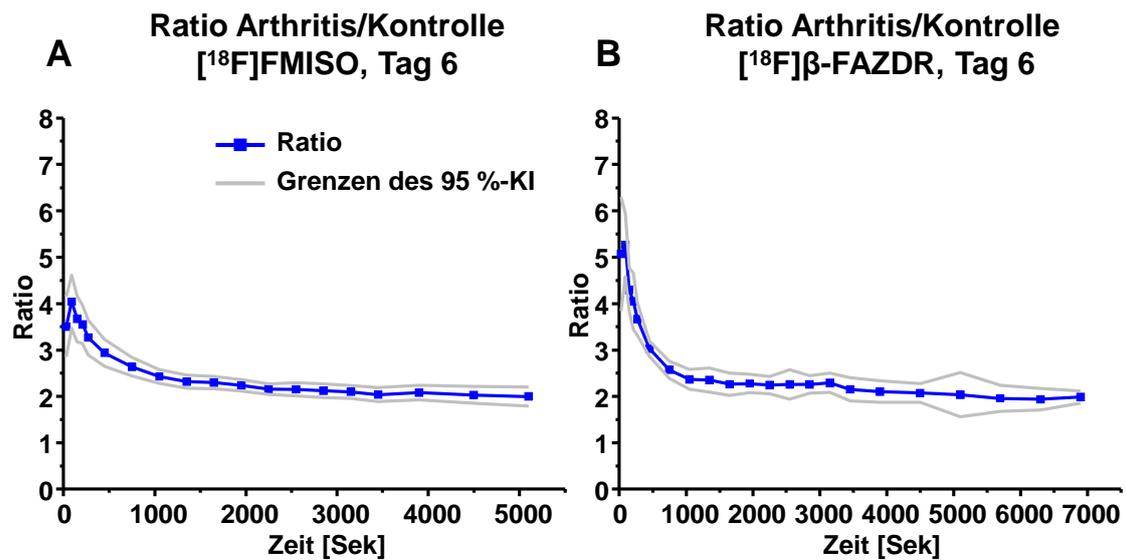


Abbildung 16: Ratio der Aktivität in %ID/cc zwischen Arthritis- und Kontrollgelenk während dynamischen PET-Scan, Tag 6 nach Arthritisinduktion, (A) 0-5400 Sekunden nach Tracerinjektion für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (Arthritis: n=5, Kontrolle: n=5), (B) 0-7200 Sekunden nach Tracerinjektion für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ (Arthritis: n=2, Kontrolle: n=2).

3.2.3 Quantifizierung und Vergleich der $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ und $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ Aufnahme (65 Minuten *post injectionem*)

Aufgrund des Verlaufs der dynamischen Kurven erfolgte die Quantifizierung der Traceraufnahme sowie die statischen Messungen 65 Minuten *post injectionem* (*p.i.*). Zu diesem Zeitpunkt wurde der Einfluss einer vermehrten unspezifischen Aufnahme des Tracers z.B. durch erhöhte Perfusion im arthritischen Gelenk als gering eingeschätzt. Außerdem zeigten frühere Studien zu diesem Zeitpunkt eine Equilibrierung von unspezifischer Traceraufnahme im Gewebe mit der Bluktivität [221]. Es zeigte sich bei beiden Tracern ein Anstieg der Traceraufnahme von Tag 1 bis Tag 6 im arthritischen Gelenk (Abbildung 17).

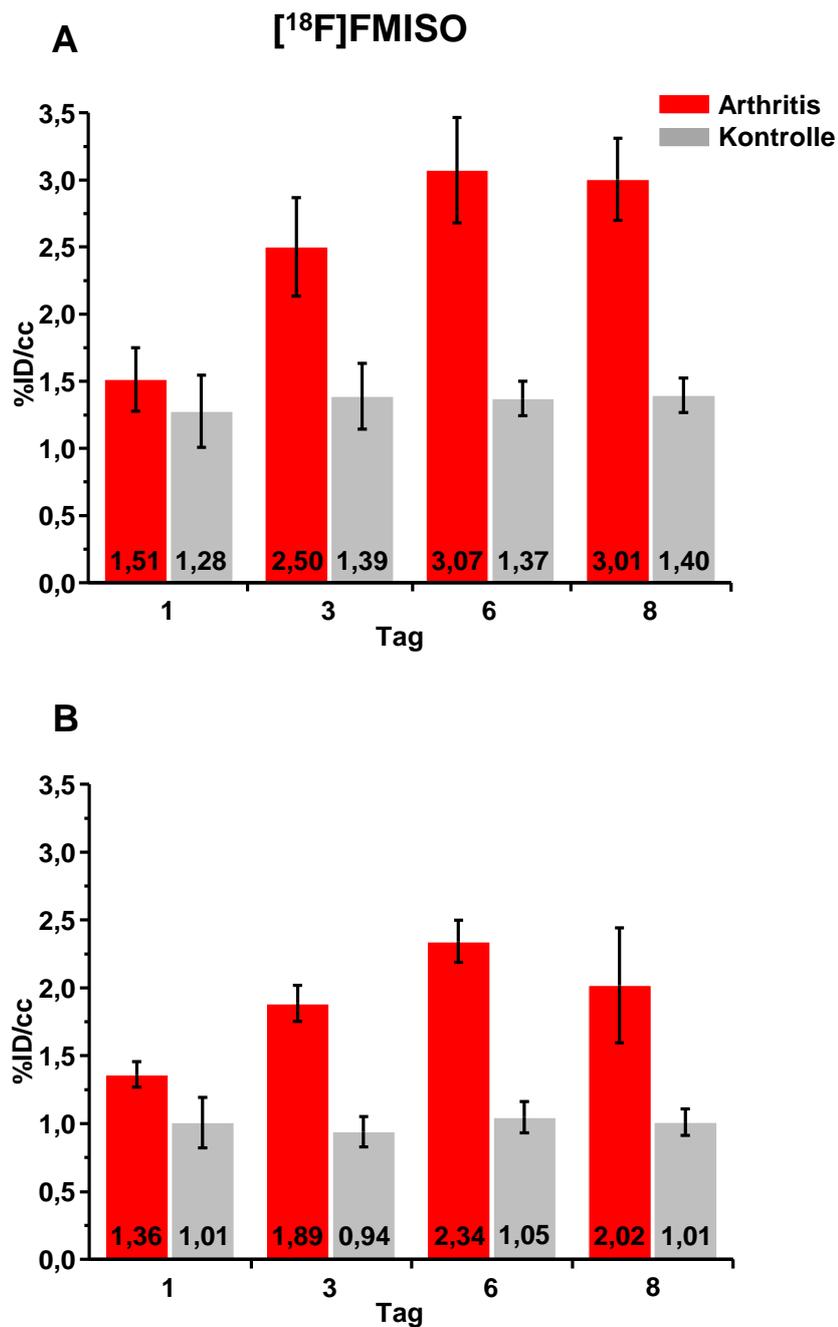


Abbildung 17: Quantifizierung der Radiotracer-Aufnahme im Gelenk für Arthritis- (rot)- und Kontrolltiere (grau), Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion. %ID/cc 65 Minuten *p.i.* für (A) $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (Tag 1 Arthritis (GPI): n=6, Kontrolle (Ko): n=4; Tag 3 GPI: n=8, Ko: n=5; Tag 6 GPI: n=9, Ko: n=6; Tag 8 GPI: n=10, Ko: n=5) und (B) $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ (Tag 1 GPI: n=5, Ko: n=5; Tag 3 GPI: n=6, Ko: n=6; Tag 6 GPI: n=4, Ko: n=4; Tag 8 GPI: n=3, Ko: n=4). Statische und dynamische Messungen wurden berücksichtigt.

An Tag 8 blieb die Aufnahme für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ gegenüber Tag 6 relativ konstant und war für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ leicht rückgängig. Beide Tracer zeigten eine konstan-

te Aufnahme in die Kontrollgelenken mit geringer Varianz zu jedem Messzeitpunkt. Sowohl in Arthritis- als auch in Kontrollgelenken zeigte $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ eine geringere absolute Aktivität zum Zeitpunkt 65 Minuten nach Tracerinjektion, im Vergleich zu $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$. Dies ist auch in den Ganzkörperaufnahmen zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 18) deutlich zu erkennen.

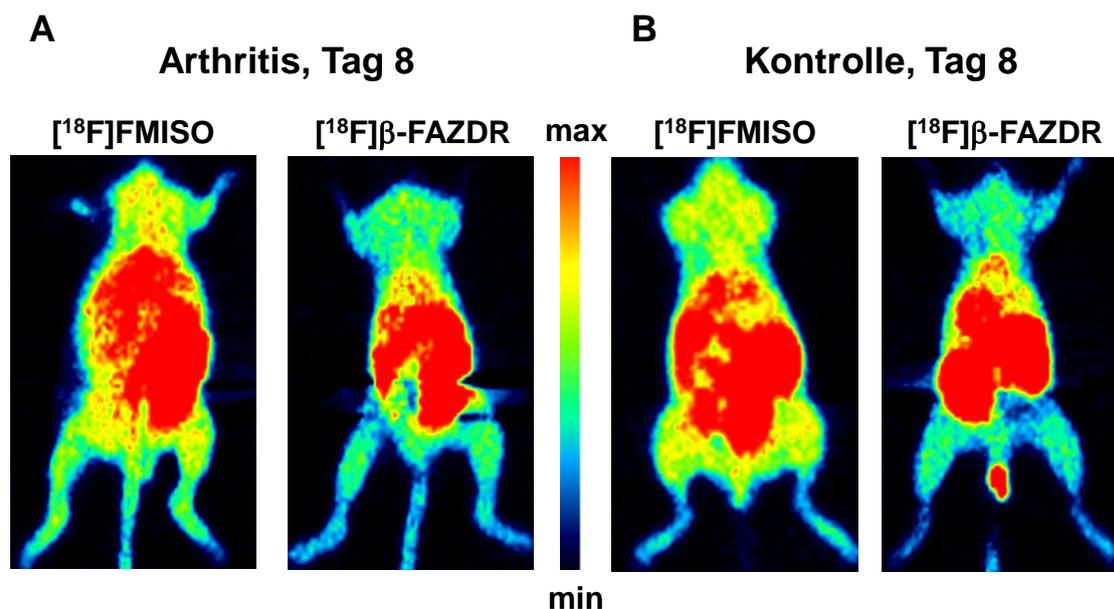


Abbildung 18: Ganzkörper-PET zum Zeitpunkt 65 Minuten *p.i.*, korrigiert für Isotopzerfall und injizierte Dosis, (A) Arthritis- und (B) Kontrolltiere, Tag 8 nach Arthritisinduktion.

Um die Frage nach dem geeigneteren Tracer für eine frühe Detektion der arthritischen Veränderungen im Gelenk zu beantworten, wurden verschiedene Kennzahlen berechnet. Signifikanztests (T-Tests) sagen aus, ob der Mittelwert einer Gruppe (z.B. Arthritistiere, Tracer 1) vom Mittelwert einer Vergleichsgruppe (z.B. Kontrolltiere, Tracer 1) auf einem bestimmten Signifikanzniveau verschieden ist. Ein Vergleich zweier Testergebnisse (also Testergebnis von Tracer 1 mit Testergebnis von Tracer 2) ist jedoch auf gleiche Gruppengrößen angewiesen, da der Test die ursprüngliche Verteilung der Werte je nach Gruppengröße verzerrt (selbst Unterschiede von 1 Tier kann bei der Gruppengrößen unter $n=10$ einen Effekt haben). Es wurde daher für jeden Messzeitpunkt ein Schwellenwert (*threshold*) errechnet, mit dem die Sensitivität und Spezifität der Unterscheidung Arthritis vs. Kontrolle für jeden Tracer maximal wurde (unter der Vo-

raussetzung, dass beide Kennwerte gleich sein sollen). Diese Werte können miteinander verglichen werden und sind nicht von der Gruppengröße abhängig (Tabelle 5). Ein T-Test hätte den gleichen Aussagewert, wenn für alle beteiligten Gruppen dieselbe Gruppengröße vorliegen würde.

Tabelle 5: Vergleich der Sensitivität/Spezifität in % für [^{18}F]FMISO und [^{18}F] β -FAZDR, Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion. In Klammern ist der jeweilige (empirische) Schwellenwert angegeben, bei welchem die maximalen Werte erreicht werden konnten.

Tracer	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 8
[^{18}F]FMISO	68 % (1,40 %ID/cc)	97 % (1,82 %ID/cc)	100 % (2,06 %ID/cc)	100 % (1,91 %ID/cc)
[^{18}F] β -FAZDR	87 % (1,21 %ID/cc)	100 % (1,51 %ID/cc)	100 % (1,81 %ID/cc)	98 % (1,26 %ID/cc)

Es zeigte sich an Tag 1 eine deutlich sensitivere und spezifischere Detektion der Arthritis durch [^{18}F] β -FAZDR im Vergleich zu [^{18}F]FMISO. An allen weiteren Messtagen sind die Ergebnisse vergleichbar. Diese Methode hat den Vorteil, dass nun einzelne Gelenke, von denen nicht bekannt ist, ob sie zur Arthritis- oder Kontrollgruppe zählen, durch den Tracer [^{18}F] β -FAZDR schon in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung zugeordnet werden könnten. Dies stellt eine realistische Situation in der Frühdiagnostik der RA dar.

Führt man trotz oben erwähnter Vorbehalte T-Tests zwischen Arthritis- und Kontrollgruppe an Tag 1 nach Arthritisinduktion durch (Vergleich des Mittelwertes der Arthritisgruppe mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe), ergibt sich ein signifikantes Ergebnis für [^{18}F] β -FAZDR ($p < 0.05$), jedoch nicht für [^{18}F]FMISO. Voraussetzung ist natürlich, dass das Merkmal Arthritis bei beiden Tracern gleich ausgeprägt war. Da für die jeweiligen Messtage zum Teil unterschiedliche Versuchsgruppen verwendet wurden, musste auf eine Durchführung von gepaarten T-Tests zur statistischen Analyse des Fortschreitens der Entzündung verzichtet werden.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für die Stärke eines linearen Zusammenhangs zwischen 2 Variablen [309]. Korreliert man die Messungen der Gelenkdurchmesser der Arthritis- und Kontrollgruppe gemeinsam mit den PET-Daten an allen Messtagen, ergibt sich für beide Tracer eine sehr gute Korrelation (Abbildung 19 und Tabelle 6).

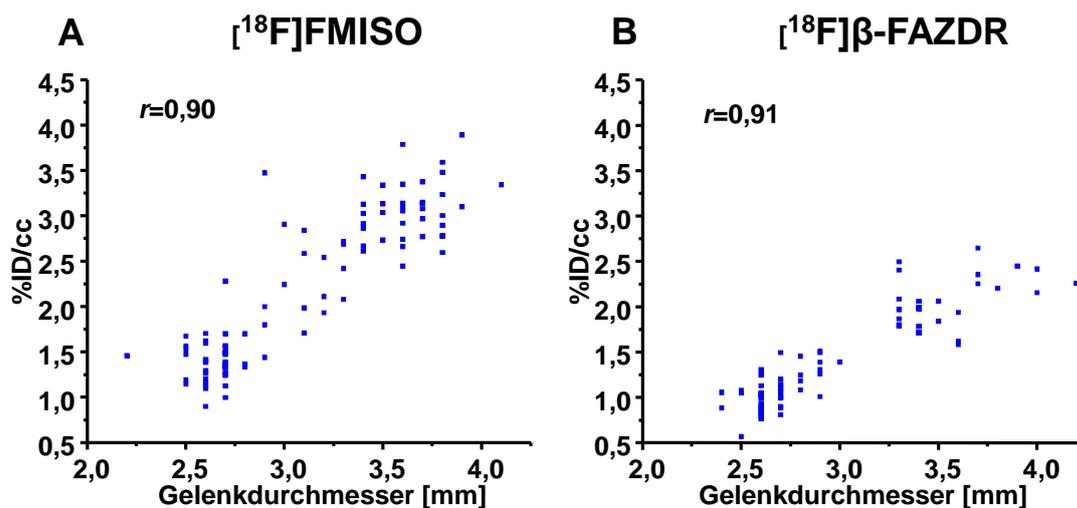


Abbildung 19: Korrelation von %ID/cc zu Gelenkdurchmesser bei Arthritis- und Kontrolltieren für (A) $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ ($n=103$) und (B) $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ ($n=72$).

Diese Korrelation ist jedoch sehr wahrscheinlich nur zu einem geringen Teil durch einen kausalen Zusammenhang bedingt. Vielmehr liegt hier der Effekt einer dritten Variablen vor, der Arthritis. Zum einen äußert diese sich in einer sog. Gemeinsamkeitskorrelation, d.h. durch das zeitliche Fortschreiten der Entzündung wird sowohl Gelenkschwellung als auch Traceraufnahme vermehrt [308]. Gleichzeitig liegt auch eine sog. Inhomogenitätskorrelation vor. Durch das Zusammenfassen von mehreren Messtagen (also „schwache Arthritis“ oder Kontrolle, im Vergleich mit „starker Arthritis“) ergibt sich schon ein Teil der Korrelation. Meist ist die Grenze zwischen dem einen und dem anderen Effekt nicht klar zu ziehen [310]. Zur genaueren Interpretation der Ergebnisse wurden daher zusätzlich die Korrelationskoeffizienten der jeweiligen (annähernd) homogenen Gruppen (z.B. Messtag 6 und 8 mit „starker Arthritis“, oder nur Kontrollen) berechnet (Tabelle 6). Es zeigte sich eine signifikant schlechtere Korrelation zwischen Gelenkschwellung und Hypoxie in fortgeschrittener Arthritis (Tag 6 und

8), im Vergleich zu Tag 1 und 3. Innerhalb der Kontrollgruppe ergab sich keine Korrelation zwischen Gelenkdurchmesser und Traceraufnahme.

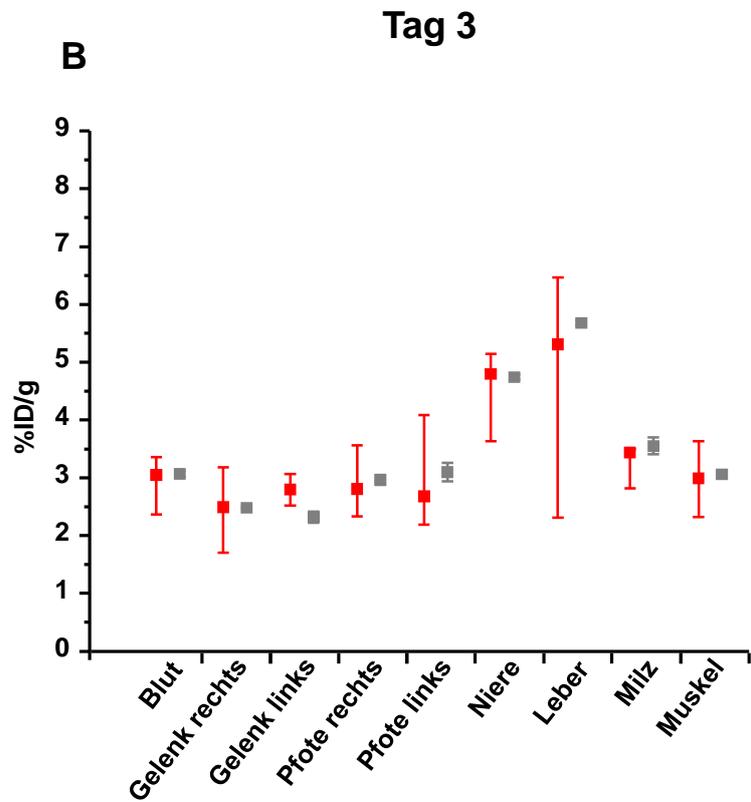
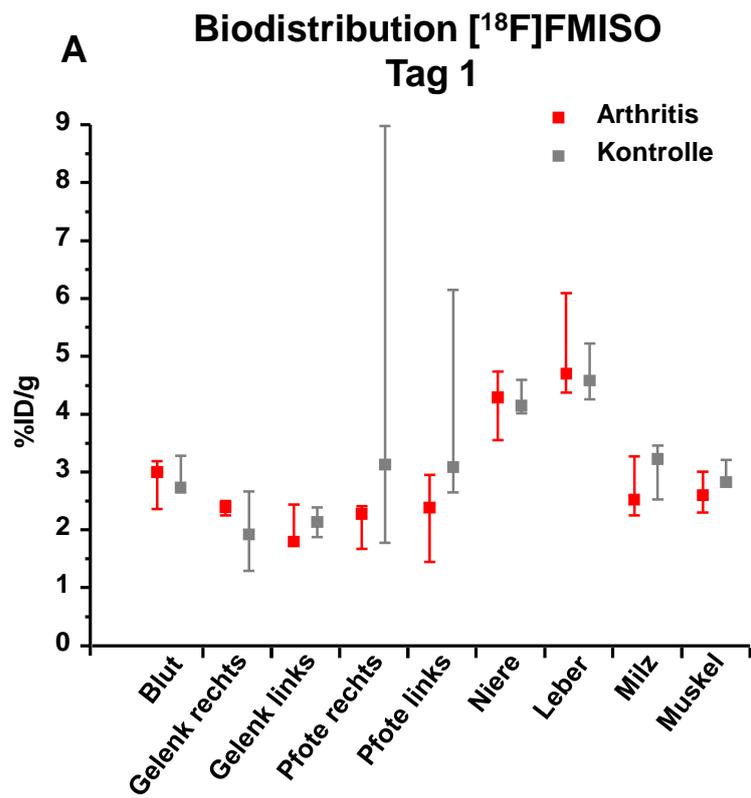
Tabelle 6: Pearson-Korrelationsquotient r zwischen Gelenkdurchmesser und Traceraufnahme für [^{18}F]FMISO und [^{18}F] β -FAZDR. In Klammern steht die jeweilige Gruppengröße (Einzelgelenke). *= auf dem 5 %-Niveau signifikant von Arthritis (Tag 1+3) verschieden.

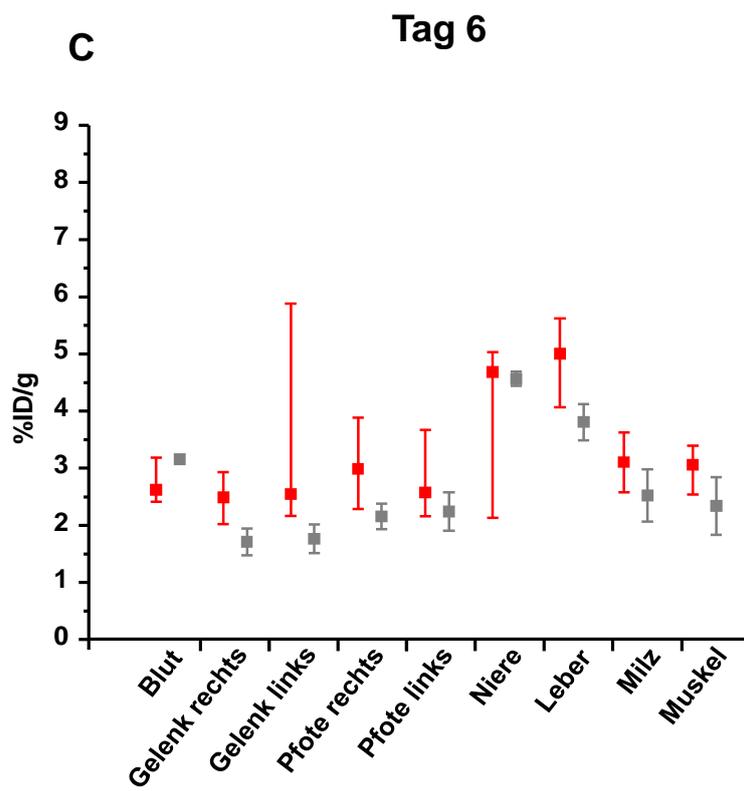
Gruppe	[^{18}F]FMISO	[^{18}F] β -FAZDR
Gesamt (Arthritis und Kontrolle)	0,90 (n=103)	0,91 (n=72)
Arthritis (Tag 1+3+6+8)	0,80 (n=63)	0,78 (n=36)
Arthritis (Tag 1+3)	0,77 (n=27)	0,86 (n=22)
Arthritis (Tag 3+6)	0,54 (n=31)	0,72 (n=20)
Arthritis (Tag 6+8)	0,20* (n=36)	0,10* (n=14)
Kontrolle (Tag 1+3+6+8)	- 0,02 (n=40)	0,35 (n=36)

Auf die Berechnung des Bestimmtheitsmaß (r^2) wurde verzichtet, da nicht von einer überwiegend kausalen Korrelation auszugehen ist.

3.2.4 Ex vivo [^{18}F]FMISO und [^{18}F] β -FAZDR Biodistribution

Nach Beendigung der PET-Studien wurde alle Tiere geopfert und an allen Messtagen eine Organentnahme zur ex vivo Biodistributionsanalyse durchgeführt (Abbildungen 20 und 21).





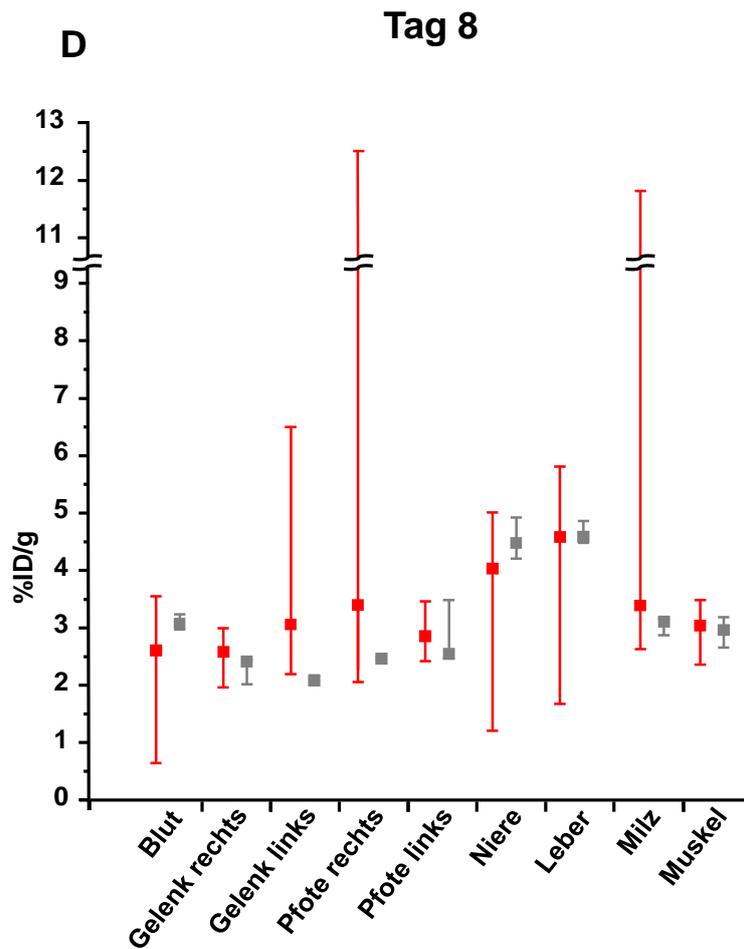
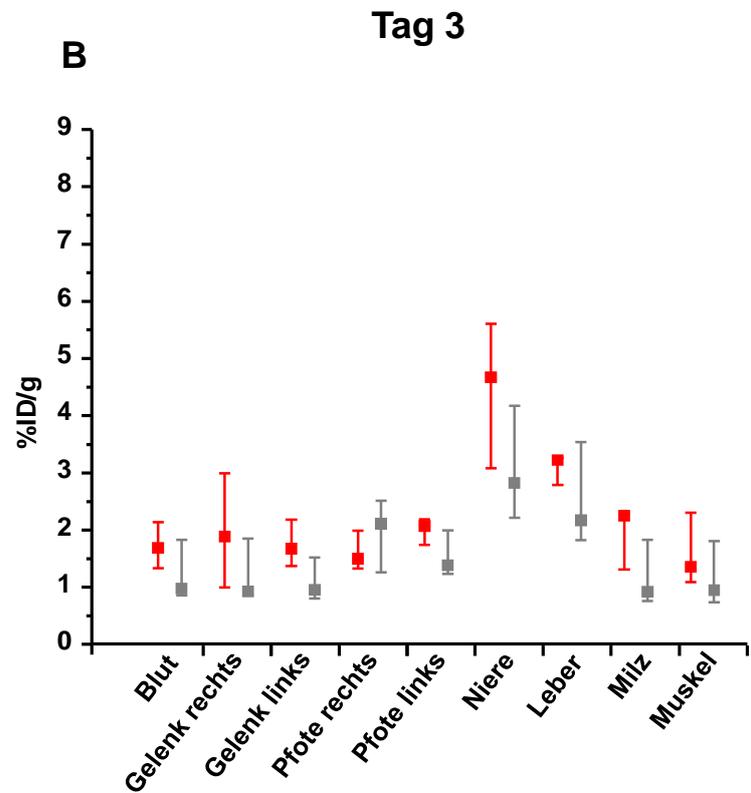
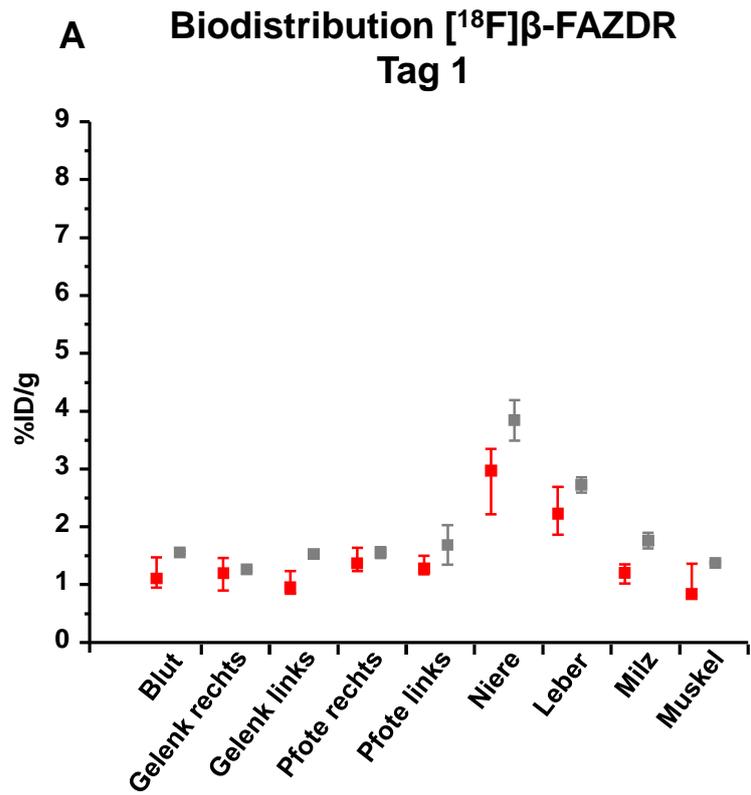


Abbildung 20: [^{18}F]FMISO-Biodistribution, Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion für Arthritis- (rot) und Kontrolltiere (grau). Dargestellt sind Median, Minimum und Maximum. %ID/g, 102-117 Minuten nach Tracerinjektion für [^{18}F]FMISO (**A**): Arthritis (GPI): n=3, Kontrolle (Ko): n=3 (n=2 für Gelenk rechts); **B**: GPI: n=5 (n=4 für Gelenk links), Ko: n=2; **C**: GPI: n=5 (n=3 für Blut), Ko: n=2 (n=1 für Blut); **D**: GPI: n=5, Ko: n=3).



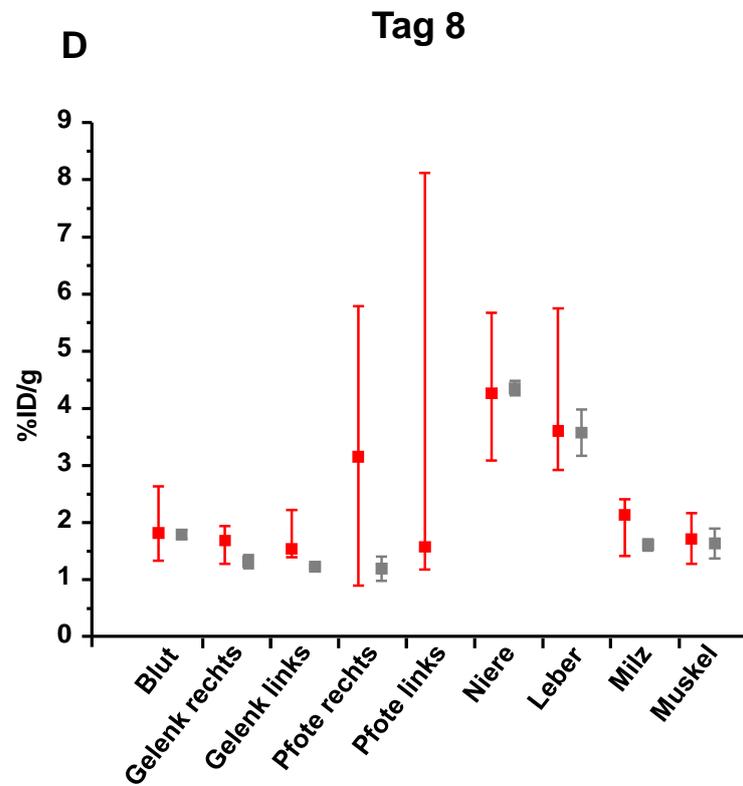
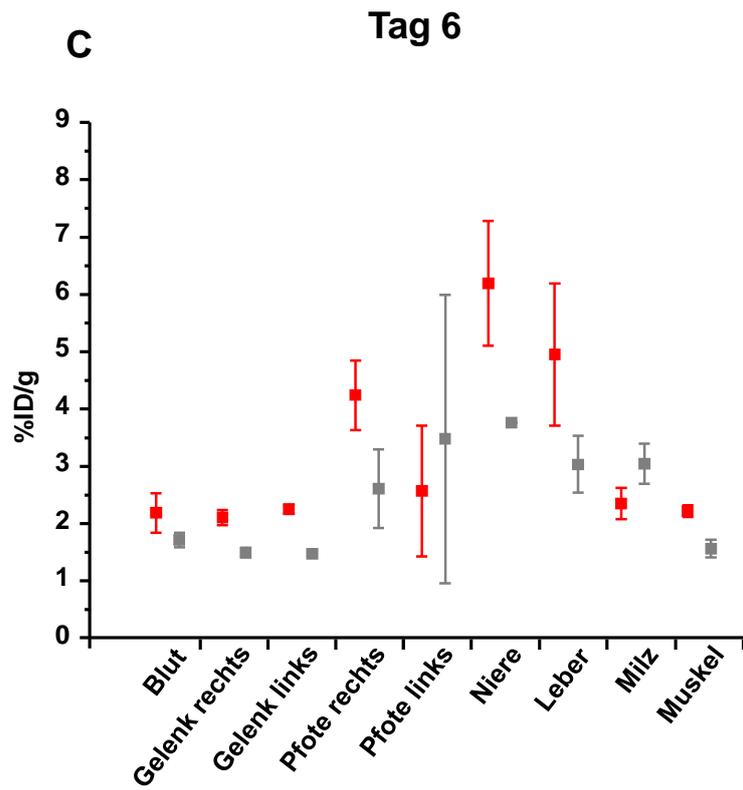


Abbildung 21: [^{18}F] β -FAZDR-Biodistribution, Tag 1, 3, 6 und 8 nach Arthritisinduktion für Arthritis- (rot) und Kontrolltiere (grau). Dargestellt sind Median, Minimum und Maximum. %ID/g, 103 Minuten nach Tracerinjektion für [^{18}F] β -FAZDR (**A**: Arthritis (GPI): n=3, Kontrolle (Ko): n=2; **B**: GPI: n=3, Ko: n=3; **C**: GPI: n=2, Ko: n=2; **D**: GPI: n=3, Ko: n=2 (n=1 für Pfote links)).

Bei den gesunden Kontrolltieren war eine höhere [^{18}F]FMISO-Ganzkörperaktivität im Vergleich zu [^{18}F] β -FAZDR erkennbar, passend zur schnelleren Auswaschung des hydrophileren Tracers [^{18}F] β -FAZDR. Bei beiden Tracern war die Aktivität in Niere (Median (Arthritis) an Tag 3: [^{18}F]FMISO: 4,79 %ID/g; [^{18}F] β -FAZDR: 4,67 %ID/g) und Leber (Median (Arthritis) an Tag 3: [^{18}F]FMISO: 5,31 %ID/g; [^{18}F] β -FAZDR 3,22 %ID/g) gegenüber Referenzgeweben wie dem Muskel (Median (Arthritis) an Tag 3: [^{18}F]FMISO: 2,99 %ID/g; [^{18}F] β -FAZDR: 1,36 %ID/g) erhöht, was auf eine Rolle dieser Organe bei Metabolismus und Ausscheidung der Tracer hindeutet. Interessanterweise stieg die Ganzkörperaktivität von [^{18}F] β -FAZDR für arthritische Tiere in allen Organen von Tag 1 bis Tag 6 an (Median für Muskel (Arthritis): Tag 1: 0,84 %ID/g; Tag 3: 1,36 %ID/g; Tag 6: 2,22 %ID/g; Tag 8: 1,72 %ID/g). Bei Kontrolltieren war diese Tendenz nicht erkennbar (Median für Muskel (Kontrolle): Tag 1: 1,37 %ID/g; Tag 3: 0,95 %ID/g; Tag 6: 1,56 %ID/g; Tag 8: 1,64 %ID/g). An Tag 6 und Tag 8 war die Aufnahme von [^{18}F] β -FAZDR in Niere (Median Tag 6 (Arthritis): 6,19 %ID/g) und Leber (Median Tag 6 (Arthritis): 4,95 %ID/g) sogar größer oder vergleichbar mit den Werten für [^{18}F]FMISO (Median Tag 6 (Arthritis) für Leber: 5,01 %ID/g, Niere: 4,68 %ID/g). Beim Referenztracer [^{18}F]FMISO war die Aktivität in Muskel und Blut sowohl bei Arthritis- als auch Kontrolltieren über alle Messtage annähernd konstant.

Die Aktivität in den arthritischen Sprunggelenken (rechts und links) stieg bei beiden Tracern von Tag 1 bis Tag 6 leicht an. Die Aktivität in den Kontrollgelenken blieb annähernd konstant. Der Median in arthritischen Gelenken lag für beide Tracer an den Messtagen 3, 6 und 8 höher, im Vergleich zu Kontrollgelenken. Interessant ist der Vergleich der Gewebeaktivität mit der Blutaktivität, um eine unspezifische Anreicherung im Gewebe einschätzen zu können. Hier zeigte sich für [^{18}F] β -FAZDR an keinem Messtag ein deutlicher Unterschied zwischen der Aktivität in den arthritischen Gelenken und der Blutaktivität (Median Tag 6 für Gelenk rechts: 2,11 %ID/g; Blut: 2,19 %ID/g). Für [^{18}F]FMISO-

injizierte Arthritistiere war die maximale Aktivität in den Gelenken an Tag 6 und Tag 8 höher als die maximale Aktivität im Blut (Maximum Tag 6 für Gelenk links: 5,88 %ID/g; Blut: 3,19 %ID/g). Die [^{18}F]FMISO-injizierten Kontrolltiere zeigten an allen Messtagen eine niedrigere Aktivität in den Gelenken, im Vergleich zum Blut (Median Tag 6 für Gelenk rechts: 1,71 %ID/g; Blut: 3,16 %ID/g).

3.2.5 *Ex vivo* [^{18}F]FMISO und [^{18}F]β-FAZDR Autoradiographie

Die Autoradiographie-Bilder der Radioaktivitätsverteilung können im Prinzip nur dann miteinander verglichen werden, wenn Arthritis- und Kontrollmaus die gleiche Traceraufnahmezeit hatten, eine vergleichbare injizierte Dosis erhielten und, da der Phosphor-Imager nicht für Zerfall korrigiert, im Messprotokoll zeitnah nacheinander ausgelesen wurden. In Abbildung 22 sind repräsentative Autoradiographie-Bilder zum qualitativen Vergleich Arthritis-Kontrolle für [^{18}F]β-FAZDR und [^{18}F]FMISO dargestellt. Es ist anhand dieser Bilder kein Vergleich zwischen den Tracern möglich. Beide Tracer verteilten sich im arthritischen Gelenk nicht homogen sondern in *Hotspots*. Die Aktivität war dabei für beide Tracer deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle, was die Ergebnisse der PET-Messungen bestätigt.

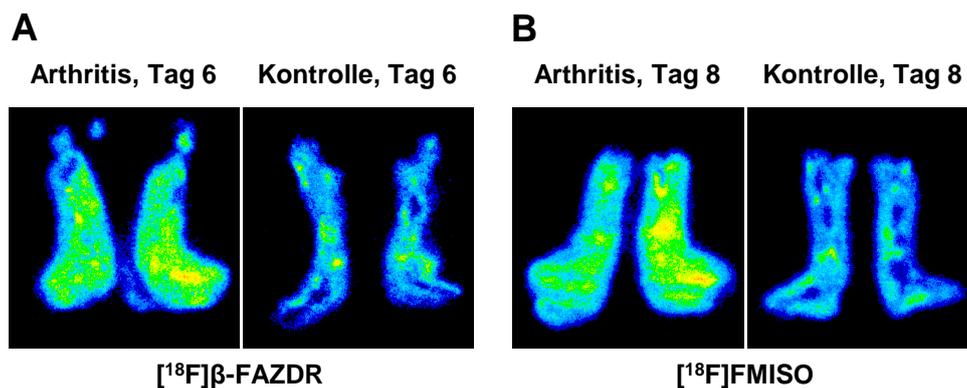


Abbildung 22: Autoradiographie-Bilder für (A) [^{18}F]β-FAZDR (Tag 6)- und (B) [^{18}F]FMISO (Tag 8)-injizierte Tiere.

Abbildung 23 zeigt zum Vergleich [^{18}F]FMISO-Autoradiographie-Schnitte, die im Anschluss H&E-gefärbt wurden. Die maximale Tracer-Anreicherung konnte im Bereich des inflammatorischen Ödems sowie wahrscheinlich im Bereich von

Knochenneuformation gefunden werden. Die *Hotspots* im Kontrollgelenk sind am Ehesten durch schlechte Schnittqualität und Überlagerung mehrerer Gewebeschichten bei anspruchsvoller Prozessierung der knöchernen Strukturen bedingt.

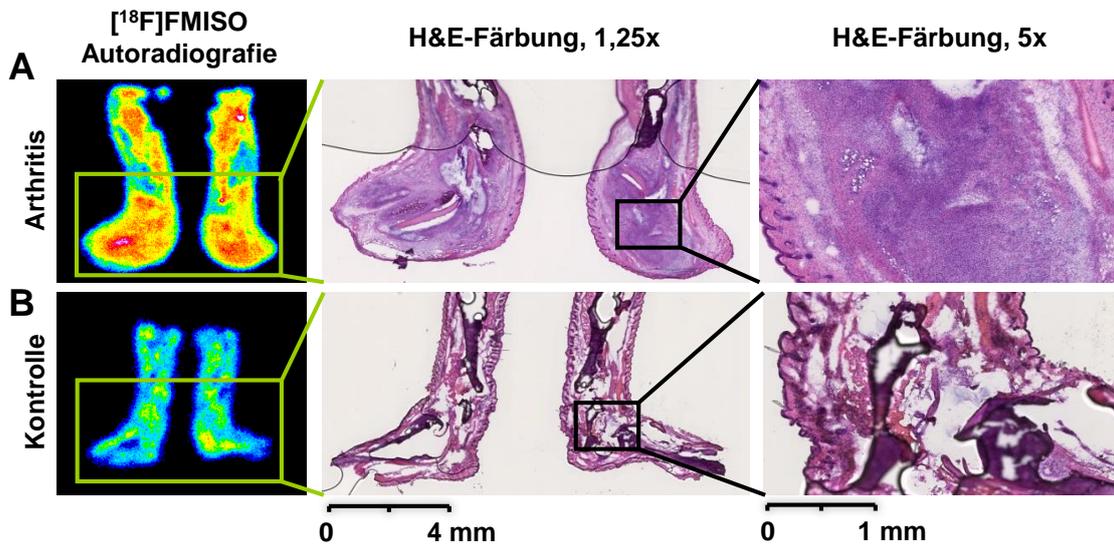


Abbildung 23: H&E-gefärbte Autoradiographie-Schnitte (20 µm) zur Beurteilung der Tracerverteilung im Gewebe für $[^{18}\text{F}]$ FMISO-Autoradiographie, Tag 8 nach Arthritisinduktion für (A) Arthritis- und (B) Kontrolltiere. CAVE: Anders gewählte Darstellungs-Intensität der Autoradiografie-Schnitte i. Vgl. zu Abb. 22 aus Gründen der Anschaulichkeit, kein Korrelat für erhöhte Traceraufnahme.

3.2.6 *Ex vivo* Pimonidazol-Immunhistochemie

An Tag 6 und 8 konnte eine stark vermehrte Anreicherung des Hypoxiemarkers Pimonidazol in arthritischen Gelenken beobachtet werden (Abbildung 24, bereits veröffentlicht unter [311]). Die braun gefärbten Pimonidazol-Antigene fanden sich in einzelnen *Hotspots* im Bereich der Synovialis und im umliegenden Gewebe. Dies korreliert gut mit der Autoradiographie und weist auf eine inhomogene Verteilung der Hypoxie im Gewebe hin. Die starke Bindung von Pimonidazol in Schweißdrüsen kann wohl zum Großteil als spezifisch Hypoxie-abhängig angesehen werden [312; 313] und diente somit als Positiv-Kontrolle der Färbung.

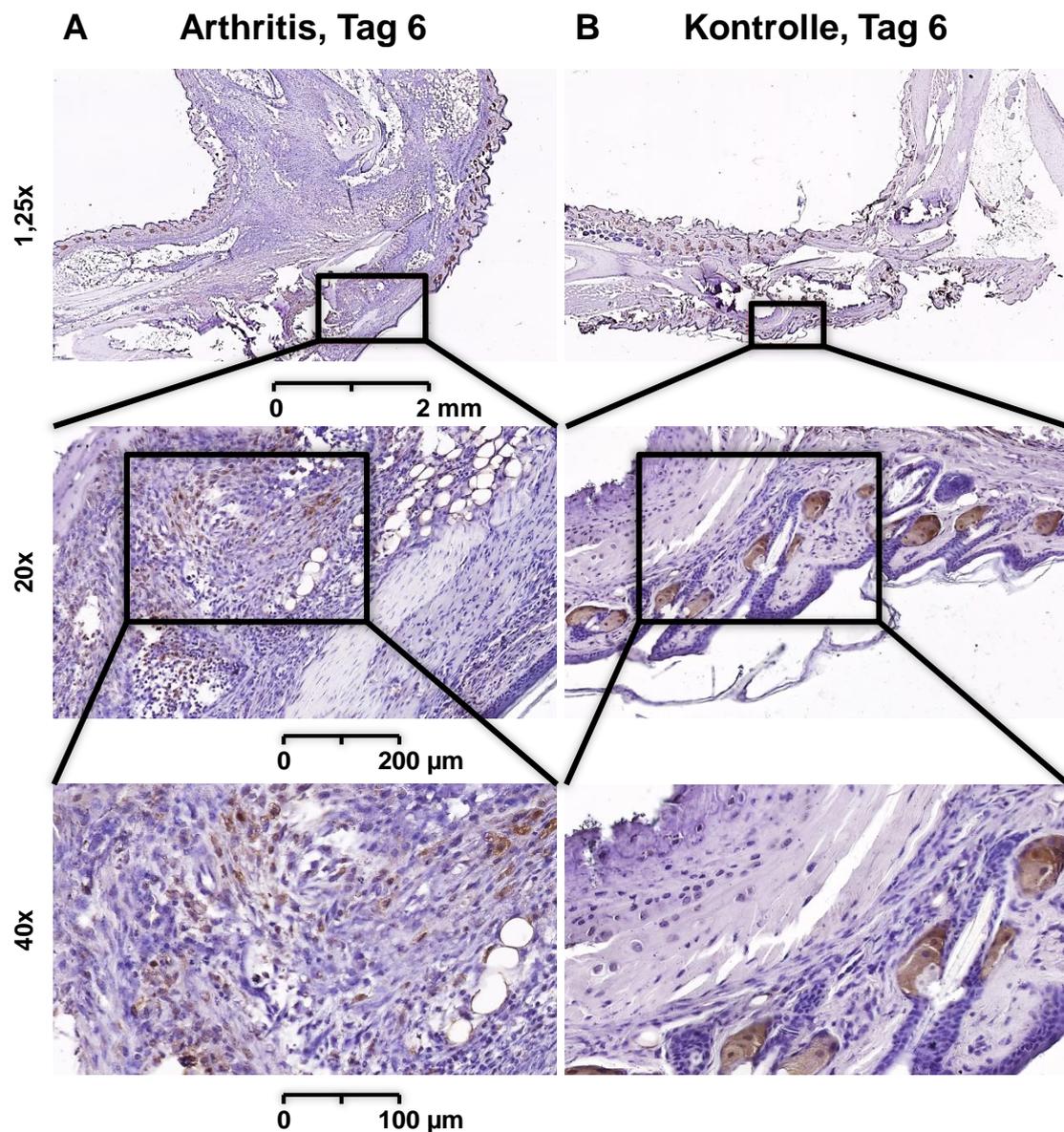


Abbildung 24: Repräsentative Pimonidazol-Immunhistochemie, Tag 6 nach Arthritisinduktion für (A) Arthritis- und (B) Kontrolltiere, EDTA-Dekalzifizierungsprotokoll. Adaptiert nach Fuchs *et al.*, 2017 [311] (Keine formale Genehmigung des Verlags zur Veröffentlichung notwendig (Stand 3/2018)).

Eine starke Färbung war stets an den metabolisch sehr aktiven Stellen der Knochenneubildung zu erkennen (Abbildung 25A). Die Isotyp-Kontrolle bewies die Spezifität der Färbung (Abbildung 25B).

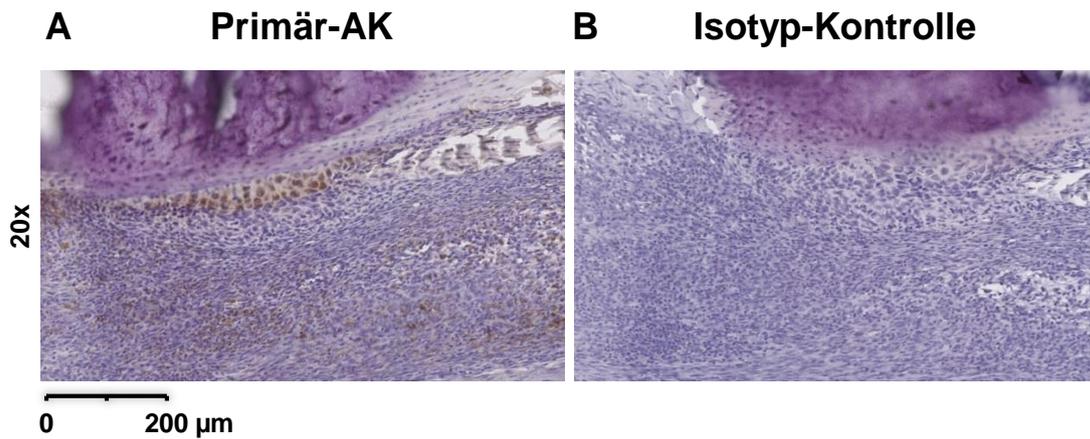


Abbildung 25: Pimonidazol-Anreicherung in arthritischer Knochenneuf ormation, Tag 6 nach Arthritisinduktion mit (A) Primär-AK und (B) Isotyp-Kontrolle, EDTA-Dekalzifizierungsprotokoll.

Es fanden sich große Unterschiede in der Stärke der Antigenfärbung, abhängig vom verwendeten Protokoll, jedoch auch innerhalb einer Gruppe. Die mit Säure dekalzifizierten Gewebe zeigten generell eine stärkere Pimonidazolfärbung, auch in der Kontrolle (Abbildung 26). Unterschiede in der Antigenfärbung innerhalb der mit EDTA dekalzifizierten Gruppe deuten auf individuelle, Tier-abhängige Einflussfaktoren in der Stärke der Antigenfärbung oder Pimonidazol-Anreicherung hin.

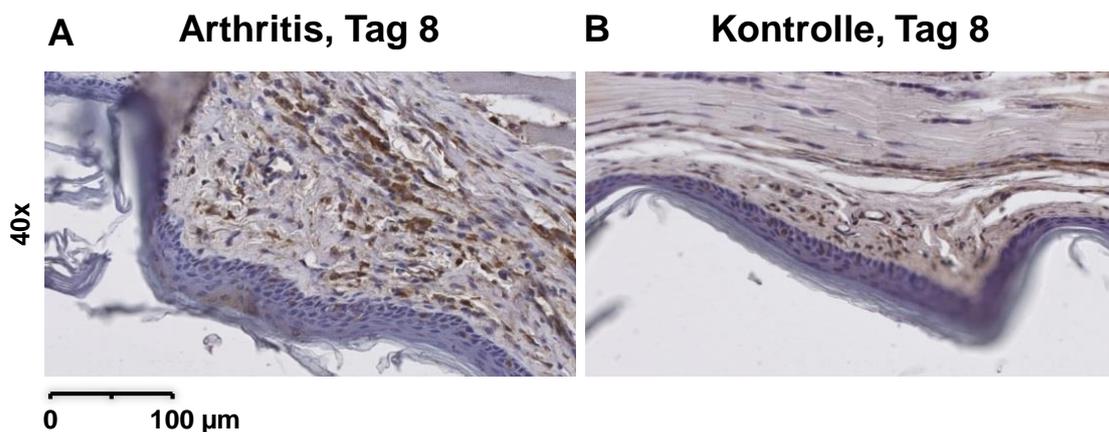


Abbildung 26: Pimonidazol-Immunhistochemie, Tag 8 nach Arthritisinduktion für (A) Arthritis- und (B) Kontrolltiere, Säure-Dekalzifizierungsprotokoll.

An Tag 1 nach Arthritisinduktion konnte keine vermehrte Pimonidazol-Anreicherung in arthritischen Gelenken detektiert werden (Abbildung 27). Dieses Ergebnis ist jedoch nur eingeschränkt beurteilbar, da aufgrund der Qualität

der Schnitte in den meisten Tieren nur die Synovialstruktur des dorsalen Gelenkspaltes analysiert werden konnte.

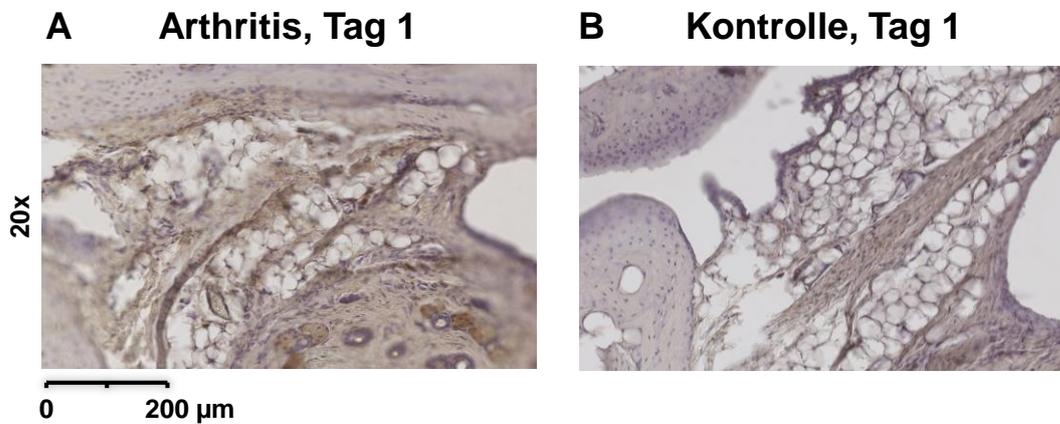


Abbildung 27: Pimonidazol-Immunhistochemie, Tag 1 nach Arthritisinduktion für (A) Arthritis- und (B) Kontrolltiere, EDTA-Dekalzifizierungsprotokoll.

3.2.7 Sequentielles [^{18}F]FMISO-PET/MRT

PET/MRT-Messungen erlauben die Kombination von anatomischen MRT-Informationen mit funktionellen PET-Informationen wie dem Gewebe-Oxygenierungszustand. Essentiell dabei ist die Fixierung des Zielgewebes, da das inflammatorische Ödem kein statisches Gewebe und somit bei veränderter Körperhaltung unter Umständen nicht mehr beurteilbar ist. Neuere Studien werden daher bevorzugt mit simultanen PET/MRT-Messungen durchgeführt. Abbildung 28 zeigt ein gut überlagertes, sequentiell aufgenommenes [^{18}F]FMISO-PET/MRT-Bild mit einer T2-gewichteten Anatomiesequenz.

Die Messungen zeigten, dass die selektive Zuordnung der Tracerverteilung mittels MRT-Anatomie möglich ist. Die Traceranreicherung erfolgte analog den Autoradiographie- und Pimonidazolanalysen nicht homogen im Gewebe, sondern in *Hotspots*. Die anatomische Lage dieser Stellen vermehrter Traceraktivität war dabei zwischen mehreren Versuchstieren sehr heterogen. In Abbildung 28 ist eine Tracermehranreicherung in T2-hyperintensem Gewebe dorsal der Knochen zu sehen. Im transversalen Schnitt scheint diese Mehranreicherung die Knochenkontur zu umgeben.

Eine Zuordnung dieser *Hotspots* zu histologischen Strukturen ist aufgrund der Scannerauflösung jedoch nicht sehr genau. Eine H&E-Färbung der PET/MRT-gemessenen Gelenke zeigte im Bereich dorsal der Knochen ein inflammatorisches Infiltrat mit verdichteten Gewebestrukturen und Knochenneuanbauten (Abbildung 28D). Denkbar wäre auch eine direkte Korrelation der Traceranreicherung mit immunhistochemischen Untersuchungen zur Gewebeoxygenierung. Da das sonst in dieser Arbeit eingesetzte Pimonidazol jedoch denselben Bindungsmechanismus wie die Nitroimidazoltracer benutzt, sind diese Untersuchungen, zeitlich dicht nach den PET-Messungen nicht uneingeschränkt möglich.

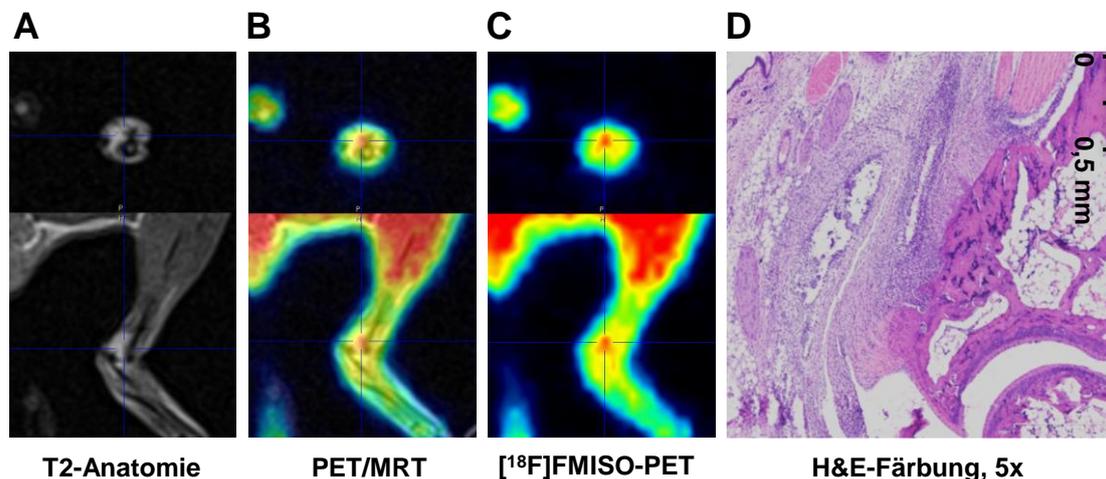


Abbildung 28: Sequentiell aufgenommene $[^{18}\text{F}]$ FMISO-PET/MRT, Tag 8 nach Arthritisinduktion mit (A) T2-Anatomiesequenz, (B) fusioniertem PET/MRT, (C) $[^{18}\text{F}]$ FMISO-PET und (D) H&E-gefärbte Histologie des zuvor *in vivo* gemessenen Gelenkes.

3.3 Diffusionsgewichtete MRT-Messungen

Für die Berechnung der ADC-Karte aus den diffusionsgewichteten Sequenzen wurden die b -Werte 150, 300, 600 und 1000 benutzt. Dies sollte eine gute Anpassung der b -Wert-Kurve bei geringem Einfluss der Perfusion gewährleisten [246]. Bei der Analyse der einzelnen diffusionsgewichteten Datensätze zeigte sich ein sehr geringes *Signal-to-Noise-Verhältnis* bei den Kontrolltieren, wahrscheinlich aufgrund der geringen Protonendichte im Gewebe. Schon bei niedrigen b -Werten war das Diffusionssignal im Hintergrundrauschen nicht mehr ab-

zugrenzen. Daher ließ sich mit diesen Datensätzen kein verlässlicher ADC-Wert für die Kontrolltiere berechnen. Eine sehr geringe Signalstärke bei höheren b -Werten, unterhalb eines bestimmten *Noise-Level*s, führt über eine zu flache Anpassung der Kurve zu geringeren und zusätzlich unterschätzten ADC-Werten. Aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit und Validität der Ergebnisse musste daher auf eine Auswertung der Kontrolltiere verzichtet werden. Ein zusätzliches Problem war die unterschiedliche Qualität der T2-Sequenzen, welches sich auch auf die ADC-Berechnung auswirkt. Grund hierfür dürfte die Fokussierung des Scanners auf beide Beine, sowie geringe Unterschiede in der Platzierung der Tiere im FOV des MRT-Scanners sein.

Bei den Arthritistieren zeigte sich ab Tag 1 nach Antikörperinjektion ein deutlich messbares ADC-Signal (dies ist jedoch nicht als „mehr Diffusion“ im Vergleich zur Kontrolle zu deuten, da bei den Kontrollen keine Aussage getroffen werden kann). Qualitativ veränderte sich das ADC-Signal während des Messzeitraums nicht, sondern war immer beidseits des Gelenks in ödematösen Strukturen zu detektieren (Abbildung 29). Die Verteilung erfolgte jedoch nicht homogen und der Fokus der ADC-Karte war häufig in einem Bereich oberhalb des OSG auszumachen. Nach eingehender Analyse der DWI-Rohdaten konnten in dieser orientierenden Studie nur wenige Tiere quantitativ ausgewertet werden (Tag 3: $n=1$, Tag 6: $n=2$). Die Platzierung der ROI erfolgte dabei im ADC-*Hotspot* und nicht am OSG orientiert. Es zeigte sich jedoch überraschenderweise ein deutlich erhöhter ADC-Wert an Tag 3 nach Arthritisinduktion ($ADC: 1464 \cdot 10^{-6}/\text{mm}^2$), im Vergleich zu Tag 6 ($ADC: 949 \pm 169 \cdot 10^{-6}/\text{mm}^2$).

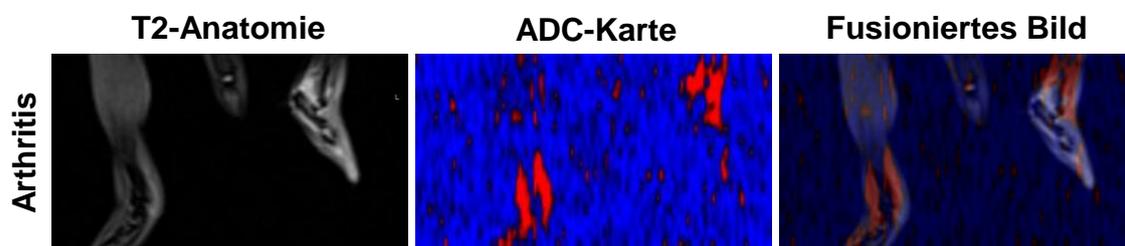


Abbildung 29: Parametrische ADC-Karte und Fusion mit T2-gewichtetem Anatomiebild bei einem Anti-GPI-injizierten Tier, Tag 6 nach Arthritisinduktion.

3.4 Validierung des therapeutischen Potenzials individueller Inhibitoren der p38-MAPK und dessen Monitoring mit [¹⁸F]FMISO

3.4.1 P38-MAPK-Immunhistochemie in Anti-GPI-induzierter RA

Um erstmals die erhöhte Expression der p38-MAPK im passiven K/BxN-Modell und folglich die Validität als therapeutisches Target zu beweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Es zeigte sich eine intensive Färbung in den arthritischen Tieren (ohne Inhibitorgabe), im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 30). Dieses Ergebnis weist auf eine erhöhte Expression der Kinase in diesem Mausmodell der RA hin.

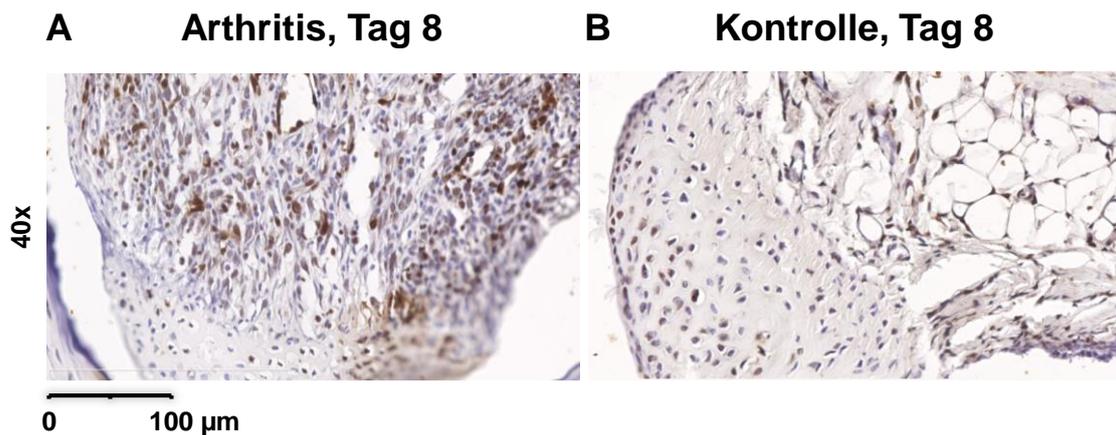


Abbildung 30: P38-MAPK-Immunhistochemie in (A) Arthritis- und (B) Kontrolltieren der PBS-Therapiegruppe.

3.4.2 Therapeutischer Effekt der MAPK-Inhibitoren auf die Gelenkschwellung im Verlauf der Anti-GPI-induzierten RA

Der Verlauf der Gelenkschwellung bei arthritischen Versuchstieren unter Therapie mit MAPK-Inhibitoren oder PBS ist in Abbildung 31 dargestellt.

Die mit dem dualen p38/PDE-4-Inhibitor ML 3595 therapierten Tiere entwickelten im Verlauf der Arthritis eine geringere Gelenkschwellung, im Vergleich zu PBS behandelten Mäusen (Abbildung 31A). Sogar schon an Tag 1 nach Induktion der Arthritis gab es eine signifikante Reduktion des Gelenkdurchmesser in

Tieren unter ML 3595-Therapie (ML 3595: $2,76 \pm 0,07$ mm; PBS: $2,98 \pm 0,06$ mm). Die Reduktion betrug 0,22 mm (Konfidenzintervall (KI) 0,10 bis 0,34). Auch 5 Tage nach Antikörperinjektion wurde eine signifikant reduzierte Gelenkschwellung von 0,31 mm (KI 0,01 bis 0,61) in der ML 3595-Gruppe ($3,24 \pm 0,18$ mm) gemessen, im Vergleich zu PBS behandelten Tieren ($3,55 \pm 0,13$ mm). Die maximale Gelenkschwellung in beiden Versuchsgruppen wurde an Tag 6 beobachtet (ML 3595: $3,28 \pm 0,35$ mm; PBS: $3,65 \pm 0,07$ mm). Die Differenz von 0,37 mm (KI -0,07 bis 0,81) bedeutete eine Reduktion der Gelenkschwellung unter Inhibitor-Therapie um 10 % zu diesem Zeitpunkt.

Auch Tiere unter Therapie mit dem spezifischen p38-Inhibitor Skepinone-L entwickelten eine reduzierte Gelenkschwellung, im Vergleich zur PBS-Gruppe (Abbildung 31B). Der Gelenkdurchmesser bei Skepinone-L therapierten Tieren zeigte bereits 1 Tag nach Antikörper-Injektion eine signifikante Reduktion ($2,75 \pm 0,09$ mm), verglichen mit der PBS-Gruppe ($2,98 \pm 0,06$ mm). Die Reduktion belief sich auf 0,23 mm (KI 0,09 bis 0,37). Eine signifikante Reduktion von 0,35 mm (KI 0,08 bis 0,62) wurde auch an Tag 5 nach Arthritisinduktion gemessen (Skepinone-L: $3,20 \pm 0,14$ mm; PBS: $3,55 \pm 0,13$ mm). An Tag 6, dem Zeitpunkt der maximalen Gelenkschwellung, war der Gelenkdurchmesser in der Inhibitor-Gruppe um 8 % reduziert ($3,35 \pm 0,31$ mm), im Vergleich zur PBS-Gruppe ($3,65 \pm 0,07$ mm).

Im direkten Vergleich der beiden Inhibitoren, ML 3595 und Skepinone-L, wurde eine schwache Tendenz für einen besseren therapeutischen Effekt von ML 3595 an Tag 6 nach Anti-GPI-Injektion beobachtet (Differenz von 0,07 mm (KI -0,50 bis 0,64)).

Im Gegensatz zur Therapie mit ML 3595 und Skepinone-L zeigten Tiere, die den p38/JNK 3-Inhibitor LN 950 erhielten, zu keiner Zeit des Versuchs eine reduzierte Gelenkschwellung (Abbildung 31C). Eine Varianzanalyse mit dem Bartlett-Test ergab, dass die Varianz innerhalb der ML 3595- oder Skepinone-L-Therapiegruppe signifikant größer war als in der PBS-Gruppe ($p^* < 0,02$). Kein Unterschied in der Varianz zeigte sich zwischen LN 950- und PBS-Gabe.

Kontrolltiere, die MAPK-Inhibitor (ML 3595 bzw. Skepinone-L) oder PBS erhielten, zeigten einen ähnlichen Verlauf der Gelenkdurchmesser (Abbildung 32). An

Tag 6 nach Kontrollserum-Injektion ergab sich jedoch für ML 3595 therapierte Tiere ein signifikant niedrigerer Wert, im Vergleich zu PBS behandelten Kontrollen (ML 3595: 2.45 ± 0.05 mm; PBS: $2,59 \pm 0,06$ mm) (Differenz von 0,14 mm (KI 0,03 bis 0,25)).

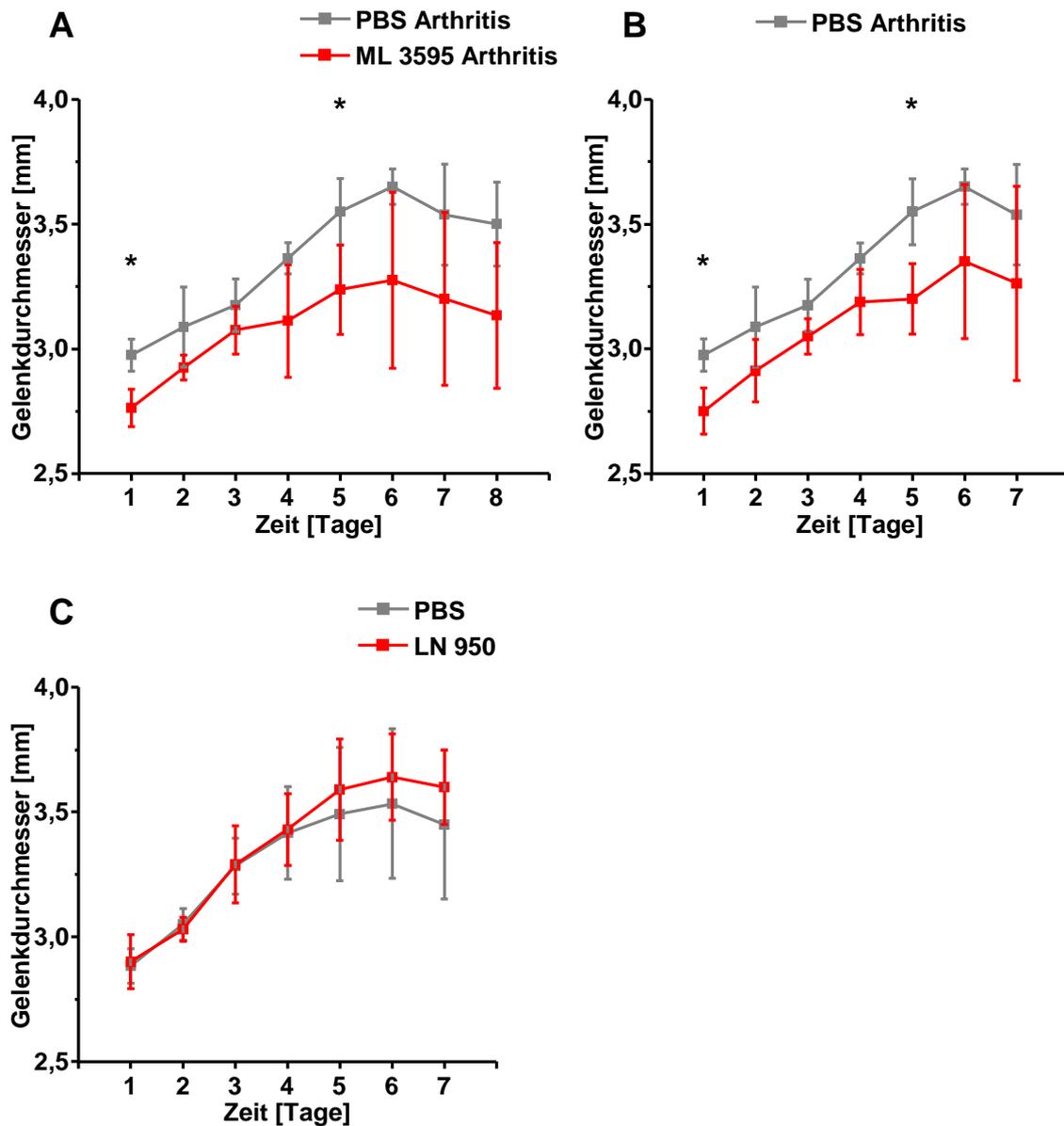


Abbildung 31: Gelenkdurchmesser (mm) von arthritischen Tieren nach Anti-GPI-Injektion (Tag 0-7/8), unter Therapie mit (A) ML 3595 (n=3-4) oder PBS (n=3-4), (B) Skepinone-L (n=4) oder PBS (n=3-4) und (C) LN 950 (n=4-5) oder PBS (n=6).

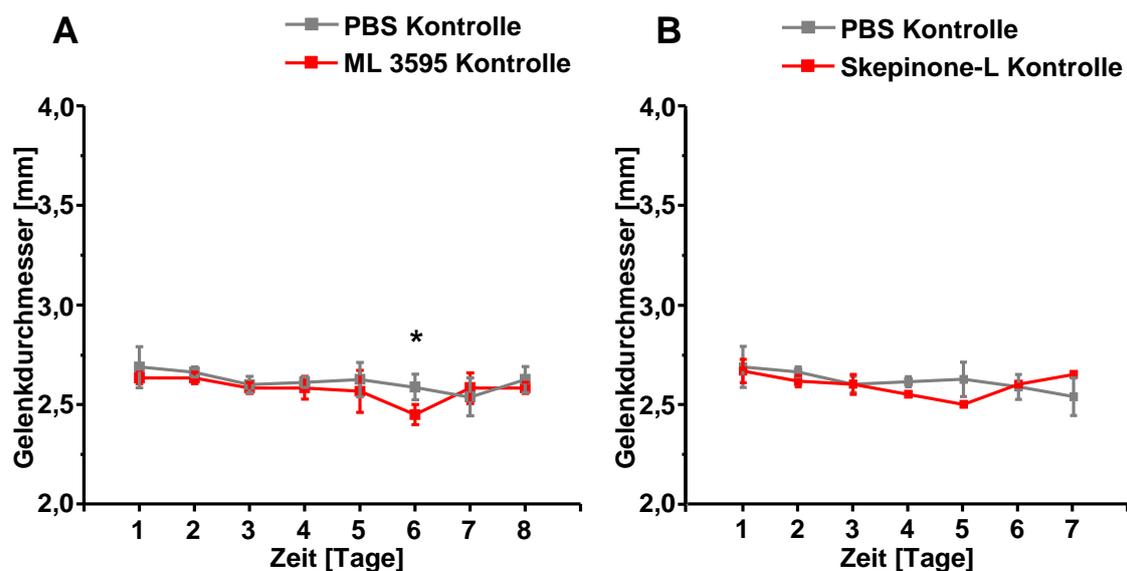


Abbildung 32: Gelenkdurchmesser (mm) von Kontrolltieren nach Kontrollserum-Injektion (Tag 0-7/8), unter Therapie mit (A) ML 3595 (n=3) oder PBS (n=4), (B) Skepinone-L (n=1-3) oder PBS (n=4).

3.4.3 *In vivo* [¹⁸F]FMISO-PET im Therapiemonitoring der MAPK-Inhibitoren

[¹⁸F]FMISO-PET-Messungen wurden an Tag 3 und 6 nach Arthritis- oder Kontrollserum-Injektion durchgeführt (Tag 7 und 10 des Therapieplans, vgl. Abbildung 8). An Tag 3 zeigten arthritische Tiere, die mit dem p38/PDE-4-Inhibitor ML 3595 therapiert wurden, eine nahezu identische [¹⁸F]FMISO-Aufnahme ($2,25 \pm 0,33$ %ID/cc), im Vergleich zur PBS-Gruppe ($2,16 \pm 0,31$ %ID/cc) (Abbildung 33A). Für Skepinone-L therapierte Mäuse konnten ebenfalls kaum Unterschiede in der [¹⁸F]FMISO-Aufnahme gemessen werden, im Vergleich zur PBS-Gruppe (Skepinone-L: $2,36 \pm 0,35$ %ID/cc, PBS: $2,16 \pm 0,31$ %ID/cc) (Abbildung 33B). Die p38/JNK 3-Inhibitor LN 950-Therapiegruppe zeigte eine identische Traceraufnahme im Gelenk ($2,07 \pm 0,49$ %ID/cc), verglichen mit der PBS-Gruppe ($2,02 \pm 0,22$ %ID/cc) (Abbildung 33C).

Die ML 3595 therapierten gesunden Kontrolltiere ($1,29 \pm 0,26$ %ID/cc) zeigten eine nahezu identische Traceraufnahme wie die mit PBS therapierten Kontrollen ($1,11 \pm 0,11$ %ID/cc) (Abbildung 33D). Bei Kontrolltieren, die mit Skepinone-L behandelt wurden, fand sich jedoch eine statistisch signifikant erhöhte Tra-

ceraufnahme ($1,48 \pm 0,04$ %ID/cc), im Vergleich zur PBS-Gruppe ($1,11 \pm 0,11$ %ID/cc) (Abbildung 33E).

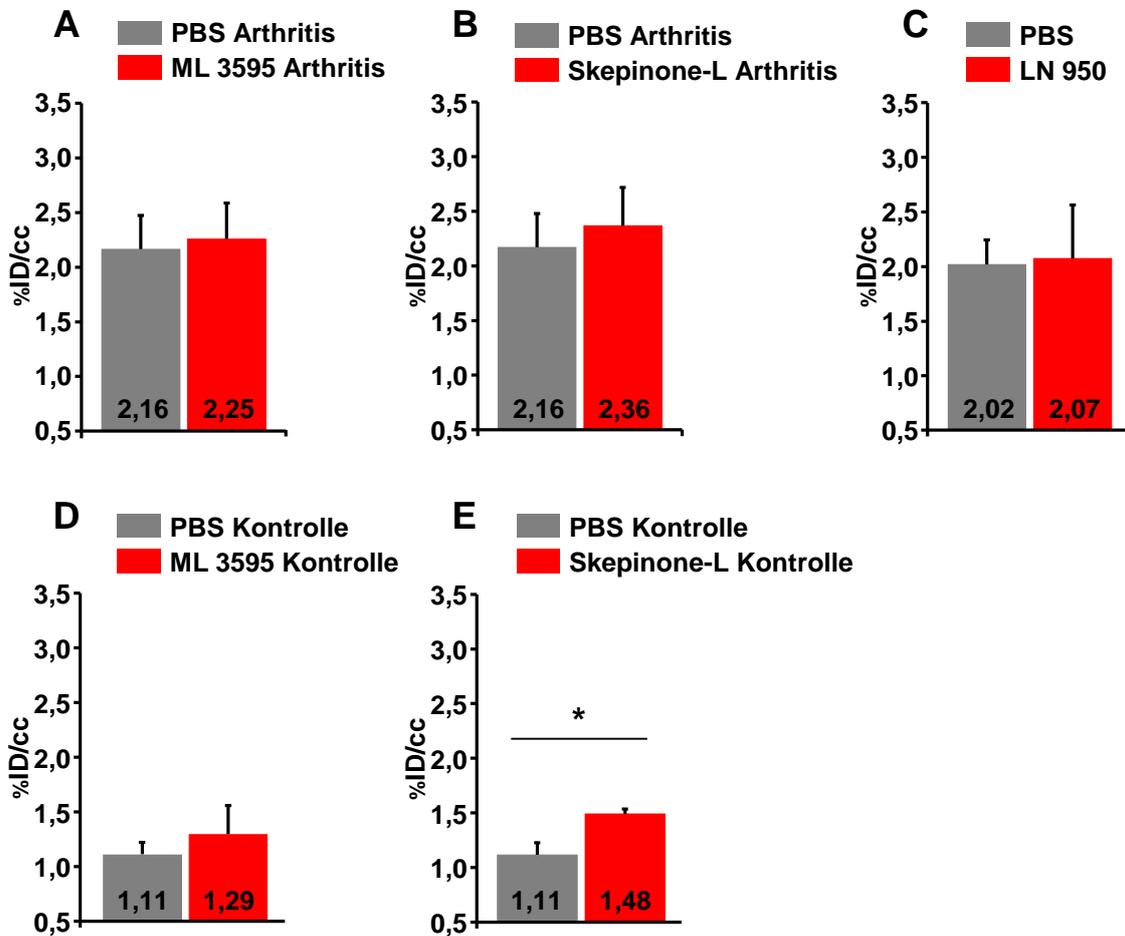


Abbildung 33: Quantifizierung der $[^{18}\text{F}]$ FMISO-Aufnahme im Gelenk an Tag 3 nach Arthritisinduktion (Therapie Tag 7). %ID/cc 65 Minuten *p.i.* für (A) ML 3595-Arthritis (n=4) oder PBS-Arthritis (n=4), (B) Skepinone-L-Arthritis (n=3) oder PBS-Arthritis (n=4), (C) LN 950 (n=5) oder PBS (n=6), (D) ML 3595-Kontrolle (n=3) oder PBS-Kontrolle (n=2), (E) Skepinone-L-Kontrolle (n=3) oder PBS-Kontrolle (n=2).

6 Tage nach RA-Induktion konnte in der ML 3595-Gruppe eine reduzierte Traceraufnahme ($2,34 \pm 0,45$ %ID/cc), im Vergleich zur PBS-Gruppe ($2,75 \pm 0,20$ %ID/cc) gemessen werden (Abbildung 34A). Die Reduktion der $[^{18}\text{F}]$ FMISO-Aufnahme war zu diesem Zeitpunkt $0,41$ %ID/cc (KI $-0,19$ bis $1,01$) oder 15 %. Therapie mit Skepinone-L ($2,58 \pm 0,52$ %ID/cc) führte zu ähnlichen Werten für die Traceraufnahme wie die Therapie mit PBS ($2,75 \pm 0,20$ %ID/cc) (Abbildung 34B). Die Differenz in der Traceraufnahme zwischen Skepinone-L- und PBS-Therapie betrug dabei $0,17$ %ID/cc (KI $-0,51$ bis $0,85$) oder 6 %. Mäuse unter

Therapie mit LN 950 zeigten eine um 15 % erhöhte [^{18}F]FMISO-Aufnahme ($2,85 \pm 0,31$ %ID/cc), verglichen mit der PBS-Therapie ($2,48 \pm 0,17$ %ID/cc) (Abbildung 34C).

An Tag 6 zeigten gesunde ML 3595-Kontrollmäuse ($1,54 \pm 0,13$ %ID/cc) eine signifikant vermehrte Traceraufnahme von $0,33$ %ID/cc (KI 0,07 bis 0,59), im Vergleich zur PBS-Kontrolle ($1,21 \pm 0,13$ %ID/cc) (Abbildung 34D).

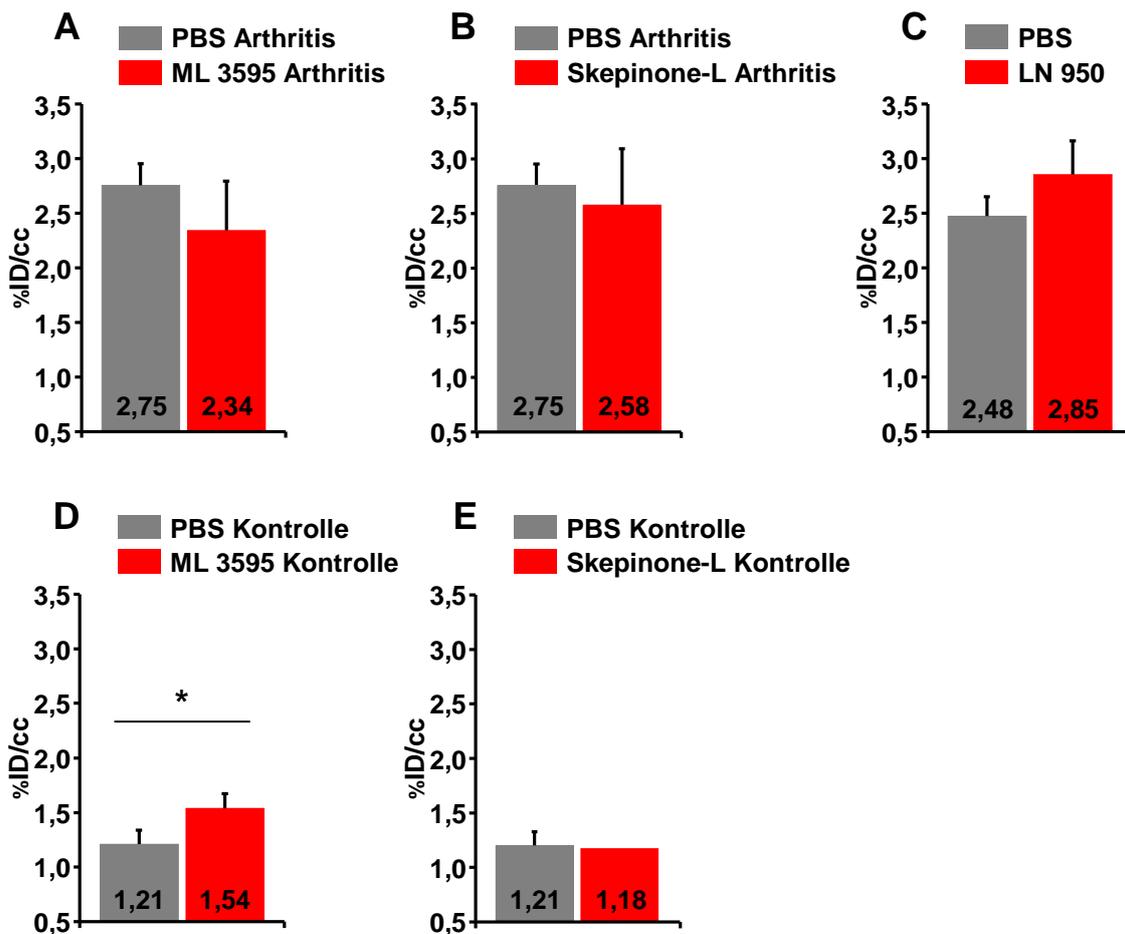


Abbildung 34: Quantifizierung der [^{18}F]FMISO-Aufnahme im Gelenk an Tag 6 nach Arthritis-Induktion (Therapie Tag 10). %ID/cc 65 Minuten p.i. für (A) ML 3595-Arthritis (n=4) oder PBS-Arthritis (n=4), (B) Skepinone-L-Arthritis (n=4) oder PBS-Arthritis (n=4), (C) LN 950 (n=4) oder PBS (n=6), (D) ML 3595-Kontrolle (n=3) oder PBS-Kontrolle (n=4), (E) Skepinone-L-Kontrolle (n=1) oder PBS-Kontrolle (n=4).

Repräsentative [^{18}F]FMISO-PET-Bilder an Tag 6 nach Arthritisinduktion sind in Abbildung 35 dargestellt. Es wurden ausschließlich statische Messungen durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche erhöhte Traceraufnahme in Sprung-

gelenken von Mäusen unter PBS-Therapie, im Vergleich zu einzelnen Mäusen unter Therapie mit ML 3595 (Abbildung 35A) und Skepinone-L (Abbildung 35B) gezeigt werden. Kein sichtbarer Unterschied konnte zwischen PET-Bildern der PBS- und LN 950-Therapiegruppe detektiert werden (Abbildung 35C).

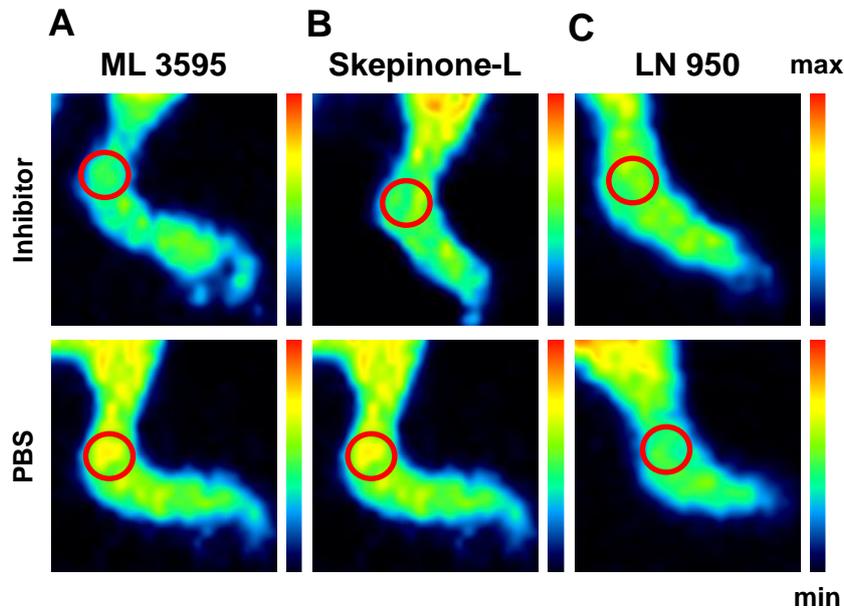


Abbildung 35: Repräsentative [^{18}F]FMISO-PET-Bilder von arthritischen Gelenken an Tag 6 nach Arthritisinduktion für die Therapie mit (A) ML 3595 oder PBS, (B) Skepinone-L oder PBS, (C) LN 950 oder PBS, korrigiert auf Isotopzerfall und injizierte Dosis. Rote Kreise zeigen die Platzierung der ROI im Bereich des OSG an.

Zur Analyse der Korrelationen zwischen Gelenkdurchmesser und Radiotraceraufnahme wurden wiederum alle Einzelgelenke analysiert. Die Koeffizienten für Arthritis- und Kontrolltiere wurden zusammen und getrennt errechnet (Tabelle 7), dies sollte eine genauere Interpretation der Ergebnisse ermöglichen. Aufgrund der geringen Gruppenstärke wurden beide Messtage zusammengefasst, unter Vorbehalt der unter 3.2.3 beschriebenen Verzerrungseffekte. PBS 1 indiziert hier die PBS-Vergleichsgruppe für die Therapie mit ML 3595 und Skepinone-L, PBS 2 für die Therapie mit LN 950 (vgl. 2.4). Es zeigte sich, bei vergleichbaren Gruppengrößen, eine schlechtere Korrelation zwischen Gelenkschwellung und Traceraufnahme für ML 3595 therapierte Arthritis- und Kontrolltiere, im Vergleich mit Skepinone-L- oder PBS-Therapie. Dieser Effekt wird deutlich verstärkt bei alleiniger Betrachtung der Arthritistiere. Zum Vergleich ist der ent-

sprechende Korrelationskoeffizient für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ aus der $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}/[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ -Vergleichsstudie aufgeführt (vgl. 3.2.3, Tabelle 6).

Tabelle 7: Pearson-Korrelationsquotient r zwischen Gelenkdurchmesser und $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ -Traceraufnahme für MAPK-Inhibitor oder PBS therapierte Gruppen, Tag 3 und Tag 6 nach Arthritisinduktion. Zum Vergleich ist der entsprechende Wert aus Tabelle 6 (vgl. 3.2.3) aufgeführt. In Klammern steht die jeweilige Gruppengröße (Einzelgelenke).

Therapiegruppe	Arthritis und Kontrolle	Nur Arthritis
PBS 1	0,91 (n=27)	0,61 (n=16)
ML 3595	0,74 (n=25)	0,31 (n=14)
Skepinone-L	0,88 (n=19)	0,66 (n=13)
PBS 2	-	0,89 (n=22)
LN 950	-	0,72 (n=18)
Aus Tracervergleichsstudie (vgl. 3.2.3): Arthritis (Tag 3+6)	-	0,54 (n=31)

Eine genaue Analyse des therapeutischen Effekts von ML 3595 auf den Gelenkdurchmessers bzw. die $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ -Aufnahme in den einzelnen Gelenken ist in Tabelle 8 aufgeführt. Es zeigte sich meist ein konkordantes, jedoch bei individuellen Gelenken teilweise stark unterschiedliches Ausmaß des Therapieeffekts, verglichen mit dem Mittelwert der PBS-Therapiegruppe.

Tabelle 8: Prozentuale Zu- oder Abnahme vom Mittelwert der PBS-Therapiegruppe für Einzelgelenke von Tieren unter ML 3595-Therapie, Tag 6 nach Arthritisinduktion.

Gelenk Nr.	Gelenkdurchmesser	[¹⁸F]FMISO-PET
1	+1 %	-8 %
2	-4 %	-11 %
3	-7 %	-22 %
4	-23 %	-39 %
5	-12 %	+8 %
6	-4 %	-18 %
7	-7 %	-23 %
8	-26 %	-20 %

3.4.4 Histologische Analyse von arthritischen Tieren unter Therapie mit PBS, ML 3595 oder LN 950

Mäuse unter PBS-Therapie zeigten deutliche Zeichen einer akuten Synovitis mit Proliferation der synovialen Membran (Pannus). Es wurde ein hauptsächlich granulozytäres Infiltrat mit vaskulärer Proliferation detektiert (vgl. 3.2.1). Außerdem waren Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und eine Vermehrung des Bindegewebes als Kennzeichen des arthritischen Gelenks deutlich zu erkennen. Das Periost zeigte sich fokal erodiert mit Knochenneubildung (Abbildung 36A). Eine histologische Analyse der ML 3595-Therapiegruppe korrelierte gut mit den Ergebnissen der Gelenkschwellung, da die Tiere unter Inhibitor-Therapie geringere Zeichen der Arthritis zeigten. Eine Maus unter ML 3595-Therapie mit nur 7 % reduzierter Gelenkschwellung zeigte dabei sehr ähnliche

histologische Zeichen der Inflammation wie eine Maus unter PBS-Therapie (Abbildung 36B). Bei einem Tier mit einer Reduktion der Gelenkschwellung um 20 % waren jedoch zum selben Zeitpunkt deutliche histologische Unterschiede zu erkennen, mit nur sehr geringer Inflammation und eher diskreten Erosionen (Abbildung 36C). Die Therapie mit LN 950 führte zu keinem histologischen Unterschied, im Vergleich zur PBS-Therapie (Abbildung 36D).

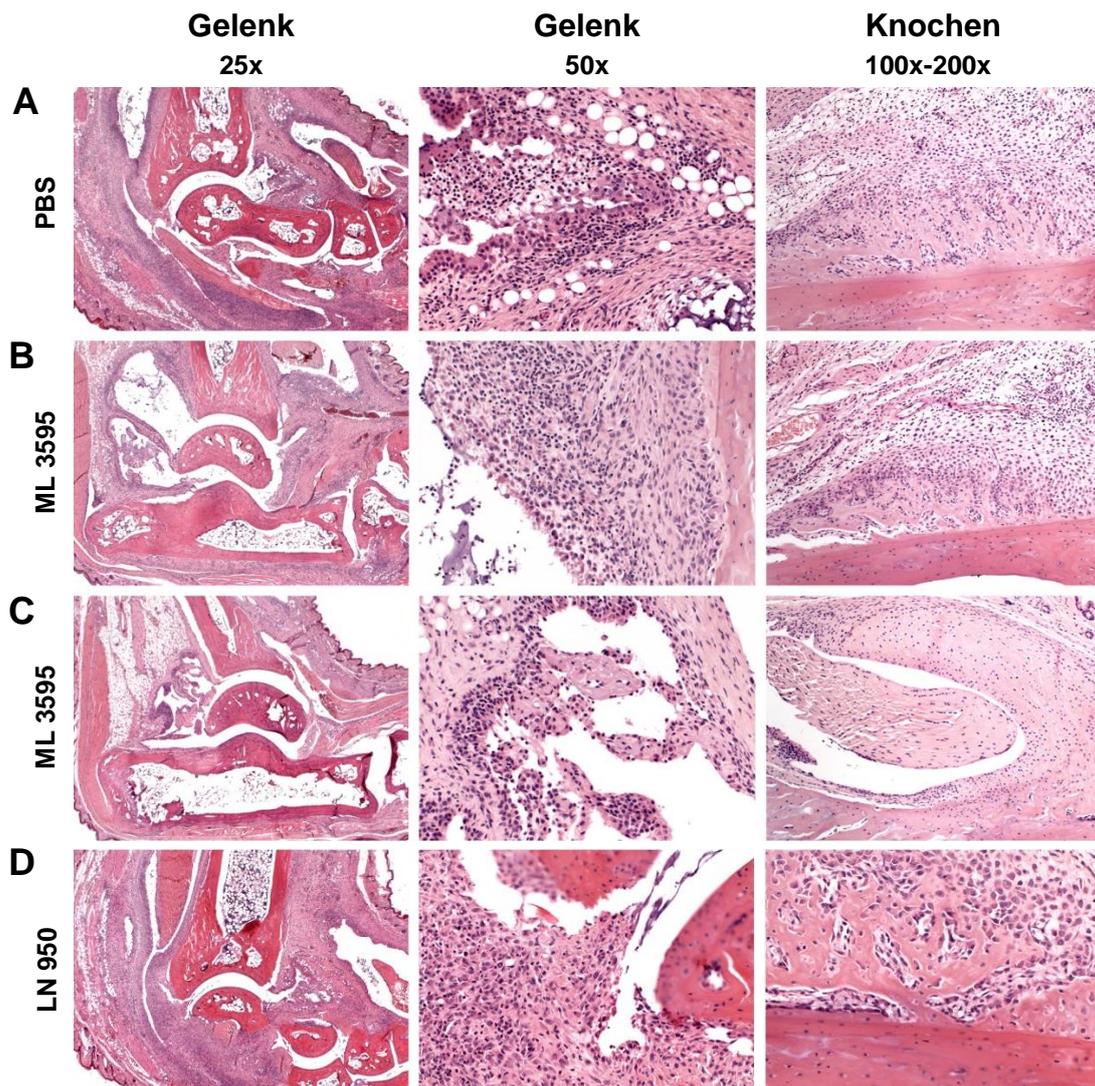


Abbildung 36: Repräsentative H&E Färbung von Gelenken, 8 Tage nach Arthritisinduktion, (A) PBS-Therapie (schwere Synovitis und Knochenneufornation), n=3-4; (B) ML 3595–Therapie mit 7 % reduzierter Gelenkschwellung (nur leichte Verbesserung der Arthritis, im Vergleich zu PBS-Therapie), n=1; (C) ML 3595–Therapie mit 20 % reduzierter Gelenkschwellung (starke Verbesserung, im Vergleich zu PBS-Therapie), n=1; (D) LN 950-Therapie (keine histologischen Veränderungen, im Vergleich zu PBS-Therapie), n=3.

4. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Gelenkentzündung, deren pathophysiologische Mechanismen in den letzten Jahren zunehmend besser verstanden wurden. Gleichzeitig scheint jedoch klar, dass die Erkrankung ein sehr heterogenes Syndrom darstellt, denn bei individuellen Patienten spielen individuelle Effektormechanismen eine Rolle. Es ist daher dringend notwendig, mittels molekularer Bildgebung wie der PET den einzelnen Patienten und sein spezifisches inflammatorisches *Microenvironment* besser zu verstehen. Hierfür spielt eine sensitive Erfassung der Krankheitsaktivität auch nach Initiierung einer Therapie eine wichtige Rolle. Ein Target dieser Bemühungen stellt die Hypoxie dar, da sie ein frühes Zeichen inflammatorischer Aktivität ist und in der RA als wichtiger Faktor für die Chronifizierung der Erkrankung gilt. Sie ist pathophysiologisch mit zahlreichen pro-inflammatorischen Signalwegen verknüpft, unter anderem dem MAPK-Signalweg. Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten der Hypoxie-Bildgebung zur sensitiven Detektion arthritischer Aktivität in einem experimentellen Modell der RA weiterzuentwickeln. Hierfür wurde der neu entwickelte Hypoxie-Tracer [^{18}F] β -FAZDR mit dem Referenztracer [^{18}F]FMISO verglichen, sowie Studien zum mit Hypoxie eng verknüpften MAPK-Signalweg durchgeführt. Darüber hinaus sollte der zusätzliche Nutzen einer sensitiven Arthritisdiagnostik mittels MRT-Diffusionsbildgebung in experimenteller RA evaluiert werden.

4.1 Vergleichende Analyse der Hypoxie-PET-Tracer [^{18}F]FMISO und [^{18}F] β -FAZDR in der experimentellen RA

Als einfach messbarer Parameter zur Validierung der Arthritisaktivität wurden die Gelenkdurchmesser bestimmt. Eine Gelenkschwellung als Kardinalzeichen der Entzündungsreaktion ist sowohl Folge einer vermehrten Proliferation inflammatorischer Zellen als auch der Ödembildung durch *Capillary Leakage*. Diese beiden Faktoren führen unter anderem auch zur Hypoxie durch gesteigerten Metabolismus und größere Diffusionsstrecken [101]. Die Entwicklung der Gelenkschwellung war konsistent mit früheren Untersuchungen im Anti-GPI-

induzierten RA-Modell in Mäusen [236]. An Tag 8 kam es in unterschiedlichem Maße zu einem Rückgang der Gelenkschwellung aufgrund fallender Antikörper-titer. Ein vollständiger Rückgang der Schwellung ist jedoch aufgrund der irreversiblen Knochendestruktion nicht möglich [236].

Zur nicht-invasiven Beurteilung der Entzündung wurden dynamische und statische PET-Messungen mit den Hypoxie-Tracern [^{18}F]FMISO und [^{18}F] β -FAZDR durchgeführt. Durch die Injektion von vergleichbaren Mengen Anti-GPI-Serum sowie Konstanz von Parametern wie Herkunft, Alter, Haltung der Tiere, Narkotisierung und Messprotokoll wurde von einer vergleichbaren Arthritisaktivität ausgegangen. Die Gelenkschwellungen als Surrogatparameter der Inflammation waren für beide Tracer in allen Versuchsgruppen vergleichbar (vgl. Abbildung 11). Als Referenzgewebe wurden in dieser Studie gesunde Gelenke von Kontrollserum-injizierten Mäusen verwendet. Dies stellt im Fall der besonderen Struktur des Gelenks mit Anteilen von Knochen, Knorpel und Synovialflüssigkeit ein geeigneteres Kontrollgewebe als Muskel dar.

Zunächst werden die Ergebnisse der dynamischen PET-Messungen diskutiert, anschließend wird auf den quantitativen Vergleich der Tracer zu einem Zeitpunkt eingegangen.

Dynamische PET-Messungen erlauben einen Rückschluss auf die Tracerkinetik im Vergleich zwischen Zielgewebe und Kontrollgewebe. Beide Tracer zeigten sowohl in arthritischen wie auch gesunden Gelenken über den gesamten Messzeitraum betrachtet eine Auswaschkinetik. Dabei war ab Tag 3 nach Arthritisinduktion eine erhöhte Akkumulation beider Tracer in arthritischen Gelenken zu messen, die bis zum Ende der Messzeit anhielt. Wie erwartet wurde der hydrophilere Tracer [^{18}F] β -FAZDR schneller ausgeschieden. Zwar wurde bisher keine Bestimmung des Partitionskoeffizienten von [^{18}F] β -FAZDR durchgeführt, es ist aber anzunehmen, dass dieser, analog zu [^{18}F]FAZA, kleiner ist als von [^{18}F]FMISO.

Insgesamt zeigten [^{18}F] β -FAZDR und [^{18}F]FMISO in den dynamischen Messungen eine sehr ähnliche Kinetik, was sich auch am Vergleich der Ratio- und Differenzkurven erkennen lässt (vgl. Abbildung 15 und 16). Bereits zu einem frü-

hen Messzeitpunkt stellte sich eine konstante Ratio zwischen Arthritis und Kontrolle ein. Ratios bleiben bei einer vorliegenden Auswaschkinetik jedoch nur konstant, wenn die Differenz zwischen krankem und gesundem Tier ebenfalls abnimmt, was an den Kurven deutlich zu erkennen ist. Dies weist darauf hin, dass der Tracer aus entzündetem Gewebe schneller ausgewaschen wird als aus gesundem Gewebe.

Verschiedenen Verläufen der TAC wurden in Studien zur Tracerkinetik unterschiedliche Oxygenierungszustände des Gewebes zugeordnet. So ist die hier vorliegende Auswasch-TAC nach dem initialen Peak ähnlich einer Blutaktivitätskurve und repräsentiert eigentlich gut perfundiertes, wenig hypoxisches Gewebe [220]. Frühere Untersuchungen zur Kinetik von [^{18}F]FMISO wurden vor allem in verschiedenen Tumormodellen durchgeführt. Hier zeigte sich, im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, häufig eine Equilibrierung der Aktivität im Kontrollgewebe mit dem Plasma und eine selektive Retention im pathologischen Gewebe [217; 221; 314]. Andere Studien, die den hydrophilen Hypoxie-Tracer [^{18}F]FAZA verwendeten, beschrieben zwar insgesamt auch eine Auswaschung aus dem Zielgewebe, jedoch mit einer langsameren Auswaschrates, im Vergleich zum Kontrollgewebe [215; 238].

Daher ist zur Interpretation der PET-Ergebnisse zunächst der zusätzliche Beweis für das Vorhandensein einer Hypoxie in den entzündeten Gelenken essentiell. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass in Anti-GPI-induzierter RA ein erniedrigter pO_2 herrscht, im Vergleich zu gesunden Kontrollen [236]. Außerdem wurde eine erhöhte Expression von HIF-1 und HIF-2 nachgewiesen sowie mittels Pimonidazol-Immunfluoreszenz die Existenz hypoxischer Areale im Gelenk bewiesen [236]. In dieser Arbeit sollte durch Pimonidazol-Immunhistochemie eine histologisch gut beurteilbare *ex vivo* Bestätigung der Hypoxie gefunden werden.

In der etablierten RA zeigte sich unabhängig vom Dekalzifizierungsprotokoll eine vermehrte Pimonidazol-Antigenfärbung in arthritischen Gelenken. Allerdings wurden innerhalb einer Protokoll-Gruppe zum Teil Unterschiede in der Stärke der Antigenfärbung gefunden, was auf zusätzliche Einflüsse hindeutet. Hier kommen prozessuale (verwendete Reagenzien und Alkohole) oder Gewe-

be-spezifische Faktoren (keine Hypoxie in einzelnen Gewebeschnitten) in Frage. Es kam außerdem zu einer geringen Färbung in Kontrolltieren, vor allem bei Säure-dekalzifizierten Schnitten. Dies könnte, wie auch die interindividuellen Unterschiede, durch eine akute Bindung von zirkulierendem Pimonidazol während der Gewebegewinnung mitverursacht sein. Pimonidazol-Analysen in anderen RA-Modellen (CIA und AIA) zeigten ebenfalls eine leichte Bindung in Kontrollgeweben [301; 315]. Zwei Vorbehalte gibt es gegen die Nutzung der Pimonidazol-Immunhistochemie zum Nachweis von hypoxischen Zellen. Einerseits kann, wie jedes Nitroimidazol, auch Pimonidazol von Nitroreduktasen O₂-unabhängig gebunden werden, dies könnte auch der Grund für einzelne hypoxische Zellen in ansonsten nicht gefärbtem Gewebe sein [316]. Andererseits deuten Studien darauf hin, dass Pimonidazol besonders sensitiv in der Detektion akuter Hypoxie ist [317]. Zwar zeigten Untersuchungen mittels [¹⁸F]FMISO-PET, dass eine akute Hypoxie einen Anteil an der Tracerbindung haben kann, die chronische oder diffusions-limitierte Hypoxie jedoch dominiert [217; 318].

Zusammengefasst wird das Vorhandensein von hypoxischen Arealen durch die Immunhistochemie bestätigt. Sie ist jedoch nicht homogen, sondern in einzelnen *Hotspots* im Gelenk verteilt. Dies bestätigte sich in der Analyse von Autoradiographie und PET-MRT-Daten. Auch im Tumor wurde wiederholt auf die Heterogenität der Hypoxie hingewiesen, hauptsächlich aufgrund der chaotischen und unorganisierten Gefäßstruktur [231; 319; 320].

Da die TAC über eine ROI gemittelt berechnet wird, tragen also hypoxische und nicht-hypoxische Gewebe zur gemessenen Kinetik des Tracers bei [321]. Als sog. *Tissue Fraction Effect* (vgl. 1.4.1) ist dies Teil des Partialvolumeneffekts [192]. TACs sind immer ein Zusammenspiel von Diffusion, Partition/Hydrophilität, Clearance, Oxygenierungszustand des Gewebes und injizierter Dosis. Die in dieser Arbeit gefundene Auswasch-TAC gibt also den Hinweis auf einen großen Anteil gut perfundierten Gewebes in der Arthritis-ROI, schließt die Existenz hypoxischer Gewebe jedoch andererseits nicht aus. Möglich wäre auch eine große Heterogenität zwischen verschiedenen Mäusen, was aber an den meisten Messtagen aufgrund der geringen Standardabweichungen im dynamischen Scan unwahrscheinlich erscheint. Eine kürzlich publizierte Studie

stellte eindrücklich die Abhängigkeit der TAC-Verläufe vom differentiellen Oxygenierungszustand der Gesamt-ROI dar. Wang *et al.* benutzten in humanen Kopf-Hals-Tumoren eine Voxel-Analyse, um die Mikrodistribution der Hypoxie möglichst akkurat nachzuvollziehen. In ROIs, wo nur eine Subregion als hypoxisch charakterisiert wurde, unterschied sich der TAC-Verlauf von stark hypoxischem oder nicht hypoxischem Gewebe. Die TAC zeigte zwar eine initiale Auswaschkinetik, flachte gegen Ende der Messung jedoch ab [322].

Möglicherweise wäre die Analyse von Subregionen (*Voxel-by-Voxel*) auch in der Arthritis denkbar und könnte zusätzliche Informationen zur Gewebeoxygenierung liefern. Problematisch bei diesen sog. *Small-Scale Approaches* ist, neben dem Aufwand, jedoch die statistische Unsicherheit der PET-Daten aus einem einzigen Voxel (vor allem bei langen Messzeiten mit wenig Counts). Hinzu kommt im präklinischen Setting ein erheblicher PVE [322; 323]. Die Heterogenität der Hypoxie ist vor allem im Tumor für die Radiotherapieplanung von erheblicher Bedeutung. Da eine statische Messung theoretisch dieselben Werte für eine Auswasch-TAC und eine Retentions-TAC zu einem Zeitpunkt liefern kann, sind dynamische Messdaten zur Interpretation der Oxygenierung unbedingt notwendig [220].

Ab Tag 3 nach Arthritisinduktion war die TAC in Arthritistieren deutlich von Kontrolltieren abzugrenzen. Im Idealfall stellt dieser Unterschied nun zum großen Teil ein spezifisches Hypoxie-Signal dar. Konsequenterweise ergibt sich aus den bisherigen Argumenten aber die Frage, warum das zweifach so hohe Arthritis-Signal im späteren Verlauf der TAC (vgl. Ratiokurven, Abbildung 16) dennoch eine Auswaschkinetik zeigt und bei Arthritistieren eine schnellere Clearance zu messen ist (vgl. Differenzkurven, Abbildung 15). Wenn kontinuierlich Tracer-retinierende hypoxische Zellen die Hälfte des Signals bedingen, würde man wie oben beschrieben ein Ansteigen oder zumindest Abflachen der TAC erwarten. Dies würde sich dann in einer ansteigenden Ratiokurve wieder spiegeln.

Hierzu ist es sinnvoll, zunächst die Verteilung des Tracers im Gewebe auf der Basis von verschiedenen Kompartimenten zu betrachten. Multiple Studien zur

Kinetik von [^{18}F]FMISO und [^{18}F]FAZA wurden in den letzten Jahren durchgeführt. Diese gehen meist von einem 3-Kompartimenten-Modell der Tracerverteilung aus, mit einem zentralen Kompartiment (Blut) und 2 Gewebekompartimenten (frei und gebunden). Da in dieser Arbeit jedoch keine Berechnung der kinetischen Parameter erfolgen soll, kann zur Veranschaulichung einer möglichst realistischen Tracerverteilung das Modell um ein weiteres Kompartiment erweitert werden. Somit ergibt sich die Anordnung aus Abbildung 37, mit den Kompartimenten zentral (Blut), frei, nicht spezifisch gebunden und spezifisch gebunden. Die Geschwindigkeitskonstanten k sind ein Maß für den Fluss des Tracers zwischen den Kompartimenten.

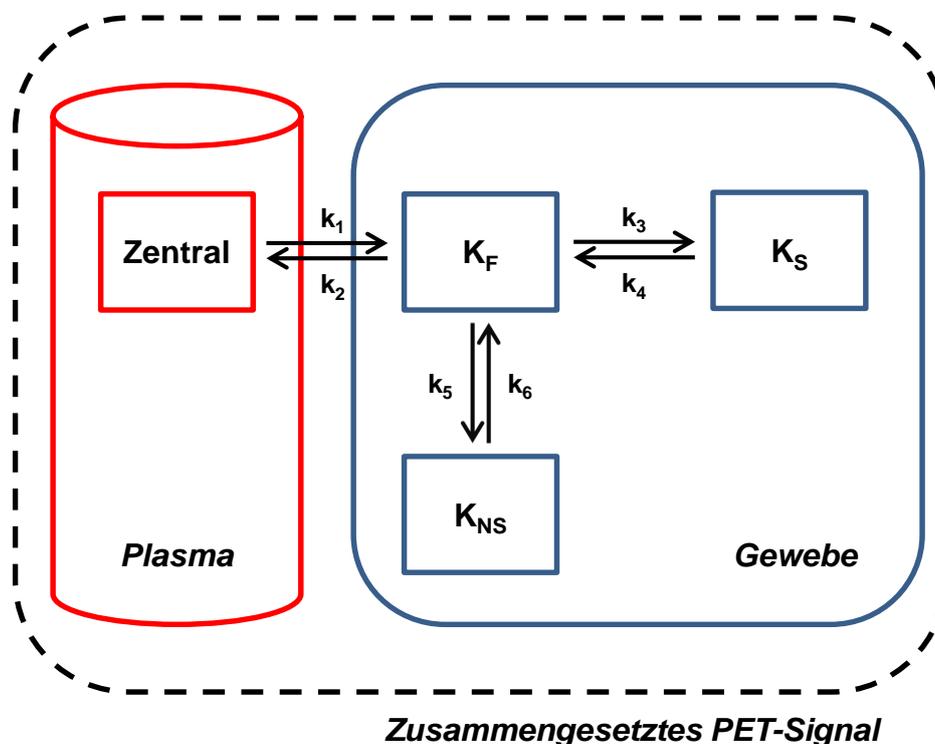


Abbildung 37: 3-Gewebe-Modell (4 Kompartimente) der Tracerverteilung mit einem zentralen Blutkompartiment sowie den Kompartimenten frei (K_F), nicht spezifisch gebunden (K_{NS}), spezifisch gebunden (K_S) und den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k_1 - k_6 . Das gemessene PET-Signal setzt sich aus allen Kompartimenten zusammen. Adaptiert nach Morris *et al.*, 2004 [324], Veröffentlichung mit Genehmigung des Verlags, © Elsevier.

Der oben beschriebene Verlauf der Arthritis-TAC könnte durch ein konstantes $K_{\text{spezifisch}}$ erklärbar sein. Die Tracerverteilung im Gewebe wäre dann schematisch wie in Abbildung 38 vorstellbar. So kommt es bei Arthritistieren aufgrund

eines hohen k_1 an einem frühen Messzeitpunkt zu einem Perfusionspeak und den deutlich erhöhten Aktivitätswerten im Vergleich zur Kontrolle. Da die Abklingkonstante κ der zeitabhängigen Auswaschfunktion $e^{-\kappa t}$ größer in der Arthritis ist (schnellere Tracer-Clearance), nehmen die Differenzen der TACs über 90 Minuten ab, dieses Phänomen lässt sich am ehesten durch eine erhöhte Perfusion erklären. Somit wäre der Bildkontrast zu einem Zeitpunkt stark durch ein hohes k_1 und die Tracer-spezifische Auswaschrage bestimmt. Zusätzlich kommt es aufgrund eines konstanten $K_{\text{spezifisch}}$ zu keiner weiteren Tracerretention in den arthritischen Gelenken.

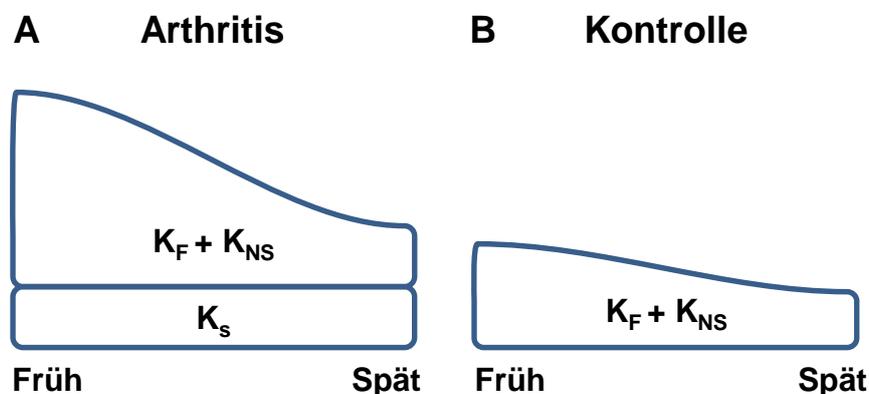


Abbildung 38: Schematische Darstellung der möglichen Tracerverteilung in den jeweiligen Kompartimenten im Verlauf der PET-Messung in (A) Arthritis- und (B) Kontrollgelenken. Für die Kontrolle wurde kein spezifisches Kompartiment angenommen.

Wie könnte es nun zu einem konstanten $K_{\text{spezifisch}}$ kommen? Wack *et al.* verglichen auf der Basis einer mathematischen Simulation von Tumervaskularisation die kinetischen Eigenschaften von $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ mit den hydrophileren Nitroimidazolen $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ und $[^{18}\text{F}]\text{Flortanidazol}$ ($[^{18}\text{F}]\text{HX4}$) [325]. Dabei kam es zu einer konstanten Zunahme des Hypoxie-spezifischen $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ und $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -Signals. Aufgrund eines schnellen Auswaschens der ungebundenen Fraktion von $[^{18}\text{F}]\text{HX4}$ war das Hypoxie-spezifische Signal dieses hydrophilen Tracers jedoch konstant, es konnte im Verlauf keine weitere Hypoxie-spezifische Retention erfolgen. Für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ wäre also ebenfalls ein konstantes $K_{\text{spezifisch}}$ aufgrund der schnellen Clearance vorstellbar.

Eine weitere Erklärung für ein konstantes $K_{\text{spezifisch}}$ könnte von einer nicht vollständigen Irreversibilität der spezifischen Tracerbindung ausgehen. Nimmt man eine irreversible spezifische Bindung des Tracers in hypoxischen Geweben an, muss $k_4=0$ sein. Es wurde jedoch von mehreren Autoren die teilweise Reversibilität von Nitroimidazolen vermutet, sowohl im Sinne eines *Wash-Outs* trotz Radikalformation in hypoxischen Zellen, als auch im Sinne einer Abdiffusion von ^{18}F vom Nitroimidazol [326]. Kinetikstudien zu $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ ergaben die beste mathematische Modellierung einer gemessenen TAC, wenn reversible Modelle verwendet wurden [327; 328]. Obwohl für $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ klassischerweise von einer irreversiblen Bindung ausgegangen wird [329], wurde in einer Studie, die an Hirntumoren durchgeführt wurde, bei einem Teil der Patienten ein besseres Modell mit der Voraussetzung $k_4 \neq 0$ gefunden [216]. Interessanterweise wurde in einer ersten *in vivo* Studie zu $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ im Tumormodell aufgrund der schnellen Auswaschung des Tracers ebenfalls die Möglichkeit einer teilweise reversiblen Bindung diskutiert [330].

Schließlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass eine konstant erhöhte Anreicherung in arthritischen Gelenken zumindest teilweise durch ein erhöhtes nicht spezifisches Signal zustande kommen kann. Denkbar wäre ein größeres K_F und K_{NS} auch zu späten Messzeitpunkten durch den initial hohen Tracerinflux (k_1). Außerdem ist die Gefäßfraktion in der ROI aufgrund der Neovaskularisation im arthritischen Gelenk erhöht, was ebenfalls zu erhöhtem PET-Signal beitragen kann [331].

Die Biodistributionsanalyse kann hierzu wertvolle Informationen liefern. Sie erlaubt die Messung der Radioaktivität, normiert auf das Gewicht des Gewebes. Eine erhöhte spezifische Bindung im PET sollte sich in der Biodistribution als erhöhtes Signal in arthritischen Gelenken, sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zur Blutaktivität zeigen. Ein erhöhtes unspezifisches Signal durch eine erhöhte Gefäßfraktion würde in der Biodistribution aufgrund der Gelenk-Fixierung in Formaldehyd (Auswaschung von Blut aus größeren Gefäßen) nicht im selben Maße zur Gesamtaktivität beitragen wie im PET.

Im Vergleich zu den Kontrollgelenken war die Aktivität im Median in arthritischen Gelenken in der Biodistribution an den Messtagen 3, 6 und 8 für beide

Tracer erhöht, was mit den PET-Messungen korreliert. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass der PVE i.S. einer Unschärfe aufgrund der PET-Auflösung und folglich einer Unterschätzung der Aktivität insbesondere im Kontrollgelenk keinen entscheidenden Einfluss hat.

Jedoch konnte nur für den Tracer [^{18}F]FMISO an Tag 6 und 8 eine gegenüber dem Blut-Wert erhöhte Gelenkaktivität gezeigt werden. Bestimmte Einflussfaktoren auf diese Ergebnisse müssen dabei aber berücksichtigt werden. Dazu gehört die erhöhte Ganzkörperaufnahme von [^{18}F] β -FAZDR im Verlauf der Arthritis, welche möglicherweise auf eine systemische Entzündung hindeutet. Hinzu kommen Ungenauigkeiten der Methode, wie die Mitauswertung von nicht-hypoxischem Gewebe in der Biodistribution. Die PET-Messung mit Platzierung der ROI über dem OSG erlaubt eine bessere Fokussierung auf die entzündeten Bereiche. Möglicherweise wird die Aktivität in Gelenken zusätzlich unterschätzt, da das Gelenk, im Vergleich zum Blut, überproportional viel Gewicht hat.

Zusammengefasst kann man aufgrund der Biodistributionsanalysen eine erhöhte Traceranreicherung in der Arthritis durch unspezifische Mechanismen (z.B. erhöhte Gefäßfraktion) nicht vollständig ausschließen. In Studien mit dem für die Arthritis unspezifischen Neurotracer [^{11}C]Racloprid konnte nach einem initialen Peak jedoch eine Equilibrierung der Arthritis-TAC mit der Kontroll-TAC im Gelenk nachgewiesen werden [236]. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf eine spezifische Anreicherung der Hypoxie-Tracer in der vorliegenden Arbeit, da bis zum Ende des Messzeitraums eine erhöhte Akkumulation der Hypoxie-Tracer in entzündeten Gelenken gezeigt werden konnte. Zudem korrelierte in der vorliegenden Arbeit die Anreicherung von [^{18}F]FMISO in *Hotspots* in den PET/MRT-Untersuchungen gut mit den immunhistochemischen Ergebnissen. Dies unterstützt zusätzlich die Selektivität der PET-Tracer-Bindung in hypoxischen Geweben.

In zukünftigen Studien sollte jedoch die Tracerverteilung im Gewebe mittels kinetischer Analysen untersucht werden. Eine dazu notwendige *Input*-Funktion der Blutaktivität könnte aus der Herzaktivität gemessen werden, obwohl dies technisch aufgrund der geringen Organgröße anspruchsvoll ist (Einfluss von PVE, *Spill-over*, etc.) [332]. Optimal wären katheterbasierte direkte Blutaktivi-

tätsmessungen, dies ist jedoch bei Mäusen unrealistisch. Mittels kinetischer Daten könnten die Geschwindigkeitskonstanten des Modells zur Quantifizierung der Hypoxie mitberücksichtigt werden. In der über 2 Stunden akquirierten $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR-TAC}$ scheint es, dass die Differenzkurve für $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ zwischen 90 und 120 Minuten konstant bleibt. Längere Messzeiträume könnten also eventuell zusätzliche Informationen über die Spezifität der Bindung und Auswaschkinetik liefern. Dabei würde jedoch ein deutlich schlechteres *Signal-to-Noise* Verhältnis für das rasch ausgewaschene $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ eine statistisch valide Quantifizierung problematisch machen.

Obwohl ein gewisser Einfluss unspezifischer Bindung auf die Traceraktivität im arthritischen Gelenk in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde als Zeitpunkt für einen quantitativen Vergleich der Tracer 65 Minuten *p.i.* gewählt. Dies ist einerseits durch Erfahrungen früherer Studien bedingt [221; 236], die zu diesem Zeitpunkt eine weitgehend spezifische Tracerbindung annehmen. Andererseits scheint aufgrund der konstanten Ratiokurven dieser Zeitpunkt für den Vergleich der Tracer nicht weniger valide zu sein als ein späterer Zeitpunkt innerhalb des für die Auswertung zur Verfügung stehenden Messzeitraums von 90 Minuten (bei jedoch deutlich besserem *Signal-to-Noise* Verhältnis für das rasch ausgewaschene $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$).

Die Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ im arthritischen Gelenk stieg von Tag 1 bis Tag 6 kontinuierlich an und blieb dann konstant. Der Verlauf der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ -Aufnahme im Gelenk war damit grundsätzlich vergleichbar und stieg bis Tag 6 an. An Tag 8 ging die $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ -Aufnahme wieder leicht zurück. Die größere Standardabweichung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ an Tag 8 weist möglicherweise auf einen heterogenen Rückgang der Hypoxie bei sinkenden Antikörpertitern hin. Die Aufnahme in den Kontrollgelenken blieb bei beiden Tracern während des gesamten Experiments gleich. Dies kann auch als Validierung der Methode gelten, da nicht davon auszugehen ist, dass sich der Oxygenierungszustand in Kontrollgelenken über die Zeit verändert. Aufgrund der schnelleren Auswaschung war das Signal von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-FAZDR}$ an jedem Messtag geringer. Dies bestätigte sich auch in den Biodistributionsuntersuchungen, die an den meisten

Messtagen ein niedrigeres Aktivitätsniveau für [¹⁸F]β-FAZDR-injizierte Tiere zeigten.

Bei Betrachtung der gesamten Versuchsgruppe wurde für beide Tracer eine sehr gute Korrelation mit der Gelenkschwellung festgestellt. Der Verlauf der Gelenkdurchmesser scheint durch die Traceraufnahme gut widerspiegelt zu werden. Eine genaue Analyse der Korrelationskoeffizienten ergab jedoch eine signifikant schlechtere Korrelation bei Arthritistieren mit fortgeschrittener Inflammation (Tag 6 und 8), im Vergleich zu früheren Messzeitpunkten (Tag 1 und 3). Dies weist auf überproportional viele Vorgänge hin, die die Traceraufnahme/Hypoxie bzw. die Gelenkschwellung in einem späteren Stadium unabhängig voneinander beeinflussen. Wahrscheinlich ist der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Gelenkdurchmesser in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien nicht linear. Beide Verfahren detektieren also den Verlauf des Merkmals „Arthritis“ in der gesamten Gruppe, im einzelnen Gelenk jedoch in unterschiedlichem Ausmaß und unabhängig voneinander. Unter Einschluss der Kontrollgruppe werden die Korrelationen besser, was durch die genannten Effekte der Inhomogenitäts- und Gemeinsamkeitskorrelation sowie die größere Gruppenstärke bedingt ist.

Ziel dieser Arbeit war jedoch auch eine Aussage, mit welchem der verwendeten Hypoxie-Tracer früher im Verlauf der Erkrankung eine Differenzierung zwischen Arthritis- und Kontrolltieren möglich ist. Aus der Berechnung der empirischen Sensitivität und Spezifität ergibt sich eine bessere und frühere Detektion der Arthritis mit dem neu entwickelten Hypoxie-Tracer [¹⁸F]β-FAZDR. Mit diesem Tracer war bereits an Tag 1 nach Arthritisinduktion eine sensitive und spezifische Differenzierung der Arthritistiere von den Kontrolltieren möglich.

Erste Untersuchungen zu [¹⁸F]β-FAZDR im Tumormodell zeigten, dass der Tracer sehr schnell (zum Zeitpunkt 1h *p.i.*) eine bessere Tumor/Muskel-Ratio erreicht, im Vergleich zu [¹⁸F]FAZA. Im weiteren Verlauf der Messung glichen sich die Ratios von [¹⁸F]FAZA jedoch an. Der Grund hierfür war möglicherweise, dass im Verhältnis zur Auswaschung aus dem Kontrollgewebe, [¹⁸F]FAZA eine langsamere Auswaschung aus dem Tumorgewebe zeigte als [¹⁸F]β-FAZDR,

was wiederum einen erhöhten Tumor/Muskel-Kontrast zu einem späteren Zeitpunkt erklärt [330].

Bisher durchgeführte Vergleiche von [^{18}F]FMISO mit hydrophileren Nitroimidazolderivaten ergaben nicht-konklusive Ergebnisse. Untersuchungen in der Arthritis zeigten ein ähnliches Arthritis/Kontrolle-Verhältnis für [^{18}F]FAZA und [^{18}F]FMISO [236]. Im murinen Tumormodell wurde teilweise ein besseres Tumor/Muskel-Verhältnis für [^{18}F]FMISO festgestellt, da der Vergleichstracer [^{18}F]FAZA keine Retentionskinetik zeigte [240]. Eine andere Studie fand hingegen in einem Sarkom-Modell in der Ratte eine [^{18}F]FMISO-Retentionskinetik bei einer [^{18}F]HX4-Auswaschkinetik, dennoch mit besseren Tumor/Blut-Ratios für den hydrophileren Tracer in den ersten 3 Stunden *p.i.* [333].

Es scheint also vom Modell-spezifischen Zusammenspiel zwischen Diffusion, Partition und *Clearance* abhängig zu sein, welcher Tracer das beste Verhältnis der Retention- bzw. Auswaschkinetik zwischen krankem und gesundem Gewebe bietet und damit den besten Kontrast erreicht. Die Entwicklung der Ribosederivate wie [^{18}F]β-FAZDR erfolgte unter anderem in der Hoffnung, aufgrund der Strukturähnlichkeit mit Nukleosiden den Transport in die Zelle über Nukleosidtransporter nutzen zu können, um somit eine höhere Gewebeaufnahme zu erreichen. Erste Untersuchungen hierzu weisen bereits darauf hin, dass dieser Mechanismus für [^{18}F]β-FAZDR möglich ist (persönliche Kommunikation, PD Dr. Gerald Reischl, Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Universität Tübingen). Es ist also denkbar, dass die bessere Sensitivität und Spezifität von [^{18}F]β-FAZDR durch eine verbesserte Hypoxie-spezifische Retention bedingt ist, ermöglicht durch einen erleichterten Transport in die Zelle.

Konsequenterweise muss jedoch die Hypoxie-Selektivität dieses Transports hinterfragt werden. Die ansteigende Ganzkörperaufnahme von [^{18}F]β-FAZDR in der Biodistribution ist möglicherweise ein Hinweis auf zusätzliche Mechanismen der [^{18}F]β-FAZDR-Aufnahme in die Zelle. Ein entsprechender, jedoch deutlicher Anstieg der Ganzkörperaufnahme mit der Schwere der Arthritis wurde auch für den Proliferationstracer [^{18}F]Fluorothymidin ([^{18}F]FLT) beobachtet (persönliche Kommunikation, Dr. Kerstin Fuchs, Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Universität Tübingen). Im Tumormodell zeigte sich au-

ßerdem eine Abhängigkeit der [^{18}F] β -FAZDR-Aufnahme vom Schlaf-Wach-Zyklus der Tiere (persönliche Kommunikation, Dr. Florian Maier, Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Universität Tübingen). Mittels der Pimonidazolfärbung konnte, bei den genannten technischen Einschränkungen, kein Nachweis einer Hypoxie schon an Tag 1 nach Arthritisinduktion erbracht werden. Hingegen berichtete eine Studie im CIA-Modell schon von einer relevanten Synovitis und Hypoxie-Pimonidazolfärbung, bevor die Arthritis klinisch sichtbar wurde [334]. Außerdem wurde eine erhöhte Ansammlung entzündungsspezifischer Zellen sowie eine vermehrte Anreicherung des Proliferationsmarkers Ki-67 im Anti-GPI-Modell gezeigt [167]. Dies lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein einer Hypoxie bereits 1 Tag nach Arthritisinduktion realistisch ist. Die vermehrte Akkumulation von [^{18}F] β -FAZDR schon 24 Stunden nach Antikörperinjektion aufgrund von Hypoxie-spezifischer Bindung ist also wahrscheinlich.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass mit den Hypoxie-Tracern [^{18}F] β -FAZDR und [^{18}F]FMISO eine nicht-invasive *in vivo* Bildgebung des Verlaufs und der Dynamik der Anti-GPI-induzierten Arthritis möglich ist. [^{18}F] β -FAZDR scheint dabei für die frühe Identifikation von pathologischen Veränderungen nach Antikörperinjektion geeigneter zu sein. Dieser Tracer ermöglicht die Differenzierung von Arthritis- und Kontrolltieren bereits zeitlich vor histologisch feststellbaren Veränderungen wie einer Knochenerosion und Knorpeldegradation. Frühere Studien ergaben, dass eine deutliche Unterscheidung zwischen Arthritis und Kontrolle mittels konventioneller T2-MR-Tomographie an Tag 1 nach Arthritisinduktion noch nicht verlässlich möglich ist [167]. Daher könnte [^{18}F] β -FAZDR ein wertvolles Instrument einer sensitiven und frühen Bildgebung der RA sein. Weitere (*in vitro* und *in vivo*) Untersuchungen zu den Mechanismen der [^{18}F] β -FAZDR-Aufnahme in die Zelle sollten jedoch angestrebt werden, um das in dieser Arbeit deutlich belegte Potential dieses Tracers in entzündlich-rheumatischen Erkrankungen verlässlich ausnutzen zu können.

Zwar konnte in dieser Arbeit kein Mehrwert der diffusionsgewichteten MR-Tomographie in der Frühdiagnostik der RA gezeigt werden, da der notwendige

Vergleich mit gesunden Kontrolltieren aufgrund eines sehr niedrigen *Signal-to-Noise*-Verhältnis technisch nicht möglich war. In Zukunft wären Messungen mit kleineren Spulen, die auf nur 1 Gelenk angepasst sind sowie die Wahl niedrigerer (und repetitiv gemessener) *b*-Werte Strategien, um das *Signal-to-Noise*-Verhältnis zu verbessern. Bei arthritischen Tieren zeigte sich jedoch ein eindeutiges Diffusionssignal, wahrscheinlich bedingt durch das inflammatorische Ödem [335]. Interessanterweise nahmen dabei die ADC-Werte (unter Vorbehalt einer geringen Tierzahl) von Tag 3 auf Tag 6 nicht zu. Dies könnte durch die Balance zwischen vermehrtem Ödem bei jedoch gleichzeitig dichterem Gewebe und daher eingeschränkter Diffusion zu erklären sein. Folglich sollte die MRT-Diffusionsmessung in individuellen Tieren zur longitudinalen Beurteilung der Arthritisaktivität oder im Therapiemonitoring evaluiert werden [336].

In einem Melanom-Tumormodell war ein geringer ADC-Wert mit einer vermehrten Pimonidazolfärbung assoziiert, was aufgrund der eingeschränkten Diffusion in dichtem, mitunter hypoxischem Gewebe sinnvoll erscheint [337]. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich aufgrund der geringen Tierzahl bislang der Zusammenhang zwischen ADC-Werten und [¹⁸F]FMISO-Anreicherung im Gelenk nicht verlässlich beurteilen. Wie beschrieben, waren jedoch teilweise die ADC-*Hotspots* oberhalb des OSG zu finden. Hier sollten simultane Hypoxie-PET/DWI-MRT-Studien in größerer Gruppenstärke erfolgen, um das spezifische inflammatorische *Microenvironment* des einzelnen Gelenkes besser zu verstehen und u.U. prognostisch auszunutzen.

4.2 Validierung des therapeutischen Potenzials individueller Inhibitoren der p38-MAPK und dessen Monitoring mit dem Hypoxie-Tracer [¹⁸F]FMISO

Ziel der Studie war die Untersuchung des therapeutischen Potentials dreier verschiedener Klassen von Inhibitoren des MAPK-Signalweges. Zusätzlich sollte Hypoxie-PET und tägliche Messung der Gelenkschwellung zum Therapiemonitoring evaluiert werden. Bezogen auf den Gelenkdurchmesser konnte mit dem

hochselektiven p38-Inhibitor Skepinone-L ein signifikanter Therapieeffekt erzielt werden, die Ausbildung einer Arthritis wurde jedoch nicht verhindert. Andere MAPK-Inhibitoren mit verbesserter Selektivität (z.B. *SCIO-469 (Talmapimod)* [279; 280], *VX-702* [281; 282] und *Pamapimod* [275]) wurden hingegen als sehr wirksam in präklinischen RA-Modellen beschrieben und konnten die Entzündung effektiver unterdrücken. Dieser Unterschied zur vorliegenden Arbeit mit Skepinone-L ist wahrscheinlich durch mehrere Ursachen bedingt. Als wichtigster Punkt kommt die Nutzung eines anderen Tiermodells der RA in Frage. Zuvor entwickelte Inhibitoren wurden vor allem im klassischen CIA- und Adjuvanz-induzierten (AIA)-Modell der Arthritis getestet. Bei der Induktion der Erkrankung in diesen Modellen spielt sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem eine Rolle [154]. Das Serum-Transfer-Modell mit Autoantikörpern gegen GPI spiegelt jedoch die Effektorphase der Erkrankung wieder und ist daher in der Initiierung nur auf das angeborene Immunsystem angewiesen (vgl. 1.2) [171]. Eine Anti-GPI-induzierte RA konnte auch in RAG-1-Mäusen, die keine B- und T-Zellen bilden, initiiert werden [172].

Die p38-MAPK kann, abhängig von Zell- und Inflammationstyp, pro- und anti-inflammatorische Funktionen ausüben. Guma *et al.* zeigten, dass p38-Depletion in Makrophagen zu einer signifikanten Verschlechterung der Arthritis im Anti-GPI-Modell führt, bei moderater Verschlechterung im AIA-Modell. Zusätzlich wurden erniedrigte IL-10-Spiegel gemessen [338], was die anti-inflammatorische Funktion von p38 in Makrophagen verdeutlicht. Auch in anderen angeborenen Immunzellen wie dendritischen Zellen konnte gezeigt werden, dass ERK und p38-MAPK die Expression von IL-10 fördern [288], ein im Anti-GPI- und CIA-Modell protektives Zytokin [339; 340]. Bezüglich anti-inflammatorischer Funktionen von p38 in adaptiven Immunzellen ist bekannt, dass die Kinase in der IL-10-Expression von regulatorischen B-Zellen [341] und der Aufrechterhaltung eines anergischen Zustandes von T-Zellen beteiligt ist [342]. Die Produktion von IL-10 in T-Zellen ist jedoch ausschließlich von ERK abhängig [343]. P38-Defizienz in TLR-stimulierten T-Zellen führte in einer Studie zusätzlich zur vermehrten Ausschüttung von IL-4, von dem eine protektive Wirkung im AIA- und CIA-Modell angenommen wird [344]. Zusammengefasst

wäre es also denkbar, dass ein hochselektiver p38-Inhibitor im Anti-GPI-Modell (Inhibition von anti-inflammatorischer p38 in angeborenen Immunzellen, dabei geringe Bedeutung pro-inflammatorischer p38 in adaptiven Immunzellen) relativ gesehen weniger therapeutischen Effekt erzielen kann, im Vergleich zum CIA- und AIA-Modell.

Ein zusätzlicher Aspekt einer anti-inflammatorischen Funktion von p38 ist die zentrale Stellung der Kinase in multiplen negativen Feedback-Schleifen, welche zur Suppression einer überschießenden Inflammation dienen. Ein bekanntes Beispiel ist die Induktion der MKP-1 durch p38, welche dann inhibierend auf p38 und JNK wirkt [345]. Selektive Inhibition von p38 oder p38-Defizienz kann zu erhöhten ERK- und JNK-Spiegeln führen [289], was in mehreren Studien in angeborenen Immunzellen [287], jedoch kürzlich auch in T-Zellen gezeigt wurde [344]. Eine vergleichende Analyse der dynamischen MAPK-Expression im CIA- und Anti-GPI-Modell zeigte, dass sich die Expressionsmuster der MAPK zwischen diesen Modellen erheblich unterscheidet [296]. Im Gegensatz zum Anti-GPI-Modell ist im CIA-Modell keine erhöhte basale ERK-Aktivität im Vergleich zu Kontrollmäusen gezeigt worden. Zusätzlich vermuteten Fukushima *et al.*, dass das Anti-GPI-Modell zur Evaluation neuer JNK-Inhibitoren besser geeignet sein könnte, da das Expressionsmuster der Kinase besser mit humaner RA übereinstimmt [296]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die bisher häufig verwendeten Tiermodelle zur Evaluation neuer p38-Inhibitoren das komplexe Netzwerk des MAPK-Signalweges möglicherweise ungenügend wieder spiegeln. Interessanterweise zeigte sich bei Inhibition der MKK-3 und MKK-6 ein Therapieerfolg im Anti-GPI- und CIA-Modell. Dies unterstützt die momentanen Tendenzen in der pharmakologischen Forschung auf Targets *upstream* von p38 [249].

Der duale p38/PDE-4-Inhibitor ML 3595 führte in dieser Arbeit zum stärksten therapeutischen Effekt am Zeitpunkt der maximalen Entzündungsreaktion (Tag 6), obwohl der Verlauf der Gelenkschwellung insgesamt mit Skepinone-L-Therapie vergleichbar war. Die pharmakologische Potenz zur p38-Inhibition von ML 3595 ist jedoch geringer als für Skepinone-L (vgl. 2.4). Es ist daher wahr-

scheinlich, dass die Inhibition von PDE-4 einen additiven therapeutischen Effekt zur p38-Inhibition von ML 3595 ermöglicht. Dazu passend wurde *Apremilast*, ein selektiver PDE-4-Inhibitor, kürzlich für die Psoriasis-Arthritis zugelassen [346] und konnte auch im CIA-Modell die Inflammation unterdrücken [293]. Eine PDE-4-Inhibition führt wahrscheinlich über eine Erhöhung der intrazellulären Level von *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) zur Herunterregulation von pro-inflammatorischen Signalwegen wie NF- κ B und zu einer verstärkten Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [347]. Zusätzlich könnte der Therapieerfolg von PDE-4-Inhibitoren teilweise durch eine Erhöhung der MKP-1-Aktivität bedingt sein. Dies würde über eine verminderte Aktivität von p38 und JNK die oben beschriebenen negativen Feedback-Mechanismen unterstützen [348]. Koch *et al.* zeigten in einem durch *Complete Freund's Adjuvans* (CFA)-induzierten Rattenmodell der RA einen besseren Krankheitsverlauf unter ML 3595-Therapie, im Vergleich zu einem selektiven p38-Inhibitor. Dabei wurden erhöhte IL-10- und erniedrigte TNF- α -Spiegel gemessen [295]. Schlussendlich ist der größere Therapieeffekt von ML 3595 gegenüber Skepinone-L jedoch in dieser Arbeit nicht statistisch relevant. Weitergehende Studien mit stärkeren Gruppengrößen wären für eine aussagekräftige Statistik notwendig. Zusätzlich kann bei geringen Differenzen in den Gelenkschwellungen auch eine inkorrekte oder unpräzise Messung nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte zumindest mit ursächlich für den niedrigeren Gelenkdurchmesser von ML 3595-Kontrolltieren an Tag 6 nach Kontrollserum-Injektion sein.

Interessanterweise begann in der zitierten Studie von Guma *et al.* die Verschlechterung der Arthritis nach p38-Depletion in Makrophagen erst in einem subakuten Stadium der Erkrankung bei bereits etablierter Arthritis. Die Studie wurde in C57BL/6-Mäusen durchgeführt [338]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete prophylaktische Therapieansatz führte zu einer signifikanten Reduktion der Gelenkschwellung bereits 1 Tag nach Arthritisinduktion, sowohl für ML 3595-, als auch Skepinone-L-Therapie. An Tag 3, als klinische Zeichen der Arthritis in allen Versuchstieren erkennbar waren, wurde der Therapieeffekt passager geringer. Möglicherweise wird von diesem subakuten Zeitpunkt an ein anti-inflammatorischer Effekt der p38 bedeutend, was wiederum zu weniger

Therapieeffekt führt. Jedoch können bei diesen leichten Veränderungen auch zufällige Schwankungen nicht ausgeschlossen werden.

Zwei wichtige Konsequenzen können jedoch gezogen werden. Zum einen kann das Therapieregime, therapeutisch oder prophylaktisch, enormen Einfluss auf den Erfolg der Studie ausüben [349]. Außerdem muss bedacht werden, dass die Suszeptibilität, Dynamik und Schwere der Inflammation zwischen verschiedenen Mausstämmen differiert. So zeigen Tiere mit einem C57BL/6-Hintergrund einen verzögerten Verlauf der Anti-GPI-Arthritis, im Vergleich zu den hier verwendeten BALB/c-Tieren [176]. Dies hat möglicherweise Einfluss auf die beschriebene Dynamik der Erkrankung. Nach aktuellem Kenntnisstand hat bislang nur eine Studie den Einsatz eines selektiven p38-Inhibitors in der Anti-GPI-Arthritis untersucht [350]. Obwohl die p38-Inhibition in dieser Studie zu einer stärkeren Suppression der Arthritisaktivität geführt hat, unterschieden sich die Dynamik des Krankheitsverlaufs und der genetische Hintergrund der Tiere von der vorliegenden Arbeit, was die Vergleichbarkeit beeinträchtigen könnte.

Die statistische Auswertung der Varianzen und die histologische Untersuchung ergaben, dass der therapeutische Effekt der ML 3595- und Skepinone-L-Gabe stark zwischen einzelnen Tieren differiert (*Responder* und *Non-Responder*). Mögliche Erklärungen hierfür sind Unterschiede in der Konstitution einzelner Tiere oder eine inkonsistente Bioverfügbarkeit des Inhibitors. Jedoch muss auch ein spezifisches Charakteristikum der Anti-GPI-Arthritis bedacht werden und zwar die unterschiedliche Abhängigkeit des Modells von TNF- α [174]. Da die p38-MAPK starken positiven Einfluss auf die TNF-Produktion nimmt [258; 351], könnte eine p38-Inhibition in diesem RA-Modell zu unterschiedlichen Effekten führen.

Das offensichtliche Versagen der Therapie mit dem p38/JNK 3-Inhibitor LN 950 hat wahrscheinlich mehrere Gründe, unter anderem eine erhöhte Lipophilie und daher reduzierte Löslichkeit des Inhibitors in wässrigen Medien wie Blut, was eine schlechte *in vivo* Aktivität zur Folge haben könnte (persönliche Kommunikation, Prof. Stefan Laufer). Zudem besitzt der Inhibitor eine kürzere sog. *Target-Residence Time* an der p38-Kinase, d.h. eine kürzere Dauer der Bindung

des Inhibitors an die Kinase, im Vergleich zu Skepinone-L (persönliche Kommunikation, Prof. Stefan Laufer). Aufgrund der besonderen Bedeutung von JNK in der Knorpel- und Knochendestruktion [268] ist anzumerken, dass sich weder periostale Erosionen noch inflammatorisches Infiltrat von der PBS-Gruppe unterschieden. Bisherige Studien zu JNK-Inhibitoren zeigten vor allem für die Isoformen JNK 1 und JNK 2 eine differenzielle Bedeutung in der Arthritis. Die von LN 950 inhibierte JNK 3 scheint vor allem Gewebe-spezifisch in Neuronen vorzukommen [266; 352]. Es wäre also für zukünftige Versuche zusätzlich zu klären, ob JNK 3 ein relevantes Target in der Arthritis darstellt.

Wie schon erwähnt, wurde auch die p38-MAPK mit Hypoxie-abhängigen Signalwegen in Verbindung gebracht und zwar in mehreren Pathologien wie Tumor [353], Alzheimer [354] und RA [116]. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse zum Nutzen von Hypoxie-Bildgebung im Therapiemonitoring von MAPK-Therapie in der experimentellen RA gezeigt werden. Unter Therapie mit ML 3595 war die [¹⁸F]FMISO-Aufnahme bei Inhibitor therapierten Tieren an Tag 6 reduziert, im Vergleich zur PBS-Gruppe. Dies scheint zunächst die Daten zum Gelenkdurchmesser widerzuspiegeln. Die Korrelationsanalyse zwischen Traceraufnahme und Gelenkmessung ergab jedoch eine sehr schwache Korrelation für ML 3595 therapierte Tiere, v.a. bei der Berechnung ohne Kontrollen.

Die in der Tracervergleichsstudie (vgl. 3.2.3) schon beobachtete schwache Korrelation zwischen Hypoxie und Gelenkschwellung in fortgeschrittener Arthritis wird durch die individuelle Inhibitorwirkung wahrscheinlich noch zum Negativen verstärkt. Beide Verfahren detektieren also insgesamt eine Reduktion des Merkmals „Arthritis“ in der gesamten Gruppe, jedoch im einzelnen Gelenk unabhängig voneinander und nicht notwendigerweise in gleichem Ausmaße (analog zu 4.1). Sehr deutlich wurde dies in der Analyse der prozentualen Zu- bzw. Abnahme im Vergleich zum Mittelwert der PBS-Gruppe, gemessen mit den Parametern Gelenkdurchmesser oder Traceraufnahme. Bislang ist es noch unklar, welchen zusätzlichen Effekt die einzelnen Inhibitoren auf den Zusammenhang zwischen Arthritis/Ödem und Hypoxie im Gelenk genau ausüben. Hier spielen

möglicherweise Hypoxie-unabhängige und Hypoxie-abhängige Einflüsse der Therapie auf die Traceraufnahme eine Rolle (außerdem der niedrig gemessene Gelenkdurchmesser für ML 3595-Kontrolltiere an Tag 6). Es ist offensichtlich, dass u.a. über die Beeinflussung von Angiogenese und Zellproliferation durch p38 ein direkter Einfluss eines Inhibitors auf die Hypoxie möglich ist [259]. Die erhöhten Werte für die [¹⁸F]FMISO-Aufnahme in der Kontrollgruppe von Skepinone-L (Tag 3) sowie ML 3595 (Tag 6) weisen jedoch auf zusätzliche Hypoxie-unabhängige Einflüsse des Inhibitors auf die Tierphysiologie hin. Abbildung 39 fasst den möglichen Zusammenhang der in dieser Arbeit erfassten Parameter zusammen.

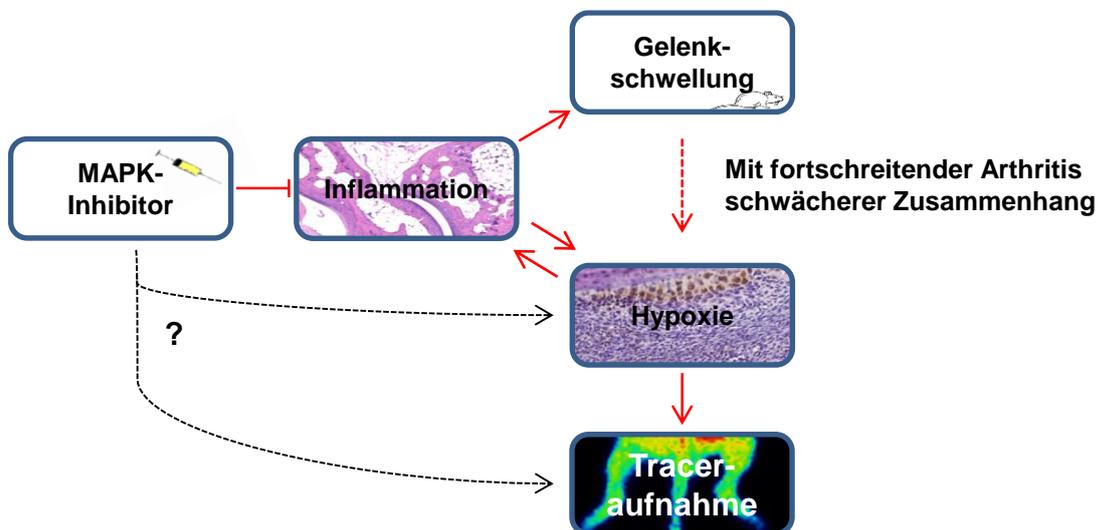


Abbildung 39: Möglicher Zusammenhang der im Rahmen der MAPK-Therapiestudie erfassten Parameter. Eine Therapie mit MAPK-Inhibitoren beeinflusst den mit fortschreitender Arthritis schwächeren Zusammenhang zwischen Gelenkdurchmesser und Hypoxie noch zusätzlich. Möglich sind Hypoxie-abhängige und -unabhängige Mechanismen. Pfeilfarbe: Rot = Verstärkung, Schwarz = unklarer Zusammenhang.

Für die Skepinone-L-Therapiegruppe zeigte sich die Traceraufnahme aufgrund der hohen Varianz nicht relevant verschieden von der PBS-Gruppe, im Gegensatz zum durch Gelenkmessung detektierten therapeutischen Effekt. Die Korrelation zwischen Gelenkschwellung und Traceraufnahme innerhalb der Gruppe war jedoch trotzdem deutlich besser, im Vergleich zu ML 3595 therapierten Versuchstieren. Unter LN 950-Therapie war die [¹⁸F]FMISO-Aufnahme an Tag 6 deutlich erhöht, im Vergleich zur PBS-Gruppe. Diese Erhöhung konnte nicht im

selben Maße in der Messung der Gelenkschwellungen nachvollzogen werden. Die PET-Ergebnisse für LN 950 widersprechen jedoch der oben beschriebenen These einer insuffizienten Wirkung von LN 950, da die Therapie anscheinend einen gewissen Effekt auf das hypoxische Gelenk und damit die Traceraufnahme zu haben scheint. Möglich wären in zukünftigen Studien z.B. Messungen des Inhibitor-Plasmaspiegels im Blut, um diese Frage zu klären.

Zusammengefasst ist also nur für die ML 3595-Therapie der Therapieeffekt insgesamt im Hypoxie-PET nachzuvollziehen. Weitere *ex vivo* Validierungsverfahren, z.B. Messung von Zytokin Spiegel oder differenzierte histologische Gutachten könnten zur Klärung des Zusammenhangs zwischen p38-Inhibition, Modulation der Hypoxie und Inflammation hilfreich sein. Im praktischen Sinne eines Therapiemonitorings ist dies jedoch nicht zwingend notwendig, wenn der Nutzen von Hypoxie-PET (analog zum [¹⁸F]FDG-PET) in längeren Beobachtungszeiträumen als Prognoseinstrument zum Therapieansprechen gezeigt werden könnte. Ob klinische Messung der Gelenkdurchmesser oder Hypoxie-PET prognostisch wertvoller eine Inflammationsreduktion detektieren, kann momentan nicht beantwortet werden und sollte in zukünftigen, longitudinalen Studien untersucht werden.

Auf die Fragestellung dieser Arbeit bezogen, kann der Einsatz von Hypoxie-PET zum Monitoring der p38-MAPK-Therapie in experimenteller RA zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig empfohlen werden. Es ist durchaus denkbar, dass mittels [¹⁸F]FMISO-PET die Schwere und Prognose der (individuellen) Inflammation (analog zum Tumor) valide differenziert werden kann. Andere Radiotracer, die direkter von p38 regulierte Mechanismen detektieren, sollten jedoch zusätzlich evaluiert werden, um die Vorteile einer molekularen Bildgebung in der Beurteilung der individuellen Inflammation auszunutzen. Ein vielversprechender Kandidat wäre hier der Proliferationstracer [¹⁸F]FLT, welcher im Anti-GPI-Modell als sehr geeignet zur sensitiven Detektion der Arthritis-Progression charakterisiert wurde [167].

Bisher haben nur wenige Studien den Effekt einer p38-Inhibition im Anti-GPI-Modell untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, wie chemi-

sche Inhibition [350; 355] oder Studien mit *Knock-out* Tieren [338; 356]. Dies macht es äußerst schwierig, den relativen Beitrag und die Funktion der p38-MAPK in individuellen Krankheitsverläufen zu verstehen und möglicherweise therapeutisch zu modulieren. Einige bisher berichtete Ergebnisse mit weniger selektiven Pharmaka wie *SB203580* oder *BIRB-769* sind dabei nicht vollständig vergleichbar [276]. Kürzlich wurde gezeigt, dass MAPK-Inhibitoren erfolgreich in neuropathischen Schmerzsyndromen eingesetzt werden können [357]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es, trotz der aktuellen Resignation in Bezug auf p38-Therapie in der RA, weiterhin notwendig ist, mittels selektiver Inhibitoren die Mechanismen des Signalweges zu klären. Zudem bietet die duale Inhibition von p38-MAPK und PDE-4 mittels ML 3595 einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz.

5. Zusammenfassung

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung der Möglichkeiten molekularer Hypoxie-Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in experimenteller rheumatoider Arthritis (RA). Hierfür wurde der neu entwickelte Hypoxie-PET-Tracer [^{18}F] β -FAZDR mit dem Referenztracer [^{18}F]FMISO in der sensitiven und frühzeitigen Beurteilung der Arthritis evaluiert. Außerdem wurde das gut charakterisierte [^{18}F]FMISO im Therapie-monitoring bei Inhibition des p38-MAPK-Signalweges eingesetzt. Sekundäres Ziel der Arbeit war die Evaluation verschiedener Inhibitorclassen dieses pathophysiologisch wichtigen und mit Hypoxie verbundenen Signalweges. Hierüber sollte ein Beitrag zum Verständnis der Bedeutung der p38-MAPK in der experimentellen RA geleistet werden.

Hypoxie gilt als wichtiges Charakteristikum der Gelenkinflammation und beeinflusst Mechanismen zur Chronifizierung der Arthritis, u.a. die Neoangiogenese. Durch optimierte immunhistochemische Analysen mittels Pimonidazol konnte das Vorliegen von Hypoxie im durch Antikörper gegen Glukose-6-Phosphat Isomerase (Anti-GPI)-induzierten Arthritismodell untersucht und bestätigt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten PET-Untersuchungen zeigen, dass vor allem mit dem neu entwickelten Hypoxie-Tracer [^{18}F] β -FAZDR eine sensitive und spezifische Detektion der Arthritis bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Erkrankungsverlauf möglich ist. Beide in dieser Arbeit eingesetzten Hypoxie-Tracer erlauben jedoch die sensitive Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung. Diese Ergebnisse stellen sich gegen die zuletzt häufig vorgebrachte Kritik eines ungenügenden Bild-Kontrasts im Hypoxie-PET und können eine zusätzliche Motivation für die weitere Evaluierung dieser Modalität in entzündlich-rheumatischen Erkrankungen darstellen. Im Falle des Tracer [^{18}F] β -FAZDR scheinen jedoch zunächst weitere Untersuchungen zum zellulären Aufnahmemechanismen notwendig, um das volle Potential dieses Tracers verlässlich ausschöpfen zu können.

Der p38-MAPK-Signalweg steht an zentraler Stelle von pro-inflammatorischen Zytokin-Netzwerken und seine Inhibition ist daher seit langem im Fokus der Forschung zur RA-Therapie. In dieser Arbeit konnte mittels des hochselektiven p38-Inhibitors Skepinone-L sowie des dualen p38/PDE-4-Inhibitors ML 3595 eine Suppression der Anti-GPI-induzierten Arthritis erreicht werden. Trotz des Misserfolgs von p38-Inhibitoren in klinischen Studien gibt diese Arbeit eine Rationale zur weiteren Evaluation von p38-Inhibitoren in experimenteller RA. Dabei können hochselektive Inhibitoren wie Skepinone-L einen Beitrag zum Verständnis der differentiellen Funktion der Kinase in verschiedenen Tiermodellen leisten. Zudem erscheint die duale Inhibition von p38-MAPK und PDE-4 als vielversprechender therapeutischer Ansatz und liegt im Trend der aktuellen pharmakologischen Forschung, die den Fokus von hochselektiven p38-Inhibitoren abrückt.

MAPK-Therapiemonitoring mittels [¹⁸F]FMISO-Hypoxie-PET ergab nicht-konklusive Ergebnisse, im Vergleich mit der Messung der Gelenkdurchmesser. Der Einsatz von molekularer Hypoxie-Bildgebung im Therapiemonitoring sollte daher in prospektiven Beobachtungen als prognostisches Instrument bei p38-MAPK-Therapie weiter evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Scott DL, Wolfe F and Huizinga TW (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet* **376**(9746): 1094-1108
- [2] Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, Verstappen SM, Aggarwal A, Alten R, Andersone D, Badsha H, Baecklund E, Belmonte M, Craig-Muller J, da Mota LM, Dimic A, Fathi NA, Ferraccioli G, Fukuda W, Geher P, Gogus F, Hajjaj-Hassouni N, Hamoud H, Haugeberg G, Henrohn D, Horslev-Petersen K, Ionescu R, Karateew D, Kuuse R, Laurindo IM, Lazovskis J, Luukkainen R, Mofti A, Murphy E, Nakajima A, Oyoo O, Pandya SC, Pohl C, Predeteanu D, Rexhepi M, Rexhepi S, Sharma B, Shono E, Sibia J, Sierakowski S, Skopouli FN, Stropuviene S, Toloza S, Valter I, Woolf A and Yamanaka H (2010) Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* **12**(2): R42
- [3] Schmidt KL, Largiadèr F, Sturm A and Wicki O (2012) Checkliste Rheumatologie. pp 120-135, 4 edn, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [4] Pratesi F, Petit Teixeira E, Sidney J, Michou L, Puxeddu I, Sette A, Cornelis F and Migliorini P (2013) HLA shared epitope and ACPA: Just a marker or an active player? *Autoimmunity Reviews* **12**(12): 1182-1187
- [5] McInnes IB and Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **365**(23): 2205-2219
- [6] Stastny P (1976) Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **57**(5): 1148-1157
- [7] Gregersen PK, Silver J and Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **30**(11): 1205-1213
- [8] Imboden JB (2009) The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* **4**: 417-434
- [9] Arend WP and Firestein GS (2012) Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol* **8**(10): 573-586
- [10] Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB and van Venrooij WJ (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* **101**(1): 273-281

- [11] van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE and de Vries RR (2006) The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**(4): 1117-1121
- [12] Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, Schreuder GM, Wener M, Breedveld FC, Ahmad N, Lum RF, de Vries RR, Gregersen PK, Toes RE and Criswell LA (2005) Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* **52**(11): 3433-3438
- [13] Vessey MP, Villard-Mackintosh L and Yeates D (1987) Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* **35**(5): 457-464
- [14] Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Ronnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapaa-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L and Alfredsson L (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* **54**(1): 38-46
- [15] van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR and Toes RE (2007) Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56**(6): 1728-1735
- [16] Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P and Schett G (2012) Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* **122**(5): 1791-1802
- [17] Willemze A, Trouw LA, Toes RE and Huizinga TW (2012) The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. *Nat Rev Rheumatol* **8**(3): 144-152
- [18] Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U and van Venrooij WJ (2003) Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**(10): 2741-2749
- [19] Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP and Dijkmans BA (2004) Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* **50**(2): 380-386

- [20] van der Woude D, Rantapaa-Dahlqvist S, Ioan-Facsinay A, Onnekink C, Schwarte CM, Verpoort KN, Drijfhout JW, Huizinga TW, Toes RE and Pruijn GJ (2010) Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann Rheum Dis* **69**(8): 1554-1561
- [21] van de Stadt LA, de Koning MH, van de Stadt RJ, Wolbink G, Dijkmans BA, Hamann D and van Schaardenburg D (2011) Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **63**(11): 3226-3233
- [22] Suwannalai P, van de Stadt LA, Radner H, Steiner G, El-Gabalawy HS, Zijde CM, van Tol MJ, van Schaardenburg D, Huizinga TW, Toes RE and Trouw LA (2012) Avidity maturation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **64**(5): 1323-1328
- [23] Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Rönnelid J and Rantapää-Dahlqvist S (2011) Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* **13**(1): R13-R13
- [24] Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L and Alfredsson L (2008) Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **26**: 651-675
- [25] Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA and Cairns E (2003) Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* **171**(2): 538-541
- [26] Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L and Catrina AI (2008) Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* **67**(10): 1488-1492
- [27] Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid J, Klareskog L and Alfredsson L (2011) Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis* **70**(3): 508-511
- [28] Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M and Venables PJ (2010) Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* **233**(1): 34-54
- [29] Klareskog L, Lundberg K and Malmstrom V (2013) Autoimmunity in rheumatoid arthritis: citrulline immunity and beyond. *Adv Immunol* **118**: 129-158

- [30] Snir O, Rieck M, Gebe JA, Yue BB, Rawlings CA, Nepom G, Malmstrom V and Buckner JH (2011) Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* **63**(10): 2873-2883
- [31] Law SC, Street S, Yu CH, Capini C, Ramnoruth S, Nel HJ, van Gorp E, Hyde C, Lau K, Pahau H, Purcell AW and Thomas R (2012) T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Res Ther* **14**(3): R118
- [32] Menard L, Saadoun D, Isnardi I, Ng Y-S, Meyers G, Massad C, Price C, Abraham C, Motaghedi R, Buckner JH, Gregersen PK and Meffre E (2011) The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *The Journal of Clinical Investigation* **121**(9): 3635-3644
- [33] Chang X, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T and Yamamoto K (2005) Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* **44**(11): 1374-1382
- [34] Makrygiannakis D, af Klint E, Lundberg IE, Lofberg R, Ulfgren AK, Klareskog L and Catrina AI (2006) Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis* **65**(9): 1219-1222
- [35] Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ and Tak PP (2004) The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* **50**(11): 3485-3494
- [36] Binstadt BA, Patel PR, Alencar H, Nigrovic PA, Lee DM, Mahmood U, Weissleder R, Mathis D and Benoist C (2006) Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nat Immunol* **7**(3): 284-292
- [37] Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C and Mathis D (2010) Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* **32**(6): 815-827
- [38] Scher JU and Abramson SB (2011) The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**(10): 569-578
- [39] Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R, Sumida T, Hitchon CA, Schur PH, Anderson RJ, Coblyn JS, Weinblatt ME, Brenner M, Duclos B, Pasquali JL, El-Gabalawy H, Mathis D and Benoist C (2003) Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* **48**(4): 944-954

- [40] Waaler E (2007) On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *Apmis* **115**(5): 422-438; discussion 439
- [41] Bartok B and Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* **233**(1): 233-255
- [42] Kiener HP and Karonitsch T (2011) The synovium as a privileged site in rheumatoid arthritis: cadherin-11 as a dominant player in synovial pathology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **25**(6): 767-777
- [43] Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, Hallmans G, Lejon K and Rantapaa Dahlqvist S (2010) Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **62**(2): 383-391
- [44] McInnes IB and Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* **7**(6): 429-442
- [45] Boissier MC (2011) Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Joint Bone Spine* **78**(3): 230-234
- [46] Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD and Salmon M (2005) Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* **7**(4): R784-795
- [47] Montecucco F and Mach F (2009) Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **48**(1): 11-22
- [48] Geiler J, Buch M and McDermott MF (2011) Anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* **17**(29): 3141-3154
- [49] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D and Kollias G (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo j* **10**(13): 4025-4031
- [50] Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Koenders MI, Baeuerle PA and van den Berg WB (2009) Combined blockade of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 17 pathways potently suppresses chronic destructive arthritis in a tumour necrosis factor alpha-independent mouse model. *Ann Rheum Dis* **68**(5): 721-728
- [51] Srirangan S and Choy EH (2010) The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **2**(5): 247-256

- [52] Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M and Iwakura Y (2000) Development of Chronic Inflammatory Arthropathy Resembling Rheumatoid Arthritis in Interleukin 1 Receptor Antagonist–Deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine* **191**(2): 313-320
- [53] Feldmann M, Brennan FM and Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **14**: 397-440
- [54] Koenders MI, Joosten LA and van den Berg WB (2006) Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* **65 Suppl 3**: iii29-33
- [55] Koenders MI, Lubberts E, van de Loo FA, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Kolls JK, Di Padova FE, Joosten LA and van den Berg WB (2006) Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions. *J Immunol* **176**(10): 6262-6269
- [56] Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA and van den Berg WB (2001) IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol* **167**(2): 1004-1013
- [57] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR and Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**: 821-852
- [58] Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ and Arend WP (1994) Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **37**(5): 644-652
- [59] Wehrens EJ, Prakken BJ and van Wijk F (2013) T cells out of control--impaired immune regulation in the inflamed joint. *Nat Rev Rheumatol* **9**(1): 34-42
- [60] van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW and van Laar JM (2008) Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(1): 53-60
- [61] Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, McInnes IB and Liew FY (2000) IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *European Journal of Immunology* **30**(11): 3147-3156

- [62] Janson PC, Linton LB, Bergman EA, Marits P, Eberhardson M, Piehl F, Malmstrom V and Winqvist O (2011) Profiling of CD4+ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *J Immunol* **186**(1): 92-102
- [63] Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y and Yoshikai Y (2008) Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**(9): 1299-1304
- [64] Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N and Falgarone G (2012) Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun* **39**(3): 222-228
- [65] Miossec P, Korn T and Kuchroo VK (2009) Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *New England Journal of Medicine* **361**(9): 888-898
- [66] van den Berg WB and Miossec P (2009) IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **5**(10): 549-553
- [67] Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, Wucherpfennig K, Turley S, Carroll MC, Sobel RA, Bettelli E and Kuchroo VK (2011) Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity* **35**(6): 986-996
- [68] Nakae S, Nambu A, Sudo K and Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* **171**(11): 6173-6177
- [69] Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA and van den Berg WB (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* **50**(2): 650-659
- [70] Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A and Matthys P (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* **158**(11): 5507-5513
- [71] Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H and Skapenko A (2010) Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* **62**(10): 2876-2885
- [72] Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M and Wedderburn LR (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(33): 14751-14756

- [73] Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, Bowman EP, Sgambellone NM, Chan C-C and Caspi RR (2008) Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of Experimental Medicine* **205**(4): 799-810
- [74] van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, Dolhain RJ and Lubberts E (2011) Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum* **63**(1): 73-83
- [75] van den Berg WB and McInnes IB (2013) Th17 cells and IL-17 a--focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Semin Arthritis Rheum* **43**(2): 158-170
- [76] Wehrens EJ, Mijnheer G, Duurland CL, Klein M, Meerding J, van Loosdregt J, de Jager W, Sawitzki B, Coffier PJ, Vastert B, Prakken BJ and van Wijk F (2011) Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood* **118**(13): 3538-3548
- [77] Amara K, Steen J, Murray F, Morbach H, Fernandez-Rodriguez BM, Joshua V, Engstrom M, Snir O, Israelsson L, Catrina AI, Wardemann H, Corti D, Meffre E, Klareskog L and Malmstrom V (2013) Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med* **210**(3): 445-455
- [78] Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM and Shaw T (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **350**(25): 2572-2581
- [79] Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ and Weyand CM (2001) T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* **167**(8): 4710-4718
- [80] Gierut A, Perlman H and Pope RM (2010) Innate Immunity and Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America* **36**(2): 271-296
- [81] Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebaul A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F and Foxwell B (2009) Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* **15**(7): 774-780
- [82] Takahashi N, de Jager VC, Gluck A, Letzkus M, Hartmann N, Staedtler F, Ribeiro-Dias F, Heuvelmans-Jacobs M, van den Berg WB and Joosten LA (2008) The molecular signature of oxidative metabolism and the mode of macrophage activation determine

the shift from acute to chronic disease in experimental arthritis: critical role of interleukin-12p40. *Arthritis Rheum* **58**(11): 3471-3484

[83] Li J, Hsu H-C and Mountz JD (2012) Managing Macrophages in Rheumatoid Arthritis by Reform or Removal. *Current rheumatology reports* **14**(5): 445-454

[84] Wijbrandts CA, Vergunst CE, Haringman JJ, Gerlag DM, Smeets TJ and Tak PP (2007) Absence of changes in the number of synovial sublining macrophages after ineffective treatment for rheumatoid arthritis: Implications for use of synovial sublining macrophages as a biomarker. *Arthritis Rheum* **56**(11): 3869-3871

[85] Han Z, Boyle DL, Manning AM and Firestein GS (1998) AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* **28**(4): 197-208

[86] Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ and Green DR (1997) Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(20): 10895-10900

[87] Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE and Gay S (1996) Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* **149**(5): 1607-1615

[88] Bottini N and Firestein GS (2013) Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* **9**(1): 24-33

[89] Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnaker EM, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Sturz H, Steinmeyer J, Gay S, Scholmerich J, Pap T, Muller-Ladner U and Neumann E (2009) Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* **15**(12): 1414-1420

[90] Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M and Brenner MB (2007) Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* **315**(5814): 1006-1010

[91] Van den Berg WB (2002) Lessons from animal models of arthritis. *Curr Rheumatol Rep* **4**(3): 232-239

[92] Schett G and Gravallese E (2012) Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* **8**(11): 656-664

[93] Ejbjerg B, Narvestad E, Rostrup E, Szkudlarek M, Jacobsen S, Thomsen HS and Ostergaard M (2004) Magnetic resonance imaging of wrist and finger joints in healthy

subjects occasionally shows changes resembling erosions and synovitis as seen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **50**(4): 1097-1106

[94] McGonagle D, Tan AL, Moller Dohn U, Ostergaard M and Benjamin M (2009) Microanatomic studies to define predictive factors for the topography of periarticular erosion formation in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **60**(4): 1042-1051

[95] van der Heijde DM (1995) Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **34 Suppl 2**: 74-78

[96] Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG and Schwarz EM (2003) Mechanisms of TNF- α - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **111**(6): 821-831

[97] Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD and Mundy GR (1986) Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* **319**(6053): 516-518

[98] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* **93**(2): 165-176

[99] Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS and Goldring SR (1998) Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *The American Journal of Pathology* **152**(4): 943-951

[100] Strehl C, Fangradt M, Fearon U, Gaber T, Buttgereit F and Veale DJ (2014) Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *J Leukoc Biol* **95**(2): 233-241

[101] Konisti S, Kiriakidis S and Paleolog EM (2012) Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **8**(3): 153-162

[102] Lee YA, Kim JY, Hong SJ, Lee SH, Yoo MC, Kim KS and Yang HI (2007) Synovial proliferation differentially affects hypoxia in the joint cavities of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clin Rheumatol* **26**(12): 2023-2029

[103] Eltzschig HK and Carmeliet P (2011) Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* **364**(7): 656-665

[104] Vaupel P (2010) Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression. *Exp Oncol* **32**(3): 125-127

- [105] Lund-Olesen K (1970) Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum* **13**(6): 769-776
- [106] Sivakumar B, Akhavani MA, Winlove CP, Taylor PC, Paleolog EM and Kang N (2008) Synovial hypoxia as a cause of tendon rupture in rheumatoid arthritis. *J Hand Surg Am* **33**(1): 49-58
- [107] Ng CT, Biniiecka M, Kennedy A, McCormick J, Fitzgerald O, Bresnihan B, Buggy D, Taylor CT, O'Sullivan J, Fearon U and Veale DJ (2010) Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann Rheum Dis* **69**(7): 1389-1395
- [108] Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Biniiecka M, O'Sullivan JN, Heffernan E, Fearon U and Veale DJ (2011) Tumor necrosis factor blocking therapy alters joint inflammation and hypoxia. *Arthritis Rheum* **63**(4): 923-932
- [109] Muz B, Khan MN, Kiriakidis S and Paleolog EM (2009) Hypoxia. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **11**(1): 201
- [110] Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ and Lewis CE (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum* **44**(7): 1540-1544
- [111] Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**(3): 399-408
- [112] Nizet V and Johnson RS (2009) Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**(9): 609-617
- [113] Akhavani MA, Madden L, Buyschaert I, Sivakumar B, Kang N and Paleolog EM (2009) Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **11**(3): R64
- [114] Izquierdo E, Canete JD, Celis R, Santiago B, Usategui A, Sanmarti R, Del Rey MJ and Pablos JL (2009) Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy. *PLoS One* **4**(12): e8131
- [115] Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P and Eltzschig HK (2007) Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Coordinates Induction of Toll-Like Receptors TLR2 and TLR6 during Hypoxia. *PLoS ONE* **2**(12): e1364
- [116] Hu F, Shi L, Mu R, Zhu J, Li Y, Ma X, Li C, Jia R, Yang D, Li Y and Li Z (2013) Hypoxia-inducible factor-1alpha and interleukin 33 form a regulatory circuit to perpetuate the inflammation in rheumatoid arthritis. *PloS one* **8**(8): e72650

- [117] Makino Y, Nakamura H, Ikeda E, Ohnuma K, Yamauchi K, Yabe Y, Poellinger L, Okada Y, Morimoto C and Tanaka H (2003) Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J Immunol* **171**(12): 6534-6540
- [118] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N and Johnson RS (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* **112**(5): 645-657
- [119] Ryu J-H, Chae C-S, Kwak J-S, Oh H, Shin Y, Huh YH, Lee C-G, Park Y-W, Chun C-H, Kim Y-M, Im S-H and Chun J-S (2014) Hypoxia-Inducible Factor-2 α Is an Essential Catabolic Regulator of Inflammatory Rheumatoid Arthritis. *PLoS Biology* **12**(6): e1001881
- [120] Ahn JK, Koh EM, Cha HS, Lee YS, Kim J, Bae EK and Ahn KS (2008) Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* **47**(6): 834-839
- [121] Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N and Chilvers ER (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med* **201**(1): 105-115
- [122] Scholz CC, Cavadas MA, Tambuwala MM, Hams E, Rodriguez J, Kriegsheim A, Cotter P, Bruning U, Fallon PG, Cheong A, Cummins EP and Taylor CT (2013) Regulation of IL-1beta-induced NF-kappaB by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(46): 18490-18495
- [123] Simmonds RE and Foxwell BM (2008) Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* **47**(5): 584-590
- [124] Taylor CT (2008) Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol* **586**(Pt 17): 4055-4059
- [125] Scortegagna M, Cataisson C, Martin RJ, Hicklin DJ, Schreiber RD, Yuspa SH and Arbeit JM (2008) HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NFkB activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* **111**(7): 3343-3354
- [126] Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J and Taylor CT (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18154-18159

- [127] Scholz CC and Taylor CT (2013) Hydroxylase-dependent regulation of the NF-kappaB pathway. *Biol Chem* **394**(4): 479-493
- [128] van Uden P, Kenneth NS and Rocha S (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* **412**(3): 477-484
- [129] Frede S, Stockmann C, Freitag P and Fandrey J (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* **396**(3): 517-527
- [130] Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS and Nizet V (2007) Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* **178**(12): 7516-7519
- [131] Nicholas SA and Sumbayev VV (2010) The role of redox-dependent mechanisms in the downregulation of ligand-induced Toll-like receptors 7, 8 and 4-mediated HIF-1 alpha prolyl hydroxylation. *Immunol Cell Biol* **88**(2): 180-186
- [132] Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T and Gorlach A (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* **18**(12): 4691-4697
- [133] Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG and Karin M (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**(7196): 807-811
- [134] Westra J, Brouwer E, Bos R, Posthumus MD, Doornbos-van der Meer B, Kallenberg CG and Limburg PC (2007) Regulation of cytokine-induced HIF-1alpha expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1108**: 340-348
- [135] Bollinger T, Bollinger A, Gies S, Feldhoff L, Solbach W and Rupp J (2016) Transcription regulates HIF-1[alpha] expression in CD4+ T cells. *Immunol Cell Biol* **94**(1): 109-113
- [136] Jantsch J, Wiese M, Schodel J, Castiglione K, Glasner J, Kolbe S, Mole D, Schleicher U, Eckardt KU, Hensel M, Lang R, Bogdan C, Schnare M and Willam C (2011) Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J Leukoc Biol* **90**(3): 551-562
- [137] Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V and Johnson RS (2005) HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* **115**(7): 1806-1815

- [138] Chan DA, Kawahara TL, Sutphin PD, Chang HY, Chi JT and Giaccia AJ (2009) Tumor vasculature is regulated by PHD2-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment. *Cancer Cell* **15**(6): 527-538
- [139] Hams E, Saunders SP, Cummins EP, O'Connor A, Tambuwala MT, Gallagher WM, Byrne A, Campos-Torres A, Moynagh PM, Jobin C, Taylor CT and Fallon PG (2011) The hydroxylase inhibitor dimethyloxallyl glycine attenuates endotoxic shock via alternative activation of macrophages and IL-10 production by B1 cells. *Shock* **36**(3): 295-302
- [140] Colgan SP and Taylor CT (2010) Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**(5): 281-287
- [141] Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, Jedlicka P, de Zoeten EF, Cambier JC, Stenmark KR, Colgan SP and Eltzschig HK (2012) Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(41): E2784-2793
- [142] Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG and Taylor CT (2008) The hydroxylase inhibitor dimethyloxallylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology* **134**(1): 156-165
- [143] Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP and Haase VH (2004) Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* **114**(8): 1098-1106
- [144] Robinson A, Keely S, Karhausen J, Gerich ME, Furuta GT and Colgan SP (2008) Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. *Gastroenterology* **134**(1): 145-155
- [145] Tambuwala MM, Cummins EP, Lenihan CR, Kiss J, Stauch M, Scholz CC, Fraisl P, Lasitschka F, Mollenhauer M, Saunders SP, Maxwell PH, Carmeliet P, Fallon PG, Schneider M and Taylor CT (2010) Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. *Gastroenterology* **139**(6): 2093-2101
- [146] Spehlmann ME and Eckmann L (2009) Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* **25**(2): 92-99
- [147] Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, Lowes BD, Han J, Borchers CH, Buttrick PM, Kominsky DJ, Colgan SP and Eltzschig HK (2012) Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med* **18**(5): 774-782

- [148] Eckle T, Brodsky K, Bonney M, Packard T, Han J, Borchers CH, Mariani TJ, Kominsky DJ, Mittelbronn M and Eltzschig HK (2013) HIF1A reduces acute lung injury by optimizing carbohydrate metabolism in the alveolar epithelium. *PLoS Biol* **11**(9): e1001665
- [149] Kumar V and Gabrilovich DI (2014) Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology* **143**(4): 512-519
- [150] Shehade H, Oldenhove G and Moser M (2014) Hypoxia in the intestine or solid tumors: a beneficial or deleterious alarm signal? *Eur J Immunol* **44**(9): 2550-2557
- [151] Shankar J, Thippegowda PB and Kanum SA (2009) Inhibition of HIF-1alpha activity by BP-1 ameliorates adjuvant induced arthritis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **387**(2): 223-228
- [152] Thoms BL, Dudek KA, Lafont JE and Murphy CL (2013) Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* **65**(5): 1302-1312
- [153] Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A and Mosedale B (1980) Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* **283**(5748): 666-668
- [154] Bevaart L, Vervoordeldonk MJ and Tak PP (2010) Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* **62**(8): 2192-2205
- [155] Kouskoff V, Korganow A-S, Duchatelle V, Degott C, Benoist C and Mathis D (1996) Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity. *Cell* **87**(5): 811-822
- [156] Kyburz D and Corr M (2003) The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **25**(1): 79-90
- [157] Matsumoto I, Staub A, Benoist C and Mathis D (1999) Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* **286**(5445): 1732-1735
- [158] Monach PA, Benoist C and Mathis D (2004) The role of antibodies in mouse models of rheumatoid arthritis, and relevance to human disease. *Adv Immunol* **82**: 217-248
- [159] Umeda N, Matsumoto I, Ito I, Kawasaki A, Tanaka Y, Inoue A, Tsuboi H, Suzuki T, Hayashi T, Ito S, Tsuchiya N and Sumida T (2013) Anti-citrullinated glucose-6-phosphate isomerase peptide antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with HLA-DRB(1) shared epitope alleles and disease activity. *Clinical and Experimental Immunology* **172**(1): 44-53

- [160] van Gaalen FA, Toes RE, Ditzel HJ, Schaller M, Breedveld FC, Verweij CL and Huizinga TW (2004) Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **50**(2): 395-399
- [161] Nigrovic PA and Shin K (2015) Evaluation of synovial mast cell functions in autoimmune arthritis. *Methods Mol Biol* **1220**: 423-442
- [162] Monach PA, Mathis D and Benoist C (2008) The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**: Unit 15.22
- [163] Wipke BT and Allen PM (2001) Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* **167**(3): 1601-1608
- [164] Solomon S, Rajasekaran N, Jeisy-Walder E, Snapper SB and Illges H (2005) A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis. *Eur J Immunol* **35**(10): 3064-3073
- [165] Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D and Brenner MB (2002) Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* **297**(5587): 1689-1692
- [166] Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C and Mathis D (2002) Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* **16**(2): 157-168
- [167] Fuchs K, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Lamparter D, Kotter I, Reischl G, Rocken M, Pichler BJ and Kneilling M (2013) In vivo imaging of cell proliferation enables the detection of the extent of experimental rheumatoid arthritis by 3'-deoxy-3'-18f-fluorothymidine and small-animal PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **54**(1): 151-158
- [168] Wipke BT, Wang Z, Kim J, McCarthy TJ and Allen PM (2002) Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography. *Nat Immunol* **3**(4): 366-372
- [169] Wipke BT, Wang Z, Nagengast W, Reichert DE and Allen PM (2004) Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes. *J Immunol* **172**(12): 7694-7702
- [170] Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, Mathis D and Benoist C (2002) How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* **3**(4): 360-365

- [171] Nandakumar KS and Holmdahl R (2006) Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther* **8**(6): 223
- [172] Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C and Mathis D (1999) From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* **10**(4): 451-461
- [173] Jacobs JP, Wu HJ, Benoist C and Mathis D (2009) IL-17-producing T cells can augment autoantibody-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21789-21794
- [174] Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, Gravallesse E, Mathis D and Benoist C (2002) Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* **196**(1): 77-85
- [175] Sadik CD, Kim ND, Alekseeva E and Luster AD (2011) IL-17RA Signaling Amplifies Antibody-Induced Arthritis. *PLoS ONE* **6**(10): e26342
- [176] Monach P, Hattori K, Huang H, Hyatt E, Morse J, Nguyen L, Ortiz-Lopez A, Wu HJ, Mathis D and Benoist C (2007) The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice. *Methods Mol Med* **136**: 269-282
- [177] Christensen AD, Haase C, Cook AD and Hamilton JA (2016) K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Frontiers in Immunology* **7**: 213
- [178] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F and Hawker G (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* **62**(9): 2569-2581
- [179] Mjaavatten MD and Bykerk VP (2013) Early rheumatoid arthritis: the performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for diagnosing RA. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **27**(4): 451-466
- [180] Colebatch AN, Edwards CJ, Ostergaard M, van der Heijde D, Balint PV, D'Agostino MA, Forslind K, Grassi W, Haavardsholm EA, Haugeberg G, Jurik AG, Landewe RB, Naredo E, O'Connor PJ, Ostendorf B, Potocki K, Schmidt WA, Smolen JS,

Sokolovic S, Watt I and Conaghan PG (2013) EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **72**(6): 804-814

[181] Mountz JM, Alavi A and Mountz JD (2012) Emerging optical and nuclear medicine imaging methods in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **8**(12): 719-728

[182] Wunder A, Thiele A, Koslowski M, Gantner F and Niessen H (2014) Nuclear imaging to support anti-inflammatory drug discovery and development. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **58**(3): 290-298

[183] Hevesy G (1923) The Absorption and Translocation of Lead by Plants: A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants. *Biochem J* **17**(4-5): 439-445

[184] Cherry SR and Gambhir SS (2001) Use of Positron Emission Tomography in Animal Research. *ILAR Journal* **42**(3): 219-232

[185] Fahey FH (2002) Data acquisition in PET imaging. *J Nucl Med Technol* **30**(2): 39-49

[186] Turkington TG (2001) Introduction to PET instrumentation. *J Nucl Med Technol* **29**(1): 4-11

[187] Cherry SR and Dahlbom M (2004) PET: PHYSICS, INSTRUMENTATION AND SCANNERS. pp 1-124, In: PET-Molecular Imaging and Its Biological Applications, Phelps ME (ed), 1 edn, Springer, New York

[188] Mannheim JG, Judenhofer MS, Schmid A, Tillmanns J, Stiller D, Sossi V and Pichler BJ (2012) Quantification accuracy and partial volume effect in dependence of the attenuation correction of a state-of-the-art small animal PET scanner. *Phys Med Biol* **57**(12): 3981-3993

[189] Kearfott KJ and Votaw JR (1995) The Basics of Positron Emission Tomographic (PET) Imaging. In *Chemists' Views of Imaging Centers*, Emran AM (ed), 1 edn, pp 3-26. Boston: Springer

[190] Disselhorst JA, Boerman OC, Oyen WJG, Slump CH and Visser EP (2010) Spatial resolution of the Inveon small-animal PET scanner for the entire field of view. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **615**(2): 245-248

[191] Visser EP, Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Gotthardt M, Oyen WJ and Boerman OC (2009) Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET

scanner. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **50**(1): 139-147

[192] Soret M, Bacharach SL and Buvat I (2007) Partial-volume effect in PET tumor imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **48**(6): 932-945

[193] Kiessling F and Pichler BJ (2011) *Small Animal Imaging-Basics and Practical Guide*. 1 edn, Springer, Berlin-Heidelberg

[194] Wang SC, Xie Q and Lv WF (2014) Positron emission tomography/computed tomography imaging and rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* **17**(3): 248-255

[195] Irmiler IM, Opfermann T, Gebhardt P, Gajda M, Bräuer R, Saluz HP and Kamradt T (2010) In vivo molecular imaging of experimental joint inflammation by combined (18)F-FDG positron emission tomography and computed tomography. *Arthritis Research & Therapy* **12**(6): R203-R203

[196] Polisson RP, Schoenberg OI, Fischman A, Rubin R, Simon LS, Rosenthal D and Palmer WE (1995) Use of magnetic resonance imaging and positron emission tomography in the assessment of synovial volume and glucose metabolism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **38**(6): 819-825

[197] Beckers C, Jeukens X, Ribbens C, Andre B, Marcelis S, Leclercq P, Kaiser MJ, Foidart J, Hustinx R and Malaise MG (2006) (18)F-FDG PET imaging of rheumatoid knee synovitis correlates with dynamic magnetic resonance and sonographic assessments as well as with the serum level of metalloproteinase-3. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **33**(3): 275-280

[198] Kubota K, Ito K, Morooka M, Minamimoto R, Miyata Y, Yamashita H, Takahashi Y and Mimori A (2011) FDG PET for rheumatoid arthritis: basic considerations and whole-body PET/CT. *Ann N Y Acad Sci* **1228**: 29-38

[199] Okamura K, Yonemoto Y, Arisaka Y, Takeuchi K, Kobayashi T, Oriuchi N, Tsushima Y and Takagishi K (2012) The assessment of biologic treatment in patients with rheumatoid arthritis using FDG-PET/CT. *Rheumatology (Oxford)* **51**(8): 1484-1491

[200] Okamura K, Yonemoto Y, Okura C, Higuchi T, Tsushima Y and Takagishi K (2014) Evaluation of tocilizumab therapy in patients with rheumatoid arthritis based on FDG-PET/CT. *BMC Musculoskelet Disord* **15**: 393

[201] Elzinga EH, van der Laken CJ, Comans EF, Boellaard R, Hoekstra OS, Dijkmans BA, Lammertsma AA and Voskuyl AE (2011) 18F-FDG PET as a tool to predict the clinical outcome of infliximab treatment of rheumatoid arthritis: an explorative study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **52**(1): 77-80

- [202] Miese F, Scherer A, Ostendorf B, Heinzel A, Lanzman RS, Kropil P, Blondin D, Hautzel H, Wittsack HJ, Schneider M, Antoch G, Herzog H and Shah NJ (2011) Hybrid 18F-FDG PET-MRI of the hand in rheumatoid arthritis: initial results. *Clin Rheumatol* **30**(9): 1247-1250
- [203] Gent YY, Voskuyl AE, Kloet RW, van Schaardenburg D, Hoekstra OS, Dijkmans BA, Lammertsma AA and van der Laken CJ (2012) Macrophage positron emission tomography imaging as a biomarker for preclinical rheumatoid arthritis: findings of a prospective pilot study. *Arthritis & Rheumatism* **64**(1): 62-66
- [204] Pichler BJ, Kneilling M, Haubner R, Braumuller H, Schwaiger M, Rocken M and Weber WA (2005) Imaging of delayed-type hypersensitivity reaction by PET and 18F-galacto-RGD. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **46**(1): 184-189
- [205] Kneilling M, Hultner L, Pichler BJ, Mailhammer R, Morawietz L, Solomon S, Eichner M, Sabatino J, Biedermann T, Krenn V, Weber WA, Illges H, Haubner R and Rocken M (2007) Targeted mast cell silencing protects against joint destruction and angiogenesis in experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum* **56**(6): 1806-1816
- [206] Vaupel P and Mayer A (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **26**(2): 225-239
- [207] Fleming IN, Manavaki R, Blower PJ, West C, Williams KJ, Harris AL, Domarkas J, Lord S, Baldry C and Gilbert FJ (2015) Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography. *Br J Cancer* **112**(2): 238-250
- [208] Maeda K, Osato T and Umezawa H (1953) A new antibiotic, azomycin. *J Antibiot (Tokyo)* **6**(4): 182
- [209] Chapman JD, Franko AJ and Sharplin J (1981) A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *British Journal of Cancer* **43**(4): 546-550
- [210] Nunn A, Linder K and Strauss HW (1995) Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med* **22**(3): 265-280
- [211] Kizaka-Kondoh S and Konse-Nagasawa H (2009) Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci* **100**(8): 1366-1373
- [212] Chapman JD, Baer K and Lee J (1983) Characteristics of the metabolism-induced binding of misonidazole to hypoxic mammalian cells. *Cancer Res* **43**(4): 1523-1528

- [213] Padhani AR, Krohn KA, Lewis JS and Alber M (2007) Imaging oxygenation of human tumours. *Eur Radiol* **17**(4): 861-872
- [214] Kumar P, Bacchu V and Wiebe LI (2015) The chemistry and radiochemistry of hypoxia-specific, radiohalogenated nitroaromatic imaging probes. *Semin Nucl Med* **45**(2): 122-135
- [215] Maier FC, Kneilling M, Reischl G, Cay F, Bukala D, Schmid A, Judenhofer MS, Rocken M, Machulla HJ and Pichler BJ (2011) Significant impact of different oxygen breathing conditions on noninvasive in vivo tumor-hypoxia imaging using [(1)(8)F]-fluoro-azomycinarabino-furanoside ([[(1)(8)F]FAZA). *Radiat Oncol* **6**: 165
- [216] Bruehlmeier M, Roelcke U, Schubiger PA and Ametamey SM (2004) Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with 18F-fluoromisonidazole and 15O-H₂O. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **45**(11): 1851-1859
- [217] Rasey JS, Martin GV and Krohn KA (1999) Quantifying Hypoxia with Radiolabeled Fluoromisonidazole: Pre-Clinical and Clinical Studies. pp 85-118, In: *Imaging of Hypoxia - Tracer Developments*, Machulla HJ (ed), 1 edn, Springer, Dordrecht
- [218] Workman P (1980) Pharmacokinetics of hypoxic cell radiosensitizers: a review. *Cancer Clin Trials* **3**(3): 237-251
- [219] Brown JM and Workman P (1980) Partition coefficient as a guide to the development of radiosensitizers which are less toxic than misonidazole. *Radiat Res* **82**(1): 171-190
- [220] Thorwarth D, Eschmann SM, Paulsen F and Alber M (2005) A kinetic model for dynamic [18F]-Fmiso PET data to analyse tumour hypoxia. *Phys Med Biol* **50**(10): 2209-2224
- [221] Koh WJ, Rasey JS, Evans ML, Grierson JR, Lewellen TK, Graham MM, Krohn KA and Griffin TW (1992) Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **22**(1): 199-212
- [222] Lopci E, Grassi I, Chiti A, Nanni C, Cicoria G, Toschi L, Fonti C, Lodi F, Mattioli S and Fanti S (2014) PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **4**(4): 365-384
- [223] Rajendran JG and Krohn KA (2015) F-18 fluoromisonidazole for imaging tumor hypoxia: imaging the microenvironment for personalized cancer therapy. *Semin Nucl Med* **45**(2): 151-162

- [224] Rasey JS, Hofstrand PD, Chin LK and Tewson TJ (1999) Characterization of [18F]fluoroetanidazole, a new radiopharmaceutical for detecting tumor hypoxia. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **40**(6): 1072-1079
- [225] Mahy P, De Bast M, de Groot T, Cheguillaume A, Gillart J, Haustermans K, Labar D and Grégoire V (2008) Comparative pharmacokinetics, biodistribution, metabolism and hypoxia-dependent uptake of [18F]-EF3 and [18F]-MISO in rodent tumor models. *Radiotherapy and Oncology* **89**(3): 353-360
- [226] Krohn KA, Link JM and Mason RP (2008) Molecular imaging of hypoxia. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **49 Suppl 2**: 129s-148s
- [227] Grunbaum Z, Freauff SJ, Krohn KA, Wilbur DS, Magee S and Rasey JS (1987) Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **28**(1): 68-75
- [228] Rajendran JG, Schwartz DL, O'Sullivan J, Peterson LM, Ng P, Scharnhorst J, Grierson JR and Krohn KA (2006) Tumor hypoxia imaging with [F-18] fluoromisonidazole positron emission tomography in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **12**(18): 5435-5441
- [229] Zimny M, Gagel B, DiMartino E, Hamacher K, Coenen HH, Westhofen M, Eble M, Buell U and Reinartz P (2006) FDG--a marker of tumour hypoxia? A comparison with [18F]fluoromisonidazole and pO₂-polarography in metastatic head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **33**(12): 1426-1431
- [230] Dubois L, Landuyt W, Haustermans K, Dupont P, Bormans G, Vermaelen P, Flamen P, Verbeken E and Mortelmans L (2004) Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry. *Br J Cancer* **91**(11): 1947-1954
- [231] Carlin S, Zhang H, Reese M, Ramos NN, Chen Q and Ricketts SA (2014) A comparison of the imaging characteristics and microregional distribution of 4 hypoxia PET tracers. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **55**(3): 515-521
- [232] Cher LM, Murone C, Lawrentschuk N, Ramdave S, Papenfuss A, Hannah A, O'Keefe GJ, Sachinidis JI, Berlangieri SU, Fabinyi G and Scott AM (2006) Correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in gliomas using 18F-fluoromisonidazole, 18F-FDG PET, and immunohistochemical studies. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **47**(3): 410-418

- [233] Bentzen L, Keiding S, Nordmark M, Falborg L, Hansen SB, Keller J, Nielsen OS and Overgaard J (2003) Tumour oxygenation assessed by ¹⁸F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **67**(3): 339-344
- [234] Cherk MH, Foo SS, Poon AM, Knight SR, Murone C, Papenfuss AT, Sachinidis JI, Saunder TH, O'Keefe GJ and Scott AM (2006) Lack of correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in non-small cell lung cancer assessed by ¹⁸F-Fluoromisonidazole and ¹⁸F-FDG PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **47**(12): 1921-1926
- [235] Nordmark M, Loncaster J, Aquino-Parsons C, Chou SC, Ladekarl M, Havsteen H, Lindegaard JC, Davidson SE, Varia M, West C, Hunter R, Overgaard J and Raleigh JA (2003) Measurements of hypoxia using pimonidazole and polarographic oxygen-sensitive electrodes in human cervix carcinomas. *Radiother Oncol* **67**(1): 35-44
- [236] Fuchs K. Molekularbiologische Regulationsmechanismen in experimenteller Arthritis. Dissertation, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Tübingen, 2012
- [237] Halmos GB, Bruine de Bruin L, Langendijk JA, van der Laan BF, Pruijm J and Steenbakkers RJ (2014) Head and neck tumor hypoxia imaging by ¹⁸F-fluoroazomycin-arabino-side (¹⁸F-FAZA)-PET: a review. *Clin Nucl Med* **39**(1): 44-48
- [238] Piert M, Machulla HJ, Picchio M, Reischl G, Ziegler S, Kumar P, Wester HJ, Beck R, McEwan AJ, Wiebe LI and Schwaiger M (2005) Hypoxia-specific tumor imaging with ¹⁸F-fluoroazomycin arabinoside. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **46**(1): 106-113
- [239] Reischl G, Dorow DS, Cullinane C, Katsifis A, Roselt P, Binns D and Hicks RJ (2007) Imaging of tumor hypoxia with [¹²⁴I]IAZA in comparison with [¹⁸F]FMISO and [¹⁸F]FAZA--first small animal PET results. *J Pharm Pharm Sci* **10**(2): 203-211
- [240] Sorger D, Patt M, Kumar P, Wiebe LI, Barthel H, Seese A, Dannenberg C, Tannapfel A, Kluge R and Sabri O (2003) [¹⁸F]Fluoroazomycin-arabino-furanoside (¹⁸FAZA) and [¹⁸F]Fluoromisonidazole (¹⁸FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumors. *Nucl Med Biol* **30**(3): 317-326
- [241] Kumar P, Emami S, Kresolek Z, Yang J, McEwan AJ and Wiebe LI (2009) Synthesis and hypoxia selective radiosensitization potential of beta-2-FAZA and beta-3-FAZL: fluorinated azomycin beta-nucleosides. *Med Chem* **5**(2): 118-129
- [242] Reischl G, Ehrlichmann W, Hammerschmidt F, Woschek A, Lamparter D, Kneilling M, Maier F, Pichler B and Machulla H-J (2008) Imaging of tumor hypoxia - Comparison

of [18F]fluoro-azomycin-beta-deoxyriboside with [18F]FMISO and [18F]FAZA. *J NUCL MED MEETING ABSTRACTS* **49**(MeetingAbstracts_1): 292P-a-

[243] Emami S, Kumar P, Yang J, Kresolic Z, Paproski R, Cass C, McEwan AJ and Wiebe LI (2007) Synthesis, transportability and hypoxiaselective binding of 1-beta-D-(5-Deoxy-5-fluororibofuranosyl)-2-nitroimidazole (beta-5-FAZR), a configurational isomer of the clinical hypoxia marker, FAZA. *J Pharm Pharm Sci* **10**(2): 237-245

[244] Weishaupt D, Froehlich JM, Nanz D, Köchli VD, Prüßmann KP and Marincek B (2009) Wie funktioniert MRI?: Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung. 6 edn, Springer, Berlin Heidelberg

[245] Li X, Liu X, Du X and Ye Z (2014) Diffusion-weighted MR imaging for assessing synovitis of wrist and hand in patients with rheumatoid arthritis: A feasibility study. *Magnetic Resonance Imaging* **32**(4): 350-353

[246] Koh D-M and Collins DJ (2007) Diffusion-Weighted MRI in the Body: Applications and Challenges in Oncology. *American Journal of Roentgenology* **188**(6): 1622-1635

[247] Attariwala R and Picker W (2013) Whole body MRI: Improved lesion detection and characterization with diffusion weighted techniques. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **38**(2): 253-268

[248] Choy EH, Kavanaugh AF and Jones SA (2013) The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. *Nat Rev Rheumatol* **9**(3): 154-163

[249] Paunovic V and Harnett MM (2013) Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs* **73**(2): 101-115

[250] Upchurch KS and Kay J (2012) Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **51 Suppl 6**: vi28-36

[251] Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, Bridges SL, Jr., Chatham WW, Paulus HE, Suarez-Almazor M, Bombardier C, Dougados M, Khanna D, King CM, Leong AL, Matteson EL, Schousboe JT, Moynihan E, Kolba KS, Jain A, Volkman ER, Agrawal H, Bae S, Mudano AS, Patkar NM and Saag KG (2012) 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **64**(5): 625-639

[252] Singh JA, Christensen R, Wells GA, Suarez-Almazor ME, Buchbinder R, Lopez-Olivo MA, Ghogomu ET and Tugwell P (2010) Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Sao Paulo Med J* **128**(5): 309-310

- [253] Katchamart W, Johnson S, Lin HJ, Phumethum V, Salliot C and Bombardier C (2010) Predictors for remission in rheumatoid arthritis patients: A systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **62**(8): 1128-1143
- [254] Rubbert-Roth A (2012) [New kinase inhibitors]. *Z Rheumatol* **71**(6): 479-484
- [255] Kumar S, Boehm J and Lee JC (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2**(9): 717-726
- [256] Raman M, Chen W and Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**(22): 3100-3112
- [257] Cuadrado A and Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**(3): 403-417
- [258] Thalhamer T, McGrath MA and Harnett MM (2008) MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford, England)* **47**(4): 409-414
- [259] Schett G, Zwerina J and Firestein G (2008) The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**(7): 909-916
- [260] Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW and et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**(6508): 739-746
- [261] Tokuda H, Kanno Y, Ishisaki A, Takenaka M, Harada A and Kozawa O (2004) Interleukin (IL)-17 enhances tumor necrosis factor-alpha-stimulated IL-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *J Cell Biochem* **91**(5): 1053-1061
- [262] Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H and Tsujimoto M (2000) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem* **275**(40): 31155-31161
- [263] Westra J, Limburg PC, de Boer P and van Rijswijk MH (2004) Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* **63**(11): 1453-1459
- [264] Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q and Steiner G (2000) Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**(11): 2501-2512

- [265] Nah SS, Won HJ, Ha E, Kang I, Cho HY, Hur SJ, Lee SH and Baik HH (2010) Epidermal growth factor increases prostaglandin E2 production via ERK1/2 MAPK and NF-kappaB pathway in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **30**(4): 443-449
- [266] Guma M and Firestein GS (2012) c-Jun N-Terminal Kinase in Inflammation and Rheumatic Diseases. *Open Rheumatol J* **6**: 220-231
- [267] Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY and Ng DC (2010) c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* **1804**(3): 463-475
- [268] Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM and Firestein GS (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* **108**(1): 73-81
- [269] Emerling BM, Platanias LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ and Chandel NS (2005) Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Mol Cell Biol* **25**(12): 4853-4862
- [270] Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J and Michiels C (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* **468**(1): 53-58
- [271] Margutti S and Laufer SA (2007) Are MAP kinases drug targets? Yes, but difficult ones. *ChemMedChem* **2**(8): 1116-1140
- [272] Karcher SC and Laufer SA (2009) Aza-analogue dibenzepinone scaffolds as p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors: design, synthesis, and biological data of inhibitors with improved physicochemical properties. *J Med Chem* **52**(6): 1778-1782
- [273] Karcher SC and Laufer SA (2009) Successful structure-based design of recent p38 MAP kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **9**(7): 655-676
- [274] Goldstein DM, Kuglstatler A, Lou Y and Soth MJ (2010) Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. *J Med Chem* **53**(6): 2345-2353
- [275] Hill RJ, Dabbagh K, Phippard D, Li C, Suttman RT, Welch M, Papp E, Song KW, Chang KC, Leaffer D, Kim YN, Roberts RT, Zabka TS, Aud D, Dal Porto J, Manning AM, Peng SL, Goldstein DM and Wong BR (2008) Pamapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* **327**(3): 610-619

- [276] Koeberle SC, Romir J, Fischer S, Koeberle A, Schattel V, Albrecht W, Grutter C, Werz O, Rauh D, Stehle T and Laufer SA (2012) Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nat Chem Biol* **8**(2): 141-143
- [277] Laufer SA, Ahrens GM, Karcher SC, Hering JS and Niess R (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of phenylamino-substituted 6,11-dihydro-dibenzo[b,e]oxepin-11-ones and dibenzo[a,d]cycloheptan-5-ones: novel p38 MAP kinase inhibitors. *J Med Chem* **49**(26): 7912-7915
- [278] Borst O, Walker B, Munzer P, Russo A, Schmid E, Faggio C, Bigalke B, Laufer S, Gawaz M and Lang F (2013) Skepinone-L, a novel potent and highly selective inhibitor of p38 MAP kinase, effectively impairs platelet activation and thrombus formation. *Cell Physiol Biochem* **31**(6): 914-924
- [279] Genovese MC, Cohen SB, Wofsy D, Weinblatt ME, Firestein GS, Brahn E, Strand V, Baker DG and Tong SE (2011) A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study of the efficacy of oral SCIO-469, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **38**(5): 846-854
- [280] Nikas SN and Drosos AA (2004) SCIO-469 Scios Inc. *Curr Opin Investig Drugs* **5**(11): 1205-1212
- [281] Damjanov N, Kauffman RS and Spencer-Green GT (2009) Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum* **60**(5): 1232-1241
- [282] Ding C (2006) Drug evaluation: VX-702, a MAP kinase inhibitor for rheumatoid arthritis and acute coronary syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* **7**(11): 1020-1025
- [283] Meier FM, Frerix M, Hermann W and Muller-Ladner U (2013) Current immunotherapy in rheumatoid arthritis. *Immunotherapy* **5**(9): 955-974
- [284] Hammaker D and Firestein GS (2010) "Go upstream, young man": lessons learned from the p38 saga. *Ann Rheum Dis* **69** Suppl 1: i77-82
- [285] Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM, Wingate A, Monk CE, Toth R, Santos SG, Iversen L and Arthur JS (2008) The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **9**(9): 1028-1036
- [286] Cheung PCF, Campbell DG, Nebreda AR and Cohen P (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38 α . *The EMBO Journal* **22**(21): 5793-5805

- [287] Arthur JS and Ley SC (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**(9): 679-692
- [288] Saraiva M and O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* **10**(3): 170-181
- [289] Kim C, Sano Y, Todorova K, Carlson BA, Arpa L, Celada A, Lawrence T, Otsu K, Brissette JL, Arthur JS and Park JM (2008) The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nature immunology* **9**(9): 1019-1027
- [290] Hegen M, Gaestel M, Nickerson-Nutter CL, Lin LL and Telliez JB (2006) MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* **177**(3): 1913-1917
- [291] Hammaker D, Topolewski K, Edgar M, Yoshizawa T, Fukushima A, Boyle DL, Burak EC, Sah RL and Firestein GS (2012) Decreased collagen-induced arthritis severity and adaptive immunity in MKK-6-deficient mice. *Arthritis Rheum* **64**(3): 678-687
- [292] Crilly A, Robertson SE, Reilly JH, Gracie JA, Lai WQ, Leung BP, Life PF and McInnes IB (2011) Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane. *Ann Rheum Dis* **70**(6): 1130-1137
- [293] McCann FE, Palfreeman AC, Andrews M, Perocheau DP, Inglis JJ, Schafer P, Feldmann M, Williams RO and Brennan FM (2010) Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis research & therapy* **12**(3): R107
- [294] Trifilieff A, Keller TH, Press NJ, Howe T, Gedeck P, Beer D and Walker C (2005) CGH2466, a combined adenosine receptor antagonist, p38 mitogen-activated protein kinase and phosphodiesterase type 4 inhibitor with potent in vitro and in vivo anti-inflammatory activities. *Br J Pharmacol* **144**(7): 1002-1010
- [295] Koch DA, Silva RB, de Souza AH, Leite CE, Nicoletti NF, Campos MM, Laufer S and Morrone FB (2014) Efficacy and gastrointestinal tolerability of ML3403, a selective inhibitor of p38 MAP kinase and CBS-3595, a dual inhibitor of p38 MAP kinase and phosphodiesterase 4 in CFA-induced arthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* **53**(3): 425-432
- [296] Fukushima A, Boyle DL, Corr M and Firestein GS (2010) Kinetic analysis of synovial signalling and gene expression in animal models of arthritis. *Ann Rheum Dis* **69**(5): 918-923

- [297] Bolon B, Stolina M, King C, Middleton S, Gasser J, Zack D and Feige U (2011) Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 569068
- [298] Ebeling S, Naumann K, Pollok S, Wardecki T, Vidal-y-Sy S, Nascimento JM, Boerries M, Schmidt G, Brandner JM and Merfort I (2014) From a Traditional Medicinal Plant to a Rational Drug: Understanding the Clinically Proven Wound Healing Efficacy of Birch Bark Extract. *PLoS ONE* **9**(1): e86147
- [299] El-Gokha A, Laufer SA and Koch P (2015) An optimized and versatile synthesis to pyridinylimidazole-type p38alpha mitogen activated protein kinase inhibitors. *Org Biomol Chem* **13**(43): 10699-10704
- [300] Patt M, Kuntzsch M and Machulla H-J Preparation of [18F]fluoromisonidazole by nucleophilic substitution on THP-protected precursor: Yield dependence on reaction parameters. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **240**(3): 925-927
- [301] Peters CL, Morris CJ, Mapp PI, Blake DR, Lewis CE and Winrow VR (2004) The transcription factors hypoxia-inducible factor 1 α and Ets-1 colocalize in the hypoxic synovium of inflamed joints in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **50**(1): 291-296
- [302] Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler Jr WC and Raleigh JA (1998) Pimonidazole: A Novel Hypoxia Marker for Complementary Study of Tumor Hypoxia and Cell Proliferation in Cervical Carcinoma. *Gynecologic Oncology* **71**(2): 270-277
- [303] http://www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=10944, 01.03.2018 (Accessed)
- [304] https://www.biolegend.com/media_assets/support_protocol/BioLegend_IHC_Paraffin_121511.pdf, 01.03.2018 (Accessed)
- [305] <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-decalcification/>, 01.03.2018 (Accessed)
- [306] http://www.ihcworld.com/_protocols/epitope_retrieval/proteinase-k.htm, 01.03.2018 (Accessed)
- [307] Motulsky H (1995) Intuitive Biostatistics. p 65, 1 edn, Oxford University Press, New York-Oxford
- [308] Sachs L (1984) Angewandte Statistik. p 307, 6 edn, Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo

- [309] Hedderich J and Sachs L (2016) *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R*. p 129, 15 edn, Springer Spektrum, Berlin-Heidelberg
- [310] Walter E (1988) *Biomathematik für Mediziner*. p 145, 3 edn, Teubner, Stuttgart
- [311] Fuchs K, Kuehn A, Mahling M, Guenthoer P, Hector A, Schwenck J, Hartl D, Laufer S, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Reischl G, Rocken M, Pichler BJ and Kneilling M (2017) In Vivo Hypoxia PET Imaging Quantifies the Severity of Arthritic Joint Inflammation in Line with Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor and Enhanced Reactive Oxygen Species Generation. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **58**(5): 853-860
- [312] Cobb LM, Nolan J and Butler SA (1990) Distribution of pimonidazole and RSU 1069 in tumour and normal tissues. *Br J Cancer* **62**(6): 915-918
- [313] Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P and Koch CJ (2006) Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol* **126**(12): 2596-2606
- [314] Lee ST and Scott AM (2007) Hypoxia positron emission tomography imaging with ¹⁸F-fluoromisonidazole. *Semin Nucl Med* **37**(6): 451-461
- [315] Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, Yamada S, Nagayama S, Hashiguchi K, Sunahara N, Fukuzaki K, Nagata R, Komiya S, Maruyama I, Fukuda T and Abeyama K (2008) Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(9): 2675-2685
- [316] <http://www.hypoxyprobe.com/faq.html>, 01.03.2018 (Accessed)
- [317] Kleiter MM, Thrall DE, Malarkey DE, Ji X, Lee DYW, Chou S-C and Raleigh JA (2006) A comparison of oral and intravenous pimonidazole in canine tumors using intravenous CCI-103F as a control hypoxia marker. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **64**(2): 592-602
- [318] Monnich D, Troost EG, Kaanders JH, Oyen WJ, Alber M and Thorwarth D (2012) Modelling and simulation of the influence of acute and chronic hypoxia on [¹⁸F]fluoromisonidazole PET imaging. *Phys Med Biol* **57**(6): 1675-1684
- [319] Monnich D, Troost EG, Kaanders JH, Oyen WJ, Alber M and Thorwarth D (2011) Modelling and simulation of [¹⁸F]fluoromisonidazole dynamics based on histology-derived microvessel maps. *Phys Med Biol* **56**(7): 2045-2057

- [320] Ljungkvist ASE, Bussink J, Rijken PFJW, Kaanders JHAM, van der Kogel AJ and Denekamp J Vascular architecture, hypoxia, and proliferation in first-generation xenografts of human head-and-neck squamous cell carcinomas. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* **54**(1): 215-228
- [321] Li F, Joergensen JT, Hansen AE and Kjaer A (2014) Kinetic modeling in PET imaging of hypoxia. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **4**(6): 490-506
- [322] Wang W, Lee NY, Georgi JC, Narayanan M, Guillem J, Schoder H and Humm JL (2010) Pharmacokinetic analysis of hypoxia (18)F-fluoromisonidazole dynamic PET in head and neck cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **51**(1): 37-45
- [323] Carlin S and Humm JL (2012) PET of hypoxia: current and future perspectives. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **53**(8): 1171-1174
- [324] Morris ED, Endres CJ, Schmidt KC, Christian BT, Muzic RF and Fisher RE (2004) Kinetic Modeling in Positron Emission Tomography. pp 499-540, In: Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT, Wernick MN, Aarsvold JN (eds), Elsevier Academic Press, San Diego
- [325] Wack LJ, Monnich D, van Elmpt W, Zegers CM, Troost EG, Zips D and Thorwarth D (2015) Comparison of [18F]-FMISO, [18F]-FAZA and [18F]-HX4 for PET imaging of hypoxia - a simulation study. *Acta Oncol* **54**(9): 1370-1377
- [326] Souvatzoglou M, Grosu AL, Roper B, Krause BJ, Beck R, Reischl G, Picchio M, Machulla HJ, Wester HJ and Piert M (2007) Tumour hypoxia imaging with [18F]FAZA PET in head and neck cancer patients: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**(10): 1566-1575
- [327] Shi K, Souvatzoglou M, Astner ST, Vaupel P, Nusslin F, Wilkens JJ and Ziegler SI (2010) Quantitative assessment of hypoxia kinetic models by a cross-study of dynamic 18F-FAZA and 15O-H2O in patients with head and neck tumors. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **51**(9): 1386-1394
- [328] Verwer EE, van Velden FH, Bahce I, Yaqub M, Schuit RC, Windhorst AD, Raijmakers P, Lammertsma AA, Smit EF and Boellaard R (2013) Pharmacokinetic analysis of [18F]FAZA in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **40**(10): 1523-1531
- [329] Casciari JJ, Graham MM and Rasey JS (1995) A modeling approach for quantifying tumor hypoxia with [F-18]fluoromisonidazole PET time-activity data. *Med Phys* **22**(7): 1127-1139

- [330] Schweifer A, Maier F, Ehrlichmann W, Lamparter D, Kneilling M, Pichler BJ, Hammerschmidt F and Reischl G (2016) [18F]Fluoro-azomycin-2'-deoxy-beta-D-ribofuranoside - A new imaging agent for tumor hypoxia in comparison with [18F]FAZA. *Nucl Med Biol* **43**(12): 759-769
- [331] Verwer EE, Bahce I, van Velden FH, Yaqub M, Schuit RC, Windhorst AD, Raijmakers P, Hoekstra OS, Lammertsma AA, Smit EF and Boellaard R (2014) Parametric methods for quantification of 18F-FAZA kinetics in non-small cell lung cancer patients. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **55**(11): 1772-1777
- [332] Busk M, Munk OL, Jakobsen S, Wang T, Skals M, Steiniche T, Horsman MR and Overgaard J (2010) Assessing hypoxia in animal tumor models based on pharmacokinetic analysis of dynamic FAZA PET. *Acta Oncol* **49**(7): 922-933
- [333] Peeters SGJA, Zegers CML, Lieuwes NG, van Elmpt W, Eriksson J, van Dongen GAMS, Dubois L and Lambin P (2015) A Comparative Study of the Hypoxia PET Tracers [18F]HX4, [18F]FAZA, and [18F]FMISO in a Preclinical Tumor Model. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **91**(2): 351-359
- [334] Jeon CH, Ahn JK, Chai JY, Kim HJ, Bae EK, Park SH, Cho EY, Cha HS, Ahn KS and Koh EM (2008) Hypoxia appears at pre-arthritis stage and shows co-localization with early synovial inflammation in collagen induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **26**(4): 646-648
- [335] Jeromel M, Jevtič V, Serša I, Ambrožič A and Tomšič M (2012) Quantification of synovitis in the cranio-cervical region: Dynamic contrast enhanced and diffusion weighted magnetic resonance imaging in early rheumatoid arthritis—A feasibility follow up study. *European Journal of Radiology* **81**(11): 3412-3419
- [336] Gašperšič N, Serša I, Jevtič V, Tomšič M and Praprotnik S (2007) Monitoring ankylosing spondylitis therapy by dynamic contrast-enhanced and diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Skeletal Radiology* **37**(2): 123-131
- [337] Hompland T, Ellingsen C, Galappathi K and Rofstad EK (2014) DW-MRI in assessment of the hypoxic fraction, interstitial fluid pressure, and metastatic propensity of melanoma xenografts. *BMC Cancer* **14**: 92-92
- [338] Guma M, Hammaker D, Topolewski K, Corr M, Boyle DL, Karin M and Firestein GS (2012) Antiinflammatory functions of p38 in mouse models of rheumatoid arthritis: advantages of targeting upstream kinases MKK-3 or MKK-6. *Arthritis Rheum* **64**(9): 2887-2895
- [339] Corr M, Boyle DL, Ronacher LM, Lew BR, van Baarsen LG, Tak PP and Firestein GS (2011) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the beneficial effects of systemic

interferon beta in mice: implications for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **70**(5): 858-863

[340] Finnegan A, Kaplan CD, Cao Y, Eibel H, Glant TT and Zhang J (2003) Collagen-induced arthritis is exacerbated in IL-10-deficient mice. *Arthritis Research & Therapy* **5**(1): R18-R24

[341] Mion F, Tonon S, Toffoletto B, Cesselli D, Pucillo CE and Vitale G (2014) IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p38 activation. *Mol Immunol* **62**(2): 266-276

[342] Li C, Beavis P, Palfreeman AC, Amjadi P, Kennedy A and Brennan FM (2011) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is critical step for acquisition of effector function in cytokine-activated T cells, but acts as a negative regulator in T cells activated through the T-cell receptor. *Immunology* **132**(1): 104-110

[343] Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM and O'Garra A (2009) Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* **31**(2): 209-219

[344] Hu P, Nebreda AR, Liu Y, Carlesso N, Kaplan M and Kapur R (2012) p38alpha protein negatively regulates T helper type 2 responses by orchestrating multiple T cell receptor-associated signals. *J Biol Chem* **287**(40): 33215-33226

[345] Chen P, Li J, Barnes J, Kokkonen GC, Lee JC and Liu Y (2002) Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* **169**(11): 6408-6416

[346] Poole RM and Ballantyne AD (2014) Apremilast: first global approval. *Drugs* **74**(7): 825-837

[347] Schafer P (2012) Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochem Pharmacol* **83**(12): 1583-1590

[348] Korhonen R, Hommo T, Keranen T, Laavola M, Hamalainen M, Vuolteenaho K, Lehtimaki L, Kankaanranta H and Moilanen E (2013) Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4 inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase-1. *Br J Pharmacol* **169**(7): 1525-1536

[349] Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M and Nickerson-Nutter CL (2008) Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**(11): 1505-1515

- [350] Mnich SJ, Blanner PM, Hu LG, Shaffer AF, Happa FA, O'Neil S, Ukairo O, Weiss D, Welsh E, Storer C, Mbalaviele G, Ichijo H, Monahan JB, Hardy MM and Eda H (2010) Critical role for apoptosis signal-regulating kinase 1 in the development of inflammatory K/BxN serum-induced arthritis. *Int Immunopharmacol* **10**(10): 1170-1176
- [351] Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE, Horwood NJ, Beech JT, Hayes LA, Denys A, Feldmann M, Brennan FM and Foxwell BM (2004) A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **173**(11): 6928-6937
- [352] Davis RJ (2000) Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* **103**(2): 239-252
- [353] Maynard MA and Ohh M (2007) The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**(16): 2170-2180
- [354] Sanchez A, Tripathy D, Yin X, Desobry K, Martinez J, Riley J, Gay D, Luo J and Grammas P (2012) p38 MAPK: a mediator of hypoxia-induced cerebrovascular inflammation. *J Alzheimers Dis* **32**(3): 587-597
- [355] Mavers M, Cuda CM, Misharin AV, Gierut AK, Agrawal H, Weber E, Novack DV, Haines GK, 3rd, Balomenos D and Perlman H (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitor p21, via its C-terminal domain, is essential for resolution of murine inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **64**(1): 141-152
- [356] Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M, Rommel C, Gerondakis SD and Mackay CR (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol* **7**(3): 274-283
- [357] Tong SE, Daniels SE, Black P, Chang S, Protter A and Desjardins PJ (2012) Novel p38alpha mitogen-activated protein kinase inhibitor shows analgesic efficacy in acute postsurgical dental pain. *J Clin Pharmacol* **52**(5): 717-728

7. Veröffentlichungen

Poster:

Arbeitskreis Dermatologische Forschung (ADF) 2014, Köln:
Specific Inhibition of p38-MAPK Signaling Suppresses Experimental Arthritis and Inflammation induced Hypoxia

World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2013, Savannah, GA, USA:
P38-MAPK Therapy Monitoring in Experimental Arthritis by Non-invasive In vivo Hypoxia PET-Imaging using [¹⁸F]-Fluoromisonidazole ([¹⁸F]FMISO)

Vortrag:

World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2013, Savannah, GA, USA:
In vivo PET-Imaging of Inflammation-induced Hypoxia during Experimental Arthritis: Comparison of [¹⁸F]-Fluoromisonidazole ([¹⁸F]FMISO) and [¹⁸F]Fluoroazomycin-β-deoxyriboside ([¹⁸F]β-FAZDR)“

Artikel:

Fuchs K, Kuehn A, Mahling M, **Guenthoer P**, Hector A, Schwenck J, Hartl D, Laufer S, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Reischl G, Rocken M, Pichler BJ and Kneilling M (2017) In Vivo Hypoxia PET Imaging Quantifies the Severity of Arthritic Joint Inflammation in Line with Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor and Enhanced Reactive Oxygen Species Generation. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* **58**(5): 853-860

8. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Die Studien wurde durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bernd J. Pichler, Frau Dr. rer. nat. Kerstin Fuchs, Herrn Dr. med. Manfred Kneilling und mir konzipiert. Von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Laufer wurden die Versuche zur MAPK mit-initiiert und die verwendeten Pharmaka zur Verfügung gestellt. Die Betreuung und Beaufsichtigung der durchgeführten Versuche wurde von Frau Dr. rer. nat. Kerstin Fuchs übernommen. Bei der Durchführung der Versuche wurde ich, wenn dies zeitlich notwendig war, von einer eingewiesenen technischen Hilfskraft der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie der Universität Tübingen unterstützt. Der Text zur Radiotracerproduktion (vgl. 2.5.1) wurde von Herrn PD Dr. Gerald Reischl bereitgestellt. Die verwendeten statistischen Analysen wurden von Herrn Prof. Dr. Martin Eichner konzipiert und von mir durchgeführt. Die histologische Aufarbeitung und Analyse des Therapieeffekts der MAPK-Inhibitoren auf die Arthritis wurden von Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend sowie Frau Dr. Ursula Kohlhofer durchgeführt. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

9. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Bernd Pichler bedanken, der mir die Durchführung meiner Arbeit in seinem Institut ermöglicht hat und mich über die Jahre stets sehr persönlich mit Geduld und Interesse an meiner Arbeit unterstützt hat.

Ohne die beständige Betreuung und Hilfe durch Frau Dr. Kerstin Fuchs, von der Planung und Durchführung der Experimente bis zur Korrektur der Dissertationsschrift, wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen, vielen herzlichen Dank dafür!

Dann gilt mein besonderer Dank auch Herrn Dr. Manfred Kneilling, auf den ich in der gesamten Zeit stets zählen konnte und der mir mit Rat und Motivation zur Seite stand.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie aussprechen, im Speziellen Dr. Julia Mannheim, Dr. Andreas Schmid, Dr. Christoph Griesinger, Dr. Jonathan Disselhorst, PD Dr. Gerald Reischl, sowie Dr. Florian Maier, welche über die Jahre alle an der ein oder anderen Stelle in meiner Arbeit einen entscheidenden Anteil hatten und mir weitergeholfen haben – ganz abgesehen von der moralischen Unterstützung durch alle Kollegen im Labor! Zudem danke ich allen, die mich in der konkreten Ausführung der Versuche unterstützt haben, vor allem Sandro Aidone, Maren König, Daniel Bukkala und Funda Cay.

Herrn Prof. Martin Eichner vom Institut für medizinische Biometrie danke ich herzlich für die Konzeption und Anleitung in der statistischen Auswertung!

Mein größter Dank zum Schluss gilt Milena Meinhardt, meinen Eltern und Freunden, welche mir all die Jahre zur Seite standen und mit mir die Höhen genossen aber vor allem auch die Tiefen bewältigt haben. Vielen Dank!