

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Laqua

**Quantifizierung und Lokalisation von Matrixmetalloproteinasen
und TIMP-1 in Tränen, Blut und ulzeriertem
Hornhautgewebe bei rheumatoider Arthritis**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Andrea Edle von Figura
aus Münster

Lübeck, 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gerd Geerling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Ludwig Gross

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2007

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.05.2007

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
TABELLENVERZEICHNIS.....	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	7
1. EINLEITUNG.....	8
1.1 Die Familie der Matrixmetalloproteinasen.....	8
1.1.1 Struktur und Funktion der MMPs.....	9
1.1.2 Regulation der MMP-Aktivität.....	11
1.1.3 MMPs in Physiologie und Pathologie.....	14
1.2 Die Beteiligung der MMPs in der Pathogenese des Hornhautulkus.....	16
1.2.1 Hornhaut und Tränendrüse.....	16
1.2.2 Die normale Wundheilung der Kornea.....	16
1.2.3 Mechanismus der Hornhautulzeration.....	17
1.3 Das sterile Hornhautulkus bei der rheumatoiden Arthritis.....	19
1.3.1 Pathogenese und Klinik der rheumatoiden Arthritis.....	20
1.3.2 Pathogenese und Klinik des sterilen Hornhautulkus bei rheumatoider.....	23
Arthritis	
1.4 Fragestellung.....	26
2. MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Patienten und Kontrollen.....	27
2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	27
2.1.2 Bestimmung der Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis.....	28
2.2 Probengewinnung.....	28
2.2.1 Plasma.....	28
2.2.2 Tränen ohne und mit Stimulation.....	29
2.3 Biochemische Analyseverfahren.....	30
2.3.1 Bestimmung des Gesamtproteins.....	30
2.3.1.1 Bradford Assay zur Bestimmung des Gesamtproteins im Plasma.....	30

2.3.1.2	Bradford Assay zur Bestimmung des Gesamtproteins in der Tränenflüssigkeit	30
2.3.2	Quantifizierung der Matrixmetalloproteinasen, des Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 und TNF α mittels eines Enzymgekoppelten Immunsorbent-Assays (ELISA = <u>E</u> nzym- <u>l</u> inked- <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent- <u>a</u> ssay)	31
2.3.2.1	Bestimmung der Konzentration von proMMP-2, MMP-3, proMMP-9, TIMP-1 und TNF α	32
2.3.2.2	Bestimmung der Konzentration der aktiven MMP-1, der aktiven MMP-2- und der aktiven MMP-9	35
2.4	Immunhistochemie	37
2.5	Statistische Analyse	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1	Konzentrationen der MMPs und TIMP-1	40
3.1.1	MMP-1-aktiv (Kollagenase-1)	40
3.1.2	proMMP-2 (Progelatinase A)	42
3.1.3	MMP-2-aktiv (Gelatinase A)	43
3.1.4	MMP-3 (Stromelysin)	45
3.1.5	proMMP-9 (Progelatinase B)	47
3.1.6	MMP-9-aktiv (Gelatinase B)	48
3.1.7	TIMP-1	49
3.2	Verhältnis der TIMP-1-Konzentration zu den Konzentrationen der einzelnen MMPs ([TIMP-1] / [MMP]-Ratio)	51
3.3	Gesamtproteingehalt von Plasma, unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit	53
3.4	Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 und den Markern der klinischen Aktivität bei der rheumatoiden Arthritis	53
3.5	TNF α	55
3.6	Immunlokalisation der MMPs und TIMP-1 im Hornhaut- und Tränendrüsengewebe von RA-Patienten mit sterilem Hornhautulkus und Gesunden	57
4	DISKUSSION	61
4.1	Ein Vergleich der MMP- und TIMP-1-Konzentrationen bei RA-Patienten und Kontrollen	63

4.2	Beziehungen zwischen den MMP- und TIMP-1- Konzentrationen und der.....69 Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis
4.3	Beziehung zwischen den Plasma- und Tränenkonzentrationen der MMPs.....71 und TIMP-1: Ist das Plasma eine mögliche Quelle für die MMPs und TIMP-1 in der Tränenflüssigkeit?
4.4	Andere Quellen für die MMPs und TIMP-1 in der Tränenflüssigkeit.....75
4.5	Beziehung zwischen TNF α und den MMPs und TIMP-1.....76
4.6	Lokalisation der MMPs/TIMP-1 in humanem Hornhaut- und.....79 Tränendrüsengewebe
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....81
6	ZUSAMMENFASSUNG.....85
7	LITERATURNACHWEIS.....87
8	ANHANG.....108
9	DANKSAGUNG.....121
10	LEBENS LAUF.....122
11	PUBLIKATIONEN.....123

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
AK:	Antikörper
Anz-dG:	Anzahl druckschmerzhafter Gelenke
Anz-gG:	Anzahl geschwollener Gelenke
AP-1:	Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1
APAAP:	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
APES:	Aminopropyltriethoxysilan
APMA:	Aminophenylmercurialsäure
aqua dest.:	destilliertes Wasser
BSG:	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw:	beziehungsweise
CCP:	zyklisches citrulliniertes Peptid
c-fos:	Transkriptionsfaktor c-fos
c-jun:	Transkriptionsfaktor c-jun
CMV:	Cytomegalievirus
CRP:	C-reaktives Protein
CSF:	Colony-stimulating-factor
CTD:	Connective Tissue Disease
DAS:	Disease Activity Score
DMARD:	Disease modifying antirheumatic drugs
DMF:	Dimethylformamid
EBV:	Ebstein-Barr-Virus
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
ELISA:	Enzym-linked-immunosorbent-assay
ER:	endoplasmatisches Retikulum
EZM:	extrazelluläre Matrix
g:	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
°C:	Grad Celsius
GSSG:	oxidiertes Gluthation
h:	Stunde
HCl:	Salzsäure
HLA-DR:	Histokompatibilitätsantigen DR
H ₂ O:	Wasser
HOCl:	Hypochloridsäure

I.E.:	Internationale Einheiten
IFN- γ :	Interferon- γ
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
KCS:	Keratokonjunktivitis sicca
K_D :	Dissoziationskonstante
kDA:	Kilodalton
M:	molar
MCP:	Metokarpophalangeal
mg:	Milligramm
MHC:	Major Histokompatibilitätskomplex
min:	Minuten
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mM:	millimolar
μ l:	Mikroliter
μ m:	Mikrometer
μ M:	Mikromolar
MMP:	Matrixmetalloproteinase
mRNS:	messenger Ribonucleinsäure
MT-MMP:	Membran Type-Matrixmetalloproteinase
MTX:	Methotrexat
MW:	Molekulargewicht
n:	Nummer
NaCl:	Natriumchlorid
NEM:	N-ethylmaleimid
NG:	Nachweisbarkeitsgrenze
nm:	Nanometer
NSAR:	Nichtsteroidale Antirheumatika
OCT:	optimal cutting temperature
p:	Wahrscheinlichkeit
Pat-Urt:	Patienten-Urteil
PBS:	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
pg:	Pikogramm
PIP:	proximale Interphalangeal

PUK:	periphere ulzerative Keratitis
r:	Korrelationskoeffizient
RA:	rheumatoide Arthritis
RF:	Rheumafaktor
RT:	Raumtemperatur
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SLE:	systemischer Lupus erythematoses
s.o.:	siehe oben
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences
st.:	stimuliert
Tab.:	Tabelle
TBS:	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β :	Tumor Growth Faktor- β
TIMP:	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TMB:	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinwasserstoffperoxid
TNF α :	Tumornekrosefaktor α
ust.:	unstimuliert
uPA:	urokinase-type plasminogen activator
vs:	versus
WHO:	World Health Organisation
Zn ²⁺ :	Zink
Zys:	Zystein

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: MMPs (Kollagenase-1, Gelatinasen, Stromelysin-1)	9
Tab. 2: Biologische Funktionen der TIMP-Klasse	14
Tab. 3: Beteiligung von MMPs in physiologischen und pathologischen Prozessen	15
Tab. 4: Ätiologie des Hornhautulkus	17
Tab. 5: Pathomechanismen des Hornhautulkus	18
Tab. 6: Stadien der rheumatoiden Arthritis	21
Tab. 7: Okuläre Komplikationen der RA	22
Tab. 8: Pathomechanismen des sterilen Hornhautulkus bei RA	24
Tab. 9: Demographische Daten des Patienten- und Kontrollkollektivs	27
Tab. 10: Tränenvolumina (gemittelte Daten aus beiden Augen) vor und nach nasaler Stimulation	29
Tab. 11: Verdünnungen der Probenansätze für die verschiedenen ELISA	31
Tab. 12: Spektrum der im ELISA erfassten Formen von proMMP-2, MMP-3, proMMP-9, TIMP-1 und TNF α	33
Tab. 13: ELISA-Schema für die Bestimmung der Konzentration von proMMP-2, MMP-3, proMMP-9 und TIMP-1	34
Tab. 14: ELISA-Schema für die Bestimmung von TNF α	35
Tab. 15: ELISA-Schema für die Bestimmung der Konzentration von MMP-1-aktiv, MMP-2-aktiv und MMP-9-aktiv	37
Tab. 16: Antikörper-Spektrum	38
Tab. 17: Kategorien der immunhistochemischen Anfärbung	39
Tab. 18: Konzentration der aktiven MMP-1 (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	40
Tab. 19: proMMP-2-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	42
Tab. 20: Konzentration der aktiven MMP-2 (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	43
Tab. 21: MMP-3-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	45
Tab. 22: proMMP-9-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	47
Tab. 23: Konzentration der aktiven MMP-9 (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	48
Tab. 24: TIMP-1-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben	49
Tab. 25: [TIMP-1] / [MMP]-Ratio bei Patienten und Kontrollen	52
Tab. 26: Gesamtprotein in Plasma (mg/ml) und unstimulierten/stimulierten Tränen (μ g/ml)	53
Tab. 27: MMP-/TIMP-1-Anteil am Gesamtprotein (in%)	53

Tab. 28: Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 und der Krankheitsaktivität der RA	54
Tab. 29: TNF α -Konzentration (pg/ml) in Patienten- und Kontrollproben	55
Tab. 30: Korrelationen zwischen der TNF α -Konzentration und den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 bei Patienten und Kontrollen	57
Tab. 31: Lokalisation der MMPs/TIMP-1 in Hornhaut und Tränendrüse (mit und ohne Monensin) (1)	58
Tab. 32: Signifikante Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1, TNF α) zwischen Patienten und Kontrollen	61
Tab. 33: Signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 und der Krankheitsaktivität der RA	61
Tab. 34: Signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs, TIMP-1 und TNF α in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen	62
Tab. 35: Signifikante Korrelationen zwischen der TNF α -Konzentration und den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 bei Patienten und Kontrollen	62
Tab. 36: Übersicht über die Familie der Matrixmetalloproteinasen	108
Tab. 37: Extraartikuläre Manifestationen der RA	109
Tab. 38: Labordaten der klassischen RA	110
Tab. 39: Schirmer-Test Werte (mm) (Schirmer I und II)	111
Tab. 40: Tränenvolumina (μ l) (gemittelte Daten aus beiden Augen) vor und nach nasaler Stimulation	112
Tab. 41: Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen Patienten und Kontrollen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen	114
Tab. 42: Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen Plasma und unstimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen	114
Tab. 43: Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen	115
Tab. 44: Korrelationen zwischen den MMP-, TIMP-1- und TNF α -Konzentrationen in Plasma und unstimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen	115
Tab. 45: Korrelationen zwischen den MMP-, TIMP-1- und TNF α -Konzentrationen in unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen	116
Tab. 46: Korrelationen der MMP-3-Konzentration mit den Konzentrationen der anderen MMPs in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten	117
Tab. 47: Korrelationen der MMP-3-Konzentration mit den Konzentrationen der anderen MMPs in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Kontrollen	117
Tab. 48: Korrelationen der TNF α -Konzentration mit den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten	118

Tab. 49: Korrelationen der TNFα -Konzentration mit den MMP- undTIMP-1-Konzentrationen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Kontrollen	118
Tab. 50: Korrelationen zwischen den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen und den Markern der Krankheitsaktivität bei RA	119
Tab. 51: Immunlokalisation der MMPs/TIMP-1 in Hornhaut und Tränendrüse (mit und ohne Monensin) (2)	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktureller Aufbau der MMPs	10
Abb. 2: Aktivierungsprozeß der MMPs	13
Abb. 3: ELISA-Schema (proMMP-2, MMP-3, proMMP-9, TIMP-1)	33
Abb. 4: ELISA-Schema (MMP-1-aktiv, MMP-2-aktiv, MMP-9-aktiv)	36
Abb. 5: Konzentration der aktiven MMP-1 (ng/ml) in unstimulierten und stimulierten Tränen	41
Abb. 6: proMMP-2-Konzentration (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen	42
Abb. 7: Konzentration der aktiven MMP-2 (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen	43
Abb. 8: Korrelation der aktiven MMP-2 im Plasma mit der aktiven MMP-2 in den unstimulierten Tränen bei den Patienten	44
Abb. 9: Korrelation der aktiven MMP-2 im Plasma mit der aktiven MMP-2 in den unstimulierten Tränen bei den Kontrollen	44
Abb. 10: MMP-3-Konzentration (ng/ml) in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen	46
Abb. 11: proMMP-9-Konzentration (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen	47
Abb. 12: Konzentration der aktiven MMP-9 (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen	49
Abb. 13: TIMP-1-Konzentration (ng/ml) Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen	50
Abb. 14: Korrelation der TIMP-1-Konzentration im Plasma mit der TIMP-Konzentration in den unstimulierten Tränen bei den Patienten	50
Abb. 15: Korrelation der TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten Tränen mit der TIMP-Konzentration in den stimulierten Tränen bei den Patienten	51
Abb. 16: Korrelation der TIMP-Konzentration in den unstimulierten Tränen mit der TIMP-Konzentration in den stimulierten Tränen bei den Patienten	51
Abb. 17: Korrelation der MMP-3-Plasmakonzentration und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)	54
Abb. 18: TNF α -Konzentration (pg/ml) in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen	56
Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis für MMP-1 von normaler humaner Kornea (A/B) und Tränendrüse (C/D)	59
Abb. 20: Immunhistochemische Nachweis von MMPs im Hornhautulkus bei Rheumatoider Arthritis	60
Abb. 21: Box- und Whisker-Plot	113

1. Einleitung

Es ist seit langem bekannt, dass das sterile Hornhautulkus eine seltene, aber ernste Komplikation der fortgeschrittenen rheumatoiden Arthritis (RA) darstellt (1), die zu einem vollständigen Funktionsverlust des Auges führen und als sensibler Indikator für die Entwicklung potentiell tödlicher vaskulitischer Komplikationen bei Patienten mit RA gewertet werden kann (2).

Einzelne Mitglieder der großen Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind immer wieder mit der Pathogenese sowohl der RA (3) als auch mit der des Hornhautulkus (4) in Zusammenhang gebracht worden.

1.1 Die Familie der Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen stellen eine Gruppe strukturell und funktionell ähnlicher Enzyme dar, die als die physiologisch relevantesten Mediatoren der Matrixdegradation gelten (5). Ihr Substratspektrum umfasst nahezu alle Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), zu denen die verschiedenen Kollagene, Elastin, Glykoproteine wie Laminin und Fibronectin und die Proteinanteile der Proteoglykane gehören (6). Die Fähigkeit einer Zelle, extrazelluläre Proteine zu degradieren und so in Wechselwirkung mit ihrer Umgebung zu treten, ist unabdingbar für die normale Entwicklung und Funktion eines multizellulären Organismus (7). Dies erklärt die wichtige Rolle, die MMPs in vielen biologischen Prozessen spielen. Eine exzessive Produktion der MMPs bzw. ein Ungleichgewicht zwischen den Proteinasen und ihren Inhibitoren kann allerdings über eine erhöhte extrazelluläre Proteolyse zur Pathogenese vieler Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis und der Tumormetastasierung beitragen (7, 8).

Ihre vielfältigen Funktionen machen verständlich, dass die MMPs von vielen, an diesen Prozessen beteiligten Zellen produziert werden. Hierzu gehören Bindegewebszellen wie Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Endothelzellen, sowie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Tumorzellen (9). Das erste Mitglied (Kollagenase) dieser inzwischen 25 Enzyme umfassenden Familie wurde 1962 von Gross und Lapiere entdeckt, als diese mithilfe des Gewebes einer Kaulquappe ein Enzym nachwiesen, das in der Lage war, native Kollagenfibrillen bei neutralem pH zu spalten (10).

1.1.2 Struktur und Funktion der MMPs

MMPs sind eine Gruppe von Zink-haltigen Metallo-Endopeptidasen, die typischerweise als Proenzyme von der Zelle in den Extrazellularraum sezerniert und dort anschließend schrittweise aktiviert werden. Die Abhängigkeit ihrer Aktivität von Zink, die Hemmbarkeit durch eine Familie von endogenen Inhibitoren der Metalloproteinasen (Tissue inhibitor of metalloproteinases = TIMP) und ihre evolutionäre Verwandtschaft untereinander sind weitere Kriterien für die Zugehörigkeit der einzelnen Mitglieder zu dieser Familie (11).

Anhand ihrer Substratspezifität werden die einzelnen MMPs in 4 verschiedene Klassen unterteilt (12) (Tab. 1 und Tab. 36 im Anhang). **Kollagenasen** sind die einzigen Enzyme mit der Fähigkeit, die native Tripelhelixstruktur der interstitiellen Kollagenfibrillen Typ I, II und III (90% des Gesamtkörperkollagens) in typische 1/4 und 3/4 Fragmente zu spalten (13). Diese Formen von denaturiertem Kollagen (Gelatin) sind Substrate einer weiteren Klasse der MMPs, der **Gelatinasen**. Neben ihrer Wirkung auf Gelatin ist vor allem ihre Aktivität gegen die native Form der Kollagene Typ IV, V und VII zu nennen, die sie zum Abbau von Basalmembranen (v.a. Kollagen Typ IV und VII) befähigt (14). Dies erklärt ihre Beteiligung an Prozessen wie der Tumormetastasierung (15). **Stromelysine** haben ein breites Wirkungsspektrum, das die meisten Bestandteile der EZM umfasst. Bedeutsam ist die Tatsache, dass ein Mitglied dieser Klasse, MMP-3, an der extrazellulären Aktivierung anderer MMPs beteiligt ist (16, 17).

Tab.1: MMPs (Kollagenase-1, Gelatinasen, Stromelysin-1)

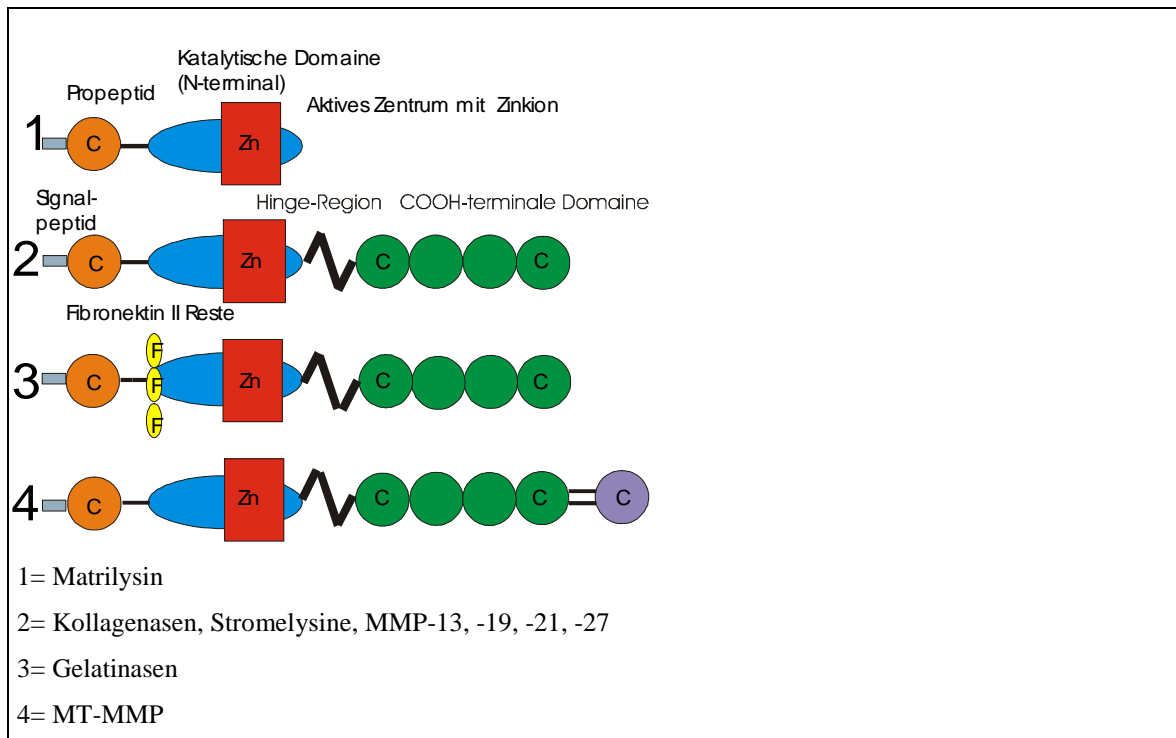
	Enzym	MG	Substratpräferenz
Kollagenasen			
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	55/43	Kollagen I, II, III, VII, X, proMMP
Gelatinasen			
MMP-2	Gelatinase A	72/66	Gelatin, Kollagen IV, V, VII, XI, Fibronectin, Elastin, proMMP-9
MMP-9	Gelatinase B	92/86	Gelatin, Kollagen IV, V, Elastin, Fibronectin
Stromelysine			
MMP-3	Stromelysin-1	57/46	ProMMP-1,-7, -8, -9, -13, Laminin, Fibronectin

(angelehnt an Wong et al, (12)); MG = Molekulargewicht

Die letzte Klasse wird von den **membran-type MMPs** (MT-MMPs) gebildet, die mithilfe einer Transmembrandomäne an ihrem carboxyterminalem Ende in der Zellmembran verankert sind und die einzige Klasse der MMPs darstellen, die nicht

sezerniert werden. Ihre katalytische Domäne befindet sich an der Außenseite der Zellmembran. Sie sind in eine Vielzahl von perizellulären Aktivitäten involviert (11, 18). So ist MT1-MMP an der Aktivierung von proMMP-2 auf der Zelloberfläche beteiligt.

Die MMPs sind aus mehreren Domänen aufgebaut, deren Struktur bei den verschiedenen MMPs sehr ähnlich ist (19). Im Folgenden wird der Aufbau dieser allgemeinen Domänenstruktur erläutert, Ausnahmen und zusätzliche Charakteristika einiger MMPs finden sich in Abbildung 1.



(Angelehnt an Murphy et al, 2002 (20))

Abb.1: Struktureller Aufbau der MMPs.

MMPs enthalten das Signalpeptid, ein Propeptid, die katalytische Domäne mit dem Zinkion, eine Verbindungsregion und die COOH-terminale Domäne (Ausnahme: Matrilysin). Gelatinasen verfügen zusätzlich über 3 Fibronektin Typ II Motive innerhalb der katalytischen Domäne, die eine Rolle in der Substraterkennung spielen. MT-MMPs besitzen an ihrem C-terminalen Ende eine transmembranäre Domäne, die diese Enzyme in der Zellmembran verankert und einen cytoplasmatischen Schwanz.

Alle MMPs besitzen am N-terminalen Ende ein Signalpeptid, das für die Enzymsynthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat und die nachfolgende Sekretion in den EZR verantwortlich ist und im Laufe dieses Prozesses abgespalten wird. Es folgt ein Propeptid („Pro“-domäne) das den sogenannten „Cystein switch“ mit der Motifsequenz PRCGVDP trägt. Der „Cystein switch“ ist für die Aufrechterhaltung der Enzymlatenz verantwortlich. Die katalytische Domäne enthält das aktive Zentrum des Enzyms mit einem Zinkion, welches für die Substrathydrolyse und die

Interaktion mit den Inhibitoren erforderlich ist. Für die Bindung des Zn^{2+} sind die 3 Histidinreste des HexxHxxGxxH-Motivs verantwortlich. Die meisten MMPs haben am COOH-terminalen Ende eine weitere Domäne, die in ihrer Sequenz große Ähnlichkeit mit dem Serumprotein Hämapexin/Vitronektin aufweist und durch eine flexible Region mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Ihre Rolle variiert bei den einzelnen MMPs (20), soll aber - wenn vorhanden - an der Bindung der TIMPs und einiger Substrate, der Membranaktivierung und der proteolytischen Aktivität beteiligt sein (7, 19).

1.1.3 Regulation der MMP-Aktivität

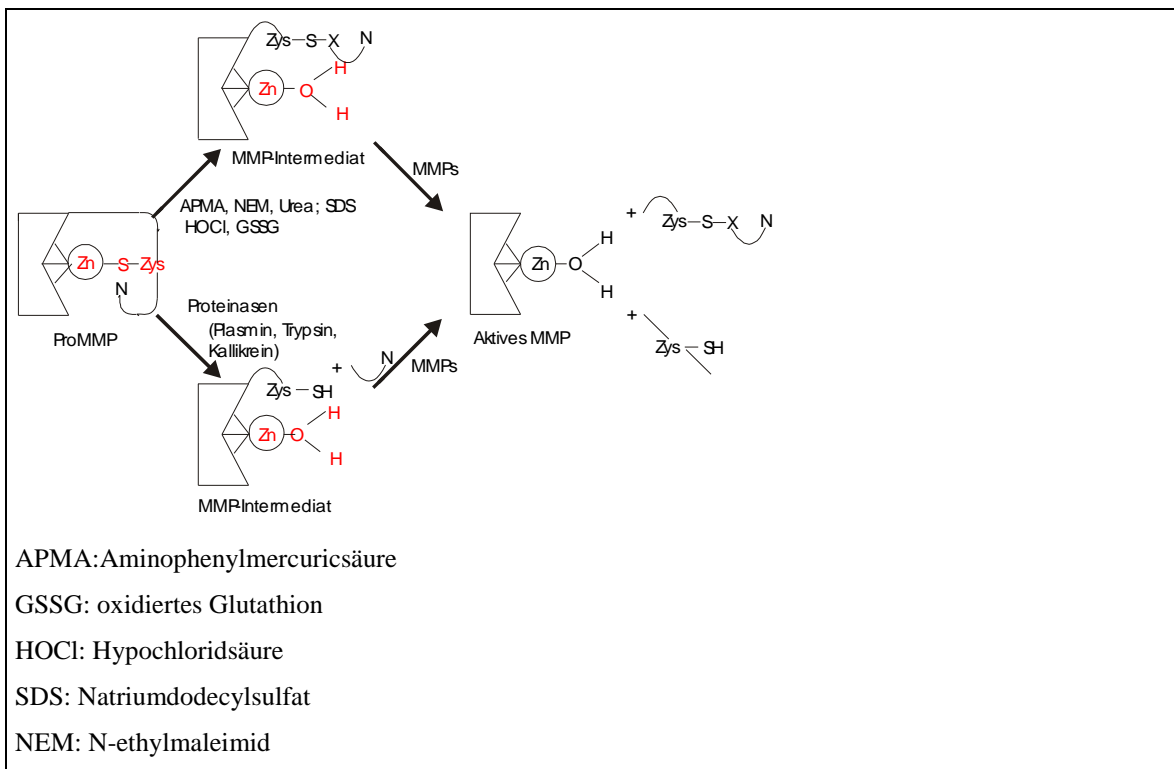
Das Sprichwort „zur rechten Zeit am rechten Ort sein“ gilt auch für MMPs, da sie ihren vielfältigen Aufgaben nur dann nachkommen können, wenn sie an der richtigen Stelle, zur rechten Zeit und in der richtigen Menge anwesend sind und der Situation angemessen aktiviert bzw. inhibiert werden (7). Auch die Vielfalt der Erkrankungen, die durch eine unangemessene und unkontrollierte MMP-Synthese ausgelöst werden, unterstreicht die Notwendigkeit einer kontrollierten Regulation ihrer Aktivität (9). Diese Kontrolle erfolgt im wesentlichen auf den Stufen der Enzymexpression, der extrazellulären Aktivierung und der Interaktion mit den Inhibitoren (9).

Die unterschiedliche räumliche und zeitliche Expression der einzelnen MMPs, wie auch ihre unterschiedliche Induzierbarkeit, wird auf der Ebene der **Transkription** kontrolliert und bestimmt im Hinblick auf das überlappende Substratspektrum dieser Enzyme wesentlich ihre individuelle biologische Funktion (7). Diese Kontrolle der Transkription gilt als der wichtigste Regulationsmechanismus, dem alle MMPs mit Ausnahme von MMP-2 unterliegen (21). Letzteres wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und unterliegt der Kontrolle durch einen einzigartigen Mechanismus der Enzymaktivierung auf der Zelloberfläche (22). Die Expression eines MMP-Gens wird durch verschiedene stimulatorische und suppressive Faktoren reguliert, zu denen Cytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Onkogenprodukte und Tumorpromotoren gehören (23, 24). Auch Komponenten der EZM haben einen Einfluß auf die MMP-Expression, wie die Induzierbarkeit der MMP-1-Expression durch Kollagen Typ I zeigt (25). Wie die Genexpression im einzelnen erfolgt, ist abhängig von der Promotorausstattung des jeweiligen MMP-Gens. Beispielhaft sei hier die Induktion und Supprimierung der MMP-1- und -3-Expression durch verschiedene Stimuli beschrieben. $TNF\alpha$ und IL-1 stimulieren die Synthese der Protoonkogenprodukte c-fos und c-jun. Diese wirken als Transkriptionsfaktoren und binden nach der Bildung des so genannten AP-1-Komplexes an

die entsprechende AP-1-Sequenz im Promotor der MMP-1 und-3 Gene (26, 27). Kerr et al (28) zeigten für die MMP-3 Expression in der Ratte, dass TGF β ebenfalls die Synthese des fos-Proteins induziert, dieses aber an eine andere Stelle des Promotors bindet und zu einer Supprimierung der Genexpression führt.

Die **extrazelluläre Aktivierung** der als inaktive Zymogene sezernierten Enzyme stellt den zweiten Mechanismus der Regulierung der MMP-Aktivität dar. Van Wart et al (29) zeigten, dass das Cystein des Propeptids mit seiner Thiolgruppe das katalytische Zinkion bindet und dass diese Interaktion die Bindung des für die Peptidhydrolyse essentiellen aktiven Wassermoleküls verhindert. Die Aktivierung der Proenzyme erfolgt nach dem Modell des sogenannten „cystein switch“, bei dem es unter der Einwirkung bestimmter Proteasen und nicht-proteolytischer Agentien durch die Abspaltung des Propeptids zur Lösung der Cys-Zn²⁺-Interaktion kommt, die im weiteren die Anlagerung des Wassermoleküls erlaubt (29). Abbildung 2 zeigt den schrittweise erfolgenden Prozess der proMMP-Aktivierung.

Für den ersten Schritt der *in vivo* Aktivierung ist Plasmin eines der Schlüsselenzyme. Es zeigte sich, dass Cytokine, die in einer Zelle die MMP-Synthese anregen, diese im selben Zuge auch zur Produktion des Plasminogenaktivators pro-uPA stimulieren können (31). Letzterer führt über einen Rezeptor-vermittelten Prozess zur Aktivierung von Plasmin aus Plasminogen (32). Die erste Spaltung durch Plasmin induziert innerhalb des Propeptids eine Strukturänderung, die dieses für eine zweite, letztlich zur vollen Aktivierung führenden Spaltung suszeptibel macht. Diese zweite Spaltung wird *in vivo* in der Regel von bereits aktivierten MMPs katalysiert, wie Suzuki et al (33) und Ogata et al (16) am Beispiel der proMMP-1- bzw. -9-Aktivierung unter Beteiligung von MMP-3 gezeigt haben. ProMMP-2 ist gegenüber dieser Form der extrazellulären Aktivierung resistent und wird stattdessen durch einen einzigartigen Prozess, der MT-MMP und TIMP-2 einschließt, auf der Zelloberfläche aktiviert (22). MMP-11 und die Gruppe der MT-MMPs enthalten in ihrem Propeptid eine zusätzliche, 10 Aminosäuren umfassende Sequenz, die für die intrazelluläre Aktivierung dieser MMPs durch die Golgi-assoziierte Subtilisin-ähnliche Proteinase Furin verantwortlich ist (34, 35).



(angelehnt an Nagase et al (30))

Abb. 2: Aktivierungsprozess der MMPs.

Durch die Verbindung des Zysteinrestes des Propeptids mit dem Zinkion der katalytischen Domäne wird die Enzymlatenz aufrechterhalten. Detergenzien wie SDS können die Struktur der proMMP zerstören und das Zinkion exponieren. Reagentien, die mit SH-Gruppen reagieren können, sind in der Lage, den Zysteinrest zu inaktivieren (GSSG, HOCl, APMA). Proteinasen (Plasmin, Trypsin, Kallikrein) können das Propeptid auch entfernt vom Zysteinrest spalten. In einem zweiten Schritt wird das Propeptid durch die Aktion anderer MMPs endgültig abgespalten und die MMP ist aktiviert.

Nach Aktivierung der Zymogene zu proteolytisch wirksamen Enzymen, werden diese durch spezifische und unspezifische Inhibitoren kontrolliert. Zu den **spezifischen Inhibitoren** der MMP-Aktivität gehört die Gruppe der TIMPs, die oft koordinativ mit den Proteasen exprimiert und sezerniert werden (19). Da sie mit den Proteinasen reversible, 1:1 stöchiometrische Komplexe bilden, bestimmt die Balance zwischen den aktiven MMPs und ihren Inhibitoren das Ausmaß der lokalen Matrixdegradation. In der Tat wird ein Ungleichgewicht zugunsten der MMP-Konzentration für die Entstehung einer exzessiven Proteolyse, und damit für das Auftreten bestimmter Erkrankungen verantwortlich gemacht (3).

TIMP-Moleküle bestehen aus 2 Domänen (36), von denen die N-terminale mit der katalytischen Domäne der MMPs interagiert, und somit wesentlich für die inhibitorische Aktivität verantwortlich ist. Die unterschiedliche Affinität der C-terminalen Domäne von TIMP-1 und -2 zur Hämapexin-ähnlichen Domäne von MMP-2 und -9 zeigt allerdings,

dass auch diese Struktur die Bindung zwischen Enzym und Inhibitor mitbestimmt (37). Zur Zeit sind 4 Isotypen innerhalb der TIMP-Familie bekannt (TIMP 1-4), die alle ein breites Wirkungsspektrum gegen Metalloproteinasen aufweisen, wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten (38). Neben dieser inhibitorischen Aktivität partizipieren TIMPs an einer Reihe weiterer biologischer Prozesse, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.

α_2 -Makroglobulin gilt als der Hauptvertreter der **unspezifischen MMP-Inhibitoren**. Im Gegensatz zur eher lokalen Wirkung der TIMPs, ist dieses Protein als weit verbreiteter Plasmabestandteil an der MMP-Hemmung in den Körperflüssigkeiten beteiligt. Da der α_2 -Makroglobulin/MMP-Komplex durch Rezeptor-induzierte Endozytose entfernt wird, spielt dieser Inhibitor eine wichtige Rolle für die Clearance von MMPs (7).

Tab. 2: Biologische Funktionen der TIMP-Klasse

TIMP	MM	Biologische Funktionen
allgemein		Inhibition der MMPs; Geweberemodellierung
TIMP-1	28,5	Hodenentwicklung und Steroidgenese, Ovulation, Inhibition der Angiogenese, Schutz vor Apoptose
TIMP-2	21,0	Reduktion der Invasivität und Metastasierung einiger Tumorzelllinien
TIMP-3	21,0	Inhibition des TNF α konvertierenden Enzyms
TIMP-4	22,0	Adverse prognostische Indikatoren für non-Hodgkin Lymphome, Stimulation des Zellwachstums <i>in vitro</i> , Schutz vor Apoptose

(angelehnt an Wong et al (12)); MM: Molekularmasse (kDa)

1.1.4 MMPs in Physiologie und Pathologie

Wie schon beschrieben, sind Matrixmetalloproteinasen durch ihre Wirkung auf die extrazelluläre Matrix an einer ganzen Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Tab. 3). Die Größe dieser Enzymfamilie mit ihren zum Teil überlappenden Funktionen (Tab. 36 im Anhang) erklärt zwar die Überlebensfähigkeit und den gering ausgeprägten Phänotyp MMP-defizienter Mäuse, erschwert allerdings das Verständnis der Rolle der einzelnen Proteinasen *in vivo*. Der Verdacht der kausalen Bedeutung einer bestimmten Proteinase für einen biologischen Prozess, ergibt sich aus der Korrelation zwischen beiden sowie der Existenz eines plausiblen Mechanismus und wird anschließend experimentell gesichert (7).

Als Beispiel sei die erhöhte Expression von MMPs bei malignen Erkrankungen genannt, die in der Regel indikativ für eine schlechte Prognose ist (7). Im Zentrum der Pathogenese dieser Erkrankungen steht die Fähigkeit der Zellen, Gewebegrenzen zu überschreiten und, wie im Falle von Krebs, zu metastasieren. Die Präsenz Matrix-degradierender Enzyme bei diesen Erkrankungen erscheint also logisch und wurde in vielen Studien belegt (39). Die tatsächlichen Mechanismen, die diesem Zusammenhang zwischen den MMPs und einer Erkrankung unterliegen, sind allerdings komplizierter als ursprünglich gedacht. Coussens et al (40) und Pozzi et al (41) zeigten zum Beispiel, dass bestimmte MMPs (MMP-7, -9) zwar den Beginn der Krebsentwicklung fördern, seine letztliche Malignität hingegen senken.

Tab. 3: Beteiligung von MMPs in physiologischen und pathologischen Prozessen

Physiologische Prozesse	Pathologische Prozesse
Ovulation	Tumorinvasion
Endometrialer Zyklus	Tumormetastasierung
Trophoblasten/Blastozystenimplantation	Leukämische Aussaat
Embryogenese	Rheumatoide Arthritis
Speicheldrüsenmorphogenese	Osteoarthritis
Brustdrüsenentwicklung/-involution	Peridontale Erkrankungen
Zervixdilataion	Lungenfibrose
Fruchtblasensprung	Leberzirrhose
Uterusinvolution	Hornhautulzeration
Knochenumbildung	Magenulkus
Zahndurchbruch	Dilatative Kardiomyopathie
Wund/-Frakturheilung	Aortenaneurysma
Angiogenese	Artherosklerose
Funktion von Makrophagen und Neutrophilen	Otosklerose
	Epidermolysis bullosa

(aus Ries und Petrides (9))

1.2 Die Beteiligung der MMPs in der Pathogenese des Hornhautulkus

1.2.1 Hornhaut und Tränenfilm

Die Hornhaut ist das optische Fenster des Auges, die aufgrund ihrer Transparenz dem Menschen das Sehen erst ermöglicht. Mit insgesamt 43 Dioptrien besitzt die Kornea den größten Anteil der Gesamtbrechkraft des Auges und nimmt so Einfluß auf die Refraktion. Histologisch besteht sie aus 5 Schichten: dem vorderen Epithel, der Bowman-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran sowie dem hinteren Endothel.

Die Ernährung der gefäßlosen Kornea erfolgt passiv durch Diffusion aus dem Randschlingennetz, dem Kammerwasser und dem Tränenfilm. Letzterer ist ein Produkt der Haupt- und akzessorischen Tränendrüsen, der Bindehaut sowie der Lidranddrüsen. Neben der Ernährung der Kornea liegt die Bedeutung des Tränenfilms in der Benetzung der ansonsten rauen Hornhautoberfläche und dem Schutz des Auges vor Infektionen durch seine bakterizid und bakteriostatisch wirkenden Bestandteile wie Lysozym, β -Lysin, Lactoferrin und IgA-Globulin.

1.2.2 Die normale Wundheilung der Hornhaut

Einsichten in die normale Wundheilung der Hornhaut wurden mithilfe des Modells der penetrierenden Keratektomie (Entfernung von Epithel, Basalmembran und superfiziell Stroma) an der Hornhaut von Kaninchen gewonnen (42). Die Beobachtung, dass der Kollagenumsatz während dieser Phase gegenüber dem sonst statischen Gewebe stark erhöht ist (43), führte zu der Annahme, dass Mitglieder der Familie der MMPs in diesen Prozeß involviert sind. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf die Klasse der Gelatinasen (MMP-2 und -9) gelenkt. Matsubara et al (44) verglichen in ihrer Studie das Muster der MMP-Expression in der normalen Kornea mit dem nach Verletzung der Hornhaut durch superfizielle oder penetrierende Keratektomie. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien fand sich in der normalen Kornea nur die Proform von MMP-2, die ausschließlich im Stroma und Endothel lokalisiert war und vor allem von Stromafibroblasten synthetisiert wurde (45, 46, 47). Fini et al (45) sahen die Funktion dieses Enzyms in der gesunden Hornhaut in der Überwachung der Kollagenstrukturen, da es nach lokaler Aktivierung beschädigte Kollagenmoleküle degradieren und somit beseitigen kann. Auch TIMP-1 konnte im Epithel des normalen Hornhautgewebes nachgewiesen werden (48).

Nach Keratektomie kam es mit dem Auftreten Matrix-sezernierender Fibroblasten im verletzten Gebiet zu einem Anstieg der MMP-2-Konzentration und zur Aktivierung des Enzyms im Stroma. Die Persistenz dieser Veränderungen über einen Zeitraum bis zu 7 Monaten deuten darauf hin, dass MMP-2 in den langen Prozeß der Stromaregeneration involviert ist. Ähnliche Zeitverläufe zeigt die Expression von MMP-1 und -3 (49). Der zeitliche Verlauf der MMP-9-Expression in den Basalzellen des Epithels (46, 47, 48, 50) nach Verletzung der Hornhaut korrelierte mit dem Zeitpunkt der Epithelregeneration. Die Beobachtung, daß das Verschwinden des Enzyms mit dem Auftreten sichtbarer Verankerungsfibrillen aus Kollagen Typ VII (Substrat für MMP-9) in der Basalmembranzzone zusammenfällt, deutet darauf hin, dass MMP-9 eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Basalmembranresynthese spielt. Ye und Azar (48) zeigten durch ihren Nachweis einer erhöhten TIMP-1-Expression nach Laser-Keratektomie der Hornhaut, dass auch dieses Protein an den frühen Stadien der Wundheilung beteiligt ist.

1.2.3 Mechanismus der Hornhautulzeration

Das Hornhautulkus ist ein Defekt des Hornhautepithels, der bis in die Bowmann'sche Lamelle reicht.

Laut dem WHO-Report von 1996 (51) gehören Hornhautulzerationen und die aus ihnen resultierende Narbenbildung zu den häufigsten Ursachen des Sehverlustes.

Die Ursachen für das Entstehen eines Korneaulkus sind vielfältig und schließen lokale wie systemische Erkrankungen mit ein, von denen einige in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tab. 4: Ätiologie des Hornhautulkus

Virale Infektionen:	CMV, HSV
Bakterielle Infektionen:	Pseudomonas aeruginosa, Staphylokokken, Serratia marcescens
Autoimmunerkrankungen:	Mooren Ulkus, RA, SLE, M. Wegener, PAN
Andere:	Traumata (Verbrennung, Verätzung), Vitamin A Mangel, Tränenmangel (Keratokonjunktivitis sicca, prim./sek. Sjögren-Syndrom), neuroparalytisch, Stammzelleninsuffizienz

Trotz der mannigfaltigen Erkrankungen, die zur Entstehung eines Hornhautulkus führen, sind die dabei zugrunde liegenden Pathomechanismen ähnlich (Tab. 5).

Tab. 5: Pathomechanismen des Hornhautulkus

Epitheldefektheilung

Inflammation

Synthese und Aktivierung von MMPs

Klinische Beobachtungen weisen darauf hin, dass dem Auftreten eines Hornhautulkus **rezidivierende oder persistierende Defekte im Epithel** vorausgehen. Experimentelle Studien mithilfe des durch thermische bzw. chemische Noxen ausgelösten Wundmodells (52) bestätigten und ergänzten dieses Konzept, indem sie zeigten, dass es zwischen dem Auftreten des Epitheldefektes und dem Beginn der Stromaulzeration zu einem Verlust der Basalmembran kommt. Berman et al (53) leiteten hieraus die Hypothese ab, dass die Zerstörung der Basalmembran der letztendlich initiierte Schritt zur Degradation des Stromas ist. Experimente mithilfe dieses Modells an Ratten zeigten, dass es während der epithelialen Wundheilung zur Zerstörung der originalen Basalmembran kommt. Die Tatsache, dass dieser Effekt auch in der Organkultur auftritt und durch Zugabe von Cycloheximid (Hemmstoff der Proteinsynthese) blockiert wird, sowie der Nachweis einer adäquaten Neusynthese der Basalmembranstrukturen Laminin-5 und Kollagen Typ VII zeigten, dass sowohl die Zerstörung der Basalmembran als auch ihre gestörte Regeneration in diesem Modell auf einen aktiven degradativen Prozeß zurückzuführen ist, der durch residente Hornhautzellen und ihre Produkte vermittelt wird (46, 50). Die signifikante Verbesserung der Basalmembranintegrität durch Behandlung der thermisch geschädigten Hornhaut mit einem synthetischen MMP-Inhibitor deutete darauf hin, dass Mitglieder dieser Enzymfamilie an der Verhinderung der normalen Basalmembranreparatur und damit an der Aufrechterhaltung epithelialer Defekte beteiligt sind. In der Tat korrelierte das Ausbleiben der Basalmembranregeneration mit einem deutlichen Anstieg gelatinolytischer MMPs im verletzten Hornhautgewebe (50). Da gezeigt werden konnte, dass allein MMP-9 für die oben erwähnte Hemmung durch Cycloheximid suszeptibel ist (46), wird diesem Enzym die größte Bedeutung in der Pathogenese der verzögerten Epithelheilung beigemessen. Da es sich in geringerer Konzentration auch während der normalen Wundheilung der Hornhaut nachweisen ließ, ist es nicht einfach seine Anwesenheit, sondern viel mehr die Überexpression, die für den Übergang eines physiologischen in ein pathologisches Geschehen verantwortlich ist (23).

Auf die Zerstörung der schützenden Epithelschicht mit Exponierung des Stromas folgt in vielen Fällen das **Einwandern von Entzündungszellen (Inflammation)**. Verschiedene Studien wiesen auf die entscheidende Bedeutung neutrophiler Granulozyten mit den in

ihnen enthaltenden Enzymen (z. B. MMP-8) für die Degradation des Stromas hin. So zeigte sich zum einem, dass die größte Ansammlung dieser Zellen im Bereich von ulzerierendem Hornhautgewebe stattfindet (54). Zum anderem ließ sich in Versuchen, in denen die Stromainvasion der Neutrophilen durch das Setzen einer physikalischen Blockade bzw. ihre selektive Elimination aus der Blutbahn unterbunden wurde, ein Fortschreiten der Ulzeration verhindern (55, 56).

Die Beobachtung, daß nicht alle Fälle von Stromaulzerationen mit der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und der Entwicklung eines inflammatorischen Infiltrats einhergehen, diese Formen des sterilen Hornhautulkus aber nichtsdestotrotz progressiv im Verlauf sind (57), rückte die Beteiligung von Matrix-zerstörenden Enzymen (**MMPs**) in das Blickfeld des Interesses. In der Tat zeigten frühere Studien, dass der zur Ulzeration führende Verlust der Stromakomponenten (70% Kollagen Typ I) auf eine exzessive kollagenolytische Aktivität (v. a. MMP-1) innerhalb der verletzten Kornea zurückzuführen ist (4, 58, 59, 60, 61, 62, 63). Dabei sind eine Vielzahl von Zellen, wie Epithelzellen, Stromafibroblasten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen zur Produktion dieser Enzyme befähigt (64).

1.3 Das sterile Hornhautulkus bei der rheumatoiden Arthritis

Nahezu 50% aller nicht-infektiösen Formen einer peripheren ulzerativen Keratitis (PUK) sind mit systemischen Erkrankungen vergesellschaftet, bei denen unter anderem die Wegenersche Granulomatose, die rezidivierende Polychondritis, der systemische Lupus erythematoses (SLE) und die Panarteritis nodosa (PAN) zu nennen sind (65). Die häufigste Assoziation findet sich allerdings mit der rheumatoiden Arthritis (66), eine Tatsache, die dem Ophthalmologen seit langem bekannt ist (67).

Hornhautulzera können bei der RA zu jedem Zeitpunkt auftreten, gelten aber in der Regel als Komplikation der fortgeschrittenen RA und leiten in bis zu 50% der Fälle den Übertritt in eine systemische Vaskulitis ein (68). In der Tat zeigten McKibben et al (69), dass zwischen der Diagnosestellung der RA und dem Beginn der Hornhautulzeration im Mittel ein Zeitraum von 19,6 Jahren liegt.

1.3.1 Pathogenese und Klinik der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische Multisystemerkrankung unbekannter Ursache, deren Hauptcharakteristikum eine persistierende Entzündung der Synovia ist, die in der Regel die peripheren Gelenke in symmetrischer Verteilung einschließt. Diese Synovitis, ähnlich einer lokalisierten Neoplasie (70), hat das Potential, die Knorpel- und Knochenstrukturen des Gelenkes zu zerstören und somit seine Integrität und Funktionsweise zu ändern. Die Prävalenz der RA beträgt 0,8% der Bevölkerung, mit einer starken Dominanz des weiblichen Geschlechts (weiblich : männlich 3:1). Diese Dominanz verliert sich allerdings mit zunehmendem Alter bei gleichzeitig steigender Prävalenz. 80% der Patienten entwickeln die RA zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr.

Wenn auch die eigentliche Ursache unklar ist, liegt der Erkrankung doch eine eindeutige genetische Prädisposition zugrunde, wie eine 15-20% Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen zeigt. Einer der wichtigsten prädisponierenden genetischen Faktoren ist das MHC II Genprodukt HLA-DR4, das bei 70% aller Patienten gefunden wird und das relative Risiko, an einer RA zu erkranken, um den Faktor 5 erhöht (71). Aminosäuresequenzänderungen in der dritten hypervariablen Region der β -Kette dieses Moleküls sind für die genetische Prädisposition, eine RA zu entwickeln, verantwortlich. Auch die Art der Manifestation der RA steht mit unterschiedlichen HLA-Phänotypen in Verbindung, wobei eine aggressive Verlaufsform mit extraartikulärer Beteiligung v. a. mit dem Auftreten der Allele DR β 1*0401 oder DR β 1*0404 korreliert. Der ursprüngliche Auslöser für die RA ist nach wie vor unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass verschiedene arthritogene Stimuli in dem genetisch prädisponierten Organismus eine Immunantwort aktivieren, deren Pathomechanismus im weiteren die Pathophysiologie der Erkrankung erklärt. Als auslösende Stimuli werden in erster Linie infektiöse Agentien wie das EB-Virus, CM-Virus, Parvovirus B19 und Mykobakterien (70) diskutiert. Die nachstehende Tabelle soll einen kurzen Überblick über die pathophysiologischen Abläufe der Erkrankung geben.

Tab. 6: Stadien der rheumatoiden Arthritis

Stadium	Pathomechanismus
Stadium 1:	Präsentation des fremden Antigens an T-Helferzellen
Stadium 2:	T-Zellproliferation B-Zellproliferation mit Produktion von Antikörpern und Rheumafaktor*
Stadium 3:	Neutrophileneinwanderung in die Synovialflüssigkeit Synovialzellproliferation mit Pannusbildung**
Stadium 4:	Pannus invadiert Knorpel, Bänder, Sehnen und den subchondralen Knochen Synthese von MMPs durch Chondrozyten und Synovialzellen/MMPs aus Granula phagozytierender Zellen → irreversible Destruktion der Gelenkstrukturen und Knochenerosionen

* Rheumafaktor: IgM-Antikörper, der an das Fc-Fragment des IgG bindet

** Pannus: Gefäßgranulationsgewebe aus proliferierenden Fibroblasten, Blutgefäßen und infiltrierenden mononuklearen Zellen (angelehnt an Harris (70))

Die Produktion von Zytokinen durch T-Lymphozyten (v. a. IL-2, -3, -4, IFN γ) und Makrophagen bzw. Fibroblasten (v.a. IL-1, -6, CSF, TNF α) trägt wesentlich zur Entwicklung der pathologischen Veränderungen der RA bei. Sie finden sich bei diesen Patienten in erhöhten Konzentrationen im Serum und in der Synovialmembran und sind am Zustandekommen der Synovialgewebsentzündung und -proliferation, der Schäden an Knorpel und Knochen und der systemischen Manifestationen wie Fieber, Müdigkeit und Krankheitsgefühl beteiligt. Im Hinblick auf diese Arbeit ist die Fähigkeit bestimmter Zytokine, die Expression und Synthese einiger MMPs zu erhöhen, von Bedeutung. Bisher ruhende Zellen erhalten durch die Einwirkung der Zytokine einen aggressiven, die Matrix zerstörenden Phänotyp, wie Unemori et al (72) am Beispiel der Induktion der 92kDa-Gelatinase in dermalen Fibroblasten durch IL-1 β , Lymphotoxin und TNF α gezeigt haben. Die beiden wichtigsten Zytokine in diesem Zusammenhang sind IL-1 β und TNF α . Beide erwiesen in verschiedenen Studien ihre Fähigkeit, die Expression der wesentlich an der RA beteiligten Metalloproteinasen, MMP-1 und -3, in Chondrozyten und Synovialzellen zu induzieren (73, 74, 75, 76).

Diese Proteinasen sind an der irreversiblen Zerstörung der Gelenkstrukturen in der letzten Phase der RA beteiligt (70, 77). Eine Erhöhung ihrer Konzentration durch Überexpression bzw. ein Ungleichgewicht zwischen Proteinasen und ihren spezifischen Inhibitoren (TIMPs) zugunsten der MMPs besitzt damit eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der RA (3, 78, 79). So zeigten Cambray et al (80) anhand ihres Modells

einer proliferativen Arthritis bei Kaninchen, dass die Induktion neuer Läsionen mit einer Reduktion der TIMP- und Steigerung der MMP-Produktion korreliert.

Die klinische Symptomatik der RA beginnt typischerweise unspezifisch mit Müdigkeit, allgemeinem Krankheitsgefühl, Morgensteifigkeit, Gewichtsabnahme und Adynamie. Die meisten Patienten entwickeln allerdings in den ersten beiden Jahren der Erkrankung das Vollbild der symmetrischen, bilateralen Polyarthritis, die in der Regel zu Beginn die kleinen Fingergelenke (MCP und PIP) und das Handgelenk befällt. Im weiteren Verlauf können alle Gelenke des Körpers betroffen sein. Die Patienten leiden neben den Allgemeinsymptomen an Gelenkschmerzen und Funktionseinschränkungen, die sich im weiteren Verlauf durch Knochenankylosen und Weichteilkontrakturen zu fixierten Deformitäten entwickeln können und damit ihren irreversiblen Charakter bekommen. Da die RA eine systemische Erkrankung ist, führt sie zu einer Vielzahl extraartikulärer Manifestationen, die wesentlich an der Morbidität beteiligt sind (siehe Tab. 37 im Anhang). Das Auge gehört zu den häufigsten extraartikulären Manifestationsorten, und seine Beteiligung bei der RA wurde in der Literatur ausführlich besprochen. Ungefähr 25% der Patienten mit RA entwickeln Komplikationen an den Augen, von denen die häufigsten in Tabelle 7 zu finden sind. Das sterile Hornhautulkus ist eine eher seltene, dafür aber ernste Komplikation der RA, da es zu einem vollständigen Verlust der Sehfähigkeit führen kann. Es stellt einen sensiblen Indikator für die Entwicklung potentiell tödlicher vaskulitischer Komplikationen bei Patienten mit RA dar (2).

Tab. 7: Okuläre Komplikationen der RA

Keratokonjunktivitis sicca (25%)
Skleritis (6%)
Periphere ulzerative Keratitis und Hornhautulkus (2%)
Episkleritis
Läsionen der Choroidea und Retinavaskularisation (selten)

(Aus Hick et al, (81))

Die Diagnose RA ist eine Kombination aus typisch zu findenden Labordaten (Tab. 38 im Anhang) und der charakteristischen Klinik der Erkrankung. Neben der erhöhten Morbidität ist auch die Mortalitätsrate bei RA erhöht. Der 2,5fache Anstieg geht allerdings nur zu 15-30% auf das Konto der RA, den wesentlichen Beitrag leisten hier Infektionen und Gastrointestinalblutungen.

Die RA kann nur palliativ behandelt werden. Die möglichen Therapien zielen auf eine Schmerzbeseitigung, Entzündungshemmung, Protektion der Gelenkstrukturen und Kontrolle der systemischen Manifestationen hin. Zum Einsatz kommen nicht steroidale Antiphlogistika und Analgetika, Glukokortikoide, „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMADs) sowie Zytostatika und Immunsuppressiva. Neuere Mittel, wie TNF α -Antagonisten, TNF α -Rezeptorblocker und CD20-Antikörper, chirurgische Maßnahmen, wie die Synovektomie und Krankengymnastik vervollständigen das Spektrum.

1.3.2 Pathogenese und Klinik des sterilen Hornhautulkus bei der rheumatoiden Arthritis

In der Literatur wird von zwei RA-assoziierten Formen des sterilen Hornhautulkus berichtet. Brown und Grayson (67) beschrieben 1968 zum ersten Mal eine charakteristische Läsion der Hornhaut, die sie in ihrer Studie an Patienten mit RA beobachtet hatten. Es handelte sich um einen limbusnahen, im unteren Quadranten liegenden Defekt, der klinisch von einer superfiziellen, nicht-progressiven Form bis hin zum Zusammenbruch der Epithelbarriere, Keratolyse, ausgedehnten Stromaeinschmelzung und letztendlich Perforation des Auges reichen konnte (**Randfurchenulkus**).

Dieser Befund tauchte im folgenden immer wieder in der Beschreibung von RA-assoziierten Hornhautulzerationen auf (82, 83, 84, 85). Der Patient ist hierbei in der Regel schmerzfrei und sein Auge zeigt keine oder nur minimale Zeichen einer begleitenden Entzündung. Die zweite und häufigere Hornhautbeteiligung bei RA findet sich in Form der **peripheren ulzerativen Keratitis (PUK)**. Dabei handelt es sich um ein nicht-infiltrierendes Ulkus in der Peripherie der Kornea mit einem umgebenden entzündlichen Infiltrat und Injektion der benachbarten Konjunktiva sowie einer Skleritis. Die betroffenen Patienten leiden an einem Fremdkörpergefühl, Schmerzen, ständigem Tränenfluß und einer herabgesetzten Sehfähigkeit. In beiden Fällen zeigen die betroffenen Patienten häufig, aber nicht obligatorisch den Zusatzbefund einer Keratokonjunktivitis sicca als Ausdruck eines sekundären Sjögren- Syndroms (57, 67, 82, 86, 87, 88, 89).

Über die Pathogenese des rheumatischen Hornhautulkus wurde in der Literatur viel diskutiert. Die wichtigsten Mechanismen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Pathomechanismen des sterilen Hornhautulkus bei RA

Pathomechanismus	Referenz
Verminderte Tränensekretion mit Bildung von Mikroerosionen	83
Immunologische Mechanismen	
a) Anwesenheit von Autoantikörper gegen spezifische Hornhautproteine	90
b) aberante Expression von HLA II Antigenen auf Epithelzellen und Keratozyten im Ulkugewebe	83, 91, 92, 93
c) vaskulitische Obstruktion der limbalen Blutgefäße	93
Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren	85

Wie im Falle der RA, kann auch die Entstehung der Hornhautulzeration auf ein Ungleichgewicht zwischen Matrix-zerstörenden Enzymen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs) zurückgeführt werden. Riley et al (85) berichteten zum ersten Mal über die Verteilung sowohl von MMP-1 und TIMP-1 im Hornhautulkusgewebe von Patienten mit bekannter RA. Ihre Beobachtung einer erhöhten MMP-1-Konzentration ausschließlich im pathologischen Gewebe bestätigte - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bereits erwähnter Studien (4, 58, 59, 60, 61, 62, 63) - die Bedeutung dieses Enzyms für die Entstehung der Stromaulzeration. TIMP-1 ließ sich ebenfalls im Ulkugewebe der RA-Patienten nachweisen. Seine Konzentration lag hier aber deutlich unterhalb der entsprechenden Konzentration in der gesunden Kornea, so dass es seiner normalen Schutzfunktion vor einer unkontrollierten MMP-Aktivität nicht mehr nachkommen kann.

Smith et al (94) zeigten, dass auch die Gelatinasen an der Entstehung rheumatischer Hornhautulzerationen beteiligt sind. Sie stellten fest, dass das Auftreten einer PUK mit einer abnormen Produktion von MMP-2 in Stromakeratozyten der betroffenen Hornhaut sowie mit einem Anstieg der MMP-9-Konzentration im Tränenfilm einhergeht. Mit dem Nachweis einer im Vergleich zu Gesunden erhöhten MMP-2- und -9-Konzentration in den Tränen von Patienten mit aktiven oder ausgeheilten Korneaulzera bestätigten Geerling et al (95) eine Beteiligung dieser Enzyme an der Pathogenese dieses Prozesses.

Die Korrelation zwischen dem Auftreten der Enzyme und dem Fortschreiten der Erkrankung führte zu der Hypothese, dass die Gelatinasen nach ihrer lokalen Aktivierung durch die Zerstörung der Basalmembranstrukturen die Perforation der Hornhaut initiieren. Weiterhin verhindern sie durch die Hydrolyse des neu synthetisierten, noch nicht quervernetzten Kollagens die Reparatur des Gewebes und erleichtern so das Eindringen inflammatorischer Zellen mit denen in ihnen enthaltenen proteolytischen Enzymen (94).

Es konnte gezeigt werden, dass RA-assoziierte Hornhautulzera mit dem Auftreten eines deutlichen Entzündungsinfiltrates assoziiert sind, welches sich im Gegensatz zu dem durch neutrophile Granulozyten geprägten Infiltrat bei verschiedenen anderen Typen steriler Hornhautulzera vornehmlich aus T-Zellen und Makrophagen zusammensetzt (83, 85, 92). Diese Zellen tragen zum einen durch ihren Gehalt an MMP-1 (Makrophagen) zum anderen durch eine Interleukin-vermittelte Induzierung der Kollagenase-Expression in ortständigen Fibroblasten zur Erhöhung dieses proteolytischen Enzyms in der Kornea bei.

Auf der Suche nach der Quelle der MMPs in der Tränenflüssigkeit verglichen Smith et al (96) das zymographische MMP-Profil in den Tränen mit den entsprechenden MMP-Profilen von Hornhaut- und Bindehautzellen, Plasma sowie Leukozyten (Monozyten und Granulozyten). Dabei zeigte sich, daß die MMP-9 in der Tränenflüssigkeit in erster Linie aus Granulozyten stammt, die durch ein externes Agens oder im Zuge einer Autoimmunerkrankung in das Entzündungsgebiet gelockt wurden.

Es existieren bisher keine Publikationen, in denen die Tränendrüse als möglicher Ursprungsort der MMPs in der Tränenflüssigkeit untersucht worden ist. Daher war es Teil dieser Arbeit, anhand von Korrelationen der MMP- und TIMP-1-Konzentrationen zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen sowie der Immunhistochemie einen Hinweis auf eine mögliche Produktion dieser Proteine in der Tränendrüse zu bekommen.

1.4 Fragestellung

Es ist seit langem bekannt, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung steriler Hornhautulzera haben. Die Bedeutung einiger Matrixmetalloproteinasen sowohl bei der Pathogenese der RA als auch bei verschiedenen Formen des sterilen Korneaulkus wurde in der Literatur ausführlich beschrieben.

Unklar ist bisher allerdings, wie die in der Tränenflüssigkeit gefundenen MMPs/TIMPs in diese Körperflüssigkeit gelangen und ob sie gegebenenfalls aus der Tränendrüse oder aus dem Blut in die Tränen übertreten.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem Patienten- und Kontrollkollektiv die Konzentration der laut publizierter Daten wesentlichen MMPs, ihres physiologischen Inhibitors TIMP-1 und des Zytokins $\text{TNF}\alpha$ im Plasma sowie in unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit zu quantifizieren. Zusätzlich wurden diese Proteine in gesundem als auch in spezifisch erkranktem Gewebe von Patienten mit sterilem Hornhautulkus bei Rheumatoider Arthritis immunhistochemisch lokalisiert. Mithilfe dieser Ergebnisse sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es zwischen RA-Patienten und Kontrollen einen signifikanten Unterschied bezüglich der Konzentrationen der untersuchten Proteine in den drei Körperflüssigkeiten?
2. Korrelieren die Konzentrationen der MMPs und TIMP-1 in Plasma, unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit mit der Krankheitsaktivität der RA?
3. Korrelieren die Konzentrationen der untersuchten MMPs/TIMP-1/ $\text{TNF}\alpha$ zwischen den verschiedenen Körperflüssigkeiten?
4. Gibt es eine Korrelation zwischen der $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration und den Konzentrationen der verschiedenen MMPs und TIMP-1 in diesen Körperflüssigkeiten?
5. Finden sich MMPs und TIMP-1 im Hornhautgewebe von Patienten mit rheumatischem Ulkus in höheren Konzentrationen und in abweichender Lokalisation als bei gesunden Hornhäuten? Werden MMPs und TIMP-1 im gesunden Gewebe der Tränendrüse exprimiert?

2. Material und Methoden

Für diese Arbeit wurden bei 40 Patienten mit RA und 40 gesunden Kontrollen Plasma sowie Tränen vor und nach Stimulation gesammelt. Alter- und Geschlechtsverteilung waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Die demographischen Daten dieses Patienten- und Kontrollkollektives sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Ethikkommission hat dieser Arbeit am 09.03.2000 zugestimmt (Aktenzeichen 00-18).

Tab. 9: Demographische Daten des Patienten- und Kontrollkollektivs

	Patienten	Kontrollen
Anzahl	40	40
Altersdurchschnitt	61,8 (24-83)	57,7 (24-89)
Geschlecht (m:w)	7:33	9:31
Steroide (systemisch)	24	/
Methotrexat	21	/

2.1 Patienten und Kontrollen

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Vorraussetzung für die Teilnahme „als Patient“ an der Studie war eine serologisch nachgewiesene rheumatoide Arthritis ohne okuläre Beteiligung. 24 Patienten wurden mit Decortin, 21 mit der Kombination MTX und Leucovorin behandelt. Zusätzlich erhielten 10 Patienten Azulfidine, 6 Quensyl, 2 Embrel, 2 NSAR und ein Patient Endoxan. Das Kontrollkollektiv bestand aus gesunden Probanden bzw. Patienten mit einer ein- oder beidseitigen Cataract.

Voraussetzung für alle Gruppen war eine basale Tränensekretion von 10 mm innerhalb von 5 Minuten im Schirmer-Test. Hierbei wurde ein 5 mm breiter Filterpapierstreifen (Dr. Mann Pharma, Berlin) nach 5 mm abgeknickt und zwischen dem äußeren und mittleren Drittel der Unterliedkante in den Fornix eingelegt, der Reststreifen wurde nach außen abgeleitet.

Dieser Test wurde einmal ohne (Schirmer I) und einmal nach vorheriger Anästhesierung mittels unkonserviertem Oxybuprocain (1ml Lösung enthält 4,0 mg Oxybuprocainhydrochlorid) (Dr. Gerhard Mann GmbH, Berlin, Deutschland) (Schirmer II) durchgeführt. Letzterer dient zur Messung der Basissekretion, da der durch den eingelegten

Streifen entstehende Reizeffekt und die damit einhergehende überschießende Tränensekretion hierdurch ausgeschaltet wird. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tabelle 39 im Anhang aufgeführt.

Als Ausschlusskriterien in beiden Gruppen galten Schwangerschaft und Stillzeit, das Tragen von Kontaktlinsen, Augenerkrankungen (mit Ausnahme der Cataract) einschließlich Hornhaut- und Bindehautepitheliopathien, die Anwendung von Augentropfen innerhalb der letzten 2 Monaten, sowie das Vorhandensein anderer systemischer Erkrankungen.

2.1.2 Bestimmung der Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis

Zur Erfassung der aktuellen Krankheitsaktivität wurden bei allen Patienten die Laborparameter CRP und BSG bestimmt sowie der aktuelle Disease Activity Score (DAS) 28 ermittelt. Dieser schließt an objektiven Merkmalen die Anzahl der geschwollenen Gelenke und die BSG sowie als subjektive Merkmale die Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke und das Patientenurteil zur Krankheitsaktivität mit ein. Letztere wird von den Betroffenen auf einer Skala von 0 bis 100 im Hinblick auf die letzten 7 Tage angegeben.

Die Berechnung des DAS 28-Scores erfolgt nach folgender Formel:

$$0,56 * \sqrt{\text{Anz-dG}} + 0,28 * \sqrt{\text{Anz-gG}} + 0,70 * \ln(\text{BSG}) + 0,014 * \text{Pat-Urt.} = \text{DAS 28}$$

Anz-dG: Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke

Anz-gG: Anzahl der geschwollenen Gelenke

Pat-Urt: Patienten-Urteil

2.2 Probengewinnung

2.2.1 Plasma

Das Blut wurde den Probanden nach vorheriger Desinfektion aus der Ellenbeugenvene in ein Blutröhrchen (enthält 20 I.E. Lithium-Heparin/ml Blut) entnommen. Bis zur weiteren Aufarbeitung des Blutes, die innerhalb von 1-30 Minuten nach Entnahme erfolgte, wurden die Röhrchen auf Eis gelagert und anschließend mit 10200 g für 10 min

zentrifugiert (Hettich–Zentrifuge, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde mithilfe einer 1000 µl Pipette (Eppendorf Research) abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorfhütchen abgefüllt. Bis zur endgültigen Verarbeitung wurden die Plasmaproben bei -70°C eingefroren.

2.2.2 Tränen ohne und mit Stimulation

Zur Gewinnung des Tränensekrets wurden beide Augen der Probanden mit 2 x einem Tropfen Oxybuprocain im Abstand von 5 min anästhesiert. Fünf Minuten nach der letzten Tropfenapplikation erfolgte die Entnahme des Tränensekrets mithilfe eines im Durchmesser 4 mm großen Schwämmchen (Katena products, inc., Denville, USA), das vorsichtig mit einer Pinzette im unteren Fornix der Bindehaut plaziert und dort für weitere 5 min belassen wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Schwämmchen mithilfe einer Pinzette entfernt und in ein 0,5 ml Eppendorfhütchen gelegt, daß unten mit einer 20-G-Kanüle perforiert worden war. Dieses 0,5 ml Eppendorfhütchen wurde auf ein weiteres 1,5 ml Eppendorfhütchen gesteckt und für 3 Minuten mit 2000 g zentrifugiert (Mikrozentrifuge, neoLab, Deutschland). Das im äußeren Eppendorfhütchen aufgefangene Tränensekret wurde sofort nach der Zentrifugation mithilfe einer 100 µl Pipette (Eppendorf Research) quantifiziert, in einem Verhältnis von 1:4 mit Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS) verdünnt, auf Eis gelagert und innerhalb von 1-30 Minuten bei -70°C eingefroren.

Um stimuliertes Tränensekret zu erhalten, wurde nach vorangegangener Lokalanästhesie beider Augen ein Wattestäbchen (Länge 15 cm; Kopfdurchmesser 2mm) in den oberen Bereich der medialen Nasenscheidewand eingeführt. Die folgende Entnahme und Aufbereitung des Tränensekrets erfolgte wie geschildert (Tab. 10 und 40 im Anhang).

Tab. 10: Tränenvolumina (µl) (gemittelte Daten aus beiden Augen) vor und nach nasaler Stimulation

	Patienten (rechtes + linkes Auge)		Kontrollen (rechtes + linkes Auge)	
	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
MW	17,1	17,9	18,7	21,4
STABW	7,1	10,7	9,1	9,9

MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung

2.3 Biochemische Analyseverfahren

2.3.1 Bestimmung des Gesamtproteins

2.3.1.1 Bradford Assay zur Bestimmung des Gesamtproteins im Plasma

Das in den Proben enthaltene Gesamtprotein wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay® nach der Methode von Bradford bestimmt. Das Prinzip dieser Farbbindungsmethode beruht auf einer Farbänderung der Lösung in Abhängigkeit von vorhandenem Protein (97). Grundlage des Farbkonzentrats ist Coomassie Brilliant Blau G-250, dessen rote Farbe bei der Bindung an Protein nach blau umschlägt (98). Es enthält Phosphorsäure und Methanol und wird vor der Bestimmung des Gesamtproteins in einem Verhältnis von 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend filtriert (595 1/2 Folded Filters, Ø 185 mm, Schleicher & Schuell GmbH). Für eine Standardkurve wurde Albuminstandard aus Rinderserum der Konzentration 1,38 mg/ml erstellt, der in einer verdoppelnden Verdünnung bis zu einer Konzentration von 0,23 mg/ml mit aqua dest. verdünnt wurde, so dass mit ihm die Grenzen der Proteinkonzentration im Plasma erfasst wurden. Die Plasmaproben wurden mit PBS (PBS Dulbecco's, Invitrogen Corporation GIBCO™) in einem Verhältnis 1:100 verdünnt und anschließend für 2 Sekunden auf einem Vortex gemischt (Heidolph REAX 2000).

10 µl dieser Lösung, sowie des Standards wurden mit 490 µl des Farbstoffkonzentrats gemischt und im 1,5 ml Eppendorfhütchen geschwenkt. 200 µl jedes Ansatzes wurden in ein Loch einer 96-Microtiter-Platte (Sarstedt, Inc., Newton, USA) pipettiert und diese bei einer Wellenlänge von 595 nm mithilfe des BIO-RAD Microplate Reader Model 3550 gelesen. Als Blindwert wurden 10 µl aqua dest. mit 490 µl Farbstoffkonzentrat angesetzt, die Negativkontrolle bestand aus 10 µl PBS und 490 µl des Farbstoffkonzentrats. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden anhand der Standardkurve in die jeweilige Konzentration umgerechnet.

2.3.1.2 Bradford Assay zur Bestimmung des Gesamtproteins in der Tränenflüssigkeit

Dieser Assay basiert auf dem gleichen Prinzip wie unter 2.3.1.1 beschrieben. Da in der Tränenflüssigkeit eine geringere Proteinkonzentration vorliegt, wurde hier eine Standardkurve mit einer geringeren Konzentrationsspannweite hergestellt. Hierfür wurde die Ausgangslösung des Albuminstandards (1,38 mg/ml) in einem Bereich von 19,7 µg/ml

bis zu einer Konzentration von 0,7 µg/ml mit aqua dest. verdünnt. Die Tränenflüssigkeit wurde im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt und im Anschluß für 2 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. 400 µl des Standards und der so angesetzten Proben wurden mit 100 µl Farbkonzentrat gemischt und in 1,5 ml Eppendorfhütchen geschwenkt. Der Blindwert wurde entsprechend mit 400 µl aqua dest., die Negativkontrolle mit 100 µl PBS und 100 µl Farbkonzentrat angesetzt. 200 µl jedes Ansatzes wurden in das entsprechenden Loch auf der 96-Microtiter-Platte pipettiert und diese bei 595 nm gelesen. Die Standardproben wurden als Doppelmessungen, die Tränenflüssigkeit aufgrund des geringen Probenvolumen jeweils als Einfachbestimmung durchgeführt.

2.3.2 Quantifizierung der Matrixmetalloproteinasen, des Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 und TNFα mittels eines Enzymgekoppelten Immunosorbent-Assays (ELISA = Enzym-linked-immunosorbent-assay)

In allen folgenden Versuchen wurde die Standardkurve als Doppelmessung, die Patienten- und Kontrollproben als Einfachbestimmung durchgeführt. Aufgrund einer Pilotstudie zur Quantifizierung von MMPs und TIMPs aus den Tränen, wurden die Proben entsprechend mit H₂O dest. für die Analyse verdünnt (Tab. 11).

Tab. 11 : Verdünnungen der Probenansätze für die verschiedenen ELISA

Enzym	Plasma	Tränen	
		unstimuliert	stimuliert
MMP-1-aktiv	1:5	1:1 – 1:4	1:1 – 1:20
proMMP-2	1:30	1:10	--
MMP-2-aktiv	1:10	1:5	--
MMP-3	1:10	1:5	1:5
proMMP-9	1:10	1:50	--
MMP-9-aktiv	1:10	1:10	--
TIMP-1	1:10	1:20	1:20
TNFα	1:5	1:20	1:20

-- = nicht bestimmt

Die Untersuchungen wurden mit qualitätskontrollierten, handelsüblichen Test-Kits gemäß den Vorgaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)

durchgeführt und die Extinktion mithilfe des BIO-RAD Microplate Reader Model 3550 ausgewertet.

2.3.2.1 Bestimmung der Konzentration von proMMP-2, MMP-3, proMMP-9, TIMP-1 und TNF α

Die Quantifizierung der MMPs, TIMP-1 und TNF α erfolgte mithilfe eines „sandwich“-ELISAs der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Hierbei werden 2 monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen zwei unterschiedliche Epitope eines Antigens gerichtet sind. Der erste Antikörper ist am Boden einer 96-Loch-Festplatte gebunden und dient der Immobilisierung des Antigens (MMP, TIMP-1, TNF α) aus der eingesetzten Probe. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit und dem Waschen der Platte mit Puffer wird mit einem zweiten Antikörper, der gegen ein zweites Epitop des Antigens gerichtet und mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist, inkubiert. Nach erneutem Waschen folgt die Zugabe des Peroxidase-Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Nach einer weiteren Inkubation wird die Reaktion mithilfe 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Bildung des blau-gelben Produktes innerhalb von 30 min photometrisch bei 450 nm gemessen. Der ELISA wird mit dem entsprechendem Referenzprotein (MMP/TNF α , vom Hersteller mitgeliefert) kalibriert.

Zur Bestimmung von TNF α wird der sekundäre Antikörper mit Biotin markiert. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit und dem Waschen der Platte wird ein so genanntes Amdex-Reagenz hinzugefügt, das eine Dextran-immobilisierte Meerrettich-Peroxidase darstellt, die mithilfe integrierter Streptavidinmoleküle mit hoher Affinität an die Biotinreste des zweiten Antikörpers bindet ($K_D = 10^{-16}$). Der weitere Vorgang entspricht dem oben beschriebenen. Den genauen Ablauf der einzelnen Schritte zeigen die Tabellen 13 und 14 sowie Abbildung 3. Aus Tabelle 12 lassen sich die einzelnen Erfassungsspektren der ELISAs entnehmen.

Tab. 12: Spektrum der im ELISA erfassten Formen von proMMP-2, MMP-3, proMMP-9, TIMP-1 und TNF α

Enzym	Spektrum
proMMP-2	freies proMMP-2, Komplex proMMP-2/TIMP-2
MMP-3	freies proMMP-3, aktives MMP-3, MMP-3/TIMP-1-Komplex, MMP-3/TIMP-2-Komplex
proMMP-9	freies proMMP-9, proMMP-9/TIMP-1-Komplex
TIMP-1	freies TIMP-1, TIMP-1/MMP-1-, -3-, -2-, -9-, -pro9- Komplex
TNF α	Natürliches und rekombinantes TNF α

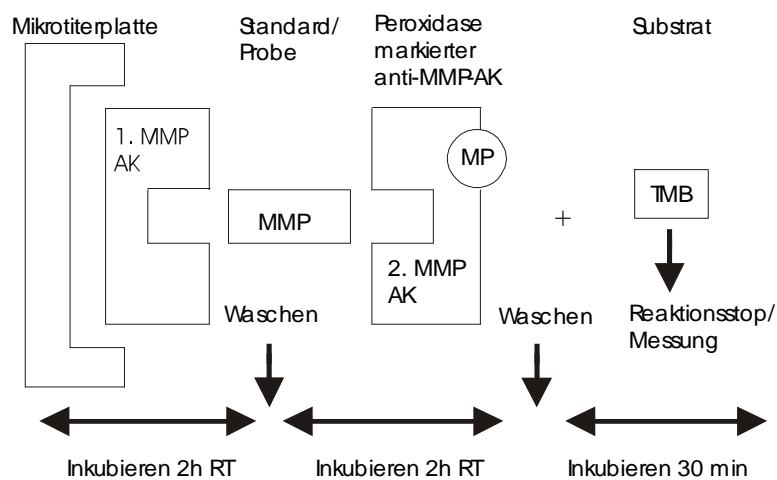


Abb. 3: ELISA-Schema (proMMP-2, MMP-3, proMMP-9, TIMP-1).

Bei dem Sandwich-ELISA wird das Antigen aus der Probe mithilfe eines an der Mikrotiterplatte fixierten Antikörpers gebunden. Es folgen die Zugabe eines zweiten, mit einer Peroxidase markierten Antikörpers, der gegen eine zweites Epitop des gesuchten Antigens gerichtet ist und die Zugabe des Peroxidase-Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB. Anschließend wird das Produkt der Reaktion photometrisch gemessen. Der ELISA wird mit einem entsprechenden Referenzprotein (MMP) kalibriert.

Tab. 13: ELISA-Schema für die Bestimmung der Konzentration von proMMP-2, MMP-3, proMMP-9 und TIMP-1

	proMMP-2	MMP-3	proMMP-9	TIMP-1
1. AK	anti-MMP-2-AK	anti-MMP-3-AK	anti-MMP-9-AK	anti-TIMP-1-AK
Probenmenge	100µl			
1. Inkubation	2h/RT	1h/2-8°C	1h/RT	2h/RT
1. Waschen	Puffer A (4x)	Puffer A (4x)	Puffer E (4x)	Puffer A (4x)
2. AK + Enzym	HRP-anti-MMP-2-AK in Puffer B	HRP-anti-MMP-3-AK in Puffer D	HRP-anti-MMP-9-AK in Puffer F	HRP-anti TIMP-1-AK in Puffer G
2. Inkubation	1h/RT	2h/2-8°C	2h/RT	2h/RT
2. Waschen	Puffer A (4x)	Puffer A (4x)	Puffer E (4x)	Puffer A (4x)
Substrat	100µl TMB in 20% DMF			
3. Inkubation	30 min/RT	30 min/RT	20 min/RT	30 min/RT
Standard (100µl)	1,5-24ng MMP-2/ml in Puffer C	3,75-120ng MMP-3/ml in Puffer D	1-32ng proMMP-9/ml in Puffer F	3,13-50ng TIMP-1/ml in Puffer G
Blindwert (100µl)	Puffer D	Puffer D	Puffer F	Puffer G

AK = Antikörper; RT = Raumtemperatur; DMF = Dimethylformamid

Puffer A: 0,01M Phosphatpuffer, pH 7,5, 0,05% TweenTM20

Puffer B: 0,03M Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,1M NaCl, 0,3% Rinderserumalbumin, 0,01M EDTA

Puffer C: 0,03M Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,1M NaCl, 2% Rinderserumalbumin, 0,01M EDTA

Puffer D: 0,03M Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,1M NaCl, 1% Rinderserumalbumin, 0,01M EDTA

Puffer E: 0,01M Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,05% TweenTM20

Puffer F: 0,01M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 1% Rinderserumalbumin, 10mM EDTA, 100mM NaCl

Puffer G: 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,1% Rinderserumalbumin, 0,1% TweenTM20

Tab. 14: ELISA-Schema für die Bestimmung von TNF α

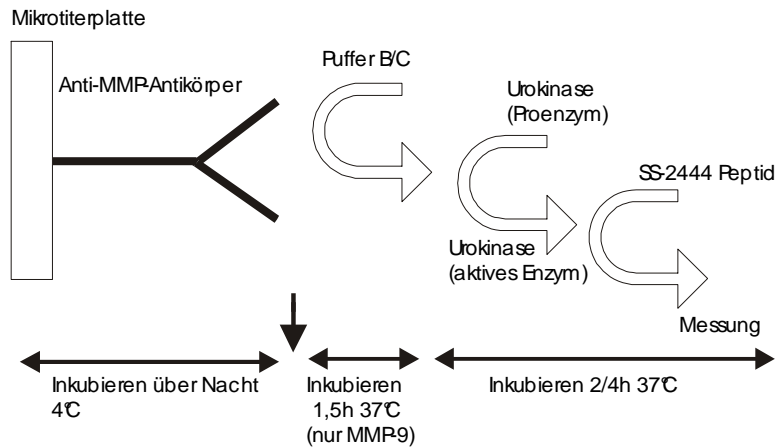
	TNFα
1. AK	Anti-TNF α -AK
Probenmenge	100 μ l
1. Inkubation	1h/RT (auf Schüttler)
1. Waschen	Waschpufferkonzentrat in aqua dest. (4x)
2. AK	Anti-TNF α -AK an Biotin gebunden
2. Inkubation	1h/RT (auf Schüttler)
2. Waschen	Waschpufferkonzentrat in aqua dest. (4x)
Amdex/Peroxidase	100 μ l
3. Inkubation	30min/RT (auf Schüttler)
3. Waschvorgang	Waschpufferkonzentrat in aqua dest. (4x)
Substrat	100 μ l TMB in Methanol
4. Inkubation	1h/RT (auf Schüttler)
Standard (100μl)	0,31-10 pg TNF α /ml in Standardverdünnungsmittel
Blindwert (100μl)	Standardverdünnungsmittel

AK = Antikörper; RT = Raumtemperatur

2.3.2.2 Bestimmung der Konzentration der aktiven MMP-1-, MMP-2- und MMP-9

Die Bestimmung der Konzentration der aktiven MMP-1-, -2- und -9 erfolgte mit einem „sandwich“-ELISA der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Der ELISA wird mit dem entsprechenden Referenz-MMP (vom Hersteller mitgeliefert) kalibriert. Dieses wird als Proform geliefert und im ELISA durch die Zugabe von Paraaminophenylquecksilberacetat (AMPA) aktiviert. Sowohl die Proform als auch die aktive Form des MMPs in der eingesetzten Probe werden mithilfe eines an die Festplatte fixierten spezifischen Antikörpers gebunden. Nach einer nächtlichen Inkubation werden die Standardproben durch Zugabe von APMA aktiviert. Dieser Schritt wird bei den Proben der Patienten und Kontrollen weggelassen, so dass durch den ELISA in den Proben nur die aktive Form von MMP-1, -2 und -9 erfasst wird. Nach der vorgegebenen Inkubationszeit sowie dem Waschen der Platte folgt die Zugabe einer modifizierten Pro-Urokinase mit ihrem Substrat (S-2444-Peptid). Diese Urokinase wird durch das aktive MMP der Probe aktiviert. Nach Bestimmung der Extinktion zum Zeitpunkt T_0 und einer weiteren Inkubation wird die Umsetzung des Substrates durch die aktivierte Urokinase bei 405 nm gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte entsprechen der Urokinase-Aktivität und reflektieren die

Aktivität der MMPs in der Probe (Tab. 15 und Abb. 4). Die Extinktionswerte der ELISAs wurden umgerechnet in ng MMP/ml Probe. Für MMP-3 lag zum Zeitpunkt der Messungen noch kein Aktivitätsassay vor, so dass in diesem Fall auf die Bestimmung der Enzymaktivität verzichtet werden musste.



Pept = Peptid; Bei den Standardproben erhält der Puffer APMA zur Aktivierung des MMPs

Abb. 4: ELISA-Schema (MMP-1-aktiv, MMP-2-aktiv und MMP-9-aktiv).

Bei dem Sandwich-ELISA wird das Antigen aus der Probe mithilfe eines an der Mikrotiterplatte fixierten Antikörpers gebunden. Es folgt die Zugabe einer modifizierten Pro-Urokinase mit ihrem Substrat (S-2444-Peptid). Die Prourokinase wird durch das aktive MMP der Probe aktiviert. Die Umsetzung des Substrates durch die aktivierte Urokinase wird photometrisch gemessen und die erhaltenen Extinktionswerte sind proportional zur Aktivität der gesuchten MMPs. Anschließend erfolgt die Umrechnung der Extinktionswerte in ng MMP/ml Probe.

Tab. 15: ELISA-Schema für die Bestimmung der Konzentration von MMP-1-aktiv, MMP-2-aktiv und MMP-9-aktiv

	MMP-1-Aktivität	MMP-2-Aktivität	MMP-9-Aktivität
1. AK	anti-MMP-1-AK	anti-MMP-2-AK	anti-MMP-9-AK
Probenmenge	_____ 100µl _____		
1. Inkubation	_____ über Nacht/2-8°C _____		
Waschen	_____ Puffer A (4x) _____		
Zugabe Puffer	50µl Puffer B	50µl Puffer C	50µl Puffer B
2. Inkubation	nicht erforderlich	nicht erforderlich	1,5h/37°C
Reagenz			
a) Proenzym	50µl modifizierte Urokinase in Puffer B	50µl modifizierte Urokinase in Puffer B	50µl modifizierte Urokinase in Puffer B
b) Substrat	S-2444 Peptid in Puffer B	S-2444 Peptid in Puffer B	S-2444 Peptid in Puffer B
1. Messung	_____ bei 405 nm /RT _____		
3. Inkubation	4h/37°C	4h/37°C	2h/37°C
2. Messung	_____ bei 405 nm /RT _____		
Standard (100µl)	0,1-1,56ng proMMP-1/ml in Puffer B	0,19-3ng proMMP-2/ml in Puffer C	0,125-4ng proMMP-9/ml in Puffer B
Blindwert (100µl)	Puffer B	Puffer C	Puffer B

AK = Antikörper; RT = Raumtemperatur

Puffer A: 0,01M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 0,05% TweenTM20

Puffer B: 50mM Tris-HCl Puffer, pH 7,6, 1,5mM NaCl, 0,5mM Kalziumchlorid, 1µM Zinkchlorid, 0,01% BRIJTM35

Puffer C: 50mM Tris-HCl Puffer, pH 7,6, 1,5mM NaCl, 0,5mM Kalziumchlorid, 1µM Zinkchlorid, 0,01% BRIJTM35, 0,01% Gelatine

Immunhistochemie

In 7 Hornhautexzidaten von Patienten, die aufgrund eines therapieresistenten rheumatischen Ulkus eine Keratoplastik erhalten haben, 3 normalen Spenderhornhäuten und in 1 gesunden Tränendrüsenteilresektat wurden MMP-1-aktiv, proMMP-2, MMP-3, proMMP-9 und TIMP-1 immunhistochemisch lokalisiert. Die normalen Spenderhornhäute stammten von Patienten mit einem malignen Melanom der Choroidia ohne Beteiligung des vorderen Augenabschnittes sowie von einem Patienten mit Verdacht auf Creutzfeld-Jacobson'sche-Erkrankung, die aus diesen Gründen nicht für eine Transplantation in Betracht kamen.

Nach der Exzision wurden die Gewebeproben halbiert und eine Hälfte sofort für mindestens 90 Minuten in 4% Paraformaldehyd (BDH/Merck Poole, Dorset, UK) in PBS (Oxoid, Basingstoke, UK) fixiert und für 5 Minuten in 20% Saccharose (BDH) in TBS (Sigma) getränkt. Um den Nachweis von MMPs und TIMP-1 in diesen Präparaten zu erleichtern, wurde die andere Hälfte des Gewebes für 6 Stunden bei 37°C in 5 µmol/ml Monensin in PBS inkubiert. Monensin ist eine Ionophore, die die Sekretion von intrazellulären Proteinen über eine Blockade des Golgi-Apparates hemmt und so zu ihrer intrazellulären Anreicherung führt (99). Nach dieser Inkubation wurde das Gewebe mit PBS abgespült und wie oben beschrieben ebenfalls mit 4% Paraformaldehyd fixiert und in Saccharose getränkt. Alle Präparate wurden dann in OCT (BDH) eingebettet und umgehend bei -70°C eingefroren. Aus diesen Präparaten wurden Kryostatschnitte von 7 µm Dicke auf mit Poly-L-Lysin (0,01% w/v, Sigma) oder 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES; Sigma) beschichteten Objektträger erstellt. Nach erneuter Fixierung der Schnitte für 5 Minuten in Paraformaldehyd sowie Beschichtung mit 20% Saccharose und 30-minütiger Lufttrocknung wurden die Präparate bis zur endgültigen Verwendung bei -70°C gelagert.

Die Färbung mit der Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode wurde wie zuvor bei Limb et al (1996) (100) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeschnitte mit einem Tris NaCl Puffer (0,05M Tris in 0,15 M NaCl:TBS, pH 7,4) gewaschen und mit 0,5% Blockierungsreagenz (Boeringer Mannheim, Deutschland) in TBS blockiert. Es folgte eine 3-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem ersten monoklonalen Mausantikörper, der gegen die verschiedenen MMPs bzw. TIMP-1 (Calbiochem, Cambridge, USA) oder gegen IgG (Dako, Glostrup, Dänemark) als Kontrolle gerichtet war. Diese Antikörper erkennen nach Herstellerangaben die in Tabelle 17 aufgeführten Proteine.

Tab. 16: Antikörper-Spektrum

MMP-1	gesamt-MMP-1
MMP-2	proMMP-2
MMP-3	gesamt-MMP-3
MMP-9	proMMP-9
TIMP-1	gesamt-TIMP-1

Nach Waschen der Schnitte mit TBS wurden diese für 45 Minuten zunächst mit einem Biotin-markierten-Kaninchen-Antimaus-Brückenantikörper (1/300 in

Blockierungsreagenz), dann nach einem weiteren Waschschrift mit einem monoklonalen Streptavidin/Avidin-konjugierten APAAP-Mausantikörper über 45 Minuten inkubiert. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem Chromogen Vector Rot (Vector laboratories, Burlingham, CA, USA) inkubiert und mit Mayer´s Haematoxylin (Shandon Astmoor, Cheshire, UK) gegengefärbt. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Xylen eingedeckt.

Eine positive immunhistochemische Reaktion zeigte sich in einer Rotfärbung von Zellen oder extrazellulärer Matrix. Diese wurden von zwei unabhängigen Untersuchern nach der Intensität und Verteilung der roten Präzipitate in 5 Kategorien beurteilt (Tab. 18).

Tab. 17: Kategorien der immunhistochemischen Anfärbung

Kategorie	Zeichen
Keine Anfärbung	-
Sehr schwache Anfärbung	(+)
Geringe Anfärbung	+
Mäßige Anfärbung	++
Starke Anfärbung	+++

2.5 Statistische Analyse

Als Software für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS 11.5 angewandt. Daten verschiedener Parameter innerhalb einer Gruppe wurden mithilfe des **Wilcoxon-Tests** für unverbundene Stichproben auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Bei der Untersuchung von Korrelationen der einzelnen Parameter innerhalb einer Gruppe wurde mit dem **Spearman-Rho-Test** gearbeitet. Bei einem Vergleich von Daten unterschiedlicher Gruppen wurde der **Mann-Whitney-U-Test** angewandt. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Konzentrationen der MMPs und TIMP-1

Im folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen MMPs, TIMP-1 und TNF α hinsichtlich beobachteter signifikanter

1. Konzentrationsunterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen,
2. Konzentrationsunterschiede zwischen Plasma und unstimulierten Tränen,
3. Konzentrationsunterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen sowie
4. Korrelationen zwischen den Konzentrationen in Plasma, unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit aufgeführt.

Weder die RA-Patienten noch die gesunden Kontrollen wiesen zum Zeitpunkt der Blut- bzw.- Tränenabnahme Zeichen einer Hornhaut- und/oder Bindehautepitheliopathie auf.

3.1.1 MMP-1-aktiv (Kollagenase-1)

Tabelle 18 führt die gemessenen Konzentrationen der aktiven MMP-1 in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 18: Konzentration der aktiven MMP-1 (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten			Kontrollen		
	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
Median	Ø	0	0,567	Ø	0 [♦]	0,7 [♦]
Range	Ø	0-5	0-14,9	Ø	0-3,7	0-29,8
N =	18	14	32	18	14	37
N <NG	18	10	15	18	12	15

[♦] = Konzentrationsunterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen (p<0,05)

Ø = unterhalb der NG des ELISA-Kits; NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Die Plasmakonzentration der aktiven MMP-1 lag in beiden Kohorten unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. In den unstimulierten Tränen der Kontrollen lagen nur 2, bei den Patienten 4 Proben oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Aufgrund dieser geringen Anzahl an Proben oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze wurden keine

Korrelationsanalysen mit der aktiven MMP-1 in der unstimulierten Tränenflüssigkeit durchgeführt.

Für die Konzentration der aktiven MMP-1 ließen sich weder in der unstimulierten noch in der stimulierten Tränenflüssigkeit signifikante Unterschiede zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen nachweisen.

Nur das Kontrollkollektiv zeigte eine signifikante Zunahme der Konzentration der aktiven MMP-1 nach Stimulation der Sekretionsrate in der Tränenflüssigkeit ($p=0,05$) (Abb. 5 und Tab. 43 im Anhang).

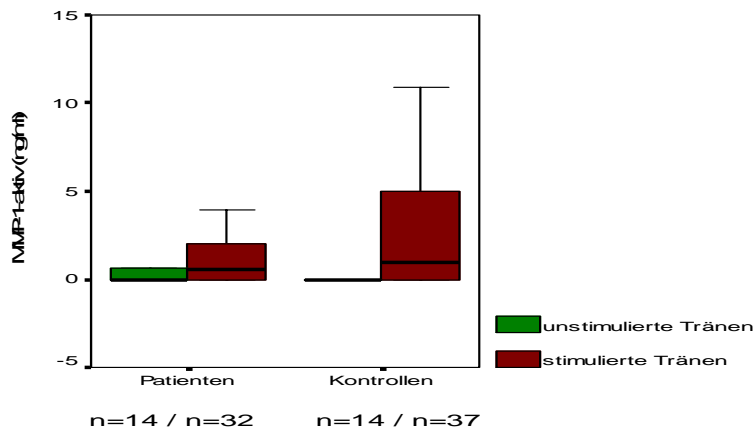


Abb. 5: Konzentration der aktiven MMP-1 (ng/ml) in unstimulierten und stimulierten Tränen.

Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).

3.1.2 proMMP-2 (Progelatinase A)

Tabelle 19 führt die gemessenen proMMP-2-Konzentrationen in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 19: proMMP-2-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten		Kontrollen	
	Plasma	ust. Tränen	Plasma	ust. Tränen
Median	1084 ⁺	184 ⁺	1097 ⁺	110 ⁺
Range	765-1776	3,6-651	703-1421	0-574
N =	40	36	40	35
N < NG	0	0	0	1

⁺ = Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und unstimulierten Tränen (p<0,05)

NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert

Die proMMP-2-Konzentrationen wurden aufgrund zu geringer Probenvolumina nur im Plasma und unstimulierten Tränen bestimmt. Auch für die proMMP-2-Konzentration ließ sich in keiner der Probenarten ein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Konzentrationen bei RA-Patienten und gesunden Kontrollen feststellen. Beide Kohorten zeigten eine im Vergleich zur Konzentration in den unstimulierten Tränen signifikant höhere proMMP-2-Konzentration im Plasma (jeweils p=0,000) (Abb. 6 und Tab. 42 im Anhang).

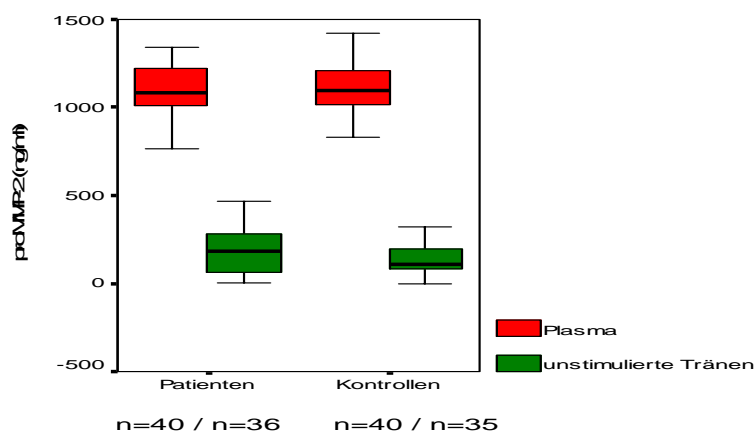


Abb. 6: proMMP-2-Konzentration (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen.

Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).

3.1.3 MMP-2-aktiv (Gelatinase A)

Tabelle 20 führt die gemessenen Konzentrationen der aktiven MMP-2 in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 20: Konzentration der aktiven MMP-2 (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten		Kontrollen	
	Plasma	ust. Tränen	Plasma	ust. Tränen
Median	19,6 ⁺	2 ⁺	16,5 ⁺	1,2 ⁺
Range	5,6-58,9	0-22,6	0-57,8	0-17,7
N =	36	33	35	35
N < NG	0	14	2	15

⁺ = Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und unstimulierten Tränen (p<0,05)

NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert

Die aktive MMP-2 wurde aufgrund zu geringer Probenvolumina ausschließlich im Plasma und in der unstimulierten Tränenflüssigkeit bestimmt. Dabei zeigte sich weder für die Plasma- noch für die Tränenkonzentration der aktiven MMP-2-Aktivität ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. In beiden Kohorten lag die gemessene Plasmakonzentration signifikant über der Konzentration in den unstimulierten Tränen (jeweils p=0,000) (Abb. 7 und Tab. 42 im Anhang).

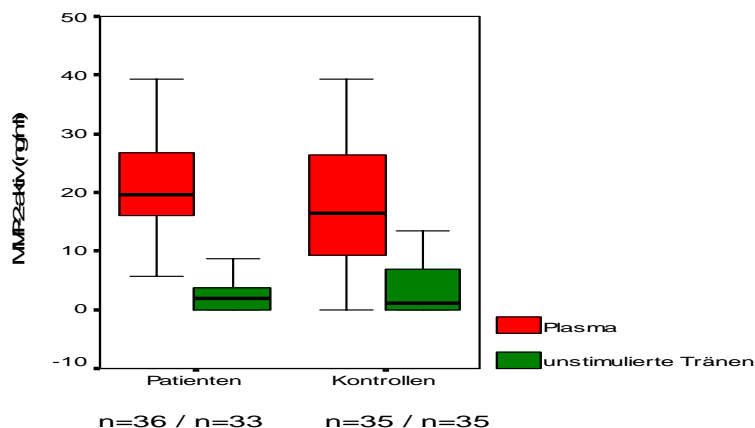
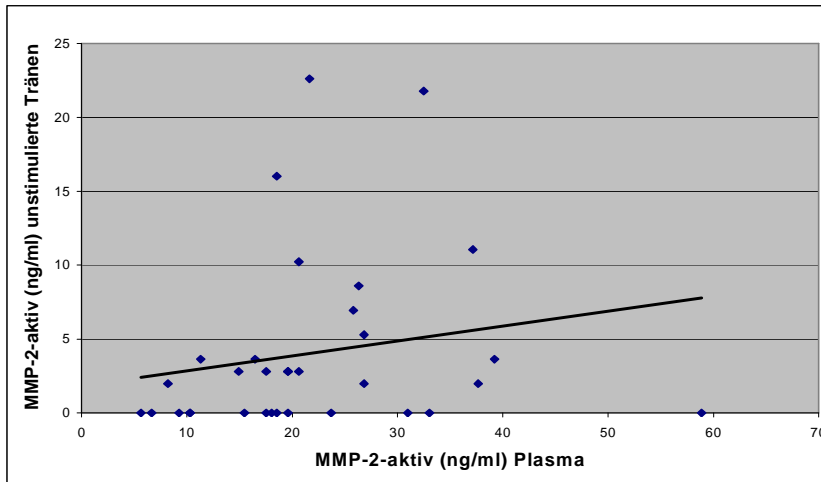


Abb. 7: Konzentration der aktiven MMP-2 (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen.

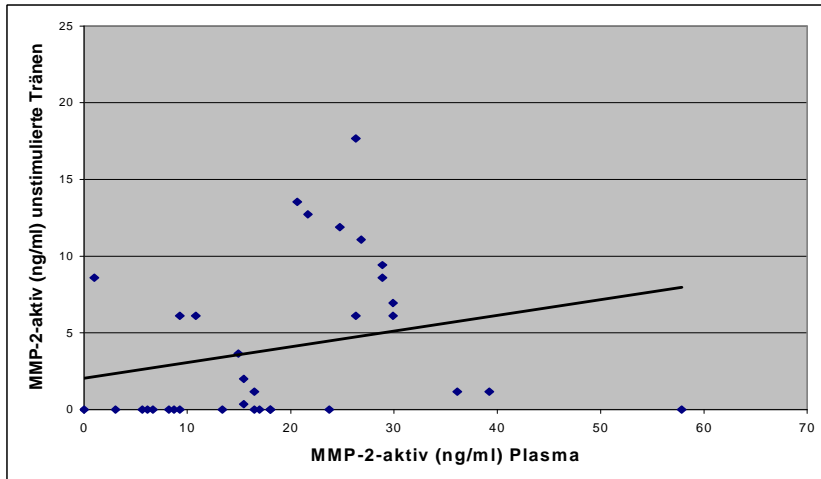
Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).

Zusätzlich fand sich sowohl bei Patienten ($p=0,028$; $r=0,337$) als auch bei Kontrollen ($p=0,004$; $r=0,452$) eine positive Korrelation zwischen der Konzentration der aktiven MMP-2 in Plasma und unstimulierter Tränenflüssigkeit (Abb. 8 und 9) (Tab. 44 im Anhang).



ust. = unstimuliert

Abb. 8: Korrelation der aktiven MMP-2 im Plasma mit der aktiven MMP-2 in den unstimulierten Tränen bei den Patienten.



ust. = unstimuliert

Abb. 9: Korrelation der aktiven MMP-2 im Plasma mit der aktiven MMP-2 in den unstimulierten Tränen bei den Kontrollen.

3.1.4 MMP-3 (Stromelysin)

Tabelle 21 führt die gemessenen MMP-3-Konzentrationen in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 21: MMP-3-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten			Kontrollen		
	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
Median	78,3* ⁺	12,3 ⁺ ♦	0♦	24,4*	8,7♦	0♦
Range	0,85-327,8	0-187,2	0-42	0-86,3	0-109	0-59
N =	40	39	37	40	39	39
N < NG	1	15	31	7	14	34

* = Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen (p<0,05)

⁺ = Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und unstimulierten Tränen (p<0,05)

♦ = Konzentrationsunterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen (p<0,05)

NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Die MMP-3-Konzentration in der stimulierten Tränenflüssigkeit lag bei den Patienten nur in 6, bei den Kontrollen in 5 Proben oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Daher wurden keine Korrelationsanalysen mit diesen Werten durchgeführt.

Die MMP-3-Plasmakonzentration lag bei den RA-Patienten signifikant über der bei den gesunden Kontrollen (p=0,000) (Tab. 41 im Anhang). Bei den Patienten lag die MMP-3-Plasmakonzentration signifikant über der entsprechenden Konzentration in den unstimulierten Tränen (p=0,000) (Tab. 42 im Anhang). Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen lag die MMP-3-Konzentration in den unstimulierten Tränen signifikant über der entsprechenden Konzentration in den stimulierten Tränen (jeweils p=0,000) (Abb. 10 und Tab. 43 im Anhang).

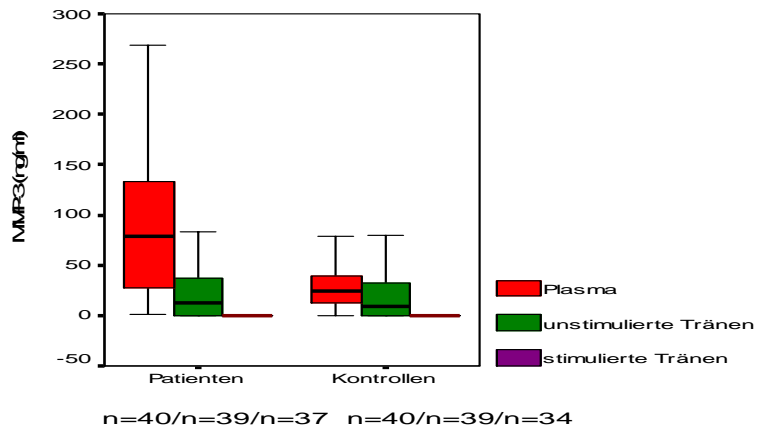


Abb. 10: MMP-3-Konzentration (ng/ml) in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen.

Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).

Wie weiter oben bereits erwähnt wurde, ist MMP-3 an der extrazellulären Proteolyse der als Proenzyme sezernierten MMPs beteiligt und trägt auf diese Weise zu ihrer Aktivierung bei. Positive Korrelationen ergaben sich dabei für die Patienten zwischen der MMP-3-Plasmakonzentration und der proMMP-2- ($p=0,002$; $r=0,436$) bzw. MMP-9-aktiv-Konzentration im Plasma ($p=0,010$; $r=0,367$). Bei den Kontrollen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der MMP-3-Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-9 in den unstimulierten Tränen ($p=0,009$; $r=0,387$) (Tab. 46 und 47 im Anhang).

3.1.5 proMMP-9 (Progelatinase B)

Tabelle 22 führt die gemessenen proMMP-9-Konzentrationen in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 22: proMMP-9-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten		Kontrollen	
	Plasma	ust. Tränen	Plasma	ust. Tränen
Median	0*	0	0*	0
Range	0-800,8	0-1921,8	0-1400	0-326
N =	39	39	38	38
N < NG	23	30	29	25

* = Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen ($p < 0,05$)

NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert

Auch die proMMP-9-Konzentrationen wurden aufgrund zu geringer Probenvolumina nur im Plasma und unstimulierten Tränenflüssigkeit bestimmt. Die proMMP-9-Plasmakonzentration lag bei den Patienten mit RA signifikant über der entsprechenden Konzentration bei den gesunden Kontrollen ($p = 0,036$) (Abb. 11 und Tab. 41 im Anhang).

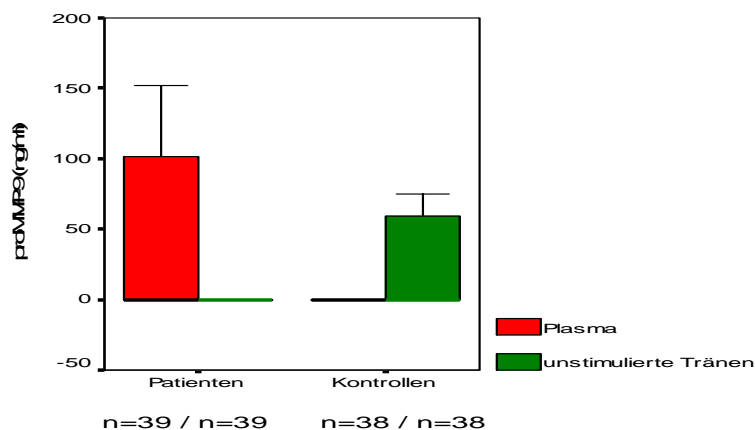


Abb. 11: proMMP-9-Konzentration (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen.

Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21)..

3.1.6 MMP-9-aktiv (Gelatinase B)

Tabelle 23 führt die gemessenen Konzentrationen der aktiven MMP-9 in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 23: Konzentration der aktiven MMP-9 (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten		Kontrollen	
	Plasma	ust. Tränen	Plasma	ust. Tränen
Median	12,8 ⁺	0 ⁺	14,9 ⁺	0 ⁺
Range	0-43,1	0-55,9	0-315	0-53,4
N =	40	37	38	37
N < NG	7	28	1	22

⁺ = Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und unstimulierten Tränen (p<0,05)

NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert

Die Konzentrationen der aktiven MMP-9 wurden aufgrund zu geringer Probenvolumina nur in Plasma und unstimulierten Tränen bestimmt. Für die aktive Form der MMP-9 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten und gesunden Kontrollen. Sowohl Patienten (p=0,001) als auch Kontrollen (p=0,000) zeigten eine signifikant höhere Konzentration dieser Protease im Plasma als in der unstimulierten Tränenflüssigkeit (Abb. 12 und Tab. 42 im Anhang). Dabei ließ sich bei den gesunden Kontrollen zusätzlich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Konzentration der aktiven MMP-9 im Plasma und in der unstimulierten Tränenflüssigkeit feststellen (p=0,000; r=0,747) (Tab. 44 im Anhang).

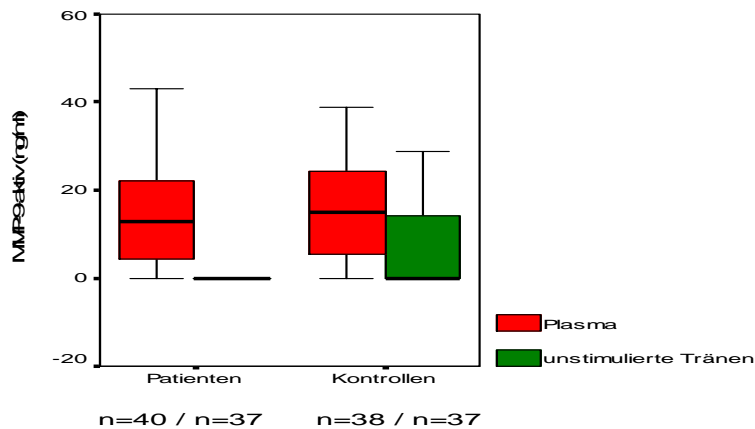


Abb. 12: Konzentration der aktiven MMP-9 (ng/ml) in Plasma und unstimulierten Tränen.
Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).

3.1.7 TIMP-1

Tabelle 24 führt die gemessenen TIMP-1-Konzentrationen in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 24: TIMP-1-Konzentration (ng/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten			Kontrollen		
	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
Median	374* ⁺	2595* ⁺	3051	498* ⁺	3332* ⁺ [♦]	3135 [♦]
Range	178-799	0-6451	1387-4985	144-713	1832-6887	1049-6534
N =	40	40	38	40	39	38
N < NG	0	1	0	0	0	0

* = Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen (p<0,05)

⁺ = Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und unstimulierten Tränen (p<0,05)

[♦] = Konzentrationsunterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen (p<0,05)

NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Die TIMP-1-Konzentration im Plasma (p=0,000) und in der unstimulierten Tränenflüssigkeit (p=0,006) war bei den RA-Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Kontrollen (Tab. 41 im Anhang). In beiden Kollektiven lag die Plasmakonzentration dabei signifikant unter der entsprechenden Konzentration in den unstimulierten Tränen (jeweils p=0,000) (Tab. 42 im Anhang). Das Kontrollkollektiv zeigte zusätzlich eine signifikante Abnahme der TIMP-1-Konzentration nach Stimulation

der Sekretionsrate in der Tränenflüssigkeit ($p=0,039$) (Abb. 13) (Tab. 43 im Anhang). Während sich bei den Patienten eine signifikant negative Korrelation zwischen der TIMP-1-Konzentration in Plasma und unstimulierten Tränen feststellen ließ ($p=0,013$; $r=-0,351$), zeigten sowohl Patienten ($p=0,000$; $r=0,521$) als auch Kontrollen ($p=0,001$; $r=0,505$) eine signifikant positive Korrelation zwischen der TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten und stimulierten Tränen (Abb. 14 – 16 und Tab. 44 und 45 im Anhang).

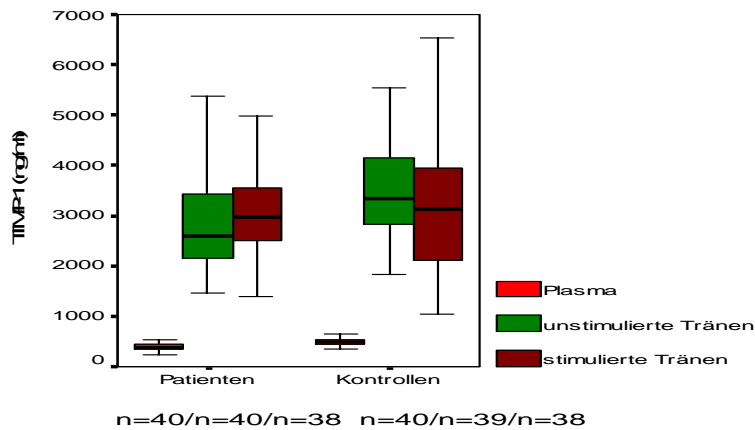
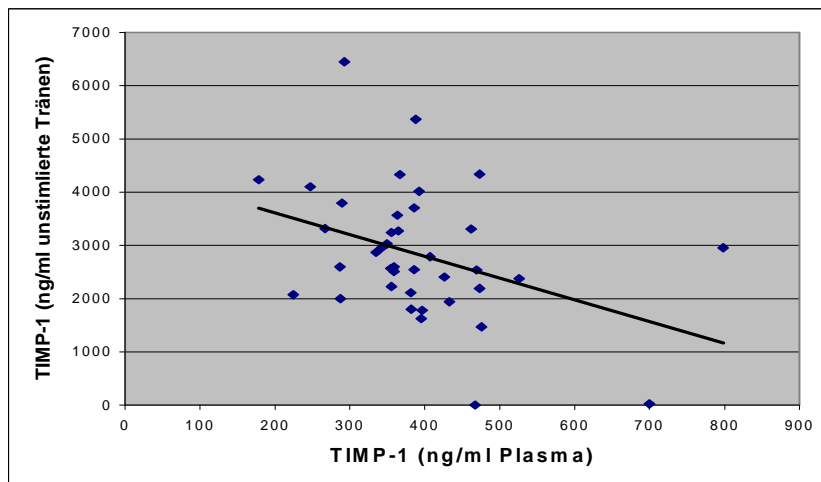


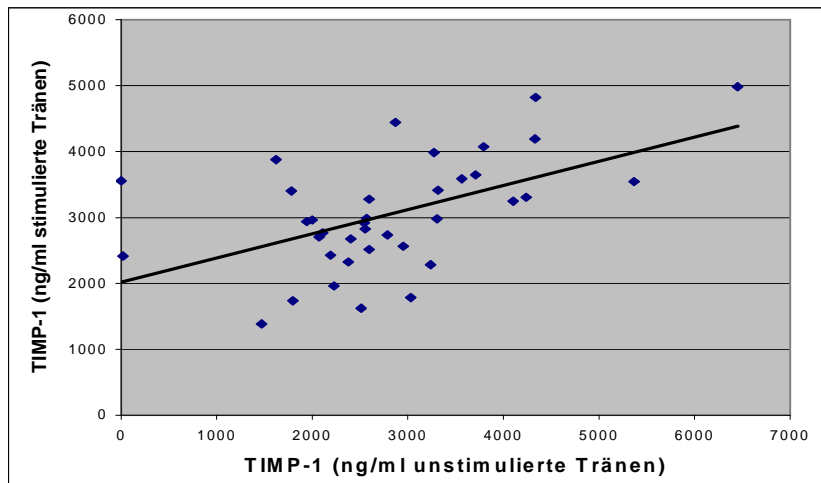
Abb. 13: TIMP-1-Konzentration (ng/ml) in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen.

Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).



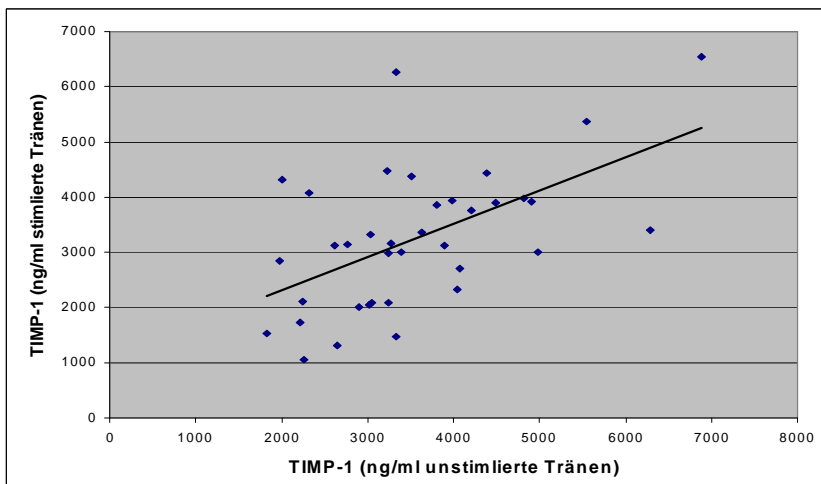
ust. = unstimuliert

Abb. 14: Korrelation der TIMP-1-Konzentration im Plasma mit der TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten Tränen bei den Patienten.



ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Abb. 15: Korrelation der TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten Tränen mit der TIMP-1-Konzentration in den stimulierten Tränen bei den Patienten.



ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Abb. 16: Korrelation der TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten Tränen mit der TIMP-1-Konzentration in den stimulierten Tränen bei den Kontrollen.

3.2 Verhältnis der TIMP-1-Konzentration zu den Konzentrationen der einzelnen MMPs ([TIMP-1] / [MMP] -Ratio)

Um Aussagen über das pathogenetisch bedeutsame Ungleichgewicht zwischen den MMPs und ihrem Inhibitor zu gewinnen, wurde in einem weiteren Schritt das Verhältnis der TIMP-1-Konzentration mit der entsprechenden MMP-Konzentration ([TIMP-1] / [MMP]-Ratio) berechnet (Tab. 25). Dabei zeigten beide Kohorten in den Plasma- und Tränenproben eine im Vergleich zur MMP-Konzentration (MMP-1-aktiv, MMP-2-aktiv, MMP-3, proMMP-9 und MMP-9-aktiv) deutlich höhere TIMP-1-Konzentration (Ratio

[TIMP-1] / [MMP] > 1). Die einzige Ausnahme bildete die Plasmakonzentration von proMMP-2, die bei Gesunden wie auch Patienten über der TIMP-1-Konzentration lag ([TIMP-1] / [proMMP-2] < 1). Insgesamt lagen die Werte der [TIMP-1] / [MMP]-Ratio der RA-Patienten tendentiell unter den entsprechenden Werten der Kontrollen. Ausnahmen bildeten die aktive MMP-1 im stimulierten Tränensekret und die aktive MMP-9 in Plasma und unstimulierten Tränen. Die im Vergleich zu RA-Patienten bei Kontrollen (nicht signifikant) erhöhte Konzentration der aktiven MMP-9 in Plasma und unstimulierten Tränen und der aktiven MMP-1 in den stimulierten Tränen erklärt den höheren Wert der [TIMP-1] / [MMP-9-aktiv]-Ratio bzw. [TIMP-1] / [MMP-1-aktiv]-Ratio in diesem Kollektiv. Auch das Verhältnis der TIMP-1-Konzentration zur Konzentration bzw. Aktivität der Summe aller MMPs ([TIMP-1] / [ΣMMPs]-Ratio) lag bei den Patienten in Plasma und unstimulierten Tränen unter dem entsprechenden Wert bei den Kontrollen. Umgekehrt verhielt es sich bei dem Verhältnis in den stimulierten Tränen, hier wurden allerdings weniger MMPs (nur MMP-1-aktiv, MMP-3) bestimmt.

Tab. 25: [TIMP-1] / [MMP] -Ratio bei Patienten und Kontrollen

Ratio TIMP-1:	Patienten					Kontrollen		
	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen			Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
MMP-1-aktiv	--	4457 ↓	1465 ↑			--	9326	612
proMMP-2	0,4 ↓	15 ↓	--			0,44	22	--
MMP-2-aktiv	17,7 ↓	702 ↓	--			26	902	---
MMP-3	3,9 ↓	101 ↓	754 ↓			17	156	840
proMMP-9	3,6 ↓	31 ↓	--			6,1	56	--
MMP-9-aktiv	26,7 ↑	540 ↑	--			20	462	--
ΣMMPs	0,3 ↓	9 ↓	498 ↑			0,4	14	355

↑ = Patienten > Kontrollen; ↓ = Patienten < Kontrollen; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

3.3 Gesamtproteingehalt von Plasma, unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit

Tabelle 26 führt den Gesamtproteingehalt in den Plasma- bzw. Tränenproben auf. In Tabelle 27 wird der MMP- bzw. TIMP-1-Anteil am Gesamtprotein dargestellt.

Tab. 26: Gesamtprotein in Plasma (mg/ml) und unstimulierten/stimulierten Tränen (µg/ml)

	Plasma	unstimulierte Tränen (rechtes + linkes Auge)	stimulierte Tränen (rechtes + linkes Auge)
Patienten	217 (n=40)	760 (n=13)	802 (n=57)
Kontrollen	256 (n=40)	978 (n=17)	794 (n=62)

Tab. 27: MMP-/TIMP-1-Anteil am Gesamtprotein (in‰)

	Plasma		ust. Tränen		st. Tränen	
	Patienten	Kontrollen	Patienten	Kontrollen	Patienten	Kontrollen
MMP-1-aktiv	--	--	0,09‰	0,04‰	0,3‰	0,7‰
proMMP-2	0,5‰	0,4‰	20‰	20‰	--	--
MMP-2-aktiv	0,01‰	0,007‰	5‰	0,4‰	--	--
MMP-3	0,05‰	0,01‰	4‰	2‰	0,5‰	0,5‰
proMMP-9	0,05‰	0,03‰	10‰	7‰	--	--
MMP-9-aktiv	0,007‰	0,009‰	0,7‰	0,8‰	--	--
TIMP-1	0,2‰	0,2‰	400‰	400‰	400‰	400‰

-- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

3.4 Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 und den Markern der klinischen Aktivität bei der rheumatoiden Arthritis

Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern und der klinischen Aktivität der Erkrankung zeigt die Tabelle 28. Die einzelnen Werte sind im Anhang aufgeführt (Tab. 50). Im Falle der unstimulierten Tränenflüssigkeit ließ sich eine negative Korrelation der proMMP-2-Konzentration ($p=0,012$; $r=-0,433$) mit den CRP-Werten feststellen. Die Konzentration der aktiven MMP-2 in den unstimulierten Tränen zeigte eine inverse

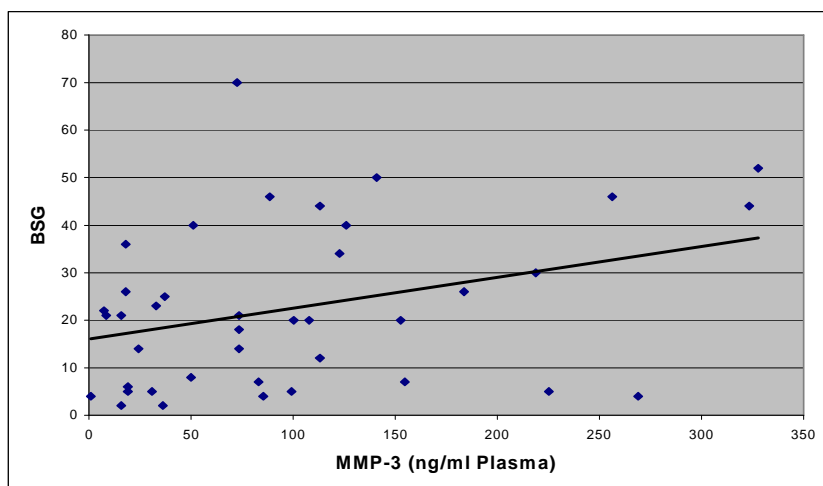
Beziehung zum DAS-Wert ($p=0,019$; $r=-0,361$). Allein die Plasma-MMP-3 korrelierte positiv mit der BSG ($p=0,031$; $r=0,298$) (Abb. 17).

Für den überwiegenden Teil der Parameter fanden sich jedoch keine signifikanten Korrelationen mit den Aktivitätsmarkern der RA.

Tab. 28: Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 und der Krankheitsaktivität der RA

	Plasma			ust. Tränen			st. Tränen		
	CRP	BSG	DAS	CRP	BSG	DAS	CRP	BSG	DAS
MMP-1-aktiv	--	--	--	--	--	--	/	/	/
proMMP-2	/	/	/	-	/	/	--	--	--
MMP-2-aktiv	/	/	/	/	/	-	--	--	--
MMP-3	/	+	/	/	/	/	--	--	--
proMMP-9	/	/	/	/	/	/	--	--	--
MMP-9-aktiv	/	/	/	/	/	/	--	--	--
TIMP-1	/	/	/	/	/	/	/	/	/

- = negative Korrelation ; + = positive Korrelation; / = keine signifikante Korrelation nachgewiesen; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert



BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit

Abb. 17: Korrelation von MMP-3-Plasmakonzentration und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG).

Keine Korrelationen bestanden zwischen den einzelnen Parametern und den Markern der klinischen Aktivität in den stimulierten Tränen.

3.5 TNF α

Tabelle 29 führt die gemessenen TNF α -Konzentrationen in den Proben der Patienten und Kontrollen auf.

Tab. 29: TNF α -Konzentration (pg/ml) in Patienten- und Kontrollproben

	Patienten			Kontrollen		
	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
Median	0* ⁺	16,6 ⁺	∅	0* ⁺	14,2 ⁺	∅
Range	0-18,6	0-49,7	∅	0-1,12	0-128	∅
N =	40	38	36	40	37	39
N < NG	27	11	36	30	10	39

* = Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen (p<0,05)

⁺ = Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und unstimulierten Tränen (p<0,05)

∅ = unterhalb der NK des ELISA-Kits; NG = Nachweisbarkeitsgrenze; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Die TNF α -Konzentration in der stimulierten Tränenflüssigkeit lag in beiden Kollektiven in allen Proben unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF α im Plasma war bei den Patienten signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen (p=0,025) (Tab. 41 im Anhang). In beiden Kollektiven war die TNF α -Plasmakonzentration signifikant höher als die entsprechende Konzentration in der unstimulierten Tränenflüssigkeit (jeweils p=0,000) (Tab. 42 im Anhang). Ferner zeigten beide Kollektive eine positive Korrelation zwischen der gemessenen TNF α -Konzentration in Plasma und unstimulierter Tränenflüssigkeit (Patienten: p=0,005; r=0,413; Kontrollen: p=0,008; r=0,393) (Tab. 44 im Anhang).

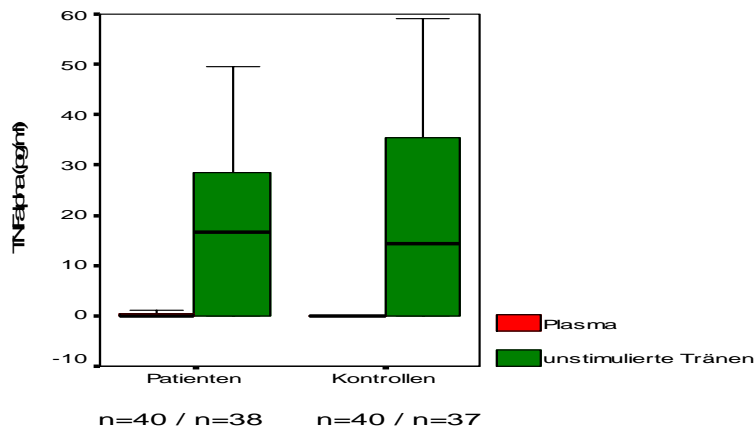


Abb. 18: TNF α -Konzentration (pg/ml) in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen.

Darstellung als Box- und Whisker-Plot. Eine Erläuterung dieser Graphikform findet sich im Anhang auf Seite 113 (Abb. 21).

Wie oben beschrieben, ist TNF α in der Lage, die Expression verschiedener Metalloproteinasen in unterschiedlichen Zellen zu induzieren. Im Folgenden wurde untersucht, ob es in dem Patienten- und Kontrollgut eine Beziehung zwischen diesen Parametern gibt. Dabei fiel in beiden Kollektiven sowohl im Plasma (Patienten: $p=0,001$; $r=0,467$; Kontrollen: $p=0,000$; $r=0,56$) als auch in der unstimulierten Tränenflüssigkeit (Patienten: $p=0,001$; $r=0,478$; Kontrollen: $p=0,006$; $r=0,414$) eine positive Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-9 auf. Die Kontrollen zeigten in Plasma und unstimulierten Tränen zusätzlich eine positive Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-2 (Plasma: $p=0,005$; $r=0,43$; unstimulierte Tränen: $p=0,001$; $r=0,501$). Bei den Patienten ließ sich in den unstimulierten Tränen außerdem eine positive Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration und der proMMP-2-Konzentration ($p=0,001$; $r=0,523$) sowie eine negative Korrelation zwischen der TNF α - und TIMP-1-Konzentration feststellen ($p=0,016$; $r=-0,347$) (Tab. 30). Die genauen Daten zeigen die Tabellen 48 und 49 im Anhang.

Tab. 30: Korrelationen zwischen der TNF α -Konzentration und den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 bei Patienten und Kontrollen

	Patienten			Kontrollen		
	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
MMP-1-aktiv	--	--	/	--	--	/
proMMP-2	/	+	--	/	/	--
MMP-2-aktiv	/	/	--	+	+	--
MMP-3	/	/	--	/	/	--
proMMP-9	/	/	--	/	/	--
MMP-9-aktiv	+	+	--	+	+	--
TIMP-1	/	-	/	/	/	/

- = negative Korrelation; / = keine signifikante Korrelation nachgewiesen; + = positive Korrelation; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

3.6 Immunlokalisation der MMPs und TIMP-1 im Hornhaut- und Tränendrüsen- und Gewebe von RA-Patienten mit sterilem Hornhautulkus und Gesunden

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung sind zusammenfassend in Tabelle 31, sowie detailliert für die einzelnen Gewebeproben in Tabelle 51 im Anhang dargestellt. Die als Negativkontrolle durchgeführte Färbung für IgG war in allen Schnitten negativ. Im gesunden Kontrollgewebe wurden mit und ohne Inkubation mit dem Sekretionshemmer Monensin keine MMPs oder TIMP-1 nachgewiesen.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich im ulzerierten Hornhautgewebe sowohl im Epithel als auch im Stroma eine intensive Anfärbung für diese Proteine. Dabei war die Färbung insgesamt für proMMP-2 am intensivsten, gefolgt von proMMP-9, MMP-3 und MMP-1. Am schwächsten färbte das Gewebe für TIMP-1.

Während sich proMMP-2 und MMP-1 in Epithel und Stroma in gleicher Weise nachweisen ließen, überwog die Anfärbung für proMMP-9, MMP-3 und TIMP-1 eindeutig im Stroma. Nach 6-stündiger Inkubation der Hornhautpräparate mit Monensin war die Färbungsintensität für proMMP-2 und TIMP-1 reduziert. Für MMP-1, -3 und proMMP-9 ließ sich keine Änderung der Färbungsintensität nachweisen.

Auch im gesunden Tränendrüsen- und Gewebe waren ohne Vorbehandlung mit Monensin keine MMPs oder TIMP-1 nachweisbar. Nach Inkubation mit dem Sekretionshemmer zeigten azinäre und duktales Epithelzellen jedoch eine deutliche Anfärbung für MMP-1.

Das Stroma zeigte zusätzlich eine leichte Reaktion für proMMP-2 und MMP-3 (Abb. 19 und 20).

Tab. 31: Lokalisation der MMPs/TIMP-1 in Hornhaut und Tränendrüse (mit und ohne Monensin) (1)

	Hornhaut (rh. Ulkus)				Tränendrüse (gesundes Gewebe)			
	Epithel	Stroma			Azinuszellen (n=1)	Stroma (n=1)		
MMP-1 (n=6)	+	+	+	+	-	+++	-	-
proMMP-2 (n=7)	+++	+	+++	(+)	-	-	-	+
MMP-3 (n=5)	+	+	++	+	-	-	-	+
proMMP-9 (n=7)	(+)	(+)	+++	+	-	-	-	-
TIMP-1 (n=6)	(+)	(+)	+	(+)	-	-	-	-

- = keine Anfärbung; (+) = sehr schwache Anfärbung; + = geringe Anfärbung; ++ = mäßige Anfärbung

+++ = starke Anfärbung; grau unterlegt = nach 6ständiger Inkubation mit Monensin; rh. = rheumatisches

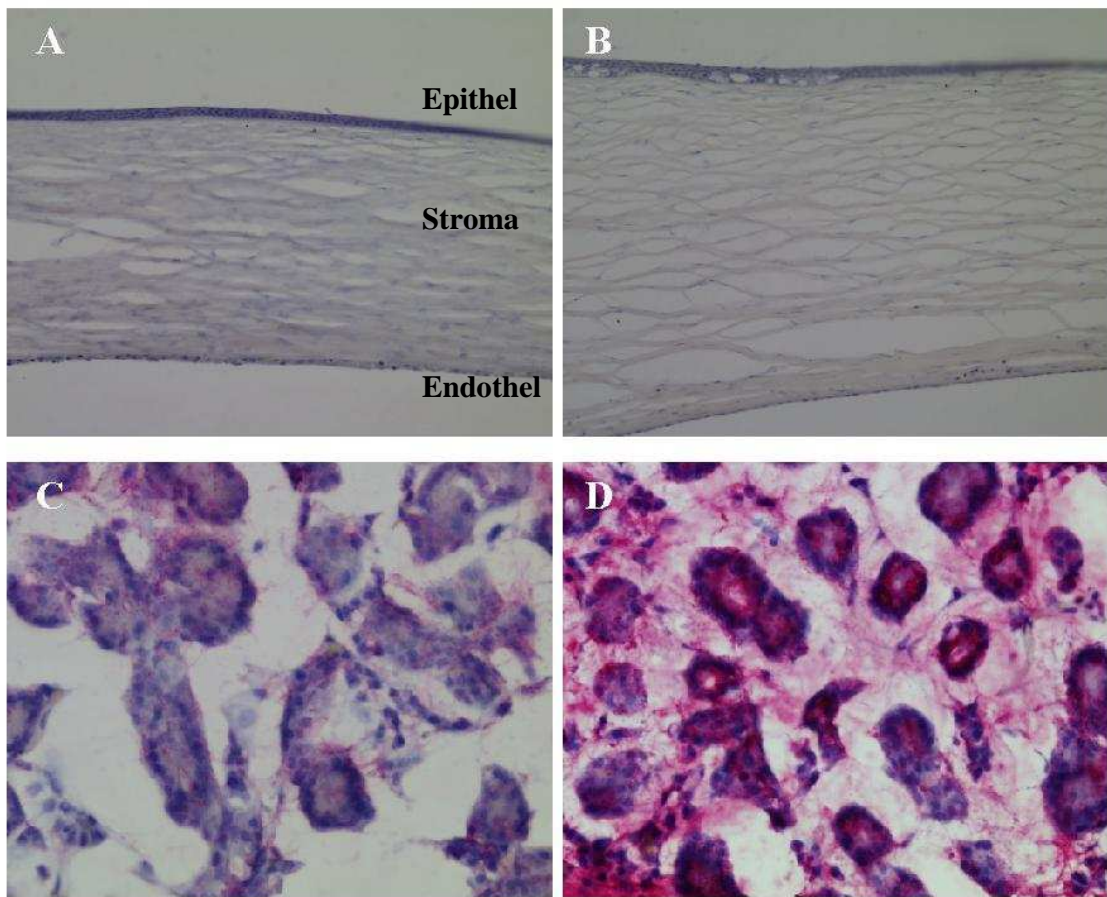


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis für MMP-1 von normaler humaner Kornea (A/B) und Tränendrüse (C/D).

Im gesunden Hornhautgewebe zeigte sich weder vor (A) noch nach 6-stündiger Inkubation mit Monensin (B) eine Anfärbung als Nachweis für MMP-1. Auch im gesunden Tränengewebe war ohne Vorbehandlung mit Monensin (C) kein MMP-1 nachweisbar. Nach Inkubation mit dem Sekretionshemmer ließ sich MMP-1 in azinären und duktaalen Epithelzellen nachweisen (D). Die leichte positive Farbreaktion im Bild C wurde als unspezifischer Hintergrund bewertet. Die deutlich erkennbaren Spalträume sowohl in der Hornhaut als auch im Tränendrüsenspräparat sind als Folge der Kryokonservierung zu bewerten.

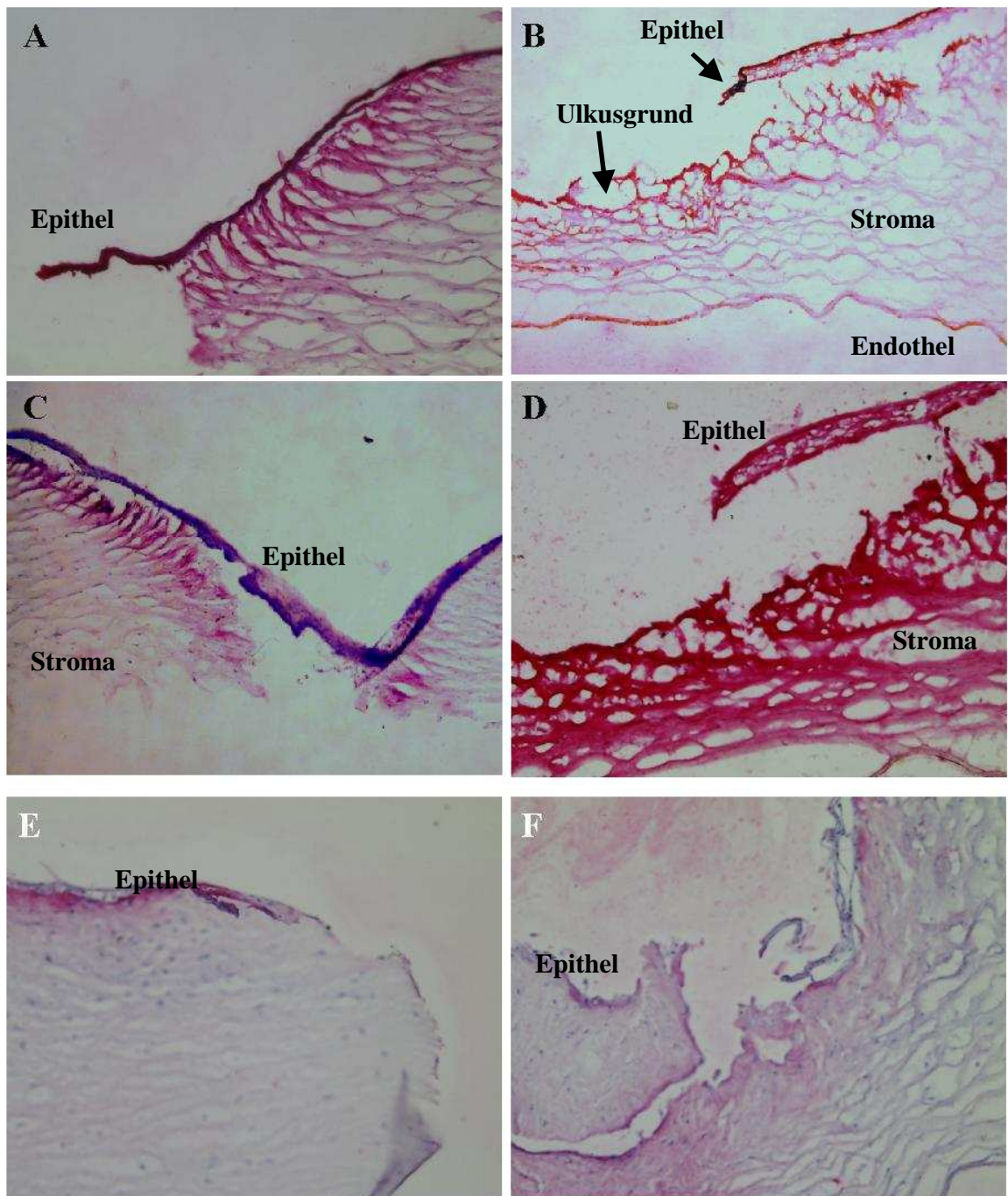


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von MMPs im Hornhautulkus bei Rheumatoider Arthritis.
A: Für MMP-1 zeigte sich vor Inkubation mit Monensin eine leichte Anfärbung im Epithel und Stroma. **B:** Für proMMP-2 konnte vor Monensin-Inkubation eine deutliche Anfärbung in Epithel und Stroma beobachtet werden. **C:** Für MMP-3 zeigte sich vor Monensininkubation eine deutliche stärkerer Anfärbung im Stroma. **D:** ProMMP-9 vor Inkubation mit Monensin. Die Anfärbung des Stromas war stärker als die des Epithels. **E/F:** Vor Monensininkubation (**E**) zeigte sich für TIMP-1 im Stroma eine schwache Anfärbung. Nach Inkubation mit Monensin (**F**) war die Färbungsintensität reduziert. In Bild **B**, **D** und **F** ist der Ulkusgrund eindeutig zu identifizieren. In Bild **A**, **C** und **E** ist aufgrund einer schrägen Schnittführung der Ulkusrand dargestellt, der teilweise von Epithel noch oder schon wieder bedeckt ist.

4. Diskussion

Im folgenden fasse ich die Ergebnisse dieser Arbeit kurz zusammen. Mithilfe von kommerziellen ELISA-Kits wurden die Konzentrationen verschiedener MMPs, TIMP-1 und TNF α in Plasma und Tränenflüssigkeit von RA-Patienten ohne okuläre Beteiligung sowie gesunden Kontrollen gemessen. Die auf diese Weise erhaltenen Daten wurden zunächst auf Konzentrationsunterschiede zwischen dem Patienten- und Kontrollkollektiv untersucht. Während bei den Patienten eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höhere Plasma-MMP-3-, -proMMP-9- und TNF α -Konzentration gefunden wurde, war die TIMP-1-Konzentration in Plasma und unstimulierter Tränenflüssigkeit im Patientenkollektiv niedriger (Tab. 32).

Tab. 32: Signifikante Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1, TNF α) zwischen Patienten und Kontrollen

MMP-3 (Plasma)	Patienten > Kontrollen
ProMMP-9 (Plasma)	Patienten > Kontrollen
TIMP-1 (Plasma/unstimulierte Tränen)	Patienten < Kontrollen
TNF α (Plasma)	Patienten > Kontrollen

Die bei den RA-Patienten ermittelten Konzentrationen der MMPs und TIMP-1 wurden mit den konventionellen Labormarkern der RA (CRP, BSG) sowie dem DAS-Score in Beziehung gesetzt, um mögliche Korrelationen zwischen den Enzym- bzw. Inhibitorkonzentrationen und der Krankheitsaktivität der RA nachzuweisen. Zwischen der Plasma-MMP-3 und der BSG war eine positive Korrelation nachweisbar. Negative Korrelationen in den unstimulierten Tränen zeigten proMMP-2 mit dem CRP-Wert und die aktive Form der MMP-2 mit dem DAS-Wert (Tab. 33).

Tab. 33: Signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 und der Krankheitsaktivität der RA

MMP-3 mit BSG (Plasma)	+
ProMMP-2 mit CRP (unstimulierte Tränen)	-
MMP-2-aktiv mit DAS (unstimulierte Tränen)	-

In einem weiteren Schritt wurden die ermittelten Konzentrationen der MMPs, TIMP-1 und TNF α für die Patienten und Kontrollen getrennt auf signifikante Korrelationen in den

unterschiedlichen Proben untersucht. Dies ist die erste Arbeit, in der MMP- und TIMP-1-Konzentrationen bei RA-Patienten ohne okuläre Symptomatik sowohl im Plasma als auch in der Tränenflüssigkeit quantifiziert und zueinander in Beziehung gesetzt worden sind. Zwischen dem Plasma und der unstimulierten Tränenflüssigkeit bestand für die Konzentrationen der aktiven MMP-2 und TNF α im Patienten- und Kontrollkollektiv, für die Konzentration der aktiven MMP-9 ausschließlich bei den Kontrollen eine positive Korrelation. Für die TIMP-1-Konzentration konnte bei den Patienten zwischen Plasma und unstimulierten Tränen eine negative Korrelation nachgewiesen werden. Zwischen der unstimulierten und stimulierten Tränenflüssigkeit bestand bei Patienten und Kontrollen für die TIMP-1-Konzentration eine positive Korrelation (Tab. 34).

Tab. 34: Signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen der MMPs, TIMP-1 und TNF α in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Plasma vs. unstimulierte Tränen	unstimulierte vs. stimulierte Tränen	
MMP-2-aktiv (Patienten/Kontrollen)	+	TIMP-1 (Patienten/Kontrollen) +
MMP-9-aktiv (Kontrollen)	+	
TIMP-1 (Patienten)	-	
TNF α (Patienten/Kontrollen)	+	

Hinsichtlich einer Verbindung zwischen der TNF α -Konzentration und den Konzentrationen der MMPs und TIMP-1 zeigten beide Kollektive im Plasma und unstimulierten Tränensekret eine positive Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-9, die Kontrollen zusätzlich auch zwischen der TNF α -Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-2. In den unstimulierten Tränen der Patienten korrelierte die TNF α -Konzentration positiv mit der proMMP-2- und negativ mit der TIMP-1-Konzentration (Tab. 35).

Tab. 35: Signifikante Korrelationen zwischen der TNF α -Konzentration und den Konzentrationen der MMPs/TIMP-1 bei Patienten und Kontrollen

TNF α mit MMP-9-aktiv (Plasma/unstimulierte Tränen) Patienten/Kontrollen	+
TNF α mit MMP-2-aktiv (Plasma/unstimulierte Tränen) Kontrollen	+
TNF α mit proMMP-2 (unstimulierten Tränen) Patienten	+
TNF α mit TIMP-1 (unstimulierte Tränen) Patienten	-

In einem letzten Schritt habe ich mithilfe der Immunhistochemie die Hornhaut von Patienten mit einem RA-assoziierten Hornhautulkus sowie gesunde Kornea und gesundes Tränendrüsen­gewebe auf den Gehalt an bestimmten Metalloproteinasen (MMP-1, proMMP-2, MMP-3, proMMP-9) und TIMP-1 untersucht. Hierbei wurden alle Präparate vor und nach Behandlung mit dem Sekretionshemmer Monensin examiniert. Während in der gesunden Hornhaut weder MMPs noch TIMP-1 nachweisbar waren, zeigte sich im ulzerierten Korneagewebe in abnehmender Intensität eine deutliche Anfärbung für proMMP-2 > proMMP-9 > MMP-3 > MMP-1. Die 6-stündige Inkubation mit Monensin resultierte in einer reduzierten Anfärbbarkeit des Gewebes für proMMP-2 und TIMP-1. Für MMP-1, -3 und proMMP-9 ließ sich keine Änderung der Färbungsintensität feststellen. Das gesunde Tränendrüsen­gewebe färbte ohne Inkubation mit Monensin weder für MMPs noch für TIMP-1. Nach Zugabe des Sekretionsinhibitor zeigten die Azinuszellen eine deutliche Anfärbung für MMP-1. Im Stroma ließ sich ein schwächere Anfärbung für proMMP-2 und MMP-3 nachweisen.

4.1 Ein Vergleich der MMP- und TIMP-1-Konzentrationen bei RA-Patienten und Kontrollen

Die progressive Zerstörung der EZM-Komponenten des Gelenks durch Mitglieder der Familie der Matrixmetalloproteinasen mit der Folge eines permanenten Funktionsverlustes ist ein Hauptcharakteristikum der rheumatoiden Arthritis.

Die in dieser Studie beobachtete deutlich erhöhte **Plasma-MMP-3-Konzentration** der RA-Patienten gegenüber den Kontrollen stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien (Serum-/Plasmaproben) überein (101, 102, 103, 104, 105, 106). Obwohl für die einzelnen Messergebnisse starke Schwankungen zwischen den erwähnten Studien bestehen, findet sich in allen Arbeiten bei den RA-Patienten ein circa 4-facher Anstieg der MMP-3-Plasmakonzentration (Ausnahmen 104, 105). Da sich die **aktive MMP-1** in meiner Studie weder im Plasma der RA-Patienten noch bei den Kontrollen nachweisen ließ, kann hier keine Aussage hinsichtlich eines Konzentrationsunterschiedes zwischen diesen beiden Kollektiven getroffen werden. Während Manicourt et al (104) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen der Patienten und Kontrollen feststellen konnten, zeigten Ergebnisse anderer Studien allerdings, dass MMP-1 im Plasma bzw. Serum von RA-Patienten in signifikant höherer Konzentration (2- bzw. 6-fache) vorliegt als im Serum gesunder Kontrollen (101, 105).

MMP-3 und MMP-1 gelten als Schlüsselenzyme in der Pathogenese der RA (19, 77, 107, 108). Neben ihrer Präsenz im Serum bzw. Plasma bei RA-Patienten, wurden diese Proteasen wiederholt in erhöhter Konzentration in der Synovialflüssigkeit (109, 110, 111, 112, 113, 114) im Synovialgewebe (78, 108, 115, 116, 117, 118, 119, 120) und im Knorpelgewebe (107) rheumatischer Gelenke gefunden. Dabei lag die MMP-3-Konzentration in allen Fällen deutlich über der MMP-1-Konzentration.

Trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen haben beide Enzyme synergistische Effekte auf die Zerstörung der Knorpelstrukturen des Gelenks. So nimmt MMP-3 durch ihre Beteiligung an der extrazellulären Aktivierung der Prokollagenase einen entscheidenden Platz in der Kaskade ein, die letztendlich über eine proteolytische Spaltung von EZM-Komponenten zur Zerstörung der Gelenkstrukturen führt (17, 33, 121). Zusätzlich stellt die MMP-3 induzierte Spaltung des Proteoglykans Aggrecan womöglich den entscheidenden Schritt dar, der MMP-1 erst den Zugang zu den Kollagenfibrillen schafft (122). Diese Beziehung der beiden Proteasen zueinander wird durch die Ergebnisse von Manicourt et al (104) bestätigt, die bei RA-Patienten, nicht aber bei gesunden Kontrollen eine positive Korrelation zwischen den MMP-1- und -3-Konzentrationen im Serum feststellen konnten. Da in der vorliegenden Arbeit die aktive MMP-1 im Plasma nicht nachweisbar war, konnte diese Korrelation hier nicht bestätigt werden.

Nachweisbar war allerdings eine positive Korrelation zwischen der MMP-3-Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-9 in Plasma und unstimulierten Tränen. Diese Beobachtungen werden durch Ergebnisse einer Studie bestätigt, die zeigen konnte, dass MMP-3 durch eine Spaltung innerhalb des Propeptids der Zymogenform von MMP-9 an der Aktivierung dieser Protease beteiligt ist (16). Übereinstimmend mit der Arbeit von Ishiguro et al (111) wurde eine positive Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen der MMP-3 und der proMMP-2 festgestellt. Diese lässt sich im Sinne einer koordinativen Expression beider Proteasen verstehen.

Auch die im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte **proMMP-9-Plasmakonzentration** der RA-Patienten stimmte mit den Ergebnissen früherer Studien überein, die hohe Konzentrationen dieses Enzyms im Plasma und Serum Erkrankter nachgewiesen haben (111, 123, 124, 125). Sopata et al (123) konnten zusätzlich zeigen, dass RA-Patienten mit begleitender Vaskulitis signifikant höhere proMMP-9-Plasmakonzentrationen aufwiesen als Patienten ohne diese Komplikation. Untersuchungen der Synovialflüssigkeit und des Synovialgewebes rheumatischer Gelenke, in denen proMMP-9 in erhöhter Konzentration nachweisbar war, zeigten, dass auch dieses Enzym eine Rolle in der proteolytischen Degradation der Gelenkstrukturen bei RA spielt (114, 120, 123, 124, 125, 126).

Für die **aktiven Formen** der **MMP-2- und -9** sowie **proMMP-2** ließ sich im Plasma meiner Kollektive kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen feststellen. Einzig die Plasmakonzentration der aktiven MMP-9 lag bei den Kontrollen über der entsprechenden Aktivität bei den Patienten. Die proMMP-2-Konzentration war in beiden Kollektiven deutlich höher als die der anderen MMPs.

Während auch Goldbach-Mansky et al (127) keinen signifikanten Konzentrationsunterschied für proMMP-2 zwischen Patienten und Kontrollen feststellen konnten, zeigten Fujimoto et al (128) sogar, dass diese Protease im Vergleich zum Serum von RA-Patienten bei gesunden Kontrollen in höherer Konzentration zu finden ist.

Sowohl für die aktiven Gelatinase als auch für proMMP-2 liegen allerdings Studienergebnisse vor, die über den Nachweis einer erhöhten Konzentration dieser Proteasen im Serum, in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe ihre Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis wahrscheinlich machen (111, 114, 117, 120, 124, 127, 129). Goldbach-Mansky et al (127) zeigten, dass die Konzentration der aktiven MMP-2 im Synovialgewebe signifikant mit dem erosiven Gelenkstatus der Patienten korrelierte. Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese überein, dass eine erhöhte Aktivität der Gelatinasen in der Synovia ähnlich den Befunden bei invasiven Tumoren eine erhöhte Invasionsfähigkeit des Pannusgewebes reflektiert.

Für die Diskrepanz zwischen der in der Literatur berichteten erhöhten Konzentration der aktiven Formen von MMP-2 und -9 sowie proMMP-2 bei RA-Patienten und den hier beobachteten Ergebnissen gibt es keine eindeutige Erklärung.

Eine Behandlung der RA-Patienten mit Steroiden und MTX kann einen Einfluß auf die Konzentration der aktiven Formen der MMP-1, -2 und -9 haben. Frühere Studien an Patienten mit Arthrose bzw. rheumatoider Arthritis zeigten, dass eine medikamentöse Behandlung mit diesen Verbindungen zu einer signifikanten Reduktion der aktiven Formen Proteoglykan- und Kollagen-degradierender Proteasen im Knorpelgewebe führt (130, 131). Andere Studien zeigten, dass Steroide und MTX zu einer Reduktion der MMP-1- und -3-Produktion im Knorpel- und Synovialgewebe führen (79, 107, 132, 133). Beides erklärt die therapeutische Effizienz dieser Medikamente in der Verhinderung einer weiteren Progression der Gelenkerosionen. Der genaue, zur Reduzierung der MMP-Konzentration führende Mechanismus durch diese Medikamente ist dabei noch ungeklärt. Vieles deutet darauf hin, dass dieser Effekt über eine Änderung in der Synthese und Aktivität der die MMP-Produktion induzierenden Zytokine wie IL-1 und TNF α vermittelt wird (134, 135, 136). Da die Kohortengröße für die ausschließlich mit Steroiden bzw. MTX behandelten Patienten in meiner Studie zu klein war, konnte ich diesen Zusammenhang zwischen

Therapie und aktiver MMP-Konzentration über eine getrennte Quantifizierung der MMP-Konzentration bei behandelten und unbehandelten RA-Patienten nicht nachweisen.

TIMP-1 stellt einen der wichtigsten natürlichen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen dar und spielt so eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der proteolytischen Gewebeerstörung (137). Es ist seit langem bekannt, dass eine Imbalance zwischen den Proteinase und ihren spezifischen Inhibitoren (TIMP) zugunsten der Protease eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der RA besitzt (78, 79, 107). Mein Ergebnis hinsichtlich einer bei RA-Patienten erniedrigten **TIMP-1-Plasmakonzentration** steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Studien, die übereinstimmend über eine erhöhte Inhibitorkonzentration im Serum von Patienten berichteten (103, 104, 105, 138). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der anderen Studien lag die TIMP-1-Plasmakonzentration dabei in beiden Kollektiven über den Plasmakonzentrationen der MMPs. Eine Ausnahme bildete hier sowie bei Ishiguro et al (111) die Plasma- bzw. Serumkonzentration von proMMP-2.

TIMP-1 konnte auch in der Synovialflüssigkeit (105, 111, 112), im Synovialgewebe (117, 119, 139) und im Knorpelgewebe rheumatischer Gelenke (107) nachgewiesen werden. Bedingt durch den Abfall der TIMP-1-Konzentration und den gleichzeitigen Anstieg der MMP-Konzentrationen im Plasma, ist das Verhältnis von TIMP-1 zu MMP ($[TIMP-1] / [MMP]$ -Ratio) mit Ausnahme der aktiven MMP-9 bei den RA-Patienten tendenziell niedriger als bei den Kontrollen. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt, in denen der disproportional hohe Anstieg der MMP-Konzentrationen bei den RA-Patienten trotz gleichzeitiger Erhöhung der TIMP-1-Konzentration zu einer deutlichen Verringerung der $[TIMP-1] / [MMP]$ -Ratio führte (103, 104, 105). Diese Aussage muß allerdings mit einer Einschränkung betrachtet werden, da die in dieser Arbeit verwendeten ELISAs zur TIMP-1- bzw. MMP-Bestimmung neben den freien Formen der Enzyme und des Inhibitors auch den Komplex zwischen TIMP-1 und verschiedenen MMPs erfasst haben. Aus diesem Grund kann aus den oben beschriebenen Daten nicht direkt auf die pathogenetische Bedeutung des Ungleichgewichts zwischen Protease und Inhibitor geschlossen werden.

Es ist bekannt, dass verschiedene Zytokine unterschiedliche Effekte in Bezug auf die Produktion von MMPs und ihren Inhibitoren haben. Die hier gemessene niedrigere TIMP-1-Plasmakonzentration bei den RA-Patienten könnte auf eine reduzierte Synthese dieses Proteins in den Chondrozyten und Synovialzellen der rheumatischen Gelenke zurückzuführen sein. So zeigten Martel-Pelletier et al (107) und Shingu et al (140), dass die bei RA in erhöhter Konzentration vorliegenden Zytokine IL-1 und TNF α bei Patienten

mit rheumatoider Arthritis die TIMP-1-Synthese im Knorpel- und Synovialgewebe inhibieren. Jackson et al (141) stellten fest, dass die TIMP-1-Sekretion in Endothelzellen aus Synovialgewebe rheumatischer Gelenke im Vergleich zu denen aus gesunder Synovia deutlich herabgesetzt war und führten diesen Abfall zum Teil auf erworbene funktionelle Abnormalitäten rheumatischer Synovialzellen zurück. Da die Plasma- bzw. Serumkonzentration von TIMP-1 wenigstens zu einem Teil aus der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke stammt, lässt sich die erniedrigte Konzentration auf diese Weise erklären.

Die zu dem im Vergleich zur TIMP-1-Produktion disproportionalen Anstieg der MMP-Konzentration führenden Faktoren sind nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise sind die Zytokine IL-1 und TNF α durch ihre selektive Stimulation der MMP-1-, -3- und -9-Synthese in Chondrozyten und Synovialzellen für die Entstehung dieses Ungleichgewichts verantwortlich (76, 142, 143).

Anders als für die Plasmakonzentrationen der MMPs gibt es in Bezug auf Änderungen der TIMP-1-Konzentration unter der Behandlung mit Steroiden bzw. MTX keine eindeutige Aussage. Da sowohl erhöhte, erniedrigte bzw. unveränderte Konzentrationen von TIMP-1 während einer Therapie mit diesen Medikamenten nachgewiesen wurden (79, 107, 132, 144), kann die hier gefundene deutlich niedrigere Inhibitorkonzentration bei den Patienten nicht einfach auf eine Behandlung mit diesen Medikamenten zurückgeführt werden.

Bei der Untersuchung der TIMP-1- und MMP-Konzentrationen in der **unstimulierten Tränenflüssigkeit** beider Kollektive ließ sich allein für **TIMP-1** eine im Vergleich zu den Kontrollen geringfügige (Faktor 0,8), aber signifikant niedrigere Konzentration bei den RA-Patienten feststellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden für das Plasma überein und könnte auf eine gemeinsame Regulation der TIMP-1-Spiegel in Plasma und Tränenflüssigkeit hinweisen. Wie bereits erwähnt wurde, entdeckten Riley et al (85) bei einem Vergleich von normalem mit RA-assoziierten ulzeriertem Hornhautgewebe eine deutlich erniedrigte TIMP-1-Konzentration im pathologischen Gewebe. Unter der Annahme, dass die TIMP-1-Produktion in Zellen des Hornhautepithels bzw. -stromas die Konzentration dieses Proteins in der Tränenflüssigkeit bestimmt, lässt sich die erniedrigte TIMP-1-Konzentration in den Tränen von RA-Patienten ohne Augenbeteiligung möglicherweise als erhöhte Anfälligkeit dieses Patientenkollektivs für die Entwicklung eines Korneaukulus verstehen.

Wie im Plasma lag die TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten Tränen in beiden Kollektiven über den entsprechenden Konzentrationen der untersuchten MMPs. Auch

wenn die RA-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen in den unstimulierten Tränen leicht erhöhte **MMP-Konzentrationen** (Ausnahme: MMP-9-aktiv) aufwiesen, war diese Erhöhung nicht signifikant.

Die Kombination aus einem Abfall der TIMP-1- und Anstieg der MMP-Konzentration war auch hier für die niedrigere [TIMP-1] / [MMP]-Ratio bei den RA-Patienten verantwortlich (Ausnahme: MMP-9-aktiv). Wie bereits für das Plasma beschrieben, könnte dieser Konzentrationsunterschied zwischen Proteasen und Inhibitor auch hier auf eine selektive Induktion der MMP-Expression im Hornhautepithel und -stroma durch die Zytokine TNF α und IL-1 β zurückgeführt werden (145, 146, 147). Aufgrund der oben erwähnten Einschränkung hinsichtlich des Substratspektrums der verwendeten ELISA-Kits, kann allerdings nur eingeschränkt auf ein Ungleichgewicht zwischen Protease und Inhibitor geschlossen werden.

Für die **stimulierte Tränenflüssigkeit** konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven festgestellt werden.

Meines Wissens gibt es nur eine weitere publizierte Studie, in der die Tränenflüssigkeit von RA-Patienten ohne begleitende okuläre Symptomatik auf die in ihr enthaltenen Konzentrationen verschiedener MMPs untersucht worden ist. Geerling et al (95) verglichen in dieser Studie mithilfe der Zymographie das Vorkommen der Gelatinasen MMP-2 und -9 in unstimulierten Tränen von Kontrollen, Patienten mit RA bzw. anderen systemischen Bindegewebserkrankungen ohne begleitende Augensymptomatik und Patienten mit der Anamnese eines aktiven oder ausgeheilten Korneaulkus. Dabei konnte für beide Gelatinasen eine im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte Konzentration dieser Enzyme in der Tränenflüssigkeit von Patienten mit Bindegewebserkrankungen festgestellt werden, auch wenn keine Beteiligung der Augen zu erkennen war. Dieses Ergebnis konnte in einem späteren Versuch mithilfe einer Quantifizierung der Daten durch ELISA-Bestimmungen bestätigt werden (Geerling et al, unpublizierte Daten). Des weiteren zeigte ein Vergleich der Tränen verschiedener Patienten, dass die eindeutig höchste Enzymkonzentration bei den RA-Patienten zu finden war. Dies stimmt mit der klinischen Beobachtung überein, dass die rheumatoide Arthritis die am häufigsten mit dem Krankheitsbild der peripheren ulzerativen Keratitis assoziierte Erkrankung darstellt (66). Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, konnten auch Geerling et al (unpublizierte Daten) keine signifikante Erhöhung der MMP-3-Tränenkonzentration bei RA-Patienten ohne okuläre Symptomatik nachweisen. Diese Arbeitsgruppe zeigte allerdings, dass es mit der Entwicklung eines Hornhautulkus zu einem signifikanten Anstieg dieses Enzyms in der Tränenflüssigkeit kommt. Dies wird durch Beobachtungen von Sobrin et al (148) bestätigt,

die in ihrer Studie anhand von Patienten mit okulärer Rosazea feststellten, dass sich die MMP-3 hier ausschließlich bei rezidivierenden Hornhauterosionen bzw. einem Kornealulkus nachweisen ließ.

Diese Arbeit zeigt, dass mit Ausnahme der MMP-1 alle der hier bestimmten MMPs und TIMP-1 in der **Tränenflüssigkeit gesunder Probanden** zu finden sind, wobei, ähnlich den Ergebnissen für das Plasma, die höchsten Konzentrationen für proMMP-2 und TIMP-1 gefunden wurden. In der Literatur gehen die Aussagen über die Anwesenheit verschiedener MMPs in der Tränenflüssigkeit gesunder Probanden auseinander. Berichte über einen positiven Nachweis bestimmter MMPs stehen Berichten über negative Befunde gegenüber. Im Falle eines positiven Nachweises zeigte sich aber, dass die Tränenkonzentrationen Gesunder deutlich unterhalb der Konzentration des untersuchten Patientenkollektives lag (95, 148, 149, 150). Übereinstimmend wurde in früheren Arbeiten allerdings über einen fehlenden Nachweis der aktiven Gelatinaseformen in der normalen Tränenflüssigkeit berichtet (149, 150, 151, 152).

4.2 Beziehungen zwischen den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen und der Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis

Die einzige signifikant positive Korrelation zwischen einer der untersuchten Proteasen und einem anerkannten Marker für die Krankheitsaktivität der RA habe ich für die Plasmakonzentration der **MMP-3 und die BSG** gefunden. Diese Korrelation steht in Übereinstimmung mit den Daten anderer Untersuchungen (101, 103, 104, 113). Keyszer et al (101) haben verschiedene Entzündungsparameter mit klinischen Zeichen der Krankheitsaktivität (Anzahl der geschwollenen Gelenke, Gelenkfunktion, visueller Analogskala und modifizierter Landsbury Index) korreliert und festgestellt, dass das C-reaktive Protein die stärkste Assoziation mit dem Aktivitätsgrad der RA aufweist. Andere Studien zeigten, dass CRP-Verlaufskurven auch mit der Progression von Gelenkschäden bzw. dem Auftreten neuer artikulärer Erosionen korrelieren (105, 153). Während die in dieser Arbeit erhobenen Befunde keine signifikante Korrelation zwischen MMP-3 und CRP zeigten, wurde in der Literatur mehrfach über eine signifikante positive Korrelation beider berichtet (101, 103, 104, 105, 111).

Da sich die **aktive MMP-1** in der vorliegenden Studie im Plasma nicht nachweisen ließ, konnte diese auch nicht mit den klinischen Markern der Krankheitsaktivität in Beziehung gesetzt werden. In einigen früheren Studien wurde über eine signifikant positive

Korrelation zwischen dieser Protease und dem CRP berichtet (104, 127, 154), in anderen Arbeiten konnte diese Beziehung nicht nachgewiesen werden (78, 105).

Während die mir bekannte Literatur übereinstimmend über eine positive Korrelation zwischen der MMP-1 und dem Grad der radiologischen und funktionellen Gelenkschäden bzw. dem Auftreten neuer Erosionen berichtet (105, 154), gehen die Aussagen hinsichtlich der MMP-3 auseinander. Yamanaka et al (106) sprechen der Serum-MMP-3 aufgrund ihrer positiven Korrelation mit dem Larsen-Score einen hohen prädiktiven Wert bezüglich der Schwere des Gelenkschadens zu. In anderen Arbeiten konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht bestätigt werden (104, 105). Cunnane et al (105) leiteten aus diesen Daten eine Differenzierung der zur Gelenkentzündung bzw. -erosion führenden pathophysiologischen Mechanismen ab, wobei die MMP-3 in erster Linie für den Grad der Gelenkentzündung, die MMP-1 für die Entwicklung artikulärer Erosionen verantwortlich gemacht wird.

Weder die Plasmakonzentrationen der **pro- und aktiven Formen der MMP-2 und -9** noch die des Inhibitors **TIMP-1** zeigten in meiner Untersuchung eine signifikante Korrelation mit den Werten des DAS-Score, der BSG oder dem CRP. In früheren Studien waren allerdings für MMP-9 und TIMP-1 positive Korrelationen mit der BSG bzw. dem CRP nachgewiesen worden (103, 104, 105, 114). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten lag die TIMP-1-Plasmakonzentration der RA-Patienten bei mir allerdings signifikant unter der gesunder Kontrollen, so dass hier eher mit einer negativen Korrelation zwischen Inhibitor und den Markern der Krankheitsaktivität zu rechnen gewesen wäre. Möglicherweise führte die Behandlung der Patienten mit Steroiden bzw. MTX über eine Senkung der Krankheitsaktivität zu einer Reduzierung des CRP-Wertes ohne gleichzeitig die TIMP-1-Konzentration zu beeinflussen.

Auch die negativen Korrelationen zwischen der MMP-2-aktiv bzw. der proMMP-2-Konzentration in den unstimulierten Tränen und den CRP- bzw. DAS-Werten im Plasma sind schwer zu erklären. Voraussetzung für solche Korrelationen wäre ein Zusammenhang zwischen der die CRP-Produktion steigernden Systemreaktion des Organismus und der Abnahme der MMP-Konzentration in der Tränenflüssigkeit. Zu erwarten wäre dann allerdings eher eine positive Korrelation.

4.3 Beziehungen zwischen den Plasma- und Tränenkonzentrationen der MMPs und TIMP-1: Ist das Plasma eine mögliche Quelle für die MMPs und TIMP-1 in der Tränenflüssigkeit?

Über die Herkunft der in der Tränenflüssigkeit gefundenen MMPs gibt es in der Literatur keine einheitlichen Aussagen. Mögliche Quellen stellen dar:

- die Tränendrüse
- die Bindehaut
- die Hornhaut
- Blutgefäße
- Entzündungszellen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, nach einem möglichen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der MMPs und TIMP-1 in der systemischen Blutzirkulation und der Tränenflüssigkeit zu suchen. Hierfür habe ich die mithilfe der ELISA-Kits gemessenen MMP- und TIMP-1-Konzentrationen auf Korrelationen zwischen Plasma und unstimulierten Tränen untersucht. Da dies nach meinem Wissen die erste Arbeit ist, in der für das hier gewählte Patientenkollektiv sowohl die Plasma- als auch die Tränenkonzentrationen verschiedener MMPs und TIMP-1 quantifiziert und zueinander in Beziehung gesetzt wurden, konnte ich die gewonnenen Daten nicht mit anderen Literaturangaben vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass bei den Patienten allein für die **aktive MMP-2** eine signifikante positive Korrelation zwischen Plasma und unstimulierten Tränen gefunden werden konnte. Für die übrigen untersuchten Metalloproteinasen ließen sich in diesem Kollektiv keine signifikanten Korrelationen feststellen. Im Falle der Kontrollen zeigte neben der **aktiven MMP-2** auch die **aktive MMP-9** eine positive Korrelation zwischen Plasma und unstimulierter Tränenflüssigkeit. Dabei lagen für beide Gelatinasen die Volumenaktivitäten im Plasma signifikant über den entsprechenden Werten in den unstimulierten Tränen. Für die **TIMP-1** fand sich ausschließlich im Patientenkollektiv eine signifikant negative Korrelation zwischen der Konzentration im Plasma und in den unstimulierten Tränen mit signifikant höherer Konzentration in der Tränenflüssigkeit.

Wenn über einen Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Enzymkonzentrationen in Plasma und präkornealem Tränenfilm diskutiert wird, stellt sich die Frage nach möglichen physiologischen Mechanismen, die eine solche Beziehung

erklären können. 99% der in der Tränenflüssigkeit gefundenen Proteine werden von der Tränendrüse selbst produziert. Um aus der Blutzirkulation in die von der Tränendrüse sezernierte Tränenflüssigkeit zu gelangen, muß ein Protein einen langen Weg zurücklegen. Hierzu gehören der Austritt des Proteins aus der Blutzirkulation, der Eintritt in das Interstitium der Tränendrüse, die Aufnahme in die Azinusepithelzellen und die nachfolgende Sekretion in das Tränendrüsenumen.

Die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren gehören als Proteine mit einem Molekulargewicht von 40-90 kDa zu den Makromolekülen. Die im Vergleich zu anderen Epithelien erhöhte Permeabilität des Gefäßendothels erlaubt diesen Proteinen den Austritt aus der Blutbahn und den Eintritt in das interstitielle Gewebe. Hierfür werden die Proteine von Vesikelausstülpungen der Plasmamembran (Caveolae) aufgenommen und durch die Endothelzelle geschleust. Da die negative Ladung der Plasmamembran im Bereich der Vesikelbildung weniger stark ausgeprägt ist, gelten Caveolae als spezielle Transportwege für anionische Plasmaproteine.

Um aus dem Interstitium des Tränendrüsengewebes in das luminale Sekret zu gelangen, muß eine Aufnahme der MMPs/TIMP-1 in das Azinusepithel der Tränendrüse und die nachfolgende Sekretion in das Lumen erfolgen. Unter normalen Bedingungen stellt das Epithel eine Barriere für Makromoleküle dar. Da ein parazellulärer Transport durch die Schlussleisten des Epithels nur für Wasser und niedrigmolekulare Ionen möglich ist, bleibt für Proteine nur der transzelluläre Transport. Dieser Mechanismus der Transzytose durch die Epithelbarriere ist nur für wenige Proteine beschrieben worden. Das bekannteste Beispiel ist der transepitheliale Transport von sekretorischem IgA aus dem Gewebe in das Sekret verschiedener exkretorischer Drüsen. In der Tränendrüse bindet das von Plasmazellen produzierte IgA an einen von den Epithelzellen produzierten transmembranären polymeren IgA-Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne die sogenannte „sekretorische Komponente“ bildet. Nach einer Klathrin-assoziierten Rezeptor-vermittelten Endozytose des Protein-Rezeptor-Komplexes wird das IgA in einem Vesikel durch das Zytoplasma der Zelle geschleust. Mit Erreichen der apikalen Plasmamembran wird nach Abspaltung der luminalen Rezeptordomäne von der Transmembrandomäne die „sekretorische Komponente“ gemeinsam mit ihrem Liganden per Exozytose in das Lumen der Tränendrüse sezerniert. Weitere Beispiele für einen transepithelialen Transport von Proteinen stellen der Transport des maternalen IgGs aus dem Blut durch die Plazentaschranke mithilfe des Fc-Rezeptors sowie die Megalin-vermittelte Transzytose des Thyreoglobulin durch die Follikelzellen der Schilddrüse dar (155, 156).

Für MMPs und TIMP-1 ist ein solcher Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Transzytose in der Literatur bislang nicht beschrieben worden. Unter physiologischen Bedingungen ist ein Übertritt dieser Proteine aus dem Plasma in das Sekret der Tränendrüse somit unwahrscheinlich. Möglicherweise existieren für diese Proteine aber andere, bisher nicht beschriebene transepitheliale Transportwege, ähnlich der unspezifischen oder Rezeptor-vermittelten Caveolae-assoziierten endothelialen Transzytose, die ihren Übertritt aus der Blutbahn in die Tränenflüssigkeit ermöglichen. Es ist allerdings schwer vorstellbar, dass derartige Transportwege ausschließlich für die aktiven Formen der MMP-2 und -9 vorliegen. Somit bleibt ungeklärt, warum die positiven Korrelationen zwischen Plasma und Tränen nur für die aktiven Gelatinasen gefunden wurden.

Untersuchungen des Darmepithels zeigten, dass das proinflammatorische Zytokin TNF α in der Lage ist, die natürliche Epithelbarriere zu zerstören und somit den transzellulären Transport von Proteinen hochzuregulieren (157, 158). RA-Patienten wiesen in dieser Arbeit eine im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte TNF α -Plasmakonzentration auf. Vorstellbar wäre, dass diese erhöhte Zytokinkonzentration analog den Vorgängen am Darmepithel zu einer Zerstörung der lakrimalen Epithelbarriere führt und den Transport der aktiven Gelatinasen vom Plasma in die Azinuszellen fördert.

Das sekundäre Sjögren Syndrom mit seiner verminderten Tränen- und Speichelsekretion ist eine bekannte Komplikation von Patienten mit rheumatoider Arthritis (81). Die bei den Patienten beobachtete Reduktion der Tränenproduktion ist dabei auf eine lymphozytäre Infiltration und Zerstörung des Tränendrüsenorgans zurückzuführen (159). Denkbar wäre, dass es hiermit einhergehend zu einer Veränderung der Blut-Tränensekret-Schranke bei den Patienten kommt, die zu einer erhöhten Permeabilität des Drüsenepithels für Proteine führt. Die Durchführung des Schirmertests vor Aufnahme in diese Studie galt dem Ausschluß von RA-Patienten, die an einer begleitenden „Sicca-Symptomatik“ im Rahmen eines sekundären Sjögren Syndrom litten. Einschränkend muß allerdings dargelegt werden, daß mithilfe dieses Tests ausschließlich das klinische Korrelat der zugrunde liegenden lymphozytären Infiltration bestimmt wird, dass aber über das Ausmaß der Tränendrüsenzerstörung keine Aussage getroffen werden kann. Bei vielen der in diese Studie aufgenommenen Patienten (50%) konnte anhand des Ergebnisses im Schirmer Test eine Tränenproduktion an der unteren Normgrenze konstatiert werden (Tab. 39 im Anhang). Es wäre nun denkbar, dass dieses Subkollektiv bereits eine lymphozytäre Infiltration der Tränendrüse mit hiermit einhergehender Schrankenstörung aufweist, über

die sich die bei den Patienten beobachteten positiven Korrelationen der aktiven Gelatinasen zwischen Plasma und unstimulierter Tränenflüssigkeit erklären ließen.

Fukuda et al (160) konnten in ihrer Studie zeigen, dass Fibronectin über dilatierte Konjunktivalgefäße aus dem Plasma in die Tränenflüssigkeit übertritt. Die Zugabe eines Vasokonstriktors beendete den Anstieg des Fibronectins in den Tränen. Bei der Untersuchung der Patienten und Kontrollen fand sich klinisch und anamnestisch kein Anhalt für eine bestehende Konjunktivitis, die in der Regel mit einer sichtbaren konjunktivalen Injektion auf der Augenoberfläche einhergeht. Eine mögliche subklinische Entzündung der Bindehaut, in deren Folge es über erweiterte Gefäße zum Austritt der untersuchten Gelatinasen kommt, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Allen genannten Transportmöglichkeiten (**Caveolae**, **Schrankenstörung**, **dilatierte Blutgefäße**) ist gemeinsam, dass sie konzentrationsabhängig sind. Da die MMPs im Plasma in höherer Konzentration vorlagen als in der Tränenflüssigkeit, wäre diese Voraussetzung erfüllt. Die beschriebenen Schrankenstörungen (verursacht durch TNF α bzw. ein sekundäres Sjögren Syndrom) sind auf RA-assoziierte pathologische Veränderungen der Epithelbarriere bzw. des Tränendrüsen Gewebes zurückzuführen. Sie können daher die bei den Gesunden zwischen Plasma und unstimulierten Tränen beobachteten positiven Korrelationen für die aktive MMP-2- und MMP-9 nicht erklären. Ebenso ungeklärt bleibt die Beobachtung, dass nur die aktiven Gelatinasen aus dem Plasma in die Tränen übertreten, da sowohl Schrankenstörungen als auch dilatierte Blutgefäße unselektive Transportwege darstellen.

Die bei den RA-Patienten beobachtete negative Korrelation zwischen der TIMP-1-Konzentration in Plasma und unstimulierten Tränen spricht für eine unabhängige Produktion des Inhibitors im Bereich des Auges. Dabei deutet die in beiden Kollektiven beobachtete positive Korrelation zwischen der TIMP-1-Konzentration in unstimulierten und stimulierten Tränen auf die Tränendrüse als Ursprungsort der Inhibitorsynthese hin. Da Proteasen oft koordiniert mit ihren Inhibitoren in einer Zelle expremiert und sezerniert werden (19) ist es wahrscheinlich, dass auch die MMPs aus der Tränendrüse stammen.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die MMPs in der Tränenflüssigkeit ihren Ursprung am ehesten in der Tränendrüse haben. Für die aktiven Gelatinasen in den Tränen muss aber auch das Plasma als Ursprungsort in Erwägung gezogen werden. Ungeklärt bleibt, auf welchem Weg die aktiven Proteasen aus der Blutbahn in die Tränenflüssigkeit übergetreten sind. Möglicherweise sind die aktiven Formen der MMPs in der Lage, selbstständig die Epithelbarriere zwischen Blut und Tränenflüssigkeit zu

durchdringen. Allerdings gibt es für diese bislang rein hypothetische Erklärung keine publizierten Hinweise.

4.4 Andere Quellen für die MMPs und TIMP-1 in der Tränenflüssigkeit

Ein alternativer Ursprung für die in der Tränenflüssigkeit gefundenen MMPs und TIMP-1 stellt das **Epithel der Bindehaut und Hornhaut** dar. Da bei der Entnahme der Tränenflüssigkeit aus dem unteren Fornix der Konjunktiva abgeschilferte Epithelzellen dieser Strukturen in die Proben gelangt sein können, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der in der Tränenflüssigkeit gefundenen MMP- und TIMP-1-Konzentration beider Kollektive hier ihren Ursprung hat. Einschränkend für das Epithel der gesunden Hornhaut ist allerdings festzuhalten, dass hier – wie an der Hornhaut von Ratten gezeigt wurde - neben TIMP-1 nur proMMP-2 als einzige Metalloproteinase konstitutiv exprimiert wird (45, 48).

Rolando et al (161) zeigten, dass Patienten mit einer normalen, aber grenzwertigen Tränenproduktion bereits Schäden an der Konjunktiva aufweisen, die denen bei ausgeprägter Keratokonjunktivitis sicca (KCS) gleichen. Dabei ist der Epithelschaden ausschließlich im interpalpebralen, nicht durch die Lider geschützten, Spalt lokalisiert. Als pathogenetischer Mechanismus wird hier eine erhöhte Osmolarität der Tränenflüssigkeit, bedingt durch die bei KCS erhöhte Tränenwasserverdunstung, verantwortlich gemacht (162, 163). Über ähnliche Schäden am Epithel der Hornhaut liegen mir keine Literaturangaben vor. Da aber auch diese Struktur nicht durch die Lider geschützt, und somit ebenfalls der erhöhten Verdunstung bei KCS ausgesetzt ist, ließe sich vermuten, dass es auch hier zu ähnlichen Epithelschäden kommt.

Es ist bekannt, dass Epitheldefekte der Hornhaut die Expression verschiedener Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren induzieren. Anhand eines Wundheilungsmodells der Kornea ließ sich zeigen, dass es nach Verletzung der Hornhaut zu einem Anstieg der MMP-9-Synthese im Epithel sowie zur Induktion der Genexpression der MMP-1 und -3 im Stroma kommt. Des Weiteren steigt die Rate der MMP-2-Synthese und es kommt zum Auftreten aktiver Enzymformen (46, 49). Auch für TIMP-1 ließ sich dieser Zusammenhang zwischen Verletzung und Synthesesteigerung nachweisen (48).

50% der in dieser Studie untersuchten Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Tränenproduktion an der unteren Normgrenze auf (Tab. 39 im Anhang). Wie oben beschrieben, könnte es bei ihnen zu einer gestörten Epithelbarriere von Horn- und Bindehaut gekommen sein, die einen Übertritt von im Stroma und Epithel synthetisierten MMPs und TIMP-1 in den präkornealen Tränenfilm erlaubt. Dies könnte

auch eine Erklärung für die im Vergleich zu den gesunden Probanden beobachtete - wenn auch nicht signifikant - höhere MMP-Konzentration bei den Patienten sein.

Obwohl sich in der Literatur keine Angaben über eine Synthese der MMPs und TIMP-1 in der **Tränendrüse** fanden, weisen die in dieser Studie gefundenen positiven Korrelationen zwischen der TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten und stimulierten Tränen beider Kollektive auf diese Struktur als Produktionsort hin. Auch der weiter unten diskutierte immunhistochemische Nachweis von MMP-1 sowie in schwächerem Maße von proMMP-2 und MMP-3 in gesundem Tränendrüsenewebe unterstützt diese Theorie.

Smith et al (96) konnten zeigen, dass die bei PUK-Patienten in der Tränenflüssigkeit nachgewiesene MMP-9 aus neutrophilen Granulozyten stammen. In der Tat konnte für viele **Entzündungszellen** eine Synthese von MMPs und ihren Inhibitoren nachgewiesen werden, wobei neben den neutrophilen Granulozyten vor allem Makrophagen eine Rolle zu spielen scheinen (85, 164). Da allerdings auch diese Zellen nicht in der Lage sind, die Schlussleisten des gesunden Tränendrüsenepithels zu durchdringen, wäre auch hier eine gestörte Barrierefunktion, wie etwa im Falle einer PUK, für einen Beitrag dieser Zellen zur nachgewiesenen MMP-Tränenkonzentration notwendig.

Insgesamt ist der bei Patienten und Kontrollen beobachtete gleichsinnige, wenn auch nicht in jedem Falle korrelierende Verlauf der Konzentrationsänderungen in Plasma und unstimulierten Tränen eher auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus zurückzuführen, der sowohl im Plasma als auch in der Tränenflüssigkeit Einfluß auf die MMP- und TIMP-1-Konzentration nimmt. Vorstellbar wäre hierbei zum Beispiel eine durch die Systemerkrankung induzierte Synthese eines Faktors (z. B. Zytokin-vermittelt), der die Produktion der MMPs sowohl im Synovialgewebe als auch in Horn-, Bindehaut und Tränendrüse stimuliert und die des TIMP-1 inhibiert. So ließe sich die im Vergleich zu den Kontrollen gefundene Konzentrationserhöhung der MMPs bzw. -erniedrigung des TIMP-1 in Plasma und unstimulierten Tränen von RA-Patienten erklären.

4.5 Beziehung zwischen TNF α und den MMPs und TIMP-1

Der Tumornekrosefaktor- α gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen und ist als solches an Immunantwort und Entzündungsgeschehen beteiligt. Auf seine Rolle in der Pathogenese und klinischen Symptomatik der RA wurde bereits eingegangen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien fand ich eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Zytokinkonzentration im Plasma der RA-Patienten (165).

TNF α ist ein normaler Bestandteil der gesunden Tränenflüssigkeit (166). Als mögliche Quelle werden dabei das Azinusepithel der Tränendrüse, das Hornhaut- und Bindehautepithel sowie inflammatorische Zellen genannt, wobei letztere in der gesunden Hornhaut nur in geringer Anzahl vorhanden sind (167, 168, 169). Mit Verletzung der Hornhaut kommt es in Zellen der Kornea und Tränendrüse zu einem Anstieg der TNF α -mRNA und damit einhergehend zu einer Erhöhung der TNF α -Konzentration in der Tränenflüssigkeit. Unsicher ist allerdings, ob die Tränendrüse auch an der Synthese des Proteins beteiligt ist (166, 167, 170).

Da TNF α in dieser Arbeit weder bei den Kontrollen noch bei den RA-Patienten in der stimulierten Tränenflüssigkeit nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass die Tränendrüse keinen Einfluß auf die hier gefundene TNF α -Tränenkonzentration ausübt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass auch das Plasma an der TNF α -Tränenkonzentration beteiligt sein kann, da in beiden Kollektiven eine positive Korrelation zwischen den Zytokinkonzentrationen in Plasma und unstimulierten Tränen beobachtet wurde. Über die bereits erwähnte Fähigkeit des Zytokins, Epithelbarrieren zu zerstören, ist es in der Lage, seinen eigenen Transport zwischen den beiden Körperflüssigkeiten zu induzieren.

Wie weiter oben beschrieben, konnte in vielen Studien nachgewiesen werden, dass TNF α die Expression und Synthese verschiedener Metalloproteinasen induziert. Gemeinsam mit IL-1 wurde es in hohen Konzentrationen in der Synovialmembran rheumatischer Gelenke gefunden, wobei TNF α in erster Linie von Makrophagen- und Fibroblasten-ähnlichen Zellen produziert wird (171).

In dieser Arbeit konnte sowohl im Plasma als auch in den unstimulierten Tränen eine signifikant positive Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-2 (Kontrollen) und der Konzentration der aktiven MMP-9 (Kontrollen und Patienten) beobachtet werden. Weiterhin korrelierte die TNF α -Tränenkonzentration bei den Patienten positiv mit der proMMP-2- und invers mit der TIMP-1-Konzentration.

Da die Rolle des TNF α als Induktor der MMP-Synthese in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben worden ist, soll hier nur kurz auf die Gemeinsamkeiten und Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen früherer Studien und meiner Arbeit hingewiesen werden. Klimiuk et al (172) konnten in ihrer Studie eine signifikant positive Korrelation zwischen der Serumkonzentration von TNF α und der von MMP-1, -3 und -9 bei RA-Patienten feststellen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Beobachtung verschiedener

Studien, nach der $\text{TNF}\alpha$ die Synthese dieser MMPs in Synovialzellen aus rheumatischen Gelenken und gesunden dermalen Fibroblasten stimuliert (72, 75, 76).

Da das Epithel von Binde- und Hornhaut kontinuierlich den verschiedenen Bestandteilen der Tränenflüssigkeit ausgesetzt ist, lassen sich die beobachteten positiven Korrelationen in den unstimulierten Tränen auch über eine Stimulierung der MMP-Synthese in den Epithelzellen dieser Strukturen durch $\text{TNF}\alpha$ in den Tränen erklären. Für das Epithel der Konjunktiva konnte ich in der Literatur keine Angaben über eine $\text{TNF}\alpha$ -induzierte MMP-Produktion finden. Mehrere Studien beschreiben allerdings eine Induktion der mRNA- und Proteinsynthese der MMP-1, -3 und -9 durch dieses Zytokin im Hornhautepithel (145, 146). Die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen $\text{TNF}\alpha$ und der aktiven MMP-9 in Plasma und unstimulierten Tränen ist demnach nachzuvollziehen.

Ob allerdings die hier beobachteten Korrelationen zwischen $\text{TNF}\alpha$ und der aktiven MMP-2 bzw. proMMP-2 ebenfalls auf eine Zytokin-induzierte Stimulation der Proteasesynthese zurückgeführt werden können, bleibt offen, da ich in der bislang publizierten Literatur keine Bestätigung dieses Ergebnisses finden konnte.

Obwohl nach meiner Kenntnis eine Suppression der TIMP-1-Produktion im Hornhautepithel durch $\text{TNF}\alpha$ bisher nicht beschrieben worden ist, wäre es denkbar, dass eine solche - ähnlich der bereits erwähnten $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Inhibition der TIMP-1-Synthese in Synovialzellen - für die bei RA-Patienten beobachtete negative Korrelation zwischen Zytokin und Inhibitor verantwortlich ist. Auch der bei RA-Patienten nachgewiesene Abfall der TIMP-1-Konzentration in der unstimulierten Tränenflüssigkeit könnte diese inverse Beziehung erklären.

Dass nur eine Korrelation zwischen $\text{TNF}\alpha$ und der Klasse der Gelatinasen (MMP-2/MMP-9) gefunden wurde, kann nicht erklärt werden. Ist diese Korrelation tatsächlich auf eine Induzierung der MMP-Synthese zurückzuführen, bleibt offen, aus welchem Grund sie dann nicht ebenfalls für die Kollagenase-1 (MMP-1) und für Stromelysin-1 (MMP-3) nachgewiesen werden konnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass mit $\text{TNF}\alpha$ ein möglicher Kandidat für den erwähnten gemeinsamen Regulationsmechanismus der MMP- und TIMP-1-Expression in den verschiedenen Körpergeweben (Synovia, Hornhaut, Bindehaut, Tränendrüse) gefunden worden ist. Zur Untermauerung dieser Hypothese wären allerdings weitere Arbeiten zur $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptorausstattung der unterschiedlichen Gewebe sowie genaue Analysen der Expressionsinduktion der einzelnen MMP- bzw. TIMP-1-Gene notwendig.

4.6 Lokalisation der MMPs und TIMP-1 in humanem Hornhaut- und Tränendrüsen­gewebe

Nach meinem Wissen ist dies die erste Arbeit, in der mithilfe der Immunhistochemie sowohl die Lokalisation von Kollagenase-1 und Stromelysin-1 als auch die der beiden Gelatinasen A und B sowie des Inhibitors TIMP-1 im Hornhautgewebe von RA-assoziierten Hornhautgeschwüren untersucht wurde.

In dem hier untersuchten **gesunden humanen Hornhautgewebe** ließen sich weder MMPs noch TIMP-1 nachweisen. Dieses Ergebnis überraschte insofern, da frühere Arbeiten anhand der Kornea von Kaninchen und Ratten zeigen konnten, dass die Gelatinase-A (MMP-2) ein konstitutiv in der normalen Hornhaut exprimiertes Enzym darstellt, welches sich ebenso wie der Inhibitor TIMP-1 in verschiedenen Studien in der gesunden Kornea nachweisen ließ (45, 48). Während Garrana et al (173) mein Ergebnis hinsichtlich eines fehlenden MMP-2-Nachweises im gesunden humanen Hornhautgewebe bestätigen, konnten Kenney et al (174) im menschlichen Hornhautepithel sehr geringe Mengen dieser Protease nachweisen. Der fehlende Nachweis der MMP-1, -3 und -9 in der gesunden menschlichen Hornhaut wird jedoch durch Ergebnisse anderer Arbeiten an Kaninchen bzw. Ratten bestätigt (45). Möglicherweise lassen sich die differenten Befunde bezüglich der MMP-2 durch die unterschiedlichen Spezies erklären. So wiesen Fini et al (50) in ihrer Studie bereits auf eine Speziesdifferenz in der Synthese von MMP-1 und -3 zwischen der Hornhaut von Ratten und Kaninchen hin.

Im **RA-assoziierten ulzerierten Hornhautgewebe** zeigte sich für proMMP-2 die stärkste Anfärbung. Es folgten in absteigender Intensität proMMP-9, MMP-3 und MMP-1. Am schwächsten färbte das Gewebe für den Inhibitor TIMP-1. Während proMMP-2 und MMP-1 in gleicher Weise im Epithel und Stroma nachweisbar waren, zeigten proMMP-9, MMP-3 und TIMP-1 eine intensivere Anfärbung im Hornhautstroma. Hinsichtlich der relativen Verteilung der MMP-Expriemierung zwischen Epithel und Stroma zeigten frühere Arbeiten anhand der Hornhaut von Kaninchen, dass MMP-1 und -3 in stromalen Fibroblasten produziert werden, während MMP-2 und -9 sowohl in Stroma- als auch in Epithelzellen synthetisiert werden können. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurde MMP-9 in diesen Studien allerdings in erster Linie in den Epithelzellen, MMP-2 vor allem in den Stromafibroblasten exprimiert (45, 49). Es existieren aber auch Studienergebnisse, in denen eine MMP-2-Lokalisation in gesundem wie auch erosivem humanem Hornhautepithel beschrieben wird, so dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeiten auch hier eventuell auf Speziesdifferenzen zurückzuführen sind (173, 174).

In der einzigen weiteren mir zugänglichen Arbeit zur Lokalisation von MMPs bzw. TIMP-1 bei Patienten mit RA-assoziierten Hornhautulzera berichteten Riley et al (85) über eine im Vergleich zu Kontrollen deutlich erhöhte MMP-1-Expression, die mit einem starken Abfall von TIMP-1 einherging. Übereinstimmend mit dieser Arbeit fand sich auch in meinem Untersuchungsgut eine im Vergleich zu TIMP-1-Expression deutlich erhöhte Proteasen-Expression. Dies stellt im Sinne eines Ungleichgewichts zwischen destruirenden und protektiven Mechanismen des Gewebes das pathophysiologische Korrelat der Hornhautulzeration dar.

Frühere Studien an Hornhautexzidaten von Patienten mit nicht heilenden Ulzera (genaue Ursache wurde nicht genannt!) bzw. von Patienten mit rezidivierenden kornealen Erosionen (Ursache ebenfalls nicht spezifiziert!) konnten mithilfe der Immunhistochemie MMP-2 und TIMP-1 und -2 sowohl epithelial als auch subepithelial nachweisen (173, 174).

Die Abnahme bzw. fehlende Zunahme der Farbtintensität im Hornhautulkus nach Behandlung der Schnitte mit dem Sekretionshemmer Monensin weist darauf hin, dass diese Proteine nicht von den Epithelzellen oder Keratozyten der Hornhaut selbst synthetisiert wurden, sondern dort möglicherweise über Diffusion aus den Tränen gelangt und während der Inkubation teilweise desintegriert sind. Diese Deutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Behandlung der **gesunden Tränendrüse** mit Monensin die Farbreaktion der Schnitte für MMP-1, proMMP-2 und MMP-3 deutlich verstärkte. Das Fehlen von immunreaktivem Material im normalen Tränendrüsenewebe ohne Zugabe der Ionophore spricht für eine schnelle Sekretion dieser Enzyme nach ihrer Synthese ohne weitere intrazelluläre Speicherung.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in der Tat alle der hier untersuchten Matrixmetalloproteinasen im ulzerierten Hornhautgewebe nachweisbar waren, so dass ihre Beteiligung an der Pathogenese dieser Komplikation der rheumatoiden Arthritis hoch wahrscheinlich ist. Wahrscheinlicher Ursprungsort für diese Proteasen ist dabei die Tränendrüse.

5. Schlussfolgerungen

Die eingangs definierten Fragestellungen können wie folgt beantwortet werden:

1. Gibt es zwischen RA-Patienten und Kontrollen einen signifikanten Unterschied bezüglich den Konzentrationen der untersuchten Proteine in den drei Körperflüssigkeiten?

Patienten mit Rheumatoider Arthritis weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen in ihrem Plasma signifikant höhere Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins TNF α sowie der MMP-3 und der Proform der MMP-9 auf. Gleichzeitig ist die Plasmakonzentration des natürlichen MMP-Inhibitors TIMP-1 bei RA-Patienten deutlich vermindert. Während bezüglich der MMPs weder in der unstimulierten noch in der stimulierten Tränenflüssigkeit ein signifikanter Unterschied zwischen dem Patienten- und Kontrollkollektiv festzustellen war, lag die TIMP-1-Konzentration der RA-Patienten in den unstimulierten Tränen deutlich unterhalb der entsprechenden Konzentration der Kontrollen.

Bei RA-Patienten ist das Verhältnis von TIMP-1- zur MMP-Konzentration ([TIMP-1/MMP]-Ratio) in Plasma und unstimuliertem Tränensekret – vermutlich durch die differente Wirkung von Zytokinen auf die Synthese von MMPs bzw. TIMP-1 – tendenziell niedriger als bei gesunden Kontrollen. Dieses zugunsten der MMPs bestehende Ungleichgewicht zwischen Proteinasen und Inhibitoren ist maßgeblich an der Pathogenese der RA und des sterilen Hornhautulkus beteiligt.

2. Korrelieren die Konzentrationen der MMPs und TIMP-1 in Plasma, unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit mit der Krankheitsaktivität der RA?

Der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen der Plasma-MMP-3 und BSG zeigt, daß diese Protease als Marker für die Krankheitsaktivität der RA gewertet werden kann. Die beobachtete negative Korrelation zwischen der Konzentration der Proteasen in der unstimulierten Tränenflüssigkeit (MMP-2-aktiv und proMMP-2) und den CRP- bzw. DAS-Werten im Plasma setzt einen Zusammenhang zwischen der Systemreaktion des Organismus im Rahmen der RA (CRP-Steigerung) und der MMP-Konzentration in der Tränenflüssigkeit (Abnahme) voraus. Unter Berücksichtigung der im Rahmen der RA

ablaufenden Pathomechanismen (MMP-Synthesesteigerung) wäre hier allerdings eher mit einer positiven Korrelation zu rechnen gewesen. Für die stimulierte Tränenflüssigkeit ließen sich keine signifikanten Korrelationen mit den Aktivitätsmarkern feststellen.

3. Korrelieren die Konzentrationen der untersuchten MMPs/TIMP-1/TNF α zwischen den verschiedenen Körperflüssigkeiten?

Für die aktiven Formen der MMP-2 (Patienten und Kontrollen) und MMP-9 (Kontrollen) ließen sich positive Korrelationen zwischen ihren Konzentrationen in Plasma und unstimulierten Tränen nachweisen. Wird das Plasma als Ursprungsort für die in der Tränenflüssigkeit vorhandenen MMPs/TIMP-1 angenommen, wäre ein physiologischer Übertritt dieser Moleküle von der Blutbahn in das Tränendrüseninterstitium notwendig. Ein derartiger transepithelialer Transportweg ist für diese Proteine bisher nicht beschrieben worden. Das Vorliegen noch unbekannter Transportwege, die nur auf die Klasse der aktiven Gelatinasen beschränkt sind, ist schwer vorstellbar. Dass die Korrelationen auch bei den Kontrollen gefunden wurden, macht es unwahrscheinlich, dass RA-assoziierte pathologische Veränderungen der Epithelbarriere bzw. des Tränendrüsen Gewebes die Ursache dieser Beziehung zwischen Plasma und unstimulierten Tränen sind.

Die negative Korrelation zwischen der TIMP-1-Konzentration in Plasma und unstimulierten Tränen bei den Patienten spricht für eine unabhängige Produktion des Inhibitors im Bereich des Auges. Die bei Patienten und Kontrollen beobachtete positive Korrelation für die TIMP-1-Konzentration zwischen unstimulierter und stimulierter Tränenflüssigkeit läßt dabei auf die Tränendrüse als Syntheseort schließen. Da Proteasen oft koordiniert mit ihren Inhibitoren in einer Zelle exprimiert und sezerniert werden, ist es wahrscheinlich, dass auch die Metalloproteinasen aus der Tränendrüse stammen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit demnach am ehesten auf die Tränendrüse als Ursprungsort für die MMPs in der Tränenflüssigkeit hin. Für die aktiven Gelatinasen in den Tränen muß aber auch ein Ursprung im Plasma in Erwägung gezogen werden. Dabei bleibt allerdings unklar, auf welchem Weg die aktiven Proteasen aus der Blutbahn in die Tränenflüssigkeit übergetreten sind. Andere mögliche Quellen für die in der Tränenflüssigkeit gefundenen MMPs stellen das Binde- und Hornhautepithel sowie inflammatorische Zellen dar.

Auch für TNF α konnte bei RA-Patienten und Kontrollen eine positive Korrelation zwischen der Konzentration im Plasma und in den unstimulierten Tränen nachgewiesen

werden. Durch die Fähigkeit dieses Zytokins, Epithelbarrieren zu zerstören, ist es in der Lage, seinen eigenen Transport zwischen diesen beiden Körperflüssigkeiten zu induzieren.

4. Gibt es eine Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration und den Konzentrationen der verschiedenen MMPs und TIMP-1 in diesen Körperflüssigkeiten?

Die beobachteten positiven Korrelationen zwischen der TNF α -Konzentration und der Konzentration der aktiven MMP-9 (Patienten/Kontrollen) bzw. der Konzentration der aktiven MMP-2 (Kontrollen) in Plasma sowie unstimulierten Tränen und zwischen TNF α und der proMMP-2-Konzentration (Patienten) im unstimulierten Tränensekret können als Hinweis auf eine Zytokin-induzierte Stimulation der MMP-Synthese gewertet werden. Eine Korrelation zwischen TNF α und MMP-2 ist bisher noch nicht beschrieben worden. Dass nur eine Korrelation für TNF α und die Gelatinasen (MMP-2/-9) gefunden wurde, kann nicht erklärt werden. Das Patientenkollektiv zeichnet sich zusätzlich durch eine negative Korrelation zwischen der Zytokin- und TIMP-1-Konzentration in den unstimulierten Tränen aus. Dies stimmt mit der in diesem Kollektiv signifikant erniedrigten Inhibitor-Konzentration überein. In der stimulierten Tränenflüssigkeit konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen Zytokin und MMPs bzw. TIMP-1 nachgewiesen werden.

5. Finden sich MMPs und TIMP-1 im Hornhautgewebe von Patienten mit rheumatischem Ulkus in höheren Konzentrationen und in abweichender Lokalisation als bei gesunden Hornhäuten? Werden MMPs und TIMP-1 im gesunden Gewebe der Tränendrüse exprimiert?

Während das gesunde Hornhautgewebe weder MMPs noch TIMP-1 enthält, können sowohl die Proteasen als auch der Inhibitor im ulzerierten Hornhautgewebe von RA-Patienten mit sterilem Korneaulkus in deutlicher Konzentration nachgewiesen werden. Dabei liegt die Konzentration der einzelnen Proteasen (proMMP-2 > proMMP-9 > MMP-3 > MMP-1) deutlich über der TIMP-1-Konzentration. Dieses Ergebnis deutet einmal mehr auf die Bedeutung eines Ungleichgewichts zwischen den Proteasen und ihrem Inhibitor für die Entstehung des sterilen Korneaulkus bei RA-Patienten hin. Aufgrund des fehlenden Nachweises im gesunden Gewebe kann keine Aussage über eine mögliche differente Lokalisation der Proteasen und TIMP-1 zwischen gesundem und ulzeriertem

Hornhautgewebe getroffen werden. Im gesunden Tränendrüsen­gewebe gelang der Nachweis von proMMP-2, MMP-3 und MMP-1. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Tränendrüse der wahrscheinliche Syntheseort für die Proteasen in der Tränenflüssigkeit ist.

6. Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis sowie des RA-assoziierten sterilen Hornhautulkus.

In dieser Studie habe ich mithilfe von ELISA-Kits die Konzentrationen verschiedener MMPs, TIMP-1 und TNF α in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen von RA-Patienten ohne okuläre Beteiligung und Kontrollen bestimmt. Weiterhin wurde gesundes bzw. ulzeriertes Hornhaut- und gesundes Tränendrüsen-gewebe immunhistochemisch auf seinen MMP- bzw. TIMP-1- Gehalt untersucht.

Während RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant höhere Plasmakonzentrationen an MMP-3, proMMP-9 und TNF α aufwiesen, war ihre TIMP-1-Konzentration im Plasma und unstimulierten Tränensekret deutlich vermindert. Positive Korrelationen zwischen Plasma und unstimulierten Tränen ergaben sich für die aktive MMP-2 und TNF α bei Patienten und Kontrollen, für die aktive MMP-9 bei den Kontrollen. Für TIMP-1 zeigte sich zwischen Plasma und unstimulierten Tränen bei den Patienten eine inverse Korrelation. In beiden Kollektiven fanden sich für TIMP-1 eine positive Korrelationen zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen. Positive Korrelationen zwischen TNF α und MMPs/TIMP-1 in Plasma und unstimulierten Tränen ergaben sich für die aktive MMP-9 bei Patienten und Kontrollen, für die aktive MMP-2 nur bei den Kontrollen. In den unstimulierten Tränen der Patienten korrelierte TNF α positiv mit proMMP-2 und negativ mit TIMP-1. Während ulzeriertes Korneagewebe hohe MMP- und niedrige TIMP-1-Konzentrationen aufwies, fanden sich im gesunden Gewebe weder Proteasen noch Inhibitor.

Die im Patientenplasma und ulzerierten Hornhautgewebe nachweisbare erhöhte MMP- bzw. erniedrigte TIMP-1-Konzentration weist auf die Bedeutung eines Ungleichgewichts zwischen Proteasen (Gewebedestruktion) und ihrem Inhibitor (Gewebe-protektion) als pathogenetisches Korrelat des Korneaulkus hin. Möglicherweise deutet die erniedrigte TIMP-1-Tränenkonzentration der RA-Patienten ohne okuläre Beteiligung auf eine erhöhte Anfälligkeit dieses Patientenkollektivs für die Entwicklung eines sterilen Korneaulkus hin.

Die MMPs und TIMP-1 in den Tränen stammen am ehesten aus der Tränendrüse. Hierfür sprechen die positive Korrelationen zwischen der TIMP-1-Konzentration in unstimulierten und stimulierten Tränen sowie der immunhistochemische Nachweis von proMMP-2, MMP-3 und MMP-1 im gesunden Tränendrüsen-gewebe. Für die aktiven Gelatinasen in den Tränen muss aber auch das Plasma als Ursprungsort in Erwägung

gezogen werden, wobei allerdings ungeklärt bleibt, auf welchem Weg die Proteasen aus der Blutbahn in die Tränenflüssigkeit übertreten.

Die positiven Korrelationen zwischen TNF α und proMMP-2, MMP-2-aktiv und MMP-9-aktiv bzw. die inverse Korrelation zwischen TNF α und TIMP-1 in Plasma und unstimulierten Tränen lässt sich durch die Fähigkeit des Zytokins erklären, die MMP- bzw. TIMP-1-Synthese in verschiedenen Geweben zu induzieren bzw. zu hemmen. Eine mögliche Erklärung für die gleichsinnigen, zum Teil korrelierenden MMP- und TIMP-1-Konzentrationsänderungen zwischen Plasma und Tränen beider Kollektive ist eine gemeinsame Regulation ihrer Expression durch TNF α .

7. Literaturnachweis

1. Hazleman BL, Watson PG: **Ocular complications of rheumatoid arthritis.** Clin Rheum Dis; 3: 501-526 (1977)
2. Foster CS, Forstot SL, Wilson LA: **Mortality rate in rheumatoid arthritis patients developing necrotizing scleritis or peripheral ulcerative keratitis; effects of systemic immunosuppression.** Ophthalmology; 91: 1253-1263 (1984)
3. Murphy G, Hembrey RM: **Proteinases in rheumatoid arthritis.** J Rheumatol; (suppl 32) 19: 61-64 (1992)
4. Slansky HH, Gnädinger MC, Itoi M, Dohlman CH: **Collagenases in corneal ulcerations.** Arch Ophthalmol; 82: 108-111 (1969)
5. Woessner JF Jr: **Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.** FASEB J; 5: 2145-2154 (1991)
6. Birkedal-Hansen H: **Proteolytic remodeling of extracellular matrix.** Curr Opin Cell Biol; 7: 728-735 (1995)
7. Sternlicht MD, Werb Z: **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.** Annu Rev Cell Dev Biol; 17: 463-516 (2001)
8. Shapiro SD: **Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.** Curr Opin Cell Biol; 10: 602-608 (1998)
9. Ries C, Petrides PE: **Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease.** Biol Chem; 376: 345-355 (1995)
10. Gross J, Lapiere CM: **Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay.** Proc Natl Acad Sci USA; 48: 1014-1022 (1962)

11. Nagase H, Woessner Jr. JF: **Matrix metalloproteinases**. J Biol Chem; 274: 21491-21494 (1999)
12. Wong TTL, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT: **Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment**. Surv Ophthalmol; 47: 239-256 (2002)
13. Gross J: **An essay on biological degradation of collagen**. In „Cell biology of the extracellular matrix“ (E.D. Hay, Ed.); pp 217-258. Plenum, New York (1982)
14. Baricos WH, Murphy G, Zhou Y, Nguyen HH, Shah SV: **Degradation of glomerular basement membrane by purified mammalian metalloproteinases**. Biochem J; 254: 609-612 (1988)
15. Liotta LA, Rao CN, Wewer UM: **Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane**. Annu Rev Biochem; 55: 1037-1055 (1986)
16. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H: **Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase-9**. J Biol Chem; 267: 3581-3584 (1992)
17. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJP: **Stromelysin is an activator of procollagenase**. Biochem J; 248: 265-268 (1987)
18. Woessner JF: **The matrix metalloproteinase family**. In: Parks, WC, Mecham RP (Eds.), Matrix metalloproteinases. Academic Press, San Diego, pp. 1-13 (1998)
19. Murphy G, Docherty AJP: **The matrix metalloproteinases and their inhibitors**. Am J Respir Cell Mol Biol; 7: 120-125 (1992)
20. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I: **Matrix metalloproteinases in arthritic disease**. Arthritis Res; 4 (suppl 3): 39-49 (2002)

21. Sivak JM, Fini ME: **MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology.** Prog in Retin Eye Res; 21: 1-14 (2002)
22. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: **Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.** J Biol Chem; 270: 5331-5338 (1995)
23. Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinkerhoff CE: **Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.** In: Parks WC, Mecham RP: Matrix Metalloproteinases. Auflage 299-356. New York: Academic (1998)
24. Emonard H, Grimaud JA: **Matrix metalloproteinases. A review.** Cell Mol Biol; 36: 151-153 (1990)
25. Shapiro SD, Kobayashi DK, Pentland AP, Welgus HG: **Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme- and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms.** J Biol Chem; 268: 8170-8175 (1993)
26. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M: **Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor-alpha.** Nature; 337: 661-663 (1989)
27. Schönthal A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ, Ponta H: **Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters.** Cell; 54: 325-334 (1988)
28. Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM: **TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence.** Cell; 61: 267-278 (1990)

29. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H: **The cystein switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.** Proc Natl Acad Sci USA; 87: 5578-5582 (1990)
30. Nagase H: **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** Biol Chem; 378: 151-160 (1997)
31. Saksela O, Rifkin DB: **Cell-associated plasminogen-activation: Regulation and physiological functions.** Annu Rev Cell Biol; 4: 93-126 (1988)
32. Ellis V, Behrendt N, Dano K: **Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated und isolated receptor.** J Biol Chem; 266: 12752-12758 (1991)
33. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H: **Mechanism of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin).** Biochemistry; 29: 10261-10270 (1990)
34. Pei D, Weiss SJ: **Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.** Nature; 375: 244-247 (1995)
35. Santavicca M, Noel A, Angliker H, Stoll I, Segain JP, Anglard P, Chretien M, Seidah N, Basset P: **Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate ant furin-type convertases.** Biochem J; 315: 953-958 (1996)
36. Williamson RA, Carr MD, Frenkiel TA, Feeney J, Freedman RB: **Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 by NMR chemical shift perturbation.** Biochemistry; 36: 13882-13889 (1997)
37. **Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. Methods Enzymol; 248: 496-510 (1995)**

38. **Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta; 1477: 267-283 (2000)**
39. Sternlicht MD, Bergers G: **Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: a status and prospects.** Emerging Ther Targets; 4: 609-633 (2000)
40. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z: **MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis.** Cell; 103: 481-490 (2000)
41. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA: **Elevated matrix metalloproteinase and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularisation.** Proc Natl Acad Sci USA; 97: 2202-2207 (2000)
42. Cintron C, Kublin CL: **Regeneration of corneal tissue.** Dev Biol; 61: 346-357 (1977)
43. Cionni RJ, Katakami C, Lavrich JB, Kao WW: **Collagen metabolism following corneal laceration in rabbits.** Curr Eye Res; 5: 549-558 (1986)
44. Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME: **Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea.** Dev Biol; 147: 425-439 (1991)
45. Fini ME, Girard MT: **Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 31: 1779-1788 (1990)
46. Matsubara M, Zieske J, Fini ME: **Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 32: 3221-3237 (1991)

47. Fini ME, Yue BYJT, Sugar J: **Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in normal and keratoconus corneas.** *Curr Eye Res*; 11: 849-862 (1992)
48. Ye HQ, Azar DT: **Expression of gelatinase A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 39: 913-921 (1998)
49. Girard MT, Matsubara M, Kublin C, Tessier M, Cintron C, Fini ME: **Stroma fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term remodelling of repair tissue.** *J Cell Sci*; 104: 1001-1011 (1993)
50. Fini ME, Parks WC, Rinehart WB, Girard MT, Matsubara M, Cook JF, West-Mays JA, Sadow PM, Burgeson RE, Jeffrey JJ, Raizman MB, Krueger RR, Zieske JD: **Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury.** *Am J of Pathol*; 149: 1287-1302 (1996)
51. **World Health Organisation:** Epidemiological and vital statistics report; 19: 437 (1996)
52. Kenyon KR: **Inflammatory mechanisms in corneal ulceration.** *Trans Am Ophthalmol Soc*; 83: 610-663 (1985)
53. Berman MB, Kenyon K, Hayashi K, L'Hernault N: **The pathogenesis of epithelial defects and stromal ulceration.** In: Cavanagh D (ed.). *The Cornea: Transactions of the world congress on the cornea III*, p. 35-43. Raven Press, New York (1988)
54. Pfister R, Burnstein N: **The alkali burned cornea I. Epithelial and stromal repair.** *Exp Eye Res*; 23: 519-535 (1976)
55. Kenyon KR, Berman M, Rose J, Gage J: **Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens: evidence for the role of PMNs in collagen degradation.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 18: 570-587 (1979)

56. Foster CS, Zelt RP, Mai-Phan T, Kenyon KR: **Immunosuppression and selective inflammatory cell depletion: studies on a guinea pig model of corneal ulceration after alkali burning.** Arch Ophthalmol; 100: 1820-1824 (1982)
57. Pfister RR, Murphy GE: **Corneal ulcer and perforation associated with Sjögren's syndrome.** Arch Ophthalmol; 98: 89-94 (1980)
58. Gnädinger MC, Itoi M, Slansky HH, Dohlman CH: **The role of collagenase in the alkali-burned cornea.** Am J Ophthalmol; 68: 478-483 (1969)
59. Slansky HH, Dohlman CH: **Collagenase and the cornea.** Surv Ophthalmol; 14: 402-415 (1970)
60. Brown SI: **Collagenase and corneal ulcers.** Invest Ophthalmol; 10: 203 (1971)
61. Brown SI, Wassermann HE, Dunn MW: **Alkali burns of the cornea.** Arch Ophthalmol; 82: 91-94 (1969)
62. Berman MB: **Collagenase and corneal ulceration.** In Collagenase in normal and pathological connective tissues; Woolley DE and Evanson JM, editors. Chicester, John Wiley, 1980 pp. 140-174
63. Itoi M, Gnädinger MC, Slansky H, Freeman MI, Dohlman CH: **Collagenase in the cornea.** Exp Eye Res; 8: 369-373 (1969)
64. Fini ME, Cook JR, Mohan R: **Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair.** Arch Dermatol; 290: 12-23 (1998)
65. Messmer EM, Foster CS: **Vasculitic peripheral ulcerative keratitis.** Surv Ophthalmol; 43: 379-396 (1999)
66. Ladas JG, Mondino BJ: **Systemic disorders associated with peripheral corneal ulceration.** Curr Opin Ophthalmol; 11: 468-471 (2000)

67. Brown SI, Grayson M: **Marginal furrows. A characteristic corneal lesion of rheumatoid arthritis.** Arch Ophthalmol; 79: 563-567 (1968)
68. Sule A, Balakrishnan C, Gaitonde S, Mittal G, Pathan E, Gokhale NS, Joshi VR: **Rheumatoid corneal melt.** Rheumatology; 41: 705-706 (2002)
69. McKibben M, Isaacs JD, Morrell AJ: **Incidence of corneal melting in association with systemic disease in the Yorkshire region.** Br J Ophthalmol; 83: 941-943 (1999)
70. Harris ED Jr: **Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy.** N Engl J Med; 322: 1277-1289 (1990)
71. Gross WL: **Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.** In: Claasen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. 4. Aufl., 475-528, Urban&Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1998)
72. Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP: **Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines.** J Clin Invest; 88: 1656-1662 (1991)
73. Krane SM, Conca W, Stephenson ML, Amento EP, Goldring MB: **Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis.** N Y Acad Sci; 580: 340-354 (1990)
74. Cunnane G, Hummel KM, Muller-Ladner U, Gay RE, Gays S: **Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz.); 46: 1-7 (1998)
75. Dayer J-M, Beutler B, Cerami A: **Cachectin/Tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts.** J Exp Med; 162: 2163-2168 (1985)

76. MacNaul KL, Chartain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI: **Discoordinate expression of stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts: synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor – alpha on stromelysin expression.** J Biol Chem; 265: 17238-17245 (1990)
77. Mainardi CL: **Biochemical mechanisms of articular destruction.** Rheum Dis Clin North Am; 13: 215-233 (1987)
78. Maeda S, Sawai T, Uzuki M, Takahashi Y, Omoto H, Seki M, Sakurai M: **Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis; 54: 970-975 (1995)
79. McGuire MB, Murphy G, Reynolds JJ, Russell RGG: **Production of collagenase and inhibitor (TIMP) by normal, rheumatoid and osteoarthritic synovium in vitro: effects of hydrocortison and indomethacin.** Clin Sci; 61: 703-710 (1981)
80. Cambray GJ, Murphy G, Page-Thomas DP, Reynolds JJ: **The production in culture of metalloproteinases and an inhibitor by joint tissues from normal rabbits, and from rabbits with a model arthritis.** I Synovium Rheumatol Int; 1: 11-16 (1981)
81. Hick S, Duchesne B, Kaye O, Marechal-Couortois C, Galand A: **Les ulcères de cornée associés à la polyarthrite rhumatoïde.** Rev Med Liege; 57: 228-232 (2002)
82. Jayson MIV, Easty DL: **Ulceration of the cornea in rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis; 36: 428-432 (1977)
83. Kervick GN, Pflugfelder SC, Haimovici R, Brown H, Tozman E, Yee R: **Paracentral rheumatoid corneal ulceration.** Ophthalmology; 99: 80-88 (1992)

84. Eiferman RA, Carothers BS, Yankeelov Jr: **Peripheral rheumatoid ulceration and evidence for conjunctival collagenase production.** Am J Ophthalmol; 87: 703-709 (1979)
85. Riley GP, Harrall RL, Watson PG, Cawston TE, Hazleman BL: **Collagenase (MMP-1) and TIMP-1 in destructive corneal disease associated with rheumatoid arthritis.** Eye; 9: 701-718 (1995)
86. Bialasiewicz AA, Naumann GOH: **Tektonische Keratoplastik bei perforiertem Hornhautulkus bei Sjögren-Syndrom.** Klin Mbl Augenheilk; 193: 554-564 (1988)
87. Gudas PP, Altman B, Nicholson DH, Green WR: **Corneal perforation in Sjögren's Syndrome.** Arch Ophthalmol; 90: 470-472 (1973)
88. Böke W, Thiel HJ, Winter R: **Hornhautveränderungen bei rheumatoider Arthritis und Sjögren-Syndrom mit besonderer Berücksichtigung der rheumatischen Keratomalazie.** Klin Mbl Augenheilk; 168: 483 (1976)
89. Wilson FM, Grayson M, Ellis FD: **Treatment of peripheral corneal ulcers by limbal conjunctivectomy.** Br J Ophthalmol; 60: 713-719 (1976)
90. Reynolds I, John SL, Tullo AB et al: **Characterization of two corneal epithelium-derived antigens associated with vasculitis.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 40: 2147-2151 (1998)
91. Diaz-Valle D, Benitez del Castillo JM, Sayagues O, Banares A, Garcia-Sanchez J: **Immunologic and clinical evaluation of postsurgical necrotizing sclerocorneal ulceration.** Cornea; 17: 371-375 (1998)
92. Michels ML, Cobo M, Cadwell DS, Rice JR, Haynes BF: **Rheumatoid arthritis and sterile corneal ulceration; analysis of tissue immune effector cells and ocular epithelial antigens using monoclonal antibodies.** Arthritis Rheum; 27: 606-614 (1984)

93. Saal JG, Fritz P, Zymela B, Zierhut M, Dürk H, Müller CA, Pleyer U, Thiel HJ: **Keratomalazie bei rheumatoider Arthritis: immunhistologische und enzymhistochemische Untersuchungen.** Z Rheumatol; 50: 151-159 (1991)
94. Smith VA, Hoh HB, Easty DL: **Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis.** Br J Ophthalmol; 83: 1376-1383 (1999)
95. Geerling G, Jousseaume AM, Daniels JT, Mullholland B, Khaw PT, Dart JKG: **Matrix metalloproteinases in sterile corneal ulceration.** Ann N Y Acad Sci; 878: 571-574 (1999)
96. Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL: **Tear film MMP accumulation and corneal disease.** Br J Ophthalmol; 85: 147-153 (2001)
97. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem; 72: 248 (1976)
98. Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C: **The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels.** Anal Biochem; 64: 509 (1975)
99. Morré DJ, Morré DM, Mollenhauer HH, Reutter W: **Golgi apparatus cisternae of monensin-treated cells accumulate in the cytoplasm of liver slices.** Eur J Cell Biol; 43: 235-242 (1987)
100. Limb GA, Chignell AH, Green W, LeRoy F, Dumonde DC: **Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy.** Br J Ophthalmol; 80: 168-173 (1996)

101. Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, Keysser M, Gromnica-Ihle E, Franz J, Burmester G, Jung K: **Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers.** *J Rheumatol*; 26: 251-258 (1999)
102. Zucker S, Lysik RM, Zattabi MH, Greenwald RA, Gruber BL, Tickle SP, Baker TS, Docherty AJP: **Elevated plasma stromelysin levels in arthritis.** *J Rheumatol*; 21: 2329-2333 (1994)
103. Yoshihara Y, Obata K, Fujimoto N, Yamashita K, Hayakawa T, Shimmei M: **Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*; 38: 969-975 (1995)
104. Manicourt D-H, Fujimoto N, Obata K, Thonar EJ-M: **Levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of antigenic keratan sulfate and systemic parameters of inflammation.** *Arthritis Rheum*; 38: 1031-1039 (1995)
105. Cunnane G, FitzGerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B: **Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis.** *Arthritis and Rheum*; 44: 2263-2274 (2001)
106. Yamanaka H, Matsuda Y, Tanaka M, Gludo W, Nakajima H, Taniguchi A, Kamatani N: **Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during six months of measurement, in patients with early rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*; 43: 852-858 (2000)

107. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier J-M, Pelletier J-P: **Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** Lab Invest; 70: 807-815 (1994)
108. Okada Y, Takeuchi N, Tomita K, Nakanishi I, Nagase H: **Immunolocalisation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis; 48: 645-653 (1989)
109. Harris ED Jr, DiBona DR, Krane SM: **Collagenase in human synovial fluid.** J Clin Invest; 48: 2104- (1969)
110. Walakovitz LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallik GS, Lark MW: **Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid and posttraumatic knee injury.** Arthritis Rheum; 35: 35-42 (1992)
111. Ishiguro N, Ito T, Obata K-I, Fujimoto N, Iwata H: **Determination of stromelysin-1, 72 and 92kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in the synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis.** J Rheumatol; 23: 1599-1604 (1996)
112. Clark IM, Powell LK, Ramsey S, Hazleman BL, Cawston TE: **The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** Arthritis and Rheum; 36: 372-379 (1993)
113. Sasaki S, Iwata H, Ishiguro N, Obata N, Miura T: **Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.** Clin Rheumatol; 13: 228-233 (1994)
114. Gaudin P, Razakaboay M, Surla A, Berthier S, Fauconnier J, Morel F, Phelip X: **A study of metalloproteinases in fifty joints fluid specimens.** Rev Rhum Engl Ed; 64: 375-381 (1997)

115. Gravallesse EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH: **In situ hybridisation studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium.** *Arthritis Rheum*; 34: 1076-1084 (1991)
116. Sawai T, Murakami K, Ohtani Y, Kurkinnen M, Kyogoku M, Hayashi M: **Stromelysin synthesizing cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis demonstrated by in situ hybridisation and immunohistochemical methods.** *Tohoku J Exp Med*; 160: 285-286 (1990)
117. Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL: **Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis*; 54: 25-32 (1995)
118. McCachren SS, Haynes BF, Niedl JE: **Localisation of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridisation histochemistry.** *J Clin Immunol*; 10: 19-27 (1990)
119. McCachren SS: **Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium.** *Arthritis Rheum*; 34: 1085-1093 (1991)
120. Tetlow LC, Lees M, Ogata Y, Nagase H, Wooley DE: **Differential expression of gelatinase B (MMP-9) and stromelysin-1 (MMP-3) by rheumatoid synovial cells in vitro and in vivo.** *Rheumatol Int*; 13: 53-59 (1993)
121. Ito A, Nagase H: **Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase.** *Arch Biochem Biophys*; 267: 211-216 (1988)
122. Hastly KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM: **The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis.** *Arthritis Rheum*; 33: 388-397 (1990)

123. Sopata I, Wize J, Filipowicz-Sosnoswska A, Stanislawska-Biernat J, Brzezinska B, Maslinski S: **Neutrophil gelatinase levels in plasma and synovial fluid of patients with rheumatic diseases.** *Rheumatol Int*; 15: 9-14 (1995)
124. Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR, Arbeit LA: **Markedly elevated serum MMP-9 (Gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker.** *Clin Immunol Immunopathol*; 78: 161-171 (1996)
125. Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ: **Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd Gelatinase B) in human rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*; 39: 1576-1587 (1996)
126. Hirose T, Reife RA, Smith GN, Stevens RM, Mainardi CL, Hasty KA: **Characterisation of type V collagenase (gelatinase) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol*; 19: 593-599 (1992)
127. Goldbach-Mansky R, Lee JM, Hoxworth JM, Smith D 2nd, Duray P, Schumacher RH Jr, Yarboro CH, Klippel J, Kleiner D, El-Gabalawy HS: **Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis.** *Arthritis Res*; 2: 145-153 (2000)
128. Fujimoto N, Mouri N, Iwata K, Ohuchi E, Okada Y, Hayakawa T: **A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 2 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase) using monoclonal antibodies.** *Clin Chim Acta*; 221: 91-103 (1993)
129. Koolwijk P, Miltenburg AM, van erck MG, Oudshoorn M, Niedbala MJ, Breedveld FC, van Hinsberg VW: **Activated gelatinase B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation.** *J Rheumatol*; 22: 385-393 (1995)

130. Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Howell DS, Pelletier JP: **Human rheumatoid arthritic cartilage and its neutral proteoglycan-degrading proteases. The effect of antirheumatic drugs.** Arthritis Rheum; 28: 405-412 (1985)
131. Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP: **In vivo effects of antirheumatic drugs on neutral collagenolytic proteases in human rheumatoid arthritis cartilage and synovium.** J Rheumatol; 15: 1198-1204 (1988)
132. Firestein GS, Paine MM, Littman BH: **Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium: quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids.** Arthritis Rheum; 34: 1094-1105 (1991)
133. Firestein GS, Paine MM, Boyle DL: **Mechanisms of methotrexate action in rheumatoid arthritis. Selective decrease in synovial collagenase gene expression.** Arthritis Rheum; 37: 193-200 (1994)
134. Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **In vitro effects of NSAIDs and corticosteroids on the synthesis and secretion of interleukin 1 by human osteoarthritic synovial membranes.** Agents Actions Suppl; 39: 181-193 (1993)
135. Rudwaleit M, Yin Z, Siebert S, Grolms M, Radbruch A, Braun J, Sieper J: **Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4.** Ann Rheum Dis; 59: 311-314 (2000)
136. Segal R, Yaron M, Tartakovsky B: **Methotrexate: mechanism of action in rheumatoid arthritis.** Semin Arthritis Rheum; 20: 190-200 (1990)
137. Hembry RM, Bagga MR, Murphy G, Henderson B, Reynolds JJ: **Rabbit model of arthritis: Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase in synovium and cartilage.** Am J Pathol; 143: 628-642 (1993)

138. Kodama S, Iwata K, Iwata H, Yamashita K, Hayakawa T: **Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases.** J Immunol Methods; 127: 103-108 (1990)
139. Okada Y, Gonoji Y, Nakanishi I, Nagase H, Hayakawa T: **Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium.** Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol; 59: 305-312 (1990)
140. Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y: **The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells.** Clin Exp Immunol; 94: 145-149 (1993)
141. Jackson CJ, Arkell J, Nguyen M: **Rheumatoid synovial endothelial cells secrete decreased levels of tissue inhibitor of MMP (TIMP).** Ann Rheum Dis ; 57: 158-161 (1998)
142. Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G: **Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes.** Biochim Biophys Acta; 1052: 366-378 (1990)
143. Millis AJ, Hoyle M, Mccue HM, Martini H: **Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts.** Exp Cell Res; 201: 373-379 (1992)
144. Seitz M, Dayer JM: **Enhance production of tissue inhibitor of metalloproteinases by peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients responding to methotrexate treatment.** Rheumatology (Oxford); 39: 637-645 (2000)
145. Li CG, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC: **Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells.** Exp Eye Res; 73: 449-459 (2001)

146. Li DQ, Shang TY, Kim H-S, Solomon A, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC: **Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 44: 2928-2936 (2003)
147. Girard MT, Matsubara M, Fini ME: **Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 32: 2441-2454 (1991)
148. Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC: **Regulation of MMP-9 activity in tear fluid and corneal epithelial culture supernatant.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 41: 1703-1709 (2000)
149. Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, Selzer M, Lokeshwar B, Pflugfelder SC: **Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 40: 2506-2512 (1999)
150. Barro CD, Romanet JP, Fdili A, Guillot M, Morel F: **Gelatinase concentration in tears of corneal-grafted patients.** Curr Eye Res 17: 174-182 (1998)
151. Sakimoto T, Shoji J, Sawa M: **Active form of gelatinases in tear fluid in patients with corneal ulcer or ocular burn.** Jpn J Ophthalmol; 47: 423-426 (2003)
152. Kumagai N, Yamamoto K, Fukuda K, Nakamura Y, Fujitsu Y, Nuno Y, Nishida T: **Active matrix metalloproteinases in the tear fluid of individuals with vernal keratokconjunctivitis.** J Allerg Clin Immunol; 110: 489-491 (2002)

153. Van Leeuwen MA, von Rijswijk MH, van der Heijde DM, Te Meerman GJ, van Riel PL, Houtman PM, et al: **The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease.** Br J Rheumatol; 32 (Suppl 3): 9-13 (1993)
154. Green MJ, Gough AK, Devlin J, Smith J, Astin P, Taylor D, Emery P: **Serum MMP-3 and MMP-1 and progression of joint damage in early rheumatoid arthritis.** Rheumatology (Oxford); 42: 83-88 (2003)
155. Tuma PL, Hubbard AL: **Transcytosis: Crossing cellular barriers.** Physiol. Rev; 83: 871-932 (2003)
156. Marino M, Andrews D, Brown D, McCheskey RT: **Transcytosis of retinol-binding protein across renal proximal tubule cells after megalin (gp 330)-mediated endocytosis.** J Am Soc Nephrol; 12: 637-648 (2001)
157. Chakravorty D, Kumar KS: **Modulation of barrier function of small intestinal epithelial cells by lamina propria fibroblasts in response to lipopolysaccharide: possible role in TNFalpha in inducing barrier dysfunction.** Microbiol Immunol; 43: 527-533 (1999)
158. Schmitz H, Fromm M: **Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in human intestinal cell line HT-29/B6.** J Cell Sci; 112: 137-146 (1999)
159. Fox RI, Kang HI: **Pathogenesis of Sjögren's syndrome.** Rheum Dis Clin North Am; 18: 517-538 (1992)
160. Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, Baleriola-Lucas C, Bestawros F, Sweeney D, Holden BA: **Fibronectin in the tear film.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 37: 459-467 (1996)

161. Rolando M, Terragna F, Giordano G, Calabria G: **Conjunctival surface damage distribution in keratokonjunctivitis sicca. An impression cytology study.** *Ophthalmologica*; 200: 170-176 (1990)
162. Gilbard JP, Carter JB, Sang DN, Refojo MF, Hanninen LA, Kenyon KR: **Morphologic effect of hyperosmolarity on rabbit corneal epithelium.** *Ophthalmology*; 91: 1205-1212 (1984)
163. Rolando M, Refojo MF, Kenyon KR: **Increased tear evaporation in eyes with keratokonjunctivitis sicca.** *Arch Ophthalmol*; 101: 557-558 (1983)
164. Matrisian LM: **The matrix-degrading metalloproteinases.** *Bioessays*; 14: 455-463 (1992)
165. Manicourt DH, Triki R, Fukuda K, Devogelaer J-P, Nagant de Deuxchaisnes C, Thonar E J-MA: **Levels of circulating tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of hyaluron and antigenic keratan sulfate.** *Arthritis Rheum*; 36: 490-499 (1993)
166. Thompson HW, Beuerman RW, Cook J, Underwood L, Nguyen DH: **Transcription of message for tumor necrosis factor-alpha by lacrimal gland is regulated by corneal wounding.** *Adv Exp Med Biol*; 350: 211-217 (1994)
167. Ayliffe W, Espaillet A, Foster CS, Lee SJ: **Polymerase chain reaction analysis of TNF- α gene expression in rat corneal wound healing.** (Abstract) *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 34 (Suppl): 1376 (1993)
168. Bernauer W, Wright P, Dart JK, Leonard JN, Lightman S: **Cytokines in the conjunctiva of acute and chronic mucous membrane pemphigoid: an immunohistochemical study.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 231: 563-570 (1993)
169. McMenamin PG: **Immunocompetent cells in the anterior segment.** *Prog Ret Eye Res*; 13: 555-591 (1994)

170. Vesaluoma M, Teppo A-M, Grönhagen-Riska C, Tervo T: **Increased release of tumor necrosis factor-alpha in human tear fluid after excimer laser induced corneal wound.** Br J Ophthalmol; 81: 145-149 (1997)
171. Firestein GS, Alvaro-Garcia JM, Maki R: **Quantitativ analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis.** J Immunol; 144: 3347-3353 (1990)
172. Klimiuk PA, Sierakowski S, Chwiecko J: **Correlation between TNF α and matrix metalloproteinase levels in serum in patients with rheumatoid arthritis.** Pol Merkuriusz Lek; 14 (83): 410-412 (2003)
173. Garrana RMR, Zieske JD, Assouline M, Gipson IK: **Matrix Metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion.** Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 1266-1270 (1999)
174. Kenney MC, Chwa M, Alba A, Saghizadeh M, Huang Z-H, Brown DJ: **Localization of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, gelatinase A and gelatinase B in pathological human corneas.** Curr Eye Res; 17: 238-246 (1998)

8. Anhang

8.1 Struktur und Funktion der MMPs

Tab. 36: Übersicht über die Familie der Matrixmetalloproteinasen

MMP-Nummer	Enzym	MG	Substratpräferenz
Kollagenasen			
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	55/43	Kollagen I, II, III, VII, X, proMMP-2,-9
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	75/58	Kollagen I, II, III
MMP-13	Kollagenase-3	65/55	Kollagen I, II, III, IV, Gelatin, Fibronectin
Gelatinasen			
MMP-2	Gelatinase A	72/66	Gelatin, Kollagen IV, V, VII, XI, Fibronectin, Elastin, proMMP-9
MMP-9	Gelatinase B	92/86	Gelatin, Kollagen IV, V, Elastin, Fibronectin
Stromelysine			
MMP-3	Stromelysin-1	57/46	ProMMP-1,-7,-8,-9,-13, Laminin, Fibronectin
MMP-10	Stromelysin-2	57/46	Wie Stromelysin-1
MMP-11	Stromelysin-3	51/44	α 1-Protease-Inhibitor
Membran Typ MMPs			
MMP-14	MT1-MMP	64/54	ProMMP-2,-13, Kollagen, Fibronectin
MMP-15	MT2-MMP	72/61	Wie MT1-MMP
MMP-16	MT3-MMP	66/55	ProMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	64/54	ProMMP-2
MMP-23	CA-MMP	56/46	Unbekannt
MMP-24	MT5-MMP	63/62	ProMMP-2
MMP-25	MT6-MMP		ProMMP-2
Andere			
MMP-7	Matrilysin	28/20	Kollagen IV, Elastin, Fibronectin, Gelatin
MMP-26	Matrilysin-2	28/19	ProMMP-9, Gelatin, Kollagen IV, Fibronectin, Fibrinogen
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase	54/45	Elastin
MMP-19	RASI-1	30/20	ProMMP-9, Gelatin, Kollagen IV, Nidogen
MMP-20	Enamelysin	54/42	Amelogenin
MMP-28	Epilysin	58/55	Amelogenin, Aggrekan

(aus Wong et al (12))

8.2 Extraartikuläre Manifestationen der rheumatoiden Arthritis

In Tabelle 37 werden die wichtigsten extraartikulären Manifestationen im Rahmen der RA zusammengefasst.

Tab. 37: Extraartikuläre Manifestationen der RA

▶ Rheumaknoten	
▶ Vaskulitis	Polyneuropathie Mononeuritis multiplex Hautulzerationen-/nekrosen Episkleritis Nagelfalzinfarkte Viszerale Infarkte
▶ Auge	Keratokonjunktivitis sicca Skleritis/Episkleritis Hornhautulzeration
▶ Lunge	Pleuraerguß Pleuritis Fibrosierende Alveolitis Interstitielle Fibrose
▶ Herz	Perikarditis Mitralklappenerkrankungen Reizleitungsstörungen
▶ Haut	(Rheuma)-Knoten kutane Vaskulitis Pyoderma gangraenosum
▶ peripheres Nervensystem	Engpasssyndrome (N. medianus, ulnaris, radialis, tibialis anterior)
▶ Knochen	Osteoporose

(angelehnt an Gross (71))

8.3 Labordaten der RA

Tabelle 38 fasst die wichtigsten im Blut und der Synovialflüssigkeit zu findenden Labordaten bei Patienten mit RA zusammen.

Tab. 38: Labordaten der klassischen RA

Blut	Synovialflüssigkeit
BSG ↑	Trübe
Akute Phase Proteine (z. B. CRP) ↑	Leukozyten ↑ (4000 – 50000/μl) ***
Rheumafaktor ↑ *	Proteingehalt ↑
CCP-Antikörper**	Rheumafaktor ↑ *
Thrombozytose	Glukosegehalt ↓
Serumeisen ↓	Komplementfaktoren C3 und C4 ↓
Ferritin ↑	Viskosität ↓

- * RF ist bei >2/3 der erwachsenen RA-Patienten vorhanden (= seropositive RA);
RF ist nicht spezifisch für RA, da er auch bei 5% der Gesunden (mit zunehmendem Alter steigend;
> 65 Jahre 10-20% der Gesunden), bei einer Reihe anderer Erkrankungen (SLE, Sjögren Syndrom,
chronische Lebererkrankungen, Sarkoidose, interstitielle Lungenfibrose, infektiöse Mononukleose,
TBC, Syphilis), nach Impfungen oder Transfusionen sowie bei Verwandten von RA-Patienten positiv
sein kann
- ** CCP-Antikörper = Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide, besitzen eine Spezifität von 90-
98% und sind bereits in der Frühphase der Erkrankung bei >50% der Patienten nachweisbar
- *** SF mit > 20000 Leukozyten/ml und > 75% Neutrophilen ist hochgradig charakteristisch für eine
entzündliche Arthritis

8.4 Schirmer-Test (I und II)

Tab. 39: Schirmer-Test Werte (mm) (Schirmer I und II)

Prob.	Schirmer I (Patienten)		Schirmer II (Patienten)		Schirmer I (Kontrollen)		Schirmer II (Kontrollen)	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
1	10*	10*	15	15	25	20	15	15
2	10*	10*	10*	10*	28	28	28	30
3	30	15	15	15	10*	12*	10*	10*
4	20	30	20	30	15	15	15	15
5	10*	12*	10*	10*	20	25	15	15
6	15	15	10*	10*	10*	10*	10*	12*
7	25	25	25	25	10*	12*	12*	12*
8	10*	11*	12*	10*	12*	12*	10*	12*
9	10*	12*	10*	10*	15	15	15	15
10	10*	12*	10*	10*	10*	10*	12*	12*
11	20	15	10*	10*	25	20	20	20
12	20	20	25	15	15	25	15	20
13	10*	10*	10*	12*	25	25	20	20
14	20	15	25	25	30	30	30	30
15	10*	12*	10*	12*	25	25	20	20
16	10*	12*	10*	10*	10*	10*	12*	12*
17	30	20	40	30	15	15	15	15
18	30	18	20	15	10*	10*	10*	10*
19	20	15	15	15	25	25	30	30
20	10*	11*	10*	10*	15	15	15	18
21	10*	10*	10*	10*	12*	12*	10*	10*
22	12*	12*	10*	10*	20	15	25	25
23	20	20	20	20	15	25	15	15
24	10*	10*	10*	10*	15	30	15	20
25	25	/	15	/	15	15	15	15
26	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	12*
27	15	20	25	25	15	25	15	30
28	10*	10*	20	20	12*	10*	12*	10*
29	30	30	35	30	15	15	15	15
30	10*	10*	15	15	10*	10*	10*	10*
31	10*	10*	20	20	30	20	15	15
32	10*	10*	20	20	15	15	15	15
33	10*	10*	12*	10*	20	20	20	25
34	15	15	10*	10*	15	15	15	15
35	20	30	20	30	10*	10*	12*	10*
36	12*	10*	20	15	15	15	18	15
37	15	15	15	15	20	20	25	20
38	20	25	15	20	20	20	25	25
39	20	20	20	20	15	15	15	18
40	10*	10*	12*	12*	25	25	30	30

* Schirmer-Test an der unteren Normgrenze; / = nicht gemessen; Prob. = Proband

8.5 Erhaltene Tränenvolumina

Tab. 40: Tränenvolumina (μl) (gemittelte Daten aus beiden Augen) vor und nach nasaler Stimulation

Prob.	Patienten MW (rechtes + linkes Auge)		Kontrollen MW (rechtes + linkes Auge)	
	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
1	14,5	24	13	10
2	10	/	29,5	36,5
3	8	7	15,5	24
4	20	26	15,5	23,5
5	18	15	42,5	29
6	17	16	34	16,5
7	29,5	35	13	9
8	18,5	12	22,5	19
9	7,85	11	7,5	6
10	16	11	15	28
11	17	5,6	27,15	13,25
12	24,5	20	15,5	8
13	16	16	23,5	26
14	16,5	26	9,5	31
15	17,5	22	27,5	32
16	14	10,5	15	12
17	12,5	28	10	10,5
18	14	14	17	8,5
19	32,5	27	22,5	37
20	25,5	/	12	7
21	18,5	16	35,5	24
22	10	8,5	22	37
23	28,5	33	11	10
24	30	12	9	12
25	20	7	8,5	13
26	11,5	7,5	7	23
27	12	30,5	12	20,5
28	12	25	29	35
29	11	40	18,5	27,5
30	7	13	34,5	31,5
31	27,5	/	16,5	26
32	20,5	36,5	22	37
33	12,5	15	11	27,5
34	10	9,5	30	19
35	22	21	12	7
36	8,5	34	7	17,5
37	7	12	17,5	25
38	22,5	10	10	18
39	30	31,5	18,5	22
40	12	27,5	30	36

/ = nicht gemessen; Prob. = Proband

8.6 Erläuterung des Box- und Whisker-Plots

Die Box- und Whisker-Plots stellen Verteilungen dar. In der Box liegen 50% aller aufgetretenen Werte. Die „Whisker“ zeigen den letzten Wert im Intervall der 25er Perzentil – Interquartilabstand (IQR) - und den letzten Wert im Intervall der 75er Perzentile + IQR an.

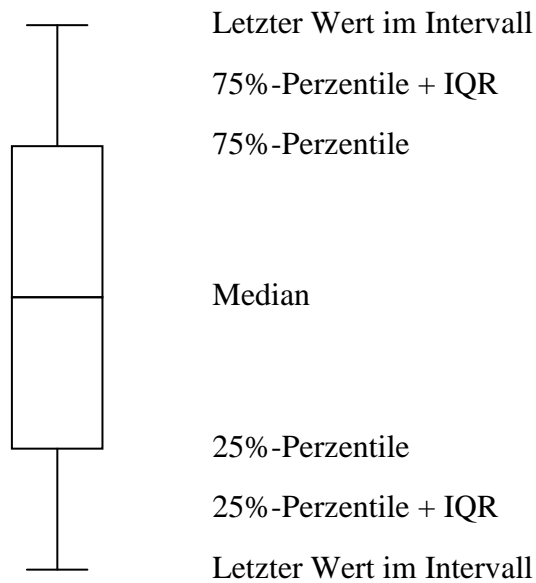


Abb. 21: Box- und Whisker-Plot: Erläuterungen der Graphiken in den Abbildungen 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 und 18

8.7 Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen Patienten und Kontrollen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen

Tab. 41: Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen Patienten und Kontrollen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen

Enzym	Plasma	ust. Tränen	st. Tränen
MMP-1-aktiv	p=0,317	p=0,587	p=0,275
proMMP-2	p=0,908	p=0,354	--
MMP-2-aktiv	p=0,120	p=0,969	--
MMP-3	\uparrow p=0,000	p=0,894	p=0,702
proMMP-9	\uparrow p=0,036	p=0,059	--
MMP-9-aktiv	p=0,420	p=0,131	--
TIMP-1	\downarrow p=0,000	\downarrow p=0,006	p=0,515
TNF α	\uparrow p=0,025	p=0,445	--

\uparrow = Patienten > Kontrollen; \downarrow = Patienten < Kontrollen; -- = nicht bestimmt

ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

8.8 Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen Plasma und unstimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Tab. 42: Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen Plasma und unstimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Enzym	Patienten	Kontrollen
MMP-1-aktiv	--	--
proMMP-2	\uparrow p=0,000	\uparrow p=0,000
MMP-2-aktiv	\uparrow p=0,000	\uparrow p=0,000
MMP-3	\uparrow p=0,000	p=0,112
proMMP-9	p=0,07	p=0,831
MMP-9-aktiv	\uparrow p=0,001	\uparrow p=0,000
TIMP-1	\downarrow p=0,000	\downarrow p=0,000
TNF α	\uparrow p=0,000	\uparrow p=0,000

\uparrow = Plasma > unstimulierte Tränen; \downarrow = Plasma < unstimulierten Tränen; -- = nicht

bestimmt

8.9 Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Tab. 43: Konzentrationsunterschiede (MMPs, TIMP-1 und TNF α) zwischen unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Enzym	Patienten	Kontrollen
MMP-1-aktiv	p=0,515	\uparrow p=0,05
proMMP-2	--	--
MMP-2-aktiv	--	--
MMP-3	\downarrow p=0,000	\downarrow p=0,000
proMMP-9	--	--
MMP-9-aktiv	--	--
TIMP-1	p=0,255	\downarrow p=0,039
TNF α	--	--

\uparrow = stimulierte > unstimulierte Tränen; \downarrow = stimulierte < unstimulierte Tränen; -- = nicht bestimmt

8.10 Korrelationen zwischen den MMP-, TIMP-1- und TNF α -Konzentrationen in Plasma und unstimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Tab. 44: Korrelationen zwischen den MMP-, TIMP-1- und TNF α -Konzentrationen in Plasma und unstimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Enzym	Patienten	Kontrollen
MMP-1-aktiv	--	--
proMMP-2	p=0,281; r=0,1	p=0,375; r=0,064
MMP-2-aktiv	p=0,028* ; r=0,337	p=0,004** ; r=0,452
MMP-3	p=0,236; r=0,119	p=0,487; r=0,005 $^{\circ}$
proMMP-9	p=0,153; r=0,168	p=0,262; r=0,107
MMP-9-aktiv	p=0,073; r=0,244	p=0,000** ; r=0,747
TIMP-1	p=0,013* ; r=0,351$^{\circ}$	p=0,406; r=0,039
TNF α	p=0,005** ; r=0,413	p=0,008** ; r=0,393

* p < 0,05; ** p < 0,01; $^{\circ}$ Korrelationskoeffizient negativ; -- = nicht bestimmt

8.11 Korrelationen zwischen den MMP-, TIMP-1- und TNF α -Konzentrationen in unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Tab. 45: Korrelationen zwischen den MMP-, TIMP-1- und TNF α -Konzentrationen in unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Enzym	Patienten	Kontrollen
MMP-1-aktiv	--	--
MMP-3	--	--
TIMP-1	p=0,000**; r=0,521	p=0,001**; r=0,505
TNF α	--	--

** p < 0,01; -- = nicht bestimmt

8.12 Korrelationen der MMP-3-Konzentration mit den Konzentrationen der anderen MMPs in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Tab. 46: Korrelationen der MMP-3-Konzentration mit den Konzentrationen der anderen MMPs in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten

	MMP-1-aktiv	proMMP-2	MMP-2-aktiv	proMMP-9	MMP-9-aktiv
Plasma	--	p=0,002**	p=0,149	p=0,072	p=0,010**
		r=0,436	r=0,178	r=0,238	r=0,367
ust.	--	p=0,190	p=0,073	p=0,107	p=0,354
Tränen		r=0,151	r=0,258	r=0,206	r=0,046°
st. Tränen	--	--	--	--	--

** p < 0,01; ° Korrelationskoeffizient negativ; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st.= stimuliert

Tab. 47: Korrelationen der MMP-3-Konzentration mit den Konzentrationen der anderen MMPs in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Kontrollen

	MMP-1-aktiv	proMMP-2	MMP-2-aktiv	proMMP-9	MMP-9-aktiv
Plasma	--	p=0,358	p=0,323	p=0,138	p= 0,275
		r=0,059	r=0,080	r=0,181°	r=0,100
ust. Tränen	--	p=0,113	p=0,067	p=0,069	p=0,009**
		r=0,210	r=0,262	r=0,245	r=0,387
st. Tränen	--	--	--	--	--

** p < 0,01; ° Korrelationskoeffizient negativ; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st.= stimuliert

8.13 Korrelationen der TNF α -Konzentration mit den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten und Kontrollen

Tab. 48: Korrelationen der TNF α -Konzentration mit den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Patienten

	MMP-1-aktiv	pro MMP-2	MMP-2-aktiv	MMP-3	pro MMP-9	MMP-9-aktiv	TIMP-1
Plasma	--	p=0,172 r=0,153 [°]	p=0,146 r=0,181	p=0,086 r=0,221	p=0,463 r=0,015	p=0,001** r=0,467	p=0,162 r=0,160
ust. Tränen	--	p=0,001** r=0,523	p=0,205 r=0,148	p=0,361 r=0,060	p=0,299 r=0,088	p=0,001** r=0,478	p=0,016* r=0,347[°]
st. Tränen	--	--	--	--	--	--	--

* p < 0,05; ** p < 0,01; ° Korrelationskoeffizient negativ; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

Tab. 49: Korrelationen der TNF α -Konzentration mit den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen in Plasma, unstimulierten und stimulierten Tränen bei Kontrollen

	MMP-1-aktiv	pro MMP-2	MMP-2-aktiv	MMP-3	pro MMP-9	MMP-9-aktiv	TIMP-1
Plasma	--	p=0,054 r=0,258	p=0,005** r=0,430	p=0,486 r=0,006 [°]	p=0,334 r=0,072	P=0,000** r=0,560	p=0,115 r=0,194
ust. Tränen	--	p=0,244 r=0,121	p=0,001** r=0,501	p=0,478 r=0,009	p=0,324 r=0,078	p=0,006** r=0,414	p=0,122 r=0,196 [°]
st. Tränen	--	--	--	--	--	--	--

** < 0,01; ° Korrelationskoeffizient negativ; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

8.14 Korrelationen zwischen den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen und den Markern der klinischen Aktivität der RA

Tab. 50 : Korrelationen zwischen den MMP- und TIMP-1-Konzentrationen und den Markern der Krankheitsaktivität der RA

Enzym		DAS	CRP	BSG
MMP-1-aktiv	Plasma	--	--	--
	ust. Tränen	--	--	--
	st. Tränen	p=0,258; r=0,199°	p=0,207; r=0,179°	p=0,061; r=0,279
proMMP-2	Plasma	p=0,200; r=0,137	p=0,261; r=0,124°	p=0,290; r=0,09
	ust. Tränen	p=0,201; r=0,144	p=0,012* ; r=0,433°	p=0,284; r=0,098°
MMP-2-aktiv	Plasma	p=0,138; r=0,186°	p=0,222; r=0,154°	p=0,306; r=0,087°
	ust. Tränen	p=0,019* ; r=0,361°	p=0,497; r=0,002°	p=0,208; r=0,147°
MMP-3	Plasma	p=0,346; r=0,065	p=0,165; r=0,188°	p=0,031* ; r=0,298
	ust. Tränen	p=0,295; r=0,098°	p=0,434; r=0,033	p=0,194; r=0,142°
	st. Tränen	--	--	--
proMMP-9	Plasma	p=0,064; r=0,248	p=0,064; r=0,29°	p=0,088; r=0,222
	ust. Tränen	p=0,302; r=0,085°	p=0,070; r=0,28°	p=0,253; r=0,11°
MMP-9-aktiv	Plasma	p=0,239; r=0,116°	p=0,225; r=0,146°	p=0,215; r=0,128
	ust. Tränen	p=0,383; r=0,05°	p=0,143; r=0,213°	p=0,375; r=0,054°
TIMP-1	Plasma	p=0,263; r=0,103°	p=0,154; r=0,196	p=0,479; r=0,008
	ust. Tränen	p=0,270; r=0,1	p=0,161; r=0,191	p=0,366; r=0,056°
	st. Tränen	p=0,249; r=0,155	p=0,427; r=0,038	p=0,134; r=0,187°

* p < 0,05; ° Korrelationskoeffizient negativ; -- = nicht bestimmt; ust. = unstimuliert; st. = stimuliert

8.15 Immunlokalisation der MMP-s/TIMP-1 in Hornhaut und Tränenrüse

Tab. 51: Immunlokalisation der MMPs/TIMP-1 in Hornhaut und Tränenrüse (mit und ohne Monensin) (2)

	Lok.	MMP-1	proMMP-2	MMP-3	proMMP-9	TIMP-1	IgG					
Gesunde Hornhaut	1 Epithel	-	-	-	-	-	-					
	Stroma	-	-	-	-	-	-					
	2 Epithel	-	-	-	-	-	-					
	Stroma	-	-	-	-	-	-					
	3 Epithel	-	-	-	-	-	-					
	Stroma	-	-	-	-	-	-					
Gesunde Tränenrüse	1 Stroma	-	-	+	+	-	-					
	AZ	-	+++	-	-	-	-					
rheumatisches Ulkus	1 Epithel	-	/	+++	/	++	/	+	/	(+)	/	-
	Stroma	++	/	+++	/	+(+)	/	+++	/	+++	/	-
	2 Epithel	/	/	+++	/	/	/	-	/	/	/	-
	Stroma	/	/	++	/	/	/	+++	/	/	/	-
	3 Epithel	-	/	-	/	/	/	+	/	-	/	-
	Stroma	-	/	-	/	/	/	-	/	-	/	-
	4 Epithel	+++	+++	-	+++	+	+	++	++	-	-	-
	Stroma	(+)	(+)	+	-	++	++	+++	(+)	+	(+)	-
	5 Epithel	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
	Stroma	+	++	++	++	++	++	++	+++	(+)	-	-
	6 Epithel	+++	+++	+++	++	+++	++	-	++	-	+	-
	Stroma	+++	++	+++	+	+++	+	++	++	++	-	-
	7 Epithel	+++	++	+++	-	+	+	-	-	-	-	-
	Stroma	+	+	+	(+)	++	++	++	+(+)	-	-	-

- = keine Anfärbung; (+) = sehr schwache Anfärbung; + = geringe Anfärbung; ++ = mäßige Anfärbung

+++ = starke Anfärbung; grau unterlegt = nach 6stündiger Inkubation mit Monensin; / = nicht durchgeführt

Lok. = Lokalisation; AZ = Azinuszellen

9. Danksagung

Hier möchte ich Herrn Prof. Dr. med. G. Geerling für die Überlassung des vielseitigen Themas und für die jederzeit freundliche und interessierte Betreuung meiner Arbeit herzlich danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Dr.-Ing. Antje Müller, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit betreut und stets unterstützt hat.

Allen Mitarbeitern des ophthalmologischen und rheumatologischen Forschungslabors möchte ich für die Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit danken. Ebenso der Rheumaklinik Bad Bramstedt und der Augenklinik Lübeck für die Bereitstellung des Patientengut.

Meinen Eltern für alles.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andrea von Figura
geboren: 28.11.1976 in Münster/Nordrhein-Westfalen
Wohnorte: 1976-1986 in Münster
1986-1996 in Göttingen
1996-1997 in Tübingen
1997-jetzt in Lübeck
Eltern: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Kurt von Figura
Brigitte von Figura

Schulbildung und Studium

1982-1996 Grundschole in Münster und Göttingen, Orientierungsstufe und
Gymnasium in Göttingen, Abschluß: Abitur (Note 1,5)
1996-1997 Studium generale im Leibniz Kolleg Tübingen
1997-2005 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
1999 Ärztliche Vorprüfung (Note 3,0)
2000 1. Staatsexamen (Note 1,0)
2003 2. Staatsexamen (Note 1,0)
2005 3. Staatsexamen (Note 1,0)

11. Publikationen

von Figura A, Müller A, Lamprecht P, Geerling G: **Matrixmetalloproteinases (MMPs) and TIMP-1 in tears of RA-patients: is plasma the source?** Abstract; DOG & SOE Kongress; Berlin, 25-29. September 2005

