

G(α)s-to-G(α)i switch of G protein-coupled receptor signalling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Bianca Dufner

aus
Freiburg im Breisgau

im Jahr
2021

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

22.10.2021

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. Rainer H. Straub

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Die Krankheit im Überblick.....	1
1.1.2 Pathogenese der RA	5
1.1.3 Zelluläre Veränderungen.....	6
1.1.4 Diagnosestellung	9
1.1.5 Therapie.....	12
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	15
1.2.1 Allgemeines über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	15
1.2.2 Ablauf der Signalweiterleitung an GPCRs.....	16
1.2.3 G-Proteine	20
1.2.4 β 2-AR	23
1.2.5 Gas-zu-Gai-Umschaltung	23
1.3 Ziel der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2 Reagenzien	29
2.1.3 Stimulanzen	31
2.1.4 Antikörper.....	32
2.1.4.1 Antikörper für immunhistologische Färbungen	32
2.1.4.2 Antikörper für <i>Cell-based ELISA</i>	33

2.1.5	Kits	35
2.1.6	Zellen	36
2.1.7	Geräte	36
2.1.8	Programme	38
2.1.9	Lösungen.....	38
2.1.9.1	Lösungen für die Zellkultur	38
2.1.9.2	Lösungen für immunhistologische Färbungen	41
2.1.9.3	Lösungen für ELISA und <i>Cell-based ELISA</i>	42
2.1.9.4	Lösungen für Transfektionen und Transduktion mit Epac-abhängigem FRET-Sensor	43
2.2	Methoden	45
2.2.1	Patienten	45
2.2.2	Zellkultur	46
2.2.2.1	Aufarbeitung des synovialen Gewebes	46
2.2.2.2	Kultivieren synovialer Fibroblasten und FLNs.....	47
2.2.2.3	Splitten kultivierter Zellen	47
2.2.2.4	Einfrieren kultivierter Zellen	48
2.2.2.5	Das In-Kultur-Nehmen gefrorener Zellen	48
2.2.2.6	Zählen der Zellen	48
2.2.2.7	Stimulation der Zellen.....	49
2.2.2.7.1	Stimulation für den <i>Human Cytokine Array</i>	49
2.2.2.7.2	Stimulation für den RNA-Microarray.....	49
2.2.2.7.3	Stimulation für ELISA und Luminex	49
2.2.2.7.4	Stimulation für <i>Cell-based ELISA</i>	50
2.2.3	Bestimmung der Parameter, die mit der Signalumschaltung von $G_{\alpha s}$ zu $G_{\alpha i}$ im Zusammenhang stehen	50
2.2.3.1	RNA-Isolation	50
2.2.3.2	RNA-Vermessung.....	50
2.2.3.3	RNA-Microarray	50

2.2.3.4	Human Cytokine Array	51
2.2.4	Quantifizierung der Parameter, die durch die Signalumschaltung von Gas zu Gai beeinflusst werden	51
2.2.4.1	Cell-based ELISA	51
2.2.4.2	ELISA	51
2.2.4.3	Luminex	52
2.2.5	Histologische Färbungen	52
2.2.5.1	Kryoschnitte	52
2.2.5.2	Cytospin	52
2.2.5.3	Färben der Schnitte und Cytospins	52
2.2.6	FRET-Sensor für den Nachweis von cAMP	53
2.2.6.1	Transformation kompetenter Bakterien	54
2.2.6.2	Plasmidgewinnung	55
2.2.6.3	Transfektion mit Lipofectamine 2.000	55
2.2.6.4	Transfektion mit Lipofectamine 3.000	55
2.2.6.5	Transfektion mit PolyFect	55
2.2.6.6	Transfektion durch Elektroporation	56
2.2.6.7	Transfektion mit FuGene 6	56
2.2.6.8	Transfektion mit X-treme Gene 9	56
2.2.6.9	Transduktion mit Lentiviren	57
2.2.6.10	Mikroskopieren der transfizierten/transduzierten Zellen	57
2.2.7	Statistische Auswertungen	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Zellkultur verschiedener Patienten	59
3.2	Überprüfung der Grundvoraussetzungen für eine Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai	60
3.2.1	β 2-adrenerger Rezeptor	61
3.2.2	PDE4 und β -Arrestin	61

3.2.3	Gas und Gai	63
3.3	Suche nach Zielparametern in Fibroblasten, die eine mögliche Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai zeigen	64
3.4	Quantifizierung der gefundenen Zielparameter	66
3.4.1	Durch NKH 477 positiv regulierte Proteine	66
3.4.2	Durch NKH 477 negativ regulierte Proteine	68
3.4.3	Proteine, die nicht durch NKH 477 reguliert wurden oder nicht durch ELISA quantifizierbar waren	72
3.5	Darstellung der GRKs	73
3.6	Bedeutung verschiedener Schlüsselpunkte in der Signalkaskade	75
3.6.1	Die Regulation des IL-6 in Fibroblasten	76
3.6.2	Die Regulation des Osteoprotegerins in Fibroblasten	87
3.6.3	Die Regulation des PAI-1 in Fibroblasten	102
3.6.4	Die Regulation des CCL2 in Fibroblasten	117
3.7	Potenzielle Regulatoren der untersuchten Zielparameter	127
3.7.1	Die Regulation des pCREB in Fibroblasten	128
3.7.2	Die Regulation des pErk1/2 in Fibroblasten	132
3.7.3	Die Regulation des pNF- κ B in Fibroblasten	137
3.8	Suche nach einem fluoreszenzbasierten cAMP Sensor	141
3.8.1	KCNQ1	141
3.8.2	Epac-abhängiger FRET-Sensor	142
3.8.2.1	Transfektion der synovialen Fibroblasten mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor	142

3.8.2.2	Transduktion der synovialen Fibroblasten mit einem lentiviralen Vektor	143
4	Diskussion	145
4.1	Zellkultur	145
4.2	Grundvoraussetzungen für die Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai	146
4.3	Relevante Zielparameter für die Signalumschaltung von Gas zu Gai	148
4.4	Die Regulation der einzelnen Proteine	149
4.4.1	Gas-zu-Gai-Umschaltung bei entzündlicher Konstellation ...	149
4.4.2	Abschaltungen bei entzündlicher Konstellation	158
4.4.3	Einschaltung bei entzündlicher Konstellation	162
4.5	Messung des cAMP mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor	163
4.6	Limitationen der Arbeit und Ausblick für weitere Arbeiten	164
5	Zusammenfassung	167
6	Anhang	168
6.1	Abbildungsverzeichnis	168
6.2	Tabellenverzeichnis	171
6.3	Literaturverzeichnis	172

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer H. Straub (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin 1, Universitätsklinikum Regensburg) für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für deine Unterstützung während der letzten Jahre. Die gemeinsame wöchentliche Besprechung, Interpretation und Diskussion der Daten war immer sehr hilfreich und ich bin dankbar für das Wissen, das du mir vermittelt hast.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Hayo Castrop (Institut für Physiologie, Universität Regensburg) und Prof. Dr. Frank Buttgerit (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité Berlin) für ihre Bereitschaft bedanken, mich als Mentoren zu unterstützen und meine Ergebnisse kritisch mit mir zu besprechen und Anreize für zukünftige Versuche zu geben.

Vielen Dank Prof. Dr. Joachim Grifka (Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Asklepios Klinikum Bad Abbach) und PD Dr. Sven Anders (Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Asklepios Klinikum Bad Abbach) dafür, dass Sie mich regelmäßig mit frischem Synovialgewebe aus dem OP versorgt haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Paul-Peter Tak (Klinische Immunologie und Rheumatologie, Universität Amsterdam), Prof. Dr. Lisa van Baarsen (Klinische Immunologie und Rheumatologie, Universität Amsterdam) und Hannelie Semmelink (Klinische Immunologie und Rheumatologie, Universität Amsterdam) für die Zusammenarbeit bezüglich der Fibroblasten aus inguinalen Lymphknoten von Patienten aus verschiedenen Phasen der RA-Erkrankung sowie der gesunden Kontrollen. Vielen Dank für die Bereitstellung der Zellen und der dazugehörigen Protokolle.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Kees Jalink (Abteilung für Zellbiologie, Niederländisches Krebsinstitut) und Jeffrey Klarenbeek (Abteilung für Zellbiologie, Niederländisches Krebsinstitut) für den Austausch und die Bereitstellung des Epac-abhängigen FRET-Sensors bedanken.

Bei Prof. Dr. Christian Wetzel (Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinikum Regensburg) und Dr. Vladimir Milenkovic (Vladi) (Lehrstuhl für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinikum Regensburg) bedanke ich mich für ihre

Unterstützung bei den Versuchen mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor. Ich bin dankbar dafür, dass ihr so viele Methoden mit mir getestet habt und vor allem danke ich Vladi für seine fachliche, technische und mentale Unterstützung hierbei.

Auch bei Prof. Dr. Karl Kunzelmann (Lehrstuhl Physiologie II, Universität Regensburg) möchte ich mich für die Unterstützung bei den Versuchen mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor bedanken, die Diskussion der Ergebnisse sowie Vorschläge für ein weiteres Vorgehen. Besonderer Dank gilt hierbei auch Prof. Dr. Rainer Schreiber (Lehrstuhl Physiologie II, Universität Regensburg) für die Herstellung und Bereitstellung des viralen Vektors.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Sabine Stöckl (Lehrstuhl für Orthopädie, Universitätsklinikum Regensburg) und Anja Pasoldt (Lehrstuhl für Orthopädie, Universitätsklinikum Regensburg) für ihre Unterstützung bei der Optimierung der lentiviralen Transduktion bedanken.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Angelika Gräber, die mich während meiner Arbeit im Labor begleitet hat. Danke für alles, was du mir technisch beigebracht hast und dafür, dass du meine Zeit im Labor so sehr geprägt hast. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Hubert Stangl für seine Unterstützung im Labor bedanken und dafür, dass er sein Wissen jederzeit mit mir geteilt hat. Ein Dankeschön geht außerdem an Dr. Kentaro Noda, Elena Underberg, Luise Rauch und Madlen Melzer, die mich während der letzten Jahre begleitet haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank auch an alle anderen Kollegen im Biopark, die mich mit fachlichen Ratschlägen und Diskussionen genauso wie mit netten Gesprächen durch die letzten Jahre begleitet haben.

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Eltern, die mich immer bei allem unterstützt und an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre ich niemals so weit gekommen. Auch bei Nico möchte ich mich für seine Unterstützung bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da wart, wenn ich euch gebraucht habe. Ich danke euch, dass ihr die Doktorarbeit mit mir durchlebt habt, mich aufgebaut oder euch mit mir gefreut habt, wann immer ich zu euch kam.

Abkürzungsverzeichnis

7TMR	Sieben-Transmembran-Rezeptor
AC	Adenylatzyklase
ACPA	Anti-citrulliniertes Protein Antikörper
ACR	<i>American Rheumatism Association</i>
AF	Alexa Fluor
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> , Knochenmorphogenetisches Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
CCG	CCG215022, GRK2/5-Inhibitor
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i> , cyan fluoreszierendes Protein
CMPD	CMPD101, GRK2/3-Inhibitor
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid
DMARD	<i>Disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPAC	<i>Exchange protein activated by cAMP</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , Fetales Kälberserum
Fc-Region	<i>fragment crystallizable region</i>
FLIPR	<i>Fluorescent Imaging Plate Reader</i>
FLN	<i>Lymph node derived fibroblast</i>
Form	Formoterol Hemifumarat, β -AR-Agonist
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
Gas1	<i>Growth arrest-specific 1</i>
GC	Glucocorticoide
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
H89	H89 Dihydrochlorid, PKA-Inhibitor
h	Stunde
HDL	<i>High-Density-Lipoprotein</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HPA	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal</i> , Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Hyp	Hypoxie
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogenaktivierte Proteinkinase

MCP	Articulationes metacarpophalangeae, Metacarpophalangealgelenk
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MIP3 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-3</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NKH	NKH 477, Adenylatzyklase-Aktivator
nm	Nanometer
Norm	Normoxie
NSAID	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drug</i>
OA	Osteoarthritis
olf	olfaktorisch
p	Passage
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
pCREB	<i>phospho cAMP responsive element binding protein</i>
PDE	Phosphodiesterase
pErk	<i>phospho extracellular signal-regulated kinases</i>
PKA	Proteinkinase A
pNF- κ B	<i>phospho nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PT	Pertussis-Toxin, G α i-Inhibitor
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RGS	<i>Regulators of G-Protein Signaling</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
sec	Sekunde
SERT	Serotonintransporter
TEP	Totalendoprothese
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF-C	<i>Vascular Endothelial Growth Factor C</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
β2-AR	β2-adrenerger Rezeptor
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Die Krankheit im Überblick

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunerkrankung, die u.a. mit Entzündungen der Gelenke einhergeht. Sie ist die häufigste Art der entzündlichen Arthritis und hat eine Prävalenz von etwa 1 % in der Bevölkerung weltweit (1,2). Eine sehr geringe Prävalenz tritt im ländlichen Afrika auf, eine hohe bei bestimmten Stämmen der amerikanischen Ureinwohner (Pima und Chippewa) (3). Das Verhältnis der betroffenen Frauen zu Männern beträgt etwa 2,5 zu 1, weshalb, wie bei vielen Autoimmunerkrankungen, den Sexualhormonen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (2–4). RA kann in jedem Alter ausbrechen, die Inzidenz steigt jedoch mit zunehmendem Alter. Am häufigsten bricht RA zwischen 40 und 70 Jahren aus (3).

Obwohl die genaue Ätiologie der RA unbekannt ist, gibt es Faktoren, die Einfluss auf einen möglichen Ausbruch der Krankheit haben (5,6). Genetische Faktoren machen etwa 60 % der Anfälligkeit für die Krankheit aus, wohingegen der sozioökonomische Status keinen Einfluss auf die Prävalenz zu nehmen scheint (3,7).

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass der klinisch manifesten RA eine asymptomatische Phase vorhergeht. Ein Merkmal dieser Phase ist eine nachweisbare synoviale Entzündung, insbesondere mit Infiltration durch Makrophagen, schon bevor die Gelenke anschwellen, schmerzhaft werden oder sonstige klinische Anzeichen der RA auftreten (8). Aufgrund dieser Erkenntnisse muss eine frühe RA bereits als chronische Erkrankung angesehen werden (8). Ein weiteres Anzeichen für eine, der symptomatischen RA vorhergehende, asymptomatische Phase der RA liegt im Nachweis von Autoantikörper, die oftmals schon Jahre vor Ausbruch der Krankheit nachweisbar sind (9,10).

Der Verlauf der RA entwickelt sich sehr individuell und variabel bei den verschiedenen Patienten, das typische klinische Merkmal ist jedoch eine symmetrische Arthritis, die hauptsächlich die kleinen Gelenke der Hände und Füße befällt, nicht aber das Finger- oder Zehenendgelenk (Abbildung 1) (1,3,5,6).



Abbildung 1: Deformationen an den Händen eines RA-Patienten. Dargestellt sind die linke (a) und rechte (b) Hand eines RA-Patienten mit Schwanenhalsdeformität und Knopfloch- bzw. Boutonnière-Deformität. Außerdem sind dorso-volare Projektionsradiographien der linken (c) und rechten (d) Hand abgebildet (11).

Der Krankheitsbeginn ist meist schleichend und es können mehrere Monate vergehen, bis eine sichere Diagnose gestellt wird (3). Die dominierenden Symptome sind Schmerzen, Steifheit und Schwellungen der peripheren Gelenke (3). In der frühen Phase betrifft die RA zunächst meist die proximalen Interphalangeal- und Metacarpophalangealgelenke, im weiteren Verlauf die größeren Gelenke wie die des Knies, des Ellenbogens und des Sprunggelenks (12). In den ersten Wochen der Erkrankung kommt es vor allem zu Gewebeödemen und Fibrinablagerungen, die sich klinisch als Gelenkschwellung und -schmerzen äußern können (3). Typisch für RA ist eine Entzündung der Synovia, Hyperplasie, Autoantikörperproduktion (Rheumafaktor (RF) und Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPA)) und Zerstörung von Knorpel und Knochen (Abbildung 2) (12–14). Systemische Symptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust und leichtes Fieber können ebenfalls bei aktiver Erkrankung auftreten (Abbildung 3) (15).



Abbildung 2: Rheumatische Vorfußdeformität. Dargestellt sind die Röntgenbilder des deformierten Vorfußes eines RA-Patienten vor (a) und nach (b) einer korrigierenden OP. In (a) erkennt man einen vergrößerten 1. intermetatarsalen Winkel, einen Hallux valgus und luxierte Kleinzehengrundgelenke II/III. In (b) sind die Gelenkkorrekturen nach der OP dargestellt (16).

Es kann schon in sehr frühen Stadien der Krankheit zur Zerstörung des Gelenkes kommen, die dazu in der Lage ist sehr schnell voranzuschreiten (3). Im ersten Jahr ist das Fortschreiten der

Gelenkschäden signifikant stärker als im 2. und 3. Jahr (17). Innerhalb der ersten 2 bis 3 Jahre kann bei etwa 70 % der Patienten bereits radiologisch die Gelenkschädigung nachgewiesen werden (3,17). Veränderungen, die im Röntgenbild ersichtlich werden, gehen einer Fehlstellung und funktionellen Behinderung oftmals um Jahre voraus. Bis sich die körperliche Deformität bemerkbar macht, sind in der Regel bereits erhebliche irreversible Gelenkschäden entstanden (Abbildung 1 und Abbildung 2) (3).

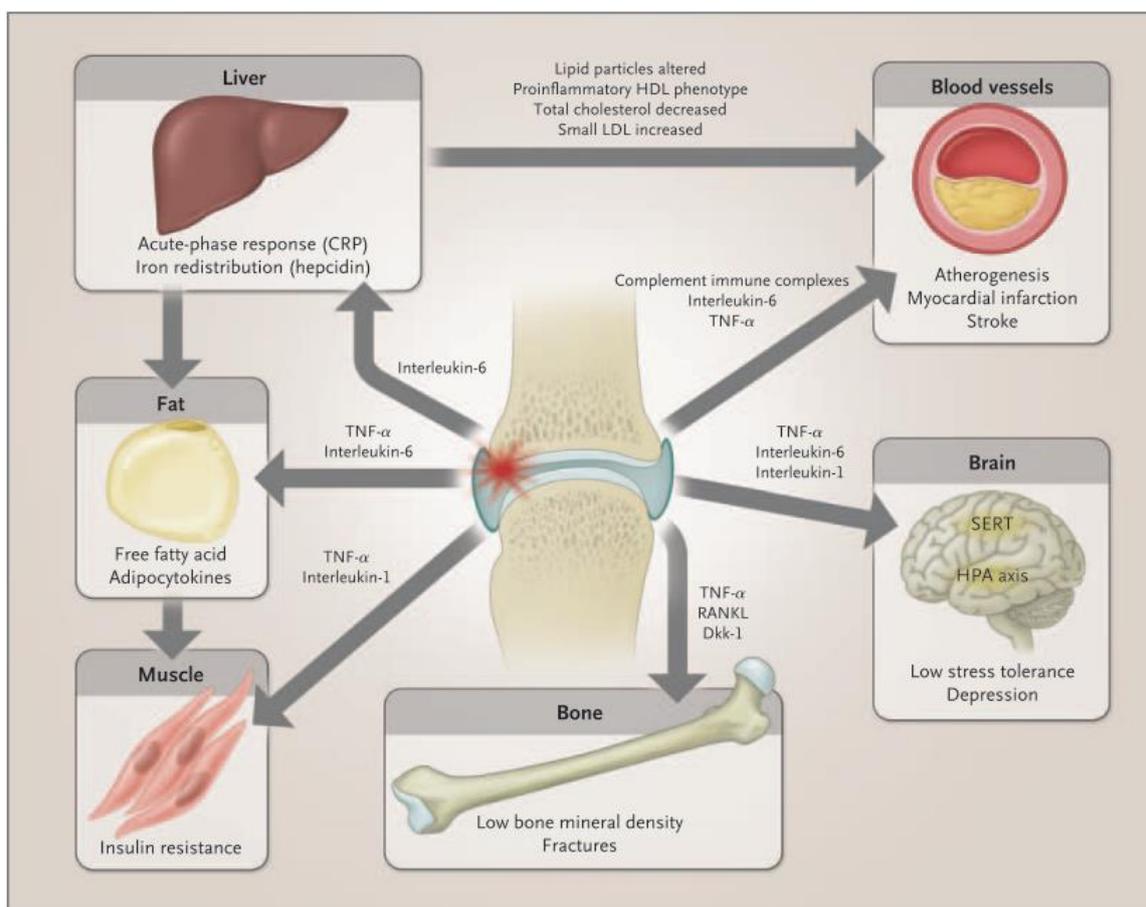


Abbildung 3: Klinisch beobachtete Langzeitkomplikationen der RA-Patienten. Entzündungsmediatoren wie Zytokine können zu einer Vielzahl von Komorbiditäten bei RA-Patienten führen, wie beispielsweise kardiovaskuläre, psychologische und skelettbezogene Störungen. CRP: C-reaktives Protein, HDL: High-Density-Lipoprotein, HPA: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse, LDL: Low-Density-Lipoprotein, SERT: Serotonintransporter (13).

Bei Patienten, die schon lange Zeit (über 3 Jahre) unter RA leiden, kommt es häufig, bei etwa 68 % der Patienten, zur Bildung von Knochenmarködemen (18). Die Anzahl der betroffenen Knochen ist bei Patienten mit einer etablierten RA signifikant höher als bei Patienten in einem frühen Stadium der RA (18). Knochenmarködeme sind mit späteren radiologischen Erosionen assoziiert (19). Sie können Aussagen über die Krankheitsaktivität geben und Marker dafür sein (18). Weitere Faktoren, die Verschlechterungen von radiologischen Läsionen und Funktionsverluste vorhersagen können, sind der Nachweis des Rheumafaktors,

Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), die Krankheitsaktivität, das Alter bei Krankheitsausbruch sowie das weibliche Geschlecht (6,20,21).

Da es sich bei der RA um eine systemische Autoimmunerkrankung handelt, können in einem späteren Stadium auch andere Teile und Organe des Körpers betroffen sein als nur die Gelenke (12). RA-Patienten leiden beispielsweise oftmals unter Osteoporose, haben ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte sowie kardiovaskuläre, pulmonale, psychologische und skelettbezogene Störungen (Abbildung 3 und Abbildung 4) (13,22–24).



Abbildung 4: Osteoporose. Innerhalb weniger Monate ist eine schwere gelenknahe Osteoporose bei einem Patienten mit hochaktiver RA aufgetreten. Sie ist besonders deutlich über der Handwurzel und den MCP-Gelenken erkennbar (25).

Außerdem haben RA-Patienten durch die langandauernde Entzündungsaktivität ein erhöhtes Risiko an Lungenkrebs sowie an Lymphomen zu erkranken, meist vom aggressiven, diffusen, großzelligen B-Zell-Typ mit einer schlechten Prognose (26–29). Zusätzlich führt RA zu einer erhöhten Todesrate, die im Zusammenhang mit dem klinischen Schweregrad und Aktivität der Erkrankung steht (15,30,31).

Bis in die frühen 2000er-Jahre waren die Behandlungsmöglichkeiten der RA noch nicht weit fortgeschritten. Mit andauernder Erkrankung kam es zu immer stärkeren Funktionsverlusten, die oft zur Notwendigkeit einer Operation mit Gelenkersatz führten, da die Symptome durch medizinische Behandlung nicht mehr zufriedenstellend beherrscht werden konnten (15,19,30). Am Häufigsten wurde ein Gelenkersatz des Knies und der Hüfte durchgeführt (15).

Außerdem führte RA in vielen Fällen zur Erwerbsunfähigkeit, oftmals schon in frühen Phasen der Erkrankung. Eine Studie aus dem Jahr 2008 zeigte, dass 23 % der Patienten mit 1 bis 3 Jahren Krankheitsdauer nicht erwerbstätig waren, und der Anteil mit der Dauer der

Erkrankung zunahm, sodass 35 % der Patienten mit 10 Jahren und 51 % der Patienten mit mehr als 25 Jahren Krankheitsdauer nicht mehr erwerbstätig waren (32).

In den letzten Jahren gab es jedoch große Fortschritte in der Behandlung der RA, was das Fortschreiten der Erkrankung und die Notwendigkeit einer OP drastisch minimierte (33–35). Hierbei spielten eine bessere Diagnostik und die Zulassung neuer Medikamente und damit frühere Behandlungsmöglichkeiten eine große Rolle. Es kann bei immer mehr Patienten eine Remission erreicht werden, bei der die Krankheitsaktivität und die Symptome durch individuelle, oftmals kombinierte Therapie mehrerer Medikamente auf ein sehr geringes Ausmaß reduziert werden (33–35).

1.1.2 Pathogenese der RA

Verschiedene Faktoren können zur Aktivierung der Peptidyl-Arginin-Deiminase führen, die daraufhin citrullinierte Neuantigene erzeugt. Zu den wichtigsten umweltbedingten Risikofaktoren gehören beispielsweise Tabakrauch und mukosale Krankheitserreger (36,37). Durch humane Leukozyten-Antigen-Moleküle wird die Interaktion zwischen antigenspezifischen B-Zellen, T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen in den sekundären lymphatischen Organen gefördert, wodurch die Reifung von ACPAs vorangetrieben wird (38).

ACPs bestehen aus einer Gruppe von Antikörpern, die mit einer Vielzahl von citrullinierten Antigenen interagieren (38). Sie sind in der Lage Immunkomplexe zu bilden und Makrophagen zu binden und aktivieren, mit Neutrophilen in einer sich selbst verstärkenden Weise zu interagieren und durch Bindung von autoreaktiven B-Zellen die citrullinspezifische T-Zell-Reifung und -Differenzierung zu fördern. Durch all diese Vorgänge kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die zur Entstehung der RA beitragen. Außerdem fördern ACPAs bei direkter Bindung die Osteoklastendifferenzierung und aktivieren diese durch gebildete Immunkomplexe, was wiederum zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt. Zusätzlich sind die ACPAs dazu in der Lage durch Interaktion mit citrullinierten zellulären Proteinen die Fibroblastenmigration zu fördern, das Komplementsystem zu aktivieren und durch Interaktion mit Typ-II-Kollagen im Gelenkknorpel die Gelenkzerstörung zu induzieren (Abbildung 5) (38).

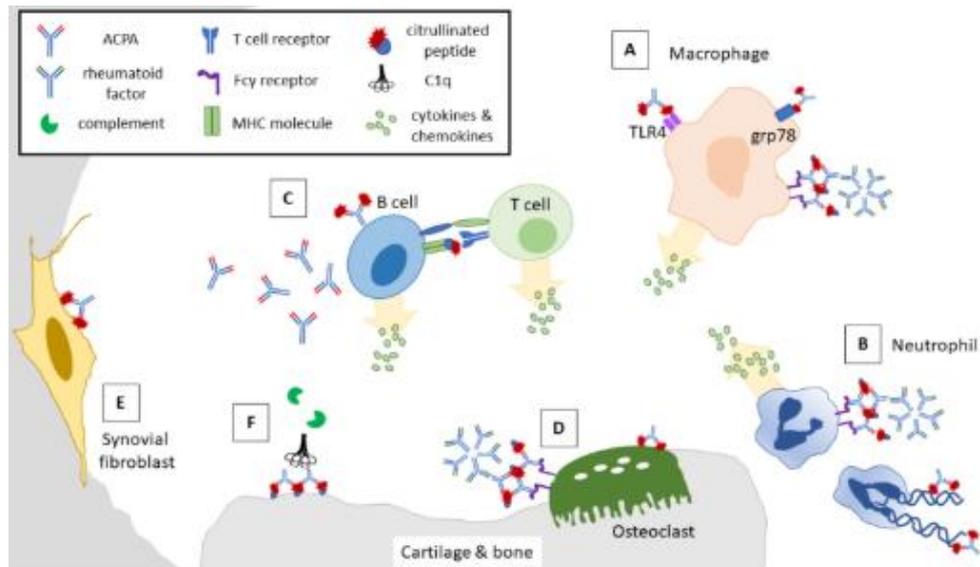


Abbildung 5: ACPA-bedingte Pathogenese der RA. (A) ACPAs bilden Immunkomplexe und binden an das grp78-Protein und TLR4 auf der Oberfläche von Makrophagen. Hierdurch werden diese aktiviert und eine Immunreaktion mit Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wird ausgelöst. (B) Neutrophile und ACPAs interagieren in einer sich selbst verstärkenden Weise. Durch NETosis werden große Mengen an citrullinierten Antigenen freigesetzt, die wiederum die ACPA-Produktion und die Immunkomplexbildung stimulieren. Dadurch werden weitere Vernetzungen gebildet und Zytokin- und Chemokinfreisetzung gesteigert. (C) Autoreaktive B-Zellen, die Oberflächen-ACPAs tragen, können als APCs dienen, um die citrullinspezifische T-Zell-Reifung/-Differenzierung zu fördern und verschiedene proinflammatorische Zytokine zu sezernieren. (D) Die direkte Bindung von ACPAs fördert die Osteoklastendifferenzierung. Durch die Immunkomplexe werden die Osteoklasten aktiviert und die Produktion proinflammatorischer Zytokine gefördert. (E) Durch die Interaktion von ACPAs und citrullinierten zellulären Proteinen wird die Fibroblastenmigration gefördert. (F) Die Komplementaktivierung erfolgt sowohl über den klassischen Weg als auch über den alternativen Weg. ACPAs reagieren auch mit Typ-II-Kollagen im Gelenknorpel, was zur Gelenkzerstörung führt (38).

Im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten konnten über 150 citrullinierte Proteine identifiziert werden, die als Citrullinom bezeichnet werden (68). Die Citrullinierung ist ein physiologischer Vorgang, der lebenswichtige zelluläre Regulationen beeinflusst (69). Erst bei übermäßiger Citrullinierung, jenseits der physiologischen Regulation, können citrullinierte Peptide potenziell zu Neoantigenen werden, welche die ACPA-Bildung anregen und damit die Entstehung von RA fördern können. In diesem Fall entspricht die Citrullinierung einem pathologischen Vorgang.

1.1.3 Zelluläre Veränderungen

Das Volumen der Synovialmembran kann Aussagen über die Krankheitsaktivität geben und Marker dafür sein (18). Mit dem Verlauf der Krankheit ändert sich die Synovia und es treten vermehrt Entzündungsmerkmale auf (1,3,12,39). Die normalerweise zarte Synovialmembran verwandelt sich in eine wuchernde, invasive Zellmasse oder einen Pannus, der das umliegende Gewebe und den Knochen erodiert (Abbildung 6) (1,3,12,39,40).



Abbildung 6: Pannus. Bei einer Operation geöffnetes Kniegelenk eines RA-Patienten, bei dem die zottenförmige Proliferation der Synovialmembran ersichtlich wird (41).

Innerhalb kurzer Zeit wird die Synovialmembran hyperplastisch, und sie besteht dann aus einer enorm vermehrten Zahl makrophagenartiger und fibroblastenartiger Synoviozyten (3,39). Diese Zellen können durch von ihnen produzierte Faktoren benachbarte Zellen aktivieren und dadurch eine Entzündungsreaktion aufrechterhalten (1). Aber auch aktivierte T-Zellen und B-Zellen infiltrieren die Synovia (1,3,8,12). Plasmazellen stellen hierbei die vorherrschende Population der infiltrierenden mononukleären Leukozyten in rheumatoiden Synovialgeweben dar (42).

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der RA, sie sind sowohl an der Krankheitsinduktion, als auch an der Krankheitserhaltung beteiligt (3,43). T-Zellen in RA-Gelenken sind hauptsächlich vom T-Helfer Typ 1 (Th1-Typ) (43).

Eine weitere entscheidende Zellart, die vermehrt in der entzündeten Synovia der RA-Patienten vorkommt sind synoviale Fibroblasten, die direkte Effektoren für Gewebeverletzungen und Matrixumbau in entzündeter Synovia sind (40). Synoviale Fibroblasten sind in der Lage eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren freizusetzen, die die Entzündungsreaktion regulieren können (40). Zu den entscheidendsten Enzymen, die synoviale Fibroblasten freisetzen können, gehören die Metalloproteinasen (3,40). Diese sind für den Umbau und den Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich (3,40). Zusätzlich haben synoviale Fibroblasten aber auch Einfluss auf andere Zellen in ihrem Umfeld, wodurch sie eine Synovitis induzieren können (40). Sie liefern chemotaktische und aktivierende Signale an residente parenchymale Zellen und infiltrierende Immunzellen und sie sind in der Lage, das Überleben von T-Zellen und Neutrophilen zu induzieren (40,44).

Außerdem kommt es bei der RA neben zellulärer Hyperplasie zu einer ausgeprägten Angiogenese und einer veränderte Expression von Zelloberflächen-Adhäsionsmolekülen, Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren (3,13,43,45). Des Weiteren sind bei der RA eine

Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen vermehrt vorhanden und aktiv (3). Diese sind sowohl von anti- als auch proinflammatorischer Natur, das Gleichgewicht in der rheumatoiden Synovialis ist jedoch zur proinflammatorischen Seite hin verschoben (43). Dies führt in den meisten Fällen zu einer fortschreitenden Zerstörung von Knorpel und Knochen, die nach einer Invasion dieser Gewebe durch das zelluläre Synovialgewebe auftritt und vermutlich hauptsächlich durch die Zytokininduktion zerstörerischer Enzyme, vor allem Matrix-Metalloproteinasen, vermittelt wird (1,43). Auch Serin-Proteinasen und Aggrecane sind für die Zerstörung der Gelenkstrukturen und der extrazellulären Matrix verantwortlich (1).

Ein wichtiger Faktor, der großen Einfluss auf die RA hat, ist das C-reaktive Protein (CRP), das zu den Akute-Phase-Proteinen gehört. Es kann Aussagen über die Krankheitsaktivität geben und erhöhte Werte prognostizieren radiologischen Läsionen und vermehrte Funktionsverluste (6,15,20,21,46). Genauso wie das CRP sind die Werte der BSG bei aktiver RA häufig erhöht (15). Beides kann verwendet werden, um die Krankheitsaktivität und das Ansprechen auf Medikamente zu verfolgen (15). Ein weiterer wichtiger Regulator der RA, der auch als Ansatzpunkt für Therapien dient, ist TNF (3,15,47–52). Es spielt eine zentrale Rolle bei der klinischen Manifestation der RA, der Entzündung der Synovia sowie der fortschreitenden Schädigung der benachbarten Knochen und Knorpel, da es an der Spitze einer proinflammatorischen Zytokin-Kaskade steht (3,43,49). Außerdem spielt IL-1 eine wichtige Rolle bei der Entzündung der Synovia und der Zerstörung der Gelenke (3).

Ein weiterer entscheidender Faktor bei der Entstehung der RA ist die Hypoxie. Der Sauerstoffgehalt im Synovialgewebe eines RA-Patienten beträgt zwischen 2 und 4 % (53–55). Die Hypoxie hat Einfluss auf die entzündlichen Prozesse und kann diese induzieren (53,55). Dies geschieht unter anderem durch den Einfluss der Hypoxie auf eine Vielzahl von Zytokinen, wie beispielsweise TNF, IL-1 β , IFN γ und das Chemokin MIP3 α (53,55). Außerdem hat die Hypoxie Einfluss auf die Angiogenese, die Zellmigration und -invasion, die Apoptose, den zellulären Stoffwechsel und die Invasivität des Pannus (53,55). Auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihre Gewebsinhibitoren (TIMPs) werden durch Hypoxie reguliert (53).

Außerdem spielt bei vermindertem Sauerstoffgehalt der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) eine große Rolle. Der aus den zwei Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β bestehende Transkriptionsfaktor ist der Hauptregulator der zellulären und systemischen O₂-Homöostase

(56,57). HIF-1 aktiviert die Transkription von Zielgenen, die für das Zellüberleben und die Adaption an Stress und Hypoxie entscheidend sind (53,56). Hierbei steuert es unter anderem die Expression von Genen, die für die Angiogenese, Erythropoese, Glukoseaufnahme, den Zellstoffwechsel und die Apoptose entscheidend sind (57). Außerdem kommt es zu einer physikalischen und funktionellen Interaktion des HIF-1 mit der PKA (56). Das PKA-Holoenzym ist vor der Aktivierung an HIF-1 α gebunden und somit bereit, auf erhöhte Konzentrationen des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) mit der Stimulation der HIF-1-Aktivität zu reagieren (56). Die PKA erhöht die HIF-1-Aktivität und Zielgenexpression, indem es den proteasomalen Abbau hemmt und die HIF-1 α -Stabilität steigert (56).

1.1.4 Diagnosestellung

Zur Diagnosestellung einer RA werden hauptsächlich die klinischen Manifestationen bewertet (6). Dies geschieht oftmals auf der Grundlage der Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR, früher *American Rheumatism Association*) von 1987, die beispielsweise Morgensteifigkeit, Arthritis oder radiologisch detektierbare Erosionen bewerten (58). Um auch frühe Stadien der RA detektieren zu können wurden die Kriterien von 1987 überarbeitet und 2010 veröffentlicht (59). Im neuen Kriteriensatz basiert die Klassifizierung als "definitive RA" auf dem bestätigten Vorhandensein einer Synovitis in mindestens einem Gelenk, dem Fehlen einer alternativen Diagnose, die die Synovitis besser erklärt, und dem Erreichen einer Gesamtpunktzahl von mindestens 6 von 10 möglichen Punkten für nachfolgende Kriterien: Anzahl und Ort der betroffenen Gelenke (0-5), serologische Abnormität (0-3), erhöhte Reaktion in der akuten Phase (0-1) und Symptombdauer (0-1) (59).

Neben der Röntgendiagnostik gewinnen auch die Magnetresonanztomographie (MRT) Untersuchungen bei RA an Bedeutung. Bei vielen Patienten sind radiologische Erosionen erst frühestens 12 Monate nach Symptombeginn sichtbar (19). Das MRT ist sensitiver für Erosionen, weshalb diese bereits in frühen Phasen der RA (4 Monate nach Symptombeginn) detektiert werden können wenn das Röntgenbild häufig noch normal ist (60). Außerdem können mittels MRT Entzündungen der Synovia und der Sehnen sowie Knochenödeme gut erkannt werden (60–62). Vor allem MRTs in frühen Phasen der RA können bei der Überwachung der Krankheitsaktivität nützlich sein, Informationen über den Schweregrad der Synovialitis liefern, radiologische Schäden und aggressive Verläufe vorhersagen und bei der Prognose und damit der Auswahl der passenden spezifischen Therapie helfen (18,19,62).

Zusätzlich stützt sich die Diagnose der RA zunehmend auch auf serologische Marker wie den Rheumafaktor oder Antikörper gegen citrullinierte Proteine oder Peptide (63). Bei RA-Patienten können eine Vielzahl von Autoantikörpern detektiert werden, viele davon bereits 4,5 Monate bis 9 Jahre vor den ersten Symptomen, mit einer zunehmenden Häufigkeit positiver Proben, je näher sie dem Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung kommen (9,10). Die Zeit von der ersten Autoantikörper-Positivität in einer Serumprobe bis zur Entwicklung von Symptomen beträgt durchschnittlich 4,5 Jahre (9). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z. B. bei systemischem Lupus erythematodes und insulinabhängigem Diabetes mellitus können Autoantikörper bereits gefunden werden, bevor klinische Symptome auftreten (64,65).

Die Autoantikörper unterscheiden sich stark in ihrer Spezifität für RA. Während manche bei vielen verschiedenen entzündlichen Erkrankungen zu finden sind, kommen andere nahezu ausschließlich bei RA vor (12). Diese RA-spezifischen Antikörper können bei der Frühdiagnose und Prognose der Erkrankung hilfreich sein (9,12,63). Die bei Patienten mit RA am häufigsten gefundenen Autoantikörper sind Antikörper gegen IgG (IgM-Rheumafaktor) und ACPA (9).

Der Rheumafaktor ist einer der am längsten und besten bekannten Autoantikörper, der erstmals von Waaler 1929 beobachtet wurde (1). Der Rheumafaktor ist ein IgM-Autoantikörper, der die Fc-Region von IgG erkennt (43). Er wird oftmals als diagnostischer Marker für RA verwendet und ist eines der Kriterien des ACR für die Diagnosestellung der RA (12). Der Rheumafaktor hat eine Sensitivität von 66 %, eine Spezifität von 87 % und eine Gesamtgenauigkeit von 78 % für die Diagnose der RA (66). Etwa 80 % der RA-Patienten sind seropositiv für diesen Faktor (1,6,12,66).

Problematisch bei der Diagnose der RA mittels des Rheumafaktor ist jedoch, dass er unter anderem bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (z. B. Sjögren-Syndrom), Infektionskrankheiten (z. B. Hepatitis, Tuberkulose), bei Gesunden (3-5 %) sowie vermehrt bei älteren gesunden Menschen (10-30 %) gefunden werden kann (1,6,12,15,67). Obwohl nicht klar ist ob die Symptome der RA direkt mit dem Rheumafaktor zusammenhängen, weist sein Vorkommen auf einen aggressiveren und destruktiveren Verlauf hin (1,12). Die RF-Titer sind hierbei linear mit der Schwere der Entzündung assoziiert (12).

Zu den Antikörpern, die sehr spezifisch für RA sind gehören vor allem jene, die gegen citrullinierte Antigene wie Sa, Filaggrin und Keratin gerichtet sind (66). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass Antikörper gegen citrullinierte Peptide bei RA eine wichtige Rolle spielen

(10,67,68). Doch auch bei anderen Krankheiten wie beispielsweise Multipler Sklerose und Schuppenflechte (Psoriasis) ist dies der Fall (68,69).

Bei der Citrullinierung katalysieren Peptidylarginin-Deiminasen die Umwandlung von proteingebundenem Arginin zu Citrullin, einer nicht kodierten Aminosäure (68). Diese posttranslationalen Modifikationen stellen frühe Prozesse in der Progression zur Krankheit dar und können einen großen Einfluss auf die Struktur und Funktion des Zielproteins haben (10,68).

Das Vorhandensein von ACPA hat einen starken prädiktiven Wert für die spätere Entwicklung der RA (10). Sie sind bei fast 70 % der RA-Patienten bereits in einer frühen Phase der Erkrankung vorhanden (6). ACPA-positive Patienten entwickelten signifikant schwerere radiologische Schäden als Patienten, die ACPA-negativ waren (6). Die Seropositivität konnte jedoch keine funktionelle Behinderung voraussagen (6).

Antikörper gegen Keratin sind bei 37-59 % der Patienten mit RA im Serum vorhanden und manchmal schon vor dem klinischen Ausbruch der Erkrankung nachweisbar (63). Weitere oftmals bei RA detektierte Antikörper sind beispielsweise gegen RA33 oder den perinukleären Faktor gerichtet. Während erstere bei etwa 36 % der RA-Patienten vorkommen, können Antikörper gegen den perinukleären Faktor bei 49-91 % der RA-Patienten gefunden werden (6,12). Die höchste Spezifität für RA erhält man bei der Kombination der Nachweise verschiedener Antikörper. Es wurde gezeigt, dass nur 31 % der RF-RA-Patienten auch positiv für Antikörper gegen Keratin, Filaggrin, Anti-Sa oder ACPA sind, und dass Anti-Sa am spezifischsten für die Diagnose ist (66). Kombiniert man den Nachweis von RF mit Antikörpern gegen Filaggrin, Anti-Sa oder ACPA nähert sich die Spezifität für RA an 100 % (66).

Zu den unspezifischen Antikörpern, die bei RA-Patienten gefunden werden können, gehören solche, die gegen eine Vielzahl von Knorpelproteinen wie Kollagen und Fibronectin gerichtet sind, aber auch Antiphospholipid-Antikörper und antineutrophile zytoplasmatische Antikörper sind häufig zu finden (12).

Diese serologischen Marker sind oftmals schon zu einem frühen Zeitpunkt detektierbar, bevor die zuvor genannten Kriterien des ACR für die Diagnosestellung erfüllt sind (63). Dies ermöglicht, dass die Ansätze der Therapie der RA immer weiter zu aggressiveren Therapien in sehr frühen Stadien der Erkrankungen tendieren (63).

1.1.5 Therapie

Da eine diagnostizierte RA nicht spontan heilt, ist der frühzeitige Beginn der Behandlung von entscheidender Bedeutung (70). Ziele der Therapie der RA sind die Linderung der Symptome sowie die Minimierung von Gelenkschmerzen und -schwellungen. Außerdem soll das Auftreten oder Fortschreiten von strukturellen Schäden an Knorpel und Knochen gehemmt sowie extraartikuläre Manifestationen kontrolliert werden. Allgemein soll die Lebensqualität und Leistungsfähigkeit im sozialen und beruflichen Umfeld erhalten bzw. verbessert werden (15,70).

Im Idealfall führt die Therapie der RA zu einer Heilung, in manchen Fällen kann jedoch auch eine geringe Krankheitsaktivität, die Remission, ein akzeptables Ziel sein (47,70). Die Wahl der passenden Therapie hängt von verschiedenen Faktoren ab, die die Wirksamkeit beeinflussen können. Patienten mit langer Krankheitsdauer sprechen weniger gut auf eine Therapie an als Patienten in einer frühen Phase der RA (71). In frühen Stadien sind sowohl die Kontrolle der Symptome und Anzeichen der Krankheitsaktivität, als auch eine Verbesserung der funktionellen Kapazität möglich (72). Das therapeutische Fenster, um Letzteres zu verbessern, liegt in den ersten 2 Jahren der Erkrankung (72). Im späteren Verlauf der Erkrankung ist eine zufriedenstellende symptomatische, klinische und labortechnische Reaktion möglich, aber eine anhaltende Verbesserung der Behinderung bleibt aus (72).

Abgesehen von der Krankheitsdauer vor Therapiebeginn haben außerdem das Geschlecht (Männer reagieren besser als Frauen), die Krankheitsaktivität (je aktiver desto besser die Wirksamkeit), eine frühere Therapie mit DMARDs und die Einschränkung der Leistungsfähigkeit wichtige Auswirkungen auf die Wirksamkeit der Therapie (71). Abhängig von der Vorhersage der Wirksamkeit der Therapie kann diese angepasst und bei einer schlechten Prognose gegebenenfalls früh aggressiver gestaltet werden (71). Neben der vorausgesagten Wirksamkeit müssen weitere Faktoren bei der Auswahl der richtigen Therapie beachtet werden. Komorbiditäten wie beispielweise Hepatitis, Krebserkrankungen, Herzinsuffizienz oder auch eine Schwangerschaft haben Einfluss auf die Wahl der passenden Therapie (15,47,70).

Bis 1999 waren die Standardmedikamente Glucocorticoide (GC), NSAIDs (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) und DMARDs (*Disease-modifying anti-rheumatic drug*). Hierzu gehörten beispielsweise Methotrexat (MTX), Goldsalze, Hydroxychloroquin, Sulfasalazin, Cyclosporin und Azathioprin, auch in verschiedenen Kombinationen (3). 1999 wurden drei

neue DMARDs zugelassen (Leflunomid, Etanercept und Infliximab) und ein COX-2-spezifischer NSAID (Celecoxib) (3). Während NSAIDs zu den weitgehend symptomatischen Mitteln gehören, sollen DMARDs eine Hemmung des Auftretens oder Fortschreitens von strukturellen Schäden an Knorpel und Knochen bewirken (70).

Sowohl das ACR im Jahr 2008 als auch die EULAR (*European League Against Rheumatism*) im Jahr 2010 haben Empfehlungen zur Behandlungen der RA veröffentlicht und diese mit dem Erlangen neuer Erkenntnisse bzw. der Zulassung neuer Medikamente 2012 bzw. 2016 und 2019 überarbeitet und aktualisiert (47,70,73–75). Diese Empfehlungen spiegeln die Ausgewogenheit der klinischen, funktionellen und strukturellen Wirksamkeit, der Sicherheit, der Kosten und der Patientenwahrnehmung wider (70). Die Standardtherapie der RA entspricht einer pharmakologischen Therapie mit DMARDs (15,70). Diese sollte sofort nach Diagnosestellung beginnen, und Methotrexat sollte Teil der ersten Behandlungsstrategie sein (70).

Bei der Gabe von MTX muss bedacht werden, dass erst nach 4 bis 8 Wochen eine Wirkung eintritt (3). Es werden mindestens 10 mg MTX pro Woche verschrieben und die Dosierung kann bis 15-25 mg erhöht werden bzw. bis die Nebenwirkungen zu stark werden (3). Die Zugabe von oraler Folsäure (1 mg pro Tag) oder Folinäure (5 mg pro Woche) reduziert selektive Nebenwirkungen wie Alopezie, Stomatitis, gastrointestinale Unverträglichkeit und hämatopoetische toxische Effekte, ohne die Wirksamkeit wesentlich zu verringern (3).

Neben MTX gehören Hydroxychloroquin, Leflunomid, Minocyclin und Sulfasalazin zu den empfohlenen DMARDs, von denen auch eine Kombination von 2 bis 3 Präparaten möglich ist (47). Zu den biologischen Wirkstoffen gehören monoklonale Antikörper und rekombinante Rezeptoren zur Blockierung von Zytokinen, welche die für die RA-Symptome verantwortliche Entzündungskaskade fördern (15). Von den biologischen Wirkstoffen sind TNF-Inhibitoren die am besten untersuchten Präparate und die Therapie der ersten Wahl (15).

Die ersten Versuche am Menschen mit Reagenzien gegen TNF begannen in den frühen 1990er-Jahren (3). Sie sind sicher und gut verträglich, können den Verlauf der Knochen- und Knorpelschädigung verlangsamen oder sogar verhindern und zu positiven Ergebnissen bei der Reduzierung der Entzündung bei klinischen Messparametern sowie den Laborwerten führen (48–50).

TNF-Inhibitoren sind auch bei anderen Krankheiten wie Morbus Crohn, Morbus Bechterew, Psoriasis and Psoriasis-Arthritis wirksam (1). Empfohlenen TNF-Inhibitoren bei RA

sind Adalimumab, Infliximab, Etanercept, Certolizumab pegol und Golimumab (70). Zu den empfohlenen biologischen Wirkstoffen, die nicht gegen TNF gerichtet sind, gehören zum Beispiel Abatacept (Anti-T-Zell-Strategie), Rituximab (Anti-B-Zell-Strategie), Tocilizumab (Anti-IL-6-Strategie) und Sarilumab (Anti-IL-6-Strategie) (70).

Eine Kombination verschiedener Präparate, vor allem zusammen mit MTX, hat sich oftmals als vorteilhaft dargestellt. Kombinationstherapien helfen bei frühem RA-Stadium genauso wie bei Patienten mit langjähriger RA, bei denen die klassische DMARD-Therapie nicht angeschlagen hat (3,49). Kombinierte Therapien von Antikörpern gegen TNF und MTX zeigten sich mehrfach als effektiv (3,49,51,52). Die Kombination von Infliximab und MTX beispielsweise zeigte eine bessere Wirksamkeit als jedes der Medikamente allein, Symptome und Anzeichen der RA wurden signifikant stärker reduziert und die Lebensqualität signifikant verbessert (3,49,51). Außerdem konnte bei der Kombination, im Gegensatz zu MTX allein, kein Fortschreiten der Gelenkschäden beobachtet werden (49).

Neben DMARDs werden zu Beginn der Therapie oftmals GCs verschrieben, die nach den EULAR-Empfehlungen jedoch so schnell wie klinisch machbar reduziert bzw. abgesetzt werden sollten (70). Sie werden in erster Linie als Überbrückungstherapie eingesetzt bis die DMARDs ihre Wirksamkeit zeigen und ausschleichend innerhalb von etwa 3 Monaten wieder abgesetzt (70). Nach Nutzen-Risiko-Abwägung gibt es jedoch auch Rheumatologen, die eine Dauergabe der GCs in niedriger Dosierung unter 5 mg/Tag empfehlen (76–78).

DMARDs sind oftmals nur mäßig wirksam und verträglich bei Langzeitbehandlungen (3). Patienten benötigen Zugang zu mehreren Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, um die Heterogenität der RA zu adressieren (70). Sie können lebenslang mehrere aufeinanderfolgende Therapien benötigen (70). Bei aktiver Erkrankung wird eine regelmäßige Überwachung der Wirksamkeit der Therapie im Abstand von 1 bis 3 Monaten empfohlen (70). Spätestens 3 Monate nach Behandlungsbeginn sollte eine Besserung auftreten und nach 6 Monaten das Behandlungsziel erreicht sein. Ist dies nicht der Fall muss die Therapie angepasst werden (70). Tritt bei Patienten eine anhaltende Remission ein, das heißt geringe Krankheitsaktivität oder Rückgang der Symptome, können die DMARDs ausgeschlichen werden (70,79). Vielen Patienten ist es jedoch nicht möglich die Therapie abzusetzen, und sie benötigen eine lebenslange Behandlung (70).

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.2.1 Allgemeines über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), auch als "Sieben-Transmembran-Rezeptoren" (7TMR) bekannt, stellen die größte, vielseitigste und ubiquitärste der verschiedenen Familien von Membranrezeptoren dar (80–82). GPCRs sind integrale Membranproteine, die sieben transmembrane α -Helices enthalten (83). Es gibt 3 extrazelluläre Schleifen, mit einem extrazellulären Amino-Terminus, und 3 intrazelluläre Schleifen, mit einem intrazellulären Carboxy-Terminus (81,84–88). Die extrazelluläre Region moduliert den Ligandenzugang, die transmembrane Region bildet den strukturellen Kern, bindet Liganden und gibt diese Information durch Konformationsänderungen an die intrazelluläre Region weiter. Diese bildet die Schnittstelle zu zytosolischen Proteinen, wie beispielsweise in Form einer G-Protein-Bindungsfläche, und kann die Aktivierung komplexer Signalnetzwerke bewirken und zu einer zellulären Reaktion führen (80,81,85,87).

Die Gesamtzahl der funktionellen GPCRs im menschlichen Genom beträgt über 800, davon sind 342 funktionale nicht-olfaktorische GPCRs sowie 460 olfaktorische Rezeptoren bekannt (89). GPCRs in Wirbeltieren werden aufgrund ihrer Sequenz und strukturellen Ähnlichkeit üblicherweise in fünf Familien unterteilt: Rhodopsin (Familie A), Sekretin (Familie B), Glutamat (Familie C), Adhäsion und Frizzled/Taste2 (86,89). Die Rhodopsin-Familie ist bei weitem die größte und vielfältigste dieser Familien und die Mitglieder zeichnen sich durch konservierte Sequenzmotive aus, die auf gemeinsame strukturelle Merkmale und Aktivierungsmechanismen hindeuten (86,89). Sie besteht aus vier Hauptgruppen (α , β , γ und δ) (89).

Trotz der Größe und Vielfalt der GPCR-Superfamilie interagieren diese Proteine mit einer relativ kleinen Anzahl von G-Proteinen, um intrazelluläre Signalkaskaden zu initiieren (81). Die klassische Aufgabe von GPCRs ist es, die Bindung von Agonisten mit der Aktivierung spezifischer heterotrimerer G-Proteine zu koppeln, was zur Modulation von nachgeschalteten Effektorproteinen führt (86,90). Als Reaktion auf eine Vielzahl von Reizen, beispielsweise durch Ionen, Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, organische Geruchsstoffe, Amine, Peptide, Proteine, Lipide, Nukleotide und sogar Photonen, regulieren diese Rezeptoren den Stoffwechsel, sekretorische Eigenschaften, elektrische Aktivität, die Form und die Motilität von praktisch allen Säugetierzellen (82–84,86,87,89,90).

7TMR sind ein häufiges Ziel von Medikamenten, da ihre Signalaktivierung oder -inaktivierung viele physiologische Pfade beeinflusst (82,91). Sie sind beispielsweise bei der Behandlung von Herzfehlfunktionen, Asthma und Migräne von Bedeutung (87).

1.2.2 Ablauf der Signalweiterleitung an GPCRs

GPCRs können sowohl in einem aktiven, als auch einem inaktiven Zustand vorkommen, wobei die Bindung eines Liganden das dynamische Gleichgewicht verschieben kann (85). Bei einem aktiven Zustand besitzt der GPCR eine Konformation bei der er mit heterotrimeren G-Proteinen oder anderen Effektoren interagieren kann (80,92). Doch auch in Abwesenheit eines Liganden zeigen die meisten GPCRs ein Grundniveau an Guanosintriphosphat(GTP)-Austauschaktivität, was darauf hindeutet, dass es eine Gleichgewichtspopulation des Rezeptors ganz im Sinne des Massenwirkungsgesetzes in einer aktiven und inaktiven Form gibt (83).

Bei einem inaktiven Zustand besitzen die GPCRs eine Konformation mit einer verschlossenen G-Protein-Bindungsfläche, die nicht in der Lage ist, den G-Protein-Nukleotidaustausch zu katalysieren (80). Verschiedene Liganden können den aktiven oder inaktiven Zustand fördern und werden nach dieser Fähigkeit in Agonisten, inverse Agonisten und Antagonisten unterteilt (85).

Agonisten, die an GPCRs binden, fördern eine aktive Konformation, was zu einer verstärkten Signalwirkung führt (83,85,86). Umgekehrt hemmen inverse Agonisten die spontane basale Signalaktivität, indem sie eine inaktive Konformation der GPCRs stabilisieren (83,85,86). Antagonisten haben keinen Einfluss auf das dynamische Gleichgewicht zwischen der aktiven und inaktiven Konformation des GPCR, verhindern aber die Bindung sowohl von Agonisten als auch von inversen Agonisten (85,86). Die Agonistenbindung erhöht die Neigung zu intrazellulären Konformationsänderungen, die für die G-Protein-Bindung erforderlich sind, aber die Agonistenbindung allein ist nicht ausreichend, um eine aktive Konformation des gesamten Rezeptormoleküls vollständig zu stabilisieren (80,87). Erst nach Bindung eines G-Proteins, Arrestins oder konformationsspezifischen Antikörpers wird der vollständig aktive Zustand des Rezeptors zum dominanten Zustand (87).

Der Rezeptor assoziiert entweder durch konstitutive Aktivität oder als Reaktion auf die Bindung eines Agonisten stärker mit dem G-Protein und wirkt als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (81,83,85,90,92–94). Dies fördert die Freisetzung von

Guanosindiphosphat (GDP) und dessen Ersatz durch GTP, das in deutlich höheren zellulären Konzentrationen als GDP vorliegt (81,83,85,90,92,93). Durch die Aktivierung des Rezeptors werden Konformationsänderungen in den Rezeptoren und den assoziierten heterotrimeren G-Proteinen induziert, die zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit vom β/γ -Komplex führen, wodurch zwei funktionelle Untereinheiten ($G\alpha$ und $G\beta\gamma$) entstehen (81,83,85,92,93). Sowohl GTP-gebundenes $G\alpha$ als auch freies $G\beta\gamma$ sind in der Lage, durch Interaktion mit nachgeschalteten Effektorproteinen, Signale zu initiieren und regulieren (81,83,85,92–94).

Zusätzlich zur Signalisierung durch G-Proteine können GPCRs auch durch Arrestine Signale weiterleiten, die außerdem großen regulatorischen Einfluss auf die 7TMRs haben (Abbildung 7) (83). Durch ihre klassische Wirkung als Rezeptor-Entkopplungsmoleküle spielen β -Arrestine bei der Desensibilisierung der 7TMRs eine große Rolle (82,90,94). Zusätzlich steuern sie den Abbau von cAMP indem sie Phosphodiesterasen (PDE) an ligandenaktivierte Rezeptoren rekrutieren (94). Auch bei der Internalisierung vieler 7TMRs sind sie essenziell, da sie als Adaptoren fungieren, die für die Rekrutierung wichtiger Strukturkomponenten der Clathrin-beschichteten Pits an agonistisch aktivierte Rezeptoren benötigt werden (90,95).

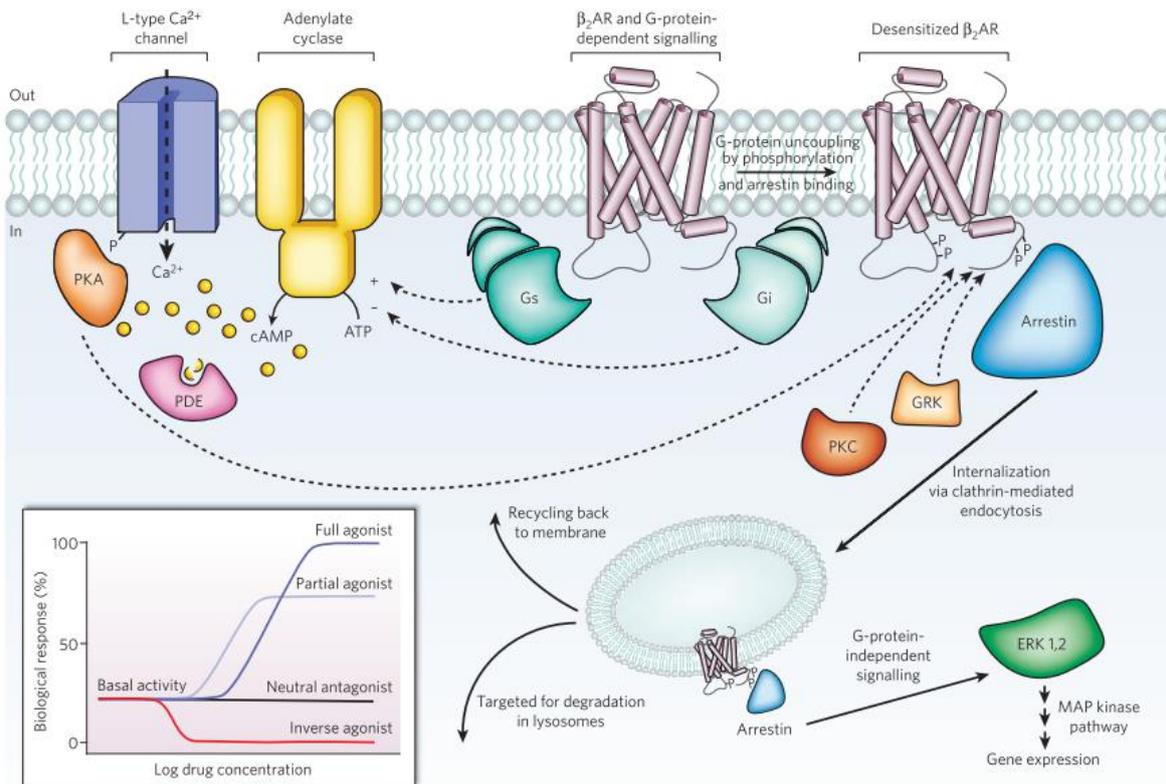


Abbildung 7: Das Beispiel der Signalweiterleitung eines β_2 -AR. Der β_2 -AR kann Signale sowohl über G_s als auch G_i weiterleiten, die in der Lage sind die Adenylatzyklase zu aktivieren bzw. zu inhibieren. Die AC generiert cAMP, das die PKA aktiviert, die wiederum eine Vielzahl zellulärer Proteine reguliert, wie beispielsweise den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und den β_2 -AR selbst. Die cAMP-Konzentration wird durch spezifische PDEs vermindert. Außerdem führt die Aktivierung des β_2 -AR zur Phosphorylierung des GPCR durch die PKC und GRKs, was zur Bindung von Arrestin führt. Arrestin wiederum aktiviert Erk, verhindert die Aktivierung des β_2 -AR und führt zur Internalisierung des Rezeptors. Im Anschluss kann der Rezeptor entweder zurück in die Membran integriert werden oder im Lysosomen abgebaut werden. Außerdem ist in der Graphik in der linken unteren Ecke eine Klassifizierung für die Wirksamkeit verschiedener Liganden der GPCRs dargestellt. Die agonistenunabhängige Aktivität der GPCRs entspricht der basalen Aktivität. Während inverse Agonisten diese basale Aktivität vermindern, haben neutrale Antagonisten darauf keine Auswirkung. Partielle und volle Agonisten sind in der Lage, die Aktivität der GPCRs über die basale Aktivität hinaus zu steigern. β_2 -AR: β_2 -adrenerger Rezeptor, AC: Adenylatzyklase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, PKA: Proteinkinase A, PDE: Phosphodiesterase, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, PKC: Proteinkinase C, GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase, Erk: Extracellular-signal Regulated Kinases (86).

Durch die Vermittlung einer Vielzahl von Rezeptor-Signalisierungs- und Regulationsprozessen haben β -Arrestine auch positiven Einfluss auf die 7TMRs (82,90). Sie sind sowohl in der Lage die Signale von mehreren Rezeptoreingängen zu empfangen, als auch die Signale an verschiedene Effektoren weiterzuleiten (82). β -Arrestine fungieren beispielsweise als multivalente Adaptorproteine, die eine Vielzahl von zytosolischen Proteinen an ihren Wirkort an der Plasmamembran rekrutieren und führen dadurch zur Entstehung neuer Signale von 7TMRs (82,90,94). Sie dienen außerdem als Signalüberträger und verbinden die aktivierten Rezeptoren mit verschiedenen Signalwegen innerhalb der Zelle (82). Unter anderem

vermitteln sie Endozytose, aktivieren die MAP-Kinase Erk, tragen zur antiapoptotischen Signalweiterleitung bei und bewirken Chemotaxis und Zellmotilität (82,94,96).

Um die Stärke der GPCR-Signale zu begrenzen und die Zelle in den nicht stimulierten Zustand zurückzubringen, um sie vor einer überschießenden Reaktion zu schützen, muss eine weitere Rezeptor-G-Protein-Kopplung verhindert werden und die bereits synthetisierten Second-Messenger-Moleküle müssen abgebaut werden (88,94). Der Prozess der Rezeptordesensibilisierung ist ein autoregulatorischer Prozess und beinhaltet mehrere Mechanismen, die in akute Reaktionen (Entkopplung) und chronische Reaktionen (Internalisierung und Herabregulation) unterteilt werden können und vom Ausmaß und der Dauer der Aktivierung abhängen (84,88,96,97).

Der Prozess der Desensibilisierung kann sich von Zelle zu Zelle und von Gewebe zu Gewebe deutlich unterscheiden (88). Während die Agonisten-induzierte Desensibilisierung bzw. Entkopplung innerhalb von Sekunden bis Minuten eingeleitet wird, dauert es Stunden bis Tage bis zur Herabregulation des Rezeptors (84). Für die Initiierung der Rezeptordesensibilisierung spielt die Phosphorylierung des Rezeptors eine entscheidende Rolle (84). Sie ist ein effektiver Mechanismus zur Modulation der Ansprechbarkeit der rezeptorvermittelten Signaltransduktionskaskade (84).

Für die Phosphorylierung des β 2-AR sind beispielsweise die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und transient auch G-Protein-gekoppelte Kinasen (GRKs), speziell GRK2, verantwortlich (Abbildung 7) (84,96,97). Durch die Phosphorylierung kommt es zur Rekrutierung und Bindung von zytosolischem β -Arrestin, das die Kopplung des Rezeptors an Gas verhindert (88,97). Dies wiederum verhindert die Signalweiterleitung an die Adenylatzyklase, wodurch die Rezeptorfunktion eingeschränkt wird (84,88).

Außerdem können durch die gerüstbildende Wirkung der β -Arrestine andere Proteine, wie z. B. die PDE4, in die Mikroumgebung des Rezeptors gebracht werden (88). PDEs sind eine Familie von Enzymen, die cAMP zu Nukleotid-5'-Monophosphat (5'-AMP) hydrolysieren, indem sie die Phosphodiesterbindung abbauen. Wird die PDE an den Rezeptor rekrutiert, reduziert sie den lokalen cAMP-Spiegel und beendet dadurch die Signalweiterleitung über den sekundären Botenstoff der vorherigen β 2-AR-Stimulation (88,96). Diese einfache Form der Desensibilisierung ist ein vorübergehender Prozess und kann innerhalb von Minuten nach Entfernen des Agonisten wieder rückgängig gemacht werden (88).

1.2.3 G-Proteine

Guanin-Nukleotid-bindende Proteine oder heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, α , β und γ , und werden durch ihre $G\alpha$ -Untereinheiten identifiziert (81,85). Im menschlichen Genom gibt es 16 $G\alpha$ -Gene, die für 23 bekannte $G\alpha$ -Proteine kodieren (98). Basierend auf den Sequenz- und Funktionsähnlichkeiten werden die $G\alpha$ -Proteine in vier Familien eingeteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$.

In der $G\alpha_s$ -Familie gibt es zwei Mitglieder: $G\alpha_s$ (s steht für Stimulation) und $G\alpha_{olf}$ (olf steht für olfaktorisch). Während $G\alpha_s$ in den meisten Zelltypen exprimiert wird, wird $G\alpha_{olf}$ spezifisch in den olfaktorischen sensorischen Neuronen exprimiert.

Die $G\alpha_i$ -Familie (i steht für Inhibition) ist die größte und vielfältigste Familie und umfasst $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_g$ und $G\alpha_z$. $G\alpha_i$ -Proteine sind in den meisten Zelltypen nachgewiesen worden. $G\alpha_o$ wird stark in Neuronen exprimiert und hat zwei gespleißte Varianten: $G\alpha_{oA}$ und $G\alpha_{oB}$. $G\alpha_t$ (t steht für Transducin) hat zwei Isoformen. $G\alpha_{t1}$ wird in den Stäbchenzellen des Auges exprimiert, während $G\alpha_{t2}$ in den Zapfenzellen des Auges vorkommt. $G\alpha_g$ (g steht für Gustducin) kann in Geschmacksrezeptorzellen gefunden werden. $G\alpha_z$ wird in neuronalen Geweben und in Blutplättchen exprimiert.

Beim Menschen besteht die $G\alpha_q$ -Familie aus $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$. $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ sind ubiquitär exprimiert, während die Expression von $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$ stärker eingeschränkt ist. $G\alpha_{14}$ wird hauptsächlich in der Niere, Lunge und Leber gefunden, während $G\alpha_{16}$ spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.

In der $G\alpha_{12}$ -Familie gibt es $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, die in den meisten Zelltypen exprimiert werden (85).

In Abwesenheit einer Stimulation ist die $G\alpha$ -Untereinheit GDP-gebunden und mit den β - und γ -Untereinheiten assoziiert (93). Die α -Untereinheit des G-Proteins kann zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Konformation, die für die Interaktion mit einem aktivierten Rezeptor vorbereitet ist, und einer aktiven GTP-gebundenen Konformation wechseln (81,98). Im aktiven Zustand ist sie in der Lage intrazelluläre Signalkaskaden als Reaktion auf die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) durch extrazelluläre Stimuli zu modulieren (81,98). Effekte über $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoren stimulieren beispielsweise eine Vielzahl von entzündungshemmenden Effekten (86).

Die Strukturen der $G\alpha$ -Untereinheit offenbaren eine konservierte Proteinfaltung, die sich aus einer GTPase-Domäne und einer helikalen Domäne zusammensetzt. Die

GTPase-Domäne ist bei allen Mitgliedern der G-Protein-Superfamilie konserviert. Diese Domäne hydrolysiert GTP und stellt die Bindungsflächen für das G $\beta\gamma$ -Dimer, GPCRs und Effektorproteine bereit (81). Die helikale Domäne ist einzigartig für G α -Proteine und besteht aus einem Bündel von sechs α -Helices, die einen Deckel über der Nukleotid-Bindungstasche bilden und gebundene Nukleotide im Kern des Proteins begraben (81).

Die Aktivierung der G α s-Untereinheiten führt zu einer anschließenden Stimulation von Adenylatzyklasen (ACs), die Adenosintriphosphat zu cAMP hydrolysieren und dessen intrazelluläre Konzentration erhöhen (99,100). Es gibt neun verschiedene membrangebundene Isoformen und eine lösliche Isoform der Klasse III AC, die alle durch G α s aktiviert werden (96,101). G α i-Proteine hingegen können bestimmte Isotypen von Adenylatzyklasen hemmen, was zu reduzierten intrazellulären cAMP-Spiegeln führt (85). Als sekundärer Botenstoff ist cAMP von entscheidender Bedeutung bei der Regulation einer Vielzahl von biologischen Reaktionen im Menschen (39). Hierzu gehören unter anderem Entzündungsprozesse, Apoptose und der Lipidstoffwechsel (39,99). Vor allem bei der Signaltransduktion über Rezeptoren für Histamin, Prostaglandin und N-Methyl-D-Asparaginsäure sowie α - und β -adrenerge Rezeptoren ist cAMP der wichtigste Botenstoff (39).

Die intrinsische Guanosintriphosphatase(GTPase)-Aktivität der G α -Untereinheit bewirkt die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch die G α -Untereinheit in ihren inaktiven Zustand zurückkehrt (Abbildung 8) (85,92,93,98). Es kommt zur Reassoziaton der G α -GDP- und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten sowie zur Beendigung der Signalweiterleitung (85,92,93). GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) (wie z. B. RGS-Proteine) binden an G α , um die intrinsisch geringe GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit zu beschleunigen (85).

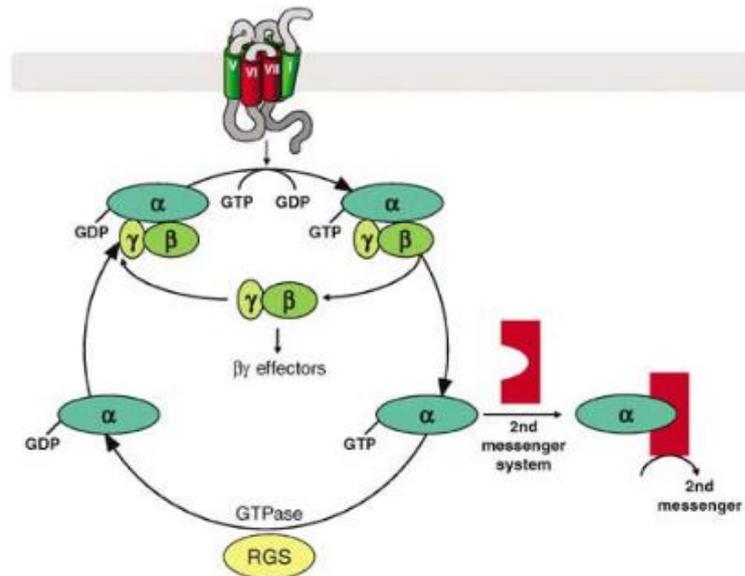


Abbildung 8: Kreislauf der G-Protein-Konformation bei Rezeptoraktivierung. Das inaktive GDP-gebundene heterotrimere G-Protein kann durch die Interaktion mit einem GPCR aktiviert werden, was den Austausch des GDP durch GTP bewirkt. Die GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit löst sich vom $G\beta\gamma$ -Komplex und beide können daraufhin Signalwege aktivieren. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird das GTP hydrolysiert. Dieser Vorgang wird durch RGS-Proteine beschleunigt. Das GDP-gebundene $G\alpha$ kann mit dem $G\beta\gamma$ -Komplex reasoziiieren und die Signalweiterleitung durch das G-Protein wird beendet. GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriophosphat, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, RGS: Regulators of G-Protein Signaling (93).

Während die α -Untereinheit des G-Proteins einzeln abgespalten werden kann, sind die β - und γ -Untereinheiten eng miteinander verbunden und können als eine Funktionseinheit betrachtet werden (Abb. 7) (85). Sowohl GTP-gebundenes $G\alpha$ als auch freies $G\beta\gamma$ sind in der Lage, Signale durch Interaktion mit nachgeschalteten Effektorproteinen zu initiieren (98). $G\beta\gamma$ -Dimere sind eine ubiquitär exprimierte Familie von Proteinen, von denen fünf verschiedene β - und 12 γ -Untereinheiten beschrieben wurden (85,93,102). $G\beta 1$, $G\beta 2$, $G\beta 3$ und $G\beta 4$ haben hohe Sequenzähnlichkeiten (zwischen 80 und 90 %), während $G\beta 5$ zu ungefähr 50 % mit den anderen $G\beta$ -Untereinheiten übereinstimmt (85).

$G\beta\gamma$ -Untereinheiten interagieren mit Rezeptoren, $G\alpha$ -Untereinheiten, Effektoren und regulatorischen Enzymen wie GRKs, weshalb sie eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung von GPCRs spielen und ihre Funktionen nahezu jeden Aspekt der Zell-, Gewebe- und Organphysiologie abdecken (102). $G\beta\gamma$ kann beispielsweise Kir3-Kanäle, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, Adenylatzyklase-Isoformen, Phospholipase C, Phosphoinositid 3 Kinasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinase regulieren (102). Durch Reassoziierung mit $G\alpha$ -GDP wird die $G\beta\gamma$ -Signalweiterleitung beendet (85).

Relativ wenige Arten von G-Proteinen leiten Signale von einer riesigen Anzahl von GPCRs weiter und so muss jedes Mitglied der G-Protein-Familie in der Lage sein, mit vielen

verschiedenen Rezeptoren zu interagieren (81). Außerdem können viele Rezeptoren mehrere G-Protein-Signalwege aktivieren (81). Zahlreiche Faktoren können die Kinetik der G-Protein-Aktivierung beeinflussen, darunter Liganden-, Rezeptor- und G-Protein-Affinitäten, intrazelluläre Proteinkonzentrationen und die Kinetik der Rezeptor-Deaktivierung (81).

1.2.4 β 2-AR

β -Adrenozeptoren (β -AR) werden in 3 verschiedene Gruppen unterteilt. Zwischen den sogenannten β 1-, β 2- und β 3-Rezeptoren besteht eine 65 %ige bis 70 %ige Homologie. Sie können klassischerweise in der Herzmuskulatur, der glatten Muskulatur der Atemwege und im Fettgewebe identifiziert werden (88).

Traditionell wird die Rolle des β 2-AR darin gesehen, die Aktivierung der Adenylatzyklase über die Kopplung an $G_{\alpha s}$ zu bewirken (97). Durch cAMP und die PKA werden auf diese Weise weitgehend hemmende Signale auf Zellen des Immunsystems ausgeübt und damit antiinflammatorische Signalweiterleitungen induziert (96,100). Inzwischen ist bekannt, dass die Signalgebung über β 2-ARs viel komplexer ist und zusätzliche Signaltransduktionswege aktivieren kann, die hemmende und/oder verstärkende Effekte auf Zellfunktionen ausüben können (96).

1.2.5 $G_{\alpha s}$ -zu- $G_{\alpha i}$ -Umschaltung

Durch Agonistenbindung an den β 2-AR kommt es zur Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -Signalweges, was über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP führt (Abbildung 9) (100). Dies wiederum aktiviert die PKA, die den mit dem Agonisten besetzten Rezeptor phosphoryliert (56,100). Dies ist ein wichtiger regulatorischer Faktor für den β -AR, da die Verringerung der Effizienz der Rezeptor-Kopplung an $G_{\alpha s}$ zu einer Desensibilisierung führt, wodurch die cAMP-Produktion reduziert wird (100).

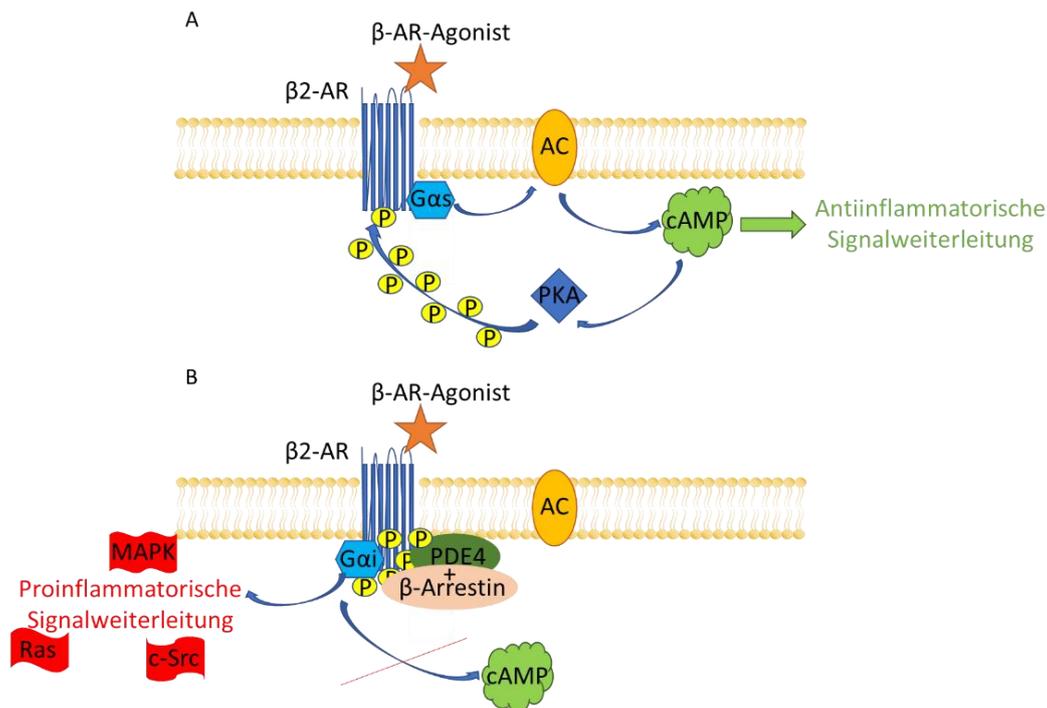


Abbildung 9: Gas-zu-Gai-Umschaltung am β 2-AR. In der oberen Abbildung (A) ist dargestellt, wie durch den β -AR-Agonisten eine Aktivierung der Adenylatzyklase über Gas induziert wird. In der Folge wird die cAMP-Konzentration gesteigert. Dies führt zur Initiierung antiinflammatorischer Signale und der Aktivierung der PKA, die den Rezeptor phosphoryliert. Im unteren Bild (B) ist die Signalweiterleitung des β 2-AR nach der Gas-zu-Gai-Umschaltung dargestellt. Nachdem PDE4 und β -Arrestin gemeinsam an den durch die PKA phosphorylierten Rezeptor gebunden haben ist die Affinität des β -AR zu Gas verringert und zu Gai verstärkt. Diese Umschaltung bewirkt eine proinflammatorische Signalweiterleitung und cAMP wird nicht mehr gebildet. β -AR: β -adrenerger Rezeptor, AC: Adenylatzyklase, PKA: Proteinkinase A, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, PDE4: Phosphodiesterase 4, MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase.

Außerdem kann es zu einer Umschaltung der Signalkaskade kommen. Hierbei wechselt der Rezeptor nach der Phosphorylierung durch die PKA aufgrund einer Konformationsänderung seine Kopplungsspezifität von Gas zu Gai (Abbildung 9) (100). Entscheidend für diese Umschaltung ist die gemeinsame Bindung von PDE4 und β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor (97,103). Die induzierte Gai-Bindung verhindert, genauso wie die reduzierte Gas-Bindung, die Bildung von cAMP (96,100). Außerdem führt die Kopplung an Gai zur Signalweiterleitung über verschiedene meist proinflammatorische Signalwege wie beispielsweise der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Src und dem G-Protein Ras und MAP-Kinasen (97,100).

Die drei wichtigsten Mitglieder der MAPK-Familie sind die extrazellulären signalregulierten Kinasen (Erks) 1 und 2, die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) 1, 2 und 3 sowie die p38-Isoformen α , β , γ und δ (104). Die MAPK-Signalwege spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation mehrerer grundlegender Prozesse, einschließlich Zellwachstum, -entwicklung, -differenzierung und Apoptose (104).

Diese Umschaltung des kanonischen, antiinflammatorischen Signalweges über G α s zu einem proinflammatorischen Signalweg über G α i konnte beim β 2-AR mehrfach beobachtet werden, wie beispielsweise bei Immunzellen unter entzündlichen Bedingungen oder gemischten synovialen Zellen der RA-Patienten (96,103,105). Beim Auftreten dieser Umschaltung kam es bei gemischten synovialen Zellen der RA-Patienten unter Hypoxie durch G α s-Agonisten unerwarteterweise zu einer Erhöhung des TNF, bei Hemmung des G α s-gekoppelten Rezeptors zu einer verminderten TNF-Freisetzung (103).

Auch die Behandlung der Zellen mit Rolipram (PDE4-Inhibitor), oder Rolipram zusammen mit einem G α s-Agonisten erhöhten die TNF-Konzentration (103). Außerdem bewirkte die Behandlung der Zellen mit G α s-Agonisten oder deren Kombination mit Rolipram eine erhöhte pErk1/2-Expression (103). Die Tatsache, dass diese Effekte durch Behandlung der Zellen mit Pertussis-Toxin (G α i-Inhibitor) und H89 (PKA-Inhibitor) umgekehrt werden konnten, entspricht hierbei der Hypothese der G α s-zu-G α i-Umschaltung mit proinflammatorischen Auswirkungen (103). Zuvor konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass kanonische G α s-Agonisten wie Noradrenalin die proinflammatorische Zytokinsekretion von Zellen des entzündeten Gewebes der RA-Patienten kaum verringern oder nicht hemmen (5).

Ähnliches wie bei den synovialen Zellen der RA-Patienten konnte auch bei Monozyten nach einer Verbrennungsverletzung beobachtet werden. Auch hier hatten typische G α s-gekoppelte Rezeptoragonisten keine antiinflammatorische, sondern eine proinflammatorische Wirkung, die sich ebenfalls durch TNF-Sekretion nachweisen ließ (105). In dieser Studie war H89 ebenfalls dazu in der Lage die proinflammatorischen Effekte umzukehren (105).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die G α s-zu-G α i-Umschaltung wie zuvor beschrieben stattfindet und zu proinflammatorischen Effekten führt (103,105). Die Erkenntnis über die Umschaltung und die daraus resultierenden Folgen können bisher ungeklärte bzw. entgegen den Erwartungen verlaufende Signalkaskaden erklären und fehlende therapeutische Effekte von Medikamenten, wie zum Beispiel Apremilast bei RA, erklären (103). Apremilast ist ein Phosphodiesterase-Hemmer, der bei der Behandlung von Psoriasis-Arthritis wirksam ist und Anzeichen und Symptome sowie die körperliche Funktion verbessert. Apremilast zeigte ein akzeptables Sicherheitsprofil und ist im Allgemeinen gut verträglich (106–108). Obwohl ähnliche Ergebnisse wie bei der Psoriasis-Arthritis auch bei RA erwartet wurden, konnte bei dieser Krankheit keine Wirksamkeit nachgewiesen werden (106,107).

Außerdem wird davon ausgegangen, dass durch eine Blockade der PDE4/ β -Arrestin Interaktion, also der Unterbindung der Umschaltung, eine antiinflammatorische Wirkung erzielt werden könnte, besonders in Kombination mit G α s-Agonisten (103).

1.3 Ziel der Arbeit

Aufgrund vorangegangener Forschung ist bekannt, dass es bei verschiedenen Erkrankungen im Rahmen eines Desensibilisierungsvorganges zu einer Umschaltung von einer kanonischen antiinflammatorischen G α s- zu einer proinflammatorischen G α i-Signalweiterleitung am β 2-adrenergen Rezeptor kommt (96,97,103,105). Auch für die hier behandelte Zielkrankheit der RA wurde diese Umschaltung bereits in gemischten synovialen Zellen nachgewiesen (103). Dabei wurde jedoch nicht weiter untersucht, welche Zelltypen der gemischten synovialen Zellen an der Umschaltung beteiligt waren bzw. durch sie beeinflusst wurden. Während die Rolle der Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen noch zu untersuchen ist, wird in dieser Arbeit detailliert auf Fibroblasten eingegangen. Verglichen werden synoviale Fibroblasten aus dem Kniegelenk sowie stromale Fibroblasten aus den inguinalen Lymphknoten.

Die gemischten synovialen Zellen aus den vorangegangenen Studien wurden aus Synovialgewebe isoliert, das beim Einsetzen einer Knie-Totalendoprothese gewonnen wurde. Zum Zeitpunkt der Durchführung einer derartigen Operation leiden die meisten Patienten bereits seit vielen Jahren unter RA. Nachdem gezeigt werden konnte, dass bei diesen Patienten eine Umschaltung der Signalweiterleitung von G α s zu G α i stattgefunden hatte, galt es im nächsten Schritt zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt der RA diese Umschaltung erstmals auftritt.

Aus anderen Arbeiten war bereits bekannt, dass es schon in frühen Phasen der Erkrankung zu Veränderungen der Zellaktivität und dem Zytokinmilieu bei RA-Patienten kommt und auch in den verschiedenen Phasen der Erkrankung immer wieder Veränderungen auftreten können (40,109). Es wurden nicht nur bei RA-Patienten in einer frühen Phase der Erkrankung Veränderungen nachgewiesen, sondern auch bei Autoantikörper-positiven Risikopatienten bereits vor Ausbruch der Krankheit, wie beispielsweise eine gesteigerte Immunzellaktivierung und Veränderungen der B-Zell-Populationen in den Lymphknoten (110,111). Um den Einfluss des zeitlichen Verlaufs der RA-Erkrankung auf eine Umschaltung von G α s zu G α i zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Fibroblasten von Patienten in verschiedenen Phasen der Erkrankung verglichen.

Die Negativkontrolle bilden gesunde Probanden. Diese wurden mit ACPA-positiven Risikopatienten ohne diagnostizierte RA verglichen und mit RA-Patienten kurz nach Diagnosestellung noch vor der Behandlung mit DMARDs. Die Positivkontrolle stellen Patienten mit langjähriger RA dar, die damit dem Zeitpunkt der früheren Studien entsprechen. Es sollte untersucht werden, ab wann erstmals Veränderungen in der Signalweiterleitung auftreten und ab wann eine Umschaltung vom kanonischen antiinflammatorischen $G\alpha s$ - zu einem proinflammatorischen $G\alpha i$ -Signal detektiert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Umschaltung des $G\alpha s$ - zu $G\alpha i$ -Signalweges in Fibroblasten nachzuweisen. Darüber hinaus sollte vor allem auf Proteinebene im Verlauf der Krankheitsentstehung der RA dieser Vorgang genauer untersucht und charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aspirationspipette (2, 5 ml)	Corning; New York, USA
Behälter für flüssigen Stickstoff	KGW-Isotherm; Karlsruhe, Deutschland
Combitips (10 ml)	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Deckgläschen (25 mm Durchmesser)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Deckgläschen für Zählkammer	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Deckgläser (24x40 mm)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Einfriergefäße CryoTube Vials	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Einwegskalpell	Feather; Osaka, Japan
High Profile Microtome Blades	Leica Biosystems; Nußloch, Deutschland
Nadeln (0,4 mm x 19 mm)	Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA
Neubauer Zählkammer 0,0025 mm ²	Marienfeld Superior; Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 5000 µl	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Reagenzreservoirs	VWR; Radnor, USA
Reaktionsgefäß (15, 50 ml)	Corning; New York, USA
SafeSeal SurPhob Spitzen (10, 20, 200, 300, 1000 µl)	Biozym Scientific; Hessisch Oldendorf, Deutschland
Shandon Filter Cards	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Spritze (10 ml)	Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA
Spritzenfilter (0,22 µm)	TPP; Trasadingen, Schweiz
Stripette Costar (5, 10, 25, 50 ml)	Corning; New York, USA
TC-Schale 100, Standard	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland

Urinbecher	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturfalsche (25, 75, 175 cm ² , jeweils mit Filter)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Wells)	Corning; New York, USA
Zellsieb (70 µm)	Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
1-Step Ultra TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
2-Propanol 70 %	B. Braun; Melsungen, Deutschland
Albumin (BSA) Fraction V	AppliChem; Darmstadt, Germany
Ciprofloxacin Kabi Infusionslösung 200 mg/100 ml	Fresenius Kabi; Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
D(+)-Saccharose	VWR; Radnor, USA
DAPI	Invitrogen; Carlsbad, USA
DMEM, low glucose, pyruvate	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
DMSO	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
DNA-Exitus Plus	AppliChem; Darmstadt, Germany
DPBS, no calcium, no magnesium	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
Erythrozyten-Lysepuffer	Qiagen; Hilden, Deutschland
Esel-Serum	Equitech-Bio; Kerrville, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
Fetal Bovine Serum, Research Grade	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Fluorescence Mounting Medium	Dako; Glostrup, Dänemark
Formalin	Merck; Darmstadt, Germany
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Promega; Madison, USA
Glutamin	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Ham's F-12 Nutrient Mix	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA

Hexadimethrinbromid	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
Humanes Fibronektin	PromoCell; Heidelberg, Deutschland
Incidin OxyWipe S	Ecolab; Saint Paul, USA
KCl 5 mM	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
Kohlensäure-Bikarbonat-Puffer-Tabletten	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
LB Agar (Lennox)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
LB Broth (Lennox)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Liberase TM Research Grade Purified Enzyme Blends	Roche; Basel, Schweiz
Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen; Carlsbad, USA
Lipofectamine 3000 Transfektionsreagenz	Invitrogen; Carlsbad, USA
Luminex Drive Fluid	Luminex Corporation; Austin, USA
MgCl ₂ 2 mM	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
NaCl 140 mM	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
Natronlauge	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM, Reduced Serum Medium	Gibco by life technologies; Carlsbad, USA
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
pMD2.G	Addgene; Watertown, USA
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen; Hilden, Deutschland
psPAX2	Addgene; Watertown, USA
Puromycin Dihydrochlorid	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Recombinant Human FGF basic/FGF2/bFGF (157 aa) Protein	R & D Systems; Minneapolis, USA
RNAlater	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
SOC-Medium	New England Biolabs; Ipswich, USA
Tissue-Tek	Sakura; Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton X-100	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA-Aldrich

Trypsin EDTA Lösung	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Tween 20	Merck; Darmstadt, Germany
Vitrogen Collagen	Cohesion Technologies; Palo Alto, USA
X-tremeGENE 9 DNA-Transfektionsreagenz	Roche; Basel, Schweiz
Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA

2.1.3 Stimulanzen

Tabelle 3: Stimulanzen

Reagenzien	Wirkung	Konzentration/ Molarität	Gelöst in	Hersteller
CCG215022	GRK2/5-Inhibitor	10^{-7} M	DMSO	Hycultec; Beutelsbach, Deutschland
CMPD101	GRK2/3-Inhibitor	10^{-8} M	DMSO	Tocris Bioscience; Bristol, Vereinigtes Königreich
Dibutyryl-cAMP	Zellgängiges Analogon des cAMP, PKA-Aktivator, PDE-Inhibitor	10^{-4} M	H ₂ O	Tocris Bioscience; Bristol, Vereinigtes Königreich
Isoprenalin Hydrochlorid	B-AR-Agonist	10^{-5} M	H ₂ O	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Formoterol Hemifumarat	B-AR-Agonist	10^{-7} M	DMSO	Tocris Bioscience; Bristol, Vereinigtes Königreich

H89 Dihydrochlorid	PKA-Inhibitor	10^{-5} M	H ₂ O	Tocris Bioscience; Bristol, Vereinigtes Königreich
NKH 477	Adenylatzyklase-Aktivator	10^{-6} M	H ₂ O	Tocris Bioscience; Bristol, Vereinigtes Königreich
Pertussis-Toxin	G α i-Inhibitor	100 ng/ml	H ₂ O	Tocris Bioscience; Bristol, Vereinigtes Königreich
Rekombinantes humanes IL-1 β	Entzündungsmediator	20 μ g/ml	H ₂ O	PeptoTech; Rocky Hill, USA

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Antikörper für immunhistologische Färbungen

Tabelle 4: Antikörper für immunhistologische Färbungen

Antikörper	Wirt	Klonalität	Konzentration	Hersteller
Anti-beta 2 Adrenergic Receptor	Kaninchen	monoclonal	0,512 μ g/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-G protein alpha inhibitor 1	Kaninchen	polyclonal	3 μ g/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-G protein alpha inhibitor 2	Kaninchen	monoclonal	2,05 μ g/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-G protein alpha S	Kaninchen	polyclonal	30,4 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-GRK2	Kaninchen	polyclonal	4,45 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-GRK5	Kaninchen	polyclonal	2 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-GRK6	Kaninchen	polyclonal	2,86 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-PDE4	Kaninchen	polyclonal	1,24 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Beta Arrestin 2	Maus	monoclonal	5 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-KCNQ1	Maus	monoclonal	8 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich

2.1.4.2 Antikörper für *Cell-based ELISA*

Tabelle 5: Antikörper für *Cell-based ELISA*

Primärantikörper	Wirt	Klonalität	Konzentration	Hersteller
Anti-CEBP Beta (phospho T235 + T188)	Kaninchen	polyclonal	0,125/1,25 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-CREB (phospho S133) [E113]	Kaninchen	monoclonal	4,095 µg/ml	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Phospho-c-Jun (Ser63) (E6I7P) XP	Kaninchen	monoclonal	0,5 µg/ml	Cell Signaling Technology; Danvers, USA
Phospho-c-Jun (Ser73) (D47G9) XP	Kaninchen	monoclonal	0,67 µg/ml	Cell Signaling Technology; Danvers, USA

Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (93H1)	Kaninchen	monoclonal	0,285 μ g/ml	Cell Signaling Technology; Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP	Kaninchen	monoclonal	0,772 μ g/ml	Cell Signaling Technology; Danvers, USA

Tabelle 6: Isotypenkontroll-Antikörper

Isotypenkontroll-Antikörper	Klonalität	Hersteller
Mouse IgG1	monoclonal	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Mouse IgG2a	monoclonal	Dako; Glostrup, Dänemark
Rabbit IgG	monoclonal	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich
Rabbit IgG	polyclonal	Abcam; Cambridge, Vereinigtes Königreich

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Konjugat	Klonalität	Konzentration	Hersteller
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody	Alexa Fluor 594	polyclonal	4 μ g/ml	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
F(ab') ₂ -Goat anti- Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody	Alexa Fluor 488	polyclonal	4 μ g/ml	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
F(ab') ₂ -Goat anti- Rabbit IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	polyclonal	4 μ g/ml	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA

Cross-Adsorbed Secondary Antibody				
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Poly-HRP Secondary Antibody	HRP	polyclonal	0,5 µg/ml	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA

2.1.5 Kits

Tabelle 8: Kits

Kits	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies; Santa Clara, USA
ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-21	BioLegend; San Diego, USA
Human BMP-2 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human BMP-6 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human CXCL12/SDF-1 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human Dermal Fibroblast Nucleofector Kit	Lonza; Basel, Schweiz
Human Gas1 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human IL-12 p70 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human IL-1ra/IL-1F3 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human IL-33 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human IL-6 ELISA Set	Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human Magnetic Luminex Assay	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human Osteoprotegerin/TNFRSF11B DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human Serpin E1/PAI-1 DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
Human VEGF-C DuoSet ELISA	R & D Systems; Minneapolis, USA
MAGPIX Calibration Kit	Luminex Corporation; Austin, USA
MAGPIX Performance Verification Kit	Luminex Corporation; Austin, USA
Plasmid Maxi Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit	R & D Systems; Minneapolis, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden, Deutschland

2.1.6 Zellen

Tabelle 9: Zellen

Bezeichnung	Zellart	Quelle
DH5 α	E. coli	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
FLN	Stromale Fibroblasten aus inguinalen Lymphknoten	Kooperation mit dem <i>Academic Medical Center der University of Amsterdam</i> ; Amsterdam, Niederlande
HEK-293T	Menschliche embryonale Nierenzelle	American Type Culture Collection; Manassas, USA
RA-Fibroblasten	Synoviale Fibroblasten aus dem Synovialgewebe des Kniegelenks von RA-Patienten	Kooperation mit dem Asklepios Klinikum Bad Abbach; Bad Abbach, Deutschland

2.1.7 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Geräte	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies; Santa Clara, USA
Autoklav VX-150	Systemec; Linden, Deutschland
Axiovision Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
Brutschrank Celligence SP	Heraeus; Hanau, Deutschland
Digitalkamera D5100	Nikon; Minato, Japan
Eismaschine ZBE 70-35	ZIEGRA; Isernhagen, Deutschland
Feinwaage PLE 200-3	Kern & Sohn; Balingen, Deutschland

Gefrierschrank -20 °C	Liebherr; Bulle FR, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Gyro-Rocker Inkubator S170	Stuart; Staffordshire, Vereinigtes Königreich
Hypoxie Inkubator Galaxy 14 S	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Imaging System ChemiDoc XRS+	Bio-Rad; Hercules, USA
iMark Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad; Hercules, USA
Kryotom	Leica Biosystems; Nußloch, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr; Bulle FR, Schweiz
MAGPIX	Luminex Corporation; Austin, USA
Mehrkanalpipetten (50, 300 µl)	Brand; Wertheim, Deutschland
Mikro Zentrifuge	Kisker; Steinfurt, Deutschland
Mikro Zentrifuge Sprout	Kisker; Steinfurt, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
NanoDrop 2.000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Nucleofector 2b Device	Lonza; Basel, Schweiz
Pipetboy Accu-Jet Pro	Brand; Wertheim, Deutschland
Pipette (5000 µl)	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Schüttelgerät Titramax 1000	Heidolph; Schwabach, Deutschland
Shandon Cytospin3	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Vakuumpumpe	KNF Neuberger; Freiburg, Deutschland
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG; Zürich, Schweiz
Wasserbad W6	Labortechnik Medingen; Arnsdorf, Deutschland
Zeiss Observer Z.1	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus; Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich; Tuttlingen, Deutschland

2.1.8 Programme

Tabelle 11: Programme

Programm	Verwendung	Hersteller
2100 Expert Software	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies; Santa Clara, USA
Axio Vision Rel. 4.8	Axiovision Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
CorelDRAW X8	Graphenbearbeitung	Corel; Ottawa, Kanada
Image Lab	Imaging System ChemiDoc XRS+	Bio-Rad; Hercules, USA
ImageJ	Datenauswertung	Open Source
Microplate Manager 6	iMark Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad; Hercules, USA
Microsoft Office	Datenauswertung	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 2000	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
SigmaPlot 13.0	Datenauswertung	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
xPONENT Software	MAGPIX	Luminex Corporation; Austin, USA
ZEN Imaging Software	Zeiss Observer Z.1	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland

2.1.9 Lösungen

2.1.9.1 Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 12: Saccharose-Lösung

Bestandteile	Menge/Volumen
Saccharose	2,5 g
PBS	12,5 ml

Tabelle 13: Liberase

Bestandteile	Menge/Volumen
Lyophilisat	50 mg
Aqua dest.	10 ml
PBS	10 ml

Tabelle 14: Vollmedium RA-Zellen

Bestandteile	Menge/Volumen
RPMI-1640 Medium	500 ml
FBS (hitzeinaktiviert für 10 min bei 42 °C)	50 ml
L-Glutamin	10 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
HEPES-Puffer	5 ml
Ciprofloxacin	2 ml

Tabelle 15: Vollmedium FLN

Bestandteile	Menge/Volumen
DMEM	500 ml
FBS (hitzeinaktiviert für 10 min bei 42 °C)	50 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
HEPES-Puffer	5 ml
Ciprofloxacin	2 ml
bFGF	500 ng

Tabelle 16: Stimulationsmedium RA-Zellen

Bestandteile	Menge/Volumen
RPMI-1640 Medium	500 ml
FBS (hitzeinaktiviert für 10 min bei 42 °C)	10 ml
L-Glutamin	10 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
HEPES-Puffer	5 ml

Tabelle 17: Stimulationsmedium FLN

Bestandteile	Menge/Volumen
DMEM	500 ml
FBS (hitzeinaktiviert für 10 min bei 42 °C)	10 ml
L-Glutamin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
HEPES-Puffer	5 ml

Tabelle 18: Einfriermedium RA-Zellen

Bestandteile	Menge/Volumen
FBS	80 %
DMSO	10 %
Vollmedium RA-Zellen	10 %

Tabelle 19: Einfriermedium FLN

Bestandteile	Menge/Volumen
Vollmedium FLN	40 %
DMSO	40 %
FBS	20 %

2.1.9.2 Lösungen für immunhistologische Färbungen

Tabelle 20: 10 x PBS

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS-Tabletten	5 Stück
Aqua dest.	1 L

Tabelle 21: Waschpuffer, PBS mit 0,3 % Triton X

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS	2 L
Triton X	6 ml

Tabelle 22: Blockierlösung histologische Färbungen (Ziegen-Antikörper)

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS mit 0,3 % Triton X	35 ml
Ziegen-Serum	5 ml
FBS	5 ml
BSA	5 g

Tabelle 23: Blockierlösung histologische Färbungen (Esel-Antikörper)

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS mit 0,3 % Triton X	35 ml
Esel-Serum	5 ml
FBS	5 ml
BSA	5 g

Tabelle 24: Blockierlösung histologische Färbungen (Doppelfärbung Esel- und Ziegen-Antikörper)

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS mit 0,3 % Triton X	30 ml
Esel-Serum	5 ml
Ziegen-Serum	5 ml
FBS	5 ml
BSA	5 g

Tabelle 25: Verdünnungslösung histologische Färbungen

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS mit 0,3 % Triton X	45 ml
BSA	5 g

2.1.9.3 Lösungen für ELISA und *Cell-based ELISA*

Tabelle 26: Waschpuffer ELISA und *Cell-based ELISA*

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS	2 L
Tween 20	1 ml

Tabelle 27: Blockierlösung *Cell-based ELISA*

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS mit 0,3 % Triton X	49,5 ml
BSA	0,5 g

Tabelle 28: Verdünnungslösung *Cell-based ELISA*, PBS mit 0,3 % Triton X

Bestandteile	Menge/Volumen
PBS	2 L
Triton X	6 ml

2.1.9.4 Lösungen für Transfektionen und Transduktion mit Epac-abhängigem FRET-Sensor

Tabelle 29: Coating-Medium

Bestandteile	Menge/Volumen
Ham's F-12 Nutrient Mix	97 ml
Humanes Fibronectin	1 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
Collagen	333 µl
BSA (75 mg/ml)	50 µl

Tabelle 30: HEK-Medium

Bestandteile	Menge/Volumen
DMEM	500 ml
FBS	50 ml
L-Glutamin	5 ml

Tabelle 31: Lösung für LB-Platten

Bestandteile	Menge/Volumen
LB-Agar	18,5 g
Millipore-Wasser	500 ml
Ampicillin (final 100 µg/ml)	500 µl

Tabelle 32: LB-Medium

Bestandteile	Menge/Volumen
LB-Broth	18,5 g
Millipore-Wasser	500 ml
Ampicillin (final 100 µg/ml)	500 µl

Tabelle 33: Polyfect-Transfektionsansatz

Bestandteile	Menge/Volumen
Opti-MEM	100 μ l
PolyFect	10 μ l
DNA	1,5 μ l

Tabelle 34: Mastermix für Elektroporation

Bestandteile	Menge/Volumen
Nucleofector Solution	82 μ l
Supplement	18 μ l
DNA	3 μ g

Tabelle 35: Transfektionsansatz A für lentivirale Transduktion

Bestandteile	Menge/Volumen
Opti-MEM	2.340 μ l
Lipofectamine 3.000	90 μ l

Tabelle 36: Transfektionsansatz B für lentivirale Transduktion

Bestandteile	Menge/Volumen
Opti-MEM	2.340 μ l
P3.000	90 μ l
pLVXPuro_EPAC187	42,84 μ g
psPAX	42,84 μ g
pMD2.G	4,23 μ g

Tabelle 37: Ringer-Lösung

Bestandteile	Menge/Volumen
NaCl 140 mM	46,7 ml
KCl 5 mM	1 ml
MgCl ₂ 2 mM	2 ml
HEPES-Puffer 10 mM	50 ml
ddH ₂ O	900,3 ml

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten

Bei Patienten mit RA oder Osteoarthritis (OA) wurde während des Einsetzens eines Knie-TEPs synoviales Gewebe vom behandelnden Arzt chirurgisch entnommen. Die Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten RA-Patienten sind in Tabelle 38 als Schnitt- und Vereinigungsmenge dargestellt. Die durchgeführte Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt und die Patienten haben, nach vorheriger Aufklärung, schriftlich zu ihrer Teilnahme zugestimmt.

Auch die stromalen Fibroblasten aus inguinalen Lymphknoten, die durch eine Kooperation mit dem *Academic Medical Center* der *University of Amsterdam* zur Verfügung gestellt wurden, stammten von Patienten, die ihre Zustimmung zu der Teilnahme an der Studie gaben.

Tabelle 38: Charakteristika der untersuchten Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die Mittelwerte wurden \pm Standardfehler angegeben. In Klammern stehen Maximum und Minimum.

Parameter	
Anzahl der Patienten mit rheumatoider Arthritis	27
Alter	62,4 \pm 2,3 [22-77]
Geschlecht	21 Frauen, 6 Männer
Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit, mm in 1. Std.	32,8 \pm 7,0
C-reaktives Protein, mg/l	95,4 \pm 30,3
Leukozyten, pro μ l	8086 \pm 499
Medikation	
Mittleres Prednisolon in mg/Tag	5,1 \pm 1,4
Prednisolon	52 %
Methotrexat	26 %
nicht-steroidale Antiphlogistika	74 %
Anti-TNF-Strategie	7 %
Leflunomid	11 %
Azulfidine	4 %
Opioid-Analgetikum	15 %

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Aufarbeitung des synovialen Gewebes

Das während des Einsetzens eines Knie-TEPs entnommene synoviale Gewebe von RA- und OA-Patienten wurde in PBS gelagert, gekühlt und steril ins Labor transportiert. Die Zeitspanne zwischen der Operation und der Weiterverarbeitung des Gewebes wurde möglichst kurzgehalten (max. 3 Std.).

Zunächst wurden ca. 0,25 cm² große Teile des Gewebes für die spätere histologische Untersuchung mit einem Skalpell abgetrennt und für mindestens drei Tage in 3,7 %igem Formalin in PBS bei RT gelagert. Anschließend wurde das Gewebe in Saccharose-Lösung überführt und für weitere 24 Stunden bei RT inkubiert. Nachdem es in PBS gewaschen worden war, um Zuckerkristalle zu entfernen, wurde es in Tissue-Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebestücke bei -20 °C aufbewahrt.

Das restliche Gewebe wurde mit dem Skalpell möglichst klein geschnitten. Der Gewebepulver wurde in ein Gefäß überführt, in das zuvor 50 ml PBS und 1 ml Liberase vorgelegt worden waren. Er wurde für 1 Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, um durch den Verdau die Zellen aus dem Gewebe zu lösen. Die Enzymaktivität wurde anschließend durch Zugabe von 20 ml PBS gestoppt und die Zellsuspension durch einen 70 µm Zellsieb gegeben. Die isolierten Zellen wurden für 8 min bei 4 °C und 1600 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer gelöst und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Lysepuffer mit 20 ml PBS deaktiviert und die Zellsuspension wurde erneut für 8 min bei 4 °C und 1600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet der gemischten synovialen Zellen wurde in vorgewärmtem Vollmedium gelöst und in eine Zellkulturflasche überführt. Entsprechend der Größe des Pellets wurde es in 7 ml Medium für eine 25 cm² Zellkulturflasche, 15 ml für eine 75 cm² Zellkulturflasche und 40 ml für eine 175 cm² Zellkulturflasche gelöst. Die ausgesäten Zellen wurden im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C gelagert. Am Folgetag wurde das Anwachsen der Zellen optisch unter dem Mikroskop kontrolliert und das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen aus der Kultur zu entfernen.

2.2.2.2 Kultivieren synovialer Fibroblasten und FLNs

Bis zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C gelagert. Es wurde wöchentlich eine optische Kontrolle der Zellen durchgeführt, um das Wohlbefinden und das Wachstum der Zellen beurteilen zu können. Außerdem wurde einmal wöchentlich das Medium gewechselt. Von jeder Mediumflasche wurde eine Mediumkontrolle angesetzt, bei der 1 ml des Mediums in einer 24-Well-Platte im Brutschrank inkubiert wurde, um eine mögliche Kontamination des Mediums auszuschließen.

Während die ersten Passagen noch eine gemischte synoviale Zellpopulation enthalten, spricht man ab Passage 3 von einer reinen synovialen Fibroblastenkultur. Für die Versuche wurden Zellen der Passage 6-7 verwendet, um eine reine Fibroblastenkultur mit ausreichender Zellzahl zu gewährleisten.

2.2.2.3 Splitten kultivierter Zellen

Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurden sie zunächst in PBS geschwenkt, um Rückstände des im Medium enthaltenen Serums auszuwaschen. Anschließend wurde eine der Flaschengröße angepasste Menge Trypsin auf die Zellen gegeben und diese für 5 bis 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen

und der visuellen Kontrolle unter dem Mikroskop, wurde das Trypsin mit dem doppelten Volumen an Vollmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei RT und 1600 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Zellpellet in Vollmedium gelöst und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 gesplittet.

2.2.2.4 Einfrieren kultivierter Zellen

Die Zellen wurden nach demselben Vorgehen wie beim Splitten abtrypsiniert und das Zellpellet anschließend in gekühltem Einfriermedium gelöst. Pro Kryoröhrchen wurden ca. 1 bis 1,5 Millionen Zellen in 1 ml Einfriermedium eingefroren. Die Zellen wurden über Nacht in einer Einfrierbox, die ein schonendes Einfrieren mit einer Rate von -1 °C pro Minute ermöglicht, bei -80 °C inkubiert. Um ein längeres Aufbewahren der Zellen zu ermöglichen wurden sie anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.5 Das In-Kultur-Nehmen gefrorener Zellen

Die gefrorenen Zellen wurden zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Um die Toxizität des im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu minimieren, wurden die aufgetauten Zellen schnellstmöglich in ein Reaktionsgefäß mit 50 ml gekühltem Vollmedium überführt und bei 4 °C für 10 min bei 1.600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 15 ml Vollmedium gelöst und in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche überführt.

2.2.2.6 Zählen der Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie zum Splitten abtrypsiniert. Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen Medium gelöst, um eine angenehme Verdünnung zum Zählen zu ermöglichen. $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellen wurden 1:1 mit Trypanblau gemischt und anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und in den äußeren vier Quadranten gezählt. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n=X*\text{Verdünnung}*Kammerfaktor*V$$

Hierbei steht das X für den Durchschnittswert der vier ausgezählten Quadranten. Dieser wird entsprechend der Verdünnung mit Trypanblau mit 2, und entsprechend des Kammerfaktors der Zählkammer mit 10.000 multipliziert. Außerdem wird mit dem Volumen multipliziert, in dem das Pellet gelöst wurde.

2.2.2.7 Stimulation der Zellen

Um den Einfluss verschiedener Schlüsselpunkte in der Signalkaskade der Umschaltung von Gas zu Gai zu untersuchen wurden die Zellen mit Inhibitoren und Stimulanzen behandelt, um deren Auswirkungen auf RNA- und Proteinebene analysieren zu können.

Hierzu wurden Zellen der Passage 6 und 7 verwendet. Sie wurden zunächst abtrypsinisiert und gezählt und anschließend ausgesät. Während Normoxie den normalen Kulturbedingungen entspricht, liegt bei den durchgeführten Versuchen unter Hypoxie ein verminderter Sauerstoffgehalt vor. Dieser entspricht bei den RA-Zellen einem Anteil von 1 %, bei den FLNs einem Anteil von 5 %.

2.2.2.7.1 Stimulation für den *Human Cytokine Array*

Es wurden jeweils 1,4 Mio. Zellen in 3 ml Vollmedium pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden jeweils 3 ml NKH 477 (10^{-7} M), in Stimulationsmedium verdünnt, bzw. Stimulationsmedium zur Kontrolle pro Well für 12 h auf die Zellen gegeben. Die Überstände aus verschiedenen Wells desselben Patienten und mit derselben Behandlung wurden zusammengeführt, bei 1.600 rpm für 10 min zentrifugiert und anschließend bis zur Auswertung bei -20°C weggefroren. Analysiert wurden die Überstände mittels des *Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit*.

2.2.2.7.2 Stimulation für den RNA-Microarray

Es wurden jeweils 1 Mio. Zellen in 3 ml Vollmedium pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage unter Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden jeweils 3 ml NKH 477 (10^{-6} M), in Stimulationsmedium verdünnt, bzw. Stimulationsmedium zur Kontrolle pro Well für 6 h auf die Zellen gegeben. Die Überstände wurden bei 1.600 rpm für 10 min zentrifugiert und anschließend bei -20°C weggefroren. Außerdem wurde die RNA mit dem RNeasy Kit aus den Zellen isoliert und mit einem RNA-Microarray analysiert.

2.2.2.7.3 Stimulation für ELISA und Luminex

Es wurden jeweils 55.000 Zellen in 200 μl Vollmedium pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden jeweils 200 μl der Stimulanzen, in Stimulationsmedium verdünnt, bzw. Stimulationsmedium und DMSO zur Kontrolle pro Well für 24 h auf die Zellen gegeben. Stimuliert wurde mit und ohne Zugabe von 20 pg/ml IL-1 β zusätzlich zu den Stimulanzen. Die

Überstände aus verschiedenen Wells desselben Patienten mit derselben Stimulation wurden zusammengeführt, bei 1.600 rpm für 10 min zentrifugiert und anschließend bis zur Auswertung bei -20 °C weggefroren. Die Auswirkungen der Stimulationen wurden mittels ELISA und Luminex analysiert.

2.2.2.7.4 Stimulation für *Cell-based ELISA*

Es wurden jeweils 25.000 Zellen in 200 µl Vollmedium pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage unter Normoxie kultiviert. Anschließend wurden jeweils 200 µl der Stimulanzen, in Stimulationsmedium verdünnt, bzw. Stimulationsmedium und DMSO zur Kontrolle pro Well in Duplikaten für 1 h auf die Zellen gegeben. Stimuliert wurde mit und ohne Zugabe von 20 pg/ml IL-1β zusätzlich zu den Stimulanzen. Die Überstände wurden abgenommen und die Zellen direkt im Anschluss mittels *Cell-based ELISA* analysiert.

2.2.3 Bestimmung der Parameter, die mit der Signalumschaltung von $G_{\alpha s}$ zu $G_{\alpha i}$ im Zusammenhang stehen

2.2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus den stimulierten Zellen wurde mit dem RNeasy Kit nach beiliegenden Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.2 RNA-Vermessung

Um die Konzentration und den Degradierungsgrad der isolierten RNA zu bestimmen, wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Das Vermessen wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bis zur weiteren Verarbeitung der RNA-Proben wurden diese bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3.3 RNA-Microarray

Um einen Überblick über die Auswirkungen der Stimulation der Zellen auf RNA-Ebene zu gewinnen, wurde ein RNA-Microarray durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Konzentration und Reinheit, bzw. der Degradierungsgrad der isolierten RNA mittels des RNA-Bioanalyzers bestimmt. Anschließend wurden die Proben an das Kompetenzzentrum Fluoreszenz Bioanalytik an der Universität Regensburg geschickt, die den RNA-Microarray durchführten.

2.2.3.4 Human Cytokine Array

Um einen Überblick über die Auswirkungen der Stimulation der Zellen auf Zytokin-Ebene zu gewinnen, wurde ein *Human Cytokine Array* durchgeführt. Die abgenommenen Überstände wurden mit dem *Human Cytokine Array* nach den beiliegenden Herstellerangaben analysiert. Anschließend wurden die Membranen mittels des Chemidoc aufgenommen und mit der *Image Lab Software* ausgewertet.

2.2.4 Quantifizierung der Parameter, die durch die Signalumschaltung von Gas zu Gai beeinflusst werden

2.2.4.1 Cell-based ELISA

Nach der Stimulation der Zellen wurden die Überstände abgenommen und je 100 µl 3,7 %iges Formalin in PBS in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend 4 Mal mit 200 µl 1 x PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl der Blockierlösung auf jedes Well pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Blockierlösung wurde durch 4-maliges Waschen mit Waschpuffer entfernt, bevor die Primärantikörper und Isotypenkontroll-Antikörper, in Verdünnungslösung angesetzt, auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden.

Am Folgetag wurden nicht gebundene Antikörper durch 7-maliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden 100 µl des Sekundärantikörpers, angesetzt in Verdünnungslösung, auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut 7 Mal mit Waschpuffer gewaschen um Antikörper zu entfernen, die nicht gebunden hatten. Im Anschluss wurden 100 µl 1-Step Ultra TMB auf jedes Well pipettiert. Die Inkubationszeit variierte von 2 bis zu 30 min, abhängig von der Intensität der Blaufärbung. Die Reaktion wurde anschließend mit 100 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption mittels ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Um unspezifisches Signal bei der Datenauswertung auszuschließen, wurden die Werte der Isotypenkontroll-Antikörper von den Werten der Wells mit Primärantikörpern subtrahiert.

2.2.4.2 ELISA

Der Zytokingehalt in den Zellkulturüberständen der stimulierten Zellen wurde mittels ELISA quantifiziert. Die Assays wurden nach den beiliegenden Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet.

2.2.4.3 Luminex

Für eine Quantifizierung des Zytokingehalts bei sehr geringem Probenvolumen wurden Luminex-Analysen der Zellkulturüberstände durchgeführt. Die Durchführung entsprach den dem Kit beiliegenden Herstellerangaben.

2.2.5 Histologische Färbungen

2.2.5.1 Kryoschnitte

Die Gewebelöcke des synovialen Gewebes wurden in das Kryotom eingespannt und bei -19 °C wurden 8 µm dicke Schnitte erstellt. Diese wurden auf Objektträger aufgebracht und bis zur histologischen Färbung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2 Cytospin

Die abtrypsinieren und gezählten Zellen wurden erneut für 10 min bei 1.600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl PBS gelöst. Nach Zugabe von 500 µl 3,7 %igem Formalin in PBS wurden die Zellen für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 1.600 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, bevor das Pellet in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen PBS erneut aufgenommen wurde. Die Endkonzentration der Zellsuspension entsprach 35.000 Zellen pro 130 µl.

Für die Zentrifugation wurden die Objektträger zusammen mit dem Filterpapier und dem Trichter in die dafür vorgesehene Vorrichtung gespannt und anschließend in die Cytospin Zentrifuge gegeben. Es wurden 130 µl der Zellsuspension auf jeden Objektträger pipettiert und diese für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert. Nachdem die Objektträger für ca. 20 min bei RT getrocknet worden waren, wurden sie bis zur Färbung bei -20 °C weggefroren.

2.2.5.3 Färben der Schnitte und Cytospins

Die Objektträger wurden zunächst für eine dreiviertel Stunde bei RT unter dem Abzug aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden sie für 10 min bei RT in 1 x PBS rehydriert und, nachdem sie nochmals in PBS gewaschen worden waren, für 45 min bei RT in der Blockierlösung inkubiert. Im Anschluss wurden sie erneut für 5 min in 1 x PBS gewaschen, bevor die Primärantikörper bzw. Isotypenkontroll-Antikörper, die zuvor in der Verdünnungslösung angesetzt worden waren, aufgetragen wurden. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Objektträger für 10 min in Waschpuffer gewaschen, der währenddessen mehrfach gewechselt wurde, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde mit 1 x PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper, ebenfalls in Verdünnungslösung angesetzt, auf die Objektträger gegeben und für 90 min bei RT inkubiert wurde. Überschüssige Antikörper wurden bei 15-minütigem Waschen mit dem Waschpuffer entfernt, der in dieser Zeit mehrmals ausgetauscht wurde. Es wurde erneut mit 1 x PBS gewaschen und anschließend wurde in 1 x PBS verdünntes DAPI (0,5 µg/ml) für 5 min bei RT auf die Objektträger gegeben. Abschließend wurde ein letztes Mal mit 1 x PBS gewaschen, bevor die Objektträger mit Fluorescence Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckelt wurden. Die fertigen Objektträger wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb der nächsten 14 Tage mikroskopiert.

2.2.6 FRET-Sensor für den Nachweis von cAMP

Zum Nachweis des cAMP in den Zellen sollten diese mit einem Epac-abhängigen FRET-Sensor transfiziert werden. Epac ist ein Protein, das durch Bindung von cAMP aktiviert wird und als GTP-Austauschfaktor für Rap1 und Rap2 dient (112). Bei der Bindung von cAMP kommt es zu einer Konformationsänderung des Epac von einer gefalteten inaktiven zu einer entfalteten aktiven Form (113). Beim Epac-abhängigen FRET-Sensor wurde aminoterminal ein cyan fluoreszierendes Protein (CFP) und carboxyterminal ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) angehängt (Abbildung 10) (113). Durch die Messung des Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen den beiden Fluorophoren kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob Epac durch gebundenes cAMP aktiviert wurde.

Durch Stimulation der Zellen mit beispielsweise Isoprenalin, das durch die Aktivierung der Adenylatzyklase die cAMP-Konzentration in der Zelle erhöht, kann der Energietransfer unterbrochen werden, was durch einen Farbumschlag detektiert werden kann. Ein Anstieg der Ration von CFP/YFP entspricht einer entfalteten Konformation des Epac und damit seiner durch Bindung des cAMP aktivierten Form (113). Durch Verminderung der cAMP-Konzentration kann das FRET-Signal in gleicher Weise wieder zunehmen (113).

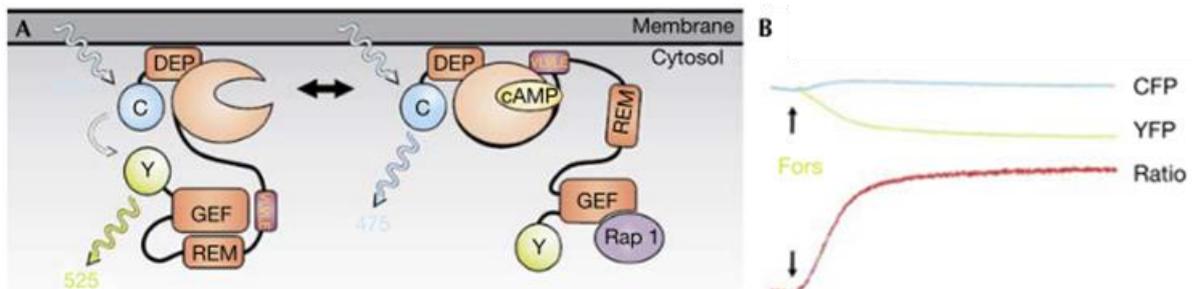


Abbildung 10: Nachweis des cAMP mit einem Epac-abhängigen FRET-Sensor. In (A) ist abgebildet, wie die Bindung des cAMP an Epac eine Konformationsänderung induziert, welche die beiden an Epac gebundenen Fluorophore CFP und YFP räumlich voneinander entfernt, sodass kein Energietransfer von CFP zu YFP mehr möglich ist. In (B) ist dargestellt, wie durch die Stimulation der Zellen mit Forskolin ein Anstieg des cAMP induziert und damit ein Anstieg der Ratio CFP/YFP detektiert werden kann. Epac: Exchange protein activated by cAMP, CFP: cyan fluorescent protein, YFP: yellow fluorescent protein, Fors: Forskolin, Adenylatzyklase-Aktivator (113).

Nach der Transfektion der Zellen mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor wurde das FRET-Signal mittels *Live Cell Imaging* detektiert. Es sollte beobachtet werden wie verschiedene Stimulanzen die cAMP-Konzentration in den Zellen regulieren. Parallel zu den RA-Zellen wurden auch HEK-Zellen als Kontrollen transfiziert. Das hierzu verwendete Konstrukt H187 wurde von der Gruppe von Kees Jalink zur Verfügung gestellt (114).

2.2.6.1 Transformation kompetenter Bakterien

Von dem Konstrukt H187 wurde 1 µg auf einem Filterpapier zur Verfügung gestellt. Es wurde herausgeschnitten und zu 50 µl Millipore-Wasser in ein Reagenzgefäß gegeben, um es zu lösen. Parallel wurden die kompetenten Bakterien DH5α auf Eis aufgetaut. 10 µl des Plasmides wurden auf die Zellen gegeben und diese für 30 min auf Eis inkubiert, in denen die Zellen immer wieder auf und ab pipettiert wurden. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec. Die Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis inkubiert, bevor 1 ml SOC-Medium, das zuvor auf 37 °C vorgewärmt worden war, auf die Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Von der Zellsuspension mit dem Plasmid wurden 200 µl auf eine LB-Platte gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 17 Stunden wurde ein Klon von der Platte genommen und in ein Reaktionsgefäß gegeben, in das zuvor 5 ml LB-Medium vorgelegt worden waren. Die Bakterien wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden 300 ml LB-Medium in einem Kolben vorgelegt und 3 ml der Bakterien zugegeben, bevor diese erneut über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension auf 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 15 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bei -20 °C weggefroren.

2.2.6.2 Plasmidgewinnung

Zur Gewinnung der Plasmide wurde das Plasmid Maxi Kit nach beiliegenden Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die Konzentration bestimmt, indem 2 µl der Plasmide mittels Nanodrop vermessen wurden.

2.2.6.3 Transfektion mit Lipofectamine 2.000

Zur Transfektion der Zellen mit Lipofectamine 2.000 wurden 2 ml Vollmedium pro Well in einer 6-Well-Platte vorgelegt, bevor jeweils 170 µl Zellsuspension mit 150.000 Zellen zugegeben wurden. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde zunächst der DNA-Mix aus 1 µg DNA und 500 µl Opti-MEM angesetzt. Außerdem wurden in einem separaten Gefäß 2 µl Lipofectamine 2.000 und 500 µl Opti-MEM gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die beiden Ansätze zusammengegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Das Medium vom Vortag wurde abgenommen und durch 2 ml frisches Vollmedium ersetzt, bevor die Lipofectamine-Mischung zu den Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden für 6 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie abtrypsiniert und auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 25 mm in eine 6-Well-Platte mit 2 ml Vollmedium pro Well gegeben wurden. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, bevor sie an den folgenden Tagen mikroskopiert wurden.

2.2.6.4 Transfektion mit Lipofectamine 3.000

Für die Transfektion mit Lipofectamine 3.000 wurden 250.000 Zellen auf Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser in einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Es wurde ein DNA-Mix mit 125 µl Opti-MEM, 3 µl DNA und 6 µl P3.000 angesetzt. Außerdem wurden 6 µl Lipofectamine 3.000 zu 125 µl Opti-MEM gegeben. Die beiden Ansätze wurden zusammengeführt und 15 min bei RT inkubiert, bevor das Gemisch auf die Zellen gegeben wurde und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und am Folgetag wurden die Zellen mikroskopiert.

2.2.6.5 Transfektion mit PolyFect

Zur Transfektion der Zellen mit Polyfect wurden 2 ml Vollmedium pro Well in einer 6-Well-Platte vorgelegt, bevor jeweils 170 µl Zellsuspension mit 150.000 Zellen zugegeben wurden. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und 1,5 ml frisches Medium vorgelegt. Das PolyFect-Transfektionsreagenz wurde angesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend

wurden 600 µl Vollmedium zugegeben und der Ansatz auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 6 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie abtrypsiniert und auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 25 mm in eine 6-Well-Platte mit 2 ml Vollmedium pro Well gegeben wurden. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, bevor sie an den darauffolgenden Tagen mikroskopiert wurden.

2.2.6.6 Transfektion durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 450.000 Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl des Mastermixes gelöst und in die dafür vorgesehene Küvette überführt. Die Küvette mit den Zellen wurde in das Nucleofector-Gerät eingesetzt und das jeweilige Programm gestartet. Es wurde mit verschiedenen Küvetten sowohl P-022 für eine hohe Überlebensrate als auch P-023 für eine hohe Transfektionsrate der Zellen getestet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen aus der Küvette auf Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser in eine 6-Well-Platte zu je 2 ml frischem Vollmedium gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, bevor sie am Folgetag mikroskopiert wurden.

2.2.6.7 Transfektion mit FuGene 6

Für die Transfektion mit FuGENE 6 wurden 250.000 Zellen auf Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser in einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Es wurden 100 µl Opti-MEM mit 6 µl FuGene 6 Transfektionsreagenz gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 µg DNA zugegeben und es wurde erneut für 15 min bei RT inkubiert, bevor der Ansatz auf die Zellen gegeben wurde und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und am Folgetag wurden die Zellen mikroskopiert.

2.2.6.8 Transfektion mit X-treme Gene 9

Für die Transfektion mit X-treme Gene 9 wurden 250.000 Zellen auf Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser in einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Es wurden 100 µl Opti-MEM mit 6 µl X-treme GENE 9 Transfektionsreagenz gemischt. Anschließend wurden 2 µg DNA hinzugegeben und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert, bevor er auf die Zellen gegeben wurde und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und am Folgetag wurden die Zellen mikroskopiert.

2.2.6.9 Transduktion mit Lentiviren

Das Konstrukt H187 wurde von Professor Rainer Schreiber in einen viralen Vektor eingebracht (pLVXPuro_EPAC187) und zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde eine 6-Well-Platte mit 500 µl Coating-Medium pro Well für 2 h inkubiert. Anschließend wurde das Coating-Medium abgenommen und 500.000 HEK-Zellen pro Well in HEK-Medium ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie mittels Lipofectamine 3.000 transfiziert wurden. Hierzu wurden die Transfektionsgemische A und B zusammengefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 260 µl des DNA-Lipofectamine Gemisches pro Well zu dem bestehenden Medium gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium zu regulärem HEK-Medium gewechselt und die Zellen weitere 30 h inkubiert.

Außerdem wurden 350.000 RA-Zellen auf Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser in 6-Well-Platten in einem Volumen von 2 ml Vollmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Virusüberstände der HEK-Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 2.000 rpm zentrifugiert, um alle HEK-Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen 45 µm Filter in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und es wurde Polybren zu einer finalen Konzentration von 8 µg/ml hinzugegeben. Das Medium der RA-Zellen wurde abgenommen und durch 2 ml der Virus-Polybren-Mischung ersetzt. Die Platten mit den RA-Zellen wurden 1 h bei 25 °C und 220 rpm zentrifugiert und anschließend für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Virus abgenommen und durch Vollmedium mit zusätzlich 1,25 µg/ml Pyromycin ersetzt. Zum nächsten Mediumwechsel 3 Tage später wurde Vollmedium mit zusätzlich 2,5 µg/ml Pyromycin verwendet. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium erneut gewechselt, bevor die Zellen mikroskopiert wurden.

2.2.6.10 Mikroskopieren der transfizierten/transduzierten Zellen

Zum Mikroskopieren der transfizierten/transduzierten Zellen wurden die Deckgläschen mit den Zellen in die Halterung des Mikroskops gelegt und mit 200 µl Ringer-Lösung bedeckt. Das FRET-Signal wurde bei einer Absorption von 430 nm und einer Emission von 480 nm/545 nm vermessen. Nach Bestimmung der basalen cAMP-Konzentration wurden die Zellen mit verschiedenen Reagenzien stimuliert und die Auswirkungen auf die cAMP-Konzentration in den Zellen durch Veränderungen des FRET-Signals detektiert. Hierzu wurden nacheinander, in unterschiedlichen Reihenfolgen und Kombinationen, Isoprenalin (10 µM), Forskolin (10 µM),

NKH 477 (1 μ M), Formoterol (1 μ M), Pertussis-Toxin (100 ng/ml) und Dibutyryl-cAMP (100 μ M) auf die Zellen gegeben. An einem angeschlossenen Computer konnten die Signale gespeichert und ausgewertet werden.

2.2.7 Statistische Auswertungen

Die Daten der Zytokinquantifizierung wurden prozentual zur jeweiligen Kontrolle dargestellt, um eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Patienten zu ermöglichen. Die Boxplots zeigen die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Ausreißer wurden mit der Formel $\text{Mittelwert} + 2 \cdot \text{Standardabweichung}$ bzw. $\text{Mittelwert} - 2 \cdot \text{Standardabweichung}$ bestimmt und gegebenenfalls ausgeschlossen. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die Werte der Stimulanzen mit der Kontrolle mittels des *Wilcoxon Signed Rank Test* verglichen. Der *Mann-Whitney Rank Sum Test* wurde verwendet, um Signifikanzen zwischen verschiedenen Stimulanzen zu bestimmen. Ergebnisse innerhalb der Dosis-Wirkungskurve derselben Stimulanz wurden mit *Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks* auf Signifikanzen überprüft. Eine Signifikanz lag bei einem p-Wert $< 0,05$ vor, als hochsignifikant wurden p-Werte $< 0,005$ gewertet, p-Werte $< 0,01$ wurden als Trend angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur verschiedener Patienten

Um für die Versuche eine reine Kultur von Fibroblasten zu erhalten und eine genügende Zellzahl für die Versuche zu erreichen, wurden alle Zellen mindestens bis Passage 6 kultiviert. Hierbei sind große Unterschiede in der Morphologie und dem Wachstum bzw. der Teilungsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Patienten aufgefallen (Abbildung 11).

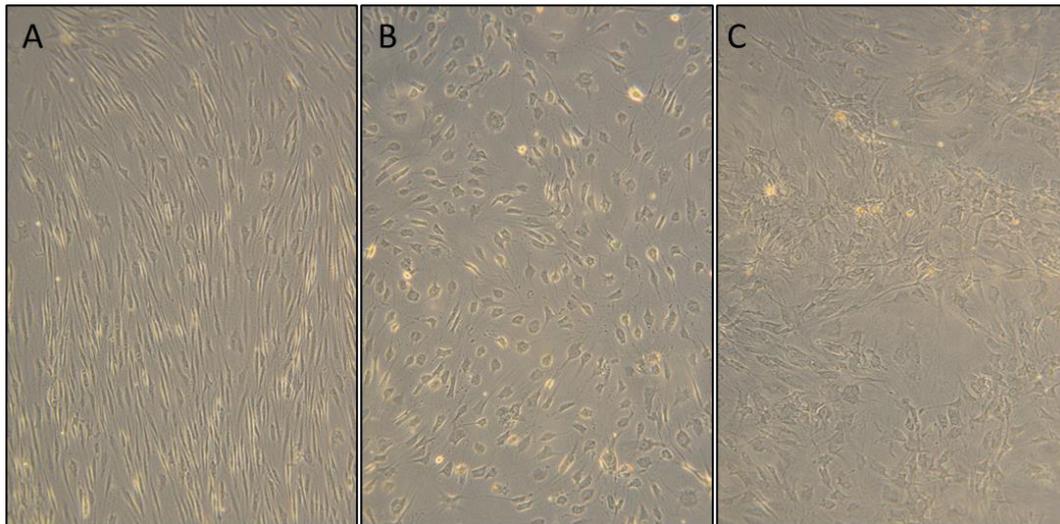


Abbildung 11: Morphologische Unterschiede in der Zellkultur verschiedener RA-Patienten. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen synovialer Fibroblasten von verschiedenen RA-Patienten. Manche Zellen (A) nahmen eine längliche Form an und bildeten lange schmale Ausläufer. Sie wuchsen annähernd parallel und dicht beieinander. Andere Zellen (B) behielten eine eher kugelige Form, während wieder andere (C) in Nestern wuchsen.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, gab es große morphologische Unterschiede zwischen den Fibroblasten unterschiedlicher Patienten. Die meisten Zellen nahmen eine für Fibroblasten typische Morphologie an, die durch ihre längliche Form mit langen schmalen Ausläufern charakterisiert war. Diese wuchsen meist in parallelen Bahnen und dicht beieinander (Abbildung 11, A). Manche Fibroblasten behielten eine eher kugelige Form und bildeten vergleichsweise kurze Ausläufer aus (Abbildung 11, B). Die Zellen anderer Patienten wiederum wuchsen in Nestern (Abbildung 11, C), was besonders oft bei den Zellen der Gesunden auftrat.

Abhängig von ihrer Morphologie unterschieden sich auch die Zellzahlen pro Flasche. Während bei den parallel wachsenden schmalen Zellen eine Vielzahl von Fibroblasten pro Passage geerntet werden konnten, wurde beispielsweise bei den in Nestern wachsenden Zellen keine vergleichbare Konfluenz erreicht. Des Weiteren traten große Unterschiede im Wachstums- bzw. Teilungsverhalten der Zellen unterschiedlicher Patienten auf. Manche Zellen konnten bereits nach wenigen Tagen bis Wochen passagiert werden, während andere

mehrere Monate wachsen mussten, bevor eine ausreichende Zellzahl bzw. Konfluenz erreicht wurde.

Einheitlich wuchsen die Zellen mit ansteigender Passage langsamer. Außerdem fiel auf, dass die Zellen mit Kontakt zu Nachbarzellen ein schnelleres Wachstum aufwiesen. Deshalb wurden die Zellen erst bei nahezu vollkommener Konfluenz geteilt und lediglich auf zwei neue Flaschen aufgeteilt, sodass sie auch dort direkt wieder Berührungspunkte mit anderen Zellen bilden konnten.

Die verwendeten primären Fibroblasten waren besonders anfällig für Kontaminationen. Trotz sterilem Arbeiten und der Zugabe von Antibiotika zum Medium waren in geringen Abständen immer wieder Bakterien in den Kulturen herangewachsen, was das Erreichen einer hohen Passage bzw. genügender Zellzahl erschwerte.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Probleme war die Durchführung der nachfolgend beschriebenen Versuche lediglich mit Zellen der RA-Patienten nach einer Knie-TEP-Operation und den Zellen der Gesunden möglich. Die FLNs der Risikopatienten und derer in einer frühen Phase ihrer RA-Erkrankung waren entweder verkeimt oder wuchsen derart langsam, dass die Zahl der Patienten, mit denen die Versuche durchgeführt werden konnten, nicht ausreichten, um aussagekräftige Ergebnisse zu gewinnen oder um Statistiken durchzuführen.

Bei den ersten Versuchen mit den stromalen Fibroblasten der Gesunden unter Hypoxie fiel auf, dass sie nicht in der Lage waren, sich an die verminderte Sauerstoffkonzentration von 1 % anzupassen. Obwohl sich die Morphologie der synovialen Fibroblasten durch die Hypoxie veränderte und sie granuliert wirkten, blieben sie adhärent. Die Fibroblasten aus den inguinalen Lymphknoten dagegen lösten sich größtenteils vom Boden ab, sodass eine Stimulation der Zellen mit anschließender Auswertung nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde der Sauerstoffgehalt unter Hypoxie bei den Fibroblasten der Gesunden von 1 % auf 5 % erhöht.

3.2 Überprüfung der Grundvoraussetzungen für eine Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai

Die untersuchte Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai tritt am β 2-adrenergen Rezeptor auf (96,97,100,103,105). Eine Voraussetzung hierfür ist das gemeinsame Binden von PDE4 und β -Arrestin in unmittelbarer Nähe zueinander (96,97,103).

In den ersten immunhistologischen Färbungen sollte überprüft werden, ob die Voraussetzungen für die Gas-zu-Gai-Umschaltung im synovialen Gewebe und den synovialen Fibroblasten gegeben waren, ob zum Beispiel ein gemeinsames Binden von PDE4 und β -Arrestin an den β 2-AR und die an der Umschaltung beteiligten G-Proteine nachweisbar waren.

3.2.1 β 2-adrenerger Rezeptor

Zunächst wurde eine immunhistochemische Färbung des β 2-adrenergen Rezeptors durchgeführt. Durch die immunhistologische Färbung konnte gezeigt werden, dass der β 2-AR sowohl bei RA- als auch bei OA-Patienten stark vertreten war (Abbildung 12). Im synovialen Gewebe konnte er hauptsächlich im sogenannten Lining Layer, der Grenzschicht zum Gelenkinnenraum, und um Gefäße detektiert werden (Abbildung 12). Auch in den synovialen Fibroblasten ließ sich seine Präsenz deutlich nachweisen (Abbildung 12). Zwischen OA und RA konnte durch die optische Kontrolle kein maßgeblicher Unterschied bezüglich des Vorkommens des β 2-AR festgestellt werden.

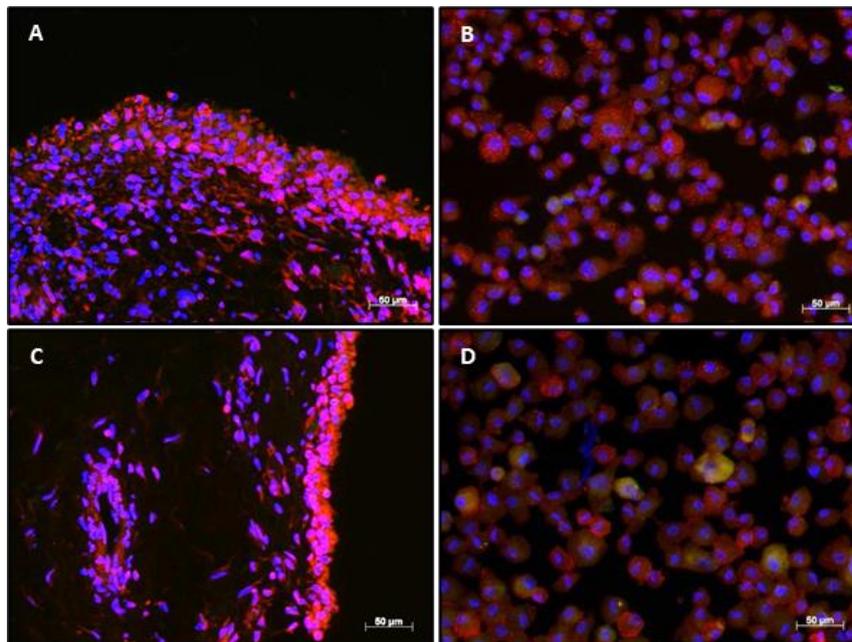


Abbildung 12: Immunhistologische Färbung des β 2-adrenergen Rezeptors. Gefärbt wurde der β 2-AR (rot) und der Zellkern (blau) im Gewebe der RA-Patienten (A) und OA-Patienten (C) sowie den daraus isolierten synovialen Fibroblasten (RA in B, OA in D). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

3.2.2 PDE4 und β -Arrestin

Im nächsten Schritt wurde das Vorhandensein von PDE4 und β -Arrestin überprüft (Abbildung 13). Außerdem sollte untersucht werden, ob diese nah beieinander lokalisiert sind.

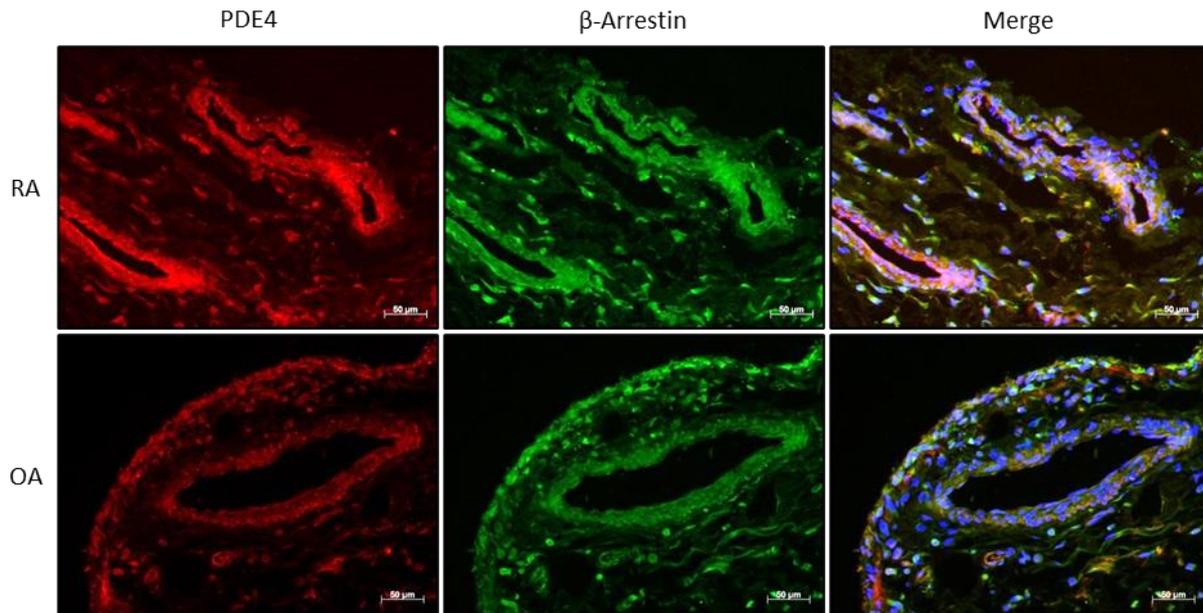


Abbildung 13: Doppelfärbung von PDE4 und β -Arrestin in synovialen Gewebe der RA- und OA-Patienten. Es wurde PDE4 (rot) und β -Arrestin (grün) sowie der Zellkern (blau) im Gewebe der RA-Patienten (obere Reihe) und OA-Patienten (untere Reihe) gefärbt und anschließend ein überlagertes Bild aller Kanäle erzeugt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Im synovialen Gewebe der RA- und OA-Patienten konnten PDE4 und β -Arrestin, ähnlich wie der β 2-AR, hauptsächlich im Lining Layer und um Gefäße detektiert werden (Abbildung 13). PDE4 und β -Arrestin waren größtenteils an denselben Stellen in den Zellen lokalisiert, was an dem Bild der überlagerten Kanäle deutlich erkennbar war (Abbildung 13).

Bei den kultivierten synovialen Fibroblasten der RA- und OA-Patienten konnte das Vorhandensein von PDE4 und β -Arrestin ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 14). Auch bei diesen Färbungen fiel beim Betrachten der überlagerten Kanäle auf, dass PDE4 und β -Arrestin nahe beieinander lokalisiert waren (Abbildung 14).

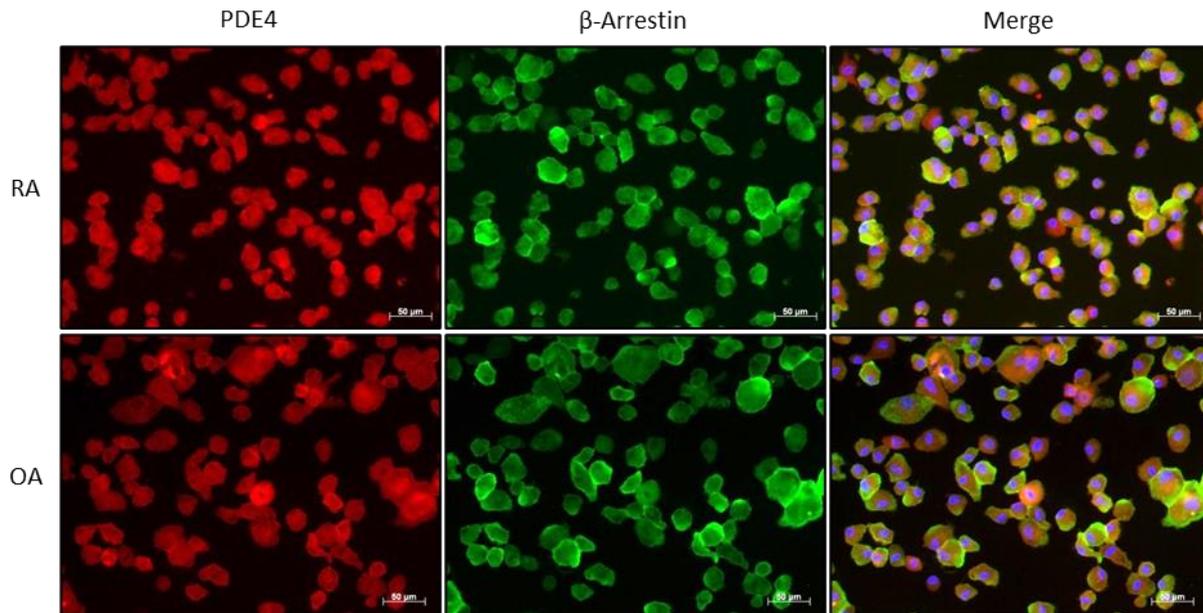


Abbildung 14: Doppelfärbung von PDE4 und β -Arrestin in synovialen Fibroblasten der RA- und OA-Patienten. Es wurde PDE4 (rot) und β -Arrestin (grün) sowie der Zellkern (blau) in synovialen Fibroblasten der RA-Patienten (obere Reihe) und OA-Patienten (untere Reihe) gefärbt und anschließend ein überlagertes Bild aller Kanäle erzeugt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Für die weiteren Versuche wurde auf den Vergleich zwischen OA und RA verzichtet und der Fokus auf die Fibroblasten der RA-Patienten gelegt.

3.2.3 Gas und Gai

Auch der Nachweis der Gas- und Gai-Proteine wurde durch immunhistologische Färbungen durchgeführt (Abbildung 15).

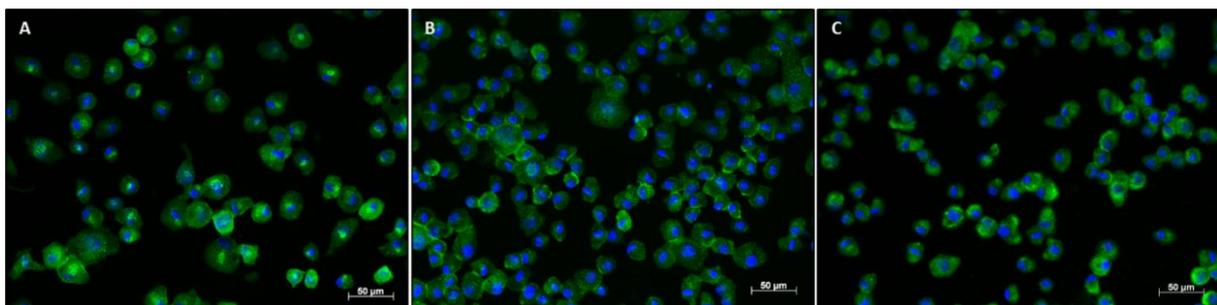


Abbildung 15: Immunhistologische Färbung von Gas, Gai1 und Gai2 in synovialen Fibroblasten der RA-Patienten. Dargestellt ist die immunhistologische Färbung von Gas (A), Gai1 (B) und Gai2 (C) in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten. Die G-Proteine wurden grün angefärbt, die Zellkerne blau. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Sowohl Gas, als auch Gai1 und Gai2 konnte in den synovialen Fibroblasten der RA-Patienten detektiert werden (Abbildung 15).

3.3 Suche nach Zielparametern in Fibroblasten, die eine mögliche Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai zeigen

Im ersten Schritt der Untersuchungen mussten zunächst jene Zielparameter gefunden werden, die durch die mögliche Umschaltung des Signalweges beeinflusst wurden. Diese Zielparameter mussten daher durch cAMP, dem zentralen Schlüsselmolekül für die Umschaltung, beeinflussbar sein. Günstig war es, Zielparameter zu finden, die durch hohes cAMP gesteigert bzw. gehemmt wurden. Hierfür wurde ein *Human Cytokine Array* durchgeführt, um eine Aussage auf Proteinebene treffen zu können (Abbildung 16). Des Weiteren wurden in einem zweiten Schritt die Auswirkungen auf RNA-Ebene mittels eines RNA-Microarrays untersucht (Tabelle 39).

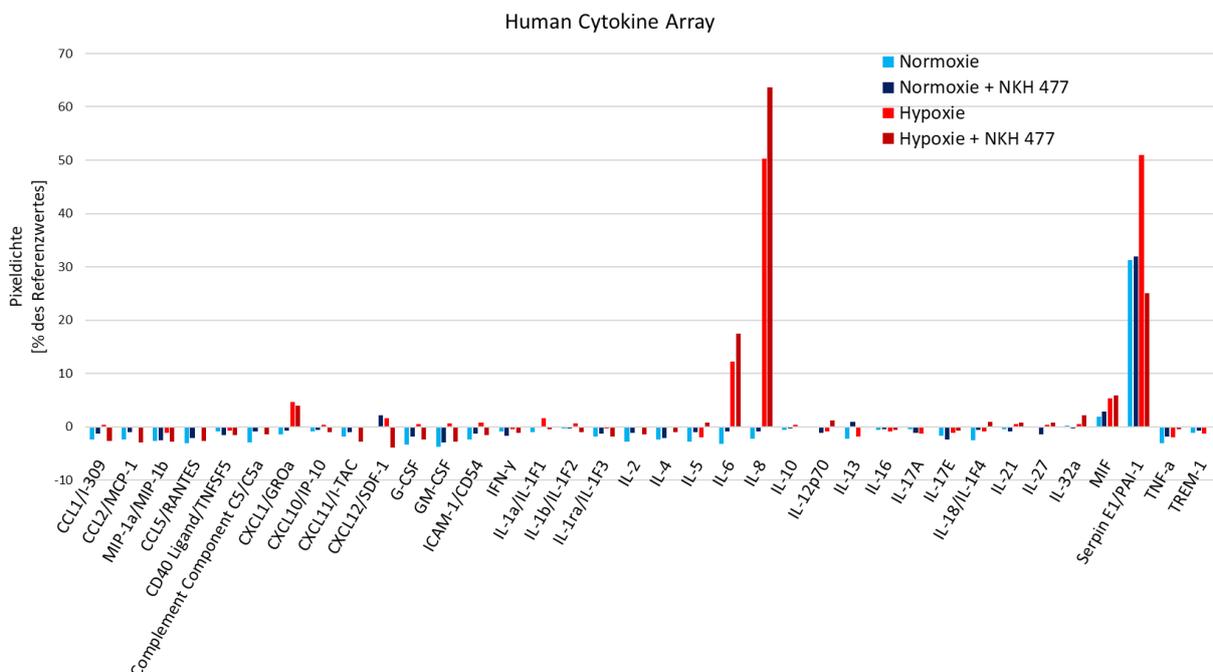


Abbildung 16: Human Cytokine Array. Dargestellt sind die prozentualen Pixeldichten der Wells mit Antikörpern gegen 36 verschiedene Zytokine im Vergleich zum Mittelwert der Referenzwerte (100 %) nach Abzug des Mittelwertes der Negativkontrollen. Die synovialen Fibroblasten wurden für 12 Stunden mit 10^{-7} M NKH 477 stimuliert, bevor mit den Überständen der Human Cytokine Array durchgeführt wurde. Hellbau: Normoxie, dunkelbau: Normoxie + NKH 477, orange: Hypoxie, rot: Hypoxie + NKH 477. NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator.

Beim Betrachten der Ergebnisse des *Human Cytokine Arrays* stachen vor allem IL-6, IL-8 und Serpin E1/PAI-1 durch ihre hohen Konzentrationen heraus (Abbildung 16). Während PAI-1 unter allen getesteten Bedingungen sehr hoch exprimiert wurde, waren IL-6 und IL-8 vor allem unter Hypoxie und unter Hypoxie mit zusätzlicher Stimulation der Adenylatzyklase mit NKH 477 besonders stark exprimiert (also durch cAMP gesteigerte Proteine) (Abbildung 16).

Aufgrund der hohen Konzentrationen der Zytokine im Überstand wurde angenommen, dass sie bei den synovialen Fibroblasten eine wichtige Rolle spielen. Außerdem wurde aufgrund des Arrays IL-12p70 und CXCL12/SDF-1 wegen ihrer Regulation und ihrer bekannten Assoziation mit Entzündungsreaktionen bei RA ausgewählt.

Die negativen Werte der Pixeldichte mancher Zytokine im Vergleich zum Referenzwert kamen durch ein starkes Signal der Negativkontrolle zustande, das von den anderen Messwerten subtrahiert wurde. Ein negativer Wert bedeutet daher, dass das Signal aus dem Well mit dem Antikörper schwächer war als der Mittelwert der Negativkontrollen.

Um weitere Zielparameter zu finden, die bei den synovialen Fibroblasten im Zusammenhang mit einer möglichen Umschaltung des Gas- zu Gai-Signalweges von Bedeutung sein könnten, wurde außerdem ein RNA-Microarray durchgeführt.

Die Ergebnisse des RNA-Microarrays wurden auf jene Gentranskripte durchsucht, die am stärksten positiv oder negativ durch die Stimulation der Adenylatzyklase reguliert worden waren. Die am stärksten regulierten Gentranskripte wurden im nächsten Schritt auf ihre Relevanz bei RA überprüft. Die Auswahl fiel auf BMP6, IL-33, Osteoprotegerin, IL-1ra, GAS-1, BMP2, VEGF-C und CCL2, um im weiteren Vorgehen genauer analysiert zu werden (Tabelle 39). Diese Zytokine waren durch die Stimulation der Adenylatzyklase stark reguliert und alle dieser Zytokine sind mit entzündlichen Reaktionen im Allgemeinen oder mit RA assoziiert. Tabelle 39 zeigt Proteine, die durch cAMP gesteigert (BMP6, IL-33, Osteoprotegerin, IL-1ra, GAS-1) oder gehemmt (BMP2, VEGF-C, CCL2) wurden.

Tabelle 39: RNA-Microarray. Nach Stimulation der synovialen Fibroblasten mit NKH 477 (10^{-6} M) für 6 h unter Hypoxie wurde die RNA isoliert und der RNA-Microarray durchgeführt. Dargestellt sind diejenigen Gentranskripte, die sowohl im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle stark reguliert wurden als auch mit Entzündungsreaktionen/rheumatischen Erkrankungen assoziiert sind. Die Pfeilrichtung zeigt an, ob die Gentranskripte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verstärkt (\uparrow) oder vermindert (\downarrow) exprimiert wurden.

Gen	Gen-Beschreibung	NKHvsCtrl meanFoldChange	Regulation
BMP6	Bone morphogenetic protein 6	19,29	\uparrow
IL33	Interleukin 33	5,88	\uparrow
TNFRSF11B	Osteoprotegerin	4,28	\uparrow
IL1RN	Interleukin 1 Receptor Antagonist	3,39	\uparrow
GAS1	Growth arrest-specific 1	2,99	\uparrow
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	-2,13	\downarrow
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor C	-2,22	\downarrow
CCL2	CC-chemokine ligand 2	-3,97	\downarrow

3.4 Quantifizierung der gefundenen Zielparameter

Die zuvor als relevant befundenen Zytokine wurden im Folgenden mittels ELISA quantifiziert. Überprüft wurde die Abhängigkeit der Proteine von NKH 477, einem Aktivator der Adenylatzyklase, in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle unter Normoxie und Hypoxie sowie mit und ohne zusätzlicher Stimulation durch IL-1 β .

3.4.1 Durch NKH 477 positiv regulierte Proteine

Bei der Regulation des IL-6 konnte eine Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt, der Stimulation mit IL-1 β sowie der Stimulation der Adenylatzyklase detektiert werden. Während bei der unstimulierten Kontrolle unter Normoxie eine sehr geringe Konzentration des IL-6 von 110 pg/ml vorlag, wurde sie unter Hypoxie auf 1.426 pg/ml gesteigert. Unter Normoxie + IL-1 β lag die IL-6-Konzentration bei 6.654 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β bei 7.292 pg/ml.

Eine deutliche Steigerung des IL-6 war außerdem durch Stimulation der Adenylatzyklase zu beobachten (Abbildung 17). Während unter allen getesteten Bedingungen eine Dosis-Wirkungskurve erkennbar war, bewirkte lediglich die höchste eingesetzte Konzentration des NKH 477 signifikante Anstiege der IL-6-Konzentration im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 17). Dies war sowohl für Normoxie, Normoxie + IL-1 β , als auch für Hypoxie + IL-1 β der Fall (Abbildung 17). Besonders stark ausgeprägt war die Wirkung der Stimulation der Adenylatzyklase unter Normoxie mit einem Anstieg der IL-6-Konzentration auf knapp 800 % (Abbildung 17).

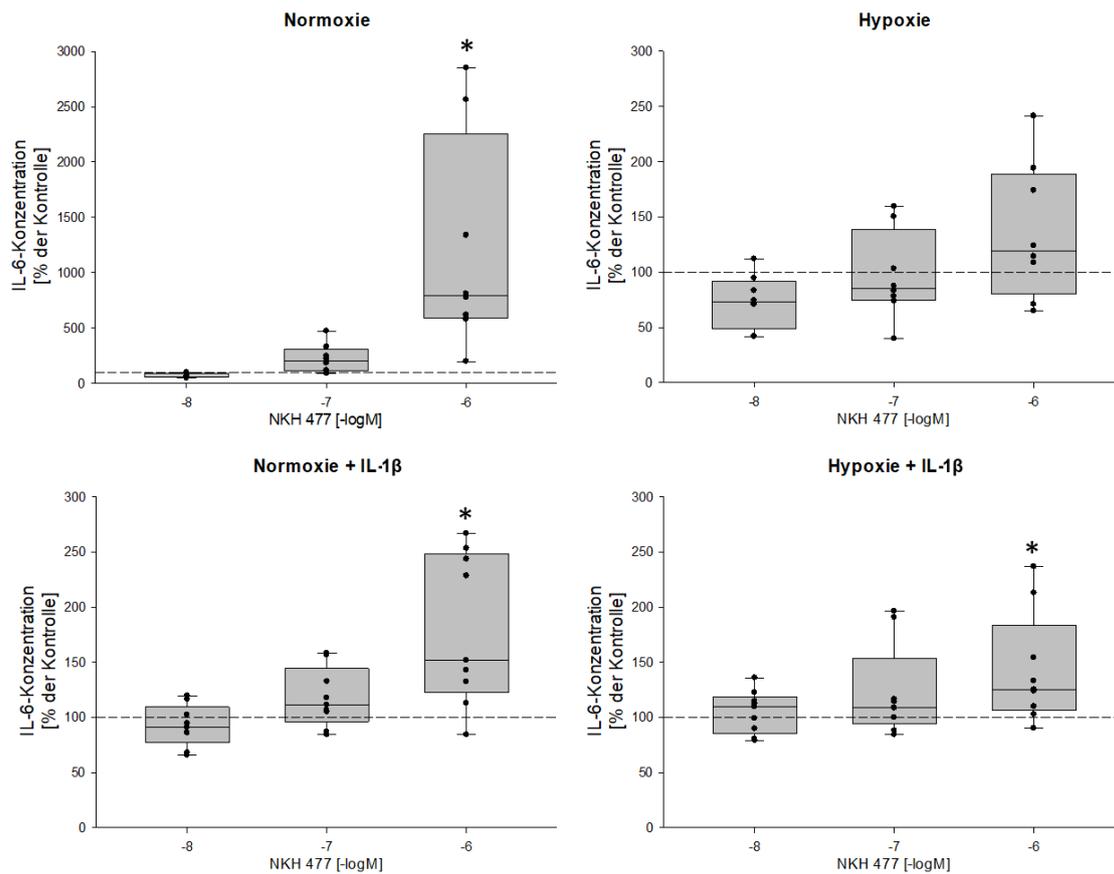


Abbildung 17: Regulation des IL-6 durch NKH 477. Dargestellt ist die Regulation des IL-6 bei Stimulation der synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit verschiedenen Molaritäten von NKH 477 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) unter Normoxie, Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %). NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator. $*=p<0,05$. $n(\text{RA})=7-9$. Die Skala der y-Achse reicht bei Normoxie von 0 % bis 3.000 %, bei den anderen Bedingungen von 0 % bis 300 %.

Die Regulation des Osteoprotegerins wurde ebenfalls durch Stimulation der Adenylatzyklase positiv beeinflusst (Abbildung 18). Doch auch der Sauerstoffgehalt und zusätzliche Stimulation mit IL-1 β hatten Auswirkungen. Während die unstimulierte Kontrolle unter Normoxie 1.963 pg/ml Osteoprotegerin enthielt, waren es unter Hypoxie 3.440 pg/ml. Durch Stimulation mit IL-1 β wurde die Konzentration des Osteoprotegerins gesteigert, sodass der Wert unter Normoxie bei 8.889 pg/ml und unter Hypoxie bei 7.981 pg/ml lag.

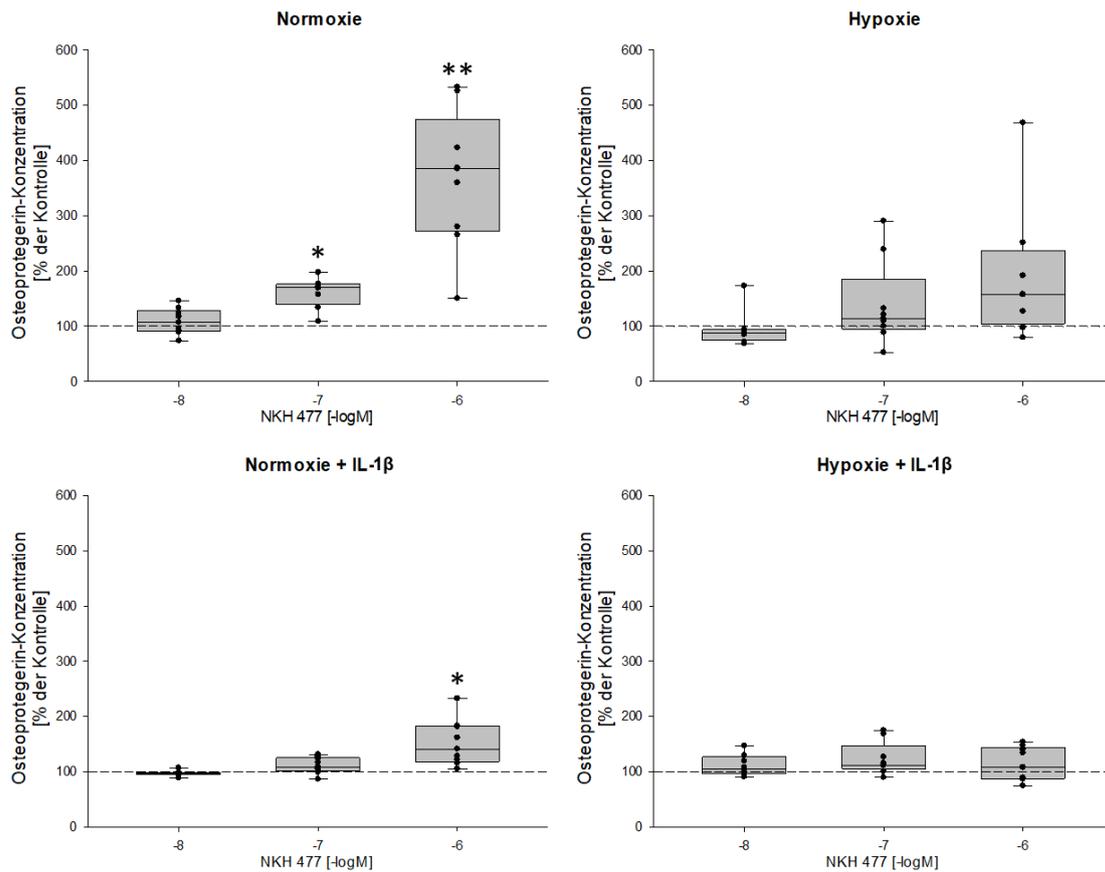


Abbildung 18: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477. Dargestellt ist die Regulation des Osteoprotegerins bei Stimulation der synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit verschiedenen Molaritäten von NKH 477 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) unter Normoxie, Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %). NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=8-9$.

Abhängig von der Molarität des Adenylatzyklase-Aktivators kam es unter Normoxie zu einem signifikanten Anstieg der Osteoprotegerin-Konzentration auf etwa 170 % bei 10^{-7} M, bzw. bei 10^{-6} M NKH 477 sogar zu einem hochsignifikanten Anstieg auf knapp 400 % (Abbildung 18). Auch bei zusätzlicher Stimulation mit IL-1 β wurde unter Normoxie bei der höchsten Konzentration von NKH 477 eine signifikante Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration auf etwa 140 % erreicht (Abbildung 18). Unter Hypoxie konnte dieselbe Tendenz erkannt werden, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 18). Bei zusätzlicher Stimulation mit IL-1 β unter Hypoxie ging die steigernde Wirkung des NKH 477 auf Osteoprotegerin verloren (Abbildung 18).

3.4.2 Durch NKH 477 negativ regulierte Proteine

Durch Stimulation der Zellen mit dem Adenylatzyklase-Aktivator wurden PAI-1, VEGF-C und CCL2 negativ reguliert. Hier hemmte also der cAMP-Anstieg die Zielproteine. Hierbei war ebenfalls, wie bei den positiv regulierten Proteinen, sowohl eine Abhängigkeit von der

Konzentration des NKH 477 als auch von der zusätzlichen Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft zu beobachten (Abbildung 19 bis Abbildung 21).

Die Regulation des PAI-1 wurde ohne Stimulation der Adenylatzyklase vor allem durch den verminderten Sauerstoffgehalt der Luft beeinflusst. Der Mittelwert der unstimulierten Kontrolle entsprach unter Normoxie 4.020 pg/ml und wurde unter Hypoxie auf 13.136 pg/ml gesteigert. Auch die zusätzliche Stimulation mit IL-1 β steigerte die PAI-1-Konzentration im Vergleich zur Normoxie, jedoch nicht so stark wie es unter Hypoxie der Fall war. Unter Normoxie + IL-1 β betrug die PAI-1-Konzentration der unstimulierten Kontrolle 7.473 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 10.189 pg/ml.

Die Stimulation der Adenylatzyklase hatte ebenfalls große Auswirkungen auf die PAI-1-Regulation (Abbildung 19). Obwohl es unter allen Bedingungen bei einer Stimulation der Fibroblasten mit 10^{-6} M NKH 477 zu einer signifikanten Verminderung der PAI-1-Konzentration kam, gab es deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Bedingungen (Abbildung 19). Unter Normoxie mit zusätzlicher Stimulation durch IL-1 β hatte die Aktivierung der Adenylatzyklase die stärkste Auswirkung auf PAI-1, es wurde auf unter 40 % der unstimulierten Kontrolle gehemmt (Abbildung 19). Auch ohne IL-1 β war unter Normoxie eine deutliche Reduzierung des PAI-1 auf etwa 50 % detektierbar (Abbildung 19). Unter Hypoxie war die Wirkung schwächer ausgeprägt, es wurde lediglich eine Verminderung auf knappe 80 % erreicht, sowohl mit als auch ohne zusätzliche Stimulation durch IL-1 β (Abbildung 19).

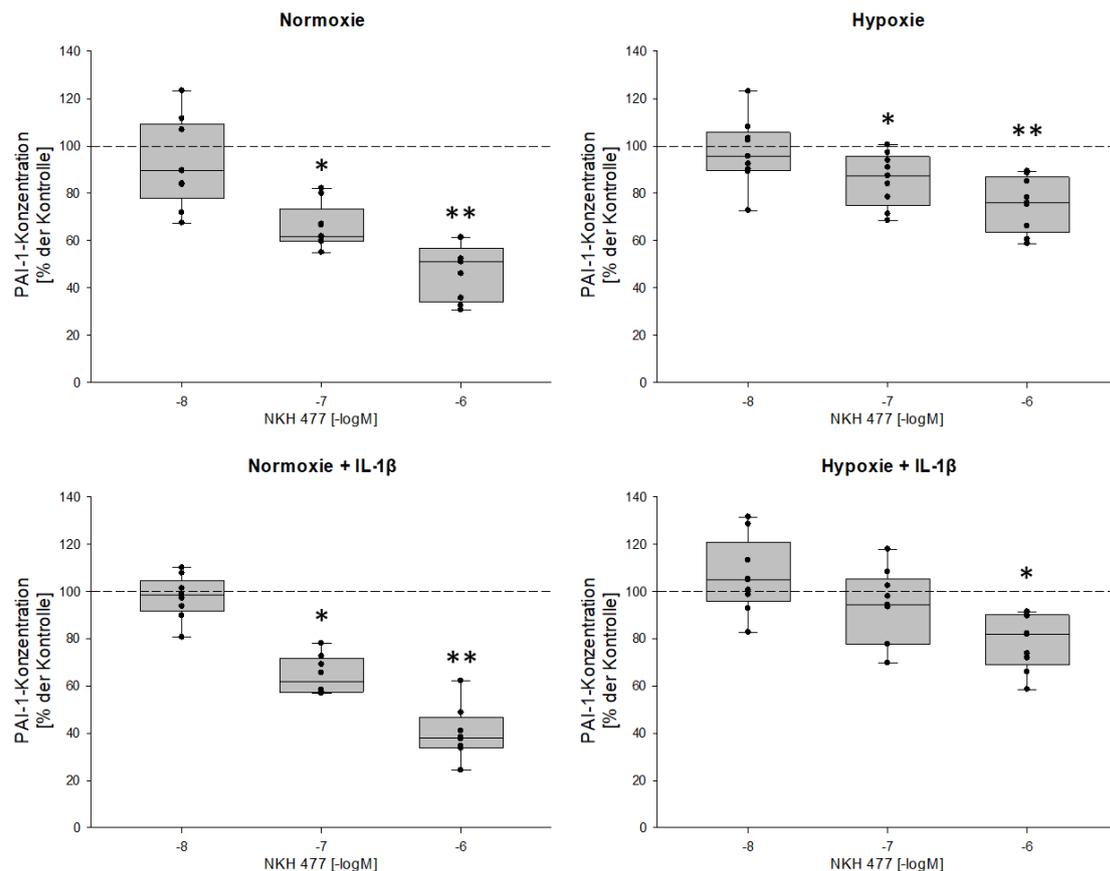


Abbildung 19: Regulation des PAI-1 durch NKH 477. Dargestellt ist die Regulation des PAI-1 bei Stimulation der synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit verschiedenen Molaritäten von NKH 477 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) unter Normoxie, Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %). NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=8-9$.

Die Abhängigkeit des CCL2 vom Sauerstoffgehalt der Luft sowie der zusätzlichen Stimulation mit IL-1 β ließ sich bereits beim Betrachten der Mittelwerte der unstimulierten Kontrollen feststellen, die unter Normoxie einer CCL2-Konzentration von 189 pg/ml und unter Hypoxie von 256 pg/ml entsprachen. Durch zusätzliche Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β wurde die CCL2-Konzentration deutlich gesteigert, unter Normoxie + IL-1 β auf 1.336 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β auf 1.137 pg/ml.

Außerdem wurde die CCL2-Regulation unter allen Bedingungen negativ von der Stimulation der Adenylatzyklase beeinflusst (Abbildung 20). Unter Normoxie und auch unter Hypoxie fiel die Konzentration des CCL2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei 10^{-6} M NKH 477 hochsignifikant knapp unter 40 % (Abbildung 20). Bei Zusätzlicher Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β wurde die Konzentration des CCL2 sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie lediglich auf etwas weniger als 70 % reduziert, was ebenfalls signifikant war (Abbildung 20).

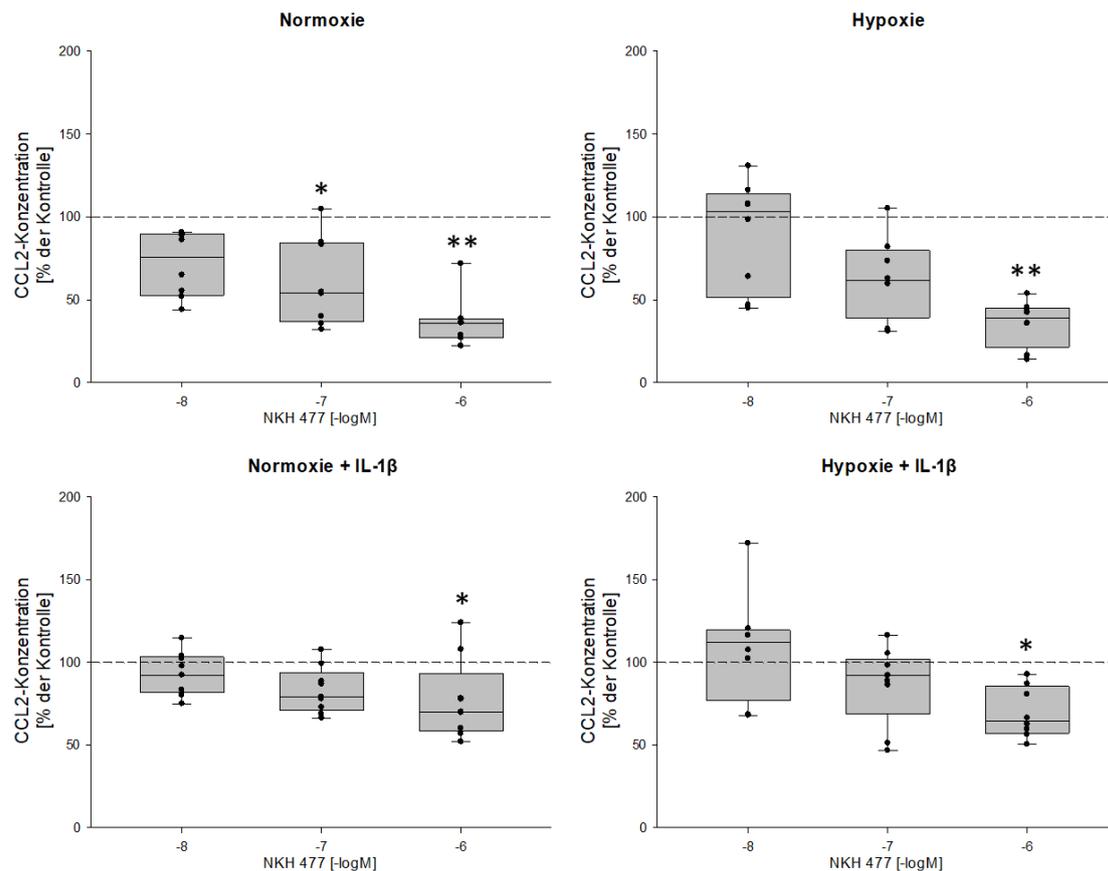


Abbildung 20: Regulation des CCL2 durch NKH 477. Dargestellt ist die Regulation des CCL2 bei Stimulation der synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit verschiedenen Molaritäten von NKH 477 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) unter Normoxie, Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %). NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=7-9$.

Auch bei der Regulation des VEGF-C konnte eine Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Luft sowie der zusätzlichen Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β bereits bei der Betrachtung der Mittelwerte der unstimulierten Kontrollen detektiert werden. Im Vergleich zur Normoxie verminderte Hypoxie diese Werte. Die Mittelwerte der unstimulierten Kontrollen entsprachen unter Normoxie 979 pg/ml und unter Hypoxie 658 pg/ml. IL-1 β steigerte die Konzentration des VEGF-C unter beiden Bedingungen. Die Werte betragen unter Normoxie + IL-1 β 1.683 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 880 pg/ml.

Durch die Stimulation der Adenylatzyklase wurde auch VEGF-C negativ reguliert (Abbildung 21). Die Hemmung war unter allen Bedingungen für die höchste Konzentration des NKH 477 hochsignifikant (Abbildung 21). Auch bei VEGF-C wurde die Wirkung der Stimulation der Adenylatzyklase durch zusätzliche Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β abgeschwächt (Abbildung 21). Während die VEGF-C-Konzentration unter Normoxie auf etwa 50 % der unstimulierten Kontrolle reduziert wurde, waren es unter Hypoxie 45 %, unter Normoxie + IL-1 β 80 % und unter Hypoxie + IL-1 β 60 % (Abbildung 21).

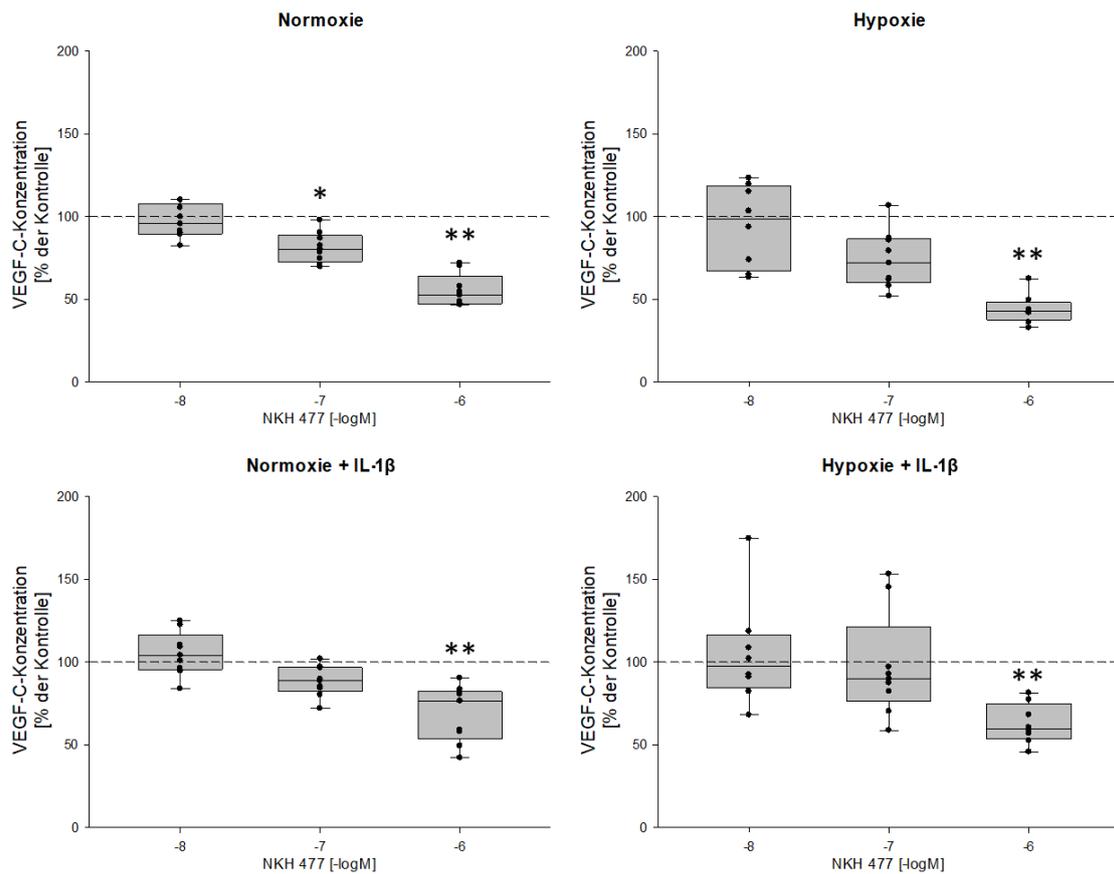


Abbildung 21: Regulation des VEGF-C durch NKH 477. Dargestellt ist die Regulation des VEGF-C bei Stimulation der synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit verschiedenen Molaritäten von NKH 477 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) unter Normoxie, Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %). NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=8-9$.

3.4.3 Proteine, die nicht durch NKH 477 reguliert wurden oder nicht durch ELISA quantifizierbar waren

Nicht alle im *Human Cytokine Array* und RNA-Microarray gefundenen Proteine konnten mittels ELISA quantifiziert werden, da diese Tests nicht sensitiv genug waren. So lagen BMP2, BMP6, GAS-1, IL-1ra, IL-12p70, IL-21, SDF-1 und IL-33 unterhalb der Detektionsgrenzen bzw. der Standardkurve, weshalb keine Analyse möglich war und diese Proteine nicht weiterverfolgt wurden.

IL-8 war unter Normoxie weder unstimuliert noch nach Stimulation der Adenylatzyklase detektierbar (Abbildung 22). Dennoch konnte ein deutlicher Einfluss der Hypoxie sowie des IL-1 β auf die IL-8-Regulation detektiert werden (Abbildung 22). Unter Hypoxie lag der Mittelwert der unstimulierten Kontrolle bei 421 pg/ml, unter Normoxie + IL-1 β bei 770 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β bei 2.929 pg/ml. Durch die fehlenden Vergleichswerte unter Normoxie und nur gering ausfallender, nicht signifikanter Regulation des IL-8 durch

Stimulation der Adenylatzyklase wurde auch dieses Zytokin im Folgenden nicht weiter analysiert.

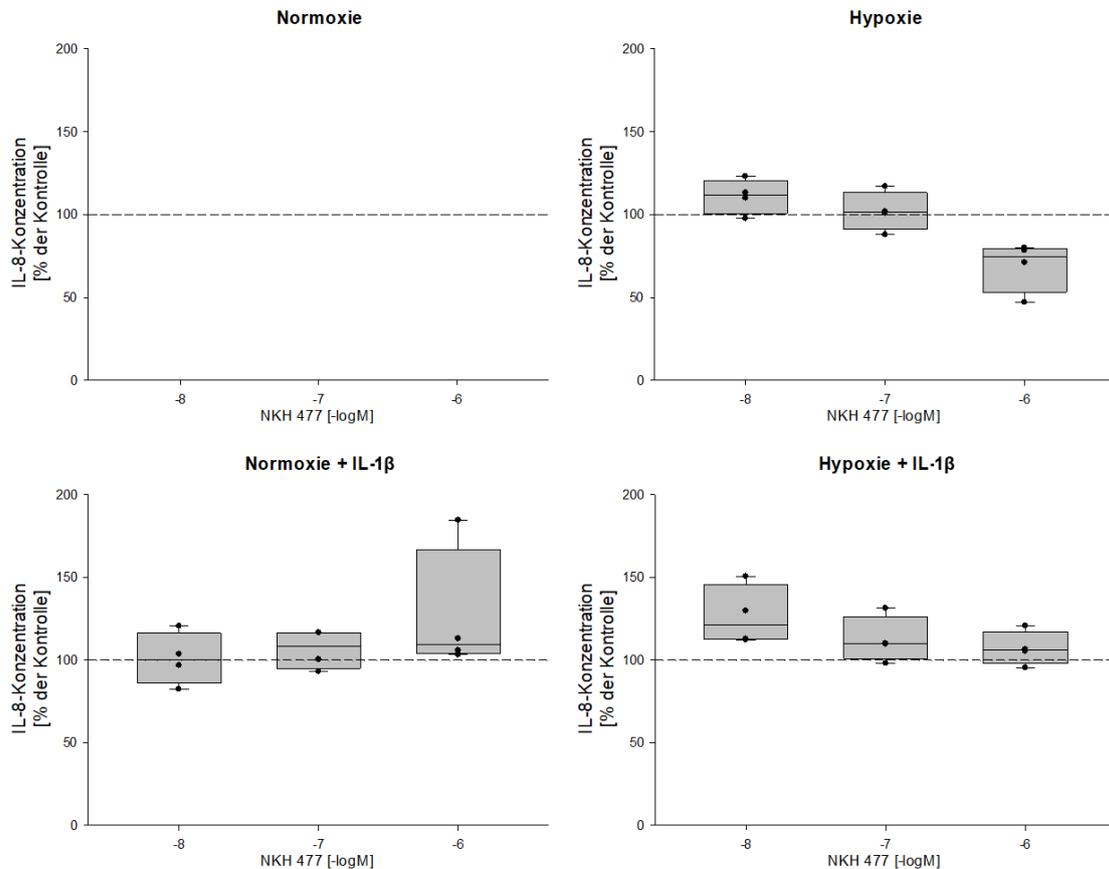


Abbildung 22: Regulation des IL-8 durch NKH 477. Dargestellt ist die Regulation des IL-8 bei Stimulation der synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit verschiedenen Molaritäten von NKH 477 (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) unter Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β im Verhältnis zu einer unstimulierten Kontrolle (100%). NKH 477: Adenylatzyklase-Aktivator. $n(\text{RA})=4$. Da unter Normoxie kein IL-8 detektierbar war, sind hier keine Daten dargestellt.

3.5 Darstellung der GRKs

Da aus der Literatur hervorgeht, dass die verschiedenen GRKs durch Phosphorylierung des Rezeptors Einfluss auf die Signalweiterleitung des β -AR nehmen, sollte auch ihre Bedeutung in Bezug auf eine mögliche Signalumschaltung genauer untersucht werden. Während die Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRK2 die β -Arrestin-vermittelte Desensibilisierung induziert, induzieren die GRK5 und GRK6 eine β -Arrestin-vermittelte Signalweiterleitung (96).

Zunächst sollte überprüft werden, ob diese GRKs im synovialen Gewebe und den synovialen Fibroblasten von RA-Patienten vorhanden waren.

Die GRK2 war stark im synovialen Gewebe der RA-Patienten vertreten (Abbildung 23). Auch bei den isolierten synovialen Fibroblasten waren viele Zellen, einige sogar sehr stark, positiv für GRK2 gefärbt (Abbildung 23). Es handelte sich um eine zytoplasmatische Färbung.

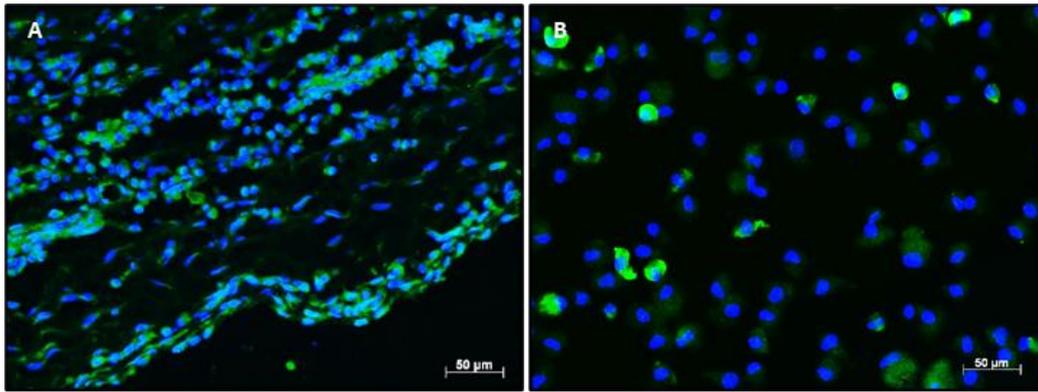


Abbildung 23: Immunhistologische Färbung der GRK2. Gefärbt wurde die GRK2 (grün) sowie der Zellkern (blau) in synovialen Gewebe (A) und synovialen Fibroblasten (B) der RA-Patienten. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Auch die GRK5 kam sowohl im synovialen Gewebe als auch in den synovialen Fibroblasten vor (Abbildung 24). Bei den synovialen Fibroblasten fiel auf, dass fast alle Zellen positiv für die GRK5 waren, jedoch keine einzelne so stark hervorstach, wie es bei der Färbung der GRK2 der Fall war (Vergleich Abbildung 23 und Abbildung 24). Es handelte sich um eine zytoplasmatische Färbung.

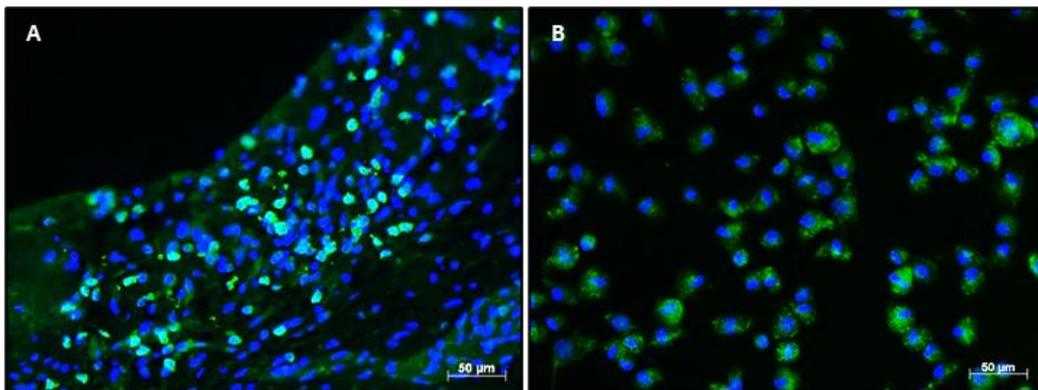


Abbildung 24: Immunhistologische Färbung der GRK5. Gefärbt wurde die GRK5 (grün) sowie der Zellkern (blau) in synovialen Gewebe (A) und synovialen Fibroblasten (B) der RA-Patienten. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Das synoviale Gewebe der RA-Patienten war deutlich positiv für die GRK6 (Abbildung 25). Auch in den synovialen Fibroblasten konnte eine Färbung der Zellen, also das Vorhandensein der GRK6, erkannt werden (Abbildung 25). Diese war jedoch nur schwach ausgeprägt, weshalb davon auszugehen war, dass eine andere Zellart vorrangig für die deutliche Positivfärbung des Gewebes verantwortlich war. Außerdem war bei der Betrachtung der Färbung der isolierten synovialen Fibroblasten auffällig, dass die GRK6 zwar vorhanden war, jedoch nicht ganz so stark vertreten zu sein schien, wie die zuvor gefärbten GRK2 und GRK5 (Vergleich Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25).

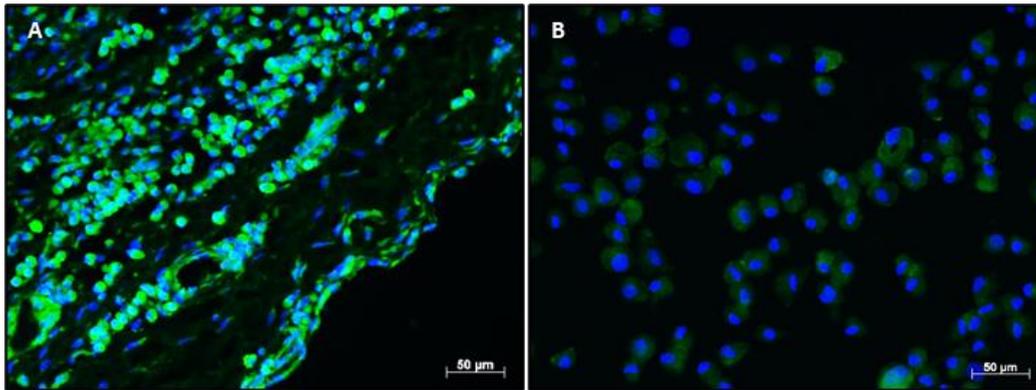


Abbildung 25: Immunhistologische Färbung der GRK6. Gefärbt wurde die GRK6 (grün) sowie der Zellkern (blau) in synovialen Gewebe (A) und synovialen Fibroblasten (B) der RA-Patienten. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die jeweiligen GRKs in den untersuchten synovialen Fibroblasten vorhanden waren, sollten diese im nächsten Schritt, genauso wie einige weitere Schlüsselpunkte der Signalkaskade, stimuliert bzw. inhibiert werden, um deren Einfluss auf die Zytokine spezifisch untersuchen zu können.

3.6 Bedeutung verschiedener Schlüsselpunkte in der Signalkaskade

Um die Umschaltung des Signalweges genauer charakterisieren zu können, wurden verschiedene Schlüsselpunkte der Signalkaskade stimuliert oder inhibiert, bevor die zuvor festgelegten Proteine erneut quantifiziert wurden (Abbildung 26). Ziel war es, den Einfluss verschiedener Knotenpunkte besser beurteilen und den Signalweg, der zur Regulation der jeweiligen Proteine führt, nachvollziehen zu können.

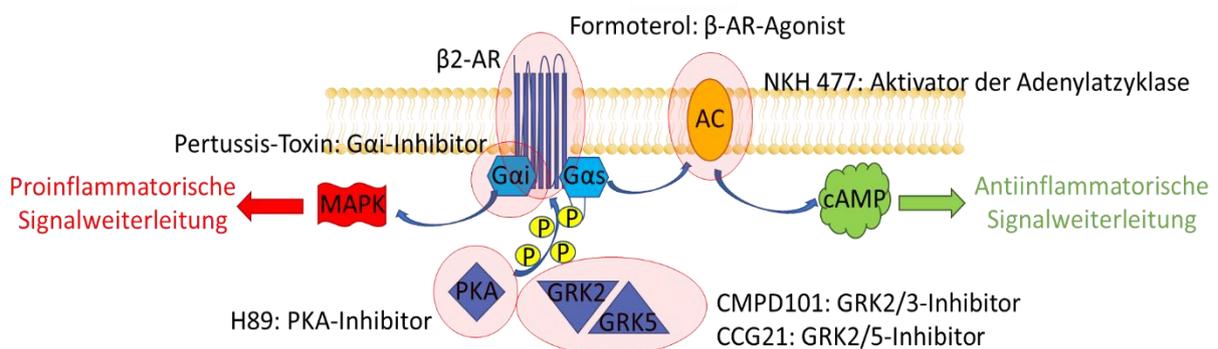


Abbildung 26: Stimulanzen zur Charakterisierung der Umschaltung des Signalweges von Gas zu Gai. β2-AR: Beta-adrenerger Rezeptor, AC: Adenylatzyklase, PKA: Proteinkinase A, GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase, MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.

Formoterol (10^{-7} M) wurde genutzt, um den β2-AR zu stimulieren. Die daraus resultierenden Effekte konnten mit einer direkten Stimulation der Adenylatzyklase durch NKH 477 (10^{-6} M) verglichen werden, um zu überprüfen, ob eine Signalweiterleitung vom Rezeptor über Gas zur

Adenylatzyklase erfolgte. Außerdem wurde die Phosphorylierung des Rezeptors gehemmt, indem die PKA durch H89 (10^{-5} M), GRK2/3 durch CMPD101 (10^{-8} M) und GRK2/5 durch CCG21 (10^{-7} M) gehemmt wurden. Um zu überprüfen welche Rolle Gai bei der Signalweiterleitung spielte, wurde Pertussis-Toxin (100 ng/ml) als Gai-Inhibitor genutzt. Die Inhibitoren wurden jeweils auch mit dem Aktivator der Adenylatzyklase bzw. dem β -AR-Agonisten kombiniert, um einen Zusammenhang der verschiedenen Schlüsselpunkte untersuchen zu können.

Im Folgenden werden Auffälligkeiten bei der Regulation der Zielparameter im Detail betrachtet und die wichtigsten Erkenntnisse einzeln ausgearbeitet.

3.6.1 Die Regulation des IL-6 in Fibroblasten

Die Regulation des IL-6 wurde genauer untersucht, da es nicht nur einer der wichtigsten Marker für entzündliche Vorgänge ist, sondern auch eng mit der Entstehung und dem Verlauf der RA verbunden ist (115,116). IL-6 kann von einer Vielzahl von Zellen des Synoviums produziert werden, auch wenn es hauptsächlich von Makrophagen freigesetzt wird (115,117). Es ist in der Lage lokale Entzündungen zu induzieren und aufrecht zu erhalten und dadurch auch die Zerstörung der Gelenke zu beeinflussen (115,116). Zusätzlich ist es aber auch an systemischen Symptomen genauso wie Komorbiditäten beteiligt, da es quasi wie ein Hormon auch andere Gebiete des Körpers beeinflussen kann (116). Es sind bereits Medikamente zugelassen, wie beispielsweise der humanisierte Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab, von dem RA-Patienten durch die Unterbindung der IL-6-Signalweiterleitung profitieren (115,116).

RA-Patienten

Die Konzentration des IL-6 in den Überständen der unstimulierten Kontrollen der RA-Patienten entsprach unter Normoxie 177 pg/ml und unter Hypoxie 906 pg/ml. Unter Normoxie + IL-1 β war die IL-6-Konzentration auf 11.183 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β auf 18.069 pg/ml gesteigert. Diese Daten sind in den Abbildungen nicht dargestellt.

Zunächst konnte bei den RA-Patienten beobachtet werden, dass die Regulation von IL-6 unter den vier Bedingungen Normoxie, Hypoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β sehr variierte (Abbildung 27).

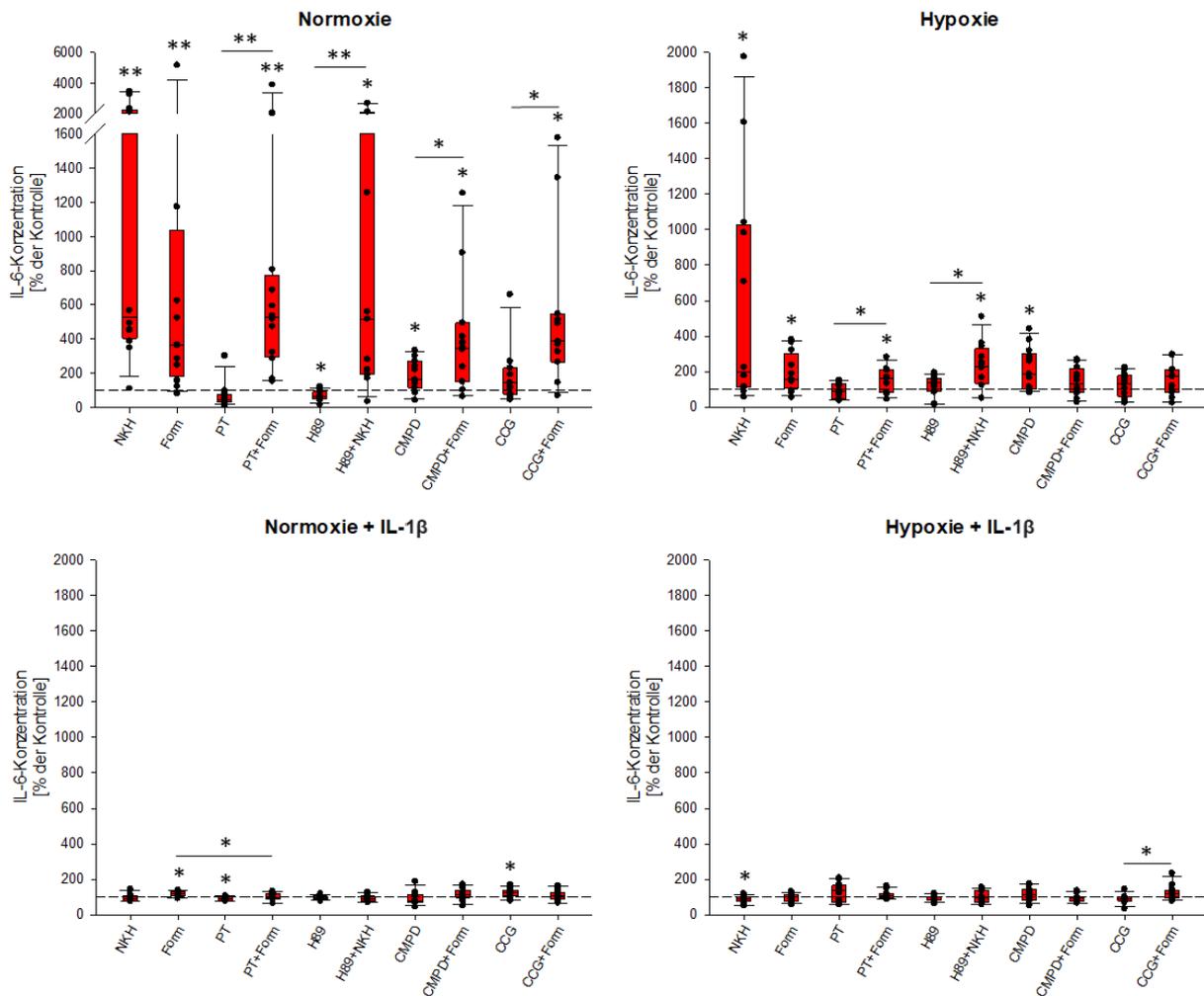


Abbildung 27: Abhängigkeit der IL-6-Regulation bei RA-Patienten von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=11-13$. Die Skala reicht unter Normoxie von 0 % bis 6.000 %, unter den anderen Bedingungen von 0 % bis 2.000 %.

Während die Wirkung der Stimulanzien bzw. Inhibitoren auf die Zellen unter Hypoxie bereits deutlich geringer ausfiel als unter Normoxie, war sie unter zusätzlicher Stimulation durch IL-1 β noch schwächer ausgeprägt und unter Hypoxie + IL-1 β kaum mehr vorhanden (Abbildung 27). So lösten sich mit der Simulation einer zunehmenden entzündlichen Situation, also mit Hypoxie und IL-1 β , die Regulationsmöglichkeiten der eingesetzten Stimulanzien auf.

Wurde die IL-6-Regulation der RA-Patienten nach Stimulation der Adenylatzyklase unter den vier verschiedenen Bedingungen verglichen fiel auf, dass sie stark variierte (Abbildung 28).

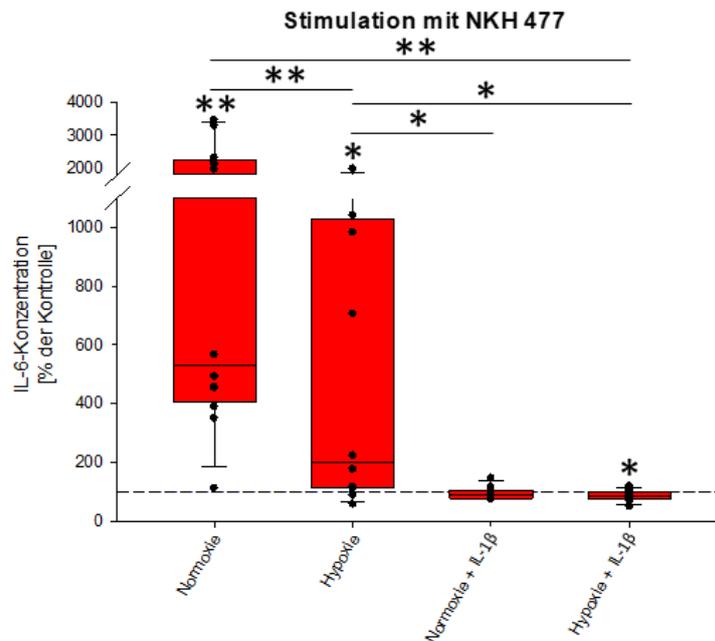


Abbildung 28: Regulation des IL-6 durch NKH 477 bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation der Fibroblasten mit NKH 477, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=12$.

Ohne die Zugabe von IL-1 β kam es zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Konzentration, unter Normoxie in deutlich ausgeprägterer Weise (etwa 530%) als unter Hypoxie (etwa 200 %) (Abbildung 28). Wurden die Fibroblasten jedoch unter Normoxie gleichzeitig mit IL-1 β stimuliert, ging der Effekt der stimulierten Adenylatzyklase auf die IL-6-Regulation verloren (Abbildung 28). Unter Hypoxie + IL-1 β kam es sogar zu einer gegensätzlichen Wirkung des NKH 477, sodass die IL-6-Konzentration signifikant auf etwa 85 % reduziert wurde. Unter der entzündlichsten der getesteten Bedingungen schlug die steigernde Wirkung der stimulierten Adenylatzyklase in eine hemmende Wirkung um (Abbildung 28).

Auch bei der Betrachtung der Wirkung des β -AR-Agonisten war Wichtiges zu erkennen (Abbildung 29). Der β -AR-Agonist allein bewirkte unter Normoxie, Normoxie + IL-1 β und Hypoxie eine Steigerung der IL-6-Konzentration (370 %, 120 % und 150 %) (Abbildung 29). Unter Normoxie und Hypoxie ohne die Zugabe von IL-1 β bewirkte Formoterol allein und zusammen mit dem G α i-Inhibitor eine etwa gleich starke Steigerung der IL-6-Konzentration (Abbildung 29). Bei denselben Patienten gab es unter Normoxie + IL-1 β einen signifikanten Unterschied zwischen der steigernden Wirkung des Formoterol allein und der Situation unter Kombination von Formoterol und Pertussis-Toxin (Abbildung 29). Unter Hypoxie + IL-1 β kam es weder durch die Stimulation des β -AR noch durch Inhibition des G α i oder deren Kombination zu einer signifikanten Regulation des IL-6 (Abbildung 29).

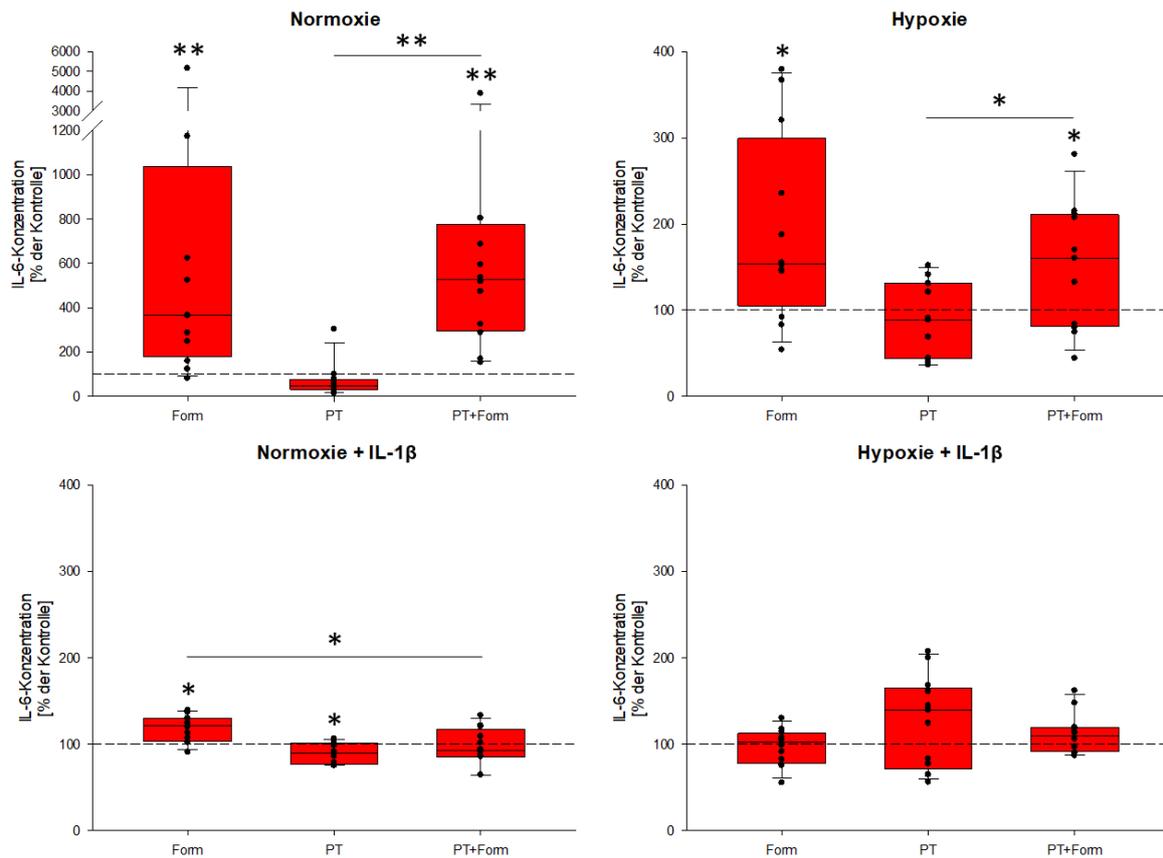


Abbildung 29: Einfluss des Formoterol und Pertussis-Toxin auf die IL-6-Regulation bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, Pertussis-Toxin, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(\text{RA})=11-13$. Die Skala der y-Achse reicht bei Normoxie von 0 % bis 6.000 %, bei den anderen Bedingungen von 0 % bis 400 %.

Abhängig von der untersuchten Bedingung wurde die Wirkung des β -AR-Agonisten außerdem von den durch die GRK-Inhibitoren regulierten Signalwegen beeinflusst (Abbildung 30).

Während der IL-6-steigernde Effekte des β -AR-Agonisten unter Normoxie unabhängig von den durch die GRK-Inhibitoren regulierten Signalwegen war, wurde unter Hypoxie und Normoxie + IL-1 β die steigernde Wirkung des β -AR-Agonisten bei Kombination mit den GRK-Inhibitoren aufgehoben (Abbildung 30).

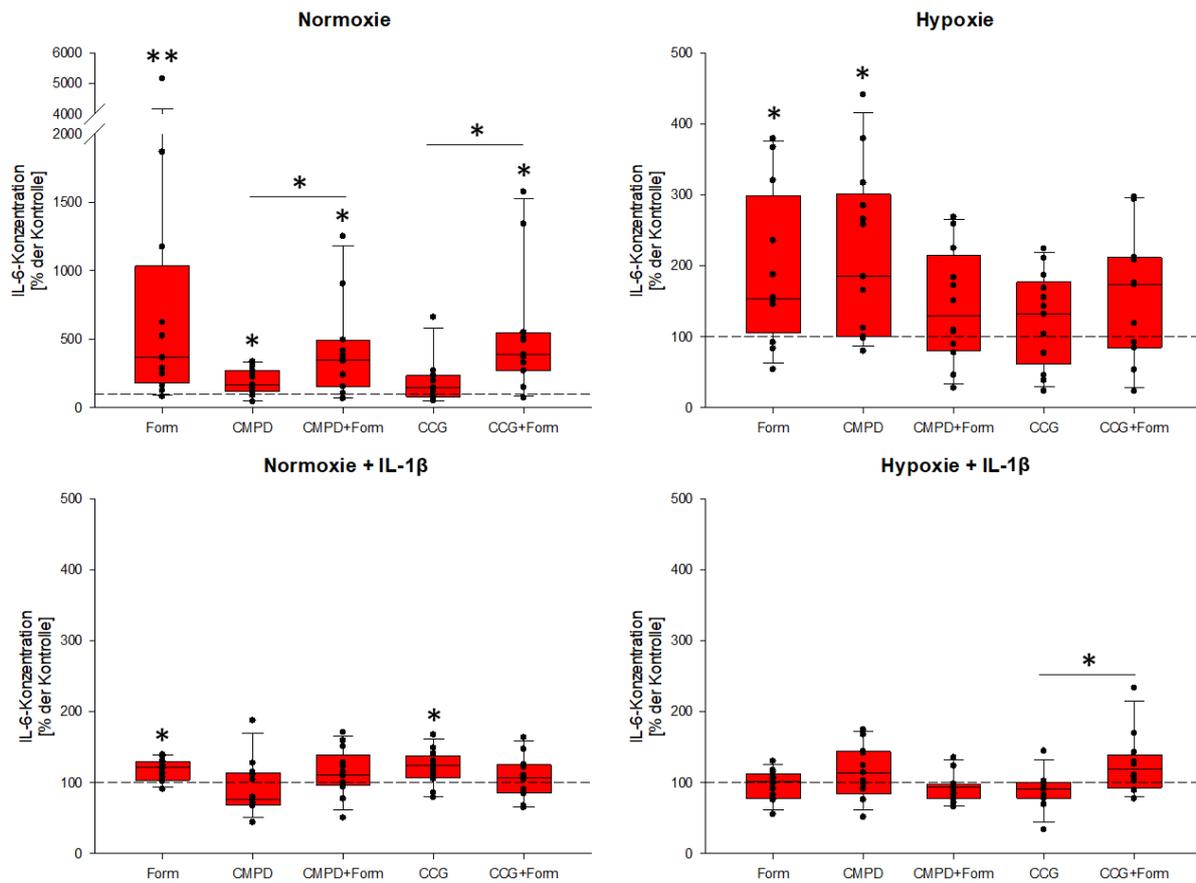


Abbildung 30: Einfluss des Formoterol, der GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination auf die IL-6-Regulation bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, den GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(\text{RA})=11-13$. Die Skala der y-Achse reicht bei Normoxie von 0 % bis 6.000 %, bei den anderen Bedingungen von 0 % bis 500 %.

Gesunde

Die IL-6-Konzentrationen der unstimulierten Kontrollen der Gesunden entsprachen unter Normoxie 975 pg/ml, unter Hypoxie 751 pg/ml, unter Normoxie + IL-1 β 30.656 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 26.967 pg/ml. Diese Daten sind in den nachfolgenden Abbildungen nicht dargestellt.

Bei den Gesunden kam es sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu signifikanten Regulationen des IL-6 (Abbildung 31). Auffällig war jedoch, dass unter Hypoxie + IL-1 β die meisten signifikanten Regulationen auftraten und dies auch dann, wenn die unterschiedlichen Stimulanzen und Inhibitoren direkt miteinander verglichen wurden (Abbildung 31). Unter Normoxie + IL-1 β konnte dagegen kein getestetes Reagenz eine signifikante Regulation bewirken (Abbildung 31).

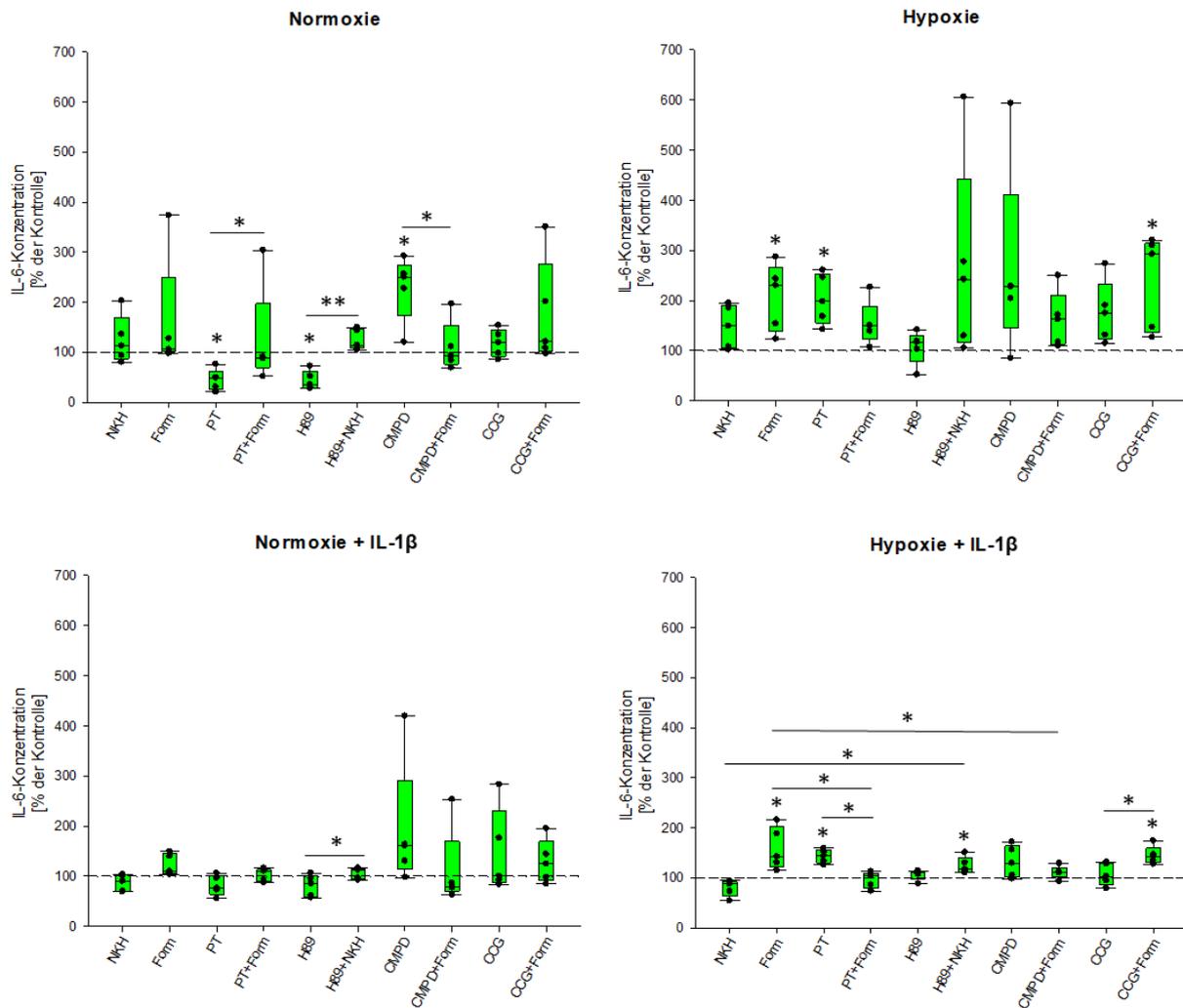


Abbildung 31: Abhängigkeit der IL-6-Regulation bei Gesunden von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$.

Der Aktivator der Adenylatzyklase allein bewirkte bei den Gesunden unter keiner der untersuchten Bedingungen eine signifikante Regulation des IL-6 (Abbildung 32). Nur unter der Bedingung mit der stärksten Entzündung unter Hypoxie + IL-1 β konnte durch die Kombination des NKH 477 mit dem PKA-Inhibitor eine Steigerung des IL-6 auf 120 % detektiert werden, die sich signifikant von der Stimulation der Fibroblasten mit dem Aktivator der Adenylatzyklase allein unterschied (Abbildung 32).

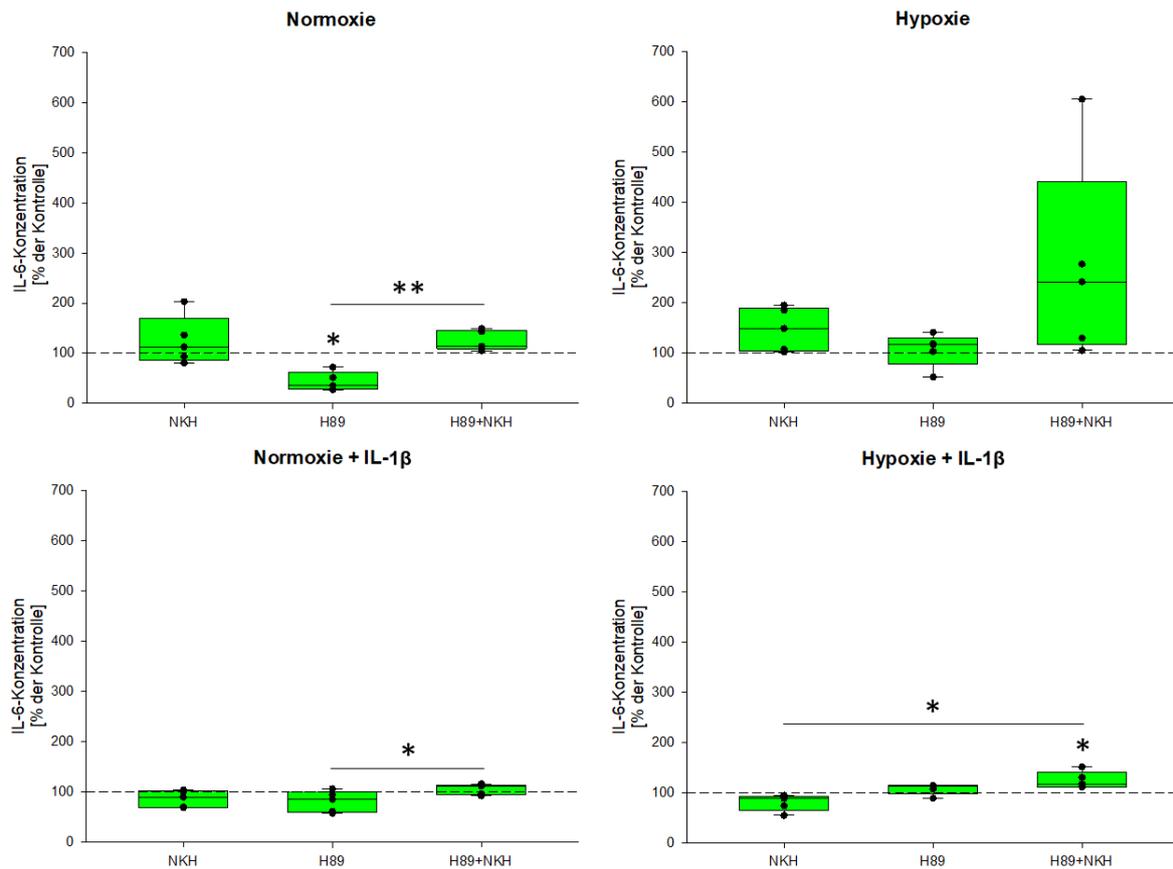


Abbildung 32: Abhängigkeit der IL-6-Regulation bei Gesunden von NKH 477, H89 und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit NKH 477, H89 und deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$.

Die Bedeutung der untersuchten Bedingungen auf die IL-6-Regulation bei Gesunden wurde auch bei der einzelnen Betrachtung der Wirkung des β -AR-Agonisten und des G α i-Inhibitors deutlich (Abbildung 33). Während Formoterol unter Normoxie und Normoxie + IL-1 β keine signifikante Regulation des IL-6 bewirkte, kam es unter Hypoxie und Hypoxie + IL-1 β zu einer gesteigerten IL-6-Konzentration von 230 % und 140 % (Abbildung 33).

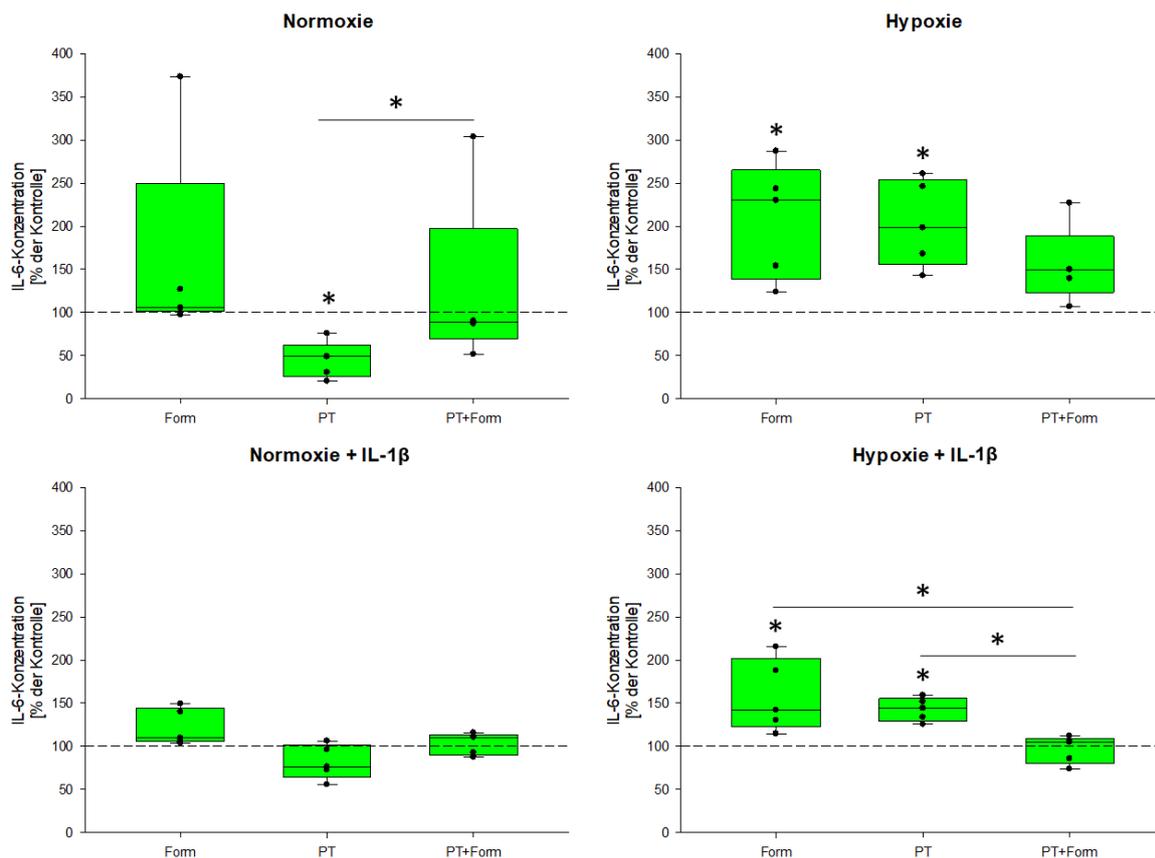


Abbildung 33: Einfluss des Formoterol und Pertussis-Toxin sowie deren Kombination auf die IL-6-Regulation bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, Pertussis-Toxin sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN})=5$.

Der G α i-Inhibitor hatte unter Normoxie eine antiinflammatorische, IL-6-hemmende Wirkung (50 %) (Abbildung 33). Bei Simulation einer Entzündung unter Normoxie durch IL-1 β wurde diese Regulation des IL-6 jedoch aufgehoben (Abbildung 33). Durch Sauerstoffmangel wurde die Wirkung des G α i-Inhibitors in die Gegenrichtung umgeschaltet und es kam mit und ohne IL-1 β zu einer steigenden, proinflammatorischen Wirkung (Abbildung 33). Unter Hypoxie wurde die IL-6-Konzentration bei Inhibition des G α i auf etwa 200 % gesteigert, während sie unter Hypoxie + IL-1 β auf etwa 145 % gesteigert wurde (Abbildung 33).

Beim Betrachten der Wirkung des Formoterol und des Pertussis-Toxin fiel außerdem auf, dass deren Kombination unter keiner der getesteten Bedingungen zu einer signifikanten Regulation des IL-6 führte (Abbildung 33). Durch Kombination der beiden Reagenzien wurden demnach etwaige Regulationen des IL-6, welche die Reagenzien einzeln bewirkten, aufgehoben (Abbildung 33).

Auch beim Betrachten des Formoterol kombiniert mit den GRK-Inhibitoren konnte beobachtet werden, dass sich die Signalwege, die durch die Reagenzien reguliert wurden, gegenseitig in ihrer Wirkung auf die Regulation des IL-6 beeinflussten (Abbildung 34).

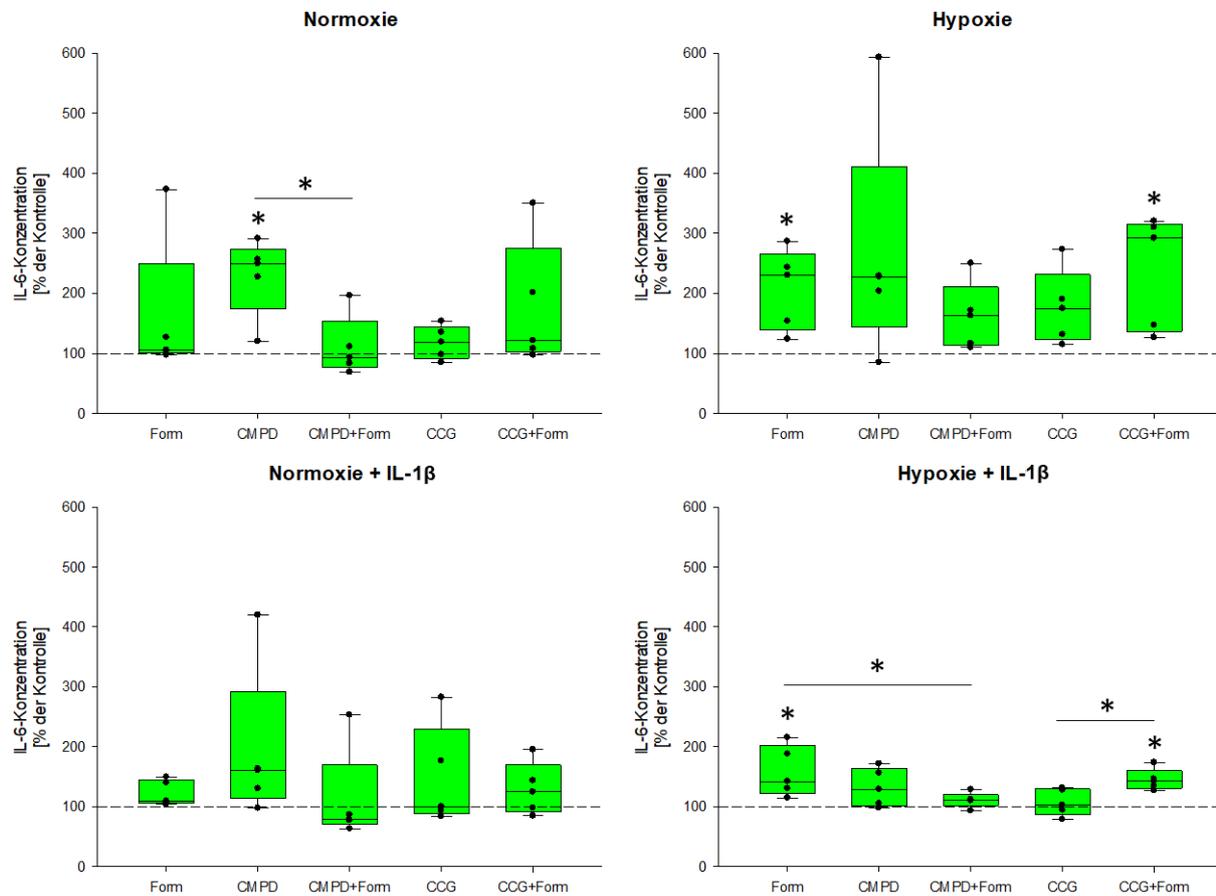


Abbildung 34 Einfluss des Formoterol, der GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination auf die IL-6-Regulation bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, den GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN})=5$.

Der GRK2/5-Inhibitor bewirkte unter keiner der untersuchten Bedingungen eine signifikante Regulation des IL-6 und der durch ihn regulierte Signalweg nahm auch keinen Einfluss auf die Regulation des IL-6 durch den β -AR-Agonisten (Abbildung 34). Im Gegensatz dazu beeinflussten sich die Signalwege, die durch den β -AR-Agonisten und den GRK2/3-Inhibitor reguliert wurden, gegenseitig in ihrer Wirkung auf die Regulation des IL-6 (Abbildung 34). Die unter Normoxie gesteigerte Konzentration des IL-6 durch den GRK2/3-Inhibitor wurde bei zusätzlicher Stimulation mit Formoterol aufgehoben (Abbildung 34). Unter Hypoxie und Hypoxie + IL-1 β dagegen wurde die steigernde Wirkung des Formoterol auf die IL-6-Konzentration durch die Kombination des β -AR-Agonisten mit dem GRK2/3-Inhibitor aufgehoben (Abbildung 34).

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Beim Vergleich der RA-Patienten mit den Gesunden war auffällig, dass unter Normoxie deutlich mehr signifikante Unterschiede in der Regulation des IL-6 detektiert werden konnten als unter den anderen getesteten Bedingungen (Abbildung 35 bis Abbildung 38). Durch Simulation einer Entzündung mit IL-1 β oder/und Hypoxie bewirkte jeweils nur noch ein einziges Reagenz eine signifikant unterschiedliche Regulation des IL-6 zwischen den RA-Patienten und den Gesunden (Abbildung 36 bis Abbildung 38).

Unter Normoxie wurde IL-6 bei den RA-Patienten und Gesunden durch den Aktivator der Adenylatzyklase allein und in Kombination mit dem PKA-Inhibitor sowie den β -AR-Agonisten kombiniert mit dem G α i-Inhibitor und Formoterol zusammen mit den GRK-Inhibitoren unterschiedlich reguliert (Abbildung 35). Während bei den RA-Patienten jeweils eine (hoch-)signifikante Steigerung der IL-6-Konzentration beobachtet werden konnte war bei den Gesunden durch dieselben Reagenzien kein signifikanter Unterschied in der Regulation des IL-6, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle, detektierbar (Abbildung 35). Besonders stark ausgeprägt war der Unterschied zwischen den Gesunden und RA-Patienten in der IL-6-Regulation beispielsweise bei Stimulation der Adenylatzyklase (Abbildung 35). Der Median der RA-Patienten lag bei ca. 430 %, wohingegen er bei den Gesunden lediglich bei etwa 120 % lag (Abbildung 35).

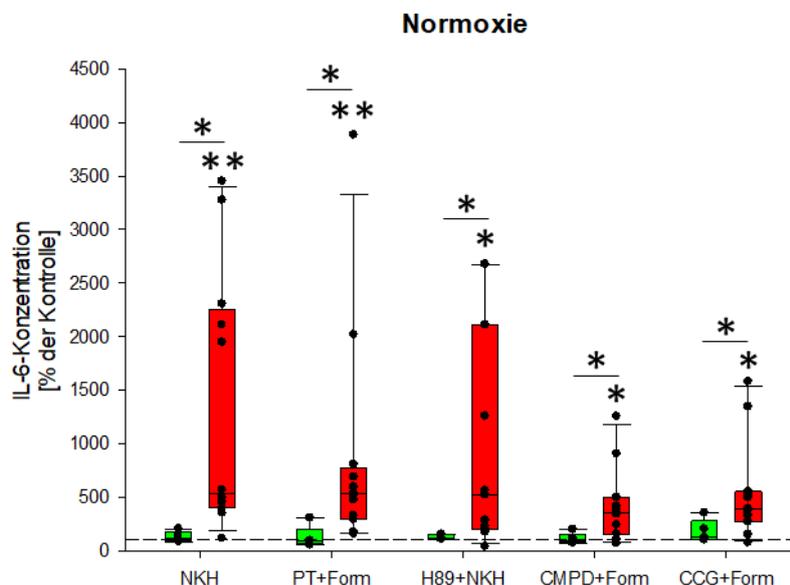


Abbildung 35: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= p <0,05, **= p <0,001. n (FLN)=5, n (RA)=11-12.

Unter Hypoxie führte die Hemmung des Gαi bei Gesunden zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Konzentration (200 %), während bei den RA-Patienten keine Regulation detektiert werden konnte (Abbildung 36). Die IL-6-Konzentration der beiden Gruppen unterschied sich hochsignifikant (Abbildung 36).

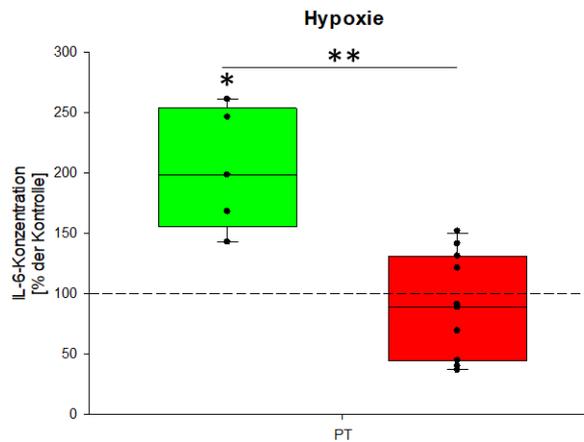


Abbildung 36: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Inhibition der Fibroblasten mit Pertussis-Toxin, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. PT: Gαi-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=11$.

Unter Normoxie + IL-1 β war der GRK2/3-Inhibitor das einzige Reagenz, das die RA-Patienten und die Gesunden signifikant unterschiedlich regulierte, obwohl er jeweils keine signifikante Regulation des IL-6 verglichen mit der unstimulierten Kontrolle bewirkte (Abbildung 37).

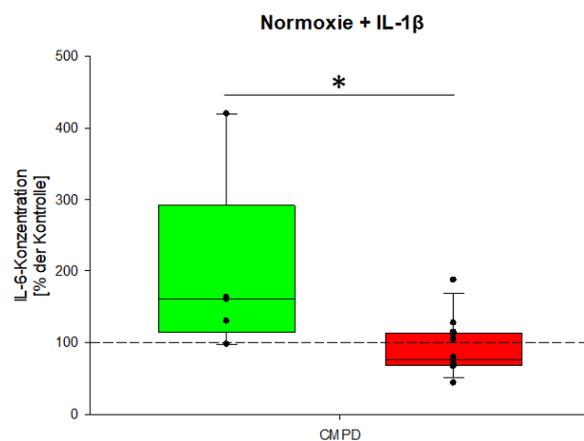


Abbildung 37: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Inhibition der Fibroblasten mit CMPD, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. CMPD: GRK2/3-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=12$.

Unter Hypoxie + IL-1 β konnte der einzige signifikante Unterschied in der Regulation des IL-6 zwischen den RA-Patienten und den Gesunden durch den β -AR-Agonisten beobachtet werden. Während er die IL-6-Konzentration bei den Gesunden auf 140 % steigerte,

unterschied sich die IL-6-Konzentration im Überstand der RA-Patienten nach der Stimulation mit Formoterol nicht von jener der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 38).

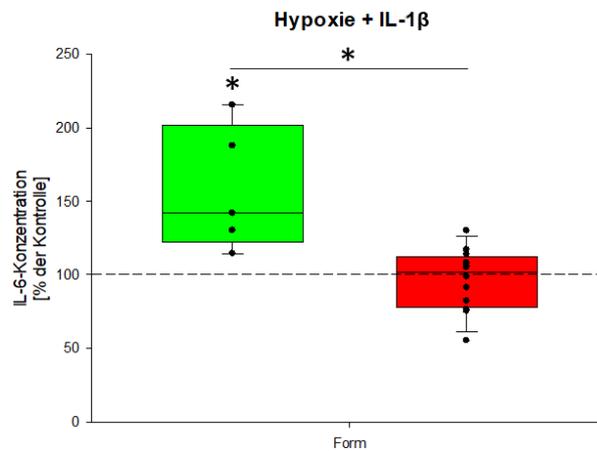


Abbildung 38: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation der Fibroblasten mit Formoterol, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. Form: β -AR-Agonist. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=12$.

Beim Vergleich der Regulationen des IL-6 zwischen den RA-Patienten und den Gesunden unter Hypoxie + IL-1 β wurde außerdem ein wichtiger Unterschied deutlich. In Abbildung 27 wurde gezeigt, dass bei den RA-Patienten die meisten Regulationsmechanismen des IL-6 bei Hypoxie + IL-1 β abgeschaltet wurden. Für die Gesunden konnte dagegen gezeigt werden, dass unter dieser Bedingung die meisten signifikanten Regulationen auftraten (Abbildung 31). Während die Simulation des entzündlichen Gewebes im hypoxischen Kniegelenk bei den RA-Patienten also eine mögliche Regulation der Gas-/Gai-Pfade verhinderte, schien die Regulation dieser Pfade bei Gesunden erst unter dieser Bedingung richtig eingeschaltet zu werden (Vergleich Abbildung 27 und Abbildung 31).

3.6.2 Die Regulation des Osteoprotegerins in Fibroblasten

Osteoprotegerin spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der RA (118–120). Bei RA-Patienten konnte sowohl eine erhöhte Expression des Osteoprotegerins als auch ein erhöhtes Serumlevel im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (119). Im Zusammenspiel mit RANKL ist Osteoprotegerin an der Regulation der Knochenbildung und Knochenresorption beteiligt (120). Osteoprotegerin hemmt die Bildung von Osteoklasten und damit die Knochenerosion (118).

RA-Patienten

Bei der Messung des Osteoprotegerins entsprachen die unstimulierten Kontrollen der RA-Patienten unter Normoxie einer Konzentration von 531 pg/ml und unter Hypoxie war sie nur minimal auf 570 pg/ml gesteigert. Unter Normoxie + IL-1 β betrug die Konzentration des Osteoprotegerins 3.557 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 2.389 pg/ml. Diese Daten sind in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt.

Beim Betrachten der einzelnen Stimulanzen konnte eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung des NKH 477 von den getesteten Bedingungen erkannt werden (Abbildung 39). Die Aktivierung der Adenylatzyklase führte unter Normoxie bei den RA-Patienten zu einer enormen Steigerung (580 %) der Osteoprotegerin-Konzentration (Abbildung 39). Auch unter Hypoxie und Normoxie + IL-1 β konnte eine signifikante Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration detektiert werden, wenn auch deutlich geringer als unter Normoxie (310 % bzw. 170 %) (Abbildung 39). Unter Hypoxie mit zusätzlicher Stimulation der Zellen durch IL-1 β dagegen wurde die Osteoprotegerin-Konzentration durch Stimulation der Adenylatzyklase auf unter 70 % gehemmt (Abbildung 39). Die cAMP-Wirkung hatte unter Hypoxie + IL-1 β , im Gegensatz zu den anderen getesteten Bedingungen, eine proinflammatorische, knochenschädigende, Osteoprotegerin-hemmende Wirkung (Abbildung 39). Ein ähnliches Bild konnte zuvor bei der Messung der IL-6-Konzentration bei RA-Patienten nach Stimulation der Adenylatzyklase in Abbildung 28 beobachtet werden.

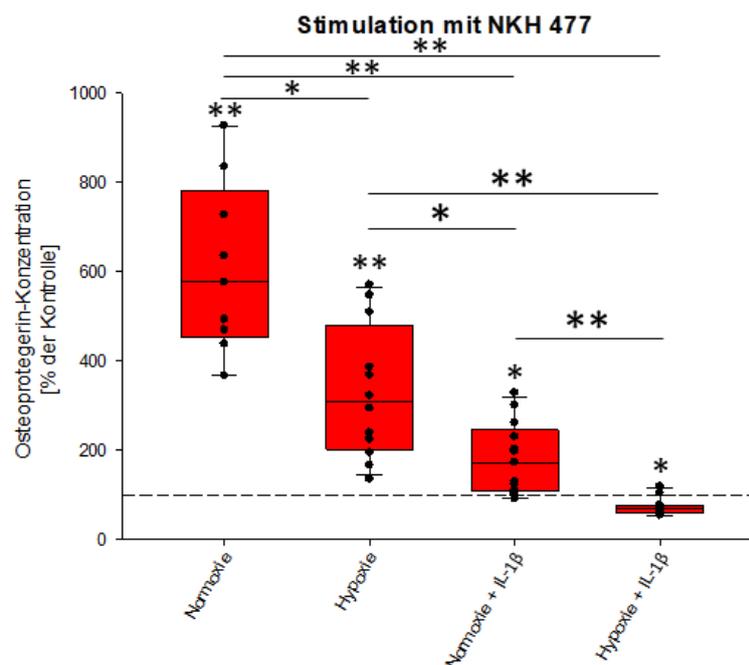


Abbildung 39: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation der Fibroblasten mit NKH 477, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=9-13$.

Außerdem war bei der Regulation des Osteoprotegerins bei den RA-Patienten auffällig, dass die Aktivierung der Adenylatzyklase andere Auswirkungen hatte als der β -AR-Agonist (Abbildung 40).

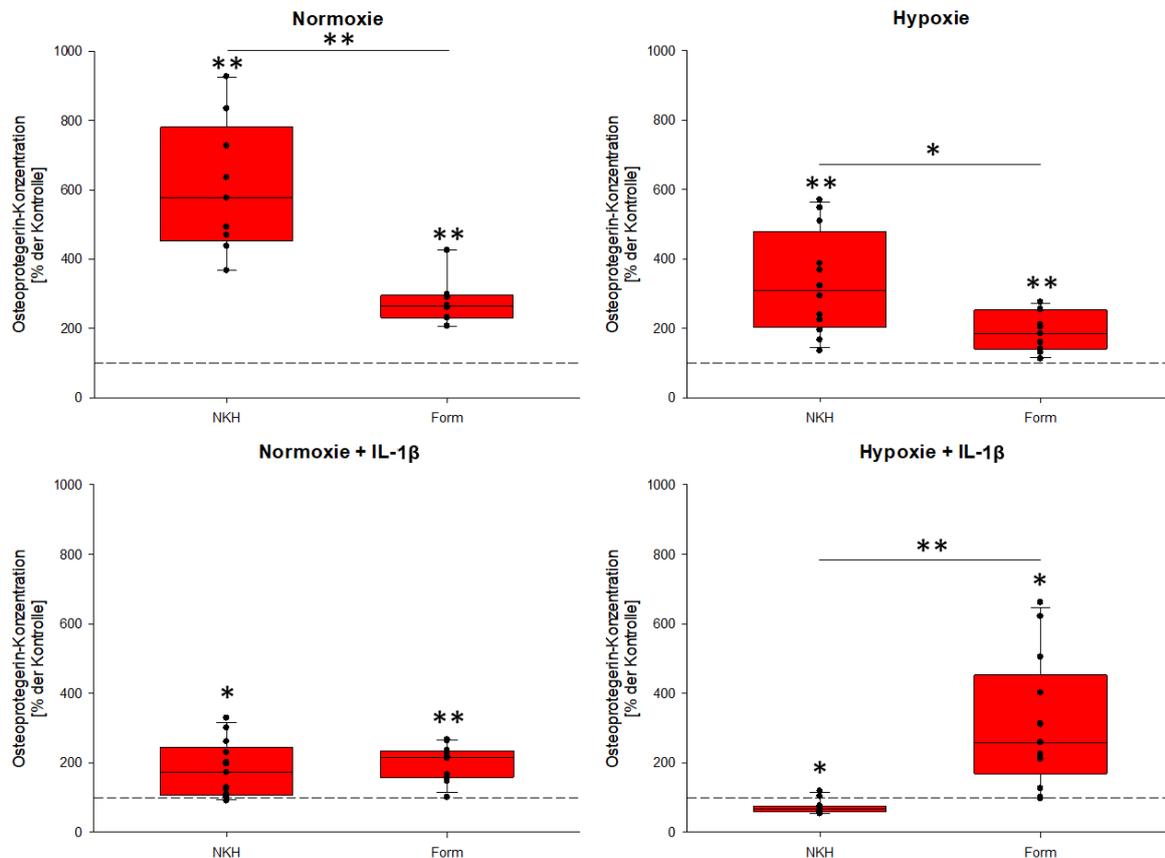


Abbildung 40: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und Formoterol bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(\text{RA})=8-13$.

Unter Normoxie und Hypoxie konnte jeweils eine hochsignifikante Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration durch den β -AR-Agonisten und den Aktivator der Adenylatzyklase beobachtet werden (Abbildung 40). Die Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration war durch Formoterol jedoch signifikant geringer als durch NKH 477 (265 % und 575 % bzw. 185 % und 310 %) (Abbildung 40). Unter Normoxie + IL-1 β dagegen war die Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration durch NKH 477 und Formoterol nicht signifikant unterschiedlich (175 % und 215 %) (Abbildung 40).

Unter Hypoxie + IL-1 β regulierten der Aktivator der Adenylatzyklase und der β -AR-Agonist das Osteoprotegerin in gegensätzliche Richtungen (Abbildung 40). Während NKH 477 bei RA-Patienten eine Hemmung auf etwa 70 % bewirke, steigerte Formoterol die Konzentration des Osteoprotegerins auf 260 % (Abbildung 40).

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass bei den RA-Patienten unter allen getesteten Bedingungen durch die Stimulation der Fibroblasten mit H89 eine verminderte Osteoprotegerin-Konzentration von 40 % bis 60 % detektiert werden konnte. Deshalb war davon auszugehen, dass die PKA an der Regulation des Osteoprotegerins beteiligt war (Abbildung 41).

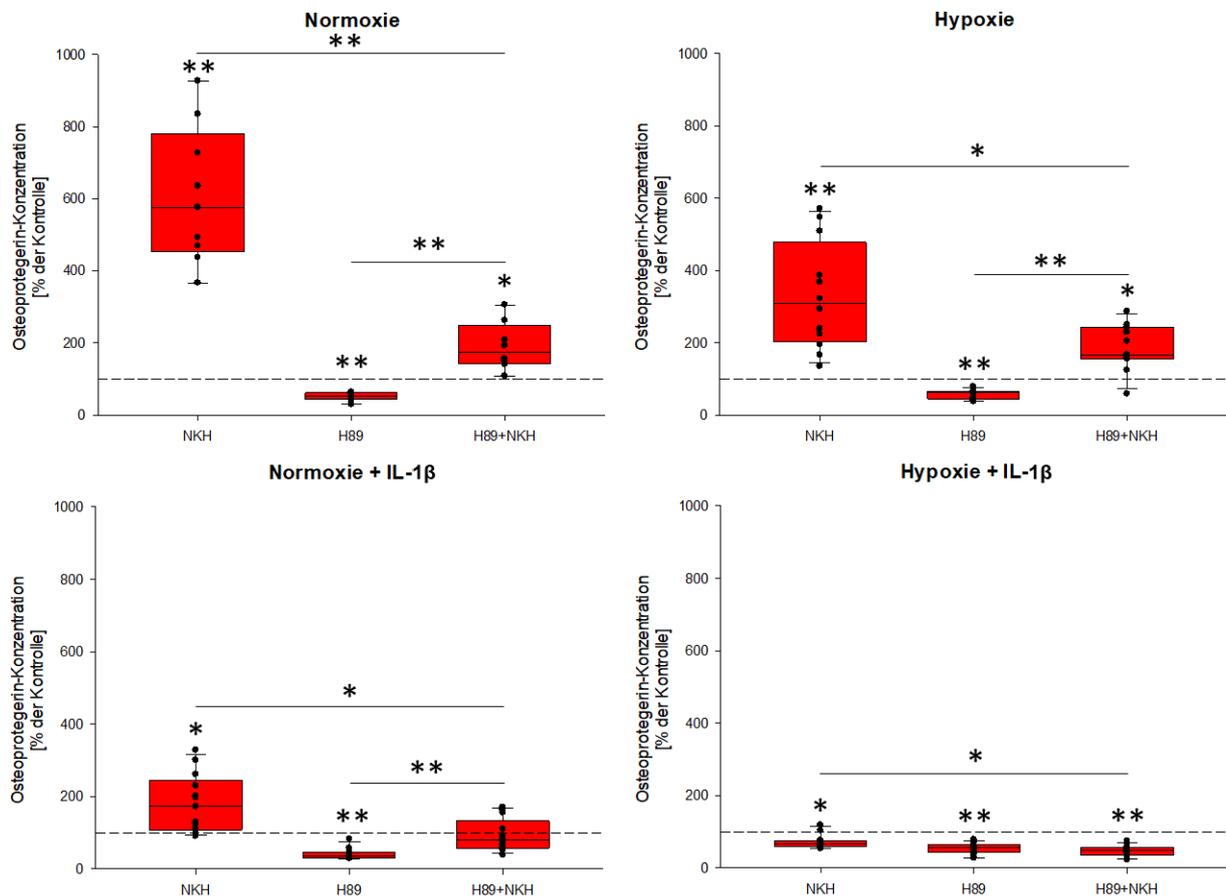


Abbildung 41: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und H89 sowie deren Kombination bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=8-13$.

Bei RA-Patienten wurde die cAMP-bedingte Steigerung des Osteoprotegerins durch die Aktivierung der Adenylatzyklase bei gleichzeitiger Hemmung der PKA unter Normoxie, Hypoxie und Normoxie + IL-1 β deutlich abgeschwächt (Abbildung 41). Unter allen Bedingungen kam es zu einem signifikanten Unterschied zwischen der alleinigen Stimulation der Adenylatzyklase und der Kombination mit dem PKA-Inhibitor (Abbildung 41). Das spricht dafür, dass die PKA unter diesen Bedingungen am steigernden Effekt der Adenylatzyklase auf die Osteoprotegerin-Konzentration beteiligt war.

Bei Kombination des Aktivators der Adenylatzyklase mit dem PKA-Inhibitor unter Hypoxie mit zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β wirkte der PKA-Inhibitor der

NKH 477-Wirkung nicht mehr entgegen, sondern verstärkte diese (Abbildung 41). Die Aktivierung der Adenylatzyklase verminderte die Konzentration des Osteoprotegerins auf etwa 70 %, die Hemmung der PKA auf etwa 60 % (Abbildung 41). Bei der Kombination der beiden Reagenzien wurde nur noch etwa 50 % der Osteoprotegerin-Konzentration der unstimulierten Kontrollen detektiert, was sich signifikant von der Stimulation der Adenylatzyklase allein unterschied (Abbildung 41).

Der Einfluss des durch den PKA-Inhibitor regulierten Signalweges auf die Wirkung der aktivierten Adenylatzyklase auf Osteoprotegerin variierte stark unter den verschiedenen Bedingungen (Abbildung 41). Während sich die Osteoprotegerin-Konzentration durch NKH 477 allein und in Kombination mit H89 unter Normoxie um 405 % unterschied, waren es unter Hypoxie + IL-1 β nur noch 20 % (Abbildung 41).

Beim Betrachten der RA-Patienten fiel außerdem auf, dass der durch den β -AR-Agonisten regulierte Signalweg in seiner Wirkung auf Osteoprotegerin nicht signifikant von dem des Gai-Inhibitors beeinflusst wurde (Abbildung 42).

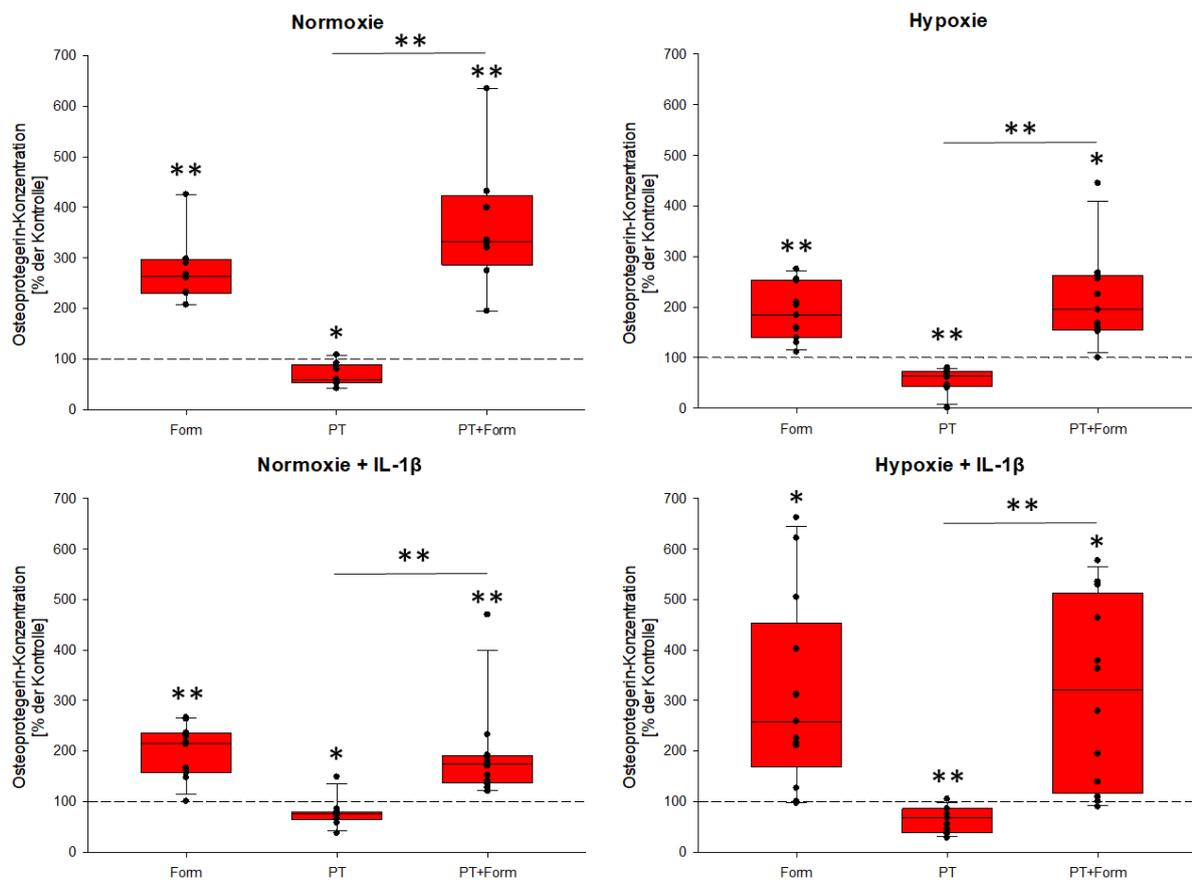


Abbildung 42: Regulation des Osteoprotegerins durch Formoterol und Pertussis-Toxin sowie deren Kombination bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA}) = 8-13$.

Formoterol bewirkte bei den RA-Patienten unter allen Bedingungen eine signifikante Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration (Abbildung 42). Der $G\alpha i$ -Inhibitor hemmte unter jeder der getesteten Bedingung die Osteoprotegerin-Konzentration (Abbildung 42). Bei Kombination der beiden Reagenzien konnten signifikante Unterschiede zu der Wirkung des Pertussis-Toxin allein festgestellt werden, nicht aber zu der Wirkung des Formoterol allein (Abbildung 42). Dies zeigte, dass der $G\alpha i$ -Pfad für die Regulation des Osteoprotegerins über den β -AR keine entscheidende Rolle spielte.

Wie auch für andere getestete Proteine gezeigt wurde, hatten die GRKs auch auf die Regulation des Osteoprotegerins einigen Einfluss (Abbildung 43).

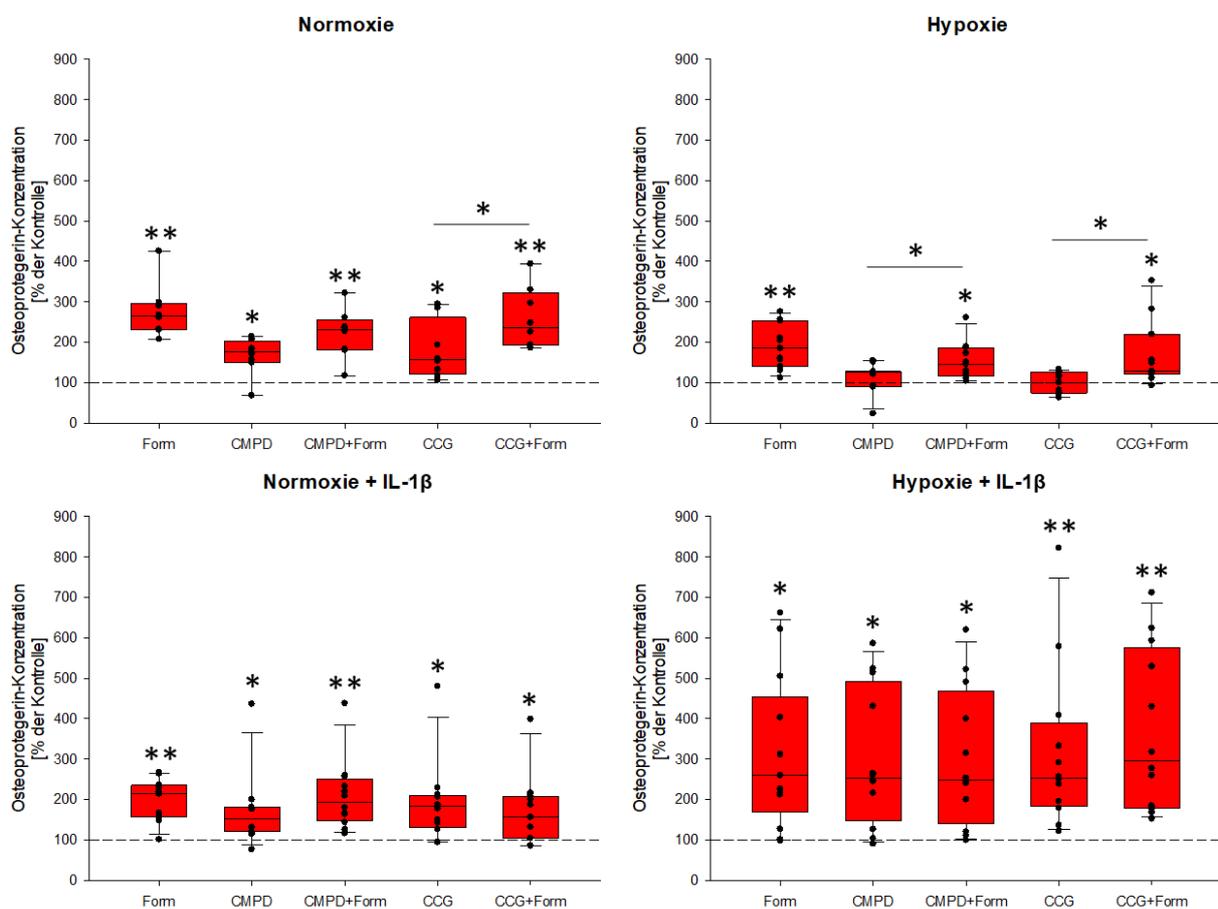


Abbildung 43: Regulation des Osteoprotegerins durch Formoterol, GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(RA)=8-13$.

Der GRK2/3-Inhibitor und der GRK2/5-Inhibitor allein steigerten die Osteoprotegerin-Konzentration nur unter Normoxie (175 % und 155 %), Normoxie + IL-1 β (155 % und 180 %) und Hypoxie + IL-1 β (250 % und 255 %) signifikant (Abbildung 43). Bei Sauerstoffmangel war durch die Hemmung der GRKs keine Stabilisierung der Rezeptorwirkung

möglich, dementsprechend auch keine gesteigerte Konzentration des Osteoprotegerins. Dies wurde durch Simulation einer gesteigerten Entzündung durch IL-1 β behoben und die Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration fiel unter Hypoxie + IL-1 β sogar stärker aus als unter Normoxie und Normoxie + IL-1 β (Abbildung 43).

Bei kombinierter Stimulation der Zellen mit dem β -AR-Agonisten und den GRK-Inhibitoren traten keine signifikanten Unterschiede zur alleinigen Stimulation der Zellen mit Formoterol auf (Abbildung 43). Die Wirkung des β -AR-Agonisten auf Osteoprotegerin war demnach unabhängig von den Signalwegen, die durch die GRK-Inhibitoren reguliert wurden.

Beim Vergleich der Regulation des Osteoprotegerins mit der Regulation der anderen Zytokine war auffällig, dass es das einzige Protein war, bei dem unter allen getesteten Bedingungen starke Regulationen durch die Stimulanzien und Inhibitoren auftraten. Die regulierenden Effekte der Reagenzien auf Osteoprotegerin wurden weder durch verminderten Sauerstoffgehalt noch durch zusätzliche Stimulation mit IL-1 β aufgehoben.

Gesunde

Bei den Gesunden betrug die Osteoprotegerin-Konzentration der unstimulierten Kontrollen unter Normoxie 5.297 pg/ml und unter Hypoxie, kaum erhöht, 5.426 pg/ml. Unter Normoxie + IL-1 β wurde 8.581 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 5.991 pg/ml Osteoprotegerin in den unstimulierten Kontrollen detektiert. Diese Daten sind in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt.

Von den getesteten Reagenzien bewirkten bei den Gesunden nur sehr wenige eine signifikante Regulation des Osteoprotegerins, unter Hypoxie + IL-1 β kein einziges (Abbildung 44). Während bei den RA-Patienten das Osteoprotegerin stark durch Gas- und Gai-Pfade reguliert wurde, galt dies nicht für die Gesunden (Abbildung 39, Abbildung 42 und Abbildung 44).

Bei denjenigen Reagenzien, die Osteoprotegerin bei Gesunden regulierten, war auffällig, dass sie alle eine hemmende Wirkung hatten, die zu einer verminderten Konzentration des Osteoprotegerins führten und damit den schützenden Effekt auf die Knochen reduzierten (Abbildung 44).

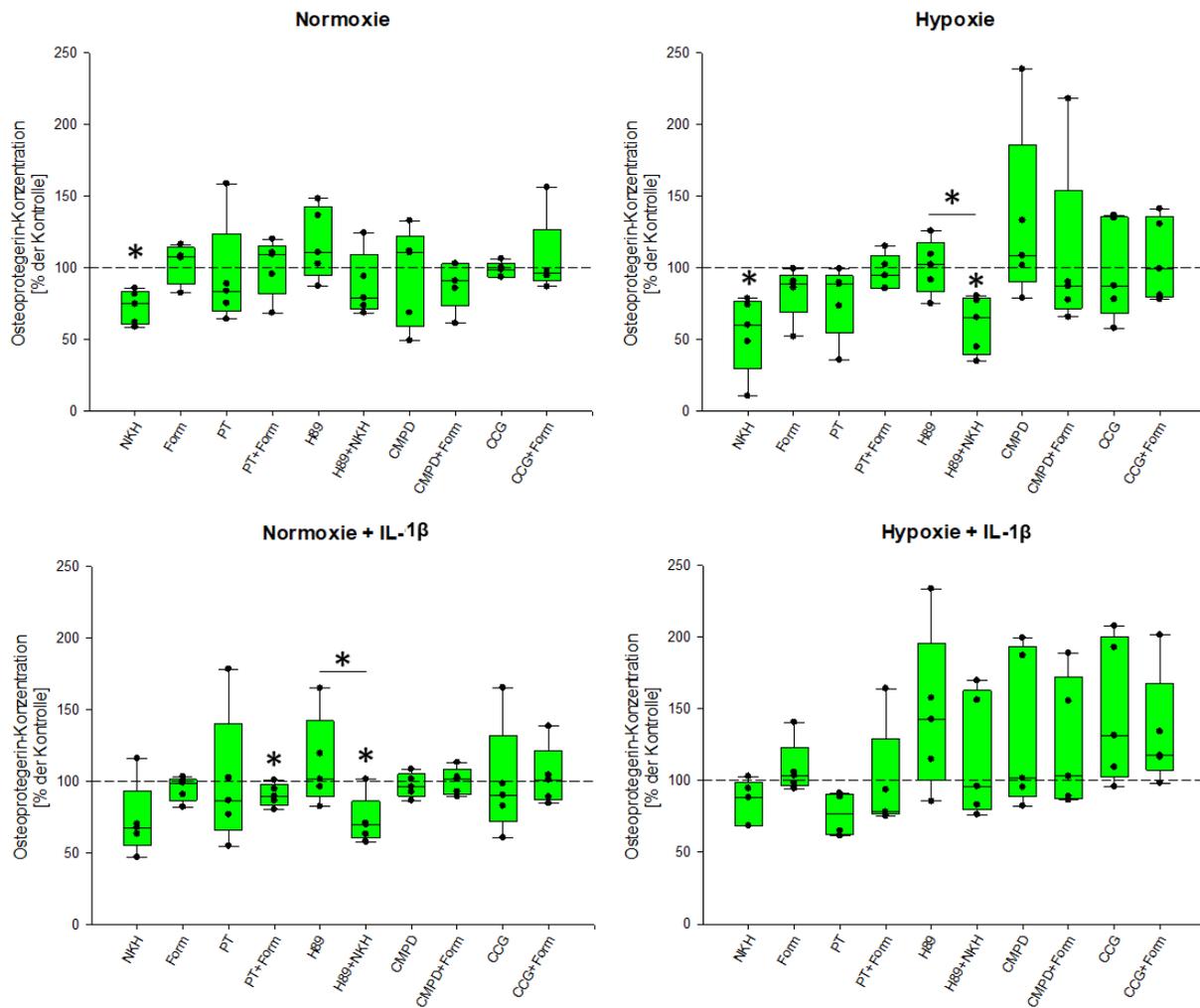


Abbildung 44: Abhängigkeit der Osteoprotegerin-Regulation bei Gesunden von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=4-5$.

Unter Normoxie war der Aktivator der Adenylatzyklase das einzige Reagenz, das eine signifikante Hemmung der Osteoprotegerin-Konzentration bewirkte (75 %) (Abbildung 44 und Abbildung 45). Auch unter Hypoxie hemmte er die Osteoprotegerin-Konzentration signifikant (60 %), während er durch Simulation einer Entzündung mit IL-1 β seine Wirkung auf Osteoprotegerin verlor (Abbildung 45).

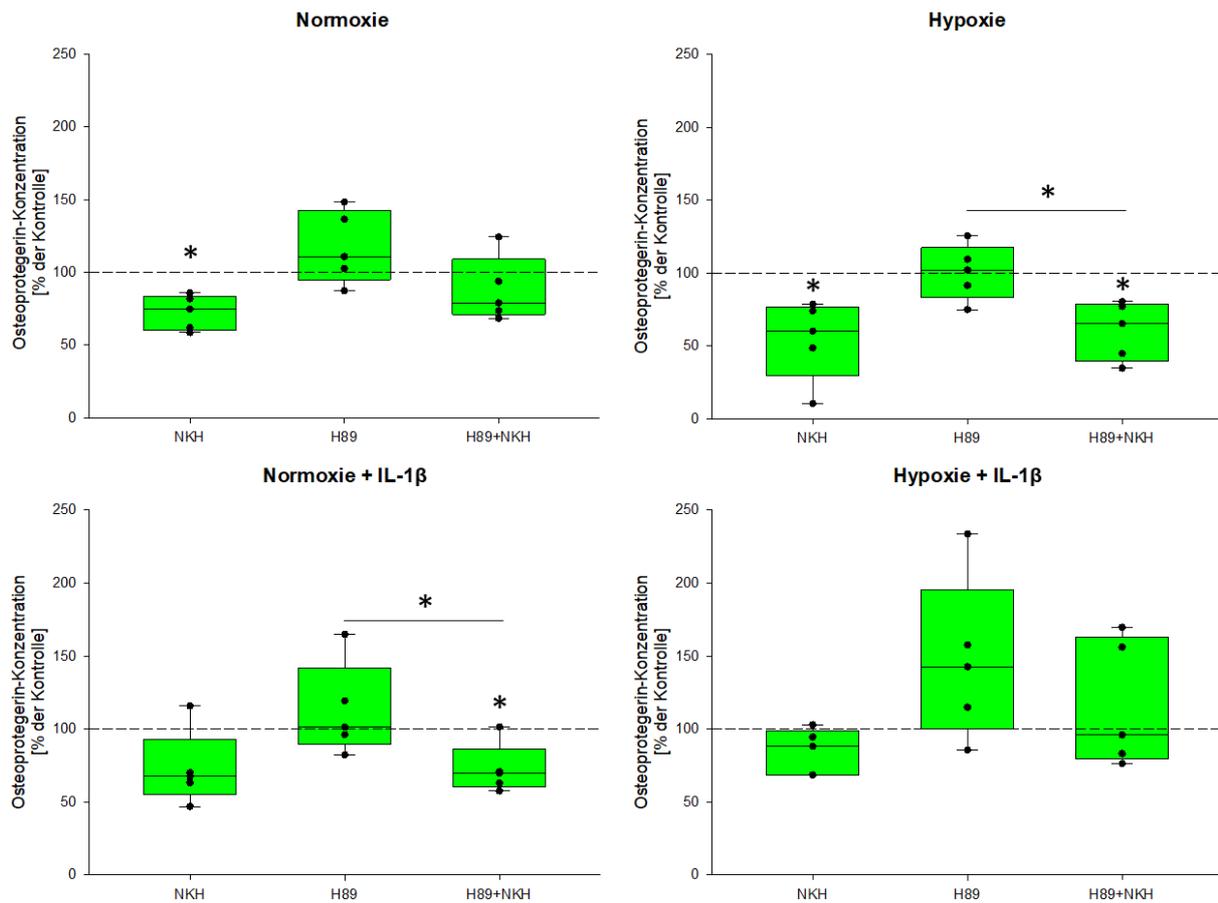


Abbildung 45: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und H89 sowie deren Kombination bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit NKH 477, H89 sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=5$.

Die Hemmung der PKA hatte allein keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation des Osteoprotegerins (Abbildung 45). Durch die Kombination des PKA-Inhibitors mit dem Aktivator der Adenylatzyklase konnten jedoch Regulationen detektiert werden, die sich von denen der Reagenzien einzeln unterschieden (Abbildung 45). Unter Normoxie wurde die hemmende Wirkung des NKH 477 durch Hemmung der PKA aufgehoben (Abbildung 45). Unter Hypoxie und Normoxie + IL-1 β dagegen konnte durch die Kombination der Reagenzien eine negative Regulation des Osteoprotegerins beobachtet werden, die sich signifikant von der Wirkung des H89 allein unterschied (65 % und 70 %) (Abbildung 45). Unter Hypoxie + IL-1 β verloren beide Reagenzien, allein und in Kombination, ihre Wirkung auf die Regulation des Osteoprotegerins (Abbildung 45).

Beim Vergleich der Wirkung des Aktivators der Adenylatzyklase und des β -AR-Agonisten wurde deutlich, dass sie unterschiedlichen Einfluss auf die Osteoprotegerin-Regulation bei Gesunden hatten (Abbildung 46).

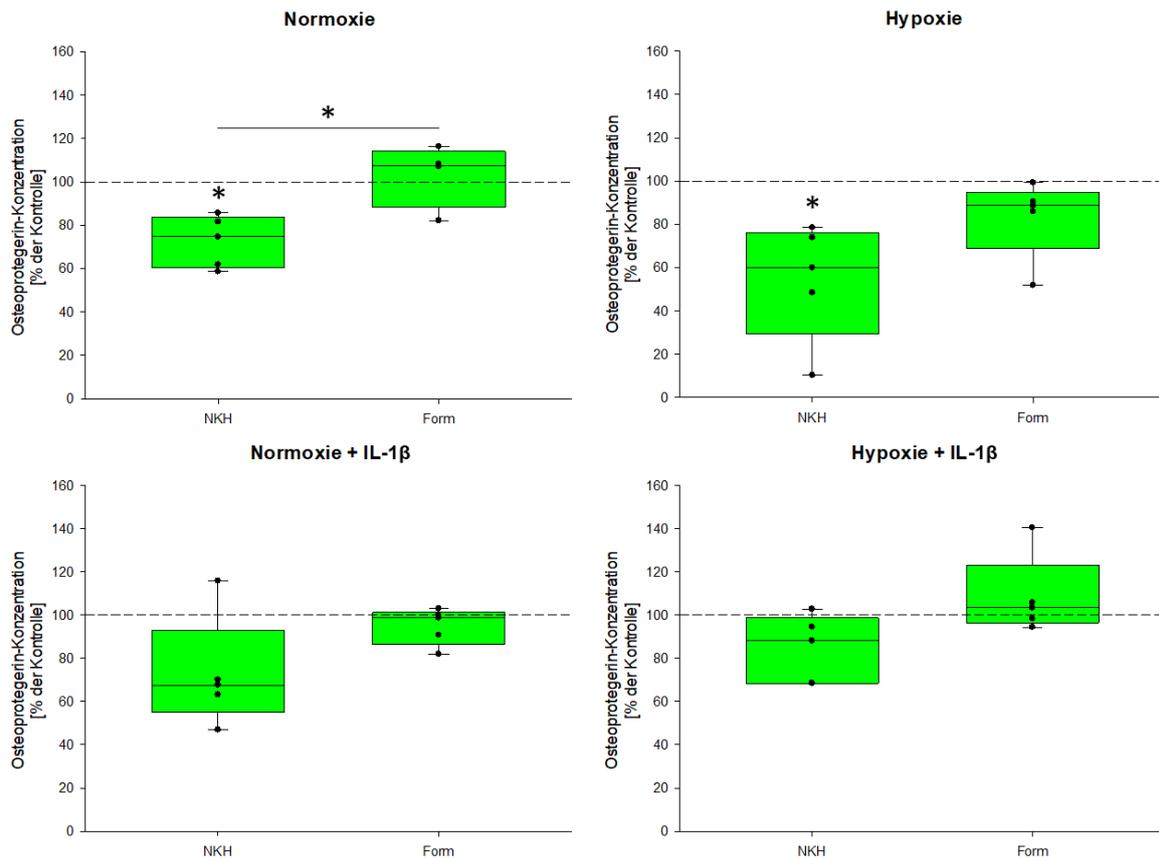


Abbildung 46: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und Formoterol bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100%), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist. $^* = p < 0,05$. $n(\text{FLN}) = 4-5$.

Während der Aktivator der Adenylatzyklase bei den Gesunden unter Normoxie und Hypoxie eine Hemmung der Osteoprotegerin-Konzentration bewirkte (75 % und 60 %), hatte der β -AR-Agonist unter keiner der getesteten Bedingungen signifikante Effekte auf die Regulation des Osteoprotegerins, konnte also keine cAMP-bedingte Hemmung des Osteoprotegerins bewirken (Abbildung 46). Dennoch war die Regulation des Osteoprotegerins durch den Aktivator der Adenylatzyklase und den β -AR-Agonisten nur unter Normoxie signifikant unterschiedlich (Abbildung 46).

Der β -AR-Agonist bewirkte nur unter Normoxie + IL-1 β kombiniert mit dem Gai-Inhibitor eine signifikante Regulation des Osteoprotegerins (Abbildung 47). Die beiden Reagenzien hatten einzeln jeweils unter keiner der untersuchten Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Osteoprotegerin-Regulation (Abbildung 44). Auch in Kombination regulierten sie Osteoprotegerin unter keiner anderen Bedingung als unter Normoxie + IL-1 β , bei der eine Hemmung der Osteoprotegerin-Konzentration auf 90 % der unstimulierten Kontrolle detektiert werden konnte (Abbildung 44 und Abbildung 47).

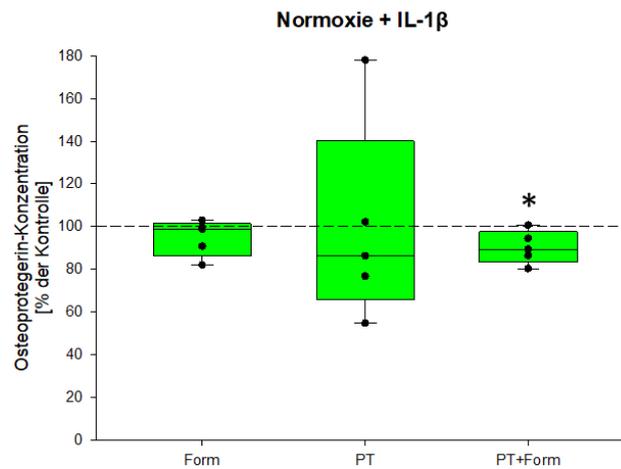


Abbildung 47: Regulation des Osteoprotegerins durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei Gesunden unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, Pertussis-Toxin sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN})=5$.

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Beim Vergleich der Regulation des Osteoprotegerins bei den RA-Patienten und den Gesunden konnten viele signifikante Unterschiede unter allen Bedingungen detektiert werden, mehr als bei den anderen untersuchten Proteinen.

Unter Normoxie waren alle Regulationen des Osteoprotegerins bei den RA-Patienten und den Gesunden signifikant unterschiedlich, außer bei der alleinigen Hemmung des Gai durch Pertussis-Toxin (Abbildung 48). Der Gai-Inhibitor war das einzige Reagenz, das unter keiner der getesteten Bedingungen eine signifikant unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei den RA-Patienten und den Gesunden bewirkte.

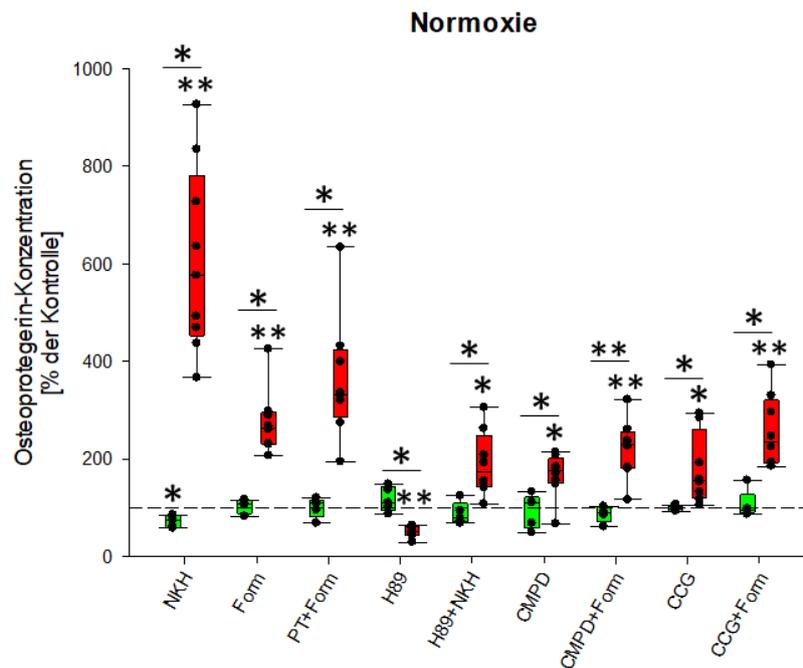


Abbildung 48: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=4-5$, $n(\text{RA})=8-9$.

Am stärksten war der Unterschied in der Regulation des Osteoprotegerins zwischen den RA-Patienten und den Gesunden unter Normoxie durch den Aktivator der Adenylatzyklase (Abbildung 48). Während NKH 477 die Konzentration des Osteoprotegerins bei den Gesunden auf 75 % hemmte, steigerte es die Konzentration bei den RA-Patienten auf 575 % (Abbildung 48).

Unter Hypoxie wurde das Osteoprotegerin signifikant unterschiedlich bei den RA-Patienten und den Gesunden durch den Aktivator der Adenylatzyklase, den β -AR-Agonisten, den Gai-Inhibitor kombiniert mit Formoterol und den PKA-Inhibitor allein und zusammen mit NKH 477 reguliert (Abbildung 49).

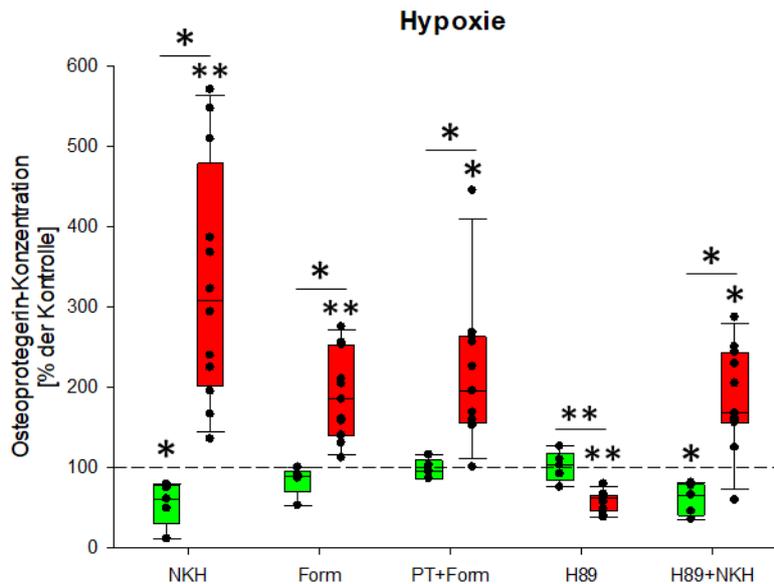


Abbildung 49: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=11-12$.

Wie zuvor unter Normoxie bewirkte auch unter Hypoxie der Aktivator der Adenylatzyklase den größten Unterschied in der Regulation des Osteoprotegerins bei RA-Patienten und Gesunden (Abbildung 49). Auch unter dieser Bedingung wurde die Konzentration des Osteoprotegerins durch NKH 477 bei den Gesunden gehemmt (60 %) und bei den RA-Patienten gesteigert (310 %) (Abbildung 49).

Unter Normoxie + IL-1 β wurde Osteoprotegerin durch alle getesteten Reagenzien signifikant unterschiedlich bei den RA-Patienten und den Gesunden reguliert, außer durch den G α i-Inhibitor, den PKA-Inhibitor zusammen mit dem Aktivator der Adenylatzyklase und der Kombination des GRK2/5-Inhibitor mit dem β -AR-Agonisten (Abbildung 50).

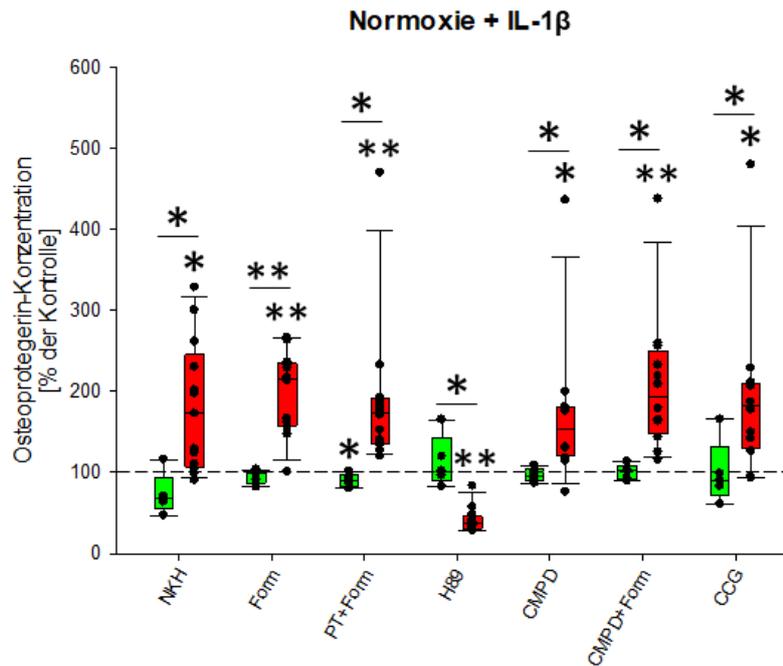


Abbildung 50: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= p <0,05, **= p <0,001. n (FLN)=5, n (RA)=12-13.

Hochsignifikant unterschiedlich war beispielsweise die Regulation des Osteoprotegerins unter Normoxie + IL-1 β durch den β -AR-Agonisten (Abbildung 50). Während bei den Gesunden keine signifikante Regulation detektiert werden konnte bewirkte er bei den RA-Patienten eine gesteigerte Konzentration des Osteoprotegerins auf 215 % (Abbildung 50).

Auch unter Hypoxie + IL-1 β wurde Osteoprotegerin durch die meisten getesteten Reagenzien bei den RA-Patienten signifikant unterschiedlich zu den Gesunden reguliert (Abbildung 51). Neben dem β -AR-Agonisten allein und in Kombination mit dem G α i-Inhibitor bewirkten außerdem der PKA-Inhibitor allein und kombiniert mit dem Aktivator der Adenylatzyklase sowie der GRK2/3-Inhibitor in Kombination mit dem β -AR-Agonisten und der GRK2/5-Inhibitor allein und zusammen mit Formoterol eine signifikant unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerin bei den RA-Patienten und den Gesunden (Abbildung 51).

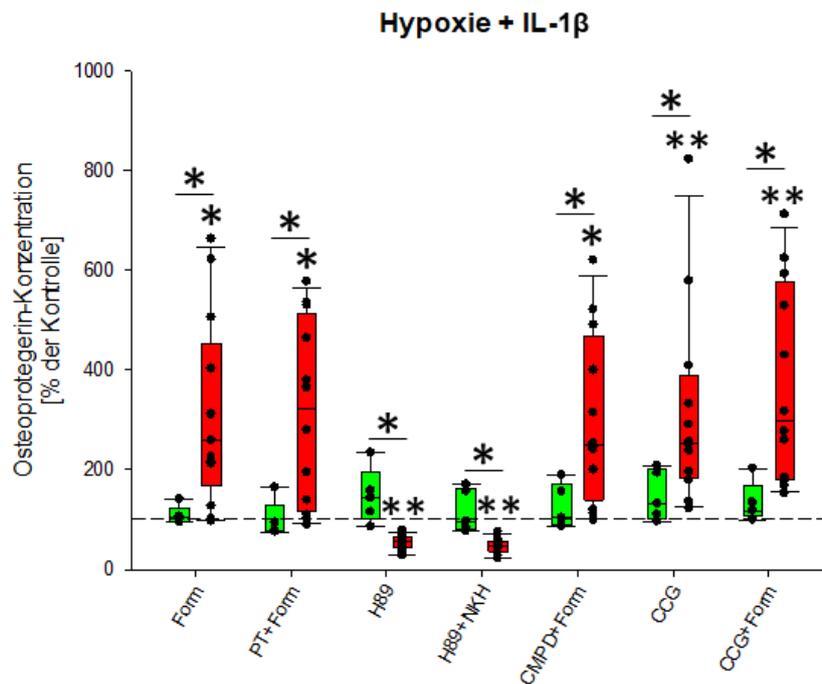


Abbildung 51: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=12-13$.

Unter Hypoxie + IL-1 β unterschied sich die Regulation des Osteoprotegerins zwischen den RA-Patienten und den Gesunden am stärksten durch kombinierte Stimulation der Fibroblasten mit dem G α i-Inhibitor und dem β -AR-Agonisten (Abbildung 51). Während die beiden Reagenzien bei den Gesunden eine verminderte Konzentration des Osteoprotegerins von 80 % bewirkten, steigerten sie die Osteoprotegerin-Konzentration bei den RA-Patienten auf 320 % (Abbildung 51).

Obwohl bei den Gesunden kaum signifikante Regulationen des Osteoprotegerins durch die Behandlung der Zellen mit den getesteten Reagenzien auftraten, waren diese meist gegensätzlich zu den Regulationen, die durch dieselben Reagenzien bei den RA-Patienten auftraten (Abbildung 52).

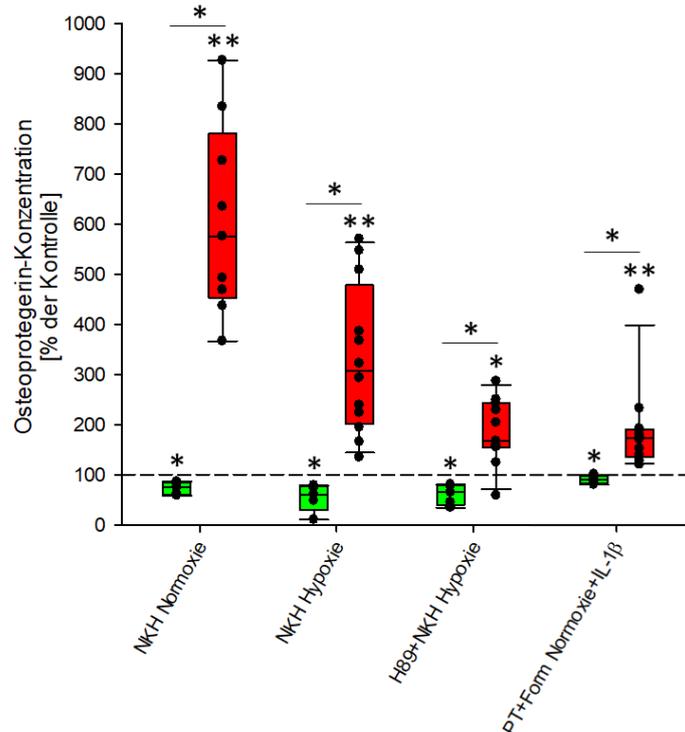


Abbildung 52: Gegensätzliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit NKH 477, H89, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$, §= $p < 0,1$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=9-13$.

Eine gegensätzliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten war beispielsweise durch die Stimulation der Adenylatzyklase detektierbar (Abbildung 52). Unter Normoxie bewirkte NKH 477 bei den RA-Patienten eine Steigerung der Osteoprotegerin-Konzentration auf etwa 575 % und hemmte sie bei den Gesunden auf ca. 75 % (Abbildung 52). Ähnliches konnte auch unter Hypoxie bei alleiniger Stimulation der Adenylatzyklase beobachtet werden (310 % bzw. 65 %) oder bei Kombination mit dem PKA-Inhibitor (170 % bzw. 70 %) (Abbildung 52).

3.6.3 Die Regulation des PAI-1 in Fibroblasten

PAI-1 ist von entscheidender Bedeutung bei der Regulation des fibrinolytischen Systems, indem es die biologische Aktivität des Urokinase-Plasminogenaktivators und des Gewebeplasminogenaktivators kontrolliert und dadurch die Umwandlung des Plasminogen zu Plasmin hemmt (121–124). Obwohl die Hauptaufgabe des PAI-1 in der Inhibition der Fibrinolyse liegt ist es auch an einer Vielzahl anderer Prozesse beteiligt. Unter anderem ist PAI-1 mit rheumatoider Arthritis, Atherosklerose und Tumorigenese assoziiert (122–127).

Die Expression des PAI-1 ist im Gewebe der RA-Patienten erhöht und wird unter anderem durch lokale proinflammatorische Zytokine beeinflusst (126,127). Ein erhöhter PAI-1-Spiegel ist mit der Krankheitsaktivität, einer verminderten Fibrinolyse und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (125,126,128). Neben vielen anderen Zellen sind auch synoviale Fibroblasten der RA-Patienten in der Lage große Mengen des PAI-1 zu produzieren (122).

RA-Patienten

Bei der Messung des PAI-1 entsprachen die unstimulierten Kontrollen der RA-Patienten unter Normoxie einer Konzentration von 1.275 pg/ml, unter Hypoxie von 5.002 pg/ml. Unter Normoxie + IL-1 β betrug die PAI-1-Konzentration 2.992 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 5.073 pg/ml. Diese Daten sind in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt.

Bei der PAI-1-Regulation der RA-Patienten war besonders auffällig, dass unter Normoxie + IL-1 β jedes getestete Reagenz eine signifikante Regulation bewirkte (Abbildung 53).

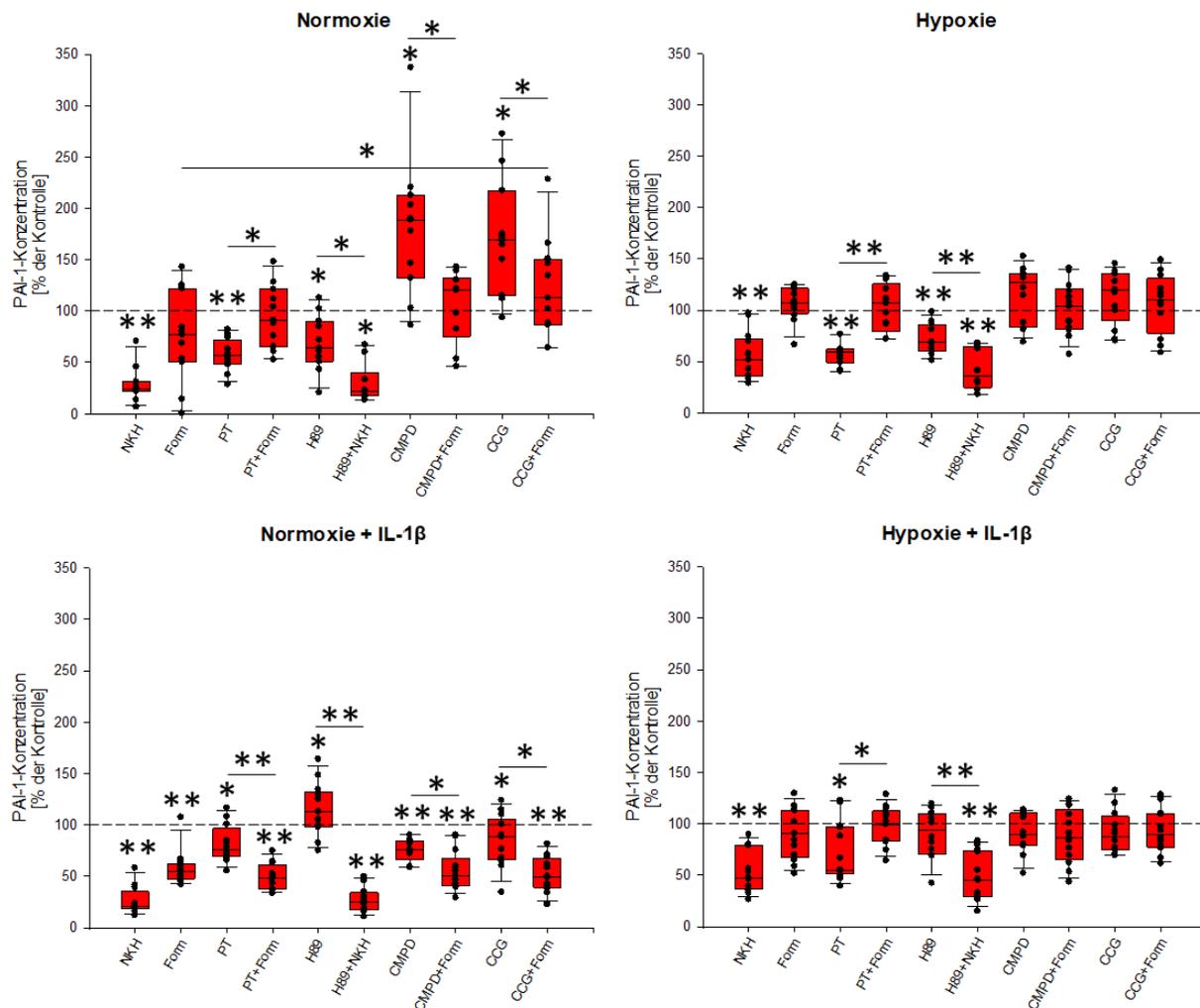


Abbildung 53: Regulation des PAI-1 bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=10-13$.

Die durch alle getesteten Stimulanzen signifikante Regulation des PAI-1 bei RA-Patienten war allerdings nur unter Normoxie + IL-1 β nachweisbar. Während ohne IL-1 β deutlich weniger Reagenzien signifikante Effekte hervorriefen, fiel der Effekt der Stimulanzen und Inhibitoren unter Hypoxie und Hypoxie + IL-1 β noch geringer aus, bzw. war in den meisten Fällen nicht mehr signifikant (Abbildung 53). Der verminderte Sauerstoffgehalt hemmte die Regulationsmöglichkeiten des PAI-1 über die untersuchten Pfade.

Beim Betrachten der Regulation des PAI-1 fiel außerdem auf, dass der PKA-Inhibitor eine wichtige Rolle spielte, die stark von der Bedingung abhing, unter der die Zellen stimuliert wurden (Abbildung 54).

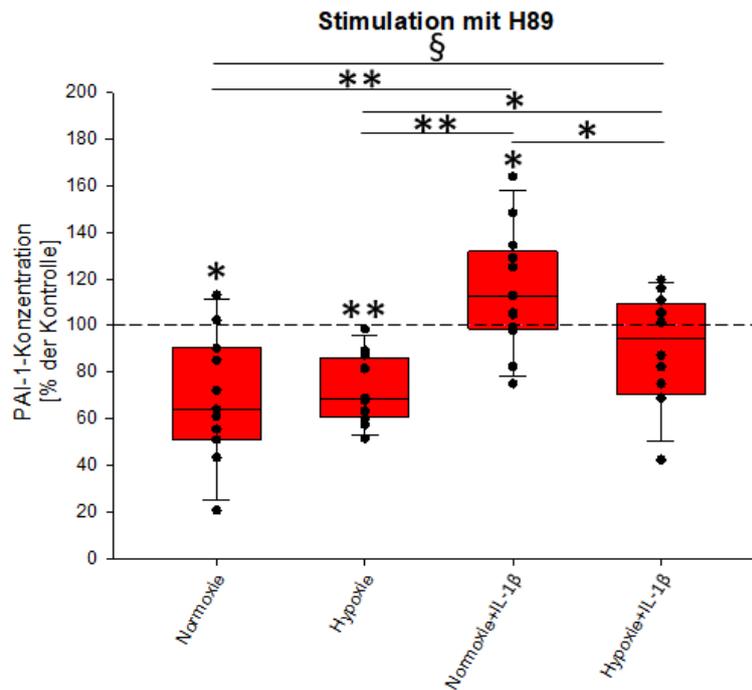


Abbildung 54: Regulation des PAI-1 durch H89 bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Inhibition der Fibroblasten mit H89, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$, §= $p < 0,1$. $n(\text{RA})=11-13$.

Ohne die Zugabe von IL-1 β bewirkte der PKA-Inhibitor eine signifikante bzw. hochsignifikante Reduzierung der PAI-1-Konzentration unter Normoxie auf etwa 65 % und unter Hypoxie auf etwa 70 % (Abbildung 54). Unter Hypoxie + IL-1 β verlor H89 seine Wirkung auf PAI-1 und es konnte keine signifikante Regulation mehr detektiert werden (Abbildung 54). Besonders auffällig war jedoch, dass unter Normoxie + IL-1 β eine gegensätzliche Regulation auftrat als unter den Bedingungen ohne IL-1 β , die zu jeder anderen getesteten Bedingung signifikant unterschiedlich war (Abbildung 54). In diesem Fall wurde die Konzentration des PAI-1 nicht gehemmt, sondern gesteigert (etwa 115 %) (Abbildung 54).

Beim Vergleich der Regulation des PAI-1 durch Behandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor allein und dessen Kombination mit dem Aktivator der Adenylatzyklase war auffällig, dass es unter allen getesteten Bedingungen zu signifikanten Unterschieden kam (Abbildung 55).

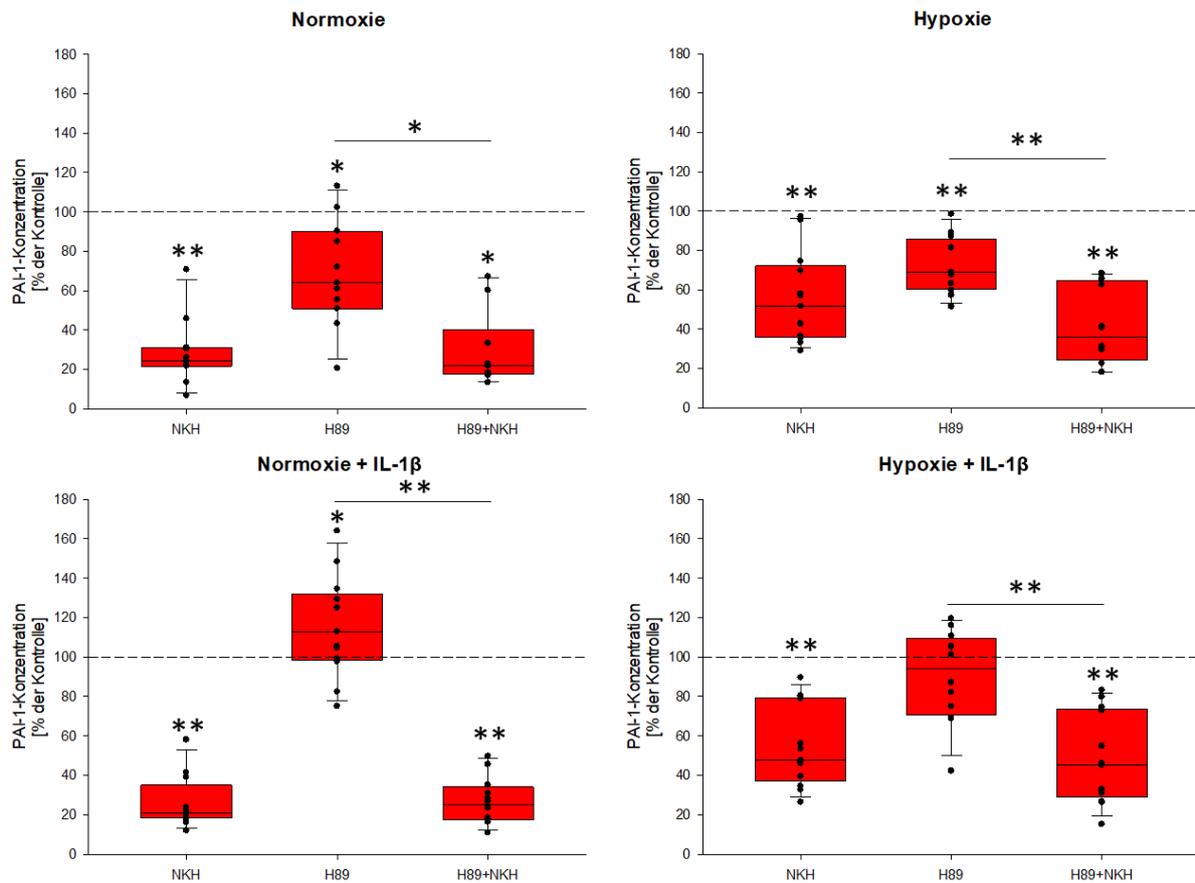


Abbildung 55: Regulation des PAI-1 durch NKH 477, H89 und deren Kombination bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit NKH 477, H89, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=10-13$.

Vergleicht man jedoch NKH 477 allein und dessen Kombination mit H89, so unterschied sich die Regulation in keinem der getesteten Fälle (Abbildung 55). Der durch H89 regulierte Signalweg beeinflusste die Wirkung des NKH 477 auf PAI-1 demnach nicht. Dass der Adenylatzyklase-Aktivator unter allen Bedingungen, allein sowie in Kombination mit dem PKA-Inhibitor, eine signifikante Hemmung des PAI-1 bewirkte, zeigte den starken Einfluss der Adenylatzyklase auf die Regulation des PAI-1 bei RA-Patienten (Abbildung 55).

Außerdem hemmte der G α i-Inhibitor die PAI-1-Konzentration bei den RA-Patienten unter allen Bedingungen signifikant (Abbildung 56). Ein funktionierendes G α i spielte demnach ebenfalls eine große Rolle bei der steigenden Regulation des PAI-1.

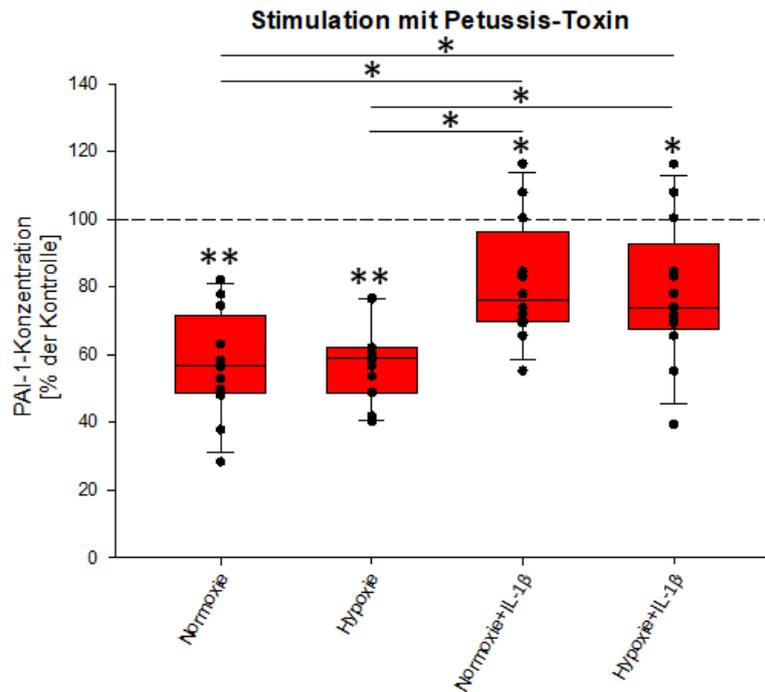


Abbildung 56: Regulation des PAI-1 durch Pertussis-Toxin bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Inhibition der Fibroblasten mit Pertussis-Toxin, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. PT: G α i-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=11-13$.

Obwohl unter allen Bedingungen eine signifikante Verminderung der Konzentration des PAI-1 durch die Inhibition des G α i induziert wurde, bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Regulation mit und ohne Zugabe von IL-1 β (Abbildung 56). Während die Konzentration des PAI-1 unter Normoxie und Hypoxie ohne IL-1 β durch den G α i-Inhibitor jeweils auf knapp 60 % vermindert wurde, reduzierte sich die Konzentration bei Zugabe von IL-1 β unter beiden Bedingungen jeweils nur auf etwa 75 % des Wertes der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 56). Die Simulation einer gesteigerten Entzündung durch IL-1 β verminderte den Einfluss des Pertussis-Toxins auf die Regulation des PAI-1 stark (Abbildung 56).

Beim detaillierten Betrachten der Regulation des PAI-1 durch die GRK-Inhibitoren bei den RA-Patienten konnte erneut eine starke Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Luft und der zusätzlichen Stimulation mit IL-1 β beobachtet werden (Abbildung 57). Unter Normoxie und unter Normoxie + IL-1 β konnte eine signifikante Regulation des PAI-1 durch die GRK-Inhibitoren detektiert werden. Während beide GRK-Inhibitoren unter Normoxie eine Steigerung der PAI-1-Konzentration bewirkten (190 % bzw. 170 %), verhielt es sich bei zusätzlicher Stimulation mit IL-1 β gegensätzlich (Abbildung 57). Bei Simulation der gesteigerten Entzündung durch IL-1 β unter Normoxie bewirkte die Stimulation der Fibroblasten mit CMPD eine verminderte Konzentration des PAI-1 von etwa 75 %, CCG bewirkte eine verminderte Konzentration von knapp 90 % (Abbildung 57). Eine ebenfalls

gegensätzliche Regulation unter Normoxie und Normoxie + IL-1 β konnte zuvor bereits in Abbildung 54 durch die Stimulation der Fibroblasten mit dem PKA-Inhibitor beobachtet werden.

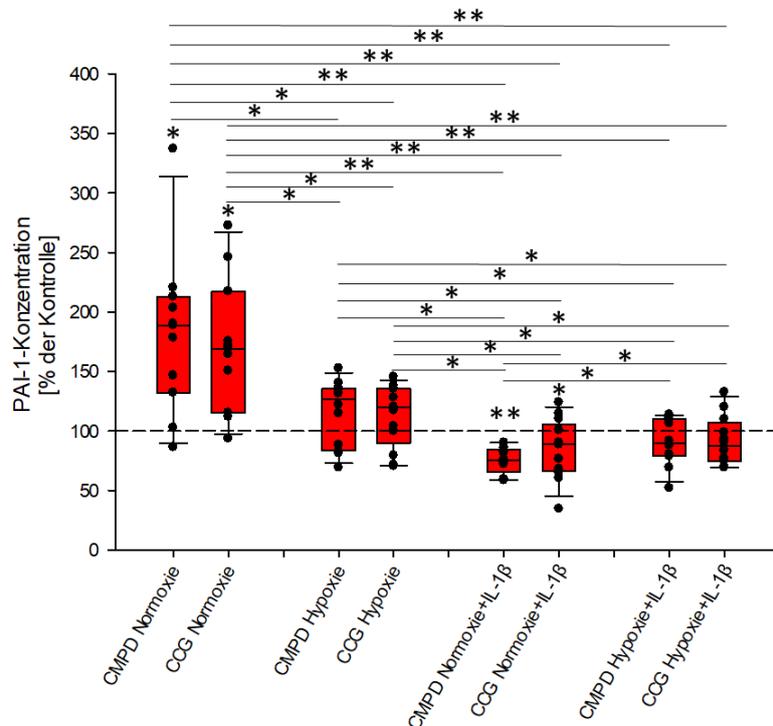


Abbildung 57: Regulation des PAI-1 durch GRK-Inhibitoren bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Inhibition der Fibroblasten mit GRK-Inhibitoren, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(RA) = 11-13$.

Bei Sauerstoffmangel wurde die Wirkung der GRK-Inhibitoren aufgehoben (Abbildung 57). Unter Hypoxie, mit und ohne IL-1 β , ließ sich keine signifikante Regulation des PAI-1 durch CMPD oder CCG nachweisen (Abbildung 57).

Unter Normoxie konnte außerdem eine Abhängigkeit der Wirkungen der durch den β -AR-Agonisten und den GRK2/5-Inhibitor regulierten Signalwege voneinander festgestellt werden (Abbildung 58). Während CCG unter Normoxie eine Steigerung der PAI-1-Konzentration bewirkte (170 %), kam es weder durch Formoterol noch deren Kombination zu einer signifikanten Regulation des PAI-1 (Abbildung 58). Dennoch unterschied sich die Regulation des PAI-1 nach Stimulation der Fibroblasten mit dem β -AR-Agonisten und dem GRK2/5-Inhibitor zusammen signifikant von der Regulation der jeweiligen Reagenzien allein (Abbildung 58).

Der GRK2/3-Inhibitor bewirkte bei den RA-Patienten unter Normoxie zwar ebenfalls, wie auch der GRK2/5-Inhibitor, eine gesteigerte Konzentration des PAI-1 (190 %), der durch ihn regulierte Signalweg beeinflusste die Wirkung des β -AR-Agonisten auf PAI-1 jedoch nicht

(Abbildung 58). Formoterol allein und zusammen mit CMPD regulierte die Konzentration des PAI-1 nicht signifikant und es konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung des β -AR-Agonisten allein und in Kombination mit dem GRK2/5-Inhibitor detektiert werden (Abbildung 58).

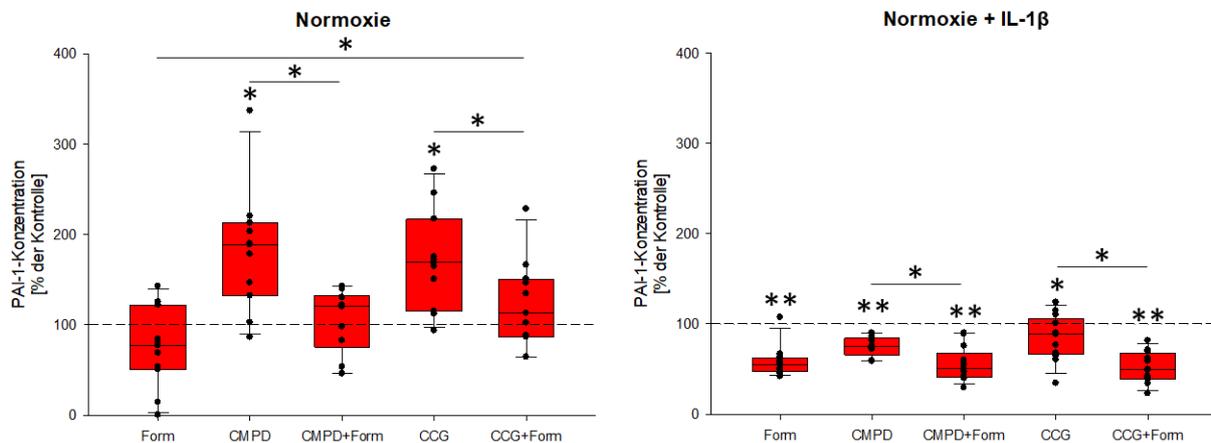


Abbildung 58: Regulation des PAI-1 durch GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination mit Formoterol bei RA-Patienten unter Normoxie und Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA}) = 10-13$.

Unter Normoxie + IL-1 β konnte bei den RA-Patienten beobachtet werden, dass die Wirkung des Formoterol von beiden Signalwegen, die durch die GRK-Inhibitoren reguliert wurden, unabhängig war (Abbildung 58). Die GRK-Inhibitoren hemmten die Konzentration des PAI-1 unter Normoxie + IL-1 β signifikant (CMPD etwa auf 75 %, CCG etwa auf knappe 90 %) (Abbildung 58). Der β -AR-Agonist senkte die Konzentration des PAI-1 auf etwa 55 %. Eine fast identische Hemmung konnte auch bei Kombination des Formoterol mit CMPD bzw. CCG beobachtet werden (jeweils ca. 50 %), weshalb ausgeschlossen werden konnte, dass die durch die GRK-Inhibitoren regulierten Signalwege Einfluss auf die Wirkung des Formoterol auf PAI-1 hatten (Abbildung 58).

Bei vermindertem Sauerstoffgehalt mit und ohne IL-1 β wurde die Regulation des PAI-1 sowohl durch den β -AR-Agonisten als auch die GRK-Inhibitoren und deren Kombination abgeschaltet, sodass keine signifikanten Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle oder Abhängigkeiten der von den Reagenzien regulierten Signalwege voneinander detektiert werden konnten (Abbildung 53).

Gesunde

Bei den Gesunden entsprachen die unstimulierten Kontrollen unter Normoxie einer PAI-1-Konzentration von 5.194 pg/ml, unter Hypoxie 5.270 pg/ml, unter Normoxie + IL-1 β 10.988 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 10.626 pg/ml. Diese Daten sind in den Abbildungen nicht dargestellt.

Eine wichtige Beobachtung bei den Gesunden war, dass IL-1 β die Regulation des PAI-1 durch die getesteten Stimulanzien stark einschränkte (Abbildung 59).

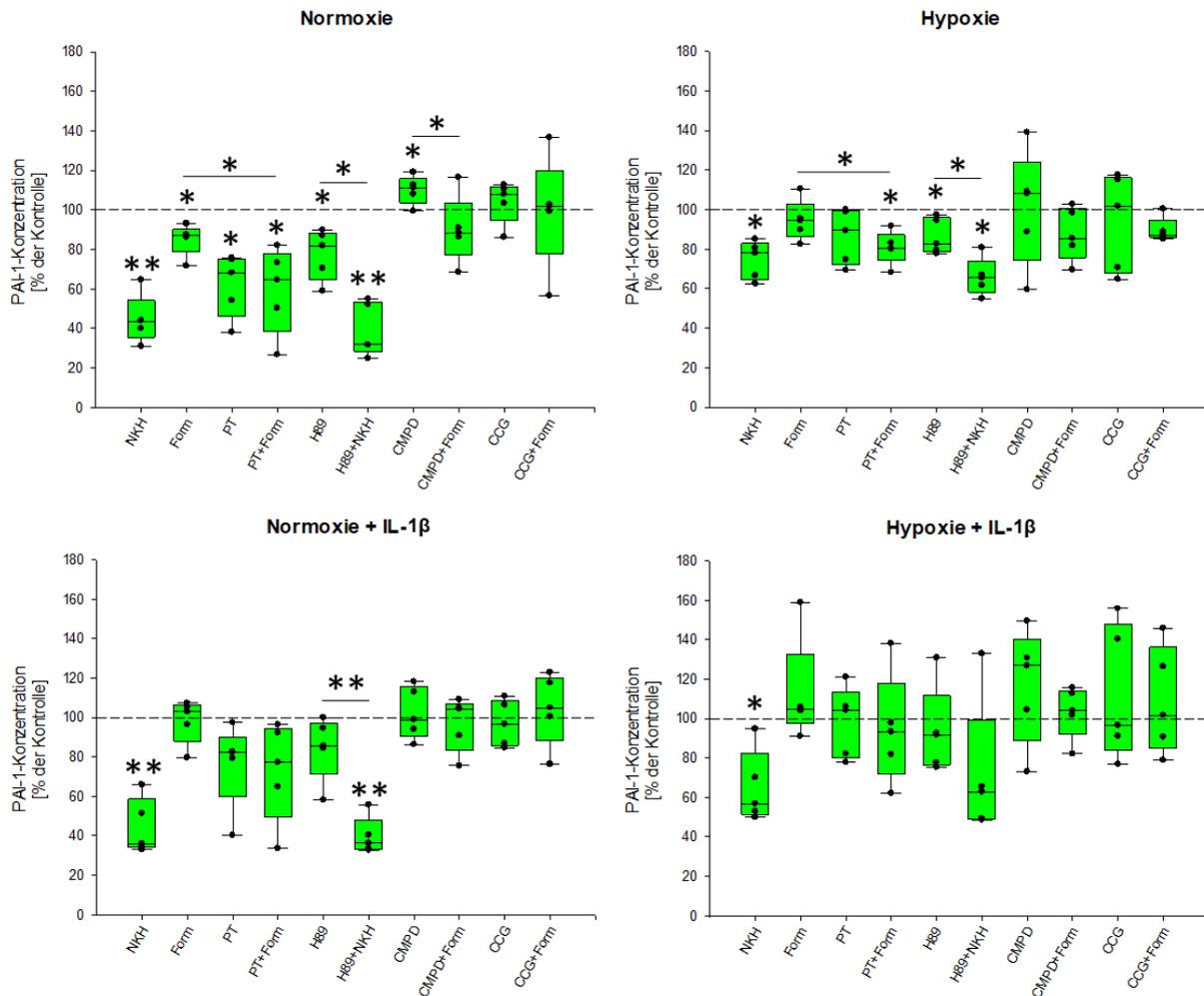


Abbildung 59: Regulation des PAI-1 bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$.

Unter Normoxie + IL-1 β bewirkte lediglich der Adenylatzyklase-Aktivator NKH 477 und dessen Kombination mit H89 eine signifikant verminderte Konzentration des PAI-1 (jeweils 35 %) (Abbildung 59). Unter Hypoxie + IL-1 β war NKH 477 die einzige Stimulanz, die eine signifikante Regulation des PAI-1 bewirkte (55 %) (Abbildung 59).

Da der Aktivator der Adenylatzyklase als einziges Reagenz unter allen Bedingungen eine signifikante Regulation des PAI-1 bewirkte, stellte er, wie zuvor auch bei den RA-Patienten beobachtet (Abbildung 53), einen wichtigen Regulator des PAI-1 dar (Abbildung 59).

Unter keiner der untersuchten Bedingungen trat eine signifikant unterschiedliche Regulation des PAI-1 durch NKH 477 allein oder in Kombination mit H89 auf, weshalb davon auszugehen war, dass die hemmende Wirkung der aktivierten Adenylatzyklase auf die PAI-1-Konzentration unabhängig von der Aktivität der PKA war (Abbildung 60). Dass die Wirkung der aktivierten Adenylatzyklase auf PAI-1 nicht von dem Signalweg beeinflusst wurde, der durch den PKA-Inhibitor reguliert wurde, konnte zuvor ebenfalls bei den RA-Patienten beobachtet werden (Abbildung 55).

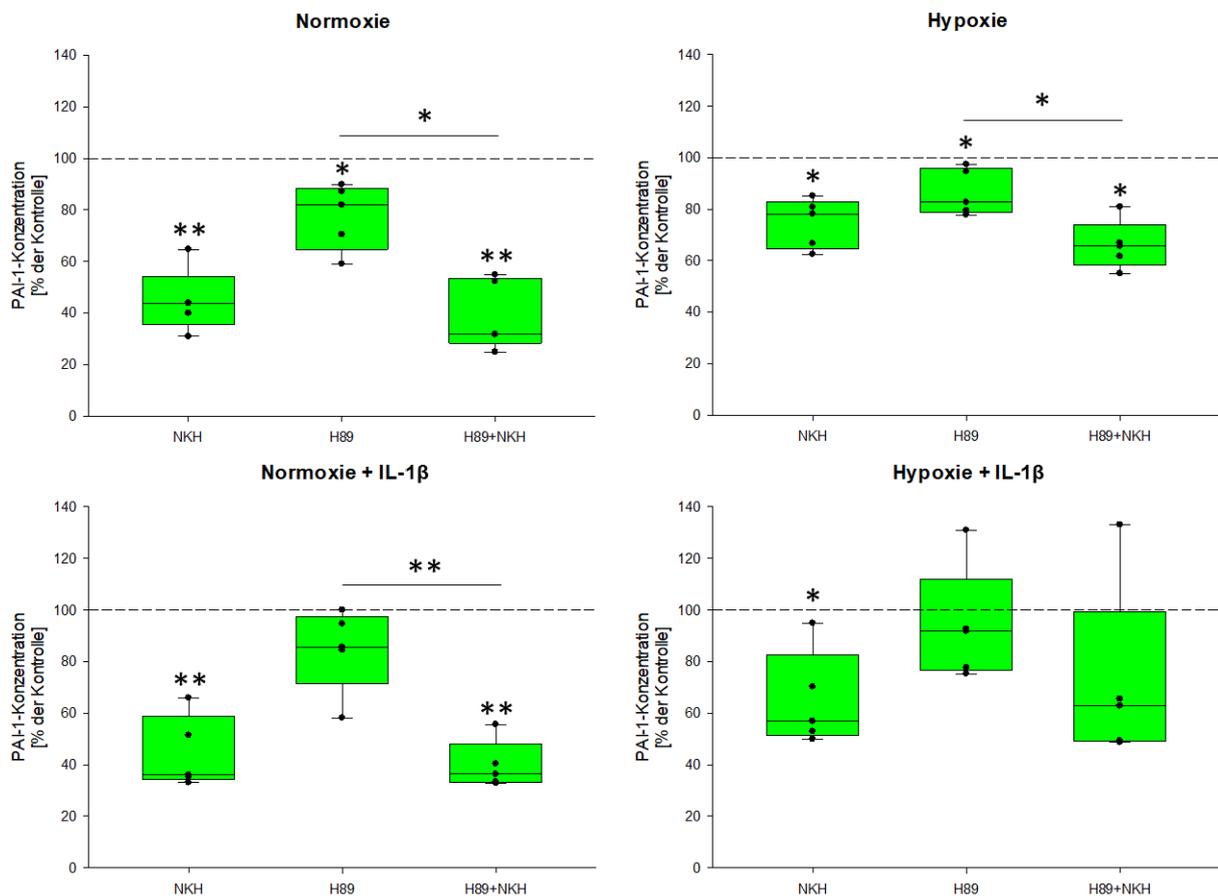


Abbildung 60: Regulation des PAI-1 durch NKH 477, H89 und deren Kombination bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit NKH 477, H89, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$.

Unter Normoxie bewirkten sowohl der β -AR-Agonist als auch der Gai-Inhibitor und deren Kombination eine signifikante Hemmung der PAI-1-Konzentration (Abbildung 61). Durch die Kombination der Reagenzien wurde die Wirkung des Formoterol signifikant verstärkt (Abbildung 61).

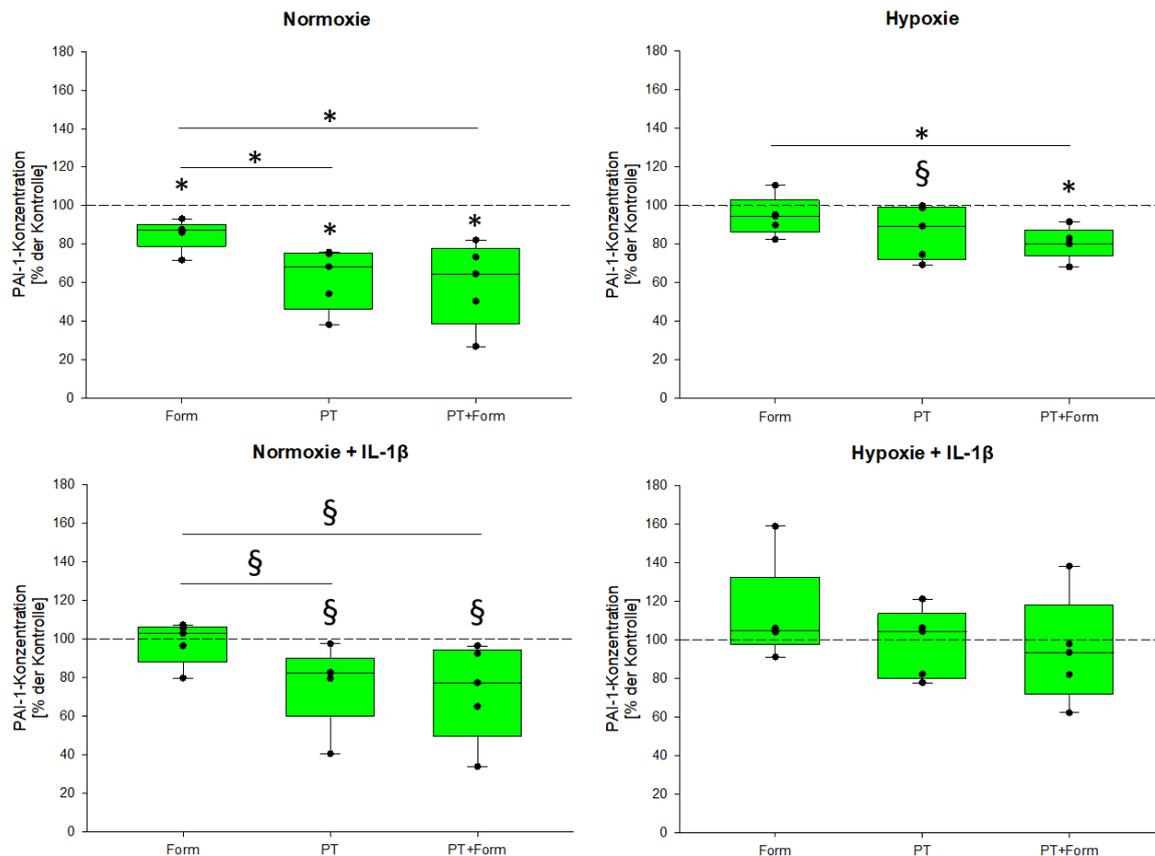


Abbildung 61: Regulation des PAI-1 durch Formoterol und Pertussis-Toxin sowie deren Kombination bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, Pertussis-Toxin, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor. *= $p < 0,05$, §= $p < 0,1$. $n(\text{FLN})=5$.

Unter Hypoxie bewirkten die Reagenzien einzeln keine signifikante Regulation des PAI-1 (Abbildung 61). Doch auch unter dieser Bedingung wurde durch die Kombination des β -AR-Agonisten mit dem G α i-Inhibitor eine signifikante Hemmung des PAI-1 bewirkt, die sich signifikant vom Effekt des Formoterol allein unterschied (Abbildung 61). Unter Normoxie + IL-1 β konnte man den Effekt der Behandlung der Zellen mit dem β -AR-Agonisten, dem G α i-Inhibitor und deren Kombination nur als Trend detektieren, während unter Hypoxie + IL-1 β keine signifikante Wirkung mehr nachweisbar war (Abbildung 61). Die Simulation einer Entzündung durch IL-1 β oder/und Hypoxie verhinderte demnach die Wirkung des β -AR-Agonisten und des G α i-Inhibitors auf die PAI-Regulation bei den Gesunden, wenn sie einzeln auf die Zellen gegeben wurden (Abbildung 61). Die Wirkung bei Kombination der beiden Reagenzien konnte nur durch IL-1 β aufgehoben werden, besonders unter der am stärksten entzündlichen Situation der Hypoxie + IL-1 β (Abbildung 61).

Bei den Gesunden konnte unter Normoxie außerdem beobachtet werden, dass die Wirkung des β -AR-Agonisten auf PAI-1 durch die von den GRK-Inhibitoren regulierten Signalwege beeinflusst wurde (Abbildung 62).

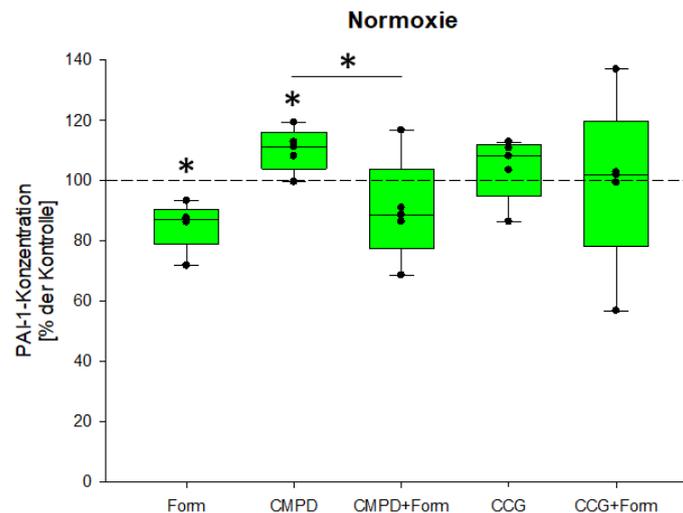


Abbildung 62: Regulation des PAI-1 durch Formoterol, GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination bei Gesunden unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=5$.

Während der β -AR-Agonist unter Normoxie die Konzentration des PAI-1 bei den Gesunden signifikant auf etwa 85 % verminderte, steigerte der GRK2/3-Inhibitor die Konzentration signifikant auf knapp 110 % (Abbildung 62). Bei Kombination der beiden Substanzen hoben sich die Wirkungen auf und es war keine signifikante Regulation mehr detektierbar (Abbildung 62). Obwohl CCG bei den Gesunden allein keinen signifikanten Einfluss auf PAI-1 hatte, war auch durch Hemmung der GRK2/5 die Aufhebung des Effektes des Formoterol bei kombinierter Gabe detektierbar (Abbildung 62).

Entgegen dieser Beobachtung, dass unter Normoxie beide der durch die GRK-Inhibitoren regulierten Signalwege Einfluss auf die Regulation des PAI-1 durch den β -AR-Agonisten hatten, konnte bei den RA-Patienten lediglich eine Abhängigkeit zwischen den durch Formoterol und CCG regulierten Signalwegen detektiert werden (Abbildung 58).

Der Einfluss der durch die GRK-Inhibitoren regulierten Signalwege auf die Wirkung des β -AR-Agonisten bei Gesunden konnte jedoch nur unter Normoxie beobachtet werden, unter den drei anderen Bedingungen, die jeweils durch Hypoxie oder/und IL-1 β eine Entzündung simulierten, bewirkten weder der β -AR-Agonist, noch die GRK-Inhibitoren oder deren Kombination eine signifikante Regulation des PAI-1 (Abbildung 59).

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Unter Normoxie unterschied sich die Regulation der PAI-1-Konzentration zwischen den RA-Patienten und den Gesunden nur bei Stimulation der Fibroblasten mit dem $G_{\alpha i}$ -Inhibitor kombiniert mit dem β -AR-Agonisten und den beiden GRK-Inhibitoren (Abbildung 63).

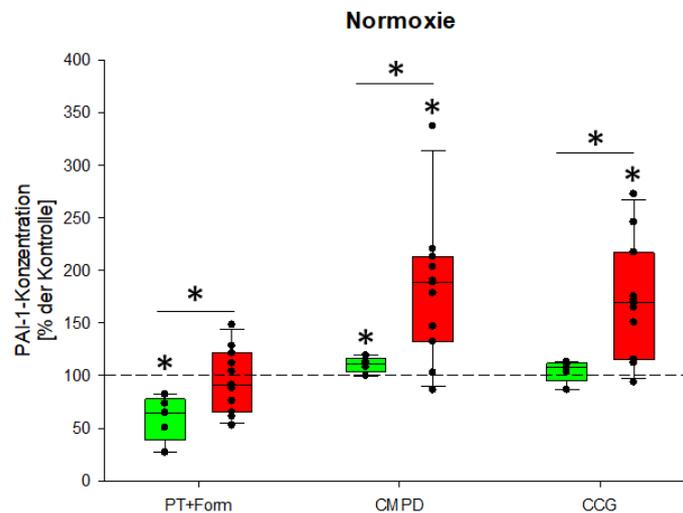


Abbildung 63: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. Form: β -AR-Agonist, PT: $G_{\alpha i}$ -Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=11$.

Besonders stark ausgeprägt war der Unterschied in der Regulation des PAI-1 unter Normoxie durch den GRK2/3-Inhibitor (Abbildung 63). Bei den Gesunden wurde die PAI-1-Konzentration auf 110 % gesteigert, bei den RA-Patienten auf 190 % (Abbildung 63).

Unter Hypoxie wurden nur durch den $G_{\alpha i}$ -Inhibitor und den PKA-Inhibitor kombiniert mit dem Aktivator der Adenylatzyklase signifikante Unterschied zwischen den RA-Patienten und den Gesunden detektiert (Abbildung 64).

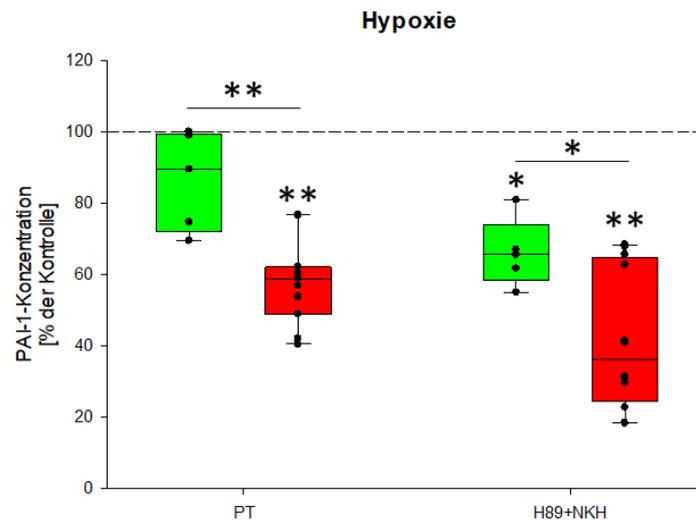


Abbildung 64: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=11-12$.

Während der Gai-Inhibitor bei den Gesunden unter Hypoxie keine Regulation des PAI-1 bewirkte, hemmte er die Konzentration bei den RA-Patienten auf 60 % (Abbildung 64).

Die Kombination des PKA-Inhibitors mit dem Aktivator der Adenylatzyklase bewirkte sowohl bei den Gesunden als auch bei den RA-Patienten eine signifikante Verminderung der PAI-1-Konzentration (Abbildung 64). Bei den RA-Patienten war die Hemmung jedoch um etwa 30 % stärker ausgeprägt (Abbildung 64).

Unter Normoxie führte die Simulation der Entzündung durch IL-1 β zu den meisten signifikanten Unterschieden in der Regulation des PAI-1 zwischen den RA-Patienten und den Gesunden im Vergleich zu den anderen getesteten Bedingungen (Abbildung 63 bis Abbildung 66). Abgesehen vom Gai-Inhibitor allein und kombiniert mit dem β -AR-Agonisten sowie dem GRK2/5-Inhibitor allein führten alle anderen getesteten Reagenzien zu einer signifikant unterschiedlichen Regulation des PAI-1 bei RA-Patienten und Gesunden (Abbildung 65).

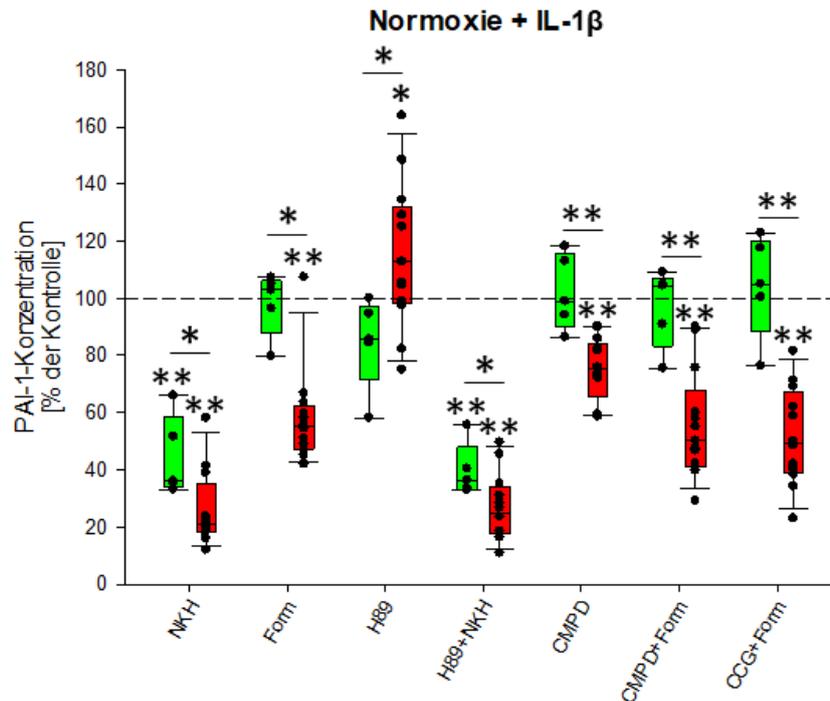


Abbildung 65: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=12-13$.

Hochsignifikant waren die Unterschiede zwischen der PAI-1-Regulation bei den Gesunden und den RA-Patienten beispielsweise bei Stimulation der Zellen mit dem GRK2/3-Inhibitor und dem GRK2/3-Inhibitor zusammen mit dem β -AR-Agonisten (Abbildung 65). Während CMPD keine Regulation des PAI-1 bei den Gesunden bewirkte, senkte es die Konzentration bei den RA-Patienten auf etwa 75 % (Abbildung 65). Die Kombination der beiden Stimulanzen führte zu einem Unterschied der PAI-1-Konzentration zwischen den Gesunden und den RA-Patienten von etwa 55 % (Abbildung 65).

Unter Hypoxie dagegen reduzierte IL-1 β die signifikanten Unterschiede zwischen den RA-Patienten und den Gesunden. Der GRK2/3-Inhibitor war das einzige Reagenz, das zwar keine signifikant unterschiedliche Regulation des PAI-1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, jedoch signifikant unterschiedliche Regulation zwischen den RA-Patienten und den Gesunden bewirkte (Abbildung 66).

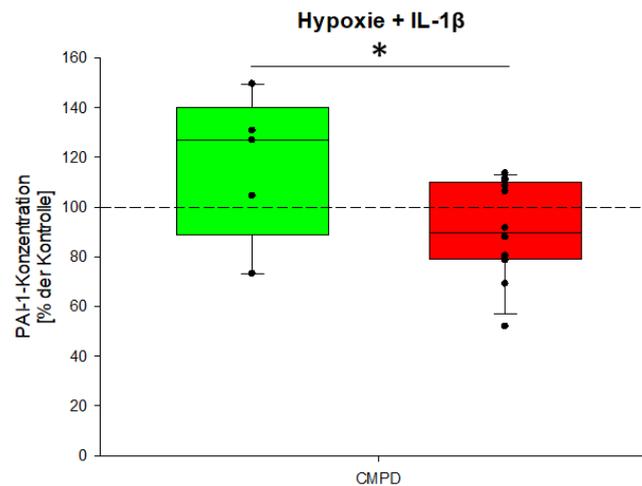


Abbildung 66: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. CMPD: GRK2/3-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=12$.

3.6.4 Die Regulation des CCL2 in Fibroblasten

CCL2 gehört zur Familie der CC-Chemokine (129). Es ist in verschiedene immunologische Ereignisse wie beispielsweise Entzündungen verwickelt und außerdem ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der RA (129–132). Es konnte gezeigt werden, dass die CCL2-Konzentrationen im Synovialgewebe, der Synovialflüssigkeit und auch im Serum der RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden und auch anderen arthritischen Erkrankungen erhöht sind (129,131,132). CCL2 ist unter anderem für Osteoklastengenes, Angiogenese sowie die Rekrutierung von Monozyten, Leukozyten und Makrophagen an den Ort der Verletzung zuständig (129–131). Obwohl CCL2 tendenziell eher mit der Krankheitsprogression assoziiert ist, kann es auch eine schützende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen übernehmen (130). CCL2 kann von einer Vielzahl von Zellen produziert werden, wie beispielsweise mononukleären Blutzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen und Tumorzelllinien (132). Bei RA wird es im Gelenk jedoch hauptsächlich von Makrophagen produziert (132).

RA-Patienten

Bei der Messung der CCL2-Konzentrationen in den Überständen der unstimulierten Kontrollen ergab sich bei den RA-Patienten unter Normoxie ein Gehalt von 389 pg/ml, unter Hypoxie 332 pg/ml, unter Normoxie + IL-1 β 8.392 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 4.741 pg/ml. Diese Daten sind in den Abbildungen nicht dargestellt.

Bei der Regulation des CCL2 bei den RA-Patienten konnte eine gegensätzliche Regulation durch NKH 477 und Formoterol detektiert werden, die man eigentlich nicht erwarten würde (Abbildung 67).

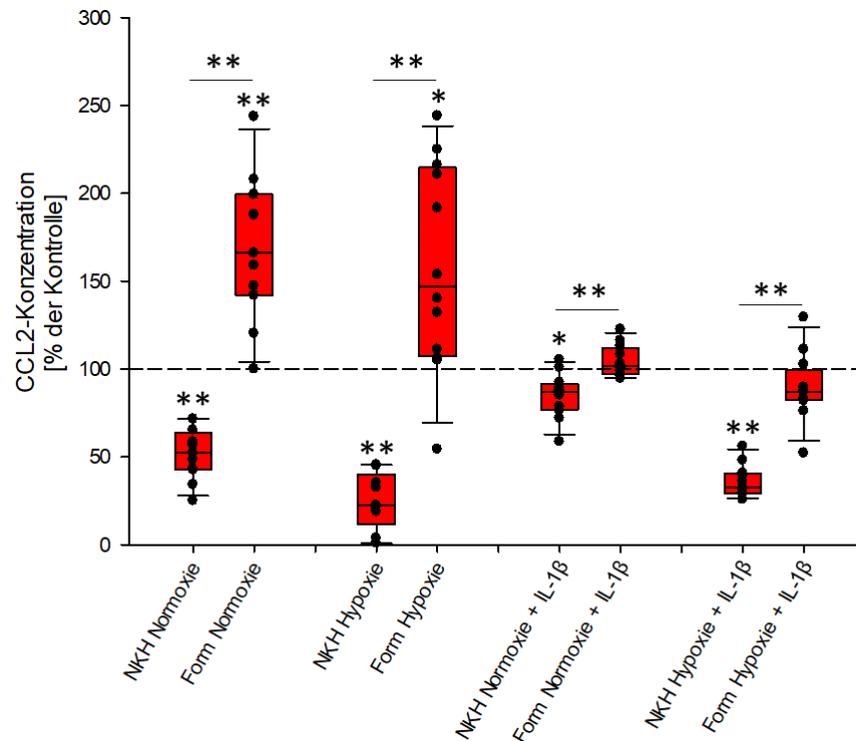


Abbildung 67: Regulation des CCL2 durch NKH 477 und Formoterol bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation der Fibroblasten mit NKH 477 und Formoterol, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=9-12$.

Die Stimulation der Adenylatzyklase bewirkte bei den RA-Patienten unter jeder der getesteten Bedingungen eine verminderte CCL2-Konzentration im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (zwischen 85 % und 20 %) (Abbildung 67). Der β -AR-Agonist dagegen steigerte die CCL2-Konzentration unter Normoxie (165 %) und Hypoxie (150 %), verlor jedoch seine Wirkung bei Simulation einer gesteigerten Entzündung durch zusätzliche Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β (Abbildung 67).

Bei der Wirkung des β -AR-Agonisten fielen außerdem Unterschiede in der Beeinflussbarkeit durch den Gai-Inhibitor regulierten Signalweg auf, abhängig von der untersuchten Bedingung (Abbildung 68).

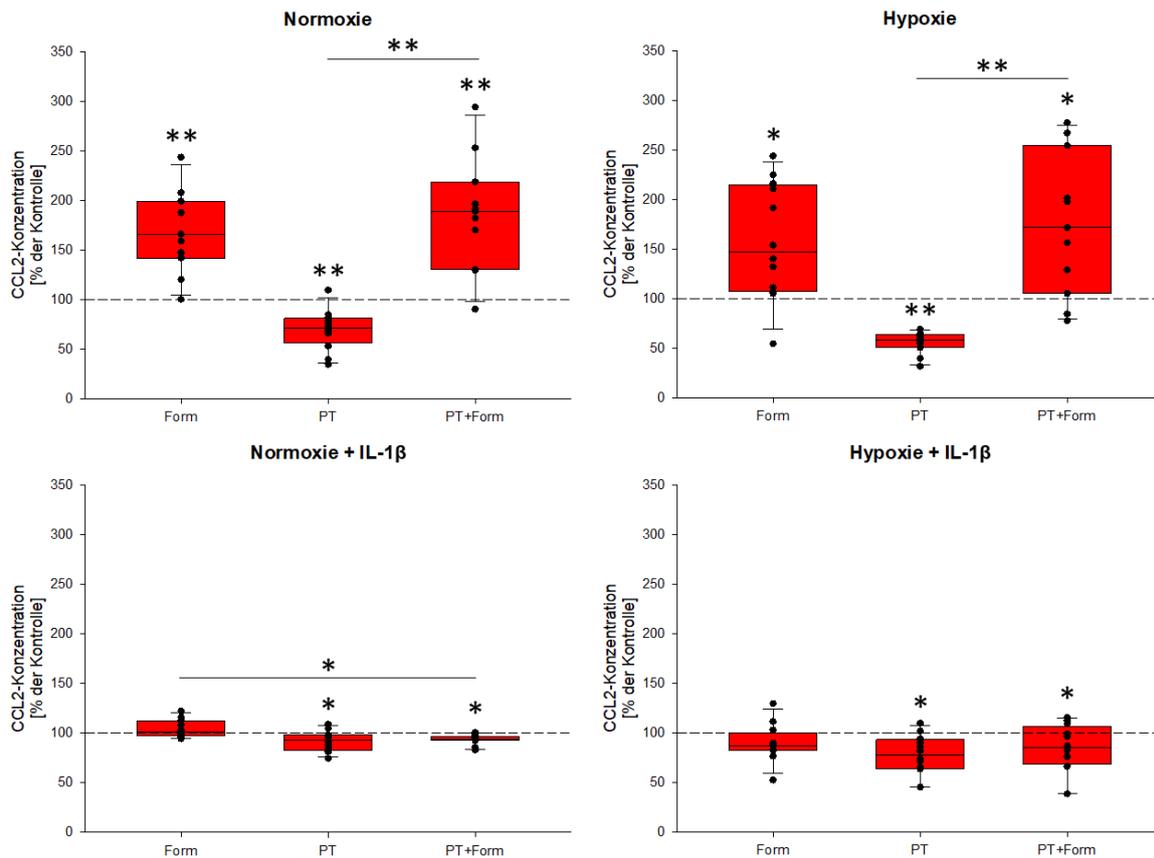


Abbildung 68: Regulation des CCL2 durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA}) = 11-12$.

Unter Normoxie und unter Hypoxie unterschied sich die steigernde, proinflammatorische Wirkung des β -AR-Agonisten allein und in Kombination mit dem Gai-Inhibitor nicht signifikant (Abbildung 68). Erst bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β beeinflusste der durch den Gai-Inhibitor regulierte Signalweg die Wirkung des β -AR-Agonisten auf CCL2 (Abbildung 68 und Abbildung 69). Während Formoterol allein jeweils keine signifikante Wirkung auf die CCL2-Konzentration hatte, wurde die Konzentration des CCL2 bei Kombination des Formoterol mit Pertussis-Toxin signifikant gehemmt (Abbildung 69).

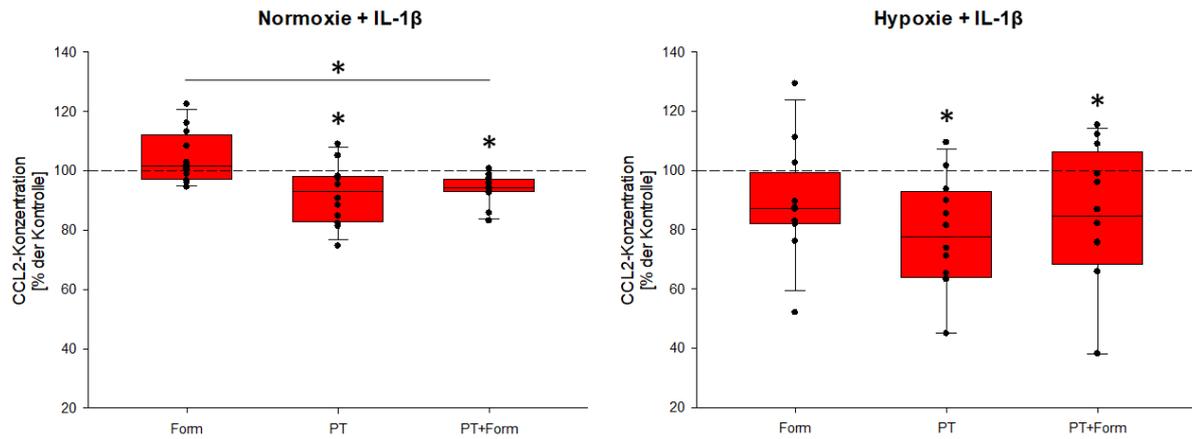


Abbildung 69: Regulation des CCL2 durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{RA})=12$.

Die GRK-Inhibitoren bewirkten unter Normoxie und Hypoxie eine gesteigerte Konzentration des CCL2 bei den RA-Patienten (jeweils etwa 170 % unter Normoxie, CMPD 190 % bzw. CCG 160 % unter Hypoxie) (Abbildung 70). Unter den Bedingungen mit IL-1 β hatten sie jedoch keinen Einfluss auf die CCL2-Konzentration (Abbildung 70), ähnlich wie es zuvor bei Formoterol beobachtet werden konnte (Abbildung 67).

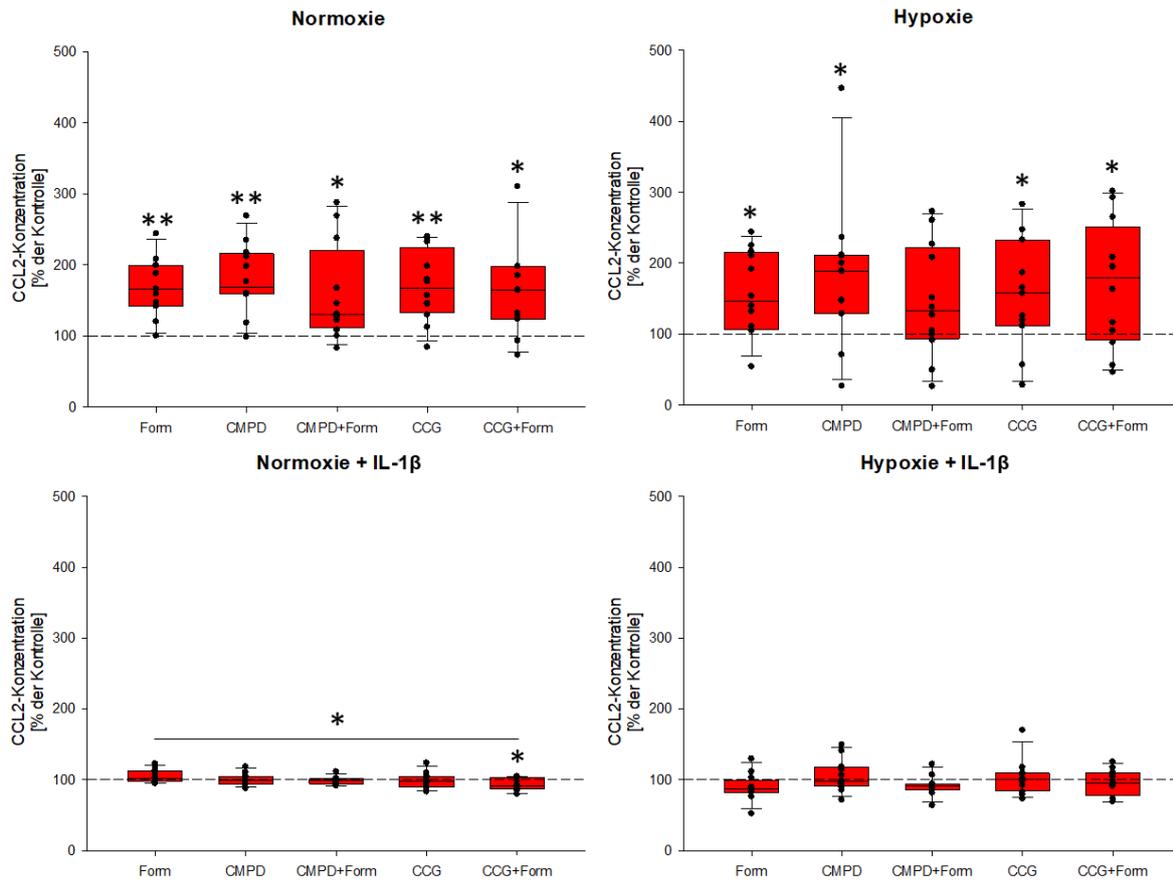


Abbildung 70: Regulation des CCL2 bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p<0,05$, **= $p<0,001$. $n(\text{RA})=11-13$.

Unter Normoxie + IL-1 β konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation der Fibroblasten mit dem β -AR-Agonisten allein und dessen Kombination mit dem GRK2/5-Inhibitor detektiert werden (Abbildung 70 und Abbildung 71).

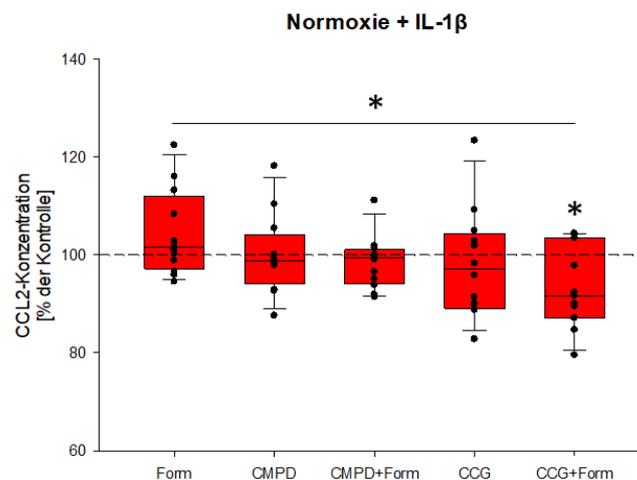


Abbildung 71 Regulation des CCL2 bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit Formoterol, GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p<0,05$. $n(\text{RA})=11-12$.

Obwohl die beiden Reagenzien einzeln keine Regulation des CCL2 bewirkten, hemmten sie in Kombination die Konzentration des CCL2 signifikant (Abbildung 71). Der durch den GRK2/5-Inhibitor regulierte Signalweg beeinflusste demnach die Wirkung des β -AR-Agonisten auf CCL2 bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β . Bei allen anderen Vergleichen zwischen den Stimulanzen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 70).

Eine weitere Auffälligkeit lag in der Regulation des CCL2 durch den PKA-Inhibitor allein und in Kombination mit dem Aktivator der Adenylatzyklase (Abbildung 72).

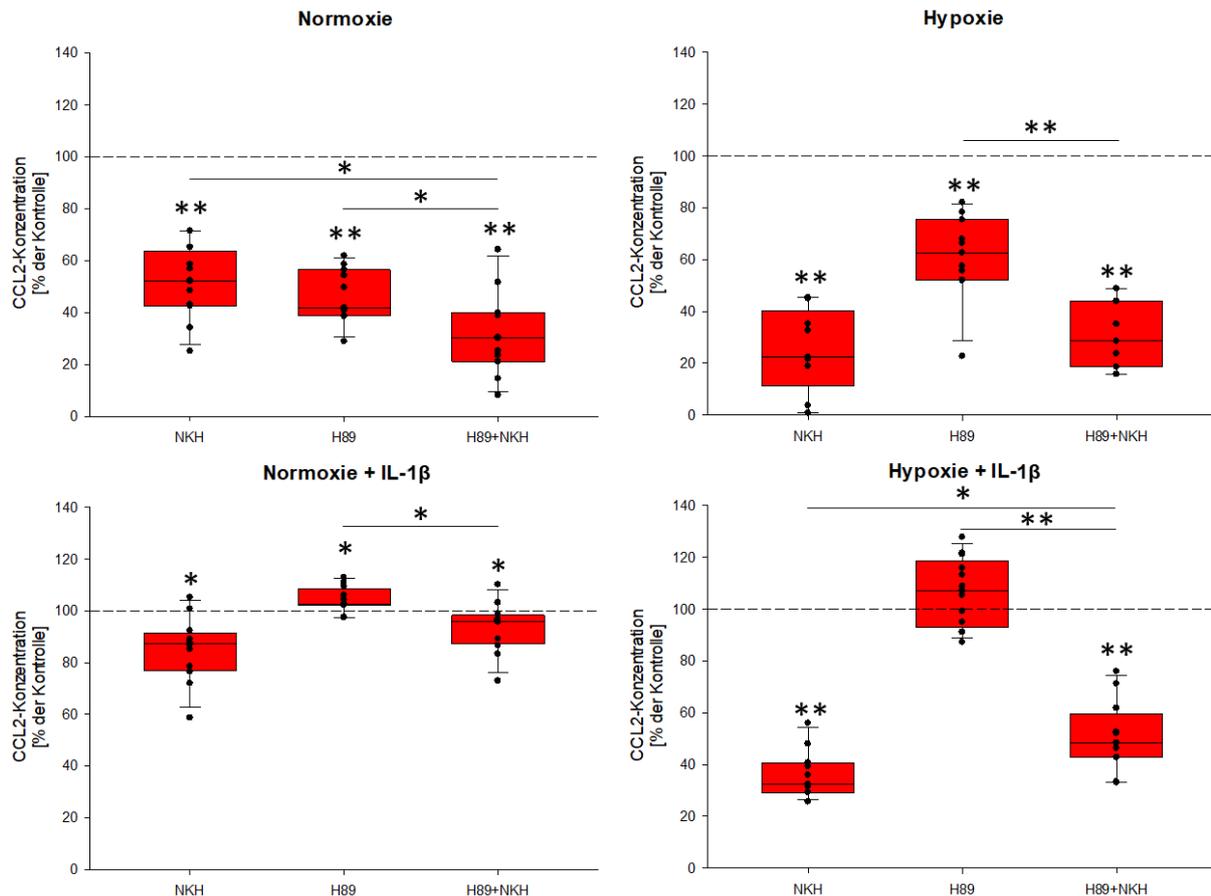


Abbildung 72: Regulation des CCL2 durch NKH 477, H89 und deren Kombination bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit NKH 477, H89, sowie deren Kombination, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=7-13$.

Zunächst fiel auf, dass der PKA-Inhibitor allein unter Normoxie und Hypoxie eine signifikante Hemmung der CCL2-Konzentration bewirkte (40 % und 60 %) (Abbildung 72). Bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β wurde der Effekt unter Normoxie in die Gegenrichtung umgeschaltet, es kam zu einer Steigerung der CCL2-Konzentration durch H89 (Abbildung 72). Unter Hypoxie + IL-1 β wurde die Wirkung des PKA-Inhibitors aufgehoben (Abbildung 72).

Außerdem wurde festgestellt, dass es nur unter Normoxie und Hypoxie + IL-1 β zu einer signifikant unterschiedlichen Regulation des CCL2 durch den Aktivator der Adenylatzyklase

allein und in Kombination mit dem PKA-Inhibitor kam (Abbildung 72). Hierbei wurde die Wirkung des NKH 477 unter Normoxie verstärkt (50 % auf 30 %) und unter Hypoxie + IL-1 β abgeschwächt (30 % auf 50 %) (Abbildung 72). Unter den anderen beiden Bedingungen wurde kein Unterschied zwischen der Regulation des CCL2 durch NKH 477 allein oder kombiniert mit H89 detektiert (Abbildung 72).

Gesunde

Bei den Gesunden fielen die Konzentrationen des CCL2 bei den unstimulierten Kontrollen deutlich höher aus als bei den RA-Patienten. Sie entsprachen unter Normoxie 1.630 pg/ml, unter Hypoxie 1.152 pg/ml, unter Normoxie + IL-1 β 8.140 pg/ml und unter Hypoxie + IL-1 β 7.884 pg/ml. Diese Daten sind in den Abbildungen nicht dargestellt.

Bei den Gesunden wurde CCL2 kaum von den getesteten Reagenzien reguliert (Abbildung 73). Lediglich der G α i-Inhibitor und der Inhibitor der PKA bewirkten eine signifikante Hemmung des CCL2 (75 % und 80 %) und dies auch nur unter Normoxie (Abbildung 73).

Unter den anderen getesteten Bedingungen konnte keine signifikante Regulation des CCL2 detektiert werden (Abbildung 73).

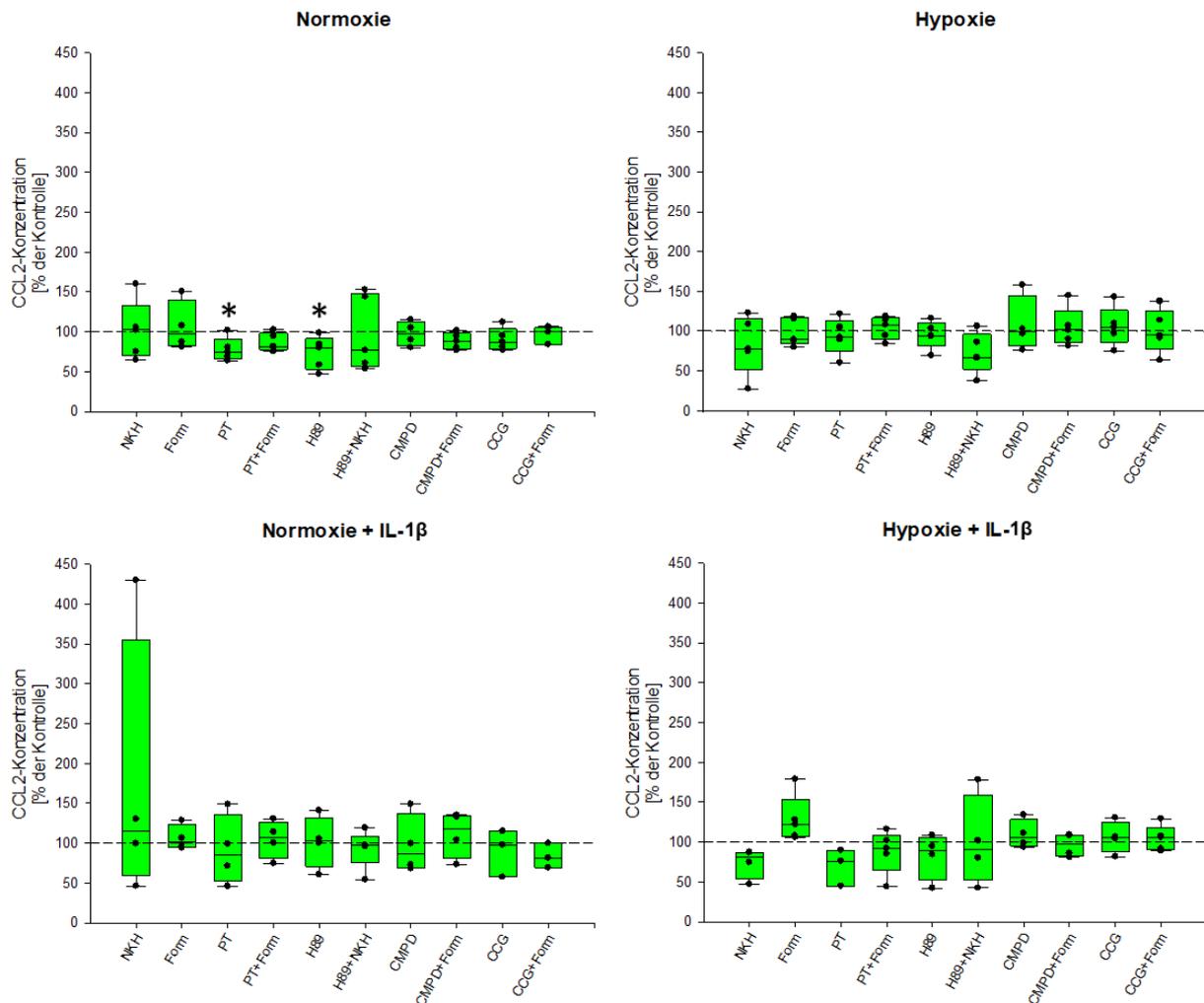


Abbildung 73: Abhängigkeit der CCL2-Regulation bei Gesunden von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN}) = 3-5$.

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Beim Vergleich der Wirkung der Reagenzien auf die RA-Patienten und die Gesunden fiel auf, dass die meisten signifikanten Unterschiede in der Regulation des CCL2 unter Normoxie auftraten (Abbildung 74 bis Abbildung 76).

Unter Normoxie war CCL2 durch alle Reagenzien außer den Gai-Inhibitor bei den RA-Patienten und den Gesunden signifikant unterschiedlich reguliert (Abbildung 74). Selbes konnte zuvor bei Osteoprotegerin beobachtet werden (Abbildung 48).

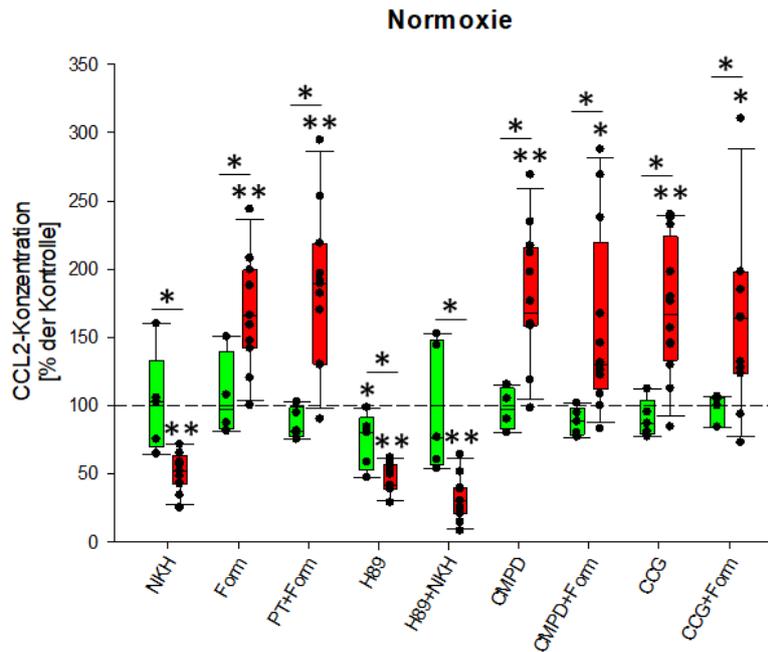


Abbildung 74: Unterschiedliche Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=4-5$, $n(\text{RA})=11-12$.

Durch Simulation einer Entzündung durch IL-1 β oder/und Hypoxie traten deutlich weniger signifikante Unterschiede in der Regulation des CCL2 zwischen den RA-Patienten und den Gesunden auf (Abbildung 74 bis Abbildung 76). Dass die signifikanten Unterschiede durch die simulierte Entzündung vermindert waren konnte zuvor auch bei IL-6 detektiert werden (Abbildung 35 bis Abbildung 38).

Unter Hypoxie wurde CCL2 bei den RA-Patienten und den Gesunden durch den Aktivator der Adenylatzyklase, den β -AR-Agonisten, den G α i-Inhibitor und den PKA-Inhibitor allein sowie in Kombination mit NKH 477 signifikant unterschiedlich reguliert (Abbildung 75). Hierbei wurde CCL2 bei den RA-Patienten jeweils (hoch-)signifikant reguliert während bei den Gesunden kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden konnte (Abbildung 75).

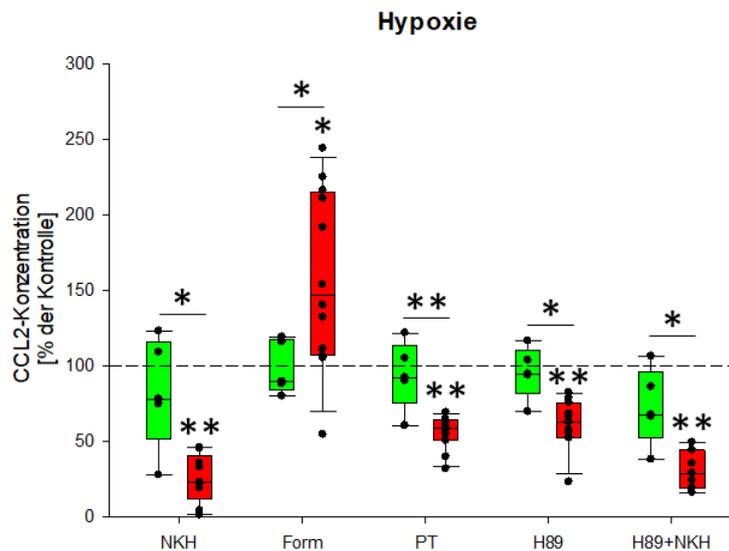


Abbildung 75: Unterschiedliche Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=5$, $n(\text{RA})=7-12$.

Unter Hypoxie + IL-1 β bewirkte der Aktivator der Adenylatzyklase eine hochsignifikante Hemmung des CCL2 bei den RA-Patienten (Abbildung 76). Diese Regulation unterschied sich hochsignifikant von den Gesunden, bei denen kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle detektiert werden konnte (Abbildung 76).

Durch Stimulation der Fibroblasten mit dem β -AR-Agonisten und Hemmung der PKA unter Hypoxie + IL-1 β unterschied sich die CCL2-Konzentration zwar nicht von der unstimulierten Kontrolle, sie unterschied sich jedoch signifikant zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 76).

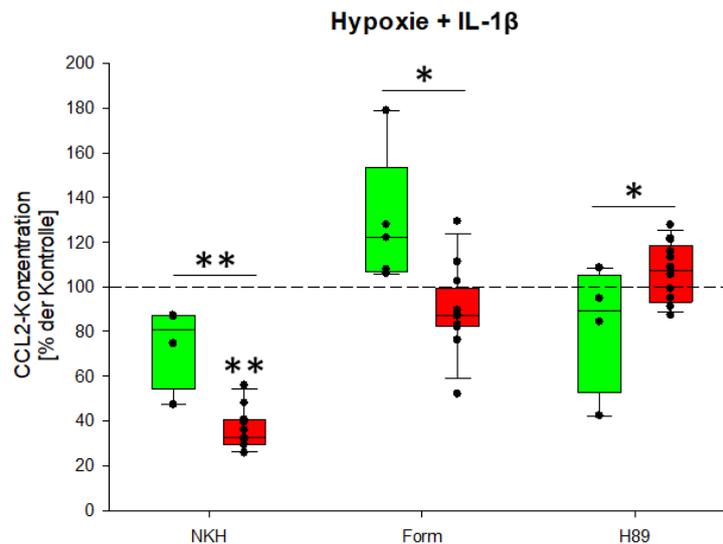


Abbildung 76: Unterschiedliche Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, H89: PKA-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{FLN})=4-5$, $n(\text{RA})=11-13$.

Unter Normoxie führte die Simulation einer Entzündung durch IL-1 β dazu, dass keine signifikanten Unterschiede in der Regulation des CCL2 zwischen den RA-Patienten und den Gesunden mehr detektierbar waren. Diese Wirkung ist gegensätzlich zu der Regulation des PAI-1, bei dem unter dieser Bedingung die meisten signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen detektiert werden konnten (Abbildung 65).

3.7 Potenzielle Regulatoren der untersuchten Zielparameter

Durch Literaturrecherche wurden weitere Schlüsselpunkte der Signalkaskade gefunden, die Einfluss auf eine G α s-zu-G α i-Umschaltung haben könnten. Hierbei wurde der Fokus auf Proteine gelegt, die das Potenzial haben, auf die zuvor untersuchten Parameter Einfluss zu nehmen und ebenfalls mit Entzündungsreaktionen und/oder RA zu assoziieren sind. Zusätzlich wurden die favorisierten Proteine mit den Ergebnissen des RNA-Microarrays abgeglichen und diejenigen ausgewählt, bei denen eine Regulation detektiert worden war. Daraufhin wurden pCREB, pErk1/2, pNF- κ B, pJun(Ser63), pJun(Ser73) und pCEBP β ausgewählt und analysiert. Da der Nachweis des pJun und pCEBP β mittels *Cell-based ELISA* nicht gelang, wurde der Fokus auf die Bedeutung des pCREB, pNF- κ B und pErk1/2 gelegt.

Auch für die potenziellen Regulatoren der Zielparameter wurde der Einfluss der Stimulanzen und Inhibitoren im Detail betrachtet und im Folgenden die Besonderheiten der Regulationen einzeln aufgeführt.

3.7.1 Die Regulation des pCREB in Fibroblasten

Die CREB-Proteine gehören zu den basischen Leuzin-Zipper-Transkriptionsfaktoren (133,134). CREB wird durch eine Vielzahl von physiologischen Reizen aktiviert und ist an der Transkriptionsregulation in vielen verschiedenen Zelltypen beteiligt (133,134). CREB wird durch Phosphorylierung aktiviert, was über verschiedene Signalwege induziert werden kann. Neben der Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige PKA, wird es auch von Ca²⁺-abhängigen Kinasen, Wachstumsfaktoren, dem Ras/Erk-Signalweg und stressbedingt beispielsweise durch Hypoxie aktiviert (133–135). Auch im Bezug auf RA spielt CREB eine große Rolle. Es wird von den FLS, genauso wie von vielen anderen Synovialzellen produziert und ist mit der proinflammatorischen Zytokin- und MMP-Produktion sowie der Proliferation der FLS assoziiert (133).

RA-Patienten

Unter Normoxie bewirkte der β -AR-Agonist bei den RA-Patienten eine Steigerung des pCREB auf 125 % der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 77). Bei der Kombination des β -AR-Agonisten mit dem G α i-Inhibitor kam es zu einer signifikant verminderten Wirkung im Vergleich zur alleinigen Stimulation des β -AR (110 %) (Abbildung 77). Das spricht dafür, dass die steigernde Wirkung des stimulierten β -AR auf pCREB durch G α i vermittelt wurde.

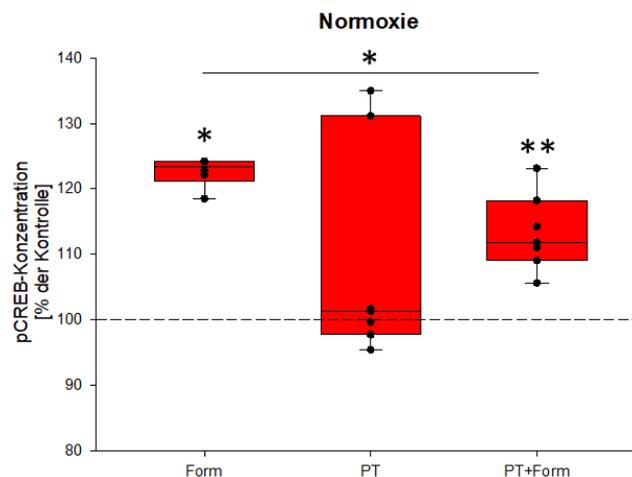


Abbildung 77: Regulation des pCREB durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA}) = 6-7$.

Die Kombination des β -AR-Agonisten mit den GRK-Inhibitoren dagegen führte nicht zu einer signifikant unterschiedlichen Steigerung des pCREB im Vergleich zur Stimulation des β -AR

allein (jeweils ca. 120 %) (Abbildung 78). Die Wirkung des stimulierten β -AR auf pCREB war demnach unabhängig von der Aktivität der GRKs.

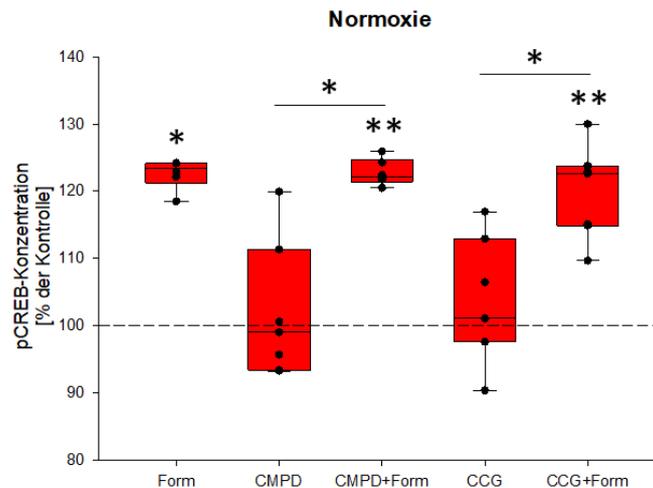


Abbildung 78: Regulation des pCREB durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination bei RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(RA)=6-7$.

Die unter Normoxie beobachteten Regulationen des pCREB wurden jedoch bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β abgeschaltet (Abbildung 79). Das einzige Reagenz, das erst durch die Simulation der gesteigerten Entzündung mit IL-1 β an Bedeutung gewann, war der PKA-Inhibitor. Durch Hemmung der PKA wurden unter Normoxie + IL-1 β nur noch 90 % des pCREB im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle detektiert (Abbildung 79).

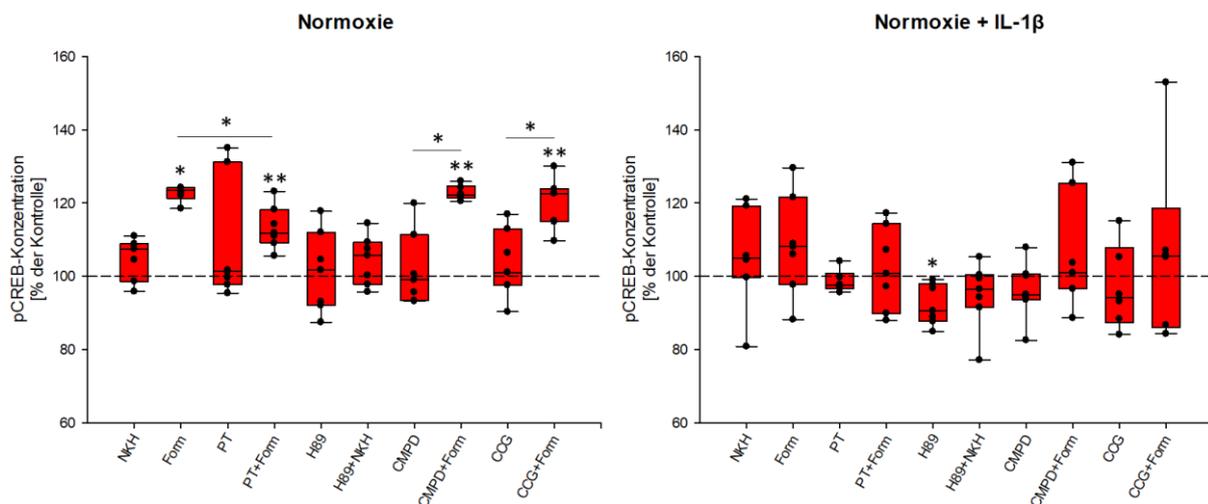


Abbildung 79: Regulation des pCREB bei RA-Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(RA)=6-7$.

Für IL-6, Osteoprotegerin, CCL2 und pCREB konnte unter Normoxie bei den RA-Patienten eine (hoch-)signifikante Steigerung durch die Stimulation des β -AR beobachtet werden (Abbildung 80). Man kann daher mit einiger Vorsicht annehmen, dass pCREB unter Normoxie bei den RA-Patienten einen stimulierenden Einfluss auf IL-6, Osteoprotegerin und CCL2 im Kontext der Stimulation des β -AR hatte. Dieser Effekt wurde in dieser Untersuchung nicht kausal nachgewiesen, und so bleibt die Aussage spekulativ.

Bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β entfiel der Effekt des Formoterol auf pCREB und CCL2 (Abbildung 80). Da die Konzentrationen des IL-6 und Osteoprotegerins auch unter dieser Bedingung signifikant gesteigert wurden, war dies wahrscheinlich über einen anderen Pfad als das pCREB geschehen (Abbildung 80).

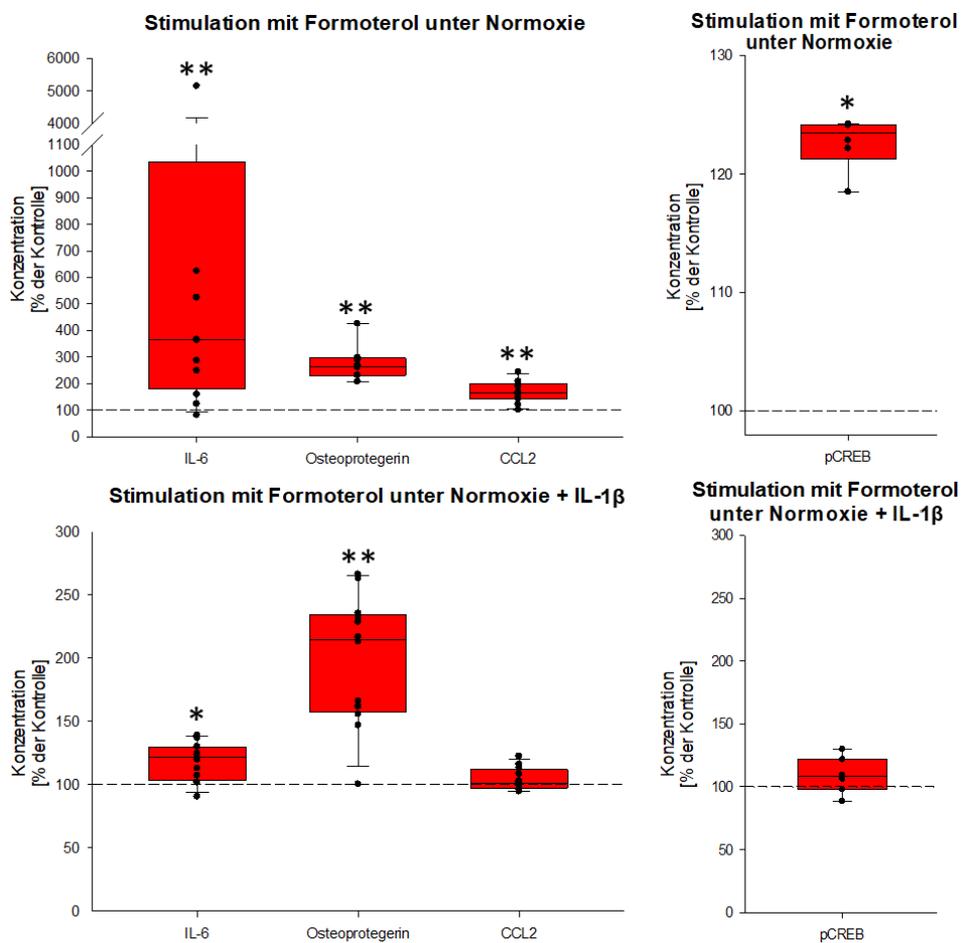


Abbildung 80: Vergleichende Darstellung der Regulation des IL-6, Osteoprotegerin, CCL2 und pCREB. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation der Fibroblasten mit Formoterol, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=6-12$.

Gesunde

Unter der nicht-entzündlichen Bedingung der Normoxie konnte bei den Gesunden keinerlei signifikante Regulation des pCREB durch die getesteten Reagenzien detektiert werden (Abbildung 81).

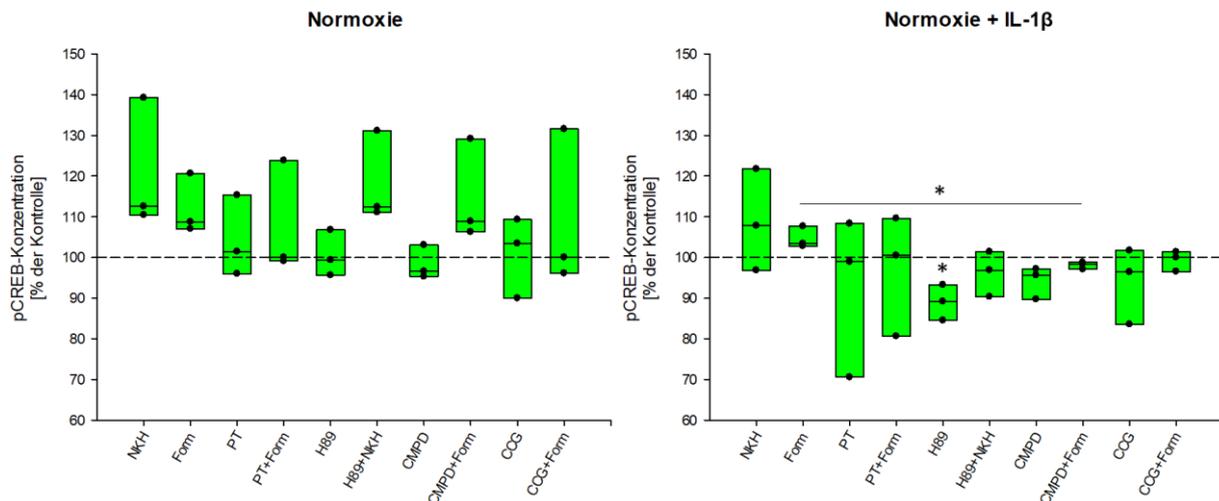


Abbildung 81: Regulation des pCREB bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=3$.

Erst durch Simulation einer Entzündung mit IL-1 β konnte eine signifikante Regulation des pCREB detektiert werden (Abbildung 81). Unter Normoxie + IL-1 β hemmte der PKA-Inhibitor pCREB auf 90 % der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 81).

Außerdem unterschied sich unter Normoxie + IL-1 β die Regulation des pCREB durch den β -AR-Agonisten allein und kombiniert mit dem GRK2/3-Inhibitor signifikant (Abbildung 81).

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Signifikante Unterschiede in der Regulation des pCREB durch die getesteten Reagenzien zwischen den Gesunden und den RA-Patienten traten nur unter Normoxie auf. Signifikant unterschiedlich war die Regulation des pCREB durch den Aktivator der Adenylatzyklase, den β -AR-Agonisten sowie die Kombination des PKA-Inhibitors mit dem Aktivator der Adenylatzyklase (Abbildung 82).

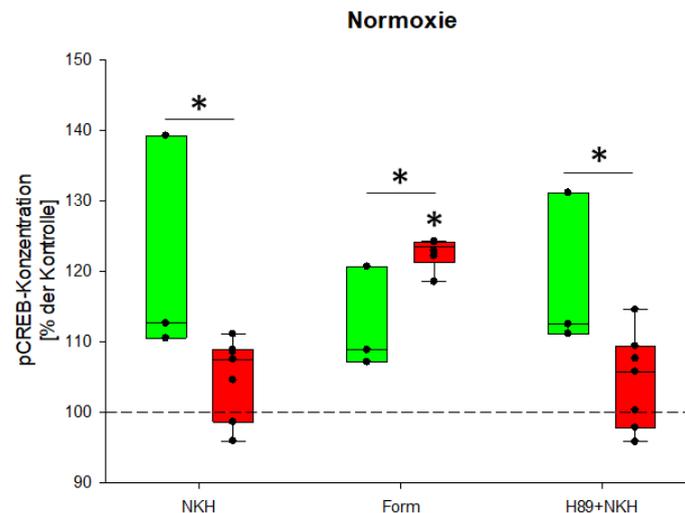


Abbildung 82: Unterschiedliche Regulation des pCREB bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, H89: PKA-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=3$, $n(\text{RA})=6-7$.

Der größte Unterschied in der Regulation des pCREB zwischen den RA-Patienten und den Gesunden konnte unter Normoxie durch den β -AR-Agonisten detektiert werden (Abbildung 82). Bei den Gesunden bewirkte Formoterol keine signifikant unterschiedliche Regulation des pCREB im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 82). Bei den RA-Patienten dagegen steigerte der β -AR-Agonist die Konzentration des pCREB signifikant auf 125 % (Abbildung 82).

3.7.2 Die Regulation des pErk1/2 in Fibroblasten

Erk1/2 ist Teil der MAPK-Kaskade und wird durch Phosphorylierung aktiviert (136). Der Signalweg über Erk1/2 ist bei der Regulation einer Vielzahl von Prozessen beteiligt wie beispielsweise Zelladhäsion, Zellzyklusprogression, Zellmigration, dem Überleben der Zellen und Apoptose, Differenzierung, Metabolismus, Proliferation, Transkription und Entzündungsprozessen (136–142). Auch bei einer Vielzahl von pathologischen Zuständen spielt die Signalweiterleitung über Erk1/2 eine große Rolle, wie beispielsweise bei Krebs, Arthritis, chronischen Entzündungen und Osteoporose (139,140,143,144). Auch die Entwicklung einer RA steht im engen Zusammenhang mit dem Erk1/2-Signalweg (145). Die erhöhte Expression der aktivierten MAP-Kinasen im Synovium sind vor allem mit Entzündungsprozessen und der Pannusbildung assoziiert, unter anderem durch die Beteiligung an der Synthese von proinflammatorischen Mediatoren und Metalloproteinasen durch Synovialzellen (137,138,141,144). Auch bei der zytokininduzierten HIF-1 α -Expression,

als Anpassung an die durch die Entzündung induzierte Hypoxie, ist der Erk1/2-Signalweg beteiligt (146).

RA-Patienten

Bei den RA-Patienten führte die Inhibition des G α i unter Normoxie zu einer gesteigerten Erk1/2-Aktivität von etwa 115 % (Abbildung 83). Der β -AR-Agonist hatte bei alleiniger Stimulation keine regulierende Wirkung auf pErk1/2 (Abbildung 83). Die Kombination des Pertussis-Toxin mit dem β -AR-Agonisten führte zu einer stark inhibierenden Wirkung auf pErk1/2 (65 %) (Abbildung 83). Die Bedeutung der Hemmung des G α i schlug also unter Normoxie radikal in die Gegenrichtung um, wenn gleichzeitig der β -AR aktiviert wurde. Da sich die Regulation des pErk1/2 durch die Kombination des β -AR-Agonisten und dem G α i-Inhibitor jeweils signifikant von der Stimulation der Reagenzien einzeln unterschied konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Signalwege, die durch die beiden Reagenzien reguliert wurden, in ihrer Wirkung auf pErk1/2 gegenseitig beeinflussten (Abbildung 83).

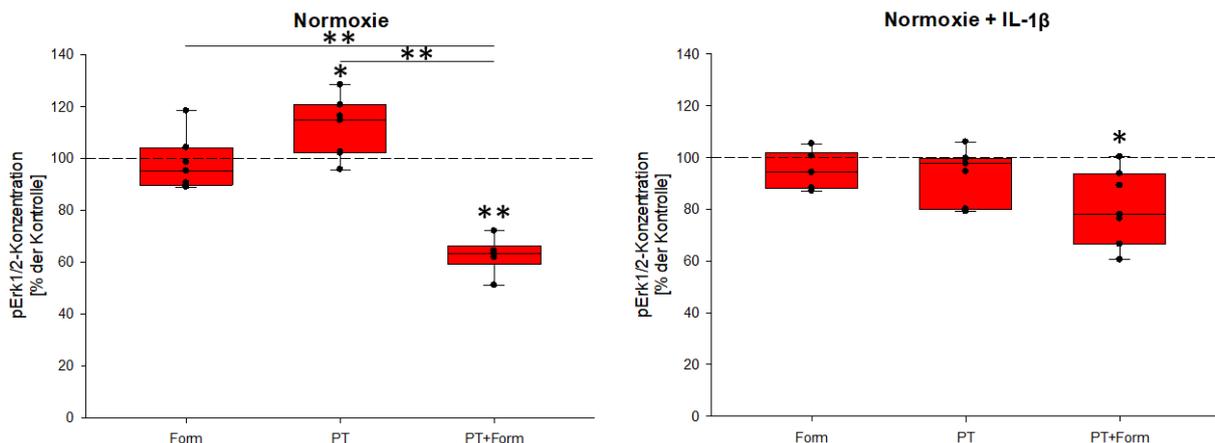


Abbildung 83: Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=6-7$.

Unter Normoxie + IL-1 β verloren Formoterol und Pertussis-Toxin einzeln ihren signifikanten Einfluss auf pErk1/2 (Abbildung 83). Nur deren Kombination führte auch bei zusätzlicher Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β noch zu einer signifikanten Hemmung des pErk1/2 (Abbildung 83). Die Wirkung fiel jedoch geringer aus als ohne IL-1 β (80 % unter Normoxie + IL-1 β und 65 % unter Normoxie) (Abbildung 83).

Unter Normoxie bewirkte der GRK2/5-Inhibitor allein und in Kombination mit dem β -AR-Agonisten eine Hemmung des pErk1/2 (75 % und 60 %) (Abbildung 84). Die Kombination

der beiden Reagenzien bewirke eine signifikant unterschiedliche Regulation als Formoterol allein, das keinen Unterschied zur unstimulierten Kontrolle bewirkte (Abbildung 84).

Unter Normoxie + IL-1 β verlor der GRK2/5-Inhibitor allein und in Kombination mit dem β -AR-Agonisten seine Wirkung auf pErk1/2 und es konnten keine Signifikanzen mehr detektiert werden (Abbildung 84).

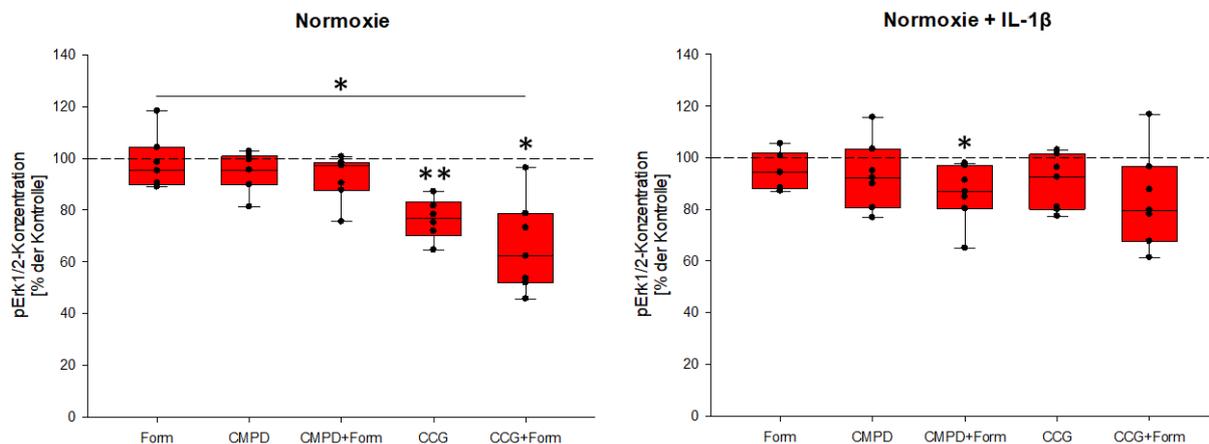


Abbildung 84: Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,001$. $n(\text{RA})=6-7$.

Im Gegensatz zum GRK2/5-Inhibitor hatte der GRK2/3-Inhibitor unter Normoxie weder allein noch kombiniert mit dem β -AR-Agonisten einen signifikanten Effekt auf pErk1/2 (Abbildung 84). Die Simulation der gesteigerten Entzündung durch IL-1 β führte jedoch dazu, dass die Kombination des β -AR-Agonisten mit dem GRK2/3-Inhibitor zu einer signifikanten Hemmung des pErk1/2 auf 85 % führte, obwohl die beiden Reagenzien einzeln, wie unter Normoxie, keine signifikante Regulation des pErk1/2 bewirkten (Abbildung 84).

Durch die Simulation einer gesteigerten Entzündung mit IL-1 β gewannen noch weitere Reagenzien an Bedeutung, die unter Normoxie keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation des pErk1/2 hatten (Abbildung 85). Hierzu gehörten der Aktivator der Adenylatzyklase (85 %), der PKA-Inhibitor (90 %) und deren Kombination (85 %) (Abbildung 85). Beim Vergleich der Reagenzien einzeln und in Kombination konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden (Abbildung 85). Die durch die beiden Reagenzien regulierten Signalwege beeinflussten sich demnach nicht gegenseitig in ihrer Wirkung auf die Regulation des pErk1/2.

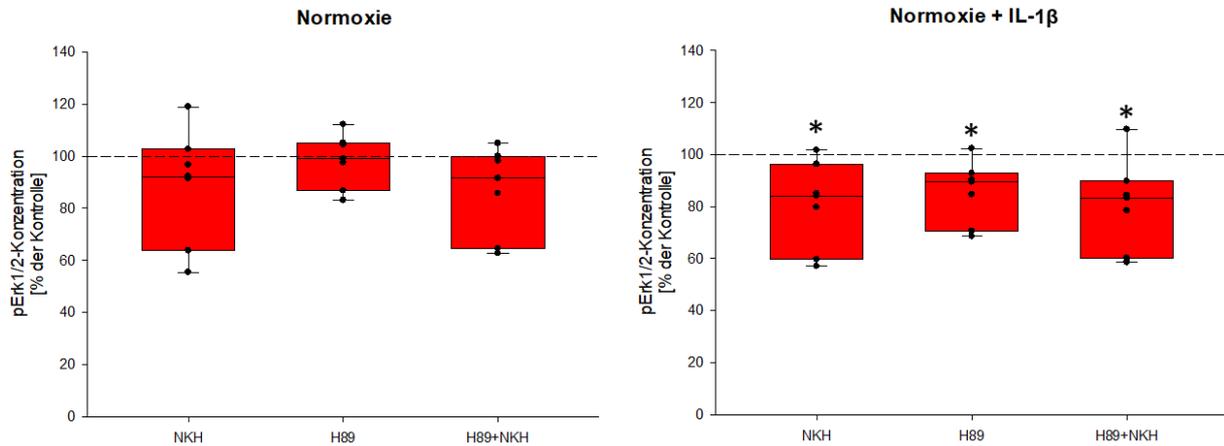


Abbildung 85: Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten durch NKH, H89 und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(RA)=7$.

Die gefundenen Regulationen des pErk1/2 konnten in keinen Zusammenhang mit den Regulationen der getesteten Zytokine gebracht werden.

Gesunde

pErk1/2 wurde bei den Gesunden durch keine der getesteten Reagenzien signifikant reguliert (Abbildung 86).

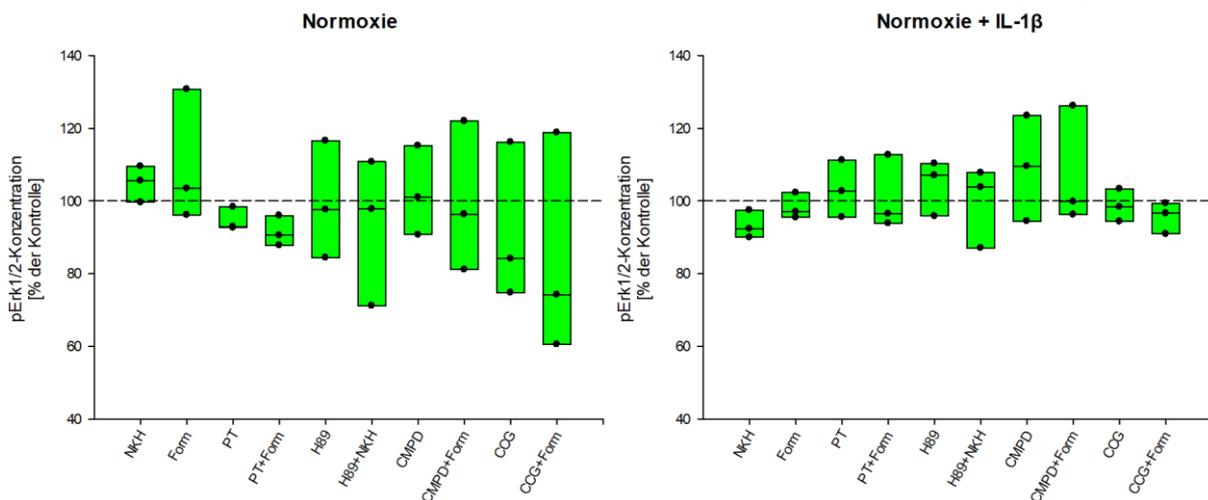


Abbildung 86: Regulation des pErk1/2 bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $n(FLN)=3$.

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Unter Normoxie unterschied sich der Einfluss des Gai-Inhibitors allein und in Kombination mit dem β -AR-Agonisten signifikant zwischen den Gesunden und den RA-Patienten (Abbildung 87).

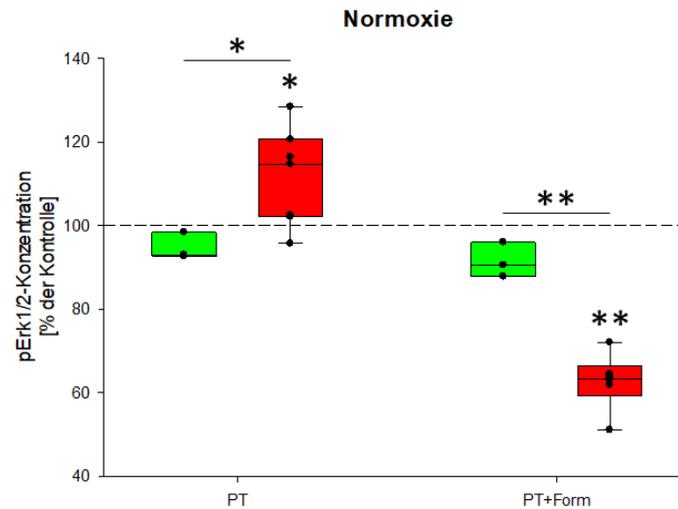


Abbildung 87: Unterschiedliche Regulation des pErk1/2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor. $*=p<0,05$, $**=p<0,001$. $n(\text{FLN})=3$, $n(\text{RA})=6-7$.

Während unter Normoxie bei den Gesunden keine Regulation des pErk1/2 detektiert werden konnte, steigerte der Gai-Inhibitor die Konzentration des pErk1/2 bei den RA-Patienten auf 115 % der unstimulierten Kontrolle und verminderte sie in Kombination mit dem β -AR-Agonisten auf 65 % (Abbildung 87).

Unter Normoxie + IL-1 β unterschieden sich die Wirkung des PKA-Inhibitors allein und des GRK2/3-Inhibitors kombiniert mit dem β -AR-Agonisten signifikant zwischen den Gesunden und den RA-Patienten (Abbildung 88).

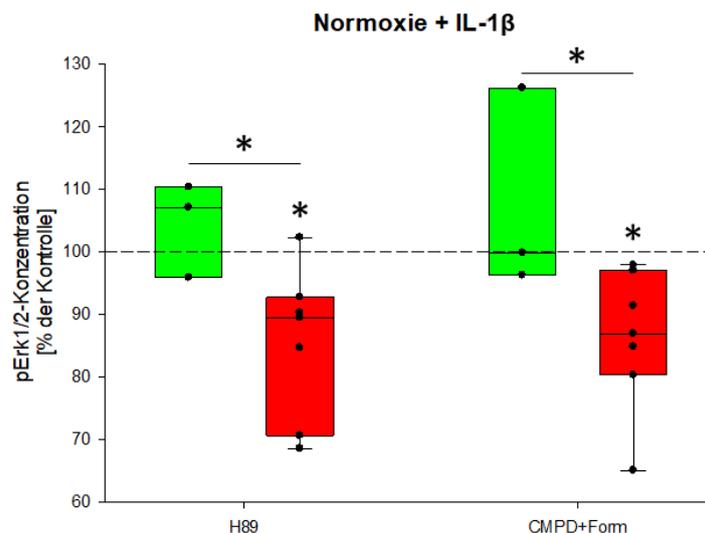


Abbildung 88: Unterschiedliche Regulation des pErk1/2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. Form: β -AR-Agonist, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=3$, $n(\text{RA})=7$.

Wie auch unter Normoxie konnte bei den Gesunden keine Regulation des pErk1/2 detektiert werden (Abbildung 88). Bei den RA-Patienten dagegen kam es zu einer signifikant verminderten Konzentration des pErk1/2 durch Stimulation der Fibroblasten mit dem PKA-Inhibitor (90 %) und Kombination des GRK2/3-Inhibitors mit dem β -AR-Agonisten (85 %) (Abbildung 88).

3.7.3 Die Regulation des pNF- κ B in Fibroblasten

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der ubiquitär im Zytoplasma fast aller Zelltypen exprimiert wird (147). Er kann durch eine Vielzahl von pathogenen Stimuli aktiviert werden, wie beispielsweise bakterielle Produkte und virale Proteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Strahlung, Ischämie/Reperfusion und oxidativen Stress und ist an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt (148,149). Unter anderem gehören dazu Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen sowie die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (148,149). NF- κ B nimmt über diese Vorgänge Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in den Zellen, sowohl in akuten als auch chronischen Situationen und ist an der Pathogenese vieler Erkrankungen beteiligt, wie beispielsweise auch RA (147–149). Hierbei ist NF- κ B nicht nur für die Entstehung, sondern auch die Aufrechterhaltung der Erkrankung entscheidend (147–149). Er induziert Entzündungsmediatoren und unter anderem die Expression der Matrix-Metalloproteinasen (148,149). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt bei FLS der RA-Patienten zu Proliferation und Hemmung der Apoptose, was zur Hyperplasie des Synoviums und der Pannusbildung führt (147–149). Neben der proinflammatorischen Wirkung kann NF- κ B jedoch auch regulierend auf die Immunantwort Einfluss nehmen (147,149).

RA-Patienten

Bei den RA-Patienten trat unter Normoxie mit und ohne IL-1 β eine Hemmung des pNF- κ B durch den PKA-Inhibitor allein (90 % bzw. 80 %) und in Kombination mit der Aktivierung der Adenylatzyklase auf (80 % bzw. 75 %) (Abbildung 89). Der Aktivator der Adenylatzyklase allein bewirkte nur unter Normoxie + IL-1 β eine signifikante Hemmung des pNF- κ B auf 75 % (Abbildung 89). Die Wirkung der Kombination der beiden Reagenzien unterschied sich jedoch unter beiden Bedingungen nicht signifikant von der Wirkung des Adenylatzyklase-Aktivators oder dem PKA-Inhibitor allein (Abbildung 89).

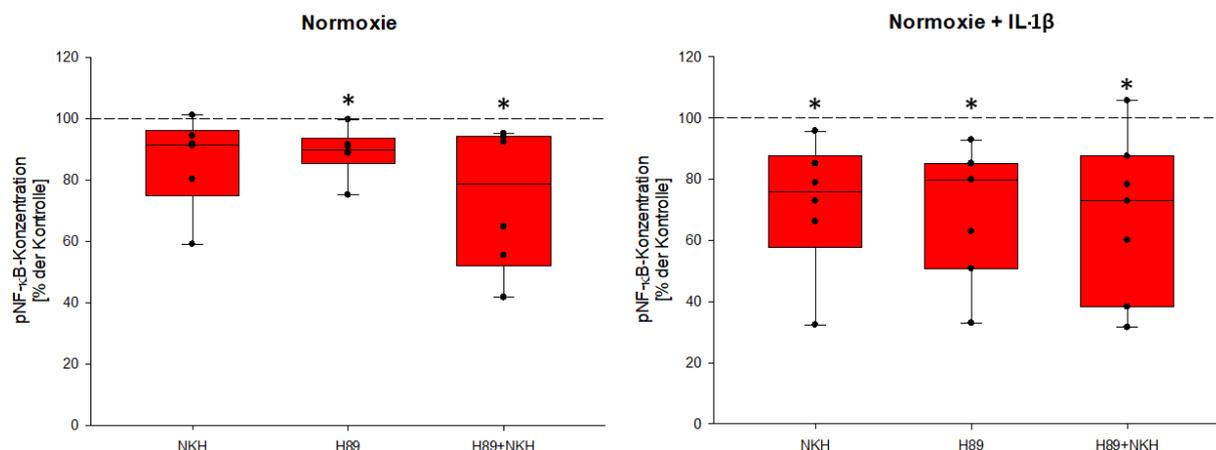


Abbildung 89: Regulation des pNF-κB bei RA-Patienten durch NKH 477, H89 und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(RA)=6-7$.

Außerdem wurde pNF-κB sowohl unter Normoxie als auch unter Normoxie + IL-1β durch den GRK2/3-Inhibitor allein (80 % bzw. 85 %) sowie den GRK2/5-Inhibitor in Kombination mit dem β-AR-Agonisten (75 % bzw. 95 %) gehemmt (Abbildung 90).

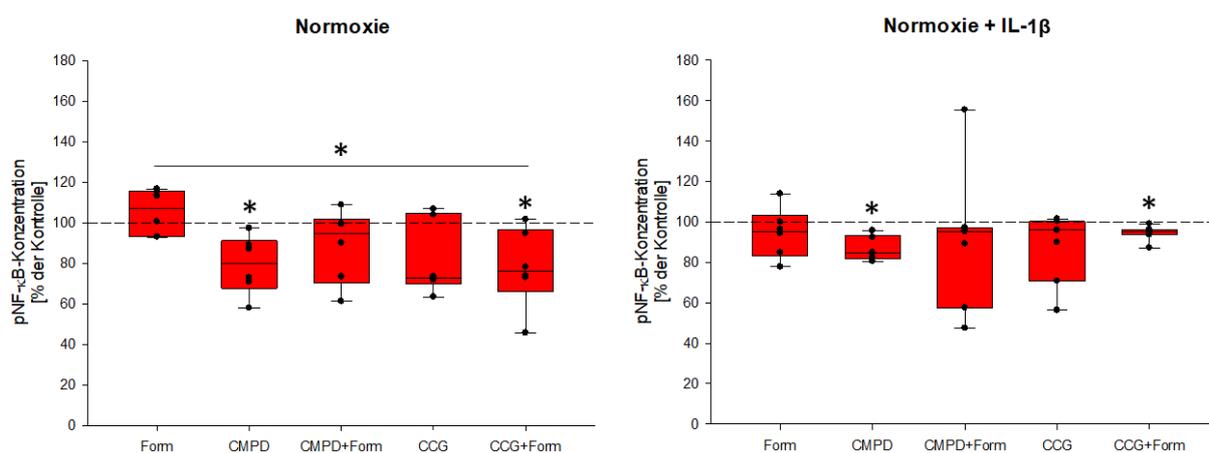


Abbildung 90: Regulation des pNF-κB bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β-AR-Agonist, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(RA)=6-7$.

Die Kombination des β-AR-Agonisten mit dem GRK2/5-Inhibitor induzierte eine Regulation des pNF-κB, die bei den Stimulanzen einzeln eingesetzt nicht detektiert werden konnte (Abbildung 90). Diese Hemmung war unter Normoxie signifikant unterschiedlich zu der Wirkung des β-AR-Agonisten allein (Abbildung 90). Die kombinierte Stimulation der Fibroblasten mit dem β-AR-Agonisten und dem GRK2/3-Inhibitor dagegen hob unter beiden getesteten Bedingungen die hemmende Wirkung, die CMPD allein hatte, auf (Abbildung 90). Dies lässt einen Zusammenhang zwischen den Signalwegen zur Regulation des pNF-κB über die GRKs und den β-AR vermuten.

Bei Simulation einer gesteigerten Entzündung durch zusätzliche Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β wurde pNF- κ B außerdem durch weitere Reagenzien gehemmt, die ohne IL-1 β keine signifikante Wirkung auf die Regulation hatten. Der Aktivator der Adenylatzyklase bewirkte beispielsweise nur unter Normoxie + IL-1 β eine signifikante Hemmung des pNF- κ B (75 %) (Abbildung 89). Dasselbe galt für den G α i-Inhibitor, der nur unter Normoxie + IL-1 β eine Hemmung des pNF- κ B auf 90 % der unstimulierten Kontrolle bewirkte (Abbildung 91). Bei zusätzlicher Stimulation des β -AR wurde die hemmende Wirkung des Pertussis-Toxin aufgehoben (Abbildung 91). Die Wirkung des β -AR-Agonisten allein veränderte sich durch die Kombination mit dem G α i-Inhibitor jedoch nicht signifikant (Abbildung 91).

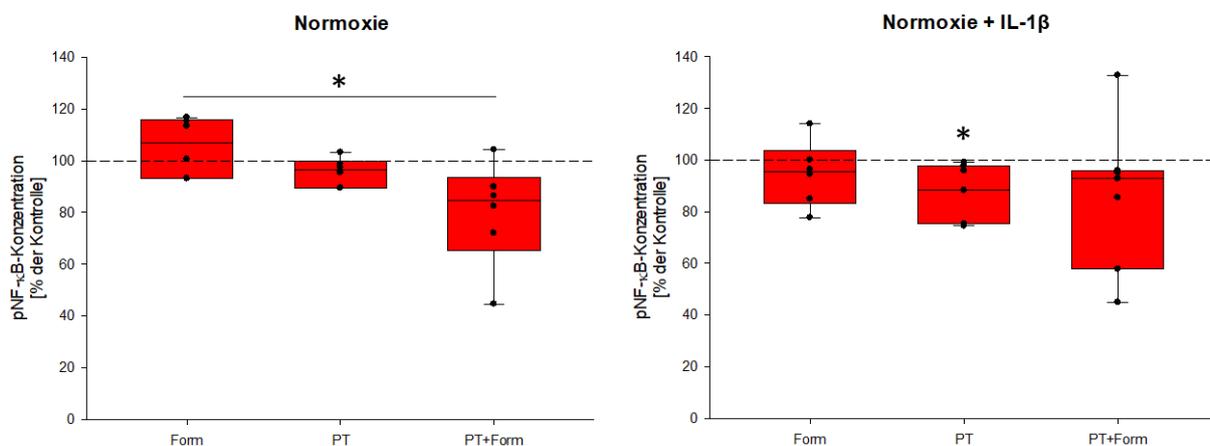


Abbildung 91: Regulation des pNF- κ B bei RA-Patienten durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor. $*$ = $p < 0,05$. $n(\text{RA})=6-7$.

Obwohl der β -AR-Agonist und der G α i-Inhibitor unter Normoxie weder einzeln noch kombiniert eine signifikante Regulation des pNF- κ B bewirkten, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit Formoterol allein und dessen Kombination mit Pertussis-Toxin detektiert werden (Abbildung 91). Die Wirkung des β -AR auf die Regulation des pNF- κ B wurde demnach unter Normoxie durch den vom G α i-Inhibitor regulierten Signalweg beeinflusst.

Genauso wie bei pErk1/2 konnten die gefundenen Regulationen des pNF- κ B in keinen Zusammenhang mit den Regulationen der getesteten Zytokine gebracht werden.

Gesunde

pNF- κ B wurde bei den Gesunden lediglich unter Normoxie durch die Kombination des GRK2/5-Inhibitors mit dem β -AR-Agonisten signifikant reguliert (Abbildung 92). Hierbei kam es zu einer Hemmung des pNF- κ B auf etwa 80 % der unstimulierten Kontrolle, die sich signifikant von der Regulation des pNF- κ B durch den β -AR-Agonisten allein unterschied (Abbildung 92).

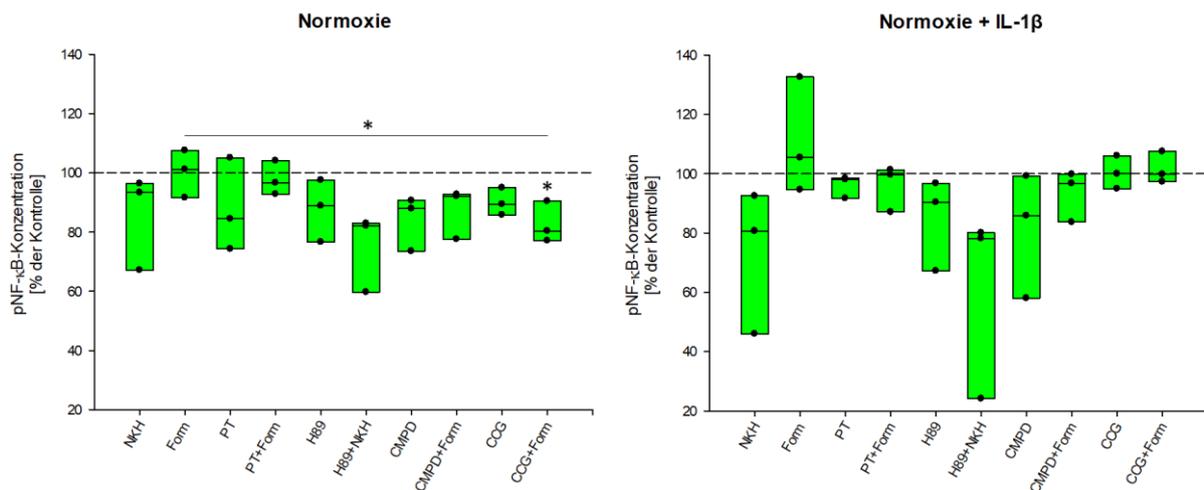


Abbildung 92: Regulation des pNF- κ B bei Gesunden. Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer unstimulierten bzw. DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor. $*=p<0,05$. $n(\text{FLN})=3$.

Bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β war keine signifikante Regulation des pNF- κ B durch die getesteten Reagenzien mehr detektierbar (Abbildung 92).

Vergleich RA-Patienten und Gesunde

Obwohl pNF- κ B bei den RA-Patienten durch viele der getesteten Reagenzien signifikant reguliert wurde und dies bei den Gesunden nur bei einem Reagenz der Fall war, wurden kaum signifikante Unterschiede beim Vergleich der Gesunden und RA-Patienten detektiert.

Der einzige signifikante Unterschied in der Regulation des pNF- κ B zwischen den Gesunden und RA-Patienten trat unter Normoxie + IL-1 β bei kombinierter Stimulation der Fibroblasten mit dem GRK2/5-Inhibitor zusammen mit dem β -AR-Agonisten auf (Abbildung 93). Während bei den Gesunden keine signifikante Regulation des pNF- κ B detektiert werden konnte, waren bei den RA-Patienten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nur 95 % des pNF- κ B detektierbar (Abbildung 93).

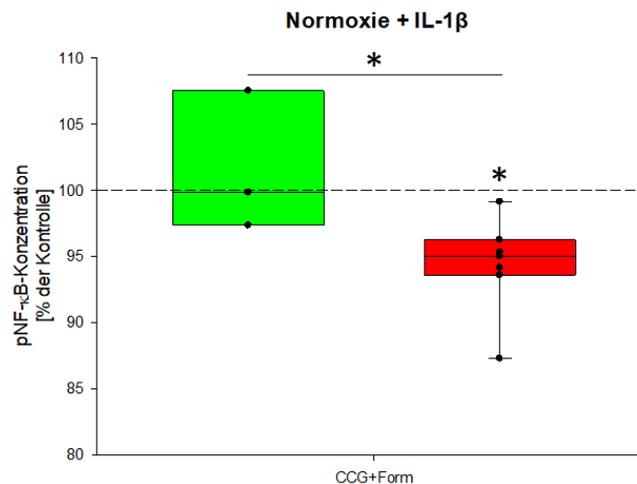


Abbildung 93: Unterschiedliche Regulation des pNF- κ B bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β . Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen, die durch Stimulation bzw. Inhibition der Fibroblasten mit verschiedenen Reagenzien, im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle (100 %), auftraten. Grün: Gesunde, rot: RA. Form: β -AR-Agonist, CCG: GRK2/5-Inhibitor. *= $p < 0,05$. $n(\text{FLN})=3$, $n(\text{RA})=7$.

3.8 Suche nach einem fluoreszenzbasierten cAMP Sensor

Um eine spezifischere Aussage über die Auswirkungen der Signalumschaltung von Gas zu Gai bzw. der Behandlung der Zellen mit Stimulanzen und Inhibitoren verschiedener Schlüsselpunkte in der Signalkaskade im Bezug auf das Vorhandensein von cAMP zu untersuchen, sollten hierfür fluoreszenzbasierte cAMP-abhängige Sensoren genutzt werden.

3.8.1 KCNQ1

Der erste Ansatz für die Suche nach fluoreszenzbasierten cAMP-Markern war der Nachweis von KCNQ1. Der Kaliumkanal wird bei β -adrenerger Stimulation üblicherweise durch die cAMP-abhängige PKA phosphoryliert, was zu einem vermehrten Kaliumstrom führt (150–153). Mittels eines FLIPR (*Fluorescent Imaging Plate Reader*) Assays kann dieser Strom mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen und gegebenenfalls mit verschiedenen Stimulanzen und Inhibitoren beeinflusst werden (154).

Bei der histologischen Untersuchung konnte der Kaliumkanal KCNQ1 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 94). Weder bei gefärbtem synovialen Gewebe noch bei isolierten synovialen Fibroblasten fiel die Färbung positiv aus (Abbildung 94). Aufgrund des fehlenden Nachweises wurde das Vorgehen zur Messung von cAMP über KCNQ1 nicht weiterverfolgt.

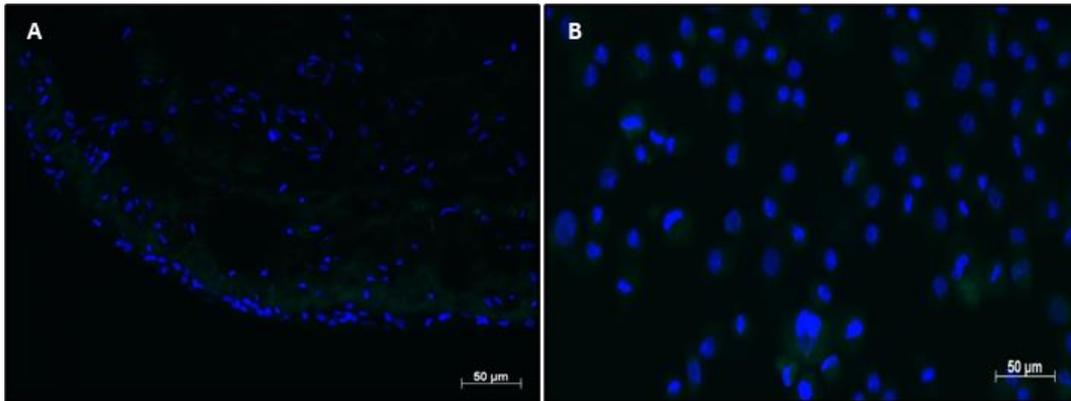


Abbildung 94: Immunhistologische Färbung des KCNQ1. Es wurde KCNQ1 (grün) sowie der Zellkern (blau) in synovialen Gewebe (A) und synovialen Fibroblasten (B) der RA-Patienten immunhistologisch gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

3.8.2 Epac-abhängiger FRET-Sensor

3.8.2.1 Transfektion der synovialen Fibroblasten mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor

Durch die Transfektion ohne einen viralen Vektor war der Nachweis des cAMP mittels des Epac-abhängigen FRET-Sensors nicht möglich. Weder mit Lipofectamine 2.000 oder Lipofectamine 3.000, PolyFect, Elektroporation, FuGene 6 oder X-treme Gene 9 gelang es in den synovialen Fibroblasten einen Farbumschlag bzw. eine Veränderung des FRET-Signals als Nachweis für veränderte cAMP-Konzentrationen durch Stimulation der Zellen zu detektieren.

Die Elektroporation mit dem Programm P-023 für eine hohe Transfektionsrate überlebten die synovialen Fibroblasten nicht, eine Analyse der Zellen unter dem Mikroskop war nicht möglich.

Bei den anderen Transfektionsmethoden war jeweils ein ähnliches Bild unter dem Mikroskop erkennbar. Die synovialen Fibroblasten hatten eine sehr hohe Eigenfluoreszenz und so war es optisch nicht eindeutig ersichtlich, welche Zelle transfiziert war und welche nicht. Außerdem waren die synovialen Fibroblasten, die am ehesten positiv zu sein schienen, nicht homogen gefärbt und nur minimal leuchtender als die restlichen Zellen (Abbildung 95). Bei den HEK-Zellen dagegen waren jeweils einige Zellen deutlich positiv, was zeigte, dass die Transfektionsmethoden bei den HEK-Zellen technisch funktionierten.

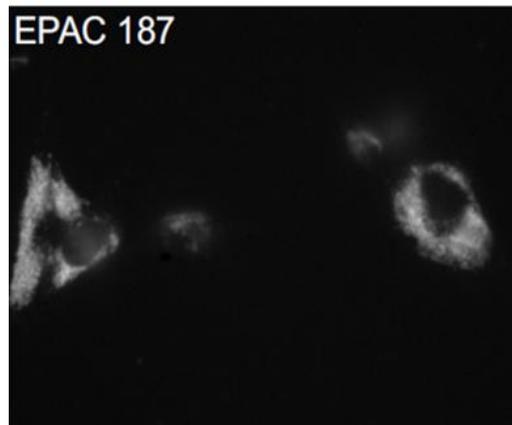


Abbildung 95: Transfizierte synoviale Fibroblasten. Synoviale Fibroblasten der RA-Patienten zeigten eine schwache, heterogene Färbung nach Transfektion mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor.

Bei dem Versuch die cAMP-Produktion durch Stimulation der Zellen anzuregen und einen Farbumschlag zu detektieren, waren keine Änderungen des FRET-Signals bei den synovialen Fibroblasten messbar. Weder Forskolin, Isoprenalin, NKH 477, Pertussis-Toxin, Dibutyryl-cAMP, noch eine Kombination verschiedener Stimulanzen bewirkte einen Farbumschlag. Zur Kontrolle wurden auch die transfizierten HEK-Zellen stimuliert. Bei ihnen war eine Aktivierung der cAMP-Produktion nachweisbar. Die Ratio CFP/YFP stieg bei den HEK-Zellen nach der Stimulation an, und die Zellen färbten sich von türkis zu dunkelblau, was die Funktion des Sensors anzeigte.

3.8.2.2 Transduktion der synovialen Fibroblasten mit einem lentiviralen Vektor

Die Transduktion mit dem lentiviralen Vektor war erfolgreicher als die nicht-viralen Methoden. Dennoch war der Nachweis des cAMP bei den synovialen Fibroblasten auch hierbei nicht reproduzierbar möglich. Auch bei der lentiviralen Transduktion war bei den synovialen Fibroblasten eine sehr hohe Eigenfluoreszenz detektierbar. Nur wenige einzelne Zellen waren minimal intensiver leuchtend als die anderen.

Ähnlich wie bei den nicht-viralen Transfektionsversuchen waren die HEK-Zellen, die als Kontrolle dienten, erfolgreich zu transduzieren. Einzelne HEK-Zellen leuchteten deutlich heller als andere und konnten als eindeutig positiv identifiziert werden. Auch der durch Stimulation induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration in den Zellen konnte wie erwartet über den Sensor mit einem Farbumschlag der Zellen und einem Anstieg der Ratio CFP/YFP nachgewiesen werden.

Bei der Stimulation der synovialen Fibroblasten mit Forskolin, Isoprenalin, NKH 477, Pertussis-Toxin, Dibutyryl-cAMP oder einer Kombination verschiedener Stimulanzen war bei

den meisten positiv scheinenden Zellen hingegen kein Farbumschlag und keine Änderung des FRET-Signals detektierbar.

Bei einem einzelnen synovialen Fibroblasten hatte die Detektion des cAMP mittels des Epac-abhängigen FRET-Sensors funktioniert (Abbildung 96). Durch die Stimulation der Zelle mit einem Aktivator des β -adrenergen Rezeptors konnte ein leichter Anstieg des cAMP nachgewiesen werden (Abbildung 96). Während das Signal des YFP nachließ, wurde das Signal des CFP stärker, die Ratio CFP/YFP stieg an (Abbildung 96). Bei anschließender Stimulation der Zelle mit einem Aktivator der Adenylatzyklase wurde ein deutlich stärkerer Anstieg der cAMP-Konzentration detektiert (Abbildung 96). Mit zunehmender Konzentration des cAMP färbte sich der synoviale Fibroblast von einem hellen Türkis zu einem dunklen Blau (Abbildung 96). Solche Befunde waren aber eine Rarität, und somit war an eine systematische reproduzierbare Untersuchung nicht zu denken.

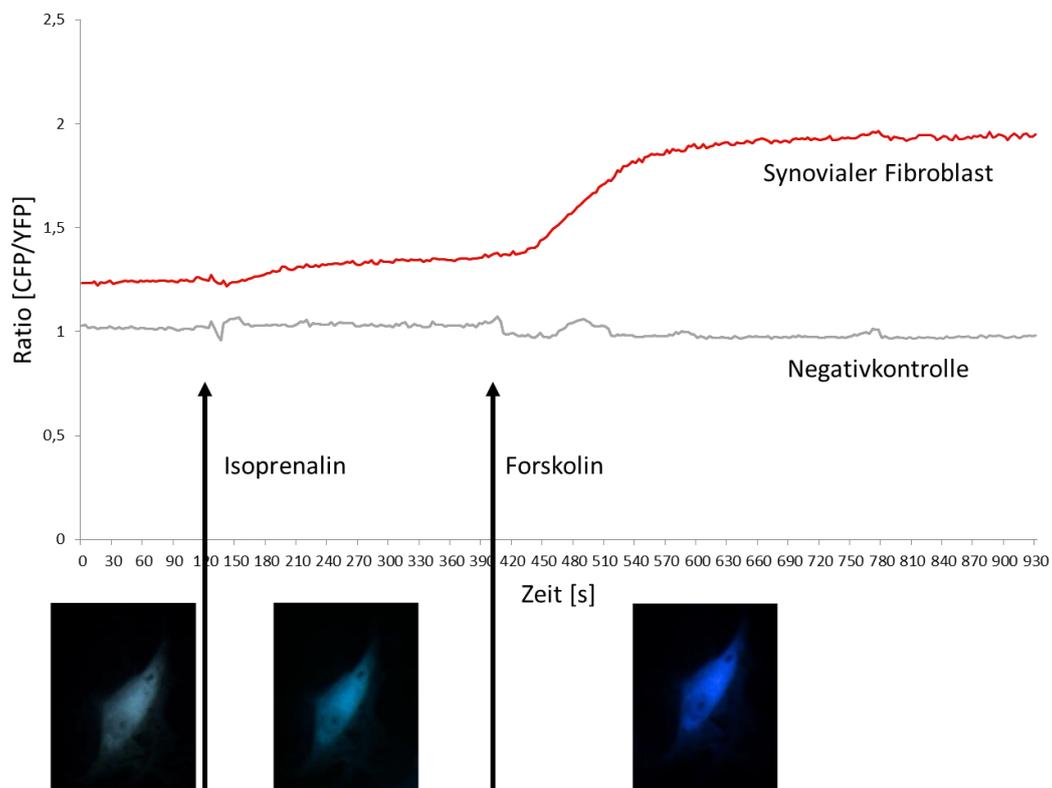


Abbildung 96: Mit einem lentiviralen Vektor transduzierter synovialer Fibroblast. Dargestellt ist die Ratio CFP/YFP eines synovialen Fibroblasten eines RA-Patienten ohne Stimulation, nach Zugabe von Isoprenalin und nach Stimulation mit Forskolin. Die Bilder des Fibroblasten demonstrieren den Farbumschlag der Zellen, der den Anstieg der Ratio widerspiegelt. Isoprenalin: Aktivator des β -AR, Forskolin: Aktivator der Adenylatzyklase.

4 Diskussion

4.1 Zellkultur

Schon beim Kultivieren der Fibroblasten wurde deutlich, dass sich die Individualität der Patienten auch in der Zellkultur widerspiegelte. Es gab große Unterschiede im Zellwachstum und der Morphologie der Zellen unterschiedlicher Patienten (Abbildung 11). Während Zellen, die aus frisch entnommenem Synovialgewebe isoliert worden waren, schneller wuchsen, gab es oft Probleme beim Anwachsen und der Vermehrung weggefrorener Zellen.

Beim Vorgang des Einfrierens und Auftauens kann es zu Zellschäden kommen (155). Es wird unter anderem die Lebensfähigkeit der Zellen beeinflusst, genauso wie die Apoptoserate, die metabolische Aktivität und das Adhäsionspotenzial (155,156). Unterschiede bezüglich der Zellzahl und der Kondition der Zellen vor dem Wegfrieren durch die Beteiligung unterschiedlicher Mitarbeiter waren möglich. Auch eine höhere Anzahl an Einfrier- und Auftauzyklen durch vorherige Arbeiten konnte nicht ausgeschlossen werden. Die Zeit, die die Zellen weggefroren waren, unterschied sich ebenfalls von Patient zu Patient und konnte Einfluss auf den Zustand der Zellen gehabt haben.

Eine weitere Ursache für die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen lag in der Passage. Während Zellen direkt nach der Isolation (Passage 0) noch teilungsfreudig erschienen, nahm diese Eigenschaft mit zunehmender Zellteilung ab, wie es auch zuvor bei anderen Arbeiten mit synovialen Fibroblasten von RA-Patienten beobachtet worden war (157). Allgemein gelten synoviale Fibroblasten von RA-Patienten als tendenziell langsam wachsend (157). Auch die Morphologie änderte sich mit zunehmender Passage. Da die meisten aufgetauten Zellen bereits in Passage 3 oder höher waren, erklärt das die Unterschiede beispielsweise zwischen frisch isolierten synovialen Fibroblasten der RA-Patienten und den FLNs, die gefroren versandt worden waren. Es ist bekannt, dass sowohl die Passage als auch die Zeit der Zellen in Kultur Einfluss auf die Zellphysiologie haben können, wie beispielsweise auf die Größe der Zellen, ihre Morphologie, Wachstumseigenschaften und auch die Genexpression (157–160). Eventuell spielte die Passage auch eine Rolle bei der Verträglichkeit des Einfrierens und der Fähigkeit, sich danach wieder zu erholen.

Weitere Faktoren, die das Zellwachstum und die Morphologie beeinflusst haben könnten, waren das Geschlecht der Patienten und ihr Alter. Außerdem standen die Patienten

unter dem Einfluss unterschiedlicher Medikamente gegen die Grundkrankheit und unterschiedliche Komorbiditäten. Aufgrund der geringen Patientenzahl, die für die Versuche zur Verfügung stand, konnten die daraus resultierenden Effekte nicht getrennt analysiert werden.

Unterschiede, die sich zwischen den FLNs und RA-Zellen dargestellt haben, lagen vermutlich unter anderem auch am Aktivitätszustand der Zellen. Die synovialen Fibroblasten wurden aus akut entzündetem Gewebe isoliert, was mit einer höheren Grundaktivität einhergeht, als dies üblicherweise bei Zellen aus gesundem Gewebe der Fall ist (157,161).

Außerdem sind die untersuchten und verglichenen Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft. Aus Studien ist bekannt, dass sich Fibroblasten abhängig von ihrem anatomischen Ursprungsort spezialisieren und unterschiedliche Funktionen erfüllen (162). Synoviale Fibroblasten der RA-Patienten unterscheiden sich beispielsweise abhängig vom Gelenk, aus dem sie stammen, in ihrem Transkriptom, Epigenom und ihrer Funktion (163,164). Der gelenkspezifische Phänotyp sorgt für eine ausgeprägte funktionelle Vielfalt mit beispielsweise unterschiedlichen adhäsiven, proliferativen, chemotaktischen und Matrix-abbauenden Eigenschaften und damit für eine einzigartige Mikroumgebung (163,164).

4.2 Grundvoraussetzungen für die Umschaltung des Signalweges von $G_{\alpha s}$ zu $G_{\alpha i}$

Aus der Literatur war bekannt, dass es am β_2 -AR zu einer Umschaltung der Signalweiterleitung von $G_{\alpha s}$ zu $G_{\alpha i}$ kommen kann (96,97,100,103,105). Bei diesen Arbeiten konnte gemeinsames Binden von PDE4 und β -Arrestin an den Rezeptor beobachtet werden (97,103). Des Weiteren scheint diese Situation vor allen Dingen dann vorzukommen, wenn eine inflammatorische Situation vorliegt.

Im entzündeten Gewebe eines RA-Patienten liegt typischerweise ein Sauerstoffgehalt zwischen 2 % und 4 % vor (53–55). Um diese Begebenheit zu simulieren, wurden die Versuche zusätzlich zur Normoxie auch unter Hypoxie durchgeführt, was eine entzündliche Situation erzeugen kann. Außerdem ist bekannt, dass bei RA-Patienten eine erhöhte Konzentration des IL-1 β im synovialen Gewebe vorliegt (117). Um die Entzündungssituation zu simulieren, wurden die Zellen unter Normoxie und auch unter Hypoxie mit und ohne IL-1 β stimuliert.

Durch die verschiedenen Bedingungen wurden drei Vergleichsplattformen geschaffen, unter denen die $G_{\alpha s}$ -zu- $G_{\alpha i}$ -Umschaltung untersucht werden konnte (Abbildung 97). Hierbei

wurden die Gesunden unter nichtentzündlichen Bedingungen mit entzündlichen Bedingungen, die durch Hypoxie oder/und IL-1 β simuliert wurden, verglichen. Außerdem wurden die Unterschiede zwischen den Gesunden und den RA-Patienten unter jeweils derselben Bedingung untersucht. Die dritte Plattform stellten die RA-Patienten dar, bei denen die Entzündung durch Hypoxie oder/und IL-1 β noch weiter gesteigert wurde.

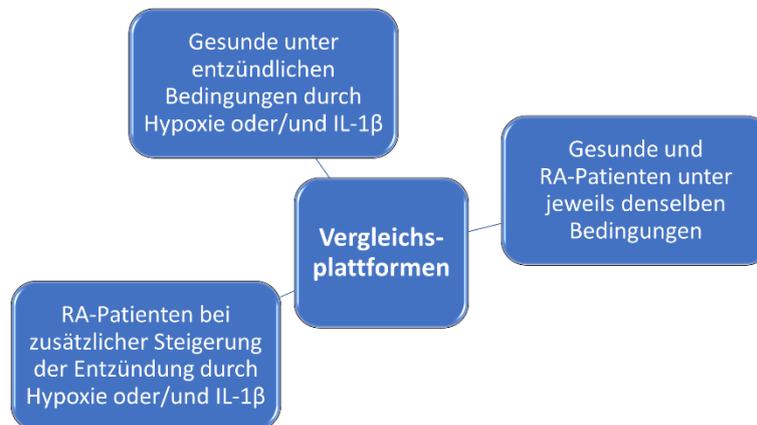


Abbildung 97: Plattformen zur Untersuchung einer Gas-zu-Gai-Umschaltung

Zunächst konnte gezeigt werden, dass der β 2-AR im synovialen Gewebe und auch den isolierten synovialen Fibroblasten vorhanden war (Abbildung 12). Schon dieser Befund ist bedeutend, weil man üblicherweise eine Hemmung des proinflammatorischen Zytokins TNF über den β 2-AR erwarten würde, was aber bei dieser Krankheit nicht zur Wirkung kommt, weil wahrscheinlich eine Rezeptorumschaltung von G α s zu G α i eine entscheidende Rolle spielt. Auch gemeinsam gebundenes PDE4 und β -Arrestin konnte nachgewiesen werden (Abbildung 13 und Abbildung 14). Nachdem diese Grundvoraussetzungen in vorherigen Arbeiten in gemischten synovialen Zellen nachgewiesen worden waren, konnte nun gezeigt werden, dass dies auch für die synovialen Fibroblasten der Fall ist (103). Außerdem konnten die Untereinheiten der G-Proteine, die an einer G α s-zu-G α i-Umschaltung beteiligt sind, in den synovialen Fibroblasten detektiert werden. Sowohl G α s als auch G α i1 und G α i2 waren stark vertreten (Abbildung 15). Dies konnte zuvor ebenfalls in einer anderen Arbeit in Monozyten beobachtet werden, bei denen die G α s-zu-G α i-Umschaltung nach Verbrennungsverletzungen untersucht wurde (105). Da die Grundvoraussetzungen erfüllt waren, sollte ein Umschalten des Signalweges von G α s zu G α i prinzipiell möglich sein.

4.3 Relevante Zielparameter für die Signalumschaltung von Gas zu G α i

In bisherigen Arbeiten, die eine Umschaltung der Signalweiterleitung von Gas zu G α i untersuchten, wurde meistens TNF als Marker für eine proinflammatorische Signalweiterleitung gewählt (103,105). Zum einen ist TNF ein typischer Entzündungsmarker, zum anderen ist bekannt, dass TNF im Zusammenhang mit G α i-Signalwegen steht (165–168). Auch in Bezug auf RA ist TNF ein wichtiger krankheitsfördernder Faktor, weshalb die Untersuchung des TNF in diesem Zusammenhang sinnvoll ist (3,15,47–52).

Da Fibroblasten jedoch kein TNF produzieren, mussten andere Parameter gefunden werden, die die Signalumschaltung sichtbar machen konnten. Hierfür wurden Proteine ausgewählt, die durch Stimulation der Adenylatzyklase reguliert wurden und mit Entzündungsreaktionen bzw. RA assoziiert sind. Durch den *Human Cytokine Array* fiel die Wahl auf IL-6, IL-8 und PAI-1, genauso wie IL-12p70 und SDF-1 (Abbildung 16). Durch den RNA-Microarray sind zusätzlich BMP2, BMP6, IL-33, Osteoprotegerin, IL-1ra, GAS1, CCL2 und VEGF-C in den Fokus geraten (Tabelle 39). Nach Ausschluss jener Proteine, die nicht mittels ELISA detektierbar waren, wurde das Hauptaugenmerk auf IL-6, Osteoprotegerin, PAI-1, CCL2 und VEGF-C gelegt.

IL-6 ist in der Lage lokale Entzündungen zu induzieren und aufrecht zu erhalten und dadurch die Zerstörung der Gelenke zu beeinflussen (115,116). Osteoprotegerin hat schützende Funktionen, da es durch die Hemmung der Bildung von Osteoklasten die Knochenerosion hemmt und an der Regulation der Knochenbildung und Knochenresorption beteiligt ist (118,120). PAI-1 ist ein Regulator des fibrinolytischen Systems, indem es die Umwandlung des Plasminogen zu Plasmin hemmt (121–124). Außerdem ist die PAI-1-Expression bei RA erhöht und mit der Krankheitsaktivität assoziiert (126,128). CCL2 wirkt chemotaktisch und nimmt unter anderem über die Osteoklastengnese und Angiogenese Einfluss auf die Entwicklung der RA (129–131). VEGF-C vermittelt ebenfalls Angiogenese und zusätzlich Lymphangiogenese, wodurch es die Synovitis beeinflusst (169,170).

Bei den ersten Versuchen mit einer Dosis-Wirkungskurve des Adenylatzyklase-Aktivators NKH 477 wurde deutlich, dass die 5 ausgewählten Proteine abhängig vom Sauerstoffgehalt der Luft und der zusätzlichen Stimulation mit IL-1 β signifikant reguliert wurden (Abbildung 18 bis Abbildung 21). Außerdem wurde ein deutlicher Effekt des

Adenylatzyklase-Aktivators detektiert, der bei einer Konzentration von 10^{-6} M sichtbar wurde (Abbildung 18 bis Abbildung 21). Auf dem Boden dieser ersten Ergebnisse wurde die Konzentration des NKH 477 für die weiteren Versuche auf 10^{-6} M festgelegt.

Außerdem konnte bereits bei diesen Versuchen festgestellt werden, dass die Regulationsmechanismen nicht für alle Proteine einheitlich waren. Während manche mehr von den induzierten Entzündungsreaktionen durch IL-1 β beeinflusst wurden, war bei anderen der Sauerstoffgehalt der Luft der entscheidende Faktor für die Regulation.

4.4 Die Regulation der einzelnen Proteine

Neben der Wirkung des Sauerstoffgehaltes der Luft, der Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β , sowie Stimulation der Adenylatzyklase sollten außerdem andere Schlüsselpunkte in der Signalkaskade über G α s und G α i bezüglich ihres Effekts auf die Zytokine untersucht werden. In den durchgeführten Versuchen wurden zusätzlich zu IL-6, Osteoprotegerin, PAI-1 und CCL2 auch pCREB, pErk1/2 und pNF- κ B analysiert, die alle mit Entzündungsreaktionen oder der Pathogenese der RA assoziiert sind.

Bei einer Signalweiterleitung des β -AR über den kanonischen G α s-Signalweg wird die Adenylatzyklase aktiviert, die durch die Steigerung der cAMP-Konzentration zu antiinflammatorischen Signalweiterleitungen führt (96,97,100). Kommt es stattdessen zu einer G α s-zu-G α i-Umschaltung wird das Signal vom stimulierten Rezeptor über G α i vermittelt und führt zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege. Neben G α i spielen die GRKs, die PKA, β -Arrestin und PDE4 eine entscheidende Rolle bei dieser Umschaltung (genauer beschrieben unter 1.2.5 G α s-zu-G α i-Umschaltung und in Abbildung 9) (84,96,97,100,103).

Da es bisher noch keine Veröffentlichungen gibt, die die in diesem Teil der Arbeit untersuchten Zusammenhänge betrachten, war es nicht möglich die folgenden Ergebnisse mit der Literatur zu vergleichen.

4.4.1 G α s-zu-G α i-Umschaltung bei entzündlicher Konstellation

Durch RA oder auch die Simulation einer Entzündung bei Gesunden konnten typische G α s-zu-G α i-Umschaltungen detektiert werden. Hierbei wurde das Signal nicht mehr vom β -AR über G α s an die Adenylatzyklase weitergeleitet. In den meisten Fällen konnte die Umschaltung durch Hemmung des G α i oder/und Hemmung der GRKs rückgängig gemacht werden.

IL-6

Bei den RA-Patienten konnte unter Normoxie bei Simulation einer gesteigerten Entzündung durch IL-1 β eine G α s-zu-G α i-Umschaltung beobachtet werden. Hierbei konnte keine cAMP-bedingte Regulation des IL-6 über den G α s-Pfad detektiert werden (Abbildung 28). Stattdessen kam es durch Aktivierung des β -AR zu einer Signalweiterleitung über G α i, die eine gesteigerte IL-6-Konzentration bewirkte (Abbildung 29). Die IL-6-Steigerung durch den aktivierten β -AR konnte sowohl durch Hemmung des G α i mit Pertussis-Toxin als auch durch die GRK-Inhibitoren aufgehoben werden (Abbildung 29 und Abbildung 30).

Die G α s-zu-G α i-Umschaltung führte demnach zu einer proinflammatorischen Situation bei stimuliertem β -AR, die durch G α i, GRK2/3 und GRK2/5 vermittelt wurde (Abbildung 98). Gleichzeitig hatten G α s, cAMP und die PKA keinen Einfluss mehr auf die Regulation des IL-6.

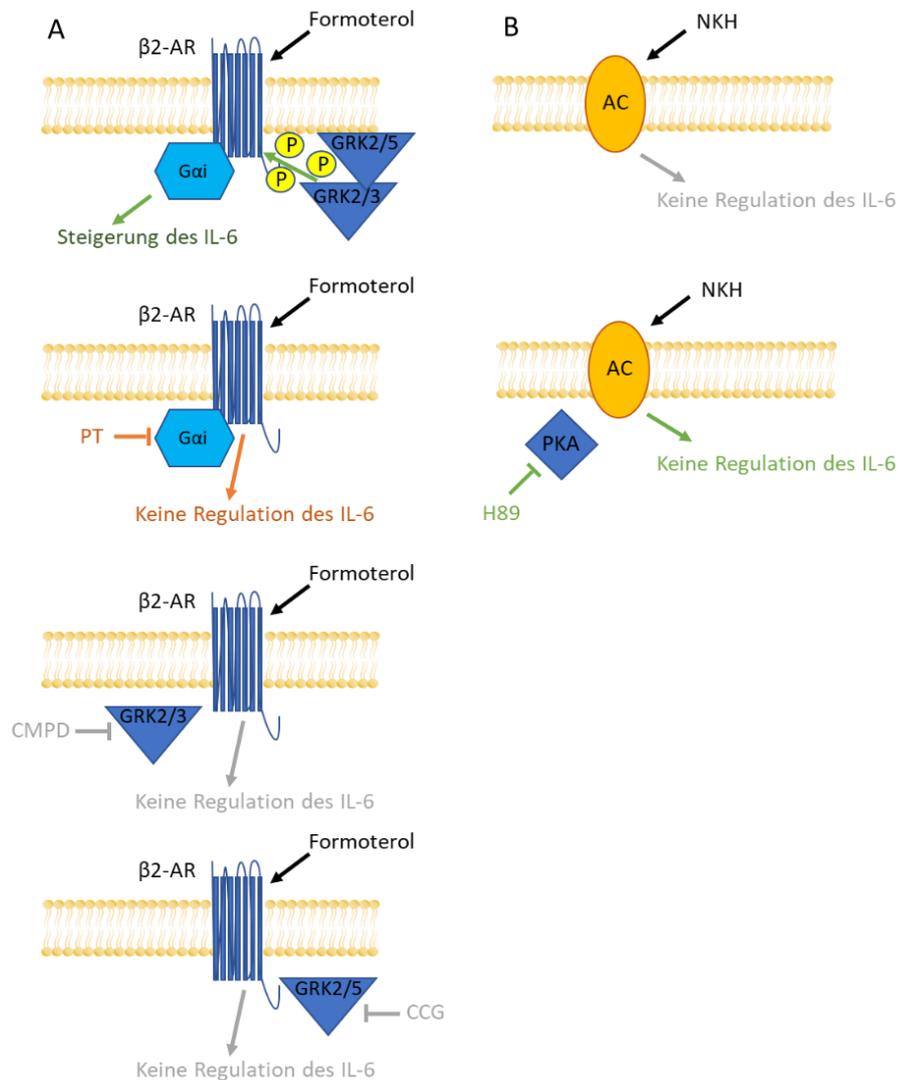


Abbildung 98: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des IL-6. Unter (A) dargestellt sind die Umschaltungen der Signalweiterleitung des β -AR. Während Formoterol allein eine Steigerung des IL-6 über G α i bewirkt, wird der Effekt bei Hemmung des G α i, der GRK2/3 oder der GRK2/5 aufgehoben. Unter (B) sieht man die Umschaltung der Signalweiterleitung der Adenylatzyklase. Durch Stimulation der Adenylatzyklase durch NKH 477 wird keine Regulation des IL-6 bewirkt, auch nicht bei gleichzeitiger Hemmung der PKA. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor, AC: Adenylatzyklase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.

Bei den Gesunden konnte durch Simulation einer Entzündung durch Hypoxie und IL-1 β eine G α s-zu-G α i-Umschaltung beobachtet werden. Formoterol führte zu einer Steigerung des IL-6, was durch eine Hemmung des G α i mit Pertussis-Toxin abgestellt werden konnte (Abbildung 33). Das war unerwartet, weil man somit eine G α i-bedingte Steigerung des IL-6 erkannte und die übliche G α s-bedingte Steigerung des cAMP keine Rolle für IL-6 zu spielen schien. Dafür spricht auch die fehlende Wirkung des NKH 477 (Abbildung 32). Der Aktivator der Adenylatzyklase bekam erst wieder eine Bedeutung, wenn der PKA-Hemmer H89 ins Spiel kam, was für die PKA-bedingte Hemmung des IL-6-Anstiegs spricht (Abbildung 32). Auch das

war unerwartet, weil man unter den kanonischen Bedingungen eine cAMP-PKA-bedingte Steigerung des IL-6 erwarten würde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die GRK3 in die Umschaltung zur proinflammatorischen Wirkung des β -AR-Agonisten involviert war (Abbildung 34). Es konnte also durch eine Kombination aus Hypoxie und IL-1 β eine Situation bei Gesunden erzeugt werden, die eine Art von Gas-zu-G α i-Umschaltung provozierte. G α i und die GRK3 bekamen so eine pro-IL-6-Wirkung und Gas, cAMP und PKA verloren sie (Abbildung 99).

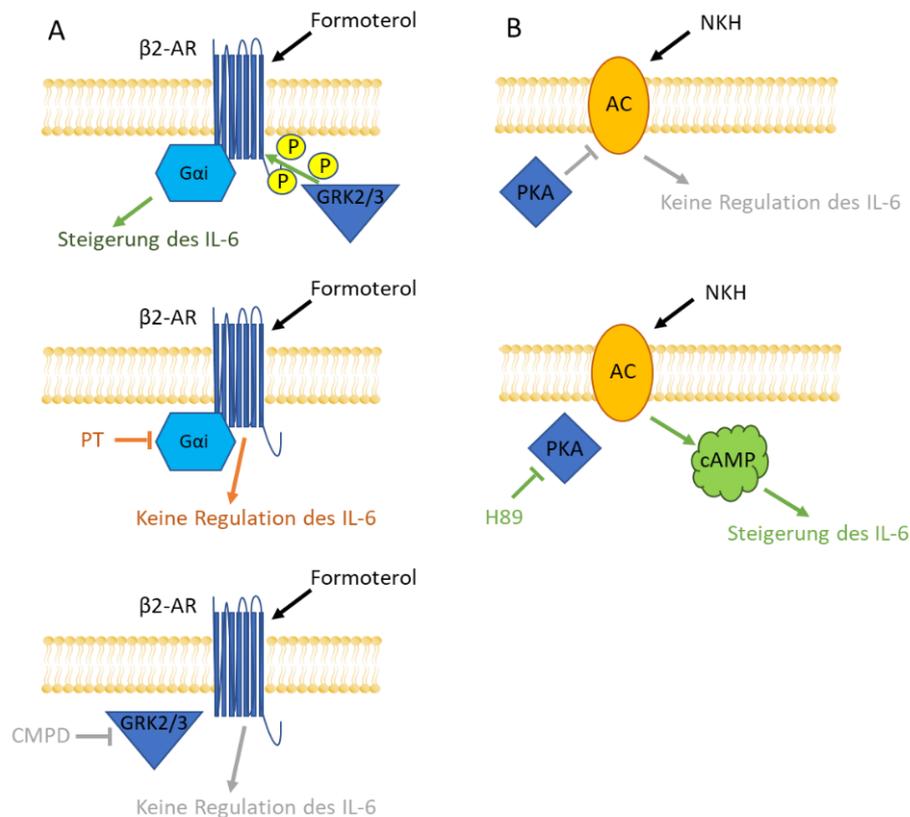


Abbildung 99: Umschaltung der Signalweiterleitung bei Gesunden unter Hypoxie + IL-1 β bei der Regulation des IL-6. Unter (A) dargestellt sind die Umschaltungen der Signalweiterleitung des β -AR. Während Formoterol allein eine Steigerung des IL-6 über G α i bewirkt, wird der Effekt bei Hemmung des G α i oder der GRK2/3 aufgehoben. Unter (B) sieht man die Umschaltung der Signalweiterleitung der Adenylatzyklase. Durch die PKA wird die Wirkung des NKH 477 unterbunden. Erst bei Hemmung der PKA durch H89 kommt es zu einer Steigerung des IL-6. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor, AC: Adenylatzyklase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.

Osteoprotegerin

Auch bei der Regulation des Osteoprotegerins bei den Gesunden konnte eine Gas-zu-G α i-Umschaltung durch Simulation einer Entzündung provoziert werden. Unter Normoxie + IL-1 β war es nicht möglich eine Regulation über Gas oder cAMP durch Stimulation des β -AR oder der Adenylatzyklase allein zu bewirken (Abbildung 46). Die Wirkung des Adenylatzyklase-Aktivators war durch die Aktivität der PKA aufgehoben, sodass erst durch

deren Hemmung eine verminderte Konzentration des Osteoprotegerins detektiert werden konnte (Abbildung 45). Die Wirkung des β -AR-Agonisten konnte nur bei gleichzeitiger Inhibition des G α i detektiert werden (Abbildung 47).

Unter Normoxie + IL-1 β waren demnach die PKA und G α i an der Gas-zu-G α i-Umschaltung bei der Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden beteiligt, die beide eine Steigerung des Osteoprotegerins bewirkten (Abbildung 100). Die GRKs, die zuvor bei IL-6 bei der Umschaltung von Gas zu G α i von Bedeutung waren, spielten dagegen keine Rolle (Abbildung 44).

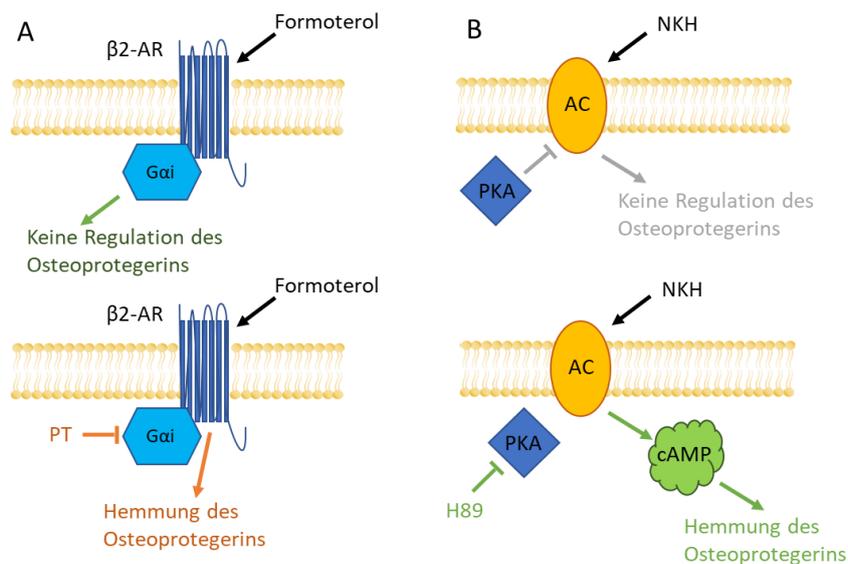


Abbildung 100: Umschaltung der Signalweiterleitung bei Gesunden unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des Osteoprotegerins. Unter (A) dargestellt sind die Umschaltungen der Signalweiterleitung des β -AR. Während Formoterol allein keine Regulation des Osteoprotegerins bewirkt kann durch Kombination mit dem G α i-Inhibitor eine Hemmung des Osteoprotegerins detektiert werden. Unter (B) sieht man die Umschaltung der Signalweiterleitung der Adenylatzyklase. Durch die PKA wird die Wirkung des NKH 477 unterbunden. Erst bei Hemmung der PKA durch H89 kommt es zu einer Hemmung des Osteoprotegerins. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, AC: Adenylatzyklase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.

PAI-1

Bei den Gesunden konnte bei der Regulation des PAI-1 eine unerwartete teilweise Gas-zu-G α i-Umschaltung bereits ohne Simulation einer Entzündung beobachtet werden. Unter Normoxie bewirkte die Stimulation des β -AR eine deutlich geringere Hemmung des PAI-1 als es beim Aktivator der Adenylatzyklase der Fall war (Abbildung 59). Das war ungewöhnlich, da das Signal bei der kanonischen Signalweiterleitung vom β -AR über Gas an die Adenylatzyklase weitergegeben werden würde, ohne dabei in diesem Ausmaß vermindert zu werden. Durch Kombination des β -AR-Agonisten mit dem G α i-Inhibitor wurde PAI-1

signifikant stärker erniedrigt als ohne Pertussis-Toxin (Abbildung 61). Dies weist darauf hin, dass Gai eine Steigerung des PAI-1 über den β -AR bewirkte.

Diese Umschaltung war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei Simulation einer Entzündung durch Hypoxie. Bei Sauerstoffmangel bewirkte die G α s-zu-Gai-Umschaltung eine gänzliche Abschaltung der Wirkung des β -AR-Agonisten (Abbildung 59). Durch Kombination des β -AR-Agonisten mit dem Gai-Inhibitor konnte jedoch eine Hemmung des PAI-1 bewirkt werden, die nahezu identisch mit der Wirkung des Aktivators der Adenylatzyklase war (Abbildung 59 und Abbildung 61). Durch Hemmung des Gai konnte das Signal also wieder über G α s eine cAMP-bedingte antiinflammatorische Hemmung des PAI-1 bewirken (Abbildung 101).

Während die Umschaltung von G α s zu Gai unter Normoxie nur eine untergeordnete Rolle spielte, unterbrach sie unter Hypoxie die Signalweiterleitung vom β -AR zur Adenylatzyklase komplett. Entgegen der Beobachtungen bei den vorherigen Zytokinen konnte bei dieser Umschaltung jedoch keine Beteiligung der PKA oder der GRKs nachgewiesen werden (Abbildung 59, Abbildung 60).

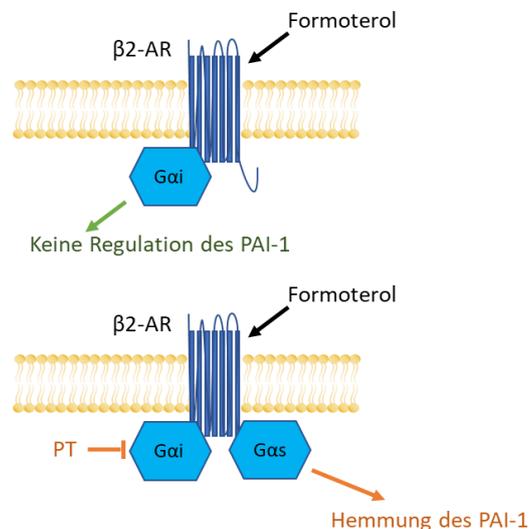


Abbildung 101: Umschaltung der Signalweiterleitung bei Gesunden unter Hypoxie bei der Regulation des PAI-1. Die Regulation des PAI-1 durch Formoterol wird bei Gesunden unter Hypoxie durch Gai verhindert. Durch Hemmung des Gai bewirkt Formoterol eine Hemmung des PAI-1 über Gas. Form: β -AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor.

CCL2

Bei der Regulation des CCL2 konnte bei den RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β eine G α s-zu-Gai-Umschaltung detektiert werden. Entgegen der cAMP-bedingten Hemmung des CCL2 durch den Aktivator der Adenylatzyklase bewirkte der β -AR-Agonist keine signifikante Regulation des CCL2 (Abbildung 67). Nur bei gleichzeitiger Hemmung des Gai (Abbildung 69)

oder Hemmung der GRK2/5 (Abbildung 71) konnte die Stimulation des β -AR eine Hemmung des CCL2 über Gas und cAMP bewirken, was für eine G α i- und GRK2/5-bedingte Steigerung des CCL2 spricht.

G α i und die GRK2/5 begünstigten demnach die Gas-zu-G α i-Umschaltung und verhinderten die Signalweiterleitung vom β -AR zur Adenylatzyklase und die damit verbundene cAMP-bedingte Hemmung des CCL2. Die Abbildung 102 fasst den Sachverhalt zusammen.

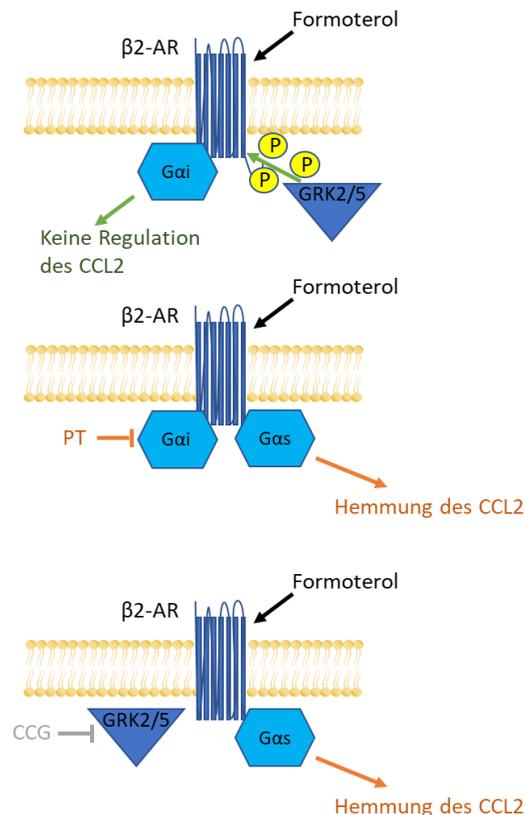


Abbildung 102: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des CCL2. Formoterol allein hat keine Wirkung auf die Regulation des CCL2 bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β , da die Wirkung durch G α i und GRK2/5 verhindert wird. Bei Hemmung des G α i oder der GRK2/5 kommt es jeweils zu einer Hemmung des CCL2 über Gas. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor.

pCREB

Auch bei der Regulation des pCREB konnte eine milde Gas-zu-G α i-Umschaltung unter Normoxie bei den RA-Patienten detektiert werden. Die Stimulation des β -AR bewirkte eine proinflammatorische Steigerung des pCREB, die nicht bei Aktivierung der Adenylatzyklase detektiert werden konnte und demnach nicht durch eine Gas-bedingte cAMP-Steigerung vermittelt wurde (Abbildung 79). Durch die Hemmung des G α i wurde die pCREB-Steigerung durch den β -AR-Agonisten signifikant vermindert was darauf hinweist, dass die

proinflammatorische pCREB-Steigerung über G α i vermittelt wurde (Abbildung 77 und Abbildung 103). Die Umschaltung war unabhängig von der Aktivität der GRKs (Abbildung 78).

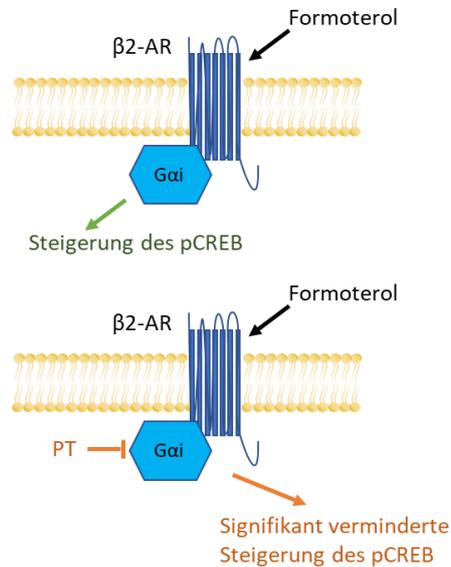


Abbildung 103: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie bei der Regulation des pCREB. Formoterol bewirkt bei den RA-Patienten unter Normoxie eine Steigerung des pCREB über G α i. Durch Hemmung des G α i kann eine signifikant verminderte Steigerung des pCREB detektiert werden. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor.

pErk1/2

Bei den RA-Patienten konnte unter Normoxie + IL-1 β eine G α s-zu-G α i-Umschaltung beobachtet werden. Die Stimulation des β -AR führte nicht zu einer Signalweiterleitung über G α s zur Adenylatzyklase, die pErk1/2 durch eine cAMP-Steigerung hemmte (Abbildung 85), sondern hatte keine Wirkung auf die Regulation des pErk1/2 (Abbildung 83). Die Weiterleitung des Signals über G α s wurde durch G α i und die GRK2/3 verhindert, die eine pErk1/2-Steigerung über den β -AR vermitteln. Erst durch deren Hemmung entsprach die Wirkung des stimulierten β -AR ungefähr der Wirkung der stimulierten Adenylatzyklase (Abbildung 83 bis Abbildung 85), was einer Signalweiterleitung des β -AR über G α s entsprach. Das Modell ist in Abbildung 104 gezeigt.

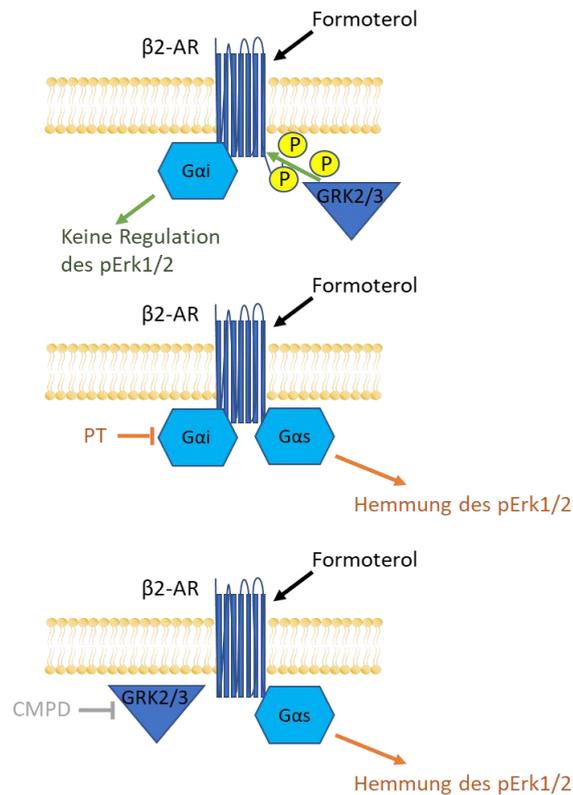


Abbildung 104: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des pErk1/2. Formoterol allein hat keine Wirkung auf die Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β , da die Wirkung durch G α i und GRK2/3 verhindert wird. Bei Hemmung des G α i oder der GRK2/3 kommt es jeweils zu einer Hemmung des pErk1/2 über G α s. Form: β -AR-Agonist, PT: G α i-Inhibitor, CMPD: GRK2/3-Inhibitor.

pNF- κ B

Bei den RA-Patienten konnte unter Normoxie eine G α s-zu-G α i-Umschaltung beobachtet werden. Die Signalweiterleitung des stimulierten β -AR war unter dieser Bedingung unterbunden, konnte jedoch durch Hemmung der GRK2/5 oder des G α i signifikant in eine pNF- κ B-hemmende Richtung verlagert werden (Abbildung 90 und Abbildung 91). Auch die Signalweiterleitung der aktivierten Adenylatzyklase war unterbunden und konnte nur bei Hemmung der PKA eingeschaltet werden (Abbildung 89).

Unter Normoxie hatten die PKA, G α i und GRK2/5 demnach steigenden Einfluss auf die pNF- κ B-Regulation, welcher die antiinflammatorische Wirkung des β -AR und der Adenylatzyklase verhinderte (Abbildung 105).

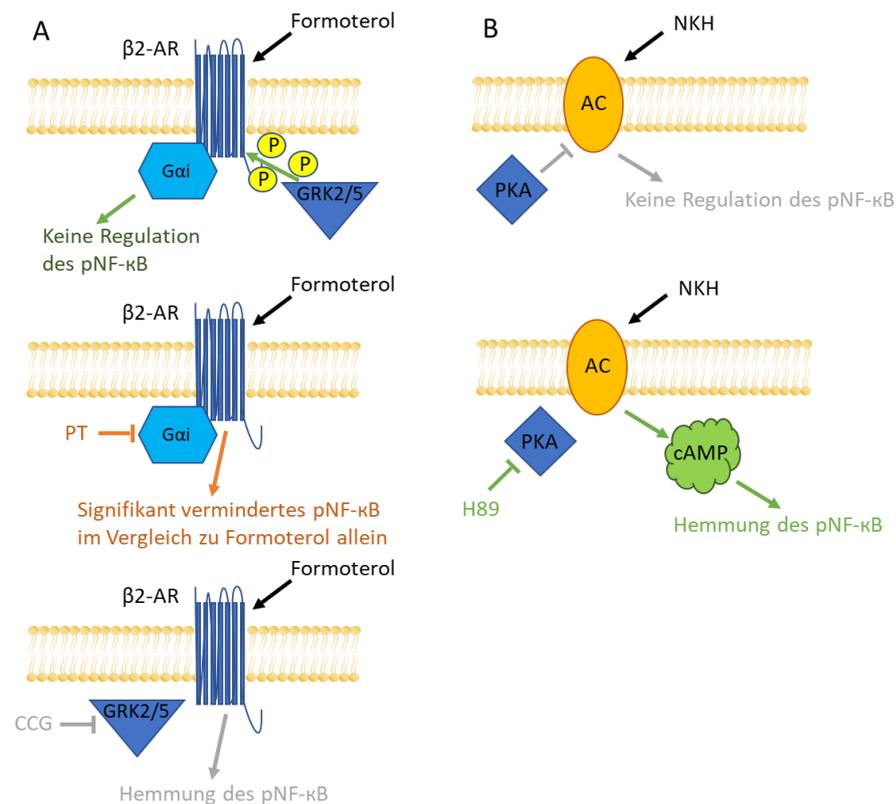


Abbildung 105: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie bei der Regulation des pNF-κB. Unter (A) dargestellt sind die Umschaltungen der Signalweiterleitung des β-AR. Formoterol allein hat keine Wirkung auf die Regulation des pNF-κB. Durch die Hemmung des Gai wird pNF-κB im Vergleich zu Formoterol allein signifikant vermindert. Durch Hemmung der GRK2/5 bewirkt Formoterol eine Hemmung des pNF-κB. Unter (B) sieht man die Umschaltung der Signalweiterleitung der Adenylatzyklase. Durch die PKA wird die Wirkung des NKH 477 unterbunden. Erst bei Hemmung der PKA durch H89 kommt es zu einer Hemmung des pNF-κB. NKH: Adenylatzyklase-Aktivator, Form: β-AR-Agonist, PT: Gai-Inhibitor, H89: PKA-Inhibitor, CCG: GRK2/5-Inhibitor, AC: Adenylatzyklase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat.

4.4.2 Abschaltungen bei entzündlicher Konstellation

Neben der Gαs-zu-Gαi-Umschaltung konnten außerdem einige Abschaltungen von Signalwegen unter den untersuchten Bedingungen detektiert werden.

Eine wichtige Ursache war in vielen Fällen, dass die durch Hypoxie oder/und IL-1β simulierte Entzündung zu einer massiven Steigerung der Zytokinproduktion führte, was weitere Regulationsmöglichkeiten durch einen anderen Signalpfad wie cAMP verhinderte. Das bedeutet, dass die inflammatorischen Stimuli der Hypoxie und des IL-1β so dominant wurden, dass subtilere Regulationsmöglichkeiten nicht mehr detektierbar waren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Beeinflussung der Adenylatzyklase vorrangig unter weitgehend nicht-entzündlichen Bedingungen zu beobachten war und unter proinflammatorischen Situationen reduziert wurde.

IL-6

Bei den RA-Patienten konnte durch die Simulation einer Entzündung beobachtet werden, dass viele Regulationsmöglichkeiten über die untersuchten Pfade abgeschaltet wurden (Abbildung 27). Besonders stark trat dies unter der entzündlichsten Bedingung, also Hypoxie + IL-1 β , auf (Abbildung 27). Dies entspricht der zuvor genannten Hypothese, dass bei starker Entzündung die Zytokinfreisetzung so stark angekurbelt wurde, dass die untersuchten G-Protein-abhängigen Regulationsmechanismen zu subtil waren und keine Wirkung mehr zeigten. Aus demselben Grund sah man bei den Gesunden unter Normoxie + IL-1 β eine Abschaltung der Regulation des IL-6 im Vergleich zur Normoxie (Abbildung 31).

Beim Vergleich der Wirkung des Aktivators der Adenylatzyklase und des β -AR-Agonisten unter Hypoxie + IL-1 β fiel außerdem auf, dass es bei den RA-Patienten zu einer Abschaltung der Signalweiterleitung des β -AR kam. Im Gegensatz zur Hemmung des IL-6 durch die stimulierte Adenylatzyklase (Abbildung 28) hatte der stimulierte β -AR keine signifikante Wirkung auf die IL-6-Konzentration (Abbildung 29). Das Signal wurde demnach nicht über Gas zur Adenylatzyklase weitergeleitet. Da keine Abhängigkeit der Wirkung des β -AR-Agonisten von den durch den G α i-Inhibitor und den anderen getesteten Reagenzien regulierten Signalwegen detektiert werden konnte, war die Abschaltung unabhängig von G α i und den GRKs (Abbildung 29 und Abbildung 30).

Osteoprotegerin

Bei den RA-Patienten konnte bei der Regulation des Osteoprotegerins eine Abschaltung der Signalwege über die GRKs unter Hypoxie beobachtet werden (Abbildung 43). Während die Hemmung der GRKs unter allen anderen Bedingungen eine Steigerung des Osteoprotegerins bewirkte, konnte unter dieser Bedingung die Rezeptorwirkung nicht stabilisiert werden (Abbildung 43).

Auch bei den Gesunden konnten einige Abschaltungen bei der Regulation des Osteoprotegerins beobachtet werden. Da die Konzentration des Osteoprotegerins unter allen untersuchten Bedingungen sehr hoch war, konnten allgemein kaum Regulationen über die untersuchten G-Protein-abhängigen Regulationsmechanismen detektiert werden (Abbildung 44). Unter Hypoxie + IL-1 β wurden bei den Gesunden jedoch alle Regulationsmöglichkeiten des Osteoprotegerins über die untersuchten Pfade abgeschaltet (Abbildung 44).

Bei den Gesunden konnte außerdem eine Abschaltung der Signalweiterleitung vom β -AR zur Adenylatzyklase beobachtet werden (Abbildung 46). Unter Normoxie und Hypoxie

bewirkte der β -AR-Agonist im Gegensatz zum Aktivator der Adenylatzyklase keine Hemmung des Osteoprotegerins (Abbildung 46). Das Signal wurde demnach nicht über $G_{\alpha s}$ zur Adenylatzyklase weitergeleitet. Da sich die Wirkung des β -AR-Agonisten auch bei Inhibition des $G_{\alpha i}$ oder der GRKs nicht der Wirkung des Aktivators der Adenylatzyklase annäherte, waren diese Signalpfade nicht für die Abschaltung der Signalweiterleitung verantwortlich (Abbildung 44).

Zusätzlich konnte bei den Gesunden die Hemmung des Osteoprotegerins durch den Aktivator der Adenylatzyklase nur unter Normoxie und Hypoxie detektiert werden (Abbildung 46). Bei Simulation einer Entzündung durch IL-1 β wurde diese Regulationsmöglichkeit aufgehoben (Abbildung 46).

PAI-1

Bei den RA-Patienten konnte eine Abschaltung vieler Regulationsmöglichkeiten des PAI-1 unter Hypoxie und Hypoxie + IL-1 β beobachtet werden (Abbildung 53). Durch die simulierte gesteigerte Entzündung durch den verminderten Sauerstoffgehalt wurde bei den Fibroblasten die PAI-1-Konzentration im Vergleich zur Normoxie deutlich gesteigert, weshalb die untersuchten Regulationswege zu subtil waren.

Bei den RA-Patienten konnte außerdem beobachtet werden, dass die Signalweiterleitung vom β -AR zur Adenylatzyklase bei der Regulation des PAI-1 in den meisten Fällen abgeschaltet war (Abbildung 53). Lediglich unter Normoxie + IL-1 β bewirkten sowohl der Aktivator der Adenylatzyklase als auch der β -AR-Agonist eine signifikante Hemmung des PAI-1 (Abbildung 53). Unter den anderen Bedingungen wurde das Signal vom β -AR nicht über $G_{\alpha s}$ an die Adenylatzyklase weitergeleitet, sondern abgeschaltet, weshalb keine cAMP-bedingte Hemmung des PAI-1 mehr detektierbar war (Abbildung 53). Da unter diesen Bedingungen weder durch Inhibition des $G_{\alpha i}$ noch der GRKs eine Annäherung an die Wirkung des Aktivators der Adenylatzyklase bewirkt wurde, war die Abschaltung der Signalweiterleitung unabhängig von diesen Signalpfaden (Abbildung 53).

Auch bei den Gesunden wurden die meisten Regulationsmöglichkeiten des PAI-1 durch Simulation einer Entzündung durch Hypoxie oder/und IL-1 β aufgehoben, besonders jedoch durch IL-1 β (Abbildung 59). Dies entspricht erneut der Hypothese, dass bei hohen Konzentrationen des Proteins, durch die Simulation der Entzündung mit IL-1 β , die untersuchten Pfade an Wirksamkeit verlieren.

Wie schon bei den RA-Patienten konnte auch bei den Gesunden eine Abschaltung/Abschwächung der Signalweiterleitung vom β -AR über G α s zur Adenylatzyklase beobachtet werden (Abbildung 59). Während unter Normoxie und Hypoxie der durch den G α i-Inhibitor regulierte Signalweg eine entscheidende Rolle dabei spielte, war die Abschaltung der Signalweiterleitung bei Simulation einer Entzündung mit IL-1 β unabhängig von G α i und den GRKs (Abbildung 59 und Abbildung 61).

CCL2

Bei den RA-Patienten konnte eine Abschaltung der Signalweiterleitung unter der gesteigerten entzündlichen Situation, die durch Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β simuliert wurde, bei der Inhibition der GRK2/3 bzw. GRK2/5 detektiert werden. Unter Normoxie und unter Hypoxie bewirkten die GRK-Inhibitoren eine gesteigerte Konzentration des CCL2 (Abbildung 70). Bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β wurde die Signalweiterleitung über die GRKs abgeschaltet, sodass deren Inhibition keine signifikante Regulation des CCL2 mehr bewirkte (Abbildung 70).

Bei den Gesunden war die Regulation des CCL2 über die G α s-/G α i-Pfade nicht von großer Bedeutung. Es konnten kaum signifikante Regulationen detektiert werden, was, wie schon zuvor bei anderen Proteinen angeführt, an der hohen Konzentration des CCL2 bei den Gesunden lag (Abbildung 73). Das führte dazu, dass sich die Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten vor allem unter Normoxie durch viele Reagenzien signifikant unterschied (Abbildung 74). Obwohl unter Normoxie + IL-1 β ebenfalls signifikante Regulationen bei den RA-Patienten detektiert wurden, die nicht bei den Gesunden auftraten, wurde durch die Simulation einer gesteigerten Entzündung mit IL-1 β eine Abschwächung der Regulationen bewirkt, die dafür sorgte, dass sich die CCL2-Konzentration der Gesunden und RA-Patienten nicht mehr signifikant unterschied.

pCREB

Bei den RA-Patienten bewirkte die Simulation einer Entzündung durch IL-1 β unter Normoxie die Abschaltung der Signalweiterleitung über den β -AR. Alle Steigerungen des pCREB durch den β -AR-Agonisten allein oder kombiniert mit dem G α i- oder den GRK-Inhibitoren wurden unter dieser Bedingung, verglichen mit der Situation unter Normoxie, abgeschaltet (Abbildung 79).

4.4.3 Einschaltung bei entzündlicher Konstellation

Neben der Abschaltung von Signalwegen konnten auch Einschaltungen durch entzündliche Bedingungen detektiert werden.

IL-6

Bei den Gesunden wurden, entgegen der Beobachtung bei den RA-Patienten (Abbildung 27), unter Hypoxie + IL-1 β die meisten signifikanten Regulationen beobachtet (Abbildung 31). Während die Simulation der gesteigerten Entzündung im hypoxischen Kniegelenk mittels IL-1 β bei den RA-Patienten also eine mögliche Regulation der G α s-/G α i-Pfade verhinderte, schien die Regulation dieser Pfade bei Gesunden erst unter dieser Bedingung richtig eingeschaltet zu werden (Vergleich Abbildung 27 und Abbildung 31). Bei den Gesunden war demnach die Simulation der Entzündung nötig, um die Regulationspfade einzuschalten, die bei den RA-Patienten durch die krankheitsbedingte Entzündung bereits beispielsweise unter Normoxie eingeschaltet waren.

PAI-1

Bei der Regulation des PAI-1 bei RA-Patienten konnte erkannt werden, dass die Bedingung der Normoxie + IL-1 β großen Einfluss hatte. Unter dieser Bedingung bewirkten alle getesteten Reagenzien eine signifikante Regulation des PAI-1 (Abbildung 53). Es kam unter dieser Bedingung zu einer Einschaltung von Regulationsmechanismen, die unter den anderen Bedingungen nicht eingeschaltet, bzw. vor allem unter Hypoxie + IL-1 β abgeschaltet waren (Abbildung 53). Ein Beispiel hierfür ist die Hemmung des PAI-1 durch den β -AR-Agonisten allein und in Kombination mit den Inhibitoren des G α i und der GRKs, die nur unter Normoxie + IL-1 β Einfluss auf die PAI-1-Regulation hatten (Abbildung 53).

pErk1/2

Die Regulation des pErk1/2 durch den Aktivator der Adenylatzyklase, den PKA-Inhibitor sowie deren Kombination war bei den RA-Patienten nur unter der gesteigerten entzündlichen Situation, bei zusätzlicher Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β , eingeschaltet (Abbildung 85).

pNF κ B

Bei den RA-Patienten konnte beobachtet werden, dass einige Reagenzien nur bei zusätzlicher Stimulation der Zellen mit IL-1 β einen signifikanten Einfluss auf die Regulation des pNF- κ B

hatten. So trat die hemmende Wirkung des Aktivators der Adenylatzyklase und des G α i-Inhibitors nur unter Normoxie + IL-1 β auf (Abbildung 89 und Abbildung 91). Die Regulation des pNF- κ B über diese Pfade wurde demnach erst durch Simulation der gesteigerten Entzündung durch die Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β eingeschaltet.

4.5 Messung des cAMP mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor

Zum direkten Nachweis des cAMP bzw. einer Konzentrationsänderung des cAMP in der Zelle wurden die synovialen Fibroblasten mit einem Epac-abhängigen FRET-Sensor transfiziert bzw. transduziert. Durch die Messung des Energietransfers nach Stimulation der Zellen sollten Unterschiede in der cAMP-Konzentration in den Zellen detektiert werden.

Nach der lentiviralen Transduktion konnte bei einem synovialen Fibroblasten eines RA-Patienten eine leicht gesteigerte cAMP-Konzentration durch Stimulation mit dem β -AR-Agonisten Isoprenalin detektiert werden (Abbildung 96). Deutlich stärker fiel der Anstieg des cAMP durch die anschließende Stimulation der Zelle mit dem Aktivator der Adenylatzyklase aus (Abbildung 96). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Signalweiterleitung vom β -AR zur Adenylatzyklase gestört war, da nicht das volle Ausmaß des Signals übertragen wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die teilweise Umschaltung des G α s-Signalweges zu einem G α i-Signalweg. Diese Umschaltung würde eine verminderte Aktivierung der Adenylatzyklase bei Stimulation des β -AR erklären.

Beim Betrachten dieses Ergebnisses muss jedoch bedacht werden, dass der Graph die einmalige Messung einer einzelnen Zelle eines einzigen RA-Patienten darstellt. Bei fast allen anderen Messungen war keine cAMP-Detektion bei den Fibroblasten der RA-Patienten möglich.

Durch ihre hohe Eigenfluoreszenz war eine klare Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen nicht eindeutig möglich. Einzelne Zellen, die heller zu leuchten schienen als andere, waren dennoch nicht in der Lage cAMP zu detektieren, weder nach Stimulation der Zellen mit Reagenzien, welche die cAMP-Produktion induzieren sollten, noch durch Zugabe von Dibutyryl-cAMP. Ob das Virus nicht in die Zellen gelangt war oder dort gehemmt und abgebaut wurde kann nicht definitiv gesagt werden. Durch die Kontrollversuche mit HEK-Zellen konnte sichergestellt werden, dass die Transfektionstechniken und der Sensor prinzipiell funktionierten.

Es gibt eine Vielzahl von Restriktionsfaktoren, die Wirtszellen vor der Infektion mit (Retro-) Viren schützen (171–173). Sie können in verschiedenen Phasen der Infektion und Virusreplikation eine Rolle spielen (171–173). Inwiefern diese Faktoren bei den synovialen Fibroblasten der RA-Patienten eine Transduktion mit dem Epac-abhängigen FRET-Sensor verhindert hatten oder welche weiteren Faktoren eine Rolle spielten wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Außerdem wurde in mehreren Studien gezeigt, dass der Erfolg der lentiviralen Transduktion durch Inhibition des Proteasomen beeinflusst werden kann (174–177). Das Proteasom stellt eine frühe intrazelluläre Abwehr gegen virale Infektionen dar (174–177). Die Inhibition des Proteasomen führt zu signifikant gesteigerter Effizienz und einer gleichmäßigeren Verteilung der Transduktion (174–177). Bei der Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor des Proteasomen wäre jedoch nicht ausgeschlossen gewesen, dass er auch Einfluss auf die Zellphysiologie der synovialen Fibroblasten und damit die zu untersuchenden Signalwege gehabt hätte, weshalb dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde.

Die einmalig gelungene Messung der cAMP-Konzentration nach Stimulation der Zelle mit dem β -AR-Agonisten und dem Aktivator der Adenylatzyklase unterstützt die Hypothese, dass es zu einer Umschaltung kam, die die Signalweiterleitung vom β -AR über G α s zur Adenylatzyklase verminderte (Abbildung 96). Da keine Daten über die Wirkung des G α i-Inhibitors auf die cAMP-Konzentration generiert werden konnten, kann lediglich vermutet werden, dass die Umschaltung des Signalweges von G α s zu G α i eine plausible Erklärung für die gehemmte Signalweiterleitung vom β -AR zur Adenylatzyklase wäre.

4.6 Limitationen der Arbeit und Ausblick für weitere Arbeiten

Die Beobachtung, dass die Zytokin-Konzentrationen der unstimulierten Kontrollen bei den Gesunden höher waren als bei den RA-Patienten stimmte nicht mit den Ergebnissen anderer veröffentlichter Arbeiten überein. Hier wurde in vielen Fällen, vor allem bei den proinflammatorischen Zytokinen, die mit einer Verschlechterung der Erkrankung einhergehen, eine erhöhte Expression bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden detektiert (129,131,132,138). In dieser Arbeit wurden die Fibroblasten der Gesunden aus Biopsien der inguinalen Lymphknoten isoliert, während die Fibroblasten der RA-Patienten aus dem Synovialgewebe des betroffenen Knies isoliert wurden. Es konnten keine Untersuchungen durchgeführt werden, inwiefern sich die Fibroblasten aus dem Synovium und den inguinalen

Lymphknoten gleichen oder unterschieden. Wie bereits unter 4.1 diskutiert können sich Fibroblasten abhängig von ihrer Herkunft in ihrer Spezialisierung und Funktion unterscheiden (162–164). Im geplanten Versuchsaufbau wären neben den Ergebnissen der Gesunden und der Langzeit-RA-Patienten außerdem die Daten der Risikopatienten und RA-Patienten in einem frühen Stadium der Krankheit vorgelegen. In diesem Fall hätte, beispielsweise durch den Vergleich der basalen Zytokin-Konzentration der Fibroblasten aus den Lymphknoten, besser beurteilt werden können, inwiefern die Fibroblasten durch die Erkrankung und inwiefern durch die Herkunft beeinflusst wurden. Da es nicht möglich war synoviale Fibroblasten von Gesunden zu untersuchen wurden die Versuche dennoch wie ursprünglich geplant durchgeführt. Es lässt sich dadurch jedoch nicht ausschließen, dass die Ergebnisse durch die unterschiedliche Herkunft der Fibroblasten beeinflusst wurden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die getesteten Zytokine sich gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen und regulieren können. Bei den durchgeführten Versuchen konnten keine eindeutigen Übereinstimmungen in den Regulationen der Zytokine und damit auch keine Zusammenhänge detektiert werden. Um hierüber jedoch eine gesicherte Aussage treffen zu können müssten in weiteren Versuchen die einzelnen Zytokine gezielt stimuliert und gehemmt werden um ihren Einfluss auf die anderen Zytokine, ohne den Einfluss weiterer Signalwege, zu untersuchen.

Außerdem wäre für zukünftige Versuche eine größere Patientenzahl anzustreben. Die *Cell-based ELISAs* wurden teilweise mit nur 3 gesunden Kontrollen durchgeführt, da nicht genug Zellen für alle Versuche zur Verfügung standen. Aufgrund der Schwankungen zwischen humanen Proben war es schwierig bei einer derart kleinen Probenzahl Signifikanzen zu detektieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der geringen Probenzahl signifikante Regulationsmechanismen und damit auch Zusammenhänge zwischen den einzelnen Zytokinen nicht detektiert werden konnten.

Aufgrund der fehlenden Aussage über die absoluten Konzentrationen der Proteine im *Cell-based ELISA* konnte nicht beurteilt werden ob, vor allem bei den Gesunden, die Proteine tatsächlich nicht über die untersuchten Pfade reguliert wurden oder wie zuvor für die anderen Proteine teilweise beobachtet in zu hohen Konzentrationen vorlagen, sodass die Regulationsmechanismen über die *Gas-* und *Gai-*Pfade zu subtil waren. Genauso ist es möglich, dass die Proteine nur gering exprimiert und reguliert werden, da sie in dem untersuchten Kontext tatsächlich keine große Rolle spielen. Ergänzende Versuche müssten

mittels eines Standards eine absolute Quantifizierung beinhalten, um diese Frage zu analysieren.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung einer G α s-zu-G α i-Signalumschaltung am β 2-AR in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten untersucht. Verglichen wurden die Signalwege in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten mit Fibroblasten aus den inguinalen Lymphknoten von gesunden Kontrollen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Voraussetzungen für eine G α s-zu-G α i-Umschaltung durch gemeinsames Binden von β -Arrestin und PDE4 an den β 2-AR gegeben waren. Außerdem konnten sowohl G α s- als auch G α i-Proteine nachgewiesen werden.

In vielen Fällen konnte eine Umschaltung der Signalweiterleitung des β -AR detektiert werden, die durch RA oder die Simulation einer Entzündung durch Hypoxie oder/und IL-1 β auch bei Gesunden ausgelöst wurde. Bei der Stimulation des β -AR, der typischerweise antiinflammatorische Signalwege über G α s induziert, konnten daraufhin proinflammatorische Effekte detektiert werden. Diese unterschieden sich stark von den cAMP-vermittelten Effekten der stimulierten Adenylatzyklase, an die das Signal ohne die Umschaltung üblicherweise weitergeleitet worden wäre.

Die beschriebene Umschaltung konnte oftmals durch Hemmung des G α i durch Pertussis-Toxin oder Hemmung der PKA durch H89 rückgängig gemacht werden, sodass die Wirkung des stimulierten β -AR der Wirkung der aktivierten Adenylatzyklase entsprach. Diese Wirkung der G α i- und PKA-Inhibitoren entspricht der Hypothese einer G α s-zu-G α i-Umschaltung, wie sie bereits zuvor auch schon in anderen Arbeiten beobachtet wurde. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die GRK2/3 und GRK2/5 ebenfalls großen Einfluss auf die Umschaltung haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei den synovialen Fibroblasten von RA-Patienten zu einer G α s-zu-G α i-Umschaltung kommt, die proinflammatorische Effekte mit sich bringt. Durch die Simulation einer Entzündung durch Hypoxie oder/und IL-1 β konnte diese Umschaltung teilweise auch bei Fibroblasten aus inguinalen Lymphknoten von Gesunden provoziert werden.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Deformationen an den Händen eines RA-Patienten.	2
Abbildung 2: Rheumatische Vorfußdeformität.	2
Abbildung 3: Klinisch beobachtete Langzeitkomplikationen der RA-Patienten.	3
Abbildung 4: Osteoporose.	4
Abbildung 5: ACPA-bedingte Pathogenese der RA.	6
Abbildung 6: Pannus.	7
Abbildung 7: Das Beispiel der Signalweiterleitung eines β 2-AR.	18
Abbildung 8: Kreislauf der G-Protein-Konformation bei Rezeptoraktivierung.	22
Abbildung 9: $G_{\alpha s}$ -zu- $G_{\alpha i}$ -Umschaltung am β 2-AR.	24
Abbildung 10: Nachweis des cAMP mit einem Epac-abhängigen FRET-Sensor.	54
Abbildung 11: Morphologische Unterschiede in der Zellkultur verschiedener RA-Patienten.	59
Abbildung 12: Immunhistologische Färbung des β 2-adrenergen Rezeptors.	61
Abbildung 13: Doppelfärbung von PDE4 und β -Arrestin in synovialem Gewebe der RA- und OA-Patienten.	62
Abbildung 14: Doppelfärbung von PDE4 und β -Arrestin in synovialen Fibroblasten der RA- und OA-Patienten.	63
Abbildung 15: Immunhistologische Färbung von $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i1}$ und $G_{\alpha i2}$ in synovialen Fibroblasten der RA-Patienten.	63
Abbildung 16: Human Cytokine Array.	64
Abbildung 17: Regulation des IL-6 durch NKH 477.	67
Abbildung 18: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477.	68
Abbildung 19: Regulation des PAI-1 durch NKH 477.	70
Abbildung 20: Regulation des CCL2 durch NKH 477.	71
Abbildung 21: Regulation des VEGF-C durch NKH 477.	72
Abbildung 22: Regulation des IL-8 durch NKH 477.	73
Abbildung 23: Immunhistologische Färbung der GRK2.	74
Abbildung 24: Immunhistologische Färbung der GRK5.	74
Abbildung 25: Immunhistologische Färbung der GRK6.	75
Abbildung 26: Stimulanzen zur Charakterisierung der Umschaltung des Signalweges von $G_{\alpha s}$ zu $G_{\alpha i}$	75
Abbildung 27: Abhängigkeit der IL-6-Regulation bei RA-Patienten von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft.	77
Abbildung 28: Regulation des IL-6 durch NKH 477 bei RA-Patienten.	78
Abbildung 29: Einfluss des Formoterol und Pertussis-Toxin auf die IL-6-Regulation bei RA-Patienten.	79
Abbildung 30: Einfluss des Formoterol, der GRK-Inhibitoren, sowie deren Kombination auf die IL-6-Regulation bei RA-Patienten.	80
Abbildung 31: Abhängigkeit der IL-6-Regulation bei Gesunden von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft.	81
Abbildung 32: Abhängigkeit der IL-6-Regulation bei Gesunden von NKH 477, H89 und deren Kombination.	82
Abbildung 33: Einfluss des Formoterol und Pertussis-Toxin sowie deren Kombination auf die IL-6-Regulation bei Gesunden.	83

Abbildung 34 Einfluss des Formoterol, der GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination auf die IL-6-Regulation bei Gesunden.	84
Abbildung 35: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie.	85
Abbildung 36: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie.	86
Abbildung 37: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β	86
Abbildung 38: Unterschiedliche Regulation des IL-6 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β	87
Abbildung 39: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 bei RA-Patienten.	88
Abbildung 40: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und Formoterol bei RA-Patienten. .	89
Abbildung 41: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und H89 sowie deren Kombination bei RA-Patienten.	90
Abbildung 42: Regulation des Osteoprotegerins durch Formoterol und Pertussis-Toxin sowie deren Kombination bei RA-Patienten.	91
Abbildung 43: Regulation des Osteoprotegerins durch Formoterol, GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination bei RA-Patienten.	92
Abbildung 44: Abhängigkeit der Osteoprotegerin-Regulation bei Gesunden von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft.	94
Abbildung 45: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und H89 sowie deren Kombination bei Gesunden.	95
Abbildung 46: Regulation des Osteoprotegerins durch NKH 477 und Formoterol bei Gesunden.	96
Abbildung 47: Regulation des Osteoprotegerins durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei Gesunden unter Normoxie + IL-1 β	97
Abbildung 48: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie.	98
Abbildung 49: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie.	99
Abbildung 50: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β	100
Abbildung 51: Unterschiedliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β	101
Abbildung 52: Gegensätzliche Regulation des Osteoprotegerins bei Gesunden und RA-Patienten. .	102
Abbildung 53: Regulation des PAI-1 bei RA-Patienten.	104
Abbildung 54: Regulation des PAI-1 durch H89 bei RA-Patienten.	105
Abbildung 55: Regulation des PAI-1 durch NKH 477, H89 und deren Kombination bei RA-Patienten.	106
Abbildung 56: Regulation des PAI-1 durch Pertussis-Toxin bei RA-Patienten.	107
Abbildung 57: Regulation des PAI-1 durch GRK-Inhibitoren bei RA-Patienten.	108
Abbildung 58: Regulation des PAI-1 durch GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination mit Formoterol bei RA-Patienten unter Normoxie und Normoxie + IL-1 β	109
Abbildung 59: Regulation des PAI-1 bei Gesunden.	110
Abbildung 60: Regulation des PAI-1 durch NKH 477, H89 und deren Kombination bei Gesunden.	111
Abbildung 61: Regulation des PAI-1 durch Formoterol und Pertussis-Toxin sowie deren Kombination bei Gesunden.	112
Abbildung 62: Regulation des PAI-1 durch Formoterol, GRK-Inhibitoren sowie deren Kombination bei Gesunden unter Normoxie.	113

Abbildung 63: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie.....	114
Abbildung 64: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie.	115
Abbildung 65: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β	116
Abbildung 66: Unterschiedliche Regulation des PAI-1 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β	117
Abbildung 67: Regulation des CCL2 durch NKH 477 und Formoterol bei RA-Patienten.....	118
Abbildung 68: Regulation des CCL2 durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei RA-Patienten.	119
Abbildung 69: Regulation des CCL2 durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β und Hypoxie + IL-1 β	120
Abbildung 70: Regulation des CCL2 bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination.	121
Abbildung 71 Regulation des CCL2 bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination unter Normoxie + IL-1 β	121
Abbildung 72: Regulation des CCL2 durch NKH 477, H89 und deren Kombination bei RA-Patienten.	122
Abbildung 73: Abhängigkeit der CCL2-Regulation bei Gesunden von IL-1 β und dem Sauerstoffgehalt der Luft.	124
Abbildung 74: Unterschiedliche Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie.....	125
Abbildung 75: Unterschiedliche Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie.	126
Abbildung 76: Unterschiedliche Regulation des CCL2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Hypoxie + IL-1 β	127
Abbildung 77: Regulation des pCREB durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination bei RA-Patienten unter Normoxie.....	128
Abbildung 78: Regulation des pCREB durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination bei RA-Patienten unter Normoxie.....	129
Abbildung 79: Regulation des pCREB bei RA-Patienten.....	129
Abbildung 80: Vergleichende Darstellung der Regulation des IL-6, Osteoprotegerin, CCL2 und pCREB.	130
Abbildung 81: Regulation des pCREB bei Gesunden.....	131
Abbildung 82: Unterschiedliche Regulation des pCREB bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie.....	132
Abbildung 83: Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination.....	133
Abbildung 84: Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination.....	134
Abbildung 85: Regulation des pErk1/2 bei RA-Patienten durch NKH, H89 und deren Kombination..	135
Abbildung 86: Regulation des pErk1/2 bei Gesunden.....	135
Abbildung 87: Unterschiedliche Regulation des pErk1/2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie.....	136
Abbildung 88: Unterschiedliche Regulation des pErk1/2 bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β	136

Abbildung 89: Regulation des pNF- κ B bei RA-Patienten durch NKH 477, H89 und deren Kombination.	138
Abbildung 90: Regulation des pNF- κ B bei RA-Patienten durch Formoterol, GRK-Inhibitoren und deren Kombination.	138
Abbildung 91: Regulation des pNF- κ B bei RA-Patienten durch Formoterol, Pertussis-Toxin und deren Kombination.	139
Abbildung 92: Regulation des pNF- κ B bei Gesunden.	140
Abbildung 93: Unterschiedliche Regulation des pNF- κ B bei Gesunden und RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β	141
Abbildung 94: Immunhistologische Färbung des KCNQ1.	142
Abbildung 95: Transfizierte synoviale Fibroblasten.	143
Abbildung 96: Mit einem lentiviralen Vektor transduzierter synovialer Fibroblast.	144
Abbildung 97: Plattformen zur Untersuchung einer G α s-zu-G α i-Umschaltung.	147
Abbildung 98: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des IL-6.	151
Abbildung 99: Umschaltung der Signalweiterleitung bei Gesunden unter Hypoxie + IL-1 β bei der Regulation des IL-6.	152
Abbildung 100: Umschaltung der Signalweiterleitung bei Gesunden unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des Osteoprotegerins.	153
Abbildung 101: Umschaltung der Signalweiterleitung bei Gesunden unter Hypoxie bei der Regulation des PAI-1.	154
Abbildung 102: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des CCL2.	155
Abbildung 103: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie bei der Regulation des pCREB.	156
Abbildung 104: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie + IL-1 β bei der Regulation des pErk1/2.	157
Abbildung 105: Umschaltung der Signalweiterleitung bei RA-Patienten unter Normoxie bei der Regulation des pNF- κ B.	158

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.	28
Tabelle 2: Reagenzien.	29
Tabelle 3: Stimulanzen.	31
Tabelle 4: Antikörper für immunhistologische Färbungen.	32
Tabelle 5: Antikörper für Cell-based ELISA.	33
Tabelle 6: Isotypenkontroll-Antikörper.	34
Tabelle 7: Sekundärantikörper.	34
Tabelle 8: Kits.	35
Tabelle 9: Zellen.	36
Tabelle 10: Geräte.	36
Tabelle 11: Programme.	38
Tabelle 12: Saccharose-Lösung.	38
Tabelle 13: Liberase.	39
Tabelle 14: Vollmedium RA-Zellen.	39
Tabelle 15: Vollmedium FLN.	39

Tabelle 16: Stimulationsmedium RA-Zellen	40
Tabelle 17: Stimulationsmedium FLN.....	40
Tabelle 18: Einfriermedium RA-Zellen.....	40
Tabelle 19: Einfriermedium FLN.....	40
Tabelle 20: 10 x PBS.....	41
Tabelle 21: Waschpuffer, PBS mit 0,3 % Triton X.....	41
Tabelle 22: Blockierlösung histologische Färbungen (Ziegen-Antikörper).....	41
Tabelle 23: Blockierlösung histologische Färbungen (Esel-Antikörper).....	41
Tabelle 24: Blockierlösung histologische Färbungen (Doppelfärbung Esel- und Ziegen-Antikörper)...	42
Tabelle 25: Verdünnungslösung histologische Färbungen.....	42
Tabelle 26: Waschpuffer ELISA und Cell-based ELISA	42
Tabelle 27: Blockierlösung Cell-based ELISA	42
Tabelle 28: Verdünnungslösung Cell-based ELISA, PBS mit 0,3 % Triton X.....	42
Tabelle 29: Coating-Medium	43
Tabelle 30: HEK-Medium.....	43
Tabelle 31: Lösung für LB-Platten.....	43
Tabelle 32: LB-Medium	43
Tabelle 33: Polyfect-Transfektionsansatz.....	44
Tabelle 34: Mastermix für Elektroporation.....	44
Tabelle 35: Transfektionsansatz A für lentivirale Transduktion.....	44
Tabelle 36: Transfektionsansatz B für lentivirale Transduktion.....	44
Tabelle 37: Ringer-Lösung	45
Tabelle 38: Charakteristika der untersuchten Patienten mit rheumatoider Arthritis.	46
Tabelle 39: RNA-Microarray.....	65

6.3 Literaturverzeichnis

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423:356–61.
2. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 1996;85:307–10.
3. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001;358:903–11.
4. Cutolo M, Straub RH. Sex steroids and autoimmune rheumatic diseases: state of the art. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16:628–44.
5. Wahle M, Hanefeld G, Brunn S, Straub RH, Wagner U, Krause A, et al. Failure of catecholamines to shift T-cell cytokine responses toward a Th2 profile in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:1–11.
6. Kroot JAEJ, De Jong BAW, Van Leeuwen MA, Swinkels H, Van Den Hoogen FHJ, Van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:1831–5.
7. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000;43:30–7.
8. Kraan MC, Versendaal H, Jonker M, Bresnihan B, Post WJ, 'T Hart BA, et al. A symptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1481–8.
9. Nielen MMJ, Van Schaardenburg D, Reesink HW, Van De Stadt RJ, Van Der Horst-Bruinsma IE, De Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004;50:380–6.
10. Rantapää-Dahlqvist S, De Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the

- development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2741–9.
11. Bollow M. Rheumatoide Arthritis der Hand. *Radiologe.* 2021;61:362–74.
 12. Van Boekel MAM, Vossenaar ER, Van Den Hoogen FHJ, Van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 2002;4:87–93.
 13. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365:2205–19.
 14. McGonagle D, Conaghan PG, O’Connor P, Gibbon W, Green M, Wakefield R, et al. The relationship between synovitis and bone changes in early untreated rheumatoid arthritis: a controlled magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1706–11.
 15. Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician.* 2011;84:1245–52.
 16. Fuhrmann RA. Die Behandlung der rheumatischen Fußdeformität. *Orthopäde.* 2002;31:1187–97.
 17. Heijde DMFMV Der, Leeuwen MAV, Riel PLCMV, Koster AM, Hof MAV t., Rijswijk MHV, et al. Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992;35:26–34.
 18. Savnik A, Malmskov H, Thomsen HS, Graff LB, Nielsen H, Danneskiold-Samsøe B, et al. Magnetic resonance imaging of the wrist and finger joints in patients with inflammatory joint diseases. *J Rheumatol.* 2001;28:2193–200.
 19. McQueen FM, Benton N, Perry D, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, et al. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1814–27.
 20. Jansen LMA, Van Der Horst-Bruinsma IE, Van Schaardenburg D, Bezemer PD, Dijkmans BAC. Predictors of radiographic joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:924–7.
 21. Gossec L, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Sibilia J, Meyer O, et al. Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:675–80.
 22. Saville PD, Kharmosh O. Osteoporosis of rheumatoid arthritis: influence of age, sex and corticosteroids. *Arthritis Rheum.* 1967;10:423–30.
 23. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JAE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003;107:1303–7.
 24. Holmqvist ME, Wedrén S, Jacobsson LTH, Klareskog L, Nyberg F, Rantapää-Dahlqvist S, et al. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J Intern Med.* 2010;268:578–85.
 25. Rau R, Lingg G, Wassenberg S, Schorn C, Scherer A. Bildgebende Verfahren in der Rheumatologie: Konventionelle Röntgendiagnostik bei der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol.* 2005;64:473–87.
 26. Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, Suissa S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:R45.
 27. Baecklund E, Sundström C, Ekblom A, Catrina AI, Biberfeld P, Feltelius N, et al. Lymphoma subtypes in patients with rheumatoid arthritis: Increased proportion of diffuse large B cell lymphoma. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1543–50.
 28. Baecklund E, Ekblom A, Sparén P, Feltelius N, Klareskog L. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study. *Br Med J.* 1998;317:180–1.
 29. Prior P, Symmons DPM, Hawkins CF, Scott DL, Brown’ AR. Cancer morbidity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1984;43:128–31.
 30. Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE, Vaughn WK. Severe functional declines,

- work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum.* 1984;27:864–72.
31. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:481–94.
 32. Allaire S, Wolfe F, Niu J, Lavalley MP. Contemporary prevalence and incidence of work disability associated with rheumatoid arthritis in the US. *Arthritis Care Res.* 2008;59:474–80.
 33. MacHold KP. Prevention and cure of rheumatoid arthritis: is it possible? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24:353–61.
 34. Mankia K, Di Matteo A, Emery P. Prevention and cure: the major unmet needs in the management of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2020;110:102399.
 35. Schett G, Tanaka Y, Isaacs JD. Why remission is not enough: underlying disease mechanisms in RA that prevent cure. *Nat Rev Rheumatol.* 2021;17:135–44.
 36. Mukherjee A, Jantsch V, Khan R, Hartung W, Fischer R, Jantsch J, et al. Rheumatoid arthritis-associated autoimmunity due to aggregatibacter actinomycetemcomitans and its resolution with antibiotic therapy. *Front Immunol.* 2018;0:2352.
 37. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren A-K, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:1488–92.
 38. Wu CY, Yang HY, Lai JH. Anti-citrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis: Biological effects and mechanisms of immunopathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21.
 39. Schett G, Sloan VS, Stevens RM, Schafer P. Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2010;2:271–8.
 40. Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:356–60.
 41. Hermann KGA. Magnetresonanztomographie der Hand bei rheumatoider Arthritis. Wissenschaftliche Ergebnisse und praktische Anwendung. *Radiologe.* 2006;46:384–93.
 42. Masson-Bessière C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, et al. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol.* 2000;119:544–52.
 43. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. Vol. 85, Cell. Cell Press; 1996. p. 307–10.
 44. Filer A, Parsonage G, Smith E, Osborne C, Thomas AMC, Curnow SJ, et al. Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2096–108.
 45. FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Bresnihan B. Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991;50:792–6.
 46. Devlin J, Gough A, Huissoon A, Perkins P, Holder R, Reece R, et al. The acute phase and function in early rheumatoid arthritis. C-reactive protein levels correlate with functional outcome. *J Rheumatol.* 1997;24:9–13.
 47. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American college of rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 2012;64:625–39.
 48. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum.* 1993;36:1681–90.
 49. Lipsky PE, van der Heijde DMFM, St. Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2000;343:1594–602.

50. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1994;344:1105–10.
51. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet*. 1999;354:1932–9.
52. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1552–63.
53. Muz B, Khan MN, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia: the role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:201.
54. Kennedy A, Ng CT, Biniiecka M, Saber T, Taylor C, O’Sullivan J, et al. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:711–21.
55. Ng CT, Biniiecka M, Kennedy A, McCormick J, FitzGerald O, Bresnihan B, et al. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1389–95.
56. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, Devine L, Wu F, Venkatraman V, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Sci Signal*. 2016;9:ra56.
57. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*. 2006;281:33095–106.
58. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315–24.
59. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1580–8.
60. McQueen FM, Stewart N, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, Tan PLJ, et al. Magnetic resonance imaging of the wrist in early rheumatoid arthritis reveals a high prevalence of erosions at four months after symptom onset. *Ann Rheum Dis*. 1998;57:350–6.
61. Østergaard M, Stoltenberg M, Løvgreen-Nielsen P, Volck B, Jensen CH, Lorenzen I. Magnetic resonance imaging-determined synovial membrane and joint effusion volumes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comparison with the macroscopic and microscopic appearance of the synovium. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1856–67.
62. Duer-Jensen A, Vestergaard A, Døhn UM, Ejbjerg B, Hetland ML, Albrecht-Beste E, et al. Detection of rheumatoid arthritis bone erosions by two different dedicated extremity MRI units and conventional radiography. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:998–1003.
63. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:120–6.
64. Aho K, Koskela P, Makitalo R, Heliovaara M, Palosuo T. Antinuclear antibodies heralding the onset of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1992;19:1377–9.
65. Tuomilehto J, Vidgren G, Toivanen L, Tuomilehto-Wolf E, Kohtamaki K, Stengård J, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet*. 1994;343:1383–5.
66. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res*. 2000;2:236–43.
67. van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2:249–51.

68. Vossenaar ER, Zendman AJW, Van Venrooij WJ, Pruijn GJM. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays*. 2003;25:1106–18.
69. Mastronardi FG, Wood DD, Mei J, Raijmakers R, Tseveleki V, Dosch HM, et al. Increased citrullination of histone H3 in multiple sclerosis brain and animal models of demyelination: a role for tumor necrosis factor-induced peptidylarginine deiminase 4 translocation. *J Neurosci*. 2006;26:11387–96.
70. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79:685–99.
71. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. *Arthritis Rheum*. 2000;43:22–9.
72. Munro R, Hampson R, McEntegart A, Thomson EA, Madhok R, Capell H. Improved functional outcome in patients with early rheumatoid arthritis treated with intramuscular gold: results of a five year prospective study. *Ann Rheum Dis*. 1998;57:88–93.
73. Saag KG, Gim GT, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*. 2008;59:762–84.
74. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:964–75.
75. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:960–77.
76. Nikas S. Long-term treatment with low dose glucocorticoids in rheumatoid arthritis: new tricks of an old drug. *Mediterr J Rheumatol*. 2018;29:13–6.
77. Strehl C, Bijlsma JWJ, De Wit M, Boers M, Caeyers N, Cutolo M, et al. Defining conditions where long-term glucocorticoid treatment has an acceptably low level of harm to facilitate implementation of existing recommendations: Viewpoints from an EULAR task force. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:952–7.
78. Caporali R, Todoerti M, Sakellariou G, Montecucco C. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013;73:31–43.
79. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, Van Tuyl LHD, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:404–13.
80. Manglik A, Kruse AC. Structural basis for G protein-coupled receptor activation. *Biochemistry*. 2017;56:5628–34.
81. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:60–71.
82. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science* (80-). 2005;308:512–7.
83. Weis WI, Kobilka BK. The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annu Rev Biochem*. 2018;87:897–919.
84. Wallukat G. The β -Adrenergic Receptors. *Herz*. 2002;27(7):683–90.
85. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY. Regulation, signaling, and physiological functions of G-Proteins. *J Mol Biol*. 2016;428:3850–68.
86. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009;459(7245):356–63.
87. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Madan Babu M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494:185–94.
88. Johnson M. Molecular mechanisms of β 2-adrenergic receptor function, response, and

- regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:18–24.
89. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63:1256–72.
 90. Perry SJ, Lefkowitz RJ. Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol*. 2002;12:130–8.
 91. Jean-Charles PY, Kaur S, Shenoy SK. G protein-coupled receptor signaling through β -Arrestin-dependent mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017;70:142–58.
 92. Rasmussen SGF, Devree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. 2011;477:549–57.
 93. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell; 2006. p. 46–55.
 94. Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, et al. Targeting of cyclic AMP degradation to β_2 -adrenergic receptors by β -arrestins. *Science* (80-). 2002;298:834–6.
 95. Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev*. 2010;62:305–30.
 96. Lorton D, Bellinger DL. Molecular mechanisms underlying β -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *Int J Mol Sci*. 2015;16:5635–65.
 97. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, et al. β -arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates β -adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:940–5.
 98. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:551–77.
 99. Mosenden R, Taskén K. Cyclic AMP-mediated immune regulation - overview of mechanisms of action in T cells. *Cell Signal*. 2011;23:1009–16.
 100. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997;390:88–91.
 101. Dessauer CW. Adenylyl cyclase-A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol*. 2009;76:935–41.
 102. Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbé JC, et al. The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev*. 2013;65:545–77.
 103. Jenei-Lanzl Z, Zwingenberg J, Lowin T, Anders S, Straub RH. Proinflammatory receptor switch from G α_s to G α_i signaling by β -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. *Brain Behav Immun*. 2015;50:266–74.
 104. Karapetsas A, Giannakakis A, Pavlaki M, Panayiotidis M, Sandaltzopoulos R, Galanis A. Biochemical and molecular analysis of the interaction between ERK2 MAP kinase and hypoxia inducible factor-1 α . *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43:1582–90.
 105. Zhang QH, Hao JW, Li GL, Ji XJ, Yao X dong, Dong N, et al. Proinflammatory switch from G α_s to G α_i signaling by Glucagon-like peptide-1 receptor in murine splenic monocyte following burn injury. *Inflamm Res*. 2018;67:157–68.
 106. Genovese MC, Jarosova K, Cieślak D, Alper J, Kivitz A, Hough DR, et al. Apremilast in patients with active rheumatoid arthritis: a phase II, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:1703–10.
 107. Poole RM, Ballantyne AD. Apremilast: first global approval. *Drugs*. 2014;74:825–37.
 108. Kavanaugh A, Mease PJ, Gomez-Reino JJ, Adebajo AO, Wollenhaupt J, Gladman DD, et al. Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1020–6.
 109. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis-shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:63–8.
 110. Van Baarsen LGM, De Hair MJH, Ramwadhoebe TH, Zijlstra IJAJ, Maas M, Gerlag DM, et al. The cellular composition of lymph nodes in the earliest phase of inflammatory arthritis. *Ann*

- Rheum Dis. 2013;72(8):1420–4.
111. Karouzakis E, Hähnlein J, Grasso C, Semmelink JF, Tak PP, Gerlag DM, et al. Molecular characterization of human lymph node stromal cells during the earliest phases of rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2019;10:1863.
 112. De Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 1998;396:474–7.
 113. Ponsioen B, Zhao J, Riedl J, Zwartkruis F, van der Krogt G, Zaccolo M, et al. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* 2004;5:1176–80.
 114. Klarenbeek J, Goedhart J, Van Batenburg A, Groenewald D, Jalink K. Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One.* 2015;10.
 115. Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
 116. Favalli EG. Understanding the role of Interleukin-6 (IL-6) in the joint and beyond: a comprehensive review of IL-6 inhibition for the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Ther.* 2020;7:473–516.
 117. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2005;1754:253–62.
 118. Schett G, Redlich K, Smolen JS. The role of osteoprotegerin in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5:239–45.
 119. Remuzgo-Martínez S, Genre F, López-Mejías R, Ubilla B, Mijares V, Pina T, et al. Expression of osteoprotegerin and its ligands, RANKL and TRAIL, in rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2016;6:1–5.
 120. Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012;4:225–33.
 121. Bae SC, Lee YH. Association between plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism and circulating PAI-1 level in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol.* 2020;79:312–8.
 122. Cerinic MM, Generini S, Partsch G, Pignone A, Dini G, Konttinen YT, et al. Synoviocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 and display u-PA receptors on their surface. *Life Sci.* 1998;63:441–53.
 123. Muñoz-Valle JF, Ruiz-Quezada SL, Oregón-Romero E, Navarro-Hernández RE, Castañeda-Saucedo E, De La Cruz-Mosso U, et al. PAI-1 mRNA expression and plasma level in rheumatoid arthritis: relationship with 4G/5G PAI-1 polymorphism. *Rheumatol Int.* 2012;32:3951–6.
 124. Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *Int J Mol Med.* 2013;31:503–10.
 125. Agirbasli M, Inanc N, Baykan OA, Direskeneli H. The effects of TNF alpha inhibition of plasma fibrinolytic balance in patients with chronic inflammatory rheumatological disorders. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:580–3.
 126. de Sá MC, Simão ANC, de Medeiros FA, Iriyoda TMV, Costa NT, Alfieri DF, et al. Cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis: influence of metabolic syndrome. *Clin Exp Med* 2018 184. 2018;18:495–504.
 127. Busso N, Péclat V, So A, Sappino AP. Plasminogen activation in synovial tissues: differences between normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis joints. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:550–7.
 128. K M, K F, J S, PP S, GD K. Interrelated reduction of chemerin and plasminogen activator inhibitor-1 serum levels in rheumatoid arthritis after interleukin-6 receptor blockade. *Clin Rheumatol.* 2015;34:419–27.
 129. Chen CY, Fuh LJ, Huang CC, Hsu CJ, Su CM, Liu SC, et al. Enhancement of CCL2 expression and

- monocyte migration by CCN1 in osteoblasts through inhibiting miR-518a-5p: implication of rheumatoid arthritis therapy. *Sci Rep*. 2017;7:1–11.
130. Moadab F, Khorramdelazad H, Abbasifard M. Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sci*. 2021;269:119034.
 131. Zhang L, Yu M, Deng J, Lv X, Liu J, Xiao Y, et al. Chemokine signaling pathway involved in CCL2 expression in patients with rheumatoid arthritis. *Yonsei Med J*. 2015;56:1134–42.
 132. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1992;90:772–9.
 133. Takeba Y, Suzuki N, Wakisaka S, Takeno M, Kaneko A, Asai T, et al. Involvement of cAMP responsive element binding protein (CREB) in the synovial cell hyperfunction in patients with rheumatoid arthritis Role of CREB in RA synovial cell function. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18:47–55.
 134. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35:605–23.
 135. Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M, Verma IM. Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4320–4.
 136. Jr RR. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012;66:105–43.
 137. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, et al. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2501–12.
 138. Ralph JA, Morand EF. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:795–808.
 139. Lu N, Malemud CJ. Extracellular signal-regulated kinase: a regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression. *Int J Mol Sci*. 2019;20.
 140. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:679–92.
 141. Jiang H, Wang L, Wang F, Pan J. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 promotes in vitro proliferation, migration and inflammatory cytokine secretion of synovial fibroblast-like cells from rheumatoid arthritis via nuclear- κ B, signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Med Rep*. 2017;16:8477–84.
 142. Wang F, Wang L, Jiang H, Chang X, Pan J. Inhibition of PCSK6 may play a protective role in the development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2015;42:161–9.
 143. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010;1802:396–405.
 144. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253:269–85.
 145. Liu F, Feng XX, Zhu SL, Huang HY, Chen Y Di, Pan YF, et al. Sonic Hedgehog signaling pathway mediates proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via MAPK/ERK signaling pathway. *Front Immunol*. 2018;9:2847.
 146. Westra J, Brouwer E, Bos R, Posthumus MD, Doornbos-Van Der Meer B, Kallenberg CGM, et al. Regulation of cytokine-induced HIF-1 α expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1108:340–8.
 147. Noort AR, Tak PP, Tas SW. Non-canonical NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde? *Arthritis Res Ther*. 2015;17.
 148. Makarov SS. NF- κ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res*. 2001;3:200–6.
 149. Nejatbakhsh Samimi L, Farhadi E, Tahmasebi MN, Jamshidi A, Sharafat Vaziri A, Mahmoudi M.

- NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis with focus on fibroblast-like synoviocytes. *Autoimmun Highlights*. 2020;11:1–10.
150. Dixit G, Dabney-Smith C, Lorigan GA. The membrane protein KCNQ1 potassium ion channel: functional diversity and current structural insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V.; 2020. p. 183148.
 151. Wu X, Larsson HP. Insights into cardiac iks (Kcnq1/kcne1) channels regulation. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1–23.
 152. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, et al. Requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science (80-)*. 2002;295:496–9.
 153. Yazawa K, Kameyama M. Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 1990;421:135–50.
 154. Schroeder KS, Neagle BD. FLIPR: a new instrument for accurate, high throughput optical screening. *J Biomol Screen*. 1996;1:75–80.
 155. Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *J Transl Med*. 2019;17:397.
 156. Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:1–15.
 157. Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefèvre S, Tarner IH, Grifka J, et al. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:83.
 158. Calles K, Svensson I, Lindskog E, Hågström L. Effects of conditioned medium factors and passage number on Sf9 cell physiology and productivity. *Biotechnol Prog*. 2006 Mar;22:394–400.
 159. Donaldson MS, Shuler ML. Effects of long-term passaging of BTI-Tn5B1-4 insect cells on growth and recombinant protein production. *Biotechnol Prog*. 1998;14:543–7.
 160. O'Driscoll L, Gammell P, McKiernan E, Ryan E, Jeppesen PB, Rani S, et al. Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells. *J Endocrinol*. 2006;191:665–76.
 161. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*. 1996;149:1607–15.
 162. Ospelt C. Synovial fibroblasts in 2017. *RMD Open*. 2017;3(2).
 163. Frank-Bertoncelj M, Trenkmann M, Klein K, Karouzakis E, Rehrauer H, Bratus A, et al. Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. *Nat Commun*. 2017;8.
 164. Ai R, Hammaker D, Boyle DL, Morgan R, Walsh AM, Fan S, et al. Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes. *Nat Commun*. 2016;7.
 165. Hotta K, Hirshman CA, Emala CW. TNF- α increases transcription of G α (i-2) in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:319–25.
 166. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:49–62.
 167. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:362–74.
 168. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25:453–72.
 169. Dai C, Kuo SJ, Hu SL, Tsai CH, Huang YL, Huang CC, et al. VEGF-C gene polymorphisms increase susceptibility to rheumatoid arthritis. *Int J Med Sci*. 2019;16:1397–403.
 170. Wauke K, Nagashima M, Ishiwata T, Asano G, Yoshino S. Expression and localization of

- vascular endothelial growth factor-C in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Rheumatol.* 2002;29:34–8.
171. Wolf D, Goff SP. Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annu Rev Genet.* 2008;42:143–63.
172. Hatziioannou T, Bieniasz PD. Antiretroviral restriction factors. *Curr Opin Virol.* 2011;1:526–32.
173. Goff SP. Genetic control of retrovirus susceptibility in mammalian cells. *Annu Rev Genet.* 2004;38:61–85.
174. Leuci V, Mesiano G, Gammaitoni L, Cammarata C, Capellero S, Todorovic M, et al. Transient proteasome inhibition as a strategy to enhance lentiviral transduction of hematopoietic CD34 + cells and T lymphocytes: implications for the use of low viral doses and large-size vectors. *J Biotechnol.* 2011;156:218–26.
175. Aktas Z, Rao H, Slauson SR, Gabelt BT, Larsen I V., Sheridan RTC, et al. Proteasome inhibition increases the efficiency of lentiviral vector-mediated transduction of trabecular meshwork. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:298–310.
176. Santoni De Sio FR, Cascio P, Zingale A, Gasparini M, Naldini L. Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction. *Blood.* 2006;107:4257–65.
177. Schwartz O, Maréchal V, Friguet B, Arenzana-Seisdedos F, Heard J-M. Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1998;72:3845–50.