

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR *Innere Medizin I*
Direktor: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEUROENDOKRINOLOGISCHE MODULATION DER *A PROLIFERATION-INDUCING*
LIGAND (APRIL)-INDUZIERTEN INTERLEUKIN-6 PRODUKTION DURCH
SYNOVIAL-FIBROBLASTEN
VERGLEICHENDE STUDIE ZWISCHEN OSTEOARTHRITIS UND RHEUMATOIDER
ARTHRITIS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Peschka

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR *Innere Medizin I*
Direktor: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEUROENDOKRINOLOGISCHE MODULATION DER *A PROLIFERATION-INDUCING*
LIGAND (APRIL)-INDUZIERTEN INTERLEUKIN-6 PRODUKTION DURCH
SYNOVIAL-FIBROBLASTEN
VERGLEICHENDE STUDIE ZWISCHEN OSTEOARTHRITIS UND RHEUMATOIDER
ARTHRITIS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Peschka

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: PD Dr. Georg Pongratz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Renkawitz
Tag der mündlichen Prüfung 21.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)	10
1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Diagnostik	10
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	12
1.1.3 Therapie	14
1.2 Fibroblastenartige Synoviozyten	16
1.3 Interleukin-6.....	17
1.4 Das APRIL-/ BAFF-System	18
1.4.1 Die TNF- und TNF-Rezeptor- Familie	18
1.4.2 APRIL und BAFF	19
1.4.3 Die Rezeptoren von APRIL und BAFF	20
1.4.4 APRIL, BAFF und Autoimmunität.....	24
1.5 Zytokin-induzierte und neuroendokrine Einflüsse auf den RA-Verlauf.....	27
1.5.1 Cortisol und RA	27
1.5.2 Sexualhormone und RA	27
1.5.3 Sympathikus und RA	28
1.5.4 Das Endocannabinoidsystem und RA.....	29
1.6 Osteoarthritis (OA)	29
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Patienteneigenschaften.....	31
2.1.2 Chemikalien	31
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	34
2.1.4 Geräte.....	35
2.1.5 Software	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Zellgewinnung	36

2.2.2 Zellkultur.....	37
2.2.3 Zellbehandlungen.....	38
2.2.4 IL-6-ELISA.....	39
2.2.5 Statistische Datenauswertung und graphische Darstellung	41
3 Ergebnisse	42
3.1 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL.....	42
3.1.1 Behandlung von RA-FLS mit APRIL.....	43
3.1.2 Behandlung von OA-FLS mit APRIL	44
3.2 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit Cortisol und APRIL.....	45
3.2.1 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit konstanter Cortisol- und variabler APRIL-Konzentration.....	45
3.2.1.1 Behandlung von RA-FLS mit APRIL (variabel) und Cortisol (10nmol/l).....	46
3.2.1.2 Behandlung von OA-FLS mit APRIL (variabel) und Cortisol (10nmol/l).....	47
3.2.2 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit variabler Cortisol- und konstanter APRIL-Konzentration	48
3.2.2.1 Behandlung von RA-FLS mit APRIL (100ng/ml) und Cortisol (variabel)	48
3.2.2.2 Behandlung von OA-FLS mit APRIL (100ng/ml) und Cortisol (variabel).....	49
3.3 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL, TNF und IL-1 β 50	
3.4 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL in Kombination mit hormoneller Stimulation	51
3.4.1 Behandlung mit APRIL, verschiedenen Konzentrationen an DHT und Nilutamide... 51	
3.4.2 Behandlung mit APRIL, verschiedenen Konzentrationen an E2 und speziellen Estrogenrezeptoragonisten.....	53
3.4.3 Behandlung mit APRIL in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an Progesteron	55
3.5 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL in Kombination mit Sympathomimetika.....	56
3.6 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL in Kombination mit Liganden des Endocannabinoidsystems	57
3.6.1 Behandlung mit APRIL, AEA (Anandamide) und JNJ 1661010	57
3.6.2 Behandlung mit APRIL, CP 47.497 und GP 1a.....	60
3.6.3 Behandlung mit APRIL, Rimonabant und JTE 907	61
3.6.3 Behandlung mit APRIL und O-1602	62

4 Diskussion	63
4.1 Überdurchschnittliche IL-6-Produktion durch OA-Synovial-Fibroblasten im Vergleich zu RA-Synovial-Fibroblasten	63
4.2 APRIL-induzierte IL-6-Produktion in RA-Synovial-Fibroblasten.....	65
4.3 Induzierbarkeit der IL-6-Produktion in OA- und RA-Fibroblasten durch starke Aktivatoren wie TNF und IL-1 β im Verhältnis zu APRIL.....	68
4.4 APRIL-abhängige Modulation der Cortisol-induzierten IL-6-Hemmung in OA und RA-Synovial-Fibroblasten.....	72
4.5 Hormonelle Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion in OA- und RA-Synovial-Fibroblasten.....	75
4.6 Sympathomimetische Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion in OA- und RA-Synovial-Fibroblasten	79
4.7 Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion in OA- und RA-Synovial-Fibroblasten durch Liganden des Endocannabinoidsystems	80
4.8 Grenzen der Arbeit und Ausblick	84
5 Zusammenfassung.....	85
6 Literaturverzeichnis.....	86
7 Eidesstattliche Erklärung.....	97
8 Danksagung.....	98

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
ACR	American College of Rheumatology
AEA	Anandamide
AMNOG	Arzneimittelmarktneuordnungsgesetz
AP-1	activator protein 1
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
Bad	Bcl-2-associated death promoter
BAFF	B cell Activating Factor of the tumor necrosis factor Family
BlyS	B Lymphocyte stimulator (=BAFF)
BAFF-R	BAFF-Receptor
BCMA	B cell maturation antigen
Bim	Bcl-2-like protein 11
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CB ₁	Cannabinoidrezeptor 1
CB ₂	Cannabinoidrezeptor 2
CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13
CCP	cyclic citrullinated peptide (zyklisch zitrulliniertes Peptid)
CD	Cluster of Differentiation
CIA	Collagen-induced arthritis
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
DcR	Decoy Receptor
DHT	Dihydrotestosteron
DMARD	disease-modifying anti-rheumatic drug
E2	Estradiol
EULAR	European League Against Rheumatism
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLS	Fibroblast-like Synoviocytes
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSPG	Heparinsulfat Proteoglycane
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IKK	I- κ B kinase
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale kinase
MCL	myeloid cell leukemia sequence
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MS	Multiple Sklerose
MTP	Metatarsophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIK	NF-kappaB-induzierende Kinase

NSAR	nichtsteroidales Antirheumatikum
OA	Osteoarthritis
PEA	Palmitoylethanolamid
PIP	proximales Interphalangealgelenk
PLA2	Phospholipase A2
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANK-L	Receptor Activator of NF- κ B - Ligand
RF	Rheumafaktor
RT	Raumtemperatur
SF	Synovialflüssigkeit
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TAC1	transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor
TCR	T-Zell-Rezeptor
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die rheumatoide Arthritis (RA) (Synonym: chronische Polyarthritits, cP) ist eine systemische, chronisch-entzündliche Erkrankung des Bindegewebes mit primärem Befall der peripheren Gelenke.

1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Diagnostik

Mit einer Prävalenz von 0,5–1% ist die RA die häufigste Form der chronisch-entzündlichen Polyarthritits weltweit. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer.¹ Die Inzidenz steigt mit dem Lebensalter und liegt für Frauen zwischen 34 und 83/100.000 pro Jahr. Der Gipfel der Neuerkrankungsrate liegt bei Frauen im Alter von 55 bis 64 Jahren und bei Männern zwischen 65 und 75 Jahren.²

Zu den Risikofaktoren, bzw. prognostisch ungünstigen Faktoren gehören positive Rheumafaktoren (RF) und/oder Antikörper gegen zyklisch zitruelliniertes Peptid (CCP), ein Erkrankungsalter über 60 Jahre, das weibliche Geschlecht, Rauchen, bereits eingetretene knöcherne Destruktionen, ein verzögerter Therapiebeginn mit DMARDs sowie fehlende soziale Bezugssysteme, schlechte ökonomische Bedingungen und ein niedriges Bildungsniveau.¹ Zudem gibt es genetische Prädispositionen. Bei der bekanntesten handelt es sich um HLA-DRB1, ein MHC-II-Genprodukt.³

Charakteristisch sind Symptome wie Schmerzen, Morgensteifigkeit, Gelenkschwellung, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Fieber und Depressionen. Die Erkrankung verläuft schubweise mit einem typischerweise symmetrischen Befall der kleinen Gelenke der Hände und Füße. Initial betroffen sind vor allem die Metacarpo- (MCP) sowie Metatarsophalangealgelenke (MTP) und die proximalen Interphalangealgelenke (PIP) der Finger und Zehen sowie die Handgelenke. Dies führt unbehandelt zu den klassischen Fehlstellungen wie Schwanenhals- und Knopflochdeformität, Ulnardeviation sowie Krallen- und Hammerzehen. In fortgeschrittenen Stadien sind dann auch die größeren Gelenke (Sprung-, Knie-, Hüft-, Ellenbogen- und Schultergelenke) beteiligt. Auch extraartikuläre Manifestationen können auftreten; beispielsweise Rheumaknoten, Perikarditis, Myokarditis, Pleuritis, Lungenfibrose, Episkleritis, Vaskulitiden, Splenomegalie und Lymphadenopathie. Laborchemisch helfen bei der Diagnostik die Bestimmung von Rheumafaktoren (RF; in den meisten Fällen IgM-Antikörper, die gegen das Fc-Fragment von IgG gerichtet sind), mit Hilfe derer seropositive

von seronegativer RA unterschieden wird, und Autoantikörper gegen zyklisch zitruelliniertes Peptid (anti-CCP; ACPA), einem sehr spezifischen Immunmarker der RA.

Zur Diagnostik galten bis 2010 allein die **revidierten ACR-Kriterien von 1987** (ACR= American College of Rheumatology), wobei zur Diagnosestellung vier der sieben Kriterien erfüllt sein müssen, die Kriterien eins bis vier davon für mindestens sechs Wochen. (91– 94 % Sensitivität und 89 % Spezifität)

Tabelle 1: ACR-Kriterien (1987)

1. Morgensteifigkeit	von mindestens 1 Stunde Dauer
2. Weichteilschwellung	Arthritis von 3 oder mehr Gelenken
3. Arthritis der Hände	proximale Interphalangeal-, Metakarpophalangeal- oder Handgelenke
4. Symmetrische Arthritis	simultane Beteiligung der gleichen Gelenkregionen auf beiden Körperseiten
5. Rheumaknoten	subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen, an den Streckseiten oder in Gelenknähe
6. Rheumafaktor im Serum nachweisbar	
7. Radiologische Veränderungen	gelenknahe Osteoporose und/oder Erosionen Veränderungen an den betroffenen Gelenken

4

Diese wurden auf Grund ihres Mangels an Sensitivität in frühen Krankheitsstadien kritisiert. Seit 2010 gelten nun deshalb die **ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die rheumatoide Arthritis 2010**. (EULAR=European League Against Rheumatism)⁵

Voraussetzung:

1. Mindestens ein Gelenk mit einer klinischen Synovitis,
2. die nicht mit einer anderen Erkrankung erklärt werden kann.

Tabelle 2: ACR/EULAR-Kriterien (2010)

A.	Geschwollene/schmerzhafte Gelenke	Punkte
1	(mittel-) großes Schulter, Ellenbogen, Hüfte, Sprunggelenke	0
2 – 10	(mittel-) große Schulter, Ellenbogen, Hüfte, Sprunggelenke	1
1 – 3	kleine MCP, PIP, MTP 2 – 5, IP, Handgelenk	2
4 – 10	kleine MCP, PIP, MTP 2 – 5, IP, Handgelenk	3
> 10	Gelenke; mind. 1 kleines	5

B. Serologie (mindestens 1 Testergebnis erforderlich)	
RF und ACPA negativ	0
RF oder ACPA niedrig positiv > Obergrenze bis $\leq 3 \times$ Obergrenze	2
RF oder ACPA hoch positiv > $3 \times$ Obergrenze	3
C. Akute-Phase-Proteine (mindestens 1 Testergebnis erforderlich)	
CRP und BSG normal	0
CRP oder BSG erhöht	1
D. Dauer der Symptome	
< 6 Wochen	0
≥ 6 Wochen	1

Die Bewertungspunkte der Kategorien A – D werden addiert, eine Bewertung von $\geq 6/10$ Punkten ist ein Indikator für eine definitive RA. ⁴

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis sind nicht vollständig geklärt. Es handelt sich um ein Zusammenspiel aus genetischen und Umweltfaktoren. Der schon genannte Risikofaktor für RA in Form bestimmter HLA-DR-Allele, in Verbindung mit der Entdeckung von MHC-II-exprimierenden antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen in entzündlich veränderten Gelenken, legt den Gedanken nahe, dass MHC-II-abhängige T- und B-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle bei dieser Erkrankung spielt.⁶ Eine weitere Assoziation der genetischen Suszeptibilität für RA mit PTPN22 wurde 2004 entdeckt.⁷ Die Tatsache, dass dieses Gen für eine Tyrosinphosphatase, die eine Bedeutung bei T- und B-Zell-Signalweiterleitung besitzt, kodiert, stellt einen weiteren Hinweis auf eine T- und B-Zell-Beteiligung bei RA dar.⁸ Diese genetischen Risikofaktoren wurden nur in Zusammenhang mit seropositiver, bzw. anti-CCP-positiver RA gefunden. Zudem scheint auch der Umweltfaktor Rauchen mit anti-CCP-positiver RA in Verbindung zu stehen. Diese Beobachtungen lassen einen Unterschied in der Ätiologie anti-CCP-positiver versus -negativer RA vermuten.³ Unabhängig von Seropositivität kommt es jedoch zur Gelenkentzündung. Untersuchungen der Entzündungsreaktion in Gelenken zeigen die Aktivität verschiedener Entzündungskaskaden, die in vielen Fällen vermutlich durch adaptive (erworbene) Immunität getriggert werden. Letztendlich führt diese Entzündungsaktivität zur Destruktion. Dies erfordert wiederum die Beteiligung der angeborenen Immunität, insbesondere vermittelt durch ein Ungleichgewicht in der Regulierung von Zytokinen und anderen entzündlichen Mediatoren.⁹ Entscheidende Rollen als Pathogenitätsfaktoren spielen hierbei TNF, IL-6, IL-1, sowie *receptor activator of NF κ B ligand* (RANK-L). Die Entzündung synovialer Gelenke ist geprägt durch die

Anwesenheit vieler verschiedener wechselwirkender Immunzellen. Antigen-präsentierende Zellen kommunizieren mit T-Zellen via T-Zell-Rezeptor-MHC-Interaktion, wobei die T-Zell-Aktivierung nur im Beisein co-stimulatorischer CD28-CD80/86 vermittelter Signale gelingt. B-Zellen spielen eine Rolle als antigenpräsentierende, zytokinproduzierende und antikörperproduzierende Zellen, wobei die entstehenden Antikörper zur Immunkomplexbildung führen. Durch T-Zellen und Immunkomplexe aktivierte Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-6.³ Eine spezielle T-Zell Subgruppe, die Th17-Helfer-Zellen produziert IL-17 in Abhängigkeit einer Stimulation durch IL-6. Dabei handelt es sich um ein hochinflammatorisches Zytokin, dass weitere Zytokine und Moleküle, die mit Knorpel- und Knochendestruktion in Verbindung stehen, wie RANKL, freisetzt.⁹ (siehe zur Pathogenese auch Abb.2)

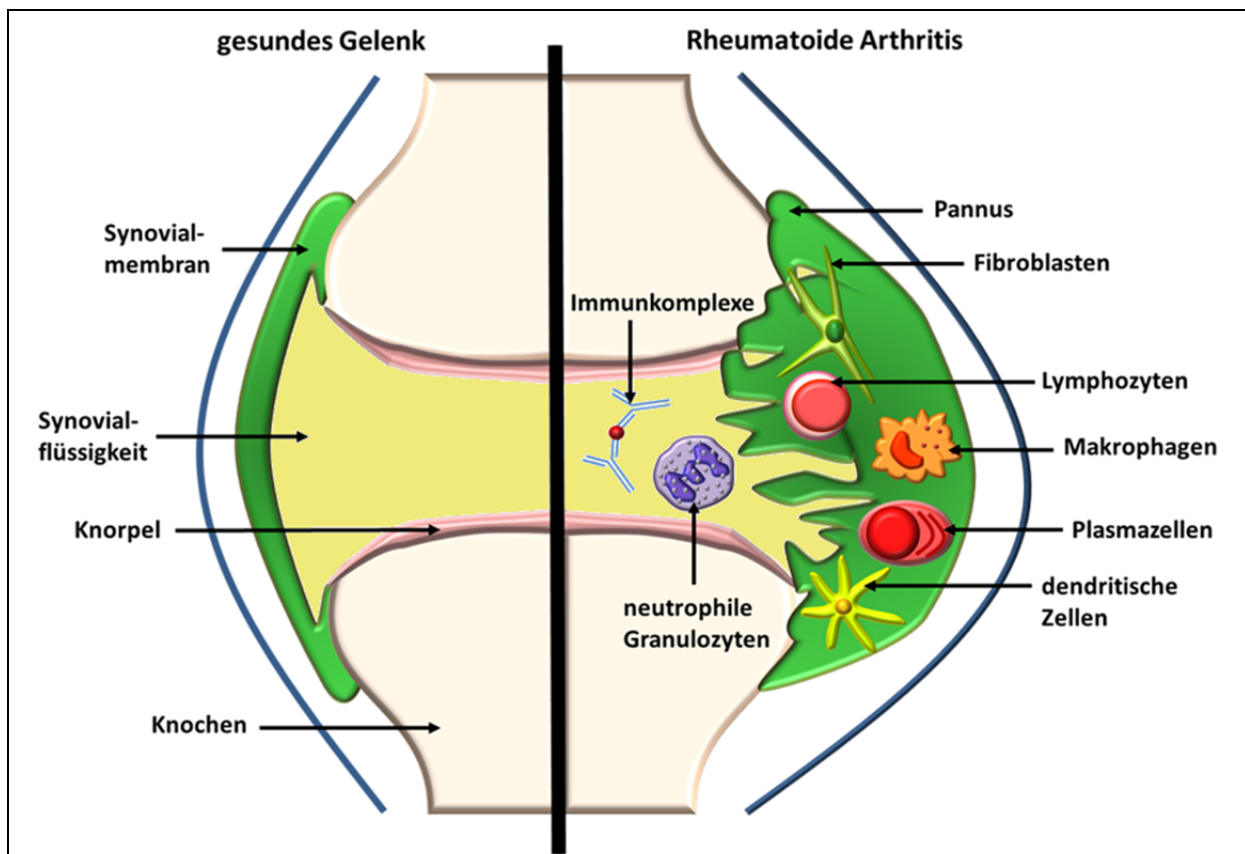


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gelenkveränderung bei RA (nach ¹⁰) Das gesunde Gelenk (links) besteht aus von Knorpelschicht bedeckten artikulierenden Gelenkflächen. Der Gelenkspalt ist frei und das Gelenk von einer Kapsel umgeben, die auf der Innenseite in eine dünne Synovialmembran übergeht. Im Vergleich dazu ist die Synovialmembran im rheumatoiden Gelenk (rechts) entzündet, hypertroph und hyperplastisch. Außerdem findet eine Infiltration der Synovialmembran und Synovialflüssigkeit durch B-, T- und Plasmazellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen statt. Zudem kommt es im Verlauf durch Angiogenese und Osteoklastenaktivierung zur Pannusformation und somit zur Knochen- und Knorpeldestruktion.

Radiologisch pathognomonisch für RA sind Erosionen und Gelenkspaltverschmälerung - ein Ausdruck für Knochen- und Knorpeldestruktion. Zur Knorpelerosion tragen vor allem Matrix-Metalloproteasen (MMPs) bei, die durch proinflammatorische Zytokinstimulation (TNF, IL1 und IL17) aus Makrophagen und Fibroblasten freigesetzt werden. Die Knochendestruktion erfolgt via Osteoklasten und Aktivierung über RANK. Die Expression und Freisetzung von RANK-L auf Fibroblasten, T-Zellen und Osteoblasten (stimuliert durch TNF, IL-1 und IL-6) führt zur vermehrten Interaktion mit RANK auf der Zelloberfläche von Osteoklastenvorstufen und damit zu deren Reifung.¹¹ (Abb. 2)

1.1.3 Therapie

Eine kausale Therapie der rheumatoiden Arthritis ist bislang nicht möglich. Neben physikalischen und physiotherapeutischen Maßnahmen, sowie chirurgischen Interventionen, kommen zur medikamentösen Therapie vor allem vier Substanzgruppen zum Einsatz. Im akuten Schub sind dies vor allem **nichtsteroidale Antiphlogistika (NSARs)** und **Glukokortikoide** (u.U. auch lokal als intraartikuläre Steroidinjektionen). Die S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie von 2012 empfiehlt ab Diagnosestellung den Beginn mit **DMARDs** (Disease-modifying antirheumatic Drugs). Dabei ist Methotrexat die Standard-Basistherapie und wird in der Regel mit niedrig dosiertem Prednisolon kombiniert. Bei nicht ausreichendem Ansprechen sollte nach zwölf Wochen eine klassische DMARD Kombinationstherapie eingesetzt werden. Bei anhaltend hoher Krankheitsaktivität wird spätestens nach sechs Monaten der Einsatz eines **Biologikums** empfohlen, in Sondersituationen (z.B. frühe Destruktionen, ungünstige Prognose) ggf. früher. Falls sich das zuerst angewandte Biologikum in einem Zeitraum von drei bis sechs Monaten als nicht ausreichend effektiv erweist, sollte der Wechsel auf ein anderes Biologikum erfolgen. Bei langanhaltender Remission kann eine kontrollierte Reduktion der Basistherapie versucht werden.¹² Die wichtigste Voraussetzung für zielgerichtete Therapien ist das Verständnis der Pathogenese der Erkrankung.

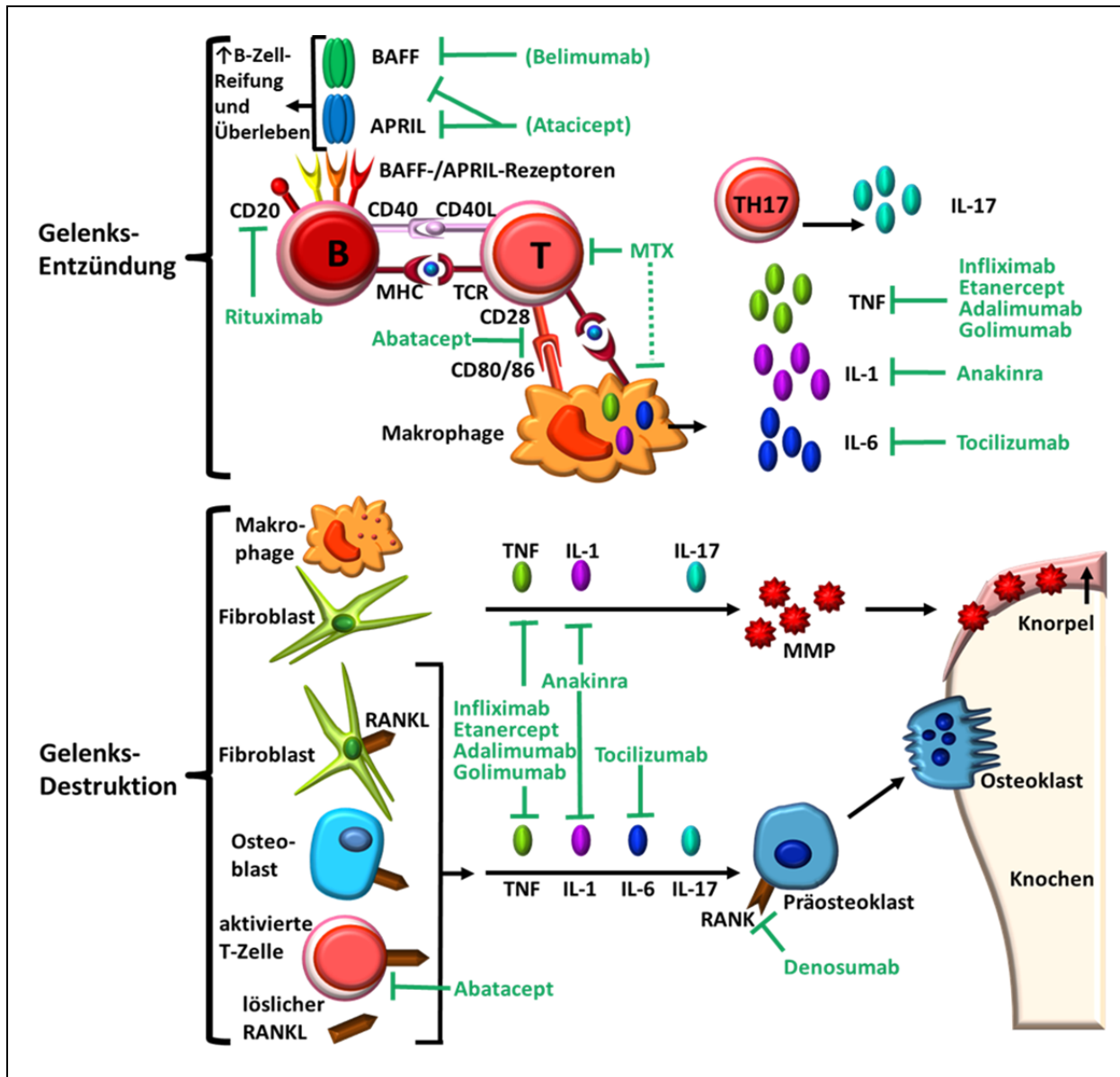


Abbildung 2: Pathogenese und Therapieansätze bei rheumatoider Arthritis (nach ³) Die Abbildung zeigt Aspekte der Pathogenese und dafür spezifische Therapieansätze im oberen Teil bei Gelenkentzündung, im unteren Teil bei Gelenksdestruktion. *MTX* - ein Folsäureanalogon - wirkt durch Hemmung des Adenosin-Metabolismus und der T-Zell-Aktivierung. Ein wichtiger Angriffspunkt liegt in der Blockade verschiedener Zytokine, vor allem durch monoklonale Antikörper. TNF-Blocker neutralisieren zirkulierendes und synoviales TNF. Zugelassen sind *Infliximab* (chimäres Anti-TNF), *Etanercept* (löslicher TNF-Rezeptor) sowie *Adalimumab* und *Golimumab* (humane Anti-TNFs). *Anakinra* - ein humaner Interleukin-1-Rezeptorantagonist - ist nur in Kombination mit *MTX* zugelassen. *Tocilizumab* ist ein zugelassener humanisierter Interleukin-6-Rezeptorantagonist. In den letzten Jahren wurden vor allem Medikamente zur Beeinflussung von B- und T-Zellen untersucht. Zugelassene Substanzen sind *Abatacept*, das durch CD-80/86-Bindung die zur T-Zell-Aktivierung notwendigen co-stimulatorischen Signale hemmt und *Rituximab*, ein chimärer Antikörper, der CD-20 auf B-Zell-Oberflächen bindet und dadurch eine B-Zell-Depletion bewirkt. Andere Ansätze zur Hemmung von zu B-Zell-Reifung und zu gesteigertem B-Zell-Überleben führenden Faktoren, wie APRIL und BAFF, stellen *Belimumab* und *Atacicept* dar. *Denosumab* ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität und Spezifität den RANKL bindet und somit die Aktivierung von Osteoklasten via RANK und daraus folgend Knochenabbau verhindert, zugelassen für RA ist es allerdings noch nicht (off-label use).

1.2 Fibroblastenartige Synoviozyten

Es werden zwei Typen von Synovialzellen unterschieden. Zum einen gibt es die Makrophagen-ähnlichen Typ-A-Synoviozyten mit Fähigkeit zur Phagozytose, die auch als antigenpräsentierende Zellen fungieren können. Den größeren Anteil stellen die Fibroblasten-ähnlichen Typ-B-Synoviozyten mit sekretorischer Funktion dar.¹³

Fibroblastenartige Synoviozyten (FLS; Fibroblast-like Synoviocytes) gehören zu den wichtigsten Effektorzellen in Bezug auf Gelenkdestruktion bei RA.¹⁴ Dabei spielt vor allem ihre Fähigkeit Weichteilgewebe und Knorpel zu infiltrieren eine Rolle (Abb. 1 und 2). Zudem können fibroblastenartige Synoviozyten die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten induzieren (Abb. 2). Ihre sekretorische Funktion umfasst die Bildung von Proteoglykanen, Zytokinen, Arachidonsäuremetaboliten und Metalloproteinasen.¹⁵

Im RA-Gelenk findet sich insgesamt ein hoher Anteil an Fibroblasten- und Makrophagentypischen Zytokinen, deren Ursprungsort die synoviale Deckzellschicht ist. Von den Typ-A-Synoviozyten stammen dabei in erster Linie IL-1 β , TNF- α und GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Die Typ B-Zellen bilden primär IL-6¹⁵ und angiogenetische Faktoren, wie *Fibroblast Growth Factor* (FGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)^{16,17}.

FLS mesenchymalen Ursprungs exprimieren *B cell Activating Factor of the tumor necrosis factor Family* (BAFF) als Reaktion auf die Stimulation mit proinflammatorischen Enzymen wie IFN- γ und TNF- α und können dadurch vermutlich B-Zellen in der unmittelbaren Umgebung vor Apoptose schützen.¹⁸ Außerdem wurde gezeigt, dass RA-FLS *B cell maturation antigen* (BCMA) exprimieren und durch *A Proliferation- Inducing Ligand* (APRIL) stimuliert werden können.¹⁹ (vgl. Kapitel 1.4)

1.3 Interleukin-6

IL-6 (Interleukin-6) – früher *B-cell stimulating factor 2* genannt^{20,21} – ist ein pleiotropes Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten, bei Entzündungsreaktionen und der Hämatopoese spielt. Störungen in der IL-6-Regulation beeinflussen die Immunantwort und haben somit Einfluss auf immunvermittelte entzündliche Erkrankungen, wie RA, juvenile idiopathische Arthritis, Morbus Castleman oder Morbus Crohn. Durch seine Rolle als Wachstums- und antiapoptotischer Faktor führt eine Überproduktion zur Entwicklung maligner Erkrankungen (z.B. malignes Melanom, Nierenkarzinom). Aus diesen Gründen wird die Interleukin-6-Hemmung in Form des IL-6-Rezeptor-Antagonisten Tocilizumab (Abb. 2) therapeutisch genutzt. Gebildet wird das Zytokin beispielweise von T- und B-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothel-, Mesangium- und einigen Tumorzellen.²² Bei RA korreliert eine IL-6-Erhöhung in Serum oder Synovia mit Klinik und CRP passend zur Krankheitsaktivität.^{23,24} Zudem wurde bei einigen RA-Patienten ein Polymorphismus im IL-6-Promotor (IL-6-174) detektiert, der mit einer erhöhten Anfälligkeit für RA und gesteigerter Aktivität der RA einherzugehen scheint und deshalb einen genetischen Risikofaktor für RA darstellen könnte.²⁵

1.4 Das APRIL-/ BAFF-System

1.4.1 Die TNF- und TNF-Rezeptor- Familie

Liganden der Tumor-Nekrose-Faktor Familie und ihre entsprechenden Rezeptoren spielen eine essentielle Rolle bei vielen zellinternen biologischen Vorgängen, wie der Immunabwehr, Entzündungsprozessen, Apoptose, Autoimmunität, sowie der Entwicklung und Organogenese des Immunsystems. Einige Liganden binden an diverse Rezeptoren und einige der Rezeptoren interagieren auch mit verschiedenen Liganden. Diese Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen sind gewöhnlich sehr spezifisch und hochaffin.²⁶ Die Expression der Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie findet zum Großteil durch Zellen des Immunsystems statt.²⁷

Die Liganden des TNF-Systems sind Typ-II-Transmembranproteine (d.h.: N-Terminus intrazellulär). Ausnahmen gibt es beispielsweise bei APRIL, der auch in löslicher Form exprimiert wird. Einige Liganden, wie zum Beispiel TNF zeigen sowohl in ihrer membranassoziierten, als auch in ihrer löslichen Form Aktivität. In der Regel handelt es sich bei den Liganden der TNF-Familie in ihrer biologisch aktiven Form um Homotrimere. Diese ähneln sich vor allem in den internen aromatischen Resten, während die Oberflächen wenige Homologien zeigen, was die Rezeptorselektivität der einzelnen Liganden erklärt²⁶.

Während es sich bei einem Großteil der Rezeptoren des TNF-Systems um Typ-I-Transmembranproteine (d.h.: N-Terminus extrazellulär) mit cysteinreichen extrazellulären Domänen handelt²⁸, gehören BCMA, TACI und BAFF-R den Typ-III-Transmembranproteinen an. Hierbei gibt es breite Variationen, so besitzt der BAFF-Rezeptor beispielsweise nur eine partielle cysteinreiche Domäne²⁷. Entsprechend der Signalweiterleitung lassen sich die Rezeptoren der TNF-Familie in drei Gruppen unterteilen. Bei der ersten Untergruppe handelt es sich um die sogenannten Todesrezeptoren, mit der gemeinsamen Eigenschaft Apoptose induzieren zu können. Übereinstimmend besitzen diese Rezeptoren eine homologe intrazelluläre circa 80 Aminosäuren lange sogenannte Todesdomäne. Beispiele für diese Gruppe sind TNF-R1 und Fas (CD95).²⁹ Die Mitglieder der zweiten Untergruppe – dazu gehören unter anderem RANK, BAFF-R, BCMA und TACI – interagieren an intrazellulären Bindungsstellen mit *TNF receptor-associated factor* (TRAF). Dies kann zur Aktivierung verschiedenster Signalwege, die zur Aktivierung, Proliferation und zum Überleben von Zellen entscheidend sind, führen. Beispiele sind die Aktivierung des *nuclear factor κB* (NF-κB) oder des *c-Jun N-terminale kinase* (JNK)-Weges.³⁰

sezernierter Faktor, nachdem es intrazellulär im Golgi-Apparat durch die Furin-Convertase modifiziert wird.³⁵ Es existiert jedoch auch eine membrangebundene Form von APRIL, der sogenannte TWE-PRIL (TNFSF12-TNFSF13). Dabei handelt es sich um ein aus APRIL und *TNF-related weak inducer of apoptosis* (TWEAK, auch: TNFSF12) fusioniertes Protein - eine Verbindung, die biologisch aktiv ist, über deren physiologische Funktion jedoch wenig bekannt ist.³⁶ Zudem wurden Heterotrimere aus BAFF und APRIL beschrieben.³⁷ Diese wurden im Serum von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen gefunden.³⁸ APRIL und BAFF werden in erster Linie durch Zellen der angeborenen Immunabwehr (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen) gebildet. Gesteigerte Bildung der Liganden findet in Gegenwart von Interferon- α , Interferon- γ , Interleukin-10, bestimmten aktivierten Toll-like Rezeptoren³⁹, sowie G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)⁴⁰ statt. Zudem können auch T-Zellen, aktivierte B-Zellen und B-CLL-Zellen APRIL und BAFF produzieren.⁴¹ Außerdem gibt es eine ganze Reihe an nicht hämatopoetischen Zellen, die APRIL und BAFF exprimieren. Unter anderem zählen dazu auch fibroblastenähnliche Synoviozyten aus der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis.⁴² Speicheldrüsenepithelzellen von Patienten mit Sjögren-Syndrom⁴³, Epithelzellen der Tonsillen und Atemwege^{44,45}, Zytotrophoblasten der Placenta⁴⁶ und Adipozyten und Karzinomzellen der Mamma⁴⁷ sowie Osteoklasten bei Patienten mit multiplem Myelom⁴⁸ und Astrozyten bei Patienten mit primären ZNS-Lymphomen oder multipler Sklerose.^{49,50}

1.4.3 Die Rezeptoren von APRIL und BAFF

APRIL und BAFF binden beide an zwei Rezeptoren der TNF-Superfamilie: *B cell maturation antigen* (BCMA; TNFRSF17) und *transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor* (TACI; TNFRSF13B). Zudem bindet BAFF mit hoher Affinität an einen eigenen Rezeptor, den BAFF-Rezeptor (BAFF-R; BR3; TNFRSF13C), während APRIL zusätzlich über seine positiv geladenen basischen Aminosäuren mit Heparinsulfat Proteoglycanen (HSPGs) interagiert.⁵¹ Das HSPG-gebundene APRIL ist biologisch aktiv.⁴⁴ BAFF bindet BCMA mit geringerer Affinität als BAFF-R und TACI, während APRIL BCMA mit höherer Affinität als TACI bindet.⁵² Exprimiert werden die Rezeptoren von APRIL und BAFF in erster Linie von B-Zellen.⁵³ *In vitro* Versuche mit Heterotrimeren aus BAFF und APRIL zeigten, dass diese am ehesten mit TACI interagieren.³⁸ TWE-PRIL scheint die gleichen Rezeptoren wie APRIL zu binden.⁵⁴

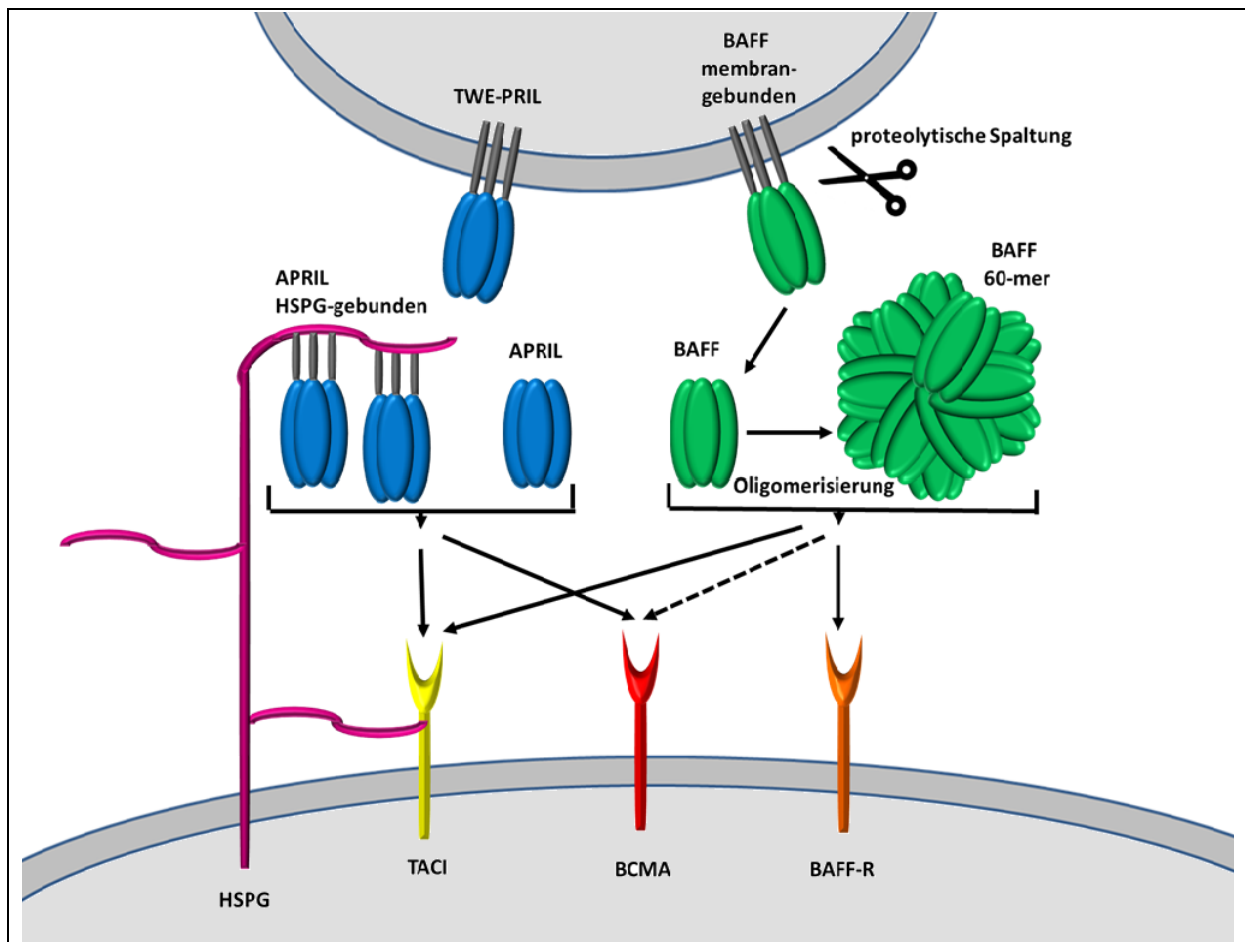


Abbildung 4: Interaktionen von APRIL und BAFF mit ihren Rezeptoren (nach ⁴¹) Die Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die verschiedenen Formen in denen APRIL (a proliferation-inducing ligand) und BAFF (B cell activating factor) vorliegen sowie über die Rezeptoren mit denen sie interagieren: TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), BCMA (B cell maturation antigen) und BAFF-R (BAFF receptor). APRIL liegt als freies Zytokin im Plasma vor, jedoch auch in einer membrangebundenen Form (TWE-PRIL) und außerdem an HSPG (heparan sulphate proteoglycan) gebunden. APRIL bindet an TACI und BCMA. Zudem kann TACI ebenfalls mit HSPG interagieren. BAFF wird als membrangebundenes Protein synthetisiert und durch proteolytische Spaltung - als Homotrimer - freigesetzt. Zudem existiert es durch Oligomerisierung von 20 Trimeren auch als BAFF 60-mer. BAFF interagiert mit BAFF-R, TACI und schwach auch mit BCMA.

Zusätzlich zur Bindung von APRIL und BAFF interagiert TACI – ähnlich wie APRIL – zusätzlich mit HSPGs, in erster Linie mit Syndekan ²⁵⁵, das auf der Oberfläche mesenchymaler Zellen, aktivierter Makrophagen und Antikörper-produzierender Zellen exprimiert wird.^{56,41} *In vitro* Versuche mit – von B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiertem – TACI, zeigten, dass einzelne lösliche APRIL- und BAFF-Trimere zwar TACI binden, jedoch nicht aktivieren können. Zur Aktivierung sind Multimere wie HSPG-gebundener APRIL^{51,57}, BAFF-60mere oder membrangebundene Liganden nötig.^{58,59,60} Diese Beobachtung lässt sich durch die weitere Signaltransduktion erklären.⁴¹ Wie bereits beschrieben interagiert die Gruppe von TNF-Rezeptoren, zu denen auch TACI (und BCMA

und BAFF-R) gehört, mit sogenannten TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs). Dabei handelt es sich um intrazelluläre Trimere, die mit jeder ihrer drei Untereinheiten mit einer intrazellulären Bindungsstelle eines Rezeptors (wie TACI, BCMA und BAFF-R) interagieren können. Die Affinität von TRAFs für monomere Rezeptoren ist gering. Die Bindungskraft steigt jedoch, wenn ein TRAF-Trimer an drei durch Liganden gebundene Rezeptoren bindet.⁶¹ Mit TACI interagieren TRAF2 und TRAF6. Wenn mindestens zwei benachbarte TRAF-Trimere auf diese Weise – also durch mindestens sechs Liganden-bindende TACIs – gebunden sind, wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert.⁶²

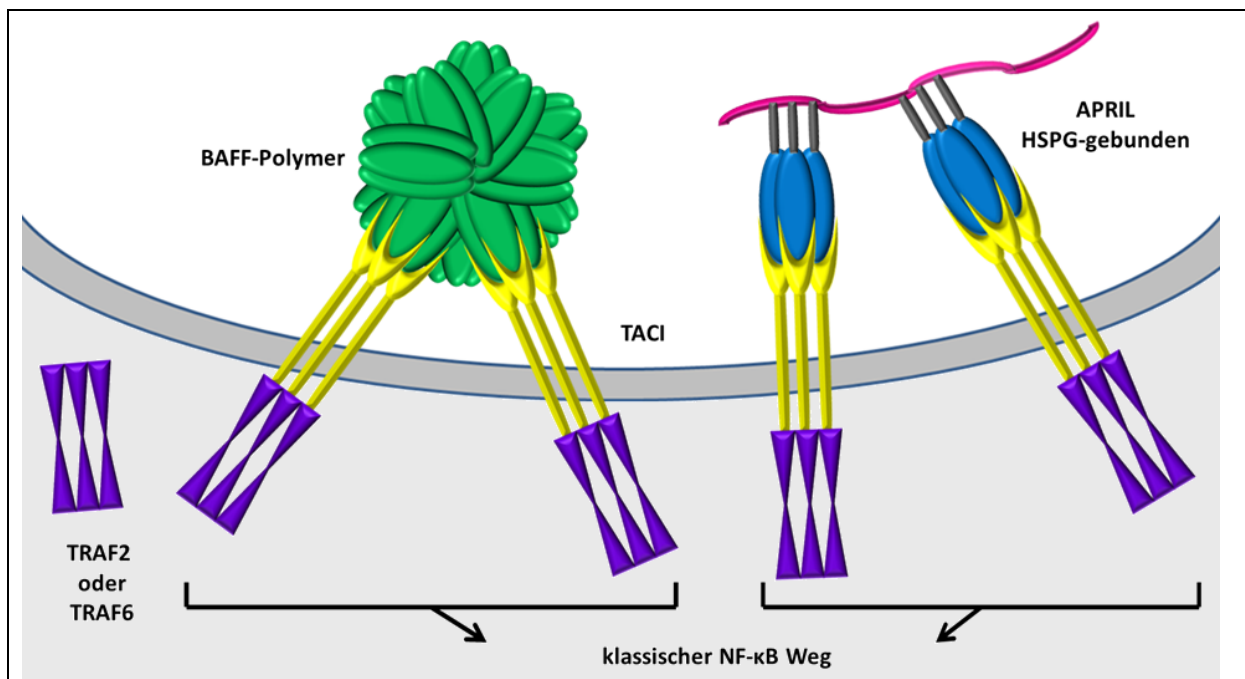


Abbildung 5: Interaktion von APRIL und BAFF mit TACI (nach ⁴¹) Nur wenn zumindest je zwei APRIL- oder BAFF-Trimere an insgesamt sechs TACIs binden, kommt es zur weiteren Signaltransduktion. Das heißt Voraussetzung zur Aktivierung sind entweder membrangebundene Liganden, HSPG-gebundenes APRIL oder BAFF-60mere. Die sechs Liganden-bindenden TACIs interagieren mit wiederum zwei benachbarten intrazellulären TRAF-Trimern (TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren). Im Fall von TACI handelt es sich dabei um TRAF2 und TRAF6-Moleküle. Aus dieser Bindung resultiert ein positives Signal, die Aktivierung des klassischen NF- κ B Weges.

Neben CD-27 positiven B-Gedächtniszellen exprimieren außerdem noch Plasmazellen (aus Tonsillen und Knochenmark), eine kleine Gruppe naiver B-Zellen in Blut und Tonsillen^{53,63} sowie Monozyten und dendritische Zellen den Rezeptor TACI.^{59,60}

Über TACI vermittelt wird eine T-Zell-unabhängige Immunantwort und daraus folgend ein positiver Effekt auf die Differenzierung von Plasmazellen.⁶⁴

Außerdem vermittelt TACI über noch unklare Mechanismen eine generelle Hemmung der B-Zell-Aktivierung.^{65,66} Beteiligt daran ist eventuell eine TACI-getriggerte Senkung des BAFF-Spiegels und damit verbunden eine verringerte BAFF Wirkung über den BAFF-R.⁶⁷

Im Gegensatz zu TACI können sowohl BAFF-Trimere als auch BAFF-60-mere zur Signalweiterleitung über den **BAFF-R** führen.⁵⁸ BAFF-R bindet TRAF3 und induziert dessen Abbau.⁶⁸ TRAF3 wiederum interagiert ansonsten mit der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK) und vermittelt deren Degradation. Die NIK wiederum ist Voraussetzung für die Aktivierung des alternativen NF- κ B Weges.⁶⁹ In Anwesenheit von BAFF wird also die TRAF3 getriggerte Hemmung des alternativen NF- κ B-Weges aufgehoben.⁷⁰ Die aktive NIK hat den Umbau von p100 zu p52 zur Folge. Die Translokation von p52 in den Nucleolus vermittelt Zell-Überleben durch die Induktion von Mcl-1 und Pim2, durch die wiederum die Transkription proapoptischer Gene (Bad und Bim) gehemmt wird.^{70,71,72} Es resultiert in erster Linie ein vermehrtes Überleben von B-Zellen.⁷³ Der BAFF-R wird mit Ausnahme von Plasmazellen des Knochenmarks von allen B-Zell-Populationen exprimiert.⁵³ Zudem findet man BAFF-R auf T-Zellen v.a. nach deren Aktivierung.⁷⁴ Hauptsächlich moduliert BAFF über BAFF-R-Aktivierung die B-Zell-Reifung, Toleranzentwicklung und das Überleben peripherer B-Zellen.^{75,76}

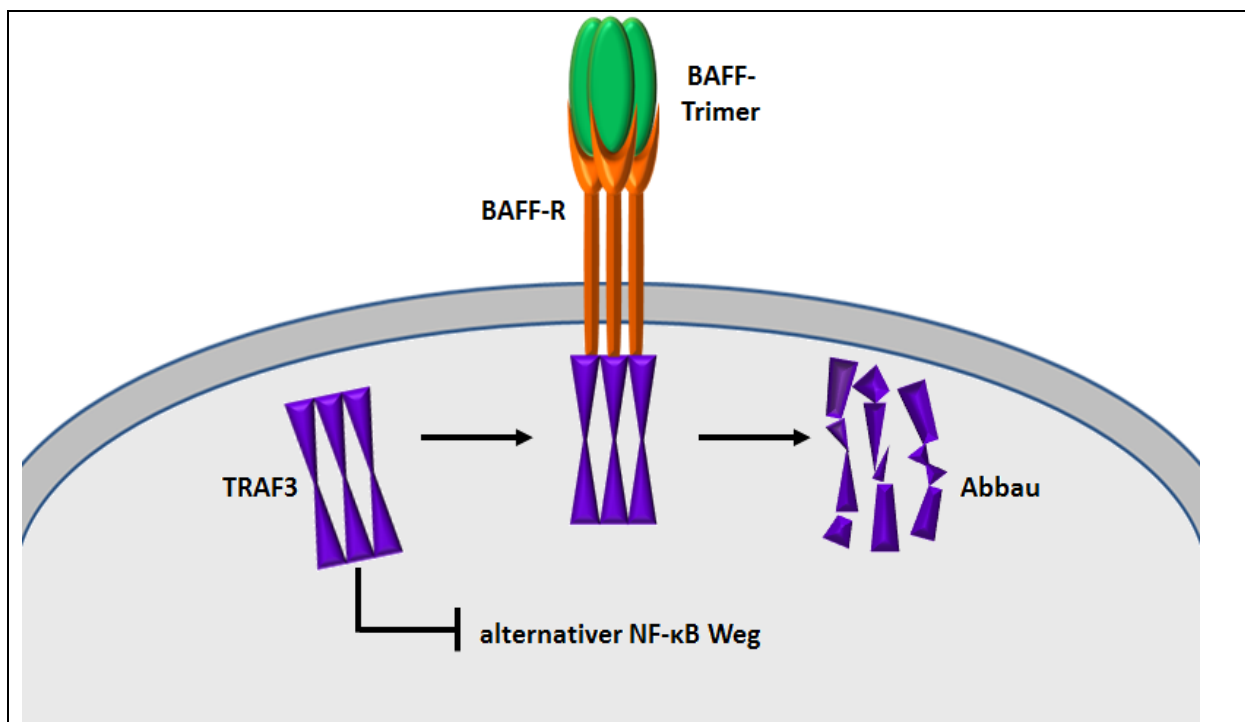


Abbildung 6: Interaktion von BAFF mit BAFF-R (nach ⁴¹) Zur Aktivierung einer BAFF-R getriggerten Signaltransduktion genügen BAFF-Trimere. Der Liganden-gebundene BAFF-R bindet intrazellulär TRAF3 und induziert damit dessen Abbau. Damit wird die –durch freies nicht gebundenes TRAF3 vermittelte –Hemmung des alternativen NF- κ B-Weges aufgehoben.

Wie Studien mit APRIL- und/oder BAFF-defizienten Mäusen zeigen, aktiviert BAFF auch BCMA, wenn auch mit geringerer Affinität als APRIL. Die Reduktion BCMA-abhängiger Plasmazellen im Knochenmark bei gleichzeitigem Fehlen von BAFF und APRIL, kann bei selektiver Abwesenheit von BAFF oder APRIL nicht beobachtet werden.^{77,78} BCMA wird in erster Linie von Plasmazellen aus Tonsillen, Milz und Knochenmark exprimiert.⁵³ Obwohl beim Verständnis der Rolle von TACI und BAFF-R jüngst viele Fortschritte gemacht wurden, bleibt der Signalweg, über den via BCMA das Überleben von Plasmazellen vermittelt wird, unklar.⁷² Bekannt ist, dass auch die Bindung der Liganden an BCMA zu einer TRAF-vermittelten (TRAF2, TRAF5 und TRAF6) NF- κ B-Aktivierung führt. Außerdem gibt es bei BCMA (als einzigem der drei Rezeptoren) Hinweise auf eine Aktivierung des JNK-Weges⁷⁹ und darüber vermittelt auf die Aktivierung von Antigen-Präsentation durch B-Zellen.⁸⁰ Bei der Untersuchung menschlicher BCMA-mRNA wurden vier verschiedene – durch alternatives Spleißen entstandene – Kopien differenziert. Bei den Varianten könnte es sich neben dem bekannten membranständigen BCMA auch um ein lösliches BCMA (mit fehlendem Exon 2 und damit fehlender Transmembrandomäne), mit Köderfunktion, handeln. Eine dritte Variante, mit Verkürzung des Exon 1, könnte eine veränderte APRIL/BAFF-Bindung zur Folge haben. Bei der vierten Variante ist dahingegen die – für die intrazelluläre Domäne kodierende – Erbinformation verändert. Daraus könnte eine BCMA-Variante mit modifizierter Signaltransduktion resultieren.^{81,82} Ob diese Splicevarianten als biologisch aktive Rezeptoren wirken und eine Rolle in Bezug auf die Interaktion mit APRIL und BAFF spielen, ist noch unklar.⁷² Zudem wurde in einigen B-Zell-Linien eine Antisense-BCMA-RNA gefunden, deren Vorkommen möglicherweise eine regulierende Größe bei der BCMA-Expression sowie bei der BCMA-abhängigen Signaltransduktion sein könnte.⁸³

1.4.4 APRIL, BAFF und Autoimmunität

APRIL und BAFF sind nun seit eineinhalb Jahrzehnten bekannt.^{32,84} Seither wurden viele Arbeiten über ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen veröffentlicht. Schon früh wurde eine Verbindung zwischen BAFF, APRIL, BCMA und Autoimmunität deutlich, da in tierexperimentellen Studien, aber auch bei Patienten mit SLE, Sjögren Syndrom und rheumatoider Arthritis auffällig hohe BAFF-Konzentrationen mit einer gesteigerten Anzahl peripherer autoreaktiver B-Zellen, vermehrter B-Zell-Aktivierung und erhöhten Autoantikörperspiegeln einher gingen.^{85,86,87,88} Außerdem zeigte sich eine Steigerung der BCMA-Expression auf PBMCs (mononukleären Zellen des peripheren Blutes) bei Patienten

mit Sjögren Syndrom und rheumatoider Arthritis.⁷² Eine Assoziation mit vermehrter Bildung der Rezeptoren für BAFF und APRIL auf B-Zellen scheint jedoch nicht für alle Autoimmunerkrankungen zu gelten. Bei Patienten mit Myasthenia gravis oder Multipler Sklerose beispielsweise alternieren die Rezeptorzahlen nicht im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen.⁸⁹

Es interagieren im Rahmen von Autoimmunerkrankungen nicht nur B-Zellen mit BAFF und APRIL und exprimieren deren Rezeptoren. Ebenfalls wurde eine APRIL-Stimulierbarkeit und BCMA-Expression von fibroblastenartige Synoviozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beschrieben. Außerdem wurde gezeigt, dass diese FLS APRIL und BAFF bilden, jedoch keinen BAFF-R oder TACI besitzen, was darauf schließen lassen könnte, dass nicht BAFF sondern APRIL der primäre Ligand ist, der mit den Synoviozyten interagiert.¹⁹

Außerdem müssen APRIL und BAFF nicht zwangsläufig parallel bei Autoimmunerkrankungen erhöht sein. Eine Studie, die sich mit BAFF/APRIL-Heterotrimeren befasst hat, fand beispielsweise im Serum von SLE-Patienten sowohl BAFF als auch APRIL als auch APRIL/BAFF-Heterotrimere im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht, während im Serum von Patienten mit RA signifikant höheres APRIL gemessen wurde, nicht aber erhöhtes BAFF oder Heterotrimere.⁹⁰

Präklinische Untersuchungen des therapeutischen Nutzens von BAFF- und APRIL-Antagonisierung bei Mäusen mit SLE-ähnlichem Syndrom hatten eine Reduktion der B- und Plasmazellzahlen zur Folge. Dabei wurde die Auswirkung selektiver BAFF-Blockade (durch BAFF-Rezeptor-Ig) mit der kombinierten Blockierung von BAFF und APRIL verglichen (durch TACI-Ig). Die kombinierte Hemmung ergab – zusätzlich zur Verringerung der B-Zellzahl und reduzierter T-Zell-Aktivierung – eine Erniedrigung der Serumspiegel von IgM-Antikörpern, erniedrigte Plasmazellzahlen in der Milz sowie eine Hemmung der IgM-Reaktion auf T-Zell abhängiges Antigen.⁹¹ Die Ergebnisse solcher Studien stellten den Beginn zur Entwicklung von BAFF- (und APRIL-)Antagonisten als wirksame Therapeutika bei Autoimmunerkrankungen dar, bei denen man sich einen positiven Effekt durch eine Reduktion neu aktivierter B-Zellen erwartet.⁷²

„Mit Belimumab erfolgte im Juli 2011 die europäische Zulassung eines monoklonalen Antikörpers gegen den B-Lymphozytenstimulator BLyS als ‚Zusatztherapie bei erwachsenen

Patienten mit aktivem, Autoantikörper-positiven systemischen Lupus erythematoses, die trotz Standardtherapie eine hohe Krankheitsaktivität (z.B. positiver Test auf Anti-dsDNA-Antikörper und niedriges Komplement) aufweisen‘ (Zulassungstext).“ (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V.)⁹² Jedoch schreibt das IQWiG (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen) am 02.05.2012 in einer Pressemitteilung nach Überprüfung des Zusatznutzens des Wirkstoffs gemäß AMNOG: „Demnach gibt es keine Belege für einen Zusatznutzen von Belimumab. Denn der Hersteller hat in seinem Dossier keine für die Bewertung des Zusatznutzens relevanten Studien vorgelegt.“⁹³ In Bezug auf den Einsatz bei RA sind Ergebnisse einer Phase II-Studie noch ausstehend.

Bei Atacicept – einem zweiten noch experimentellen Arzneimittel – handelt es sich um TACI-Ig. Atacicept bindet sowohl APRIL als auch BAFF und hemmt so B-Zell-Reifung, Differenzierung und Überleben sowie die Immunglobulinproduktion, durch den Vorenhalt von Wachstums- und Entwicklungsfaktoren.⁹⁴

Dieses Medikament ist nicht zugelassen und befindet sich derzeit in Studien zum Einsatz bei beispielsweise SLE oder RA. Zwei Phase-II-Studien zum Einsatz von Atacicept bei RA wurden 2011 veröffentlicht. Die eine, eine randomisierte, placebokontrollierte Studie zur Dosisfindung an Patienten mit RA und einer inadäquaten Reaktion auf TNF-Antagonisten, zeigte biologische Auswirkungen. Atacicept senkte zwar den Immunglobulintiter und den RF-Spiegel signifikant, nicht aber den anti-CCP-Antikörpertiter. Jedoch konnte kein nennenswerter klinischer Effekt der Therapie, gemessen am CRP, beobachtet werden.⁹⁵ Die zweite, eine ebenfalls randomisierte placebokontrollierte Studie, diesmal bei Patienten mit RA und inadäquater Reaktion auf Methotrexat, bestätigte diese Beobachtung. Die erwarteten biologischen Effekte traten ein (unter anderem wurden unter Atacicepttherapie auch niedrigere Spiegel reifer B-Zellen und Plasmazellen gemessen), nicht jedoch die klinischen.⁹⁶ Eine endgültige Bewertung der Therapieansätze ist demnach zum momentanen Zeitpunkt noch nicht möglich.

1.5 Zytokin-induzierte und neuroendokrine Einflüsse auf den RA-Verlauf

1.5.1 Cortisol und RA

Glukokortikoide besitzen antiallergische, antiphlogistische und immunsuppressive Wirkung, durch Hemmung der Freisetzung von Leukotrienen, Prostaglandinen, proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF), der klonalen T-Zell-Proliferation, der T-Zell-Aktivität und der Infiltration mit Entzündungszellen. Die Mechanismen sind meist auf Transkriptionsebene lokalisiert und beinhalten beispielsweise die Steigerung der Expression von β -Rezeptoren oder die Hemmung der Bildung von COX-2, PLA₂, Osteocalcin, IL-2, NF- κ B oder AP-1.⁹⁷

Bei RA-Patienten wird eine im Vergleich zum eigentlichen Bedarf aufgrund der hohen Entzündungsaktivität inadäquat niedrignormale Tätigkeit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse beobachtet.⁹⁸ Die endogene Cortisolproduktion unterliegt einer zirkadianen Rhythmik mit einem *Punctum maximum* in den Morgenstunden. Veränderungen des zirkadian-abhängigen Metabolismus und der Sekretion endogenen Cortisols sind wahrscheinlich mitverantwortlich für tageszeitliche Schwankungen (Morgensteifigkeit und Schmerzmaximum in den Morgenstunden) im Erkrankungsverlauf der RA.⁹⁹

Kendall und Reichstein isolierten 1935 Cortison aus der Nebenniere und Hench, ein befreundeter Arzt, applizierte dies 1948 erstmals einer Patientin mit schwerem Rheuma, die daraufhin schmerzfrei wurde. Gemeinsam erhielten die drei dafür 1950 den Nobelpreis für Medizin.¹⁰⁰ Seither werden Glukokortikoide zur systemischen und lokalen Therapie bei RA eingesetzt.

1.5.2 Sexualhormone und RA

Sowohl die Beobachtung, dass Frauen von RA deutlich häufiger betroffen sind als Männer, als auch ein Anstieg der Inzidenz von RA bei Frauen in den postmenopausalen Jahren, legen die Vermutung einer hormonellen Beteiligung nahe.¹⁰¹ Genauer betrachtet scheint bei RA-Patienten das Gleichgewicht an Sexualhormonen verschoben, gekennzeichnet durch erhöhte Östrogen- und erniedrigte Androgenspiegel.^{102,103} Eine aktuelle Studie berichtet bei Männern über niedrige Testosteronspiegel als prädiktiven Faktor speziell für RF-negative RA.¹⁰⁴ Versuche mit RA-FLS zeigten, dass Dihydrotestosteron via Androgenrezeptor-abhängiger NF- κ B-Aktivierung die IL-1 α - oder TNF-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-8, IL-6, IL-1 β) hemmt.¹⁰⁵ Estradiol (E2) hingegen wird eine duale Rolle zugeschrieben. Während E2 bei Gesunden in Zusammenhang mit FLS protektive Wirkung

aufs Gewebe hat (gesteigerte Bildung von FGF und Osteoprotegerin; Herunterregulierung von MMPs), zeigt sich in RA-FLS durch E2 eine Stimulation des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (in Gegenwart von IL-1 β).¹⁰⁶ Außerdem hemmt E2 in RA-FLS Apoptose und fördert eine CCL13 (Chemokine (C-C motif) ligand 13) Überproduktion.¹⁰⁷ Gleichzeitig scheint aber auch ein reduzierter E2-Spiegel (Menopause) mit vermehrtem Auftreten der Krankheit assoziiert.¹⁰¹ Ovariectomierte SKG-Mäuse (Tiermodell zur RA¹⁰⁸) zeigten schwere Arthritis und Knorpelzerstörung mit erhöhten TNF- α - und IL-6-Serumspiegeln. Im Gegensatz dazu zeigten östrogenbehandelte Mäuse eine Suppression der Arthritis ohne Knochenabbau, mit wenig Synovialhyperplasie, wenig Immunzellinfiltration und verminderten TNF- α - und IL-6-Serumspiegeln. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Progesteronbehandlung.¹⁰⁹

1.5.3 Sympathikus und RA

Die neuroendokrine Antwort auf einen Entzündungsprozess, vermittelt durch sensorische oder zytokingesteuerte (z.B. IL-6 getriggerte) Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und des sympathischen Nervensystems, beinhaltet initial die Bereitstellung wichtiger Ressourcen (Fett- und Aminosäuren, Glukose sowie Immunzellen und Matrixmetalloproteinasen) zur Inflammationsabwehr. Der sympathische Neurotransmitter Noradrenalin übt eine Chemoattraktion auf Zellen der angeborenen Immunität aus und provoziert eine IL-8-Produktion in Monozyten und Fibroblasten.¹¹⁰

Das sympathische Nervensystem bewirkt über α_1 - und α_2 -Rezeptoren eher proinflammatorische Effekte, während es via β_2 -Rezeptoren beispielsweise durch direkte Hemmung von TNF-Sekretion zu antiinflammatorischer Wirkung kommt.^{111,112,106} Auch die – über die jeweiligen adrenergen Rezeptoren vermittelte – Kreislaufwirkung hat rezeptorabhängig einen gesteigerten oder gehemmten Transport von Immunzellen durch das Lymph- und Blutssystem zur Folge. Es überwiegt in frühen Phasen der Entzündung eher die proinflammatorische und in späteren Phasen der Entzündung sowie bei chronischen Entzündungen die antiinflammatorische Wirkung des sympathischen Nervensystems. Die Wirkung des Sympathikus auf Immunzellen ist hierbei zum einen abhängig von der Neurotransmitterkonzentration, die wiederum mit der lokalen Aktivität und Dichte der Nervenfasern korreliert. Zum anderen steht sie in Zusammenhang mit der Rezeptordichte und -art, die die jeweiligen Immunzellen tragen. Diese regulatorischen Parameter sind auch bei Patienten mit RA verändert.¹¹⁰

1.5.4 Das Endocannabinoidsystem und RA

Zum endogenen Cannabinoid-System gehören die Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ und ihre natürlichen Liganden: Anandamide (AEA; Arachidonylethanolamid; mit höherer Selektivität für CB₁), 2-Arachidonylglycerol (2-AG; mit höherer Selektivität für CB₂) und Palmitoylethanolamid (PEA).¹¹³ Über das Endocannabinoidsystem wird zum einen Neurotransmitterfreisetzung im ZNS gesteuert (v.a. über CB₁-R)¹¹⁴ und zum anderen eine periphere Immunmodulation bewirkt (v.a. über CB₂-R)¹¹⁵.

Positive Auswirkungen hat eine Aktivierung des Endocannabinoidsystems auf Erkrankungen autoimmuner Genese durch Hemmung von Zellmigration, Zytokinproduktion sowie Apoptosesteigerung. Sowohl bei OA- als auch bei RA-Patienten finden sich auf FLS CB₁- und CB₂-Rezeptoren und in der Synovialflüssigkeit AEA und 2-AG, nicht jedoch bei gesunden Patienten, bei denen sich wiederum im Vergleich höhere PEA-Spiegel finden.¹¹⁶ Eine AEA-Behandlung von RA-FLS bringt eine Reduktion der durch IL-1-induzierten IL-6- und MMP-3-Menge (mündliche Kommunikation T. Lowin). Die Hemmung der FAAH (fatty acid amide hydrolase), dem primären Abbauenzym von AEA, führt in Versuchen mit CIA-Mäusen (Kollagen induzierte Arthritis; Tiermodell der RA¹¹⁷) zur geringeren Ausprägung der Krankheit und damit zur Schmerzreduktion. Weitere Differenzierung im Versuchsaufbau gab Hinweis darauf, dass via CB₂-Rezeptor-Aktivierung das Krankheitsausmaß und via CB₁-Rezeptor-Aktivierung die Hyperalgesie reduziert wird.¹¹⁸ Bisher ist in Deutschland seit 2011 Nabiximol (Sativex®), ein THC und Cannabidiol enthaltender Arzneistoff, zur Behandlung von MS-Patienten zugelassen. In einer Studie bei Patienten mit RA-bedingten Schmerzen reduzierte das Medikament im Placebovergleich die Krankheitsaktivität.¹¹⁹

1.6 Osteoarthritis (OA)

Unter Arthrose = Osteoarthritis (OA) versteht man einen übermäßigen Gelenkverschleiß mit daraus folgender steriler Entzündungsreaktion, deshalb „arthritis“. Sie ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung. In Deutschland ist am häufigsten das Kniegelenk betroffen (Gonarthrose). Radiologisch typische Zeichen sind die subchondrale Sklerosierung, Gelenkspaltverschmälerung, Osteophyten und Geröllzysten. Eine langfristige Therapieoption ist der Gelenkersatz mittels Endoprothese. In wissenschaftlichen Arbeiten wird die OA häufig zum Vergleich mit rheumatoider Arthritis herangezogen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Bei rheumatoider Arthritis handelt es sich um eine Erkrankung mit sozioökonomisch bedeutenden Auswirkungen, die sich nur durch ein multimodales Krankheitskonzept erklären lässt. Eine pathogenetische Rolle spielen komplexe Interaktionen von Immunzellen, verschiedensten Zytokinen, endokrinen und neurogenen Einflüssen. Diese verschiedenen Akteure im vielschichtigen Zusammenspiel bilden aber bei ausreichendem Verständnis der Zusammenhänge auch die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Da bereits gezeigt wurde, dass FLS unter bestimmten Bedingungen zumindest BCMA exprimieren, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage nach Effekten einer APRIL-Stimulation auf FLS von Patienten mit RA. Aufgrund der bekannten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch BCMA wird als Readout die IL-6-Bildung durch FLS verwendet. Als Vergleich dienen FLS von OA-Patienten. Um die Auswirkungen des komplexen Zusammenspiels neuroendokriner Faktoren (Steroidhormone, Sympathomimetika und Liganden des Endocannabinoidsystems) und APRIL zu untersuchen, werden des Weiteren entsprechend kombinierte Stimulationsversuche durchgeführt. Von vorrangigem Interesse dabei ist, ob eventuell gefundene - durch APRIL induzierte - Effekte durch neuroendokrine Faktoren unbeeinflusst bleiben, sich potenzieren oder eventuell aufheben lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienteneigenschaften

Zum Einsatz kommen FLS von Patienten mit OA und RA. Gewonnen werden diese aus Gewebe (s.u.), das beim Einsatz einer Knie-TEP (Totale Endoprothese) vom erkrankten Kniegelenk routinemäßig entfernt wird. Hierfür gibt es eine Zusammenarbeit mit dem Asklepios Klinikum Bad Abbach (Orthopädie, Prof. Grifka). Es wurden FLS von 15 OA- und 13 RA-Patienten untersucht (Tabelle 3). In beiden Gruppen sind es überwiegend Frauen (Tabelle 3). Die operierten Rheumapatienten sind im Durchschnitt ca. acht Jahre jünger, als die Arthrosepatienten ($p_{t\text{-test}} = 0,046$). In Bezug auf den BMI ergab sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied (Es handelt sich jeweils im Mittel um Adipositas Grad I.). In Bezug auf die Entzündungsparameter unterscheiden sich die Gruppen kaum in der Höhe der Leukozyten, die Rheumapatienten zeigen jedoch signifikant höhere CRP-Werte als die Arthrosepatienten ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} = 0,004$). Sowohl die RA-, als auch die OA-Patienten wurden mit NSARs schmerztherapiert. Ansonsten wurden die RA-Patienten mit der typischen Medikation bei RA (siehe 1.1.2) behandelt, nicht jedoch die OA-Patienten.

Zum Überblick: siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Patienteneigenschaften

	Anzahl	Geschlecht			Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Entzündungsparameter		Therapie			
		♀	♂	k.A.			CRP [mg/dl]	Leukozyten [*10 ⁹ /l]	NSAR	Steroide	DMARD	Biologika
OA	15	13	2		72 (SD: 10,0)	34,25 (SD: 7,1)	2,6 (SD: 2,5)	7,2 (SD: 2,6)	10 (2 k.A.)	0 (2 k.A.)	0 (2 k.A.)	0 (2 k.A.)
RA	13	10	2	1	64,25 (SD:8,9)	31,76 (SD: 7,3)	13,0 (SD: 13,9)	7,3 (SD: 1,2)	11 (1 k.A.)	10 (1 k.A.)	9 (1 k.A.)	3 (1 k.A.)

(Angaben entweder als Absolutwerte oder als arithmetisches Mittel; SD: Standardabweichung; k.A.: keine Angaben)

2.1.2 Chemikalien

Zellgewinnung

Tabelle 4: Zellgewinnung

Liberase TM Research Grade Purified Enzyme Blends	Roche
Erythrozyten-Lysepuffer	QUIAGEN
PBS (steril) (Phosphate Buffered Saline)	SIGMA-ALDRICH®

Zellkultur

Tabelle 5: Chemikalien für Fibroblastenmedien

Amphotericin	SIGMA-ALDRICH®
FCS (10%) (fetal bovine serum)	SIGMA-ALDRICH®
Hepes Buffer	SIGMA-ALDRICH®
L-Glutamine	SIGMA-ALDRICH®
P/S (Penicillin/Streptomycin)	SIGMA-ALDRICH®
RPMI 1640 Medium (hell)	SIGMA-ALDRICH®
RPMI 1640 Medium (rot) +L-Glutamin	SIGMA-ALDRICH®

Tabelle 6: Eingesetzte Fibroblastenmedien

<u>Fibroblastenmedium mit Phenolrot</u>	<u>Fibroblastenmedium ohne Phenolrot</u>	<u>Fibroblastenmedium ohne Phenolrot und ohne FCS</u>
RPMI 1640 (rot) ▶ 55 ml verwerfen + 5ml P/S + 50ml FCS (10%) + 500µl Amphotericin	RPMI 1640 (hell) ▶ 70ml verwerfen + 5ml P/S + 50ml FCS (10%) + 500µl Amphotericin + 5ml Hepes + 10ml L-Glutamin	RPMI 1640 (hell) ▶ 20 ml verwerfen + 5ml P/S + 500µl Amphotericin + 5ml Hepes + 10ml L-Glutamin

Tabelle 7: Zellsplitten

Trypsin-EDTA-Lösung	SIGMA-ALDRICH®
PBS (steril) (Phosphate Buffered Saline)	SIGMA-ALDRICH®

Behandlungen/Stimulantien

Tabelle 8: Behandlungen/Stimulantien

AEA (Anandamide)	TOCRIS bioscience
APRIL (a proliferation-inducing ligand)	Abcam [®]
HumanCD257 (Bcell activating Factor)	eBioscience
Clonidin (α_2 -Agonist)	SIGMA-ALDRICH [®]
Cortisol	SIGMA-ALDRICH [®]
CP 47.497 (CB ₁ -R-Agonist)	TOCRIS bioscience
DHT (Dihydrotestosteron)	SIGMA-ALDRICH [®]
DPN (ER- β -Agonist)	TOCRIS bioscience
E2 (Estradiol)	SIGMA-ALDRICH [®]
GP-1 α (CB ₂ -R-Agonist)	TOCRIS bioscience
IL-1 β	PromoCell [®]
Isoproterenol (β -Agonist)	SIGMA-ALDRICH [®]
JNJ 1661010 (FAAH-Inhibitor)	TOCRIS bioscience
JTE 907 (inverser CB ₂ -R-Agonist)	TOCRIS bioscience
Nilutamide (Androgen-R-Antagonist)	TOCRIS bioscience
O-1609 (Cannabidiolanalagon)	TOCRIS bioscience
PPT (ER- α -Agonist)	TOCRIS bioscience
Progesterone	SIGMA-ALDRICH [®]
Rimonabant (CB ₁ -R-Antagonist)	Cayman CHEMICAL [®]
TNF	PromoCell [®]

IL-6 ELISA

Tabelle 9: Human IL-6 ELISA

Human IL-6-ELISA - KIT	BD Biosciences-Pharmingen [®] , San Diego
Capture Antibody (1mg/ml)	Purified Anti-Human IL-6
Detection Antibody Avidin	Enzyme Reagent SA _v HRP
Detection Antibody Biotin	Anti Human IL-6
Standard (in 1 ml Aqua dest.)	Recombinant Human IL-6 Lyophilized Standard

Tabelle 10: Lösungen für den IL-6-ELISA

<u>Coating Buffer</u>	
2L Aqua dest.	
8,40g NaHCO ₃	MERCK®
3,56g Na ₂ CO ₃	MERCK®
<u>Wash Buffer</u>	
2L Aqua dest.	
1 Tabl. PBS	SIGMA-ALDRICH®
1ml Tween-20	AppliChem®
<u>Blocklösung</u>	
	(10-fach PBS: 4l Aqua dest. + 320g NaCl (ROTH®) + 8g KCL (MERCK®) + 8g KH ₂ PO ₄ (MERCK®) + 56,96g Na ₂ HPO ₄ (MERCK®))
20ml PBS (1 fach)	
2ml FCS	SIGMA-ALDRICH®
<u>Substrat Solution (TMB)</u>	
1 Tabl. TMB-Dihydrochlorid	SIGMA-ALDRICH®
10ml Phosphat-Citrat-Puffer (1 Tabl. Auf 200ml H ₂ O)	SIGMA-ALDRICH®
10 µl 30% H ₂ O ₂	MERCK®
<u>Stopplösung</u>	
946ml Aqua dest.	
54ml 96%ige H ₂ SO ₄	MERCK®

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten - Cell Culture Plate	CoStar®
BD Falcon Tubes 50ml/15ml	BD Biosciences
Bechergläser/Flaschen diverse	biochrom/ BRAND®
Cell Culture Dish	CORNING®
Einzelstreifen für ELISA	Nunc MaxiSorp®
Eppendorf Cups diverse	Eppendorf

Falcon Cell Strainer 70µm Nylon	BD Biosciences-Pharmingen
Pipettenspitzen diverse	Eppendorf
Schraubbecher mit Deckel	SARSTEDT
Skalpelle	Feather disposable Scalpel
Stripette 5/10/25/50ml	CoStar®
Zell-Kultur-Flaschen 25cm ² /75cm ²	CORNING®

2.1.4 Geräte

Tabelle 12: Geräte

Accu jet (Motorpipettierhilfe)	BRAND®
ELISA-Reader	Emax® Molecular Devices
Inkubator 37°C	Heraeus instruments
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Lichtmikroskop	LEICA DM IRB
Pipetten: diverse Größen, Multipipetten, Transferpipetten	Eppendorf; BRAND®
Schüttler 37°C	Stuart Schüttelincubator Gyro-Rocker
Sterilbank	Heraeus instruments
Vakuumpumpe	KNF Laboport®
Vortex Mixer	neoLab
Wasserbad	Julabo SW-20C
Zentrifugen	Heraeus Biofuge Fresco und Heraeus Megafuge 1.0

2.1.5 Software

Tabelle 13: Software

Citavi	3, Swiss Academic Software GmbH
Microsoft Excel	2010
Microsoft PowerPoint	2010
Microsoft Word	2010
SigmaPlot	11.0, Systat Software
SoftMax	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellgewinnung

Alle folgenden Arbeitsschritte zur Zellgewinnung erfolgen in steriler Umgebung mit sterilen Materialien. Das Synovialgewebe wird direkt aus dem OP, unmittelbar nach Entnahme, in PBS, auf Eis zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert. Der Zeitraum zwischen Entnahme und Verarbeitung beträgt ca. eine Stunde.

1. Das Gewebestück wird aus der isotonen Flüssigkeit entnommen und mittels Skalpell, in steriler Atmosphäre, auf entsprechender Unterlage (z.B. Petrischale), zügig weitestgehend zerkleinert.
2. Der Gewebebrei wird in ca. 25ml entsprechend verdünnte Liberase (Rekonstitution des Lyophilisats mit sterilem Wasser ($5\text{mg} + 2\text{ml H}_2\text{O} = 13\text{ Wünsch units/ml} = 2,5\text{ mg/ml}$); 1:50 mit PBS weiterverdünnen = 0,26 Wünsch units (Enzym-Working-Konzentration: 0,08-0,28 Wünsch units)) gegeben und eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler, unter kräftiger Bewegung, mittels des Enzyms verdaut.
3. Anschließend wird die Zellemlulsion mit ca. 20ml PBS aufgefüllt und somit die Enzymaktivität gestoppt.
4. Diese Lösung wird durch ein 70µm Zellsieb passiert (Spritzenstempel), um die Zellen, die aus dem Gewebeverband herausgelöst wurden, zu gewinnen.
5. Die „Zellsuppe“ wird bei 16000 Umdrehungen für 8min bei 4°C zentrifugiert.
6. Die Gewebebestandteile, die nicht passierbar sind, werden noch einmal in 25ml verdünnte Enzymlösung gegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die Schritte 3,4 und 5 wiederholt.
7. Nun wird eine Erythrozytenlyse vorgenommen. Dazu wird das von Überstand befreite Pellet mit ca. 5ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und nach einer 5- bis 10-minütigen Inkubationszeit mit mindestens 15ml PBS aufgefüllt, um den Lysepuffer zu deaktivieren.
8. Das Gemisch wird bei 1600 Umdrehungen für 8min bei 4°C zentrifugiert.
9. Nun werden die Zellen in ein entsprechendes Medium aufgenommen. (RPMI 1640 + FCS 10% + P/S 10ml + Hapes)
10. Gegebenenfalls kann die Zellsuspension noch einmal durch ein 70µm Zellsieb gegeben werden, um noch vorhandene Verklumpungen oder auch Fettzellen zurück zu halten.

2.2.2 Zellkultur

Alle folgenden Arbeitsschritte zur Zellkultur erfolgen in steriler Umgebung mit sterilen Materialien. Die Fibroblasten wachsen als Primärkulturen in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C. Spätestens alle 48 Stunden wird das Nährmedium der adhärenen Zellen (solange sie in Kulturflaschen wachsen: Fibroblastenmedium mit Phenolrot) gewechselt. Das Medium wurde hierzu entweder im Wasserbad auf 37°C, zumindest aber auf Raumtemperatur gehalten. Je nach Teilungsrate nimmt die Dichte der Zellen der diversen Patienten unterschiedlich schnell zu und die Fibroblasten sind dementsprechend davon abhängig nach unterschiedlich vielen Tagen konfluent und müssen gesplittet werden. Zum Zellsplitten wird 1:10 verdünnte Trypsin-EDTA-Lösung benötigt.

Im Folgenden wird das Vorgehen für das Splitten einer mittleren Zellkulturflasche auf zwei mittlere Zellkulturflaschen geschildert.

1. Das ‚alte‘ Medium wird via Pumpe in der Sterilbank aus der Kulturflasche abgesaugt.
2. Im Anschluss werden die adhärenen Zellen mit 10 ml PBS gespült.
3. Das PBS wird wieder abgesaugt.
4. Es werden 12ml der Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Flasche im Brutschrank für 1-3 Minuten inkubiert.
5. Unter dem Lichtmikroskop findet die Kontrolle der Zellablösung statt. Sind die Fibroblasten noch adhären, wird die Inkubationszeit um einige Minuten verlängert oder mechanisch durch vorsichtiges Klopfen versucht die Zellen zu suspendieren.
6. Um die Reaktion zu stoppen werden 28ml FCS-haltiges Fibroblastenmedium hinzugegeben.
7. Die 40 ml Zellsuspension werden in ein Falcontube™ überführt und mit 16000 Umdrehungen für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.
8. Der Überstand wird in einen Urinbecher dekantiert.
9. Das Zellpellet wird in 10ml Fibroblastenmedium mit Phenolrot durch auf- und abpipettieren resuspendiert.
10. Je 5ml davon werden in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit zusätzlich 10ml Medium ergänzt.

Für die Behandlungen werden Zellen der Passagen drei bis sechs ausgesät. Für eine 96-Well-Platte wird im Anschluss an Schritt 8 das Zellpellet in 19,5ml Fibroblastenmedium ohne Phenolrot resuspendiert. In jedes Well werden 200µl dieser Suspension pipettiert. Das Medium wird wieder spätestens nach 48 Stunden gewechselt.

2.2.3 Zellbehandlungen

Alle folgenden Arbeitsschritte der Zellbehandlung erfolgen in steriler Umgebung mit sterilen Materialien. 24 Stunden vor den Behandlungen wird das Medium mit FCS zu 180 µl pro Well Fibroblastenmedium ohne Phenolrot und ohne FCS gewechselt.

Für eine zeitgleiche Behandlung der Fibroblasten in allen Wells werden zunächst in einer gesonderten 96-Well-Platte Verdünnungsreihen in der 10-fachen Konzentration der letztendlich gewünschten Behandlungskonzentrationen angefertigt. Zum Verdünnen wird FCS-freies-Medium benutzt. Als Vorlage dienen folgende Schemata:

Tabelle 14: Behandlungsschema A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medium	APRIL 10ng/ml Cortisol 10µmol/l	APRIL 10ng/ml Cortisol 100nmol/l	Medium	APRIL 10ng/ml AEA 1µmol/l	APRIL 10ng/ml AEA 10nmol/l						
B	Medium	APRIL 100ng/ml Cortisol 10µmol/l	APRIL 100ng/ml Cortisol 100nmol/l	Medium	APRIL 100ng/ml AEA 1µmol/l	APRIL 100ng/ml AEA 10nmol/l						
C	APRIL 10ng/ml	APRIL 500ng/ml Cortisol 10µmol/l	APRIL 500ng/ml Cortisol 100nmol/l	APRIL 10ng/ml	APRIL 500ng/ml AEA 1µmol/l	APRIL 500ng/ml AEA 10nmol/l						
D	APRIL 100ng/ml	APRIL 1µg/ml Cortisol 10µmol/l	APRIL 1µg/ml Cortisol 100nmol/l	APRIL 100ng/ml	APRIL 1µg/ml AEA 1µmol/l	APRIL 1µg/ml AEA 10nmol/l						
E	APRIL 500ng/ml	APRIL 10ng/ml Cortisol 1µmol/l	APRIL 10ng/ml GP 1α 10nmol/l	APRIL 500ng/ml	APRIL 10ng/ml AEA 100nmol/l	APRIL 10ng/ml AEA 1nmol/l						
F	APRIL 1µg/ml	APRIL 100ng/ml Cortisol 1µmol/l	APRIL 100ng/ml GP 1α 10nmol/l	APRIL 1µg/ml	APRIL 100ng/ml AEA 100nmol/l	APRIL 100ng/ml AEA 1nmol/l						
G	APRIL 500ng/ml CP 47.497 1µmol/l	APRIL 500ng/ml Cortisol 1µmol/l	APRIL 500ng/ml GP 1α 10nmol/l	APRIL 500ng/ml AEA 10µmol/l	APRIL 500ng/ml AEA 100nmol/l	APRIL 500ng/ml AEA 1nmol/l						
H	APRIL 1µg/ml CP 47.497 1µmol/l	APRIL 1µg/ml Cortisol 1µmol/l	APRIL 1µg/ml GP 1α 10nmol/l	APRIL 1µg/ml AEA 10µmol/l	APRIL 1µg/ml AEA 100nmol/l	APRIL 1µg/ml AEA 1nmol/l						

Es werden je 20 µl jedes Wells aus Schema A in jeweils zwei Wells mit Fibroblasten überführt. Das heißt letztendlich wird jede Behandlung für jede Zelllinie mindestens zweimal durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank werden die Überstände abpipettiert und entweder eingefroren oder direkt im IL-6-ELISA weiter analysiert.

Tabelle 15: Behandlungsschema B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medium	Isoproterenol 100nmol/l	DHT 1nmol/l Nilutam. 100nmol/l	O1602 10µmol/l	AEA 10nmol/l	AEA 100pmol/l JNJ 1µmol/l	Medium	JTE 907 1µmol/l	CP 47.497 1nmol/l	Progesteron 1µmol/l	Cortisol 100nmol/l	DPN 1µmol/l
B	Phenylephrin 1µmol/l	Isoproterenol 10nmol/l	E2 1µmol/l	O1602 1µmol/l	AEA 1nmol/l	AEA 10pmol/l JNJ 1µmol/l	GP 1α 1µmol/l	JTE 907 100nmol/l	CP 47.497 100pmol/l	Progesteron 100nmol/l	Cortisol 10nmol/l	DPN 100nmol/l
C	Phenylephrin 100nmol/l	DHT 1µmol/l	E2 100nmol/l	O1602 100nmol/l	AEA 100pmol/l	JNJ 1µmol/l	GP 1α 100nmol/l	JTE 907 10nmol/l	Rimobabant 10µmol/l	Progesteron 10nmol/l	Cortisol 1nmol/l	DPN 10nmol/l
D	Phenylephrin 10nmol/l	DHT 100nmol/l	E2 10nmol/l	O1918 100µmol/l	AEA 10pmol/l	Medium	GP 1α 10nmol/l	JTE 907 1nmol/l	Rimobabant 1µmol/l	Progesteron 1nmol/l	Cortisol 100nmol/l JNJ 1µmol/l	DPN 1nmol/l
E	Clonidin 1µmol/l	DHT 10nmol/l	E2 1nmol/l	O1602 10µmol/l O1918 100µmol/l	AEA 1µmol/l JNJ 1µmol/l	TNF 100ng/ml	GP 1α 1nmol/l	CP 47.497 10µmol/l	Rimobabant 100nmol/l	Progesteron 100pmol/l	Cortisol 1µmol/l JNJ 1µmol/l	PPT 100nmol/l
F	Clonidin 100nmol/l	DHT 1nmol/l	E2 100pmol/l	AEA 10µmol/l	AEA 100nmol/l JNJ 1µmol/l	TNF 10ng/ml	GP 1α 100pmol/l	CP 47.497 1µmol/l	Rimobabant 10nmol/l	Progesteron 10pmol/l	Cortisol 100nmol/l JNJ 1µmol/l	PPT 10nmol/l
G	Clonidin 10nmol/l	DHT 100pmol/l	E2 10pmol/l	AEA 1µmol/l	AEA 10nmol/l JNJ 1µmol/l	IL-1β 100ng/ml	GP 1α 10pmol/l	CP 47.497 100nmol/l	Rimobabant 1nmol/l	Cortisol 10µmol/l	Cortisol 10nmol/l JNJ 1µmol/l	PPT 1nmol/l
H	Isoproterenol 1µmol/l	Nilutamid 100nmol/l	O1602 100µmol/l	AEA 100nmol/l	AEA 1nmol/l JNJ 1µmol/l	IL-1β 10ng/ml	JTE 907 10µmol/l	CP 47.497 10nmol/l	Rimobabant 100pmol/l	Cortisol 1µmol/l	Cortisol 1nmol/l JNJ 1µmol/l	PPT 100pmol/l

Auch aus den Wells von Schema B werden jeweils 20 µl in je zwei Wells, der mit Fibroblasten konfluent bedeckten 96-Well-Platte, pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank wird mit FCS-freiem Medium verdünntes APRIL in jedes Well pipettiert, so dass Endkonzentrationen von 10ng/ml APRIL pro Well erreicht werden. Ausgespart werden die Wells mit TNF- und IL-1β-Behandlung. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank werden die Überstände wiederum abpipettiert und entweder eingefroren oder direkt im IL-6-ELISA weiter analysiert.

2.2.4 IL-6-ELISA

Im Folgenden wird das Vorgehen für eine ELISA-Platte mit 96 Wells geschildert.

1. Platte beschichten (coaten):

Es werden 30µl des Stock (Capture Antibody 1mg/ml) in 12 ml Coating Buffer gegeben. Von dieser Lösung werden 100µl in jedes Well der 96-Well-ELISA-Platte (Nunc Maxi Sorp Flachbodenplatte) pipettiert. Diese wird mindestens 10-14 Stunden bei 4°C stehen gelassen.

2. 3 x mit Wash Buffer waschen.

3. Blocken:

Für 20 Minuten 100µl Blocklösung pro Well auftragen.

4. 3 x mit Wash Buffer waschen.

5. Auftragen der Proben und Standards:

Es wird die Standardverdünnungsreihe hergestellt: acht Verdünnungen - jeweils 1:1 - mit Fibroblastenmedium ohne Phenolrot und ohne FCS (Höchster Standard: 1242 pg/ml). Nun werden jeweils 100µl des Standards, Blinds (FCS-freies Medium) und Proben aufgetragen. Es folgt eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei RT.

6. 3 x mit Wash Buffer waschen.

7. Auftragen des Detectantikörpers:

Es werden jeweils 30µl Detection Antibody Avidin und Detection Antibody Biotin in 24ml Wash Buffer gegeben. Von diesem Substratantikörpergemisch werden 200 µl in jedes Well pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

8. 3 x mit Wash Buffer waschen.

9. Auftragen der Substrat Solution (TMB)

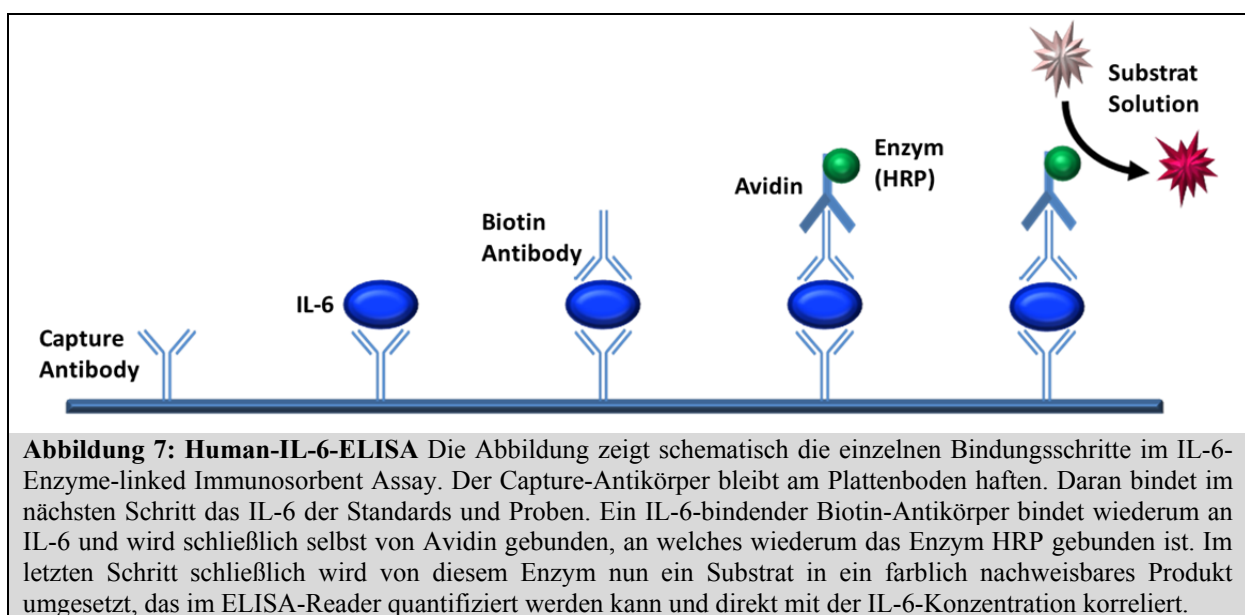
In jedes Well werden 100µl der Substrat Solution gegeben und für 30 Minuten im Dunklen inkubiert.

10. Auftragen der Stopplösung

Zusätzlich werden nun in jedes Well 50µl des Stopplösung pipettiert.

11. Lesen der Platte

Bei 450 bis 650 nm Wellenlänge wird die Platte nun im ELISA-Reader gelesen.

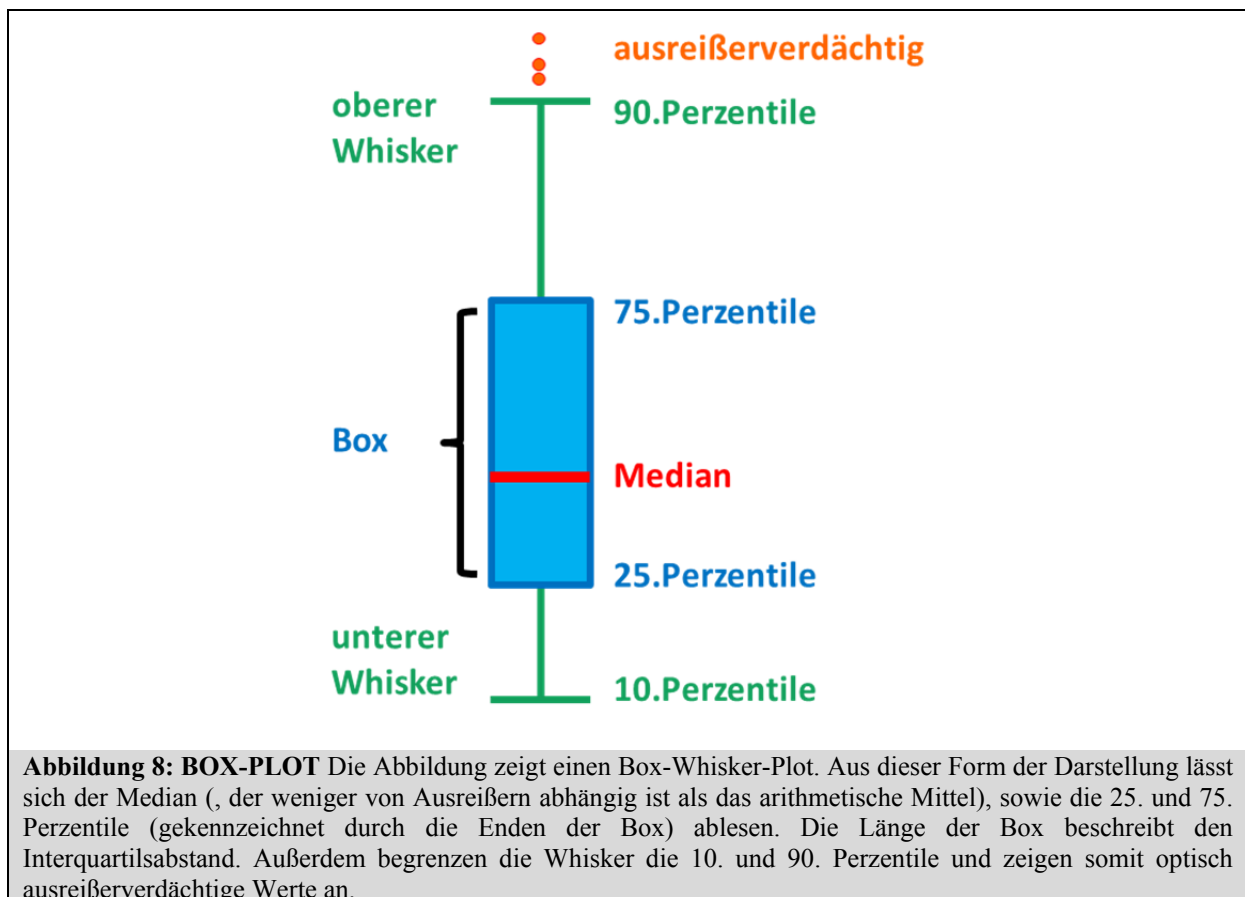


2.2.5 Statistische Datenauswertung und graphische Darstellung

Die Daten wurden mit SigmaPlot 11.0 statistisch ausgewertet, sowie graphisch dargestellt. Zur statistischen Auswertung kam beim Vergleich zweier Gruppen der nicht-parametrische Wilcoxon-Rangsummen Test (auch: Mann-Whitney-U-Test) zur Anwendung, beim Vergleich mehrerer Gruppen, die Erweiterung dieses Tests, der Kruskal–Wallis One-way Analysis of Variance Test (kurz: One Way ANOVA). Als Post-Hoc-Test wurde bei entsprechend signifikanten Unterschieden in der Gesamtvarianz der Bonferroni-Test verwendet.

Als Signifikanzniveau wurde ein p kleiner 5% festgelegt. Signifikante Unterschiede werden in den Abbildungen mit Sternchen gekennzeichnet.

Dargestellt sind die Versuchsergebnisse als Box-Whisker-Plots. Zur Verdeutlichung der einzeln erfassten Werte wurden Scatter-Plots (Streudiagramm) überlagert. Graphisch aufgetragen sind im Folgenden die relativen IL-6-Konzentrationen, errechnet in Abhängigkeit der jeweiligen Kontrollen pro unabhängigem Versuchsansatz. In Versuchen nach Behandlungsschema A entsprechen die Kontrollen den IL-6-Konzentrationen unbehandelter Fibroblasten in FCS-freiem Medium. In Versuchen nach Behandlungsschema B entsprechen die Kontrollen den IL-6-Konzentrationen in den Zellüberständen nach 24-stündiger Behandlung mit 10ng/ml APRIL. OA ist im Folgenden grün, RA rot dargestellt.



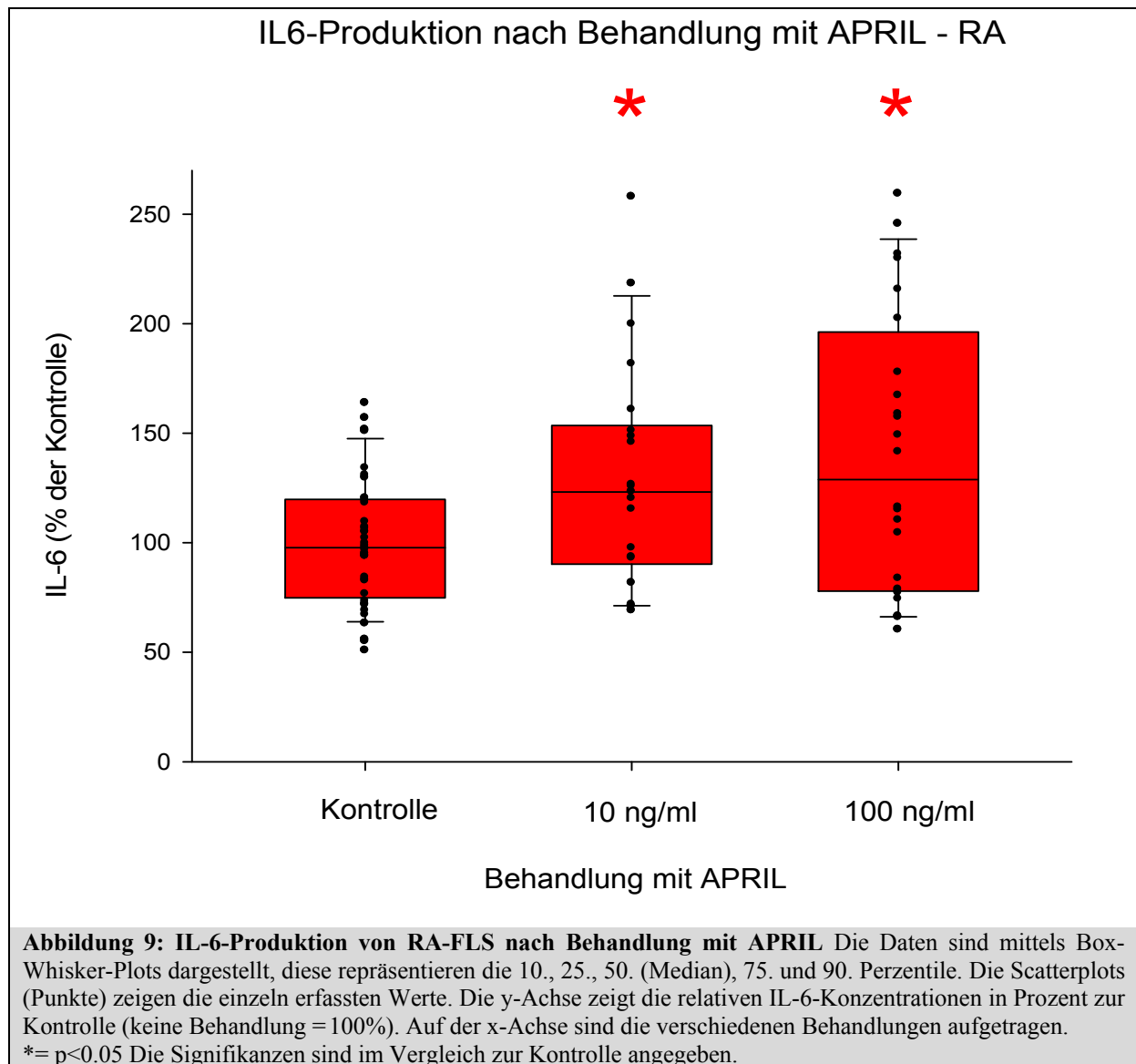
3 Ergebnisse

Die unter 3.1 und 3.2 folgenden Ergebnisse wurden aus Daten, gemessen an fünf verschiedenen OA- und sechs verschiedenen RA-Synovial-Fibroblasten, erhoben. Jede Behandlung wurde mindestens zweimal pro FLS-Zelllinie wiederholt, bei den reinen Stimulationen mit verschiedenen Konzentrationen an APRIL viermal und bei den Kontrollen bis zu achtmal. Die Kontrollen sind hierbei die Überstände mit FCS-freiem Medium behandelte Zelllinien. Der gleich 100% gesetzte Absolutwert (arithmetisches Mittel) der IL-6-Konzentration für die Kontrolle bei OA-Zelllinien entspricht 823,94pg/ml, die für RA-Zelllinien 591,45pg/ml.

3.1 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL

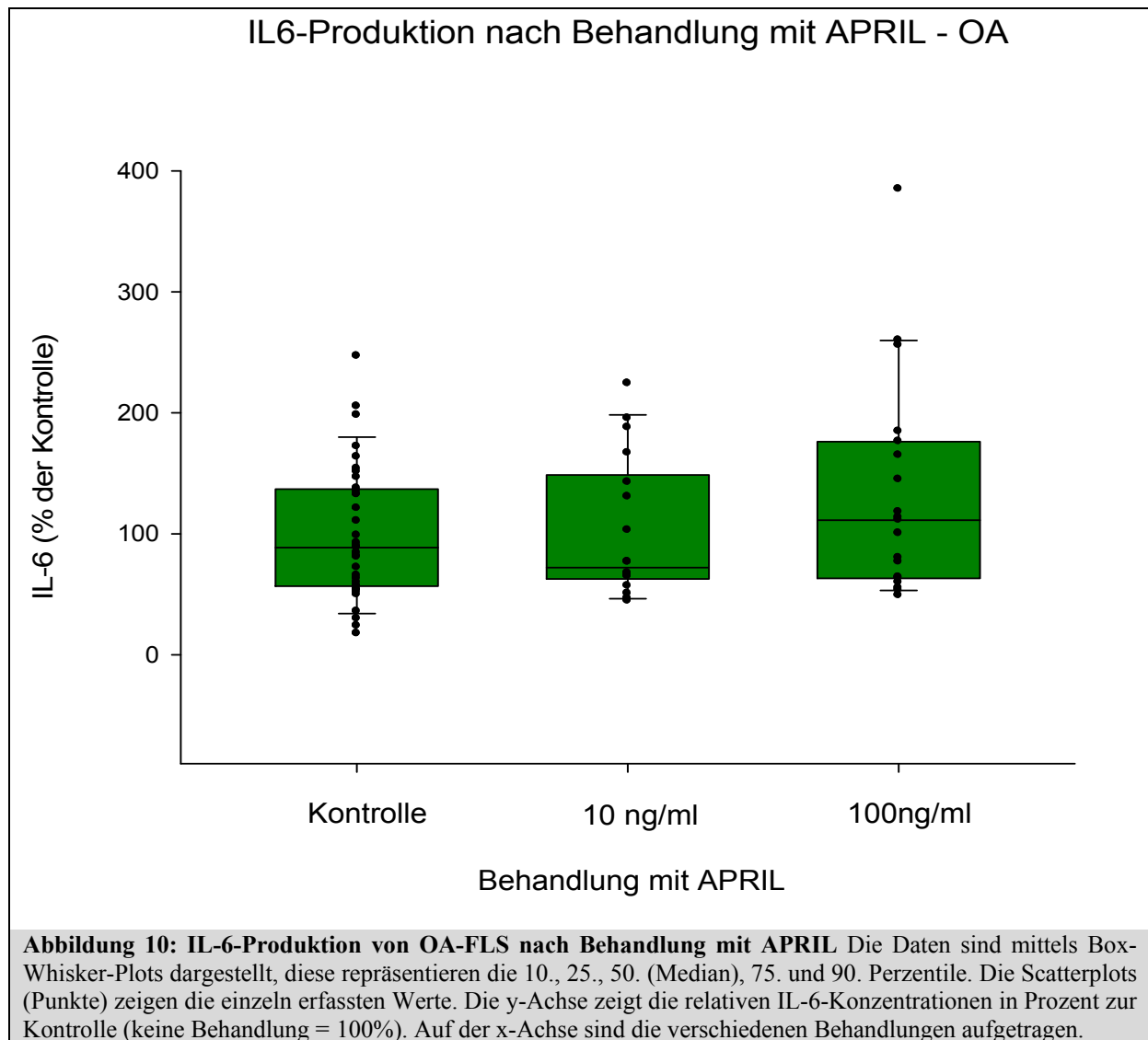
Da gezeigt wurde, dass RA-FLS BCMA exprimieren und die Signalweiterleitung dieses Rezeptors via NF-kB läuft, was wiederum IL-6 in Fibroblasten induziert (siehe auch Einleitung), sollte getestet werden, ob mit APRIL ebenfalls eine Induktion von IL-6 erreicht werden kann. In dieser ersten Versuchsanordnung wurden deshalb OA- und RA-Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an APRIL stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Konzentration an IL-6 in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.

3.1.1 Behandlung von RA-FLS mit APRIL



Bei den hier vorliegenden RA-Zelllinien sind signifikante Erhöhungen von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle ohne APRIL-Behandlung bei Behandlung der FLS mit 10ng/ml ($p_{\text{Bonferroni}} = 0,043$) bzw. 100ng/ml ($p_{\text{Bonferroni}} = 0,002$) APRIL festzustellen.

3.1.2 Behandlung von OA-FLS mit APRIL



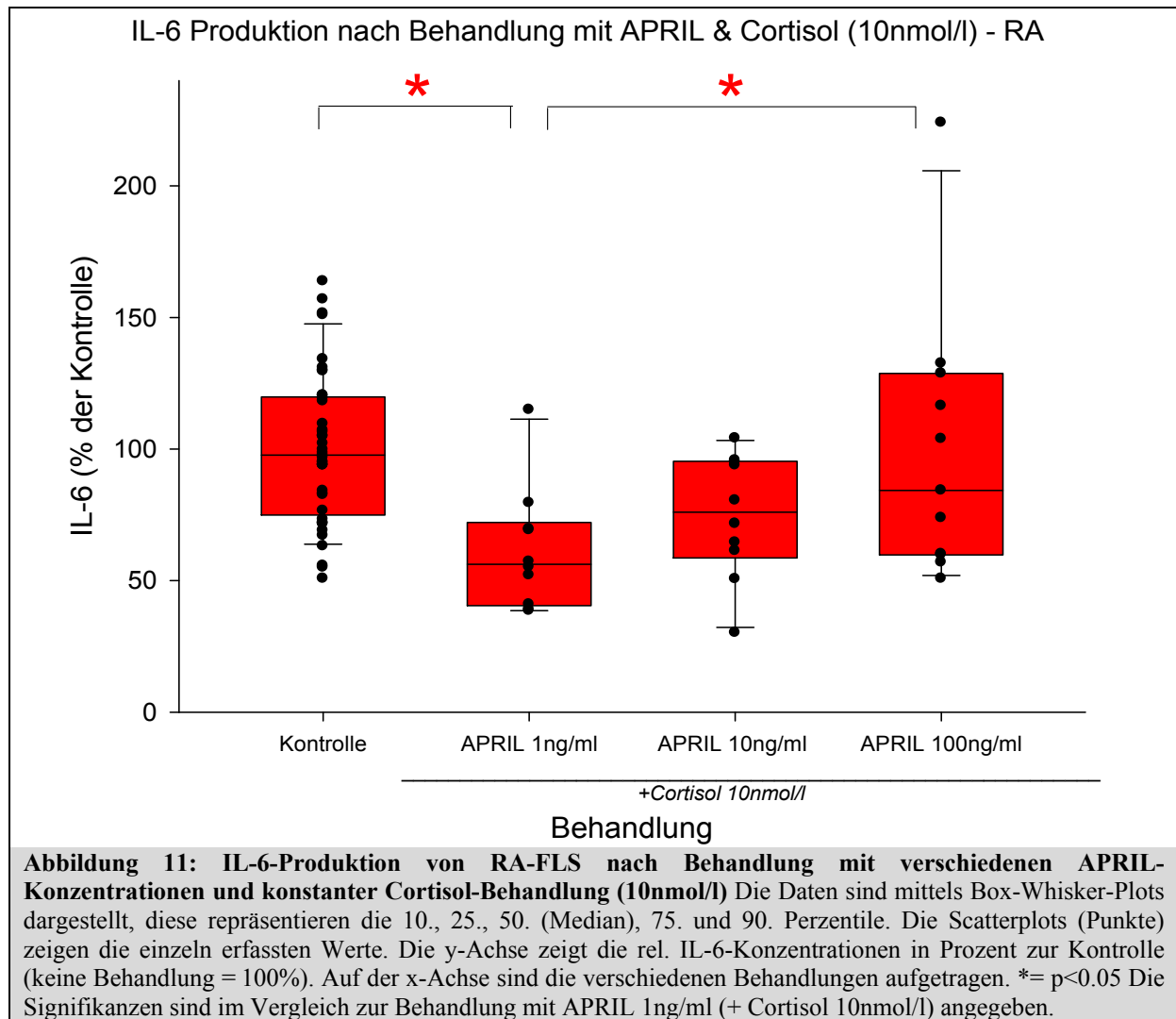
Bei OA-Zelllinien ist keine signifikante Erhöhung von IL-6 in Abhängigkeit zur Kontrolle durch Stimulation mit APRIL erreichbar, weder mit 10ng/ml APRIL noch mit 100ng/ml APRIL ($p_{\text{Kruskal-Wallis}} = 0,813$).

3.2 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit Cortisol und APRIL

3.2.1 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit konstanter Cortisol- und variabler APRIL-Konzentration

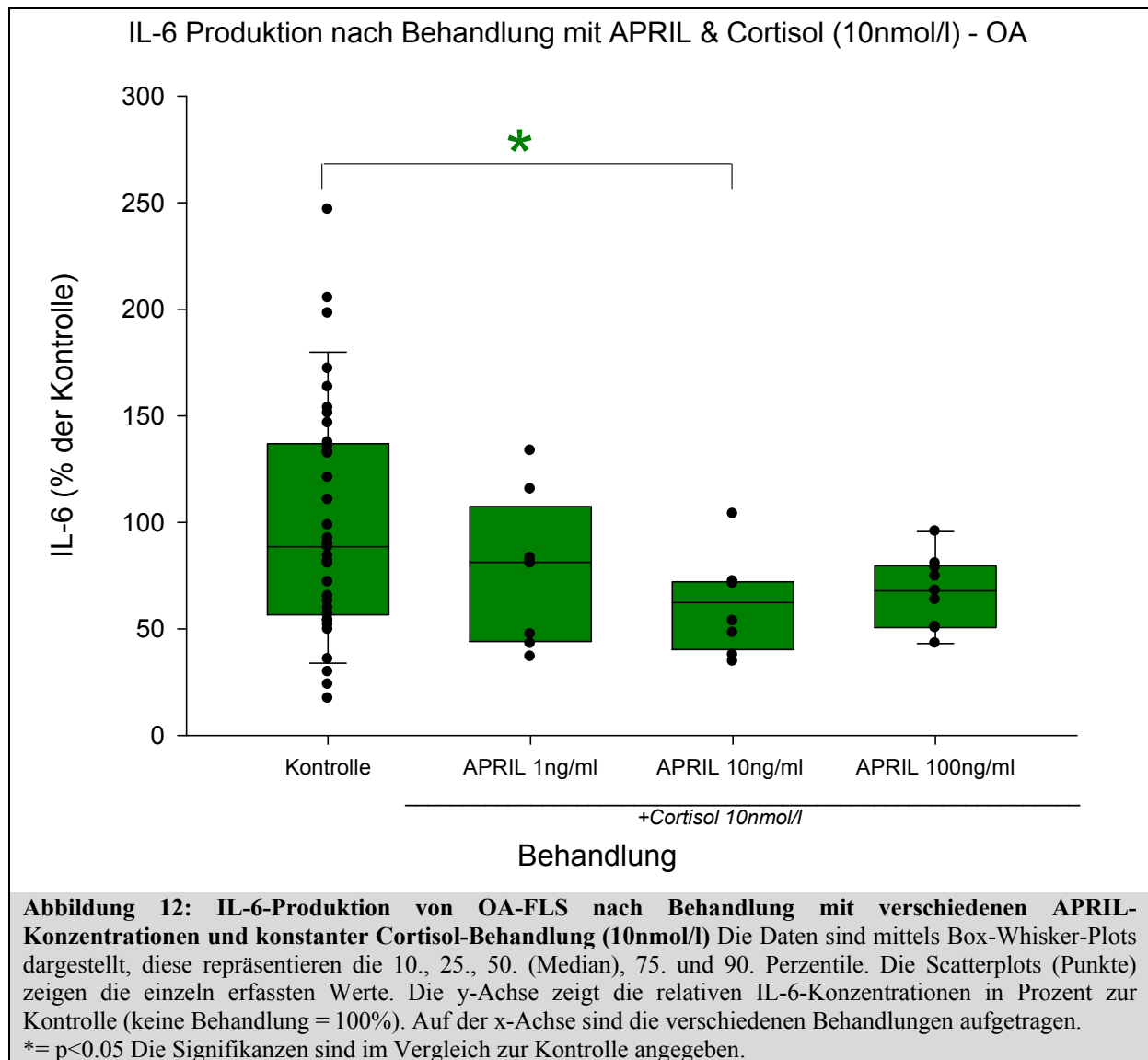
Durch Behandlungen mit Cortisol, einem bekannten Inhibitor der (beispielsweise IL-1-induzierten-) IL-6-Bildung, sollte untersucht werden ob sich auch eine APRIL-induzierte IL-6-Bildung hemmen lässt. In dieser Versuchsanordnung wurden verschiedene OA- und RA-FLS-Zelllinien mit einer konstanten Menge an Cortisol (10nmol/l) behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen wiederum mit diversen Konzentrationen an APRIL stimuliert und nach 24 Stunden die IL-6-Konzentration gemessen.

3.2.1.1 Behandlung von RA-FLS mit APRIL (variabel) und Cortisol (10nmol/l)



Die Signifikanzen im Diagramm sind in Abhängigkeit zum IL-6-Ergebnis für die Behandlung mit APRIL 1ng/ml (+ Cortisol 10nmol/l) angegeben und berechnet. Bei niedriger APRIL-Konzentration (1ng/ml) scheint die hemmende Wirkung von Cortisol (10nmol/l) zu überwiegen, da das IL-6-Ergebnis für APRIL 1ng/ml signifikant niedriger ist, als das der Kontrolle (ohne Behandlung) ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} < 0,001$). Höhere APRIL-Konzentrationen steigern wiederum die IL-6-Bildung. Die IL-6-Konzentration bei 100ng/ml APRIL + Cortisol ist signifikant höher, als die für die Behandlung mit APRIL 1ng/ml + Cortisol ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} = 0,032$).

3.2.1.2 Behandlung von OA-FLS mit APRIL (variabel) und Cortisol (10nmol/l)

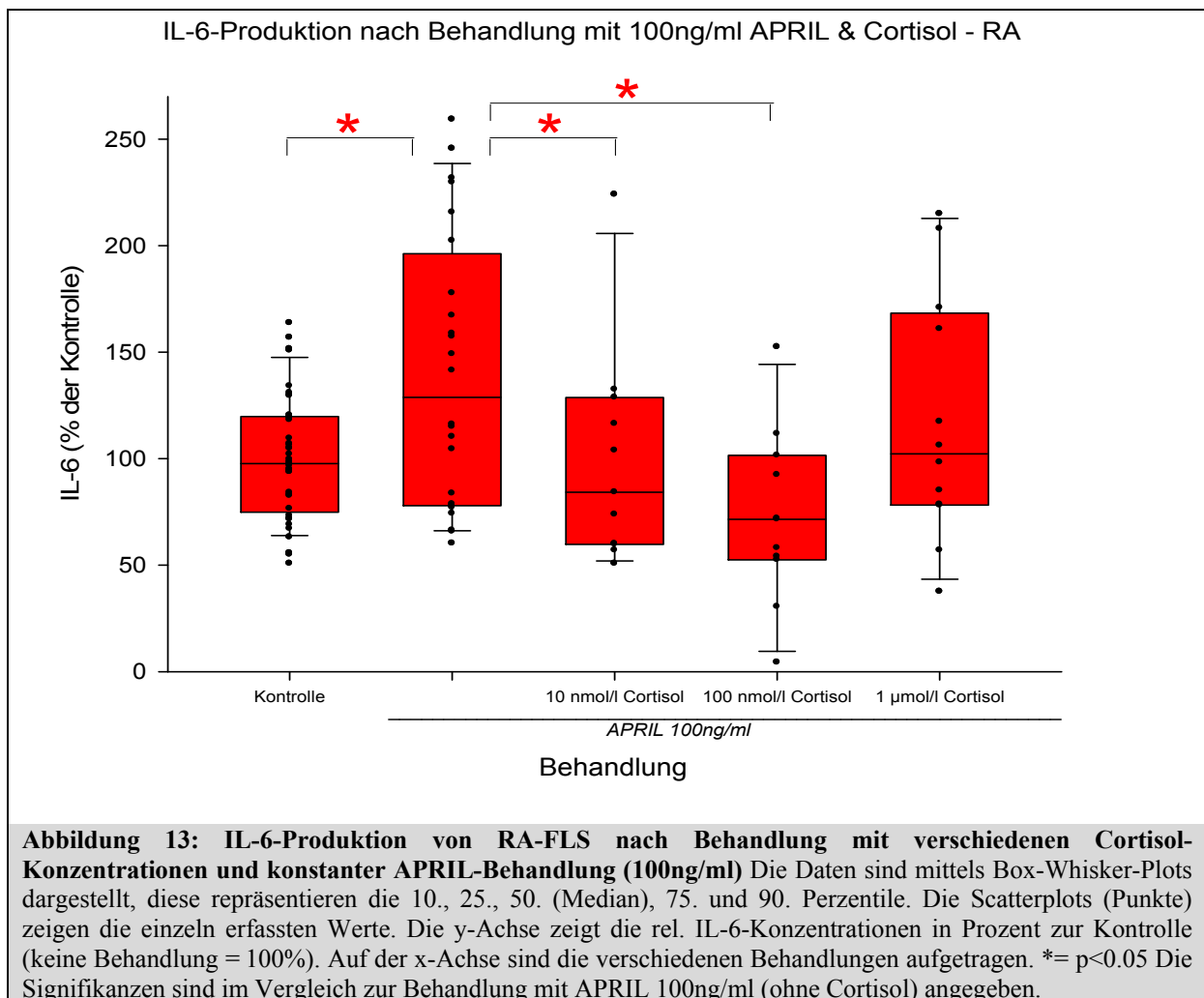


Auch hier kommt es zur Hemmung der IL-6-Bildung im Vergleich zur Kontrolle. Signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle (ohne Behandlung) ist das IL-6-Ergebnis bei APRIL 10ng/ml + Cortisol ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,050$). Im Vergleich zu APRIL 1ng/ml + Cortisol gibt es keine signifikanten Unterschiede (vgl. Ergebnis bei RA).

3.2.2 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit variabler Cortisol- und konstanter APRIL-Konzentration

Hierbei handelt es sich um eine ähnliche Versuchsanordnung, wie unter 3.2.1, mit dem Unterschied, dass die Cortisolkonzentration variiert wurde und die APRIL-Konzentration konstant blieb.

3.2.2.1 Behandlung von RA-FLS mit APRIL (100ng/ml) und Cortisol (variabel)



Im Vergleich zur Kontrolle führt die Stimulation mit APRIL 100ng/ml zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Konzentration (siehe 3.1.1).

Die Stimulationen mit Cortisol (10nmol/l und 100nmol/l) plus jeweils 100ng/ml APRIL führen (im Vergleich zu der Behandlung nur mit APRIL 100ng/ml, ohne Cortisol) zu einer signifikanten Erniedrigung der IL-6-Konzentration ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,045$ für 10nmol/l Cortisol und $p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,002$ für 100nmol/l Cortisol). Somit hemmt Cortisol konzentrationsabhängig die APRIL-induzierte IL-6 Produktion in RA-FLS.

3.2.2.2 Behandlung von OA-FLS mit APRIL (100ng/ml) und Cortisol (variabel)

Im Vergleich zur Kontrolle führt die Stimulation mit APRIL 100ng/ml, wie die bisherigen Ergebnisse bereits zeigten, zu keiner signifikanten Steigerung der IL-6 Konzentration (siehe: 3.1.2). Die IL-6-Produktion lässt sich aber auch in OA-FLS durch Cortisol hemmen. Bei der Behandlung mit Cortisol von 10 nmol/l plus 100ng/ml APRIL wird diese Hemmung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 100ng/ml APRIL signifikant ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,039$).

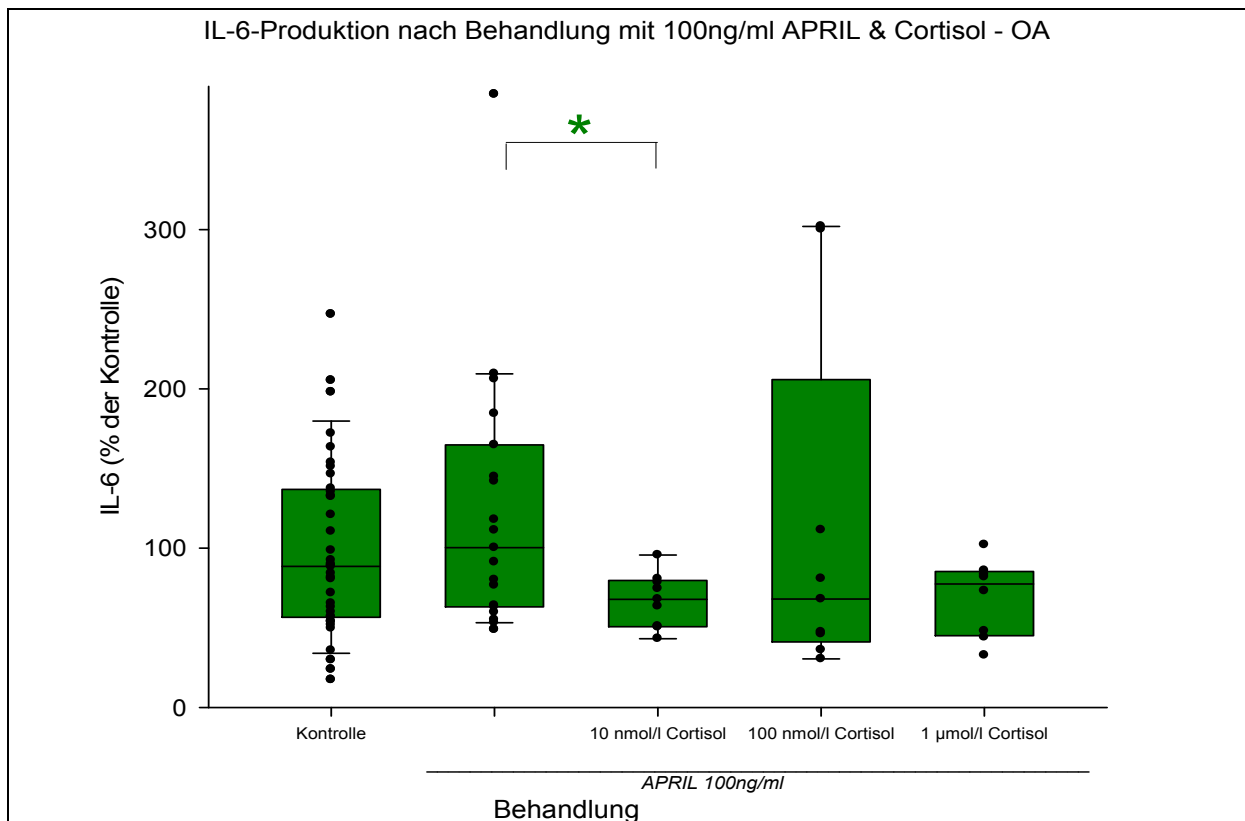


Abbildung 13: IL-6-Produktion von OA-FLS nach Behandlung mit verschiedenen Cortisol-Konzentrationen und konstanter APRIL-Behandlung (100ng/ml) Die Daten sind mittels Box-Whisker-Plots dargestellt, diese repräsentieren die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Scatterplots (Punkte) zeigen die einzeln erfassten Werte. Die y-Achse zeigt die relativen IL-6-Konzentrationen in Prozent zur Kontrolle (keine Behandlung = 100%). Auf der x-Achse sind die verschiedenen Behandlungen aufgetragen. *= $p<0.05$ Die Signifikanz ist im Vergleich zur Behandlung mit APRIL 100ng/ml (ohne Cortisol) angegeben.

Für alle folgenden Versuchsanordnungen wird, als Vergleichsgruppe, die Behandlung der Zelllinien mit 10ng/ml APRIL herangezogen. Diese hat zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Konzentration bei RA-FLS, nicht aber bei OA-FLS geführt (siehe: 3.1). Der gleich 100% gesetzte Absolutwert (arithmetisches Mittel) für die Vergleichsgruppe bei OA-FLS entspricht 1758,29pg/ml IL-6, die für RA-FLS entspricht 1084,10pg/ml IL-6.

Alle nun folgenden Versuche wurden an je zehn OA- und zehn RA-FLS-Zelllinien durchgeführt und jede Behandlung pro Zelllinie mindestens einmal wiederholt.

3.3 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL, TNF und IL-1 β

Initial wurden die Zelllinien auf die Induzierbarkeit der IL-6-Bildung hin getestet. Zum einen sollte hierbei ein besonderes Augenmerk auf grundsätzlichen Unterschieden zwischen OA- und RA-FLS liegen, zum anderen eine Relation für die APRIL-induzierte IL-6-Bildung hergestellt werden. Hierfür wurden die Zellen mit APRIL und verschiedenen Konzentrationen TNF und IL-1 β stimuliert und nach 24 Stunden die IL-6-Konzentrationen gemessen und ins Verhältnis zur IL-6-Konzentration nach Behandlung mit 10ng/ml APRIL gesetzt.

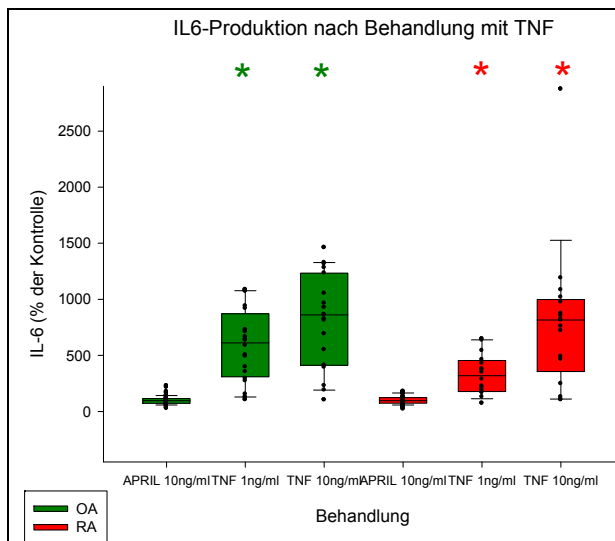


Abbildung 15: IL-6-Produktion von OA-FLS (grün) und RA-FLS (rot) nach Behandlung mit TNF Die Daten sind mittels Box-Whisker-Plots dargestellt, diese repräsentieren die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Scatterplots (Punkte) zeigen die einzeln erfassten Werte. Die y-Achse zeigt die relativen IL-6-Konzentrationen in Prozent zur Kontrolle (Behandlung mit 10ng/ml APRIL = 100%). Auf der x-Achse sind die verschiedenen Behandlungen aufgetragen. *= p<0.05

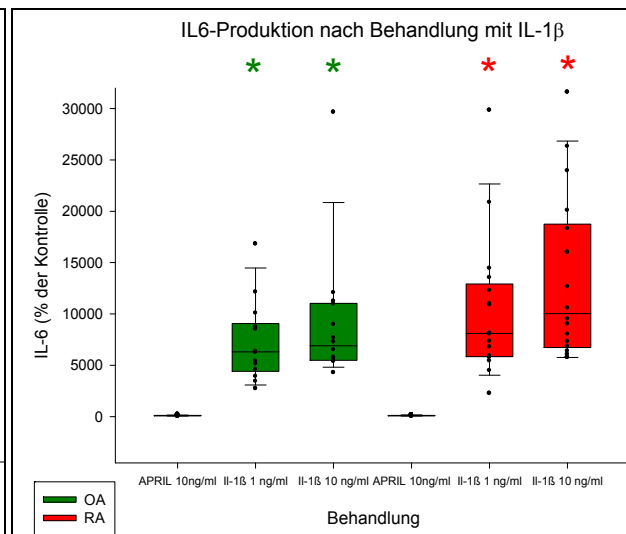


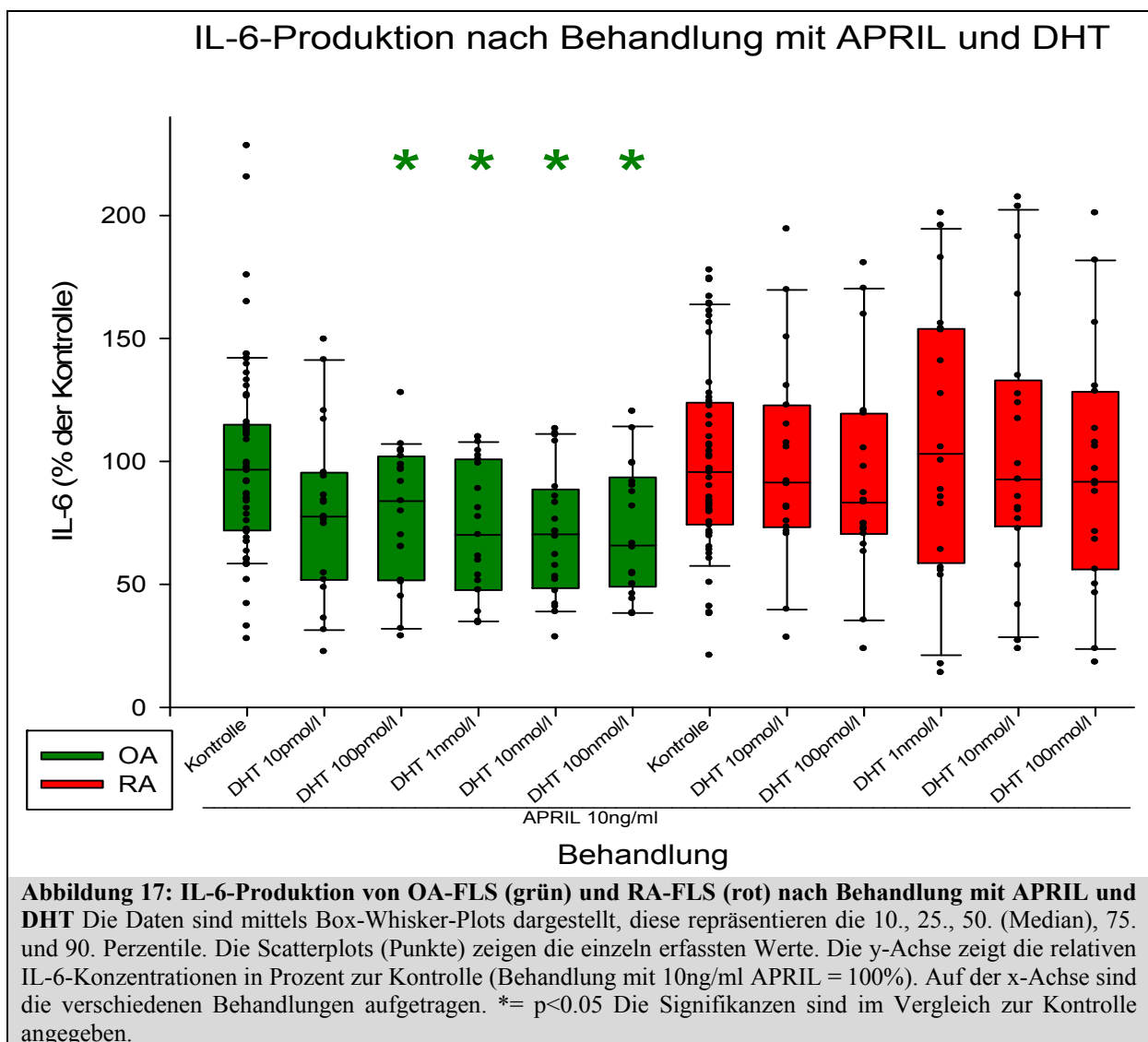
Abbildung 16: IL-6-Produktion von OA-FLS (grün) und RA-FLS (rot) nach Behandlung mit IL-1 β Die Daten sind mittels Box-Whisker-Plots dargestellt, diese repräsentieren die 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Scatterplots (Punkte) zeigen die einzeln erfassten Werte. Die y-Achse zeigt die relativen IL-6-Konzentrationen in Prozent zur Kontrolle (Behandlung mit 10ng/ml APRIL = 100%). Auf der x-Achse sind die verschiedenen Behandlungen aufgetragen. *= p<0.05

Sowohl bei OA-, als auch bei den RA-FLS steigert 1ng/ml und 10ng/ml TNF, sowie die entsprechenden Konzentrationen an IL-1 β , verglichen mit den jeweiligen Vergleichsgruppen (APRIL 10ng/ml), die IL-6-Menge im Zellkulturüberstand signifikant ($p_{\text{Bonferroni}} < 0,001$). Dies zeigt, dass sowohl RA- als auch OA-FLS prinzipiell in der Lage sind auf einen entsprechenden Stimulus die produzierte IL-6-Menge zu erhöhen. Das Fehlen der Induzierbarkeit von IL-6 durch APRIL in OA-FLS scheint somit APRIL-spezifisch.

3.4 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL in Kombination mit hormoneller Stimulation

3.4.1 Behandlung mit APRIL, verschiedenen Konzentrationen an DHT und Nilutamide

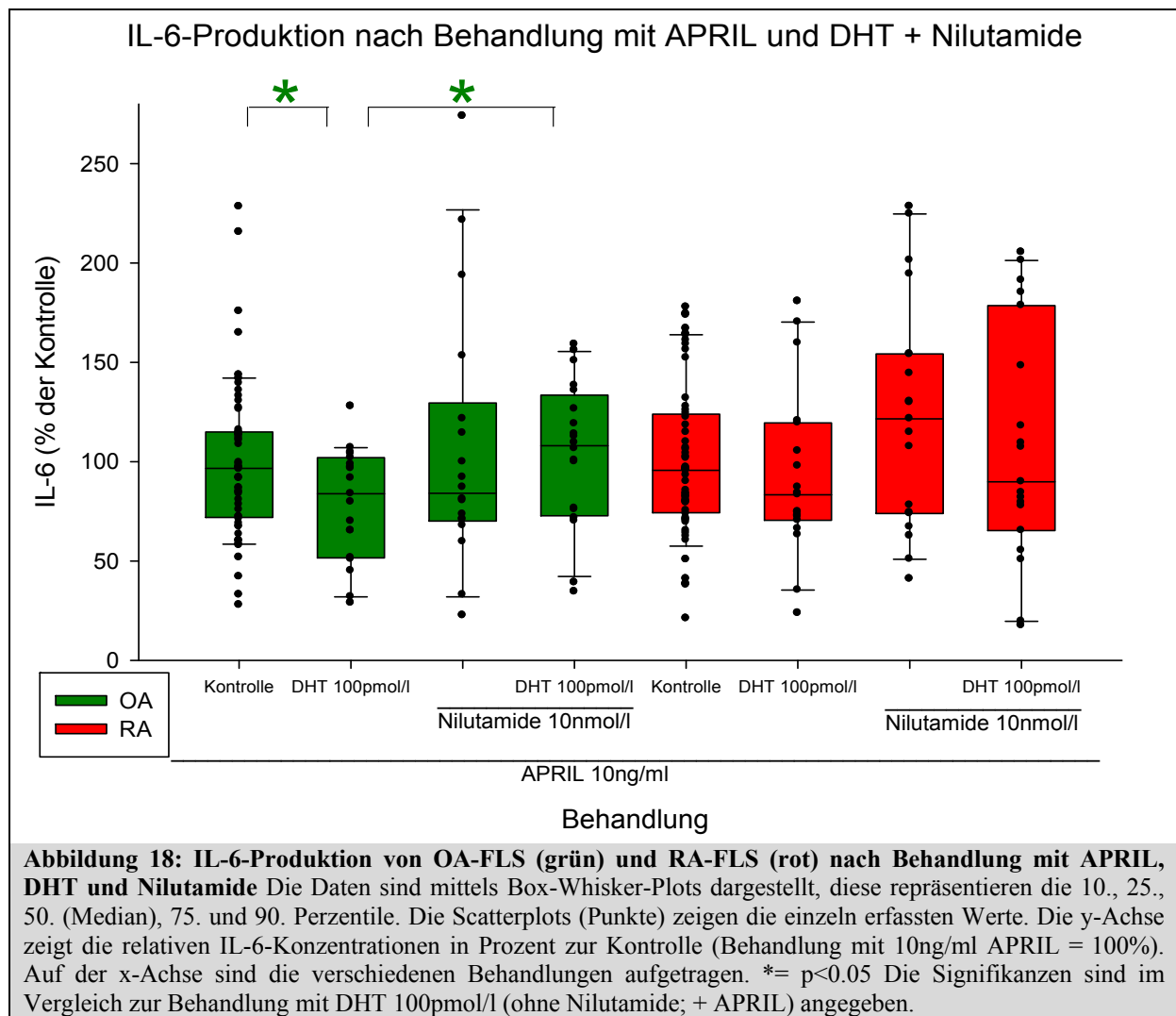
Bekannt ist, dass der Androgenrezeptoragonist DHT die IL-1 α - oder TNF-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 hemmt. In diesem Versuchsansatz sollte nun untersucht werden, ob die bekannte immunsuppressive Wirkung von DHT auch durch APRIL aufgehoben werden kann. Es wurden OA- und RA-FLS mit steigenden Konzentrationen an DHT behandelt.



Wie die vorangehende Grafik verdeutlicht, ist bei den OA-Zelllinien, ab einer DHT-Konzentration von 100pmol/l (+10ng/ml APRIL) eine Erniedrigung des IL-6-Spiegels im Vergleich zur Vergleichsgruppe zu vermerken (DHT 100 pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,046$),

DHT 1nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,005$), 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,001$), 100nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,004$)), während es bei den RA-Zelllinien, unabhängig von Höhe der DHT-Konzentrationen, zu keinen signifikanten Unterschieden zur Vergleichsgruppe kommt.

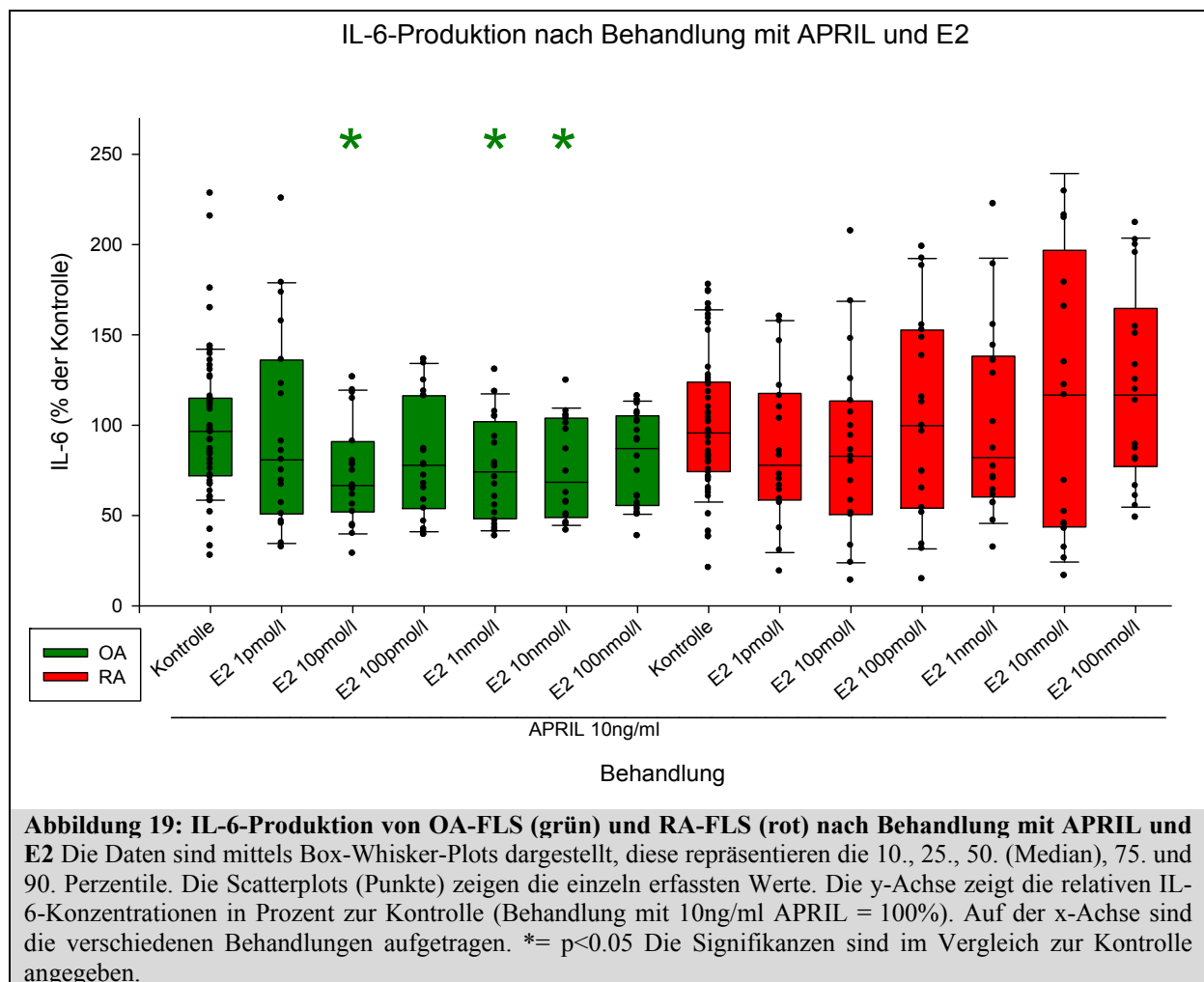
Um die erhaltenen Ergebnisse zu evaluieren und zu bestätigen wurden – kombiniert mit DHT (und APRIL) – die Zellen mit einem Androgenrezeptorantagonisten (Nilutamide) behandelt.



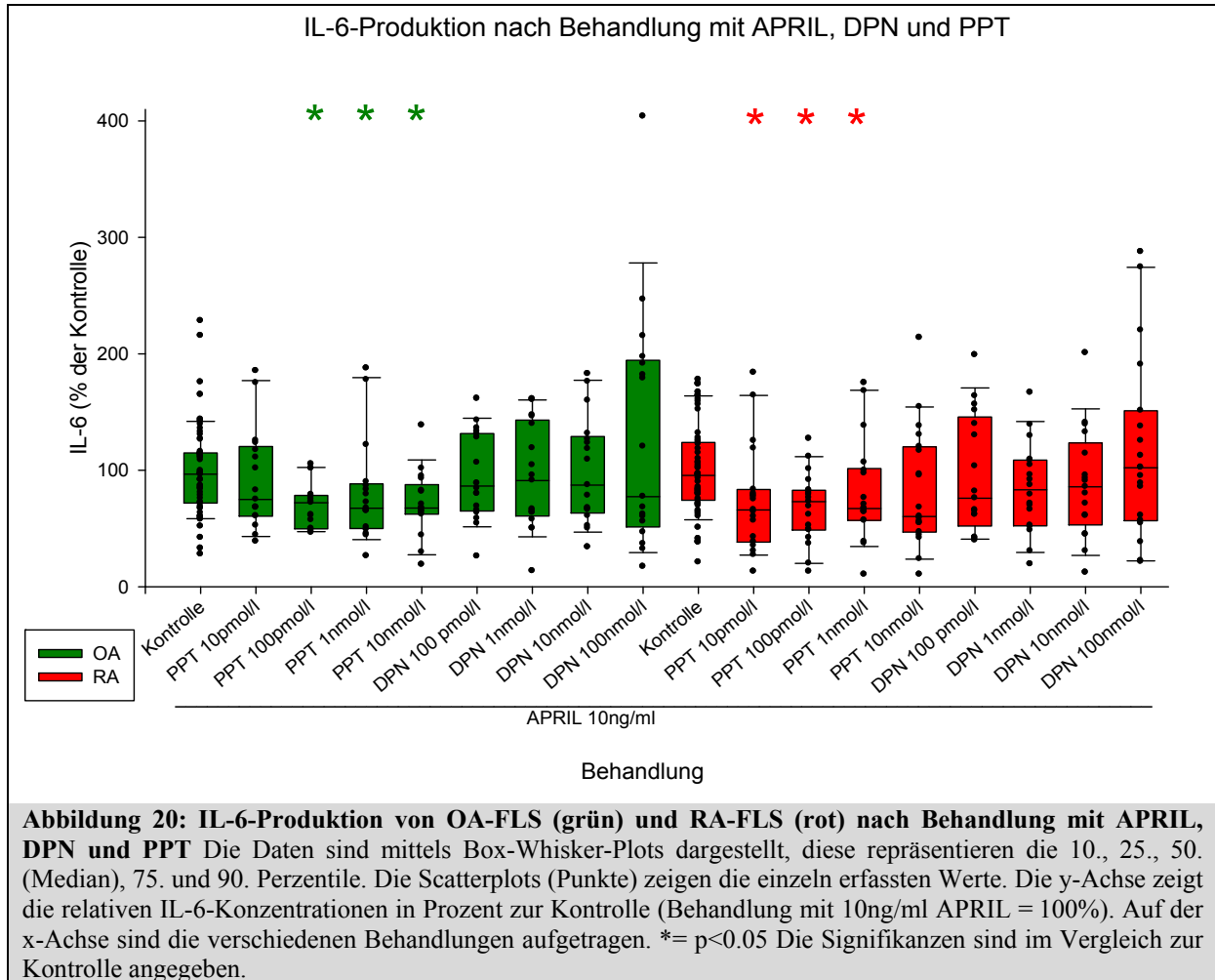
Der signifikante Unterschied zwischen Vergleichsgruppe und der Behandlung mit 100pmol/l DHT bei OA-FLS wurde vorangehend bereits beschrieben. Die Behandlung nur mit Nilutamide zeigt keinen eigenen Effekt auf die IL-6 Spiegel im FLS-Überstand. Nilutamide hebt aber die DHT induzierte Hemmung der IL-6-Produktion in OA-FLS auf ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,019$) (siehe Abb.18). Im Gegensatz dazu lässt sich die IL-6-Konzentration in Überständen von RA-FLS unter denselben Bedingungen nicht beeinflussen, was wiederum die Ergebnisse aus den Vorversuchen mit DHT bestätigt (siehe Abb. 17).

3.4.2 Behandlung mit APRIL, verschiedenen Konzentrationen an E2 und speziellen Estrogenrezeptoragonisten

Neben den bekannten Estradiol (E2) vermittelten proinflammatorischen Effekten wurde auch immer wieder beschrieben, dass E2 eine IL-6-Produktion via NF- κ B hemmen kann. Ob durch diesen erwarteten Effekt die APRIL-Wirkung an RA-FLS antagonisierbar ist, sollte sich durch folgenden Ansatz zeigen. Betrachtet wurde die IL-6-Produktion nach Behandlung mit Estradiol (E2), wiederum in Kombination mit einer APRIL-Behandlung von 10ng/ml. In Bezug auf OA-FLS zeigt sich eine Erniedrigung der IL-6-Reaktion verglichen mit der Kontrolle. Signifikant wird diese bei E2-Konzentrationen von 10pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,009$), 1nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,009$) und 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,014$). Für RA-FLS ist dieser Effekt nicht zu beobachten.



Um die beobachteten Effekte weiter zu differenzieren und die vermittelte Wirkung spezifischen Rezeptoren zuzuordnen wurden zusätzlich spezielle Estrogenrezeptor α - (PPT) und β - (DPN) Agonisten in verschiedenen Konzentrationen – kombiniert mit 10ng/ml APRIL – eingesetzt.

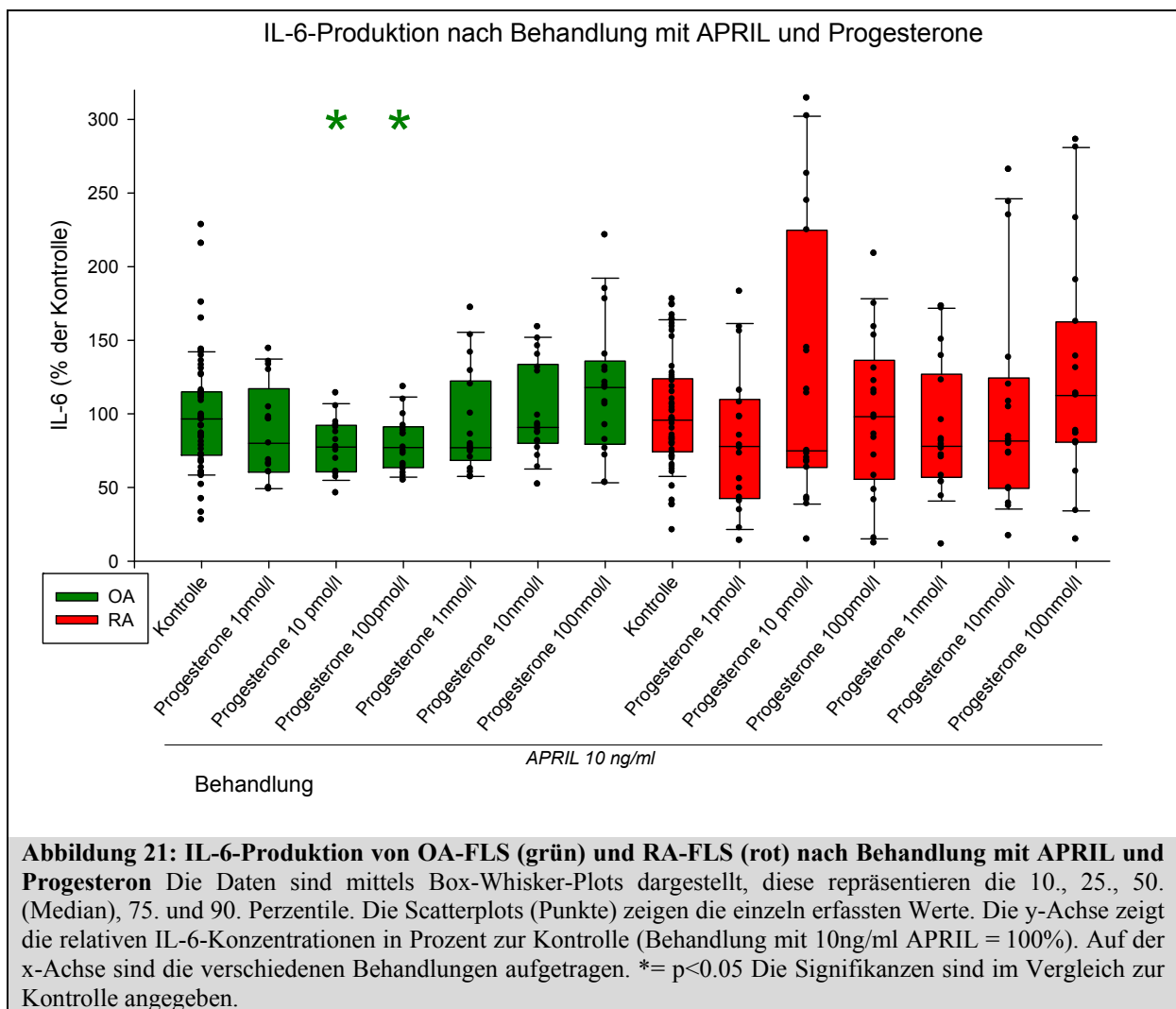


Behandlungen mit PPT führen sowohl bei OA- als auch bei RA-Zelllinien zu einer Erniedrigung der IL-6-Spiegel. Signifikanzen im Vergleich zur alleinigen APRIL-Behandlung ergeben sich bei OA-für PPT-Konzentrationen von 100pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,001$) sowie 1nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,022$) und 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,004$) und bei RA für Konzentrationen von 10pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,007$), 100pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,002$) und 1nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,037$).

Im Vergleich dazu rufen Behandlungen mit dem ER- β -Agonisten DPN weder bei OA- noch bei RA-Zelllinien signifikanten Änderungen der IL-6-Bildung hervor. Somit lässt sich eine Hemmung der IL-6-Konzentration auf OA- und RA-FLS nur durch PPT – einem ER- α -Agonisten – induzieren.

3.4.3 Behandlung mit APRIL in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an Progesteron

Um eventuelle weitere antagonistische Wirkungen zur APRIL-induzierten IL-6-Bildung durch RA-FLS zu analysieren, wurden Behandlungen mit noch einem zusätzlichen Steroidhormon – Progesteron – durchgeführt. Progesteron-Behandlungen niedriger Konzentration in Kombination mit APRIL-Stimulation führen zu einer signifikanten Erniedrigung der IL-6-Konzentration bei den OA-Zelllinien, nicht jedoch bei den RA-Zelllinien. Für eine Progesteronkonzentration von 10pmol/l entspricht $p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,026$, für eine Konzentration von 100pmol/l entspricht $p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,034$.



Insgesamt lassen sich die für DHT, E2 und Progesteron sowie APRIL aufgestellten Thesen jeweils bestätigen. Die hormonell getriggerte Hemmung der IL-6 Produktion lässt sich durch eine APRIL induzierte IL-6 Produktion kompensieren.

3.5 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL in Kombination mit Sympathomimetika

Bekannt ist eine sympathomimetisch vermittelte Modulation der IL-6-Produktion durch RA- und OA-FLS. Aus diesem Grund wurden für diese Versuchsanordnung RA- und OA-FLS zusätzlich zu APRIL mit selektiven Agonisten adrenerger Rezeptoren in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Zum Einsatz kamen hierbei, als α_1 -Agonist Phenylephrin, als α_2 -Agonist Clonidin und als β -selektiver Agonist Isoproterenol. In Bezug auf die IL-6-Konzentration konnten mit diesen Behandlungen für RA-FLS in Abhängigkeit zur Vergleichsgruppe (10ng/ml APRIL) keine signifikanten Änderungen erreicht werden. Bei einer Behandlung mit 10nmol/l Phenylephrin ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,049$) sowie mit 1nmol/l Isoproterenol ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,037$) gelang jedoch eine signifikante Hemmung der IL-6-Bildung durch OA-FLS.

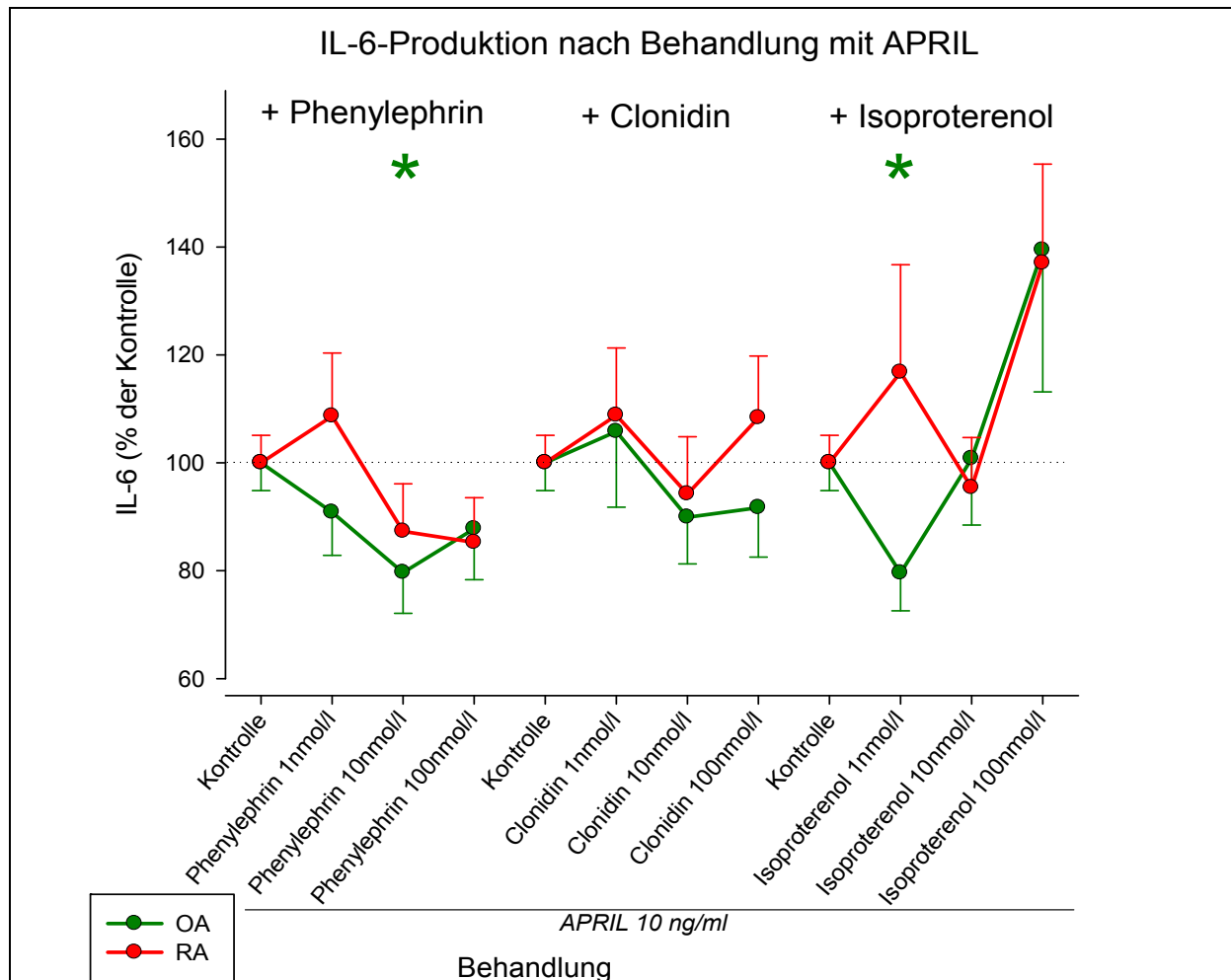


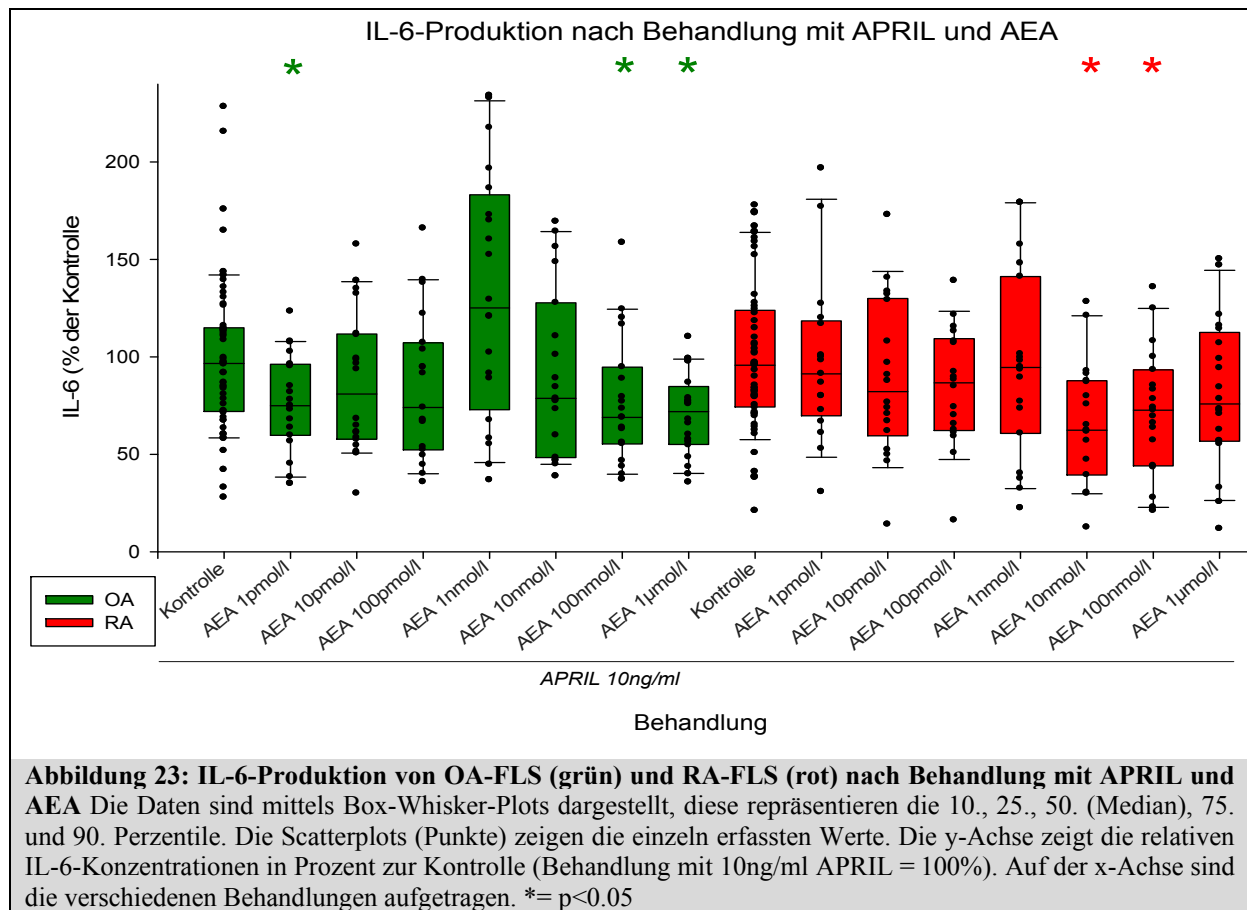
Abbildung 22: IL-6-Produktion von OA-FLS (grün) und RA-FLS (rot) nach Behandlung mit APRIL, Phenylephrin, Clonidin und Isoproterenol Die Daten sind als Line and Scatter Plots dargestellt, der Punkt repräsentiert das arithmetische Mittel. Die Balken zeigen den Standardfehler. Die y-Achse zeigt die relativen IL-6-Konzentrationen in Prozent zur Kontrolle (Behandlung mit 10ng/ml APRIL = 100%). Auf der x-Achse sind die verschiedenen Behandlungen aufgetragen. *= $p < 0.05$

3.6 IL-6-Produktion von OA- und RA-FLS nach Behandlung mit APRIL in Kombination mit Liganden des Endocannabinoidsystems

Eine Reduktion der IL-1 induzierten IL-6-Produktion durch FLS nach Behandlung mit AEA wird beschrieben. Inwieweit sich diese Beobachtungen reproduzieren lassen und inwieweit sich die APRIL-induzierte IL-6-Produktion dadurch modifizieren lässt, soll folgender Ansatz klären. Bei diesem Versuchsteil wurden die OA- und RA-FLS mit verschiedenen Liganden, die an endogenen Cannabinoidrezeptoren agonistische bzw. antagonistische Wirkung haben, behandelt. Zusätzlich erfuhren die Zelllinien, wie auch in den vorangehenden Versuchsaufbauten eine APRIL-Behandlung in einer Konzentration von 10ng/ml.

3.6.1 Behandlung mit APRIL, AEA (Anandamide) und JNJ 1661010

Zunächst wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Anandamide (AEA), dem Ethanolaminderivat der Arachidonsäure, behandelt. Dabei handelt es sich um einen endogenen Cannabinoid- und Vanilloid- Rezeptor Agonisten, der sowohl Wirkung am CB₁-, als auch am CB₂-Rezeptor hat. Bei höheren Konzentrationen ist die APRIL-induzierte-IL-6-Bildung gehemmt (siehe Abb.23). Für RA-FLS gilt dies bei einer Behandlung mit AEA-Konzentrationen von 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} < 0,001$) und 100nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} = 0,009$). Auch für OA-FLS zeigt sich bei Behandlungen mit hohen AEA-Konzentrationen (100nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} = 0,020$) und 1µmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} = 0,001$)) eine Reduktionen der IL-6-Spiegel. Allerdings kommt es auch zu einer Erniedrigung bei einer AEA-Konzentration von 1pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}} = 0,016$).

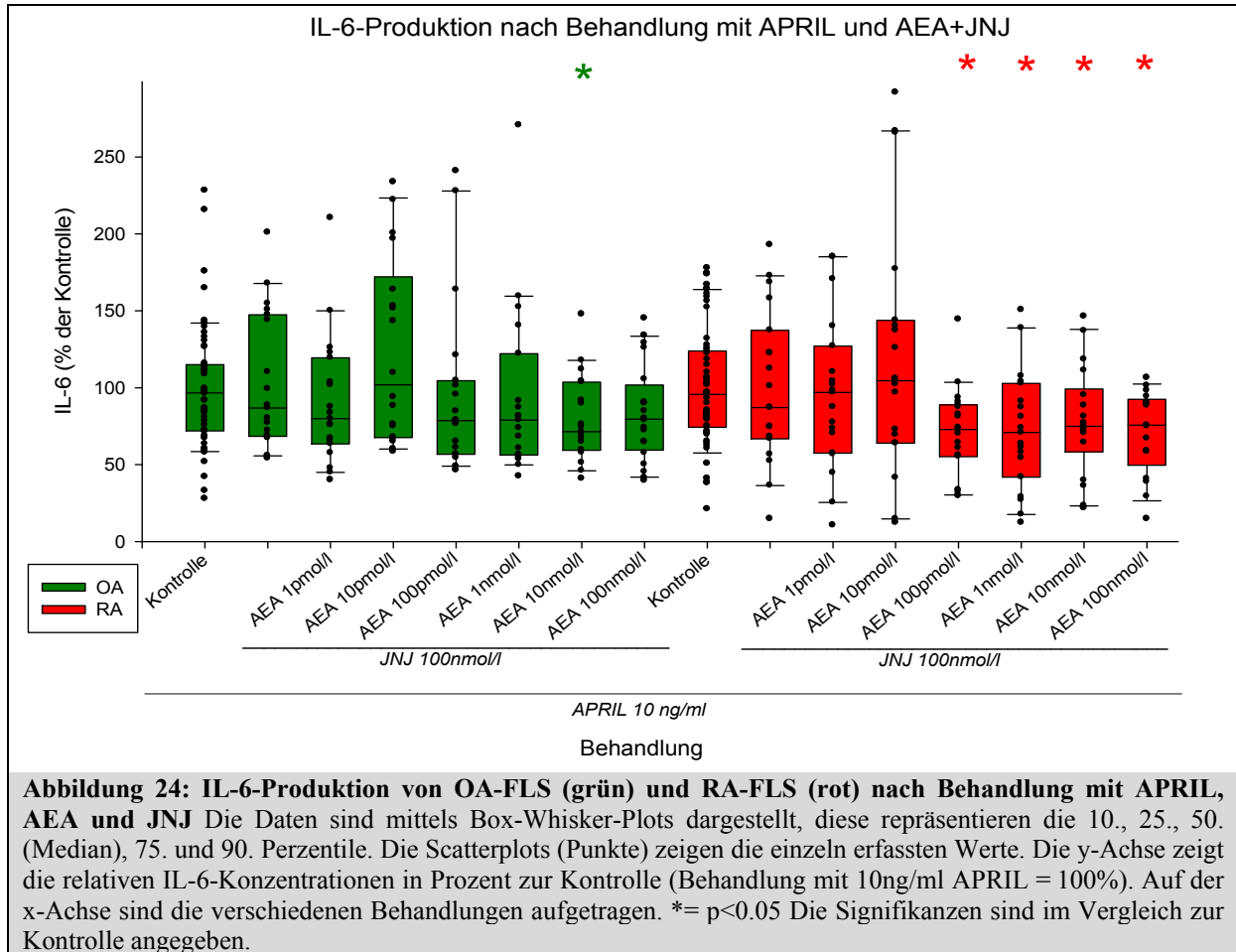


Um die beobachteten Effekte tatsächlich auf AEA zurückführen zu können wurden in einem weiteren Schritt die FLS nun zusätzlich zu APRIL und AEA in den verschiedenen Konzentrationen noch mit JNJ 1661010 (100nmol/l) versetzt. Dabei handelt es sich um einen selektiven reversiblen Inhibitor der Fettsäuren-Amidohydrolase (FAAH), dem Abbauenzym von AEA. Dadurch sollte der Abbau von AEA vermieden werden und damit die AEA-vermittelten Effekte stärker zum Tragen kommen.

Wie erwartet wurde die zuvor beschriebene – durch AEA induzierte – inhibitorische Wirkung auf die APRIL-induzierte IL-6-Bildung vor allem in Bezug auf RA-FLS nun verstärkt (siehe Abb. 24).

Für OA ist diese Hemmung bei einer AEA-Konzentration von 10nmol/l kombiniert mit einer JNJ-Konzentration von 100nmol/l signifikant ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,024$), für die Kombination mit 100nmol/l AEA zeigt sich ebenfalls der Trend ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,073$). Für RA zeigt sich eine Hemmung der APRIL-induzierten IL-6-Produktion ab einer AEA-Konzentration von 100pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,003$), sowie auch für 1nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,011$), 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,036$) und 100nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,014$) – kombiniert wiederum mit der Behandlung von 100nmol/l JNJ.

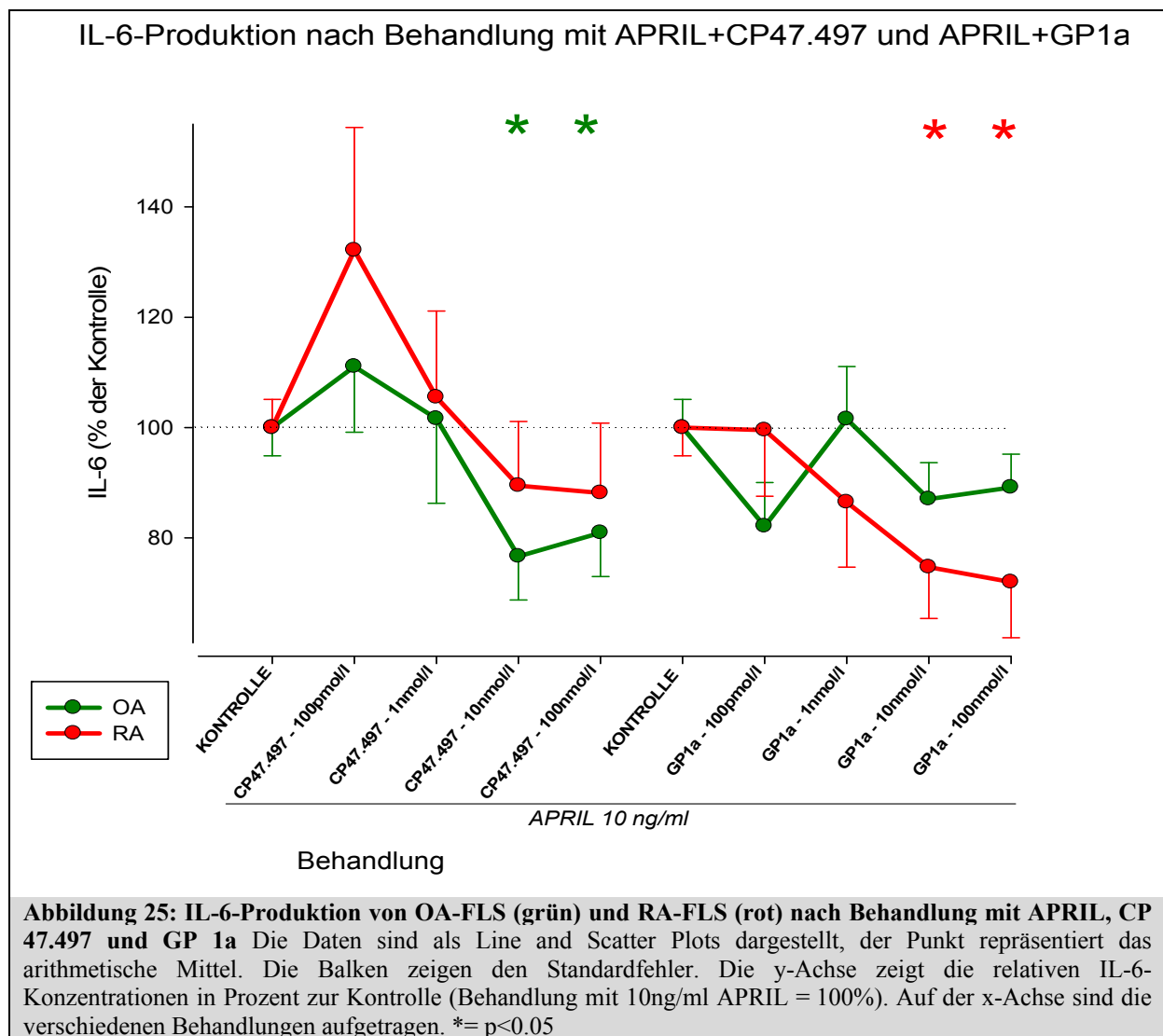
Die alleinige Zugabe von JNJ 1661010 (ohne AEA) zur Kontrolle führt weder bei RA noch bei OA zu Änderungen der IL-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (nur APRIL), so dass ein alleiniger Effekt durch JNJ 1661010 ausgeschlossen werden kann.



3.6.2 Behandlung mit APRIL, CP 47.497 und GP 1a

Zur weiteren Differenzierung der Signalvermittlung wurde im Folgenden das Verhalten der APRIL-induzierten-IL-6-Produktion in den Überständen der OA- und RA-FLS, in Abhängigkeit von der Behandlung mit hochselektiven CB₁- (CP 47.497) bzw. CB₂- (GP 1a) Rezeptoragonisten betrachtet.

Bei steigenden Konzentrationen der CB₁- und CB₂-selektiven Agonisten (10nmol/l und 100nmol/l) ist die APRIL-induzierte-IL-6-Bildung erniedrigt. Auffällig dabei ist, dass der selektive CB₁-Agonist CP 47.497 zu einer Erniedrigung der IL-6-Konzentration bei OA-FLS führt ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,013$ für CP 47.497=10nmol/l und $p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,027$ für CP 47.497=100nmol/l) wohingegen die Behandlung mit dem selektiven CB₂-Agonisten GP 1a eine Erniedrigung der APRIL-induzierten IL-6-Konzentration bei den RA-FLS hervorruft ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,022$ für GP 1a=10nmol/l und $p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,006$ für GP 1a=100nmol/l).

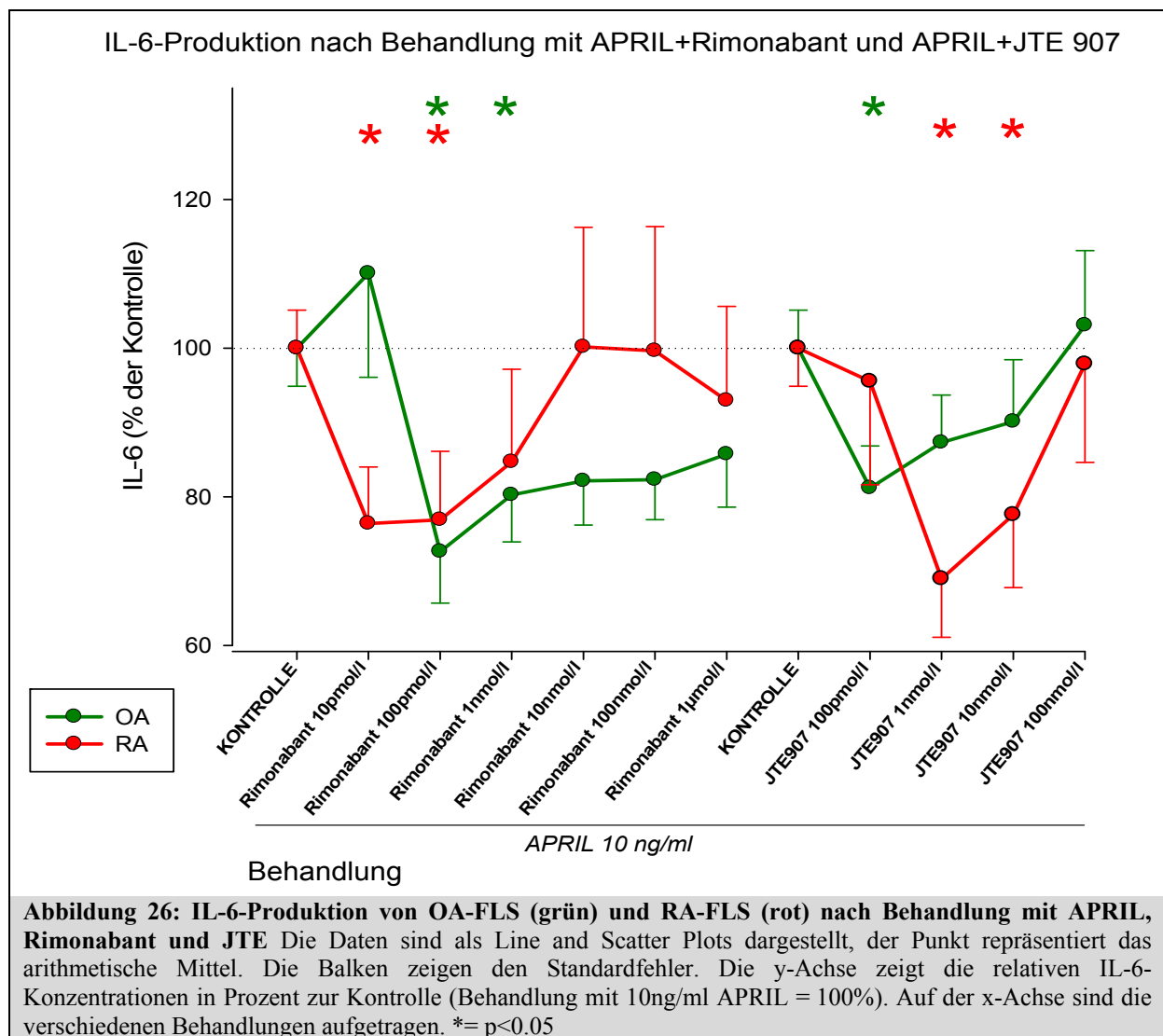


3.6.3 Behandlung mit APRIL, Rimonabant und JTE 907

Zum Vergleich kamen des Weiteren an den Rezeptoruntergruppen selektiv antagonistisch wirksame Substanzen zum Einsatz. Behandelt wurden die Zellen mit dem CB₁-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant und dem selektiven inversen CB₂-Rezeptor Agonisten JTE 907, wieder in Kombination mit einer APRIL-Stimulation von 10ng/ml.

Auch hier sind einige IL-6 Ergebnisse erniedrigt, allerdings eher bei niedrigeren Konzentrationen der Stimulanzen. (Für den CB₁-Antagonisten Rimonabant kommt es bei den Behandlungskonzentrationen von 100pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,005$) und 1nmol/l($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,042$) für OA und 10pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,036$) und 100pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,031$) für RA zu niedrigen Werten im Vergleich zur Kontrolle, für den inversen CB₂-Agonisten JTE 907 bei Konzentrationen von 100pmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,031$) für OA und 1nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,006$) und 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,034$) für RA.)

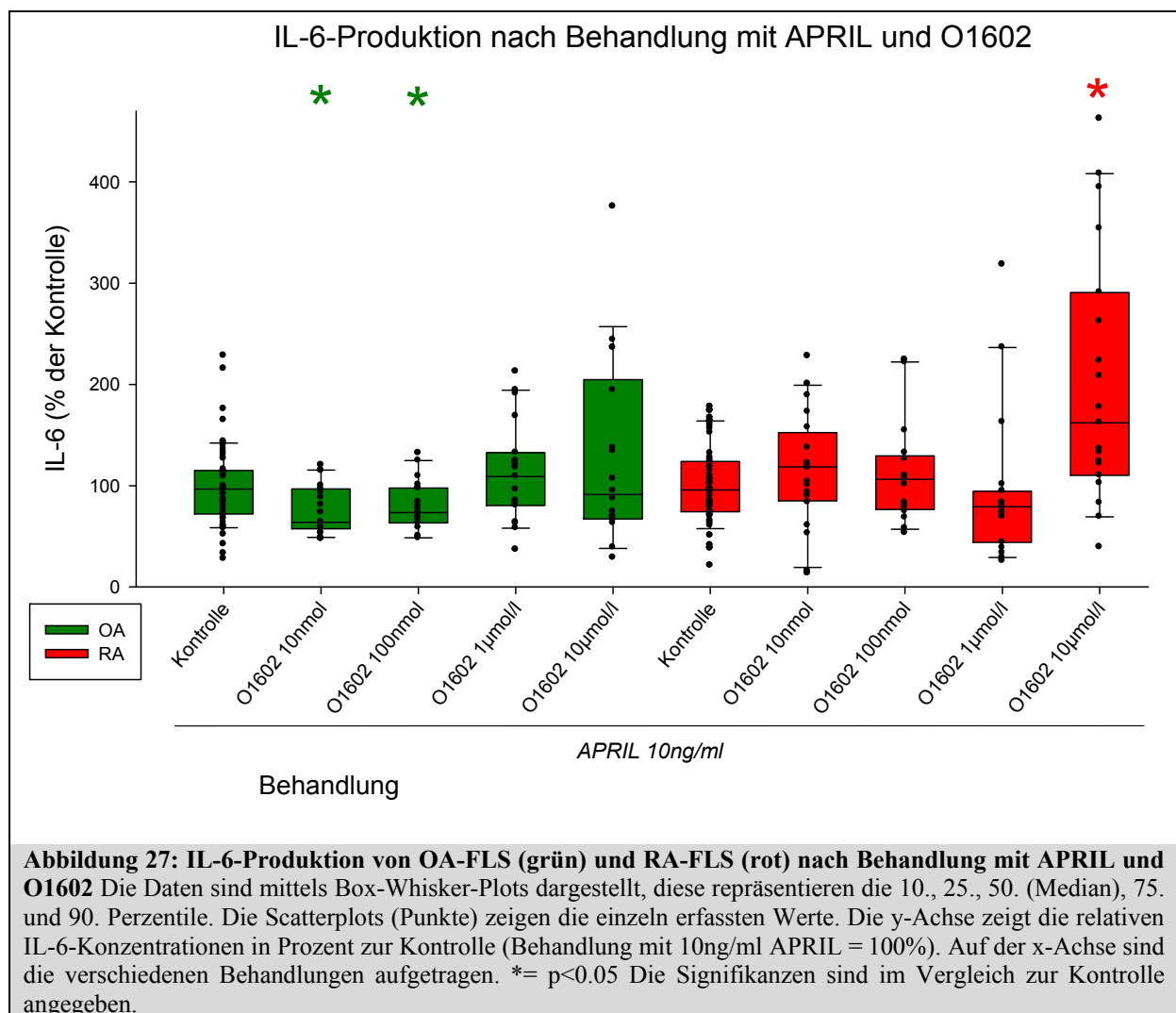
Ein eindeutiger Unterschied zwischen OA und RA lässt sich hierbei nicht ausmachen.



3.6.3 Behandlung mit APRIL und O-1602

Zum Abschluss der Stimulationen mit Liganden des Endocannabinoidsystems und der Betrachtung einer Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Bildung kam noch eine spezifische Substanz zum Einsatz. Es wurde mit O-1602 stimuliert, einem Cannabidiolanalogen, das als potenter Agonist am GPR55 Cannabinoid-Rezeptor wirkt. Hierbei handelt es sich um einen eigenständigen non-CB₁/CB₂-Rezeptor. Zusätzlich fand wieder eine Behandlung mit 10ng/ml APRIL statt.

Niedrigere O-1602-Konzentrationen senken bei OA-FLS die IL-6-Konzentration (Behandlungen mit 10nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,009$) und 100nmol/l ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}=0,026$)). Bei RA-FLS hingegen steigert eine Behandlung mit 10 μ mol/l O-1602 die IL-6-Konzentration ($p_{\text{Mann-Whitney-U-test}}<0,001$).



4 Diskussion

4.1 Überdurchschnittliche IL-6-Produktion durch OA-Synovial-Fibroblasten im Vergleich zu RA-Synovial-Fibroblasten

Bekannt ist, dass fibroblastenartige-Synoviozyten – auch in Kultur – spontan eine gewisse Menge an IL-6 produzieren.^{120,121}

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit ist auffällig, dass sich in den Überständen der OA-Zelllinien jeweils – selbst bei den Kontrollen ohne Behandlung – höhere Konzentrationen an IL-6 als in den Überständen der RA-Zelllinien finden. In den Überständen der OA-FLS, die über 24 Stunden allein mit FCS-freiem Medium inkubiert wurden, wurde im Mittel eine IL-6-Konzentration von 823,94 pg/ml gemessen, während in den Überständen der RA-FLS lediglich 591,45 pg/ml vorhanden waren. Zu dieser Beobachtung muss ergänzt werden, dass die Zelldichte der beiden Gruppen zu Behandlungsbeginn anhand der lichtmikroskopischen Konfluenz beurteilt wurde und somit qualitativ vergleichbar war.

Dieses Ergebnis der IL-6-Konzentrationsdifferenz ist insofern überraschend, da eigentlich von RA-Zelllinien eine höhere IL-6-Produktion zu erwarten gewesen wäre, als durch OA-FLS.^{120,122} Vor allem für Serumkonzentrationen von IL-6 gilt, dass diese mit der RA-Klinik (Morgensteifigkeit und Ritchie Index: Erfassung der Gelenkreaktionen auf Druck) und laborchemischen Entzündungsparametern (CRP) korrelierend erhöht sind.²⁴ Für die in diesen Experimenten vorliegende Patientenpopulationen gilt, dass die RA-Patienten (13,0 mg/l) im Vergleich zu den OA-Patienten (2,6 mg/l) leicht erhöhte CRP-Werte im Serum zeigen. Somit wären im Vergleich zumindest systemisch auch höhere IL-6-Werte bei RA-Patienten als bei OA-Patienten zu erwarten. Und auch lokal wird eine Assoziation zwischen der IL-6-Konzentration in der Synovialflüssigkeit und dem Ausmaß der chronischen Synovitis beschrieben.²³ Es stellt sich nun also die Frage, worin sich die RA- und OA-Patienten – abgesehen von ihrer Grunderkrankung – unterscheiden und ob diese Unterschiede die in diesem Fall beobachtete höhere IL-6-Bildung durch OA- als durch RA-FLS rechtfertigen.

1. Auffällig ist, dass die OA-Patienten (72 Jahre) im Mittel zum OP-Zeitpunkt knapp acht Jahre älter waren als die RA-Patienten (64,25 Jahre). Verschiedene Arbeiten beschreiben eine positive Korrelation zwischen Lebensalter und gesteigerten TNF- α - und IL-6-Plasmaspiegeln in gesunden Individuen und in Zufallspopulationen – unabhängig von Krankheitsstatus und speziellen Erkrankungen des Alters.^{123,124} Dabei handelt es sich um systemische Beobachtungen, die sich eventuell auf lokale Sachverhalte übertragen lassen könnten.

2. Eine weitere OA- und RA-FLS differenzierende Beobachtung ist die Feststellung, dass die RA-Fibroblasten im Vergleich zu OA-Fibroblasten unter den gleichen Kulturbedingungen durchwegs längere Zeit (mehrere Tage Unterschied) benötigten, um qualitativ die gleiche Zelldichte – bzw. letztendlich Konfluenz – zu erreichen. Das heißt, die Zellvermehrung und somit der Zellzyklus dauerte bei RA-Zellen länger als bei OA-Zellen. Diese Beobachtung lässt Rückschlüsse auf eine reduzierte Stoffwechselaktivität bei den RA-Zellen im Vergleich zu den OA-Zellen zu. Ein möglicher Erklärungsansatz, der sich wiederum auf die verschiedenen Patientencharakteristika bezieht, liegt in der Betrachtung der unterschiedlichen Therapien. Während vergleichbar viele OA- und RA-Patienten mit NSARs behandelt werden, erhalten keine OA-Patienten – jedoch nahezu alle RA-Patienten – Steroide oder DMARDs. Es ist bekannt, dass Glukokortikoide eine antiinflammatorische Wirkung besitzen und unter anderem die IL-6-Produktion hemmen.^{97,125} Zum Einsatz kamen hier allerdings Zellen der Passagen zwei bis sieben, die sich zuvor mehrere Tage in Kultur befanden. Daher ist ein IL-6-supprimierender Effekt durch eine direkte Glukokortikoidwirkung nicht zu erwarten. Es stellt sich die Frage, ob die Steroidtherapie dennoch nachhaltige Auswirkung auf die Stoffwechselaktivität der Fibroblasten im Sinne einer Art „zellulären Gedächtnisses“ haben könnte. In Tierversuchen mit Seebrassen konnte – durch die Identifizierung des Promotors im IL-6-Gen – kürzlich gezeigt werden, dass dieser sich durch proinflammatorische Zytokine (wie TNF- α , IL-2 und IL-6 selbst) und Lipopolysaccharide signifikant induzieren und durch Dexamethason signifikant hemmen lässt. Damit wurde direkt gezeigt, wie die Aktivität des IL-6-Genes auf Transkriptionsebene reguliert werden kann.¹²⁶

Um die unter 1. vermuteten beeinflussenden Faktoren zu umgehen, könnten bei zukünftigen ähnlichen experimentellen Ansätzen OA- und RA-Patienten nach Alter gematched werden.

Um in dieser Arbeit für alle im Folgenden diskutierten Ergebnisse vergleichbare Bedingungen zu schaffen und um den Effekt der einzelnen Behandlungen besser beurteilen zu können, werden relative Werte betrachtet. Das heißt die absoluten IL-6-Konzentrationen wurden in Bezug zu den Kontrollbehandlungen der jeweiligen Zelllinien gesetzt. Dies schließt nicht aus, dass dennoch durch die Vorbehandlung mit Prednisolon die Promotorregion des IL-6 Gens nachhaltig verändert wurde. Allerdings zeigen die eigenen Versuche, dass die Hemmung der IL-6-Produktion durch FLS mittels Cortisol bzw. die Stimulierbarkeit von IL-6 durch Induktoren in RA und OA SFs möglich ist, was die prinzipielle Modulierbarkeit der IL-6 Produktion in RA- und OA-FLS zeigt.

4.2 APRIL-induzierte IL-6-Produktion in RA-Synovial-Fibroblasten

Verschiedene Arbeiten messen dem APRIL und BAFF-System eine entscheidende Rolle bei der RA bei. Dieser Gedanke geht auf die Beobachtung erhöhter APRIL- und BAFF-Spiegel im Serum und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA zurück.^{19,88,127} FLS gehören zu den wichtigen Effektorzellen der RA, da ihre Aktivierung zur Knorpel- und Knochendestruktion führt.¹⁴ Vermittelt wird die Wirkung in erster Linie durch die Bildung diverser Metaboliten, unter anderem dem proinflammatorischen Zytokin Interleukin-6.¹⁵ (siehe auch Abb. 2 und Kapitel 1.2)

Die Hauptthese dieser Arbeit unterstellt APRIL einen proinflammatorischen Effekt in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Objektiviert werden sollte diese Vermutung anhand der APRIL-induzierten Produktion des entzündungsfördernden Zytokins Interleukin-6 durch fibroblastenartige-Synoviozyten aus entzündlich veränderten Kniegelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit bei einer APRIL-Behandlung von RA-FLS, nicht jedoch bei OA-FLS, ab einer Konzentration von 10ng/ml ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration nach 24-stündiger Inkubationszeit beobachtet werden (vgl. Abb. 9 und 10). Eine Veröffentlichung von 2007 beschreibt bereits, dass sich RA-Fibroblasten durch APRIL dazu stimulieren lassen IL-6, TNF- α , IL-1 β und auch APRIL selbst zu produzieren. Als Nachweismethode diene lediglich die Genexpression. Ein signifikanter Effekt dafür wurde jeweils ab einer Behandlungskonzentration von 300ng/ml APRIL beschrieben.¹⁹ In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Dosis-Wirkungskurven gezeigt, dass bereits ab 10ng/ml eine Steigerung der IL-6-Produktion erreicht werden kann. Die APRIL-Konzentrationen, die in anderen Arbeiten in der Synovialflüssigkeit von Rheumapatienten gemessen wurden, lagen im Mittel zwischen 30 und 40ng/ml.¹⁹ Nimmt man solche Spiegel auch für die Patienten dieser Arbeit an, wären biologisch vorkommende APRIL-Konzentrationen also durchaus in der Lage sich auf die IL-6-Produktion in den rheumatisch veränderten Gelenken auszuwirken. Damit wäre APRIL in der Lage zur lokalen IL-6-Produktion (und eventuell auch zur Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine) in rheumatisch-entzündlich veränderten Gelenken beizutragen. Die Korrelation von IL-6 mit dem Progress der rheumatoiden Arthritis ist bekannt.^{23,24} In der Literatur wird beschrieben, dass einem – dem zirkadianen Rhythmus unterworfenen – IL-6-Peak im Serum von RA-Patienten ein IL-6-Peak in der Synovialflüssigkeit vorangeht. Die Ursache für gesteigertes Serum IL-6 bei RA ist also in Pathologien der Synovia zu suchen.¹²⁸ Somit sind Faktoren wie

APRIL, die in der Synovia die IL-6-Konzentration modulieren und v.a. induzieren, von entscheidender pathogenetischer Bedeutung.

Auch durch höhere APRIL-Konzentrationen gelang keine Stimulation der IL-6-Produktion in OA-FLS. Somit ist bei Patienten die nicht an RA erkrankt sind auch nicht von einem APRIL-Effekt auf FLS auszugehen.

Des Weiteren setzen diese Ergebnisse voraus, dass RA-FLS – um auf APRIL reagieren zu können – Rezeptoren besitzen müssen mit denen APRIL interagiert. Infrage kommen hierfür die beiden bekannten und mit APRIL interagierenden Rezeptoren BCMA und TACI (siehe Kapitel 1.4.3). Da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass BAFF nicht zu einer Induktion von IL-6 beiträgt, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Rezeptor den die RA-FLS exprimieren, um BCMA handelt, denn dieser hat eine deutlich geringere Affinität zu BAFF als zu APRIL.⁵² Dieses Fazit deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, dass auf RA-FLS BCMA gefunden wurde, nicht jedoch TACI oder BAFF-R, während sich auf OA-FLS keiner dieser drei Rezeptortypen fand.¹⁹ Ob TACI und BAFF-R jedoch niemals von RA-FLS präsentiert werden, oder ob sich deren Expression durch gewisse Stimulanzien induzieren ließe, bleibt vorerst offen. Für die folgenden Beobachtungen bezüglich IL-6-Änderungen gilt jedoch am wahrscheinlichsten, dass diese auf BCMA-Aktivierung durch APRIL zurückzuführen sind, da das Rezeptorprofil der RA-FLS vermutlich nur BCMA umfasst. Somit ist wohl APRIL – und nicht BAFF – das wichtige Zytokin, das auf RA-FLS wirkt, obwohl die Spiegel beider Substanzen *in vivo* in der Synovialflüssigkeit von Rheumapatienten erhöht sind. Damit besitzt BAFF im rheumatisch-veränderten Gelenk vermutlich andere Zielzellen, am ehesten B-Zellen.^{53,129} Die durch BCMA vermittelte Signaltransduktion ist nicht gänzlich geklärt, bekannt ist jedoch eine TRAFs vermittelte NF- κ B-Aktivierung⁷² sowie ein Mechanismus in Zusammenhang mit JNK-Aktivierung⁷⁹ (siehe 1.4.3). Schon 1995 wurde bei RA im Gegensatz zu OA eine hohe DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B in der Synovialmembran gefunden.¹³⁰ Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wiederum induziert unter anderem die Interleukin-6-Transkription.^{120,131} Beschrieben ist außerdem, dass IL-6 im Gegenzug die Expression von BCMA-mRNA heraufregulieren kann.⁸⁰ Als ein weiterer Mechanismus wird in der Literatur beschrieben, dass APRIL via BCMA die Bildung von RANKL auf RA-FLS induzieren kann, somit die Genese von Osteoklasten begünstigt wird und die Knochendestruktion voranschreitet¹⁹ (siehe Kapitel 1.1.2 und Abb. 2). Außerdem wird der Zellzyklus von RA-FLS durch APRIL-Interaktionen mit von RA-FLS exprimiertem BCMA akzelleriert¹⁹ (siehe auch Abb. 28).

Somit können alles in allem sowohl APRIL als auch BCMA interessante Zielstrukturen für neue Therapieansätze darstellen. Atacicept, ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein (TACI-Ig), das BAFF und APRIL bindet, befindet sich bereits im Rahmen von Studien im experimentellen Einsatz gegen RA (siehe Kapitel 1.4.4).

Als abschließendes Fazit aus diesem Experiment ist zu ziehen, dass APRIL nicht ausschließlich ein BAFF-Analogon ist, welches eine entscheidende Rolle im B-Zell-System spielt und dadurch einen Effekt auf das adaptative Immunsystem ausübt. Vielmehr handelt es sich bei APRIL auch um einen Faktor, der als Aktivator von FLS Zytokinproduktion induziert und damit ein Akteur in der humoralen Immunologie ist.

4.3 Induzierbarkeit der IL-6-Produktion in OA- und RA-Fibroblasten durch starke Aktivatoren wie TNF und IL-1 β im Verhältnis zu APRIL

Im Vergleich zur IL-6-Induktion mit APRIL sollte auch analysiert werden in welchem Ausmaß sich RA-Fibroblasten und auch OA-Fibroblasten grundsätzlich zur Interleukin-6-Produktion aktivieren lassen. Zur Anwendung kamen dabei die Stimulatoren TNF und IL-1 β jeweils in den Konzentrationen 1 und 10ng/ml. Im Vergleich zu APRIL-behandelten FLS gelingt mit TNF eine um Faktor 50 bis 100 verstärkte IL-6 Produktion und mit IL-1 β sogar eine 500- bis 1000-fach höhere IL-6-Bildung.

Die IL-6-Induzierbarkeit findet sich hier sowohl für OA als auch für RA in vergleichbarem Ausmaß. (siehe Abb. 15 und 16) Im Verhältnis scheint die TNF-Wirkung auf OA- und die IL-1-Wirkung auf RA-FLS jeweils ein wenig ausgeprägter.

Wir konnten zeigen, dass die vorliegenden Zelllinien grundsätzlich stimulierbar und zur IL-6-Bildung induzierbar sind. In der Literatur wird empfohlen *in vitro* mit FLS der Passagen drei bis neun zu arbeiten, da frühere Passagen nennenswerte Anzahlen verunreinigender Zellen enthalten (v.a. Synovial-Makrophagen) und in späteren Passagen die FLS altern und ihre Seneszenz zunimmt.^{121,132} Das heißt, bei den FLS in dieser Arbeit (Passagen zwei bis sieben) sollte es sich zum Großteil um homogene stoffwechselaktive Zellpopulationen handeln. Weiterhin wird beschrieben, dass Synovialfibroblasten während der ersten Wochen in Kultur spontan Proteoglykane, Zytokine, Wachstumsfaktoren, MMPs und Prostaglandine bilden, diese Produktion jedoch bis zur dritten Passage allmählich abnimmt. Nach diesem Zeitpunkt sind auftretende Effekte also induziert und auf von extern zugeführte Mediatoren zurückzuführen. Der RA-Phänotyp kann aber auch noch in späteren Passagen durch die Behandlung mit Zytokinen wie IL-1 und TNF wiederhergestellt werden.¹²¹ Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass sich die IL-6-Produktion signifikant durch IL-1 und TNF induzieren lässt. Zusätzlich zu diesem Sachverhalt ist in der Literatur ebenfalls beschrieben, dass diese IL-1- oder TNF-abhängige IL-6-Bildung über den NF- κ B-Signalweg vermittelt wird.^{121,133,134}

Auch in anderen Arbeiten wurde eine IL-6-Induktion durch TNF- α und IL-1 β auf RA-FLS untersucht. Gefunden wurden dabei signifikante IL-6-Induktionen für Behandlungskonzentrationen von jeweils 10ng/ml TNF- α und IL-1 β . Auch dort handelte es sich bei IL-1 β

um die eindeutig stärkere Stimulanz.¹³⁵ Somit handelt es sich um reproduzierbare Ergebnisse und die Zellen sind zur IL-6-Bildung eindeutig stimulierbar.

Dass auch OA-FLS – den Ergebnissen dieser Arbeit nach – eindeutig auf die TNF-/IL-1 β -Behandlungen mit IL-6-Bildung antworten, ist vor allem in Bezug auf das vorangehende Kapitel (4.2) von Bedeutung. Denn die verschiedenen Reaktionen der OA- und RA-FLS auf APRIL-Behandlung sind somit aller Wahrscheinlichkeit nach tatsächlich Folge des Rezeptorstatus (BCMA auf RA und nicht auf OA) bzw. des nachgeschalteten Signalweges und nicht der Tatsache geschuldet, dass OA-FLS eventuell grundsätzlich weniger/nicht stimulierbar sein könnten.

Des Weiteren soll die durch TNF und IL-1 β erreichte IL-6-Produktion mit der IL-6-Steigerung, die durch APRIL-Stimulationseffekte induziert wird, in Relation gesetzt werden. Wie bereits erläutert wurden TNF und IL-1 β -Konzentrationen mehrfach im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten als erhöht beschrieben.^{136,137} Außerdem wurde bereits berichtet, dass sie IL-6 induzieren können.¹³⁵ Sie sind somit ein guter Indikator das Verhältnis – um welches APRIL die IL-6-Produktion erhöht – im Kontext zu beurteilen und um damit dessen biologisch-klinische Relevanz abzuschätzen.

Zunächst muss dafür beleuchtet werden ob die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit für TNF und IL-1 β auch auf die *in vivo* Situation übertragen werden kann. Die Analyse der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten ergibt im Schnitt TNF-Konzentrationen von ca. 100pg/ml. Im Gegensatz dazu findet man in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten signifikant niedrigere TNF-Spiegel von knapp 40pg/ml.¹³⁷ Eine weitere Arbeit aus dem Jahr 2011 zeigt, dass in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten (Median: 9,3pg/ml) signifikant höhere IL-1 Konzentrationen als in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten (im Median: 7,8pg/ml) zu finden sind.¹²² Frühere Arbeiten berichten von IL-1 β -Konzentrationen in der RA-Synovialflüssigkeit einzelner Patienten von bis zu 250pg/ml.^{138,139}

Die niedrigsten TNF-/IL-1 β -Konzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen sind, betragen 1ng/ml, also die zehnfache bis hundertfache Konzentration der *in vivo* gemessenen Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit. Die hier eingesetzten Konzentrationen von 1ng/ml rufen eine eindeutig signifikante ($p=0,001$) IL-6-Produktion hervor, zusätzlich sind in der Literatur ebenfalls Effekte durch physiologische Konzentrationen beschrieben,^{133,140} so dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass auch niedrigere Konzentrationen Effekte auf FLS haben.

Durch die Behandlung von RA-FLS mit APRIL konnte zwar eine signifikante IL-6-Steigerung erreicht werden (siehe Abb. 9), diese scheint jedoch gering - verglichen mit der durch TNF und IL-1 β erreichten Induktion (siehe Abb. 15 und 16). In Anbetracht der Tatsache, dass bei Behandlungen mit APRIL physiologische bei Stimulationen mit TNF und IL-1 β unphysiologisch hohe Konzentrationen zum Einsatz kamen, wird die APRIL-Wirkung unterschätzt. Beispielsweise gibt es Beobachtungen, dass physiologische TNF-Konzentrationen (100pg/ml) die IL-6-Bildung durch RA-FLS nach 24-stündiger *in vitro* Behandlung um ca. 50%¹³³, IL-1 β -Konzentrationen von 100pg/ml die IL-6-Bildung um ca. 400%¹⁴⁰ steigern. Die Behandlung mit physiologischen APRIL-Konzentrationen von 10ng/ml bzw. 100ng/ml brachten eine IL-6-Steigerung um 20 bzw. knapp 30% (vgl. Abb. 9). Somit sind APRIL-Effekte durchaus von ähnlich relevanter Bedeutung.

Dass in der Synovialflüssigkeit gefundene APRIL-Konzentrationen ausreichen könnten die *in vitro* beobachteten Effekte auch *in vivo* zu erzielen wurde bereits erläutert. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben und in Abbildung 28 veranschaulicht, kann APRIL RA-FLS dazu stimulieren TNF und IL-1 β zu produzieren.¹⁹ Wie zuvor dargestellt führen diese beiden Zytokine in ihrer Wirkung auf RA-FLS zur NF- κ B-abhängigen IL-6-Bildung. Somit fördert APRIL durch BCMA-Bindung nicht nur direkt die IL-6-Bildung. Vielmehr wird dieser Effekt durch indirekte auto- und parakrine Mechanismen im Sinne eines positiven Regelkreises verstärkt. Auch die Bildung von APRIL selbst wird durch APRIL-Wirkung an BCMA gesteigert¹⁹ und könnte wiederum weitere FLS der Umgebung stimulieren. Nicht zuletzt soll erneut erwähnt werden, dass IL-6 die Expression von BCMA-mRNA heraufregulieren kann.⁸⁰ Eine Reihe an Mechanismen kann das Zusammenspiel aus APRIL-BCMA-Interaktion und RA-FLS also intensivieren.

TNF-Antagonisten (Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab) haben als Biologika eine relevante Bedeutung in der Behandlung der RA erlangt. Auch einen IL-1-Antagonisten (Anakinra) gibt es im klinischen Einsatz. (siehe auch Abb. 2) Auf diese Art von Therapien gibt es jedoch nicht nur Responder. Verschiedene Patienten sprechen individuell sehr unterschiedlich auf die Therapien an. Ein Erklärungsansatz liegt in der ebenfalls auffälligen Variabilität im Zytokinprofil der einzelnen Patienten. Es wird beispielsweise vermutet, dass Patienten mit hoher TNF-Expression besser auf TNF-Antagonisten und Patienten mit hohen Spiegeln an anti-CCP oder RF und vielen synovialen B-Zellen besser auf B-Zell-gerichtete Therapien ansprechen könnten.³ Eventuell können an dieser Stelle auch APRIL- und BAFF-

Antagonisten, wie Belimumab und oder Atacicept (siehe Kapitel 1.4.4) ins Spiel kommen. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese, da es im Patientenkollektiv große interindividuelle Unterschiede gibt, sowohl im Ansprechen auf die Behandlung mit TNF und IL-1 β als auch auf die Behandlung mit APRIL, mit IL-6-Steigerungen auf bis zu 250% der Kontrolle (siehe Abb.10).

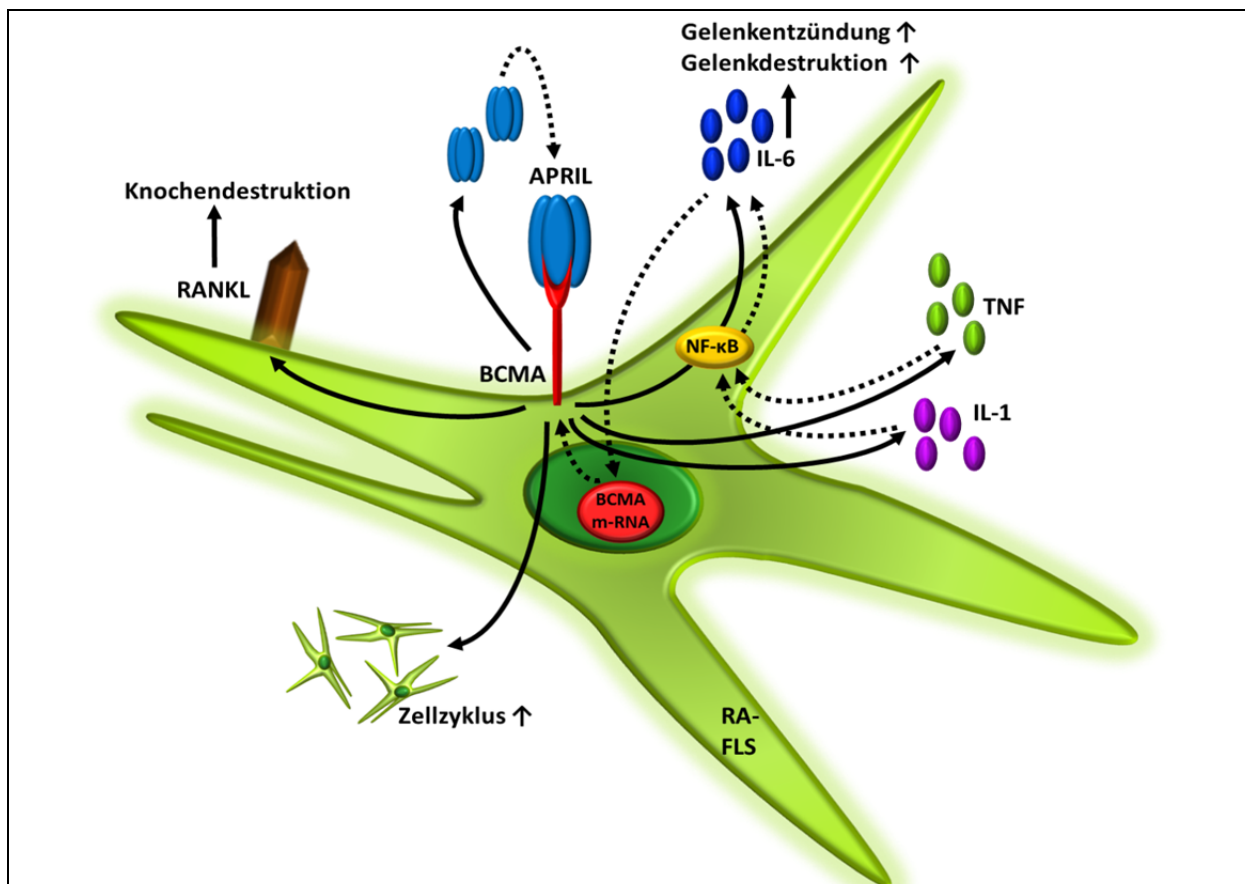


Abbildung 28: APRIL-Wirkung auf RA-FLS Die Abbildung zeigt schematisch einen fibroblastenartigen Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis. Dieser besitzt den Rezeptor BCMA, an den dessen Ligand APRIL bindet. Die durchgezogenen Pfeile beschreiben die direkten Auswirkungen der BCMA-Aktivierung durch APRIL. Diese induziert die IL-6 Bildung (Ergebnisse der vorliegenden Arbeit) via NF- κ B^{72,79,131}, die Bildung von TNF, IL-1 und APRIL selbst, die Expression von RANKL und die Steigerung des Zellzyklus der FLS.¹⁹ Die gestrichelten Pfeile beschreiben die indirekten Auswirkungen der BCMA-Aktivierung durch APRIL. Diese beinhalten autokrine/parakrine Wirkung und durch autokrine/parakrine Wirkung hervorgerufene Effekte: APRIL selbst kann erneut mit BCMA interagieren, TNF und IL-1 können ebenfalls via NF- κ B-Weg die IL-6-Bildung induzieren¹²¹ und IL-6 fördert die BCMA-m-RNA-Expression.⁸⁰

Für alle folgenden Betrachtungen ist zudem interessant, dass APRIL – im Gegensatz zu TNF und IL-1 β – unterschiedliche Effekte auf RA und OA hat. Es induziert die IL-6-Produktion durch seine Wirkung auf RA-FLS und erzielt keine solchen Effekte auf OA-FLS. Somit können OA-FLS im Weiteren auch als Kontrollgruppe betrachtet werden.

4.4 APRIL-abhängige Modulation der Cortisol-induzierten IL-6-Hemmung in OA und RA-Synovial-Fibroblasten

Während IL-1 β und TNF als „Positivkontrolle“ in Bezug auf die Stimulierbarkeit von FLS zur IL-6-Produktion dienen, sollte im Gegensatz dazu auch überprüft werden, ob sich die IL-6-Produktion adäquat hemmen lässt. Zur Behandlung wurde dabei das antiinflammatorische Steroidhormon Cortisol eingesetzt. Zusätzlich kombiniert wurde die Cortisol-Behandlung der RA- und OA-FLS mit der Stimulation durch APRIL und im Folgenden werden etwaige Aspekte einer Wechselwirkung diskutiert.

Zuerst soll der Sachverhalt für RA-FLS betrachtet werden. Zu einer signifikanten Hemmung der IL-6-Bildung verglichen mit unbehandelten Zellen kommt es bei einer Behandlung der Zellen aus einer Kombination mit Cortisol (10nmol/l) und APRIL 1ng/ml. (vgl. Abb. 11) Da für 1ng/ml APRIL kein hemmender Effekt auf RA-FLS zu erwarten ist (vgl. Kapitel 4.2), lässt sich diese Hemmung wohl auf die Cortisolwirkung zurückführen.

Cortisol hemmt die Entzündungsreaktion durch die Herabregulierung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 β und IL-6.⁹⁷ Eine Glukokortikoid-abhängige Hemmung der IL-6-Bildung durch RA-FLS ist in der Literatur beschrieben¹²⁵ und somit eine Reduktion der IL-6-Konzentration für Zellüberstände Cortisol-behandelter FLS zu erwarten. Die Normwerte für die endogene Nüchtern-Cortisolkonzentration im Serum betragen 138 bis 690nmol/l.¹⁴¹ Dabei handelt es sich um morgendliche Spitzenspiegel. In dieser Arbeit werden die FLS mit Cortisolkonzentrationen ab 10nmol/l behandelt, also durchaus mit physiologisch vorkommenden Konzentrationen.

Durch Steigerung der APRIL-Konzentrationen lässt sich diese Cortisol-induzierte IL-6-Hemmung wieder aufheben, so dass für Behandlungen mit 100ng/ml APRIL trotz bestehender Cortisolbehandlung die IL-6-Konzentration wieder signifikant steigt. (vgl. Abb.11)

Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit variiert die Cortisolkonzentration bei konstantem APRIL-Stimulus (100ng/ml - eine Konzentration, die IL-6 eindeutig induziert, vgl. Kapitel 4.2). Sowohl Cortisolkonzentrationen von 10nmol/l, als auch 100nmol/l hemmen den proinflammatorischen Effekt von APRIL wiederum signifikant (vgl. Abb. 13). Das heißt der stimulatorische APRIL-Effekt und auch der hemmende Cortisol-Effekt wirken gleichzeitig auf RA-FLS. Veränderungen der IL-6-Konzentrationen heben sich somit gegenseitig auf. Es stellt sich die Frage nach dem zugrunde liegenden biologischen Mechanismus: Cortisol

hemmt die IL-6-Bildung über die Beeinflussung der IL-6-Transkription¹²⁶. Außerdem ist bekannt, dass die hemmende Wirkung von Glukokortikoiden weitgehend auf Wechselwirkungen zwischen aktivierten Glukokortikoidrezeptoren und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B – die wiederum die Expression inflammatorischer Gene vermitteln – beruht und zu deren Suppression führt.^{142,143} APRIL induziert die IL-6-Bildung via NF- κ B⁷² und beeinflusst dadurch ebenfalls die IL-6-Transkription¹³¹. Von klinischem Interesse könnte dieses Wissen bei einer eventuellen therapeutischen Kombination von Steroiden und APRIL-Antagonisten sein. Es könnte davon ausgegangen werden, dass – zumindest in Bezug auf die IL-6-Regulation bei FLS – biologisch auf gleicher Ebene angegriffen wird. Die Bedeutung von NF- κ B in der RA-Genese wurde in dieser Arbeit schon mehrfach erwähnt. Dass eine NF- κ B-Hemmung (z.B. durch IKK-Inhibitoren) die Gelenkentzündung unterdrückt, wird auch durch Tiermodelle gestützt.¹⁴⁴

Für noch höhere Cortisolkonzentrationen (1 μ mol/l) lassen sich in dieser Arbeit jedoch keine Signifikanzen mehr beobachten. (vgl. Abb. 13) Da es sich hierbei um unphysiologisch hohe Konzentrationen handelt, könnten dabei unspezifische Mechanismen wirksam werden. Außerdem kann Cortisol über viele verschiedene Wege seine Wirkung entfalten. Grundsätzlich lassen sich die verschiedenen Wirkmechanismen in genomische und nicht-genomische einteilen.¹⁴⁵ Die bisher diskutierten Effekte werden über die genomische Wirkung vermittelt und damit über intrazelluläre Kortikosteroid-Rezeptoren, deren Hauptaufgabe in der Transaktivierung, DNA-Bindung spezifischer DNA-Domänen und Liganden-Bindung liegt.¹⁴⁶ Die schnelle nicht-genomische Wirkung wird vermutlich durch membranständige Rezeptoren oder durch Translokation in Mitochondrien vermittelt.¹⁴⁷ Diese umfasst unter anderem den analgetischen Effekt sowie die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen.⁹⁷ Während über GR α (Glukokortikoidrezeptor α) die Transkription von 5-20% des exprimierten menschlichen Genoms reguliert wird und die meisten bekannten Cortisolwirkungen vermittelt werden, bindet GR β keine Glukokortikoide¹⁴⁷ und besitzt eine ausgeprägte negative Wirkung auf die GR α -induzierte Transkription.¹⁴⁸ Dass es bei RA-Patienten mitunter zu Glukokortikoidresistenz kommt, könnte an einer hohen Expression von GR β bei diesen Patienten liegen.¹⁴⁹ Diese GR β -Expression wiederum wird wohl im Beisein proinflammatorischer Enzyme induziert.¹⁴⁷ Ein spezielles Glukokortikoidrezeptorgen, das die Stabilität von GR β erhöht, ist ebenfalls mit RA assoziiert.¹⁴⁹

Membranständiger GR ist bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ebenfalls hochreguliert.¹⁵⁰ Direkte Membraneffekte durch Glukokortikoide konnten speziell bei hohen Konzentrationen beobachtet werden.¹⁵¹

Auch für OA-FLS konnte gezeigt werden (vgl. Abb. 11 und 14), dass Cortisol die IL-6-Konzentration erniedrigt. Da bei OA kein APRIL-Effekt beobachtet wurde, ist diese Hemmung wohl auf die alleinige Cortisolwirkung zurückzuführen. Da APRIL die IL-6-Konzentration bei OA aber nicht steigert (vgl. Kapitel 4.2), zeigen sich keine zusätzlichen Signifikanzen im Vergleich mit der alleinigen APRIL-Behandlung.

Zusammenfassend bedeutet dies: Cortisol hemmt die IL-6-Bildung in RA- und OA-Fibroblasten. Die Negativkontrolle ist also aussagekräftig und die IL-6-Bildung grundsätzlich in beiden Fällen hemmbar.

Insgesamt aber ist der Cortisol-induzierte inhibitorische Effekt auf das proinflammatorische Zytokin IL-6 bei RA ausgeprägter als bei OA. Zusätzlich verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass APRIL einen Beitrag zur Entzündungsreaktion bei RA leistet. Es wird durch die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes erneut die Hypothese gestützt, dass die unveränderte IL-6-Konzentration bei RA-FLS bei gleichzeitiger Anwesenheit von APRIL und Cortisol darauf zurückzuführen ist, dass beide Substanzen entgegengesetzte Effekte haben, die sich aufheben. Dies wird erneut im Vergleich mit OA-FLS deutlich, da hier aufgrund fehlender APRIL-Wirkung nur Cortisol wirken und somit die IL-6-Bildung hemmen kann. Als ursächlich hierfür wiederum ist der unterschiedliche Rezeptorbesatz von OA- und RA-FLS anzusehen.

4.5 Hormonelle Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion in OA- und RA-Synovial-Fibroblasten

Da das Steroidhormon Cortisol Effekte auf die IL-6-Produktion durch OA- und RA-FLS gezeigt hat, wurde die Wirkung weiterer Steroidhormone im experimentellen Ansatz untersucht. Sexualhormone zeigen einen starken Einfluss auf den Verlauf und die Suszeptibilität bei rheumatoider Arthritis (vgl. Kapitel 1.5.2), weshalb sie hier gesondert betrachtet werden. Das hauptsächliche Augenmerk liegt hierbei auf einer hormonell getriggerten Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion, da durch die Anwesenheit von APRIL verstärkt die pathophysiologische Situation im RA-Gelenk wiedergespiegelt wird und selbst die Cortisolhemmung aufgehoben werden kann (vgl. Kapitel 4.4).

Bei **Dihydrotestosteron (DHT)** handelt es sich um die biologisch aktivste Form von Testosteron und damit um das eigentlich biologisch wirksame Androgen.^{152,153} Die Behandlung von OA-FLS mit APRIL und DHT brachte eine Hemmung der IL-6-Freisetzung signifikant ab DHT-Konzentrationen von 100pmol/l (vgl. Abb.17). Da für OA-FLS diese Wirkung nicht durch APRIL zu erklären ist (vgl. Kapitel 4.2), bestätigt dies den bekannten entzündungshemmenden Effekt dieses potenten Androgens. Die Konzentrationen, die hemmende Effekte gezeigt haben, sind um den Faktor 100 niedriger als unter physiologischen Bedingungen vorkommende Testosteronkonzentrationen im Serum.¹⁴¹ Typische DHT-Serum-Konzentrationen bei erwachsenen Frauen liegen im Bereich 0,2 bis 1,0nmol/l und für Männer zwischen 0,9 und 2,9nmol/l.¹⁵² Daher können die in dieser Arbeit für DHT erzielten Ergebnisse als biologisch relevant angesehen werden.

Dass die IL-6-Konzentrationsänderung tatsächlich auf DHT zurückzuführen ist, zeigt die gleichzeitige Behandlung mit Nilutamide, einem Androgenrezeptorantagonisten.¹⁵⁴ Nach Zugabe von Nilutamide wird die DHT induzierte Reduktion der IL-6 Menge wieder aufgehoben (vgl. Abb. 18). Diese Ergebnisse stützen die These, dass DHT entzündungshemmende Wirkung besitzt. Bekannt ist die immunsuppressive Wirkung von Androgenen sowohl auf die humorale als auch auf die zelluläre Immunantwort.^{155,156,157} Schon früh wurde außerdem beschrieben, dass sich insbesondere die IL-6-Produktion via Testosteron und DHT negativ beeinflussen lässt.¹⁵⁸ Für DHT behandelte OA-FLS wurde in den Ergebnissen dieser Arbeit also genau diese zu erwartende IL-6-Hemmung beobachtet.

Für RA-FLS zeigen sich keine Signifikanzen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit APRIL. Es ist jedoch bekannt, dass RA-FLS Androgenrezeptoren (AR) besitzen und dass

DHT in RA-FLS die – durch IL-1 und TNF α induzierte – Produktion proinflammatorischer Zytokine (wie IL-6) hemmt.¹⁰⁵ Das heißt also, dass APRIL – gemäß den Erwartungen – einer mutmaßlich DHT-getriggerten IL-6-Hemmung entgegenwirkt und diese teilweise oder vollständig kompensiert. Klarer werden die Zusammenhänge in Verbindung mit der Tatsache, dass die gewöhnlich durch DHT ausgelöste IL-6-Hemmung auf einer Androgenrezeptor-abhängigen Inhibition des NF- κ B-Weges beruht.¹⁰⁵ Auch die APRIL induzierte IL-6-Produktion wird vermutlich via NF- κ B-Weg vermittelt,^{79,72} so dass sich die APRIL- und DHT-Effekte am NF- κ B-Weg aufheben.

Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse: In Anwesenheit von APRIL verliert DHT bei RA seine bekannte antiinflammatorische, IL-6 reduzierende Wirkung, oder diese wird zumindest deutlich abgeschwächt. Es kann jedoch für RA-FLS eine breite Streuung der gemessenen IL-6-Werte nach Behandlung mit der Kombination aus APRIL und DHT beobachtet werden (vgl. Abb. 17). Diese lässt darauf schließen, dass die einzelnen Zelllinien der verschiedenen Rheuma-Patienten sehr unterschiedlich auf die Stimulation reagieren. Es könnte somit also zusätzliche Einflussfaktoren auf die APRIL-DHT-Interaktion geben.

Als nächstes werden die Effekte einer Kombinationsbehandlung aus APRIL und **Estradiol (E2)**, einem der wichtigsten natürlichen Estrogene diskutiert. Für diese Stimulation ergibt sich ein ähnliches Bild, wie für die Kombination aus DHT und APRIL: Behandlungen von OA-FLS mit E2/APRIL hemmen die IL-6-Produktion (zum Teil signifikant), während Behandlungen von RA-FLS mit E2/APRIL keine signifikante Variation in der IL-6-Bildung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit APRIL zeigen (vgl. Abb. 19).

In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA wurden erhöhte Estradiolspiegel gefunden.¹⁵⁹ Die Normwerte für Estradiol im Serum liegen für Frauen zyklusabhängig zwischen 70 und 2095pmol/l.¹⁴¹ Damit handelt es sich bei den Behandlungskonzentrationen dieses Versuchsaufbaus, die zur signifikanten IL-6-Konzentrationsänderung geführt haben, wiederum um physiologisch vorkommende Spiegel und damit um biologisch relevante Beobachtungen. Estrogenspiegel in der Synovialflüssigkeit sind sowohl insgesamt als auch im Verhältnis zu Androgenen bei Patienten und Patientinnen mit RA erhöht.^{160,161} Ein Grund hierfür liegt in einer gesteigerten lokalen enzymatischen Aromataseaktivität und somit in einer vermehrten Umwandlung von Hormonvorstufen in Estrogene im gleichzeitigen Beisein proinflammatorischer Enzyme (TNF- α , IL-1 oder IL-6).^{162,163,160}

Estradiol wird eine duale Rolle mit in erster Linie pro- aber auch antiinflammatorischen Effekten bei chronisch entzündlichen Erkrankungen zugesprochen. Diese sollen in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentrationen auftreten. Viele der Estrogenwirkungen werden dabei über den NF- κ B-Weg vermittelt.¹⁶⁴ Von Interesse sind hierbei bisher gefundene Auswirkungen auf die IL-6-Bildung. Beispielsweise wurde für verschiedene Zelltypen gezeigt, dass E2 die IL-6-Produktion durch Interaktionen mit der NF- κ B-Wirkung am IL-6-Promotor hemmt.^{165,166,167} Unabhängig davon gibt es noch eine Reihe weiterer Arbeiten in denen über Konstellationen, die zu einem hemmenden Effekt von E2 auf NF- κ B führen, berichtet wird (zusammengefasst in ¹⁰⁶). Einer Arbeit zufolge kommt es ab einer E2 Konzentration von 100pmol/l zur Hemmung der NF- κ B Aktivierung.¹⁶⁸ Dies deckt sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit, in denen sich ab einer Estradiol-Behandlung von 10pmol/l und höher für OA-FLS ein signifikanter hemmender Effekt auf die IL-6-Produktion zeigt (vgl. Abb. 19), und auch mit der in der Literatur bereits beschriebenen Schlussfolgerung, dass eine entzündungshemmende E2-Wirkung nur durch höhere Hormonkonzentrationen zu erwarten ist.¹⁰⁶ Dass dieser hemmende Effekt nur für Estradiol behandelte OA- und nicht für RA-FLS zu beobachten ist, bestätigt erneut die Hypothese, dass APRIL nur in RA-FLS zu einer NF- κ B-vermittelten IL-6 Induktion führt.^{72,79} Also ist der proinflammatorische APRIL-Effekt auch bei gleichzeitig wirkendem antiinflammatorischem E2-Effekt vorhanden.

Estradiol bindet sowohl den Estrogenrezeptor- α , als auch den Estrogenrezeptor- β .¹⁶⁹ Um weiter zu differenzieren über welchen speziellen Estrogenrezeptor (ER) die Hemmung der APRIL-induzierten IL-6-Steigerung vermittelt wird, wurden selektive ER-Agonisten eingesetzt. Hierbei zeigt sich sowohl für OA-, als auch für RA-FLS, dass die IL-6-Hemmung anscheinend via ER- α vermittelt wird (vgl. Abb. 20). Schon früher wurde gezeigt, dass RA-FLS funktionsfähigen ER- α besitzen und diese somit Zielstrukturen für hormonelle Regulation darstellen.¹⁷⁰ Bemerkenswert hierbei ist, dass in dieser Arbeit die direkte selektive Aktivierung der verschiedenen Rezeptortypen, das gleiche Ergebnis für OA- und RA-FLS zeigt. Das heißt für RA-FLS: bei direkter Aktivierung des ER- α überwiegt der NF- κ B-vermittelte¹⁷¹ hemmende Effekt auf die IL-6-Produktion dem aktivierenden APRIL-Effekt.

Zuletzt sollen noch die Auswirkungen einer kombinierten Zellbehandlung aus **Progesteron** und APRIL betrachtet werden. Auffällig sind hierbei wiederum die schon für E2 und DHT gemachten Beobachtungen: Die IL-6-Antworten der RA-FLS sind inhomogener als die der OA-FLS und eine signifikante Hemmung der APRIL-induzierten IL-6-Steigerung zeigt sich

bei Behandlung der OA-FLS nicht aber bei Behandlung der RA-FLS (vgl. Abb. 21). Auch erhöhte Progesteronkonzentrationen wurden in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA gefunden.¹⁵⁹ Progesteron beeinflusst verschiedene Zytokine und unterdrückt neben TNF und IL-1 β auch die IL-6-Produktion – untersucht beispielsweise an Lymphozyten von RA-Patienten.^{172,173} Dies deckt sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit, wo als Folge der Behandlung von OA-FLS mit verschiedenen Progesteronmengen bei einigen Konzentrationen signifikant weniger IL-6 gebildet wurde. Da dieses Ergebnis nicht für RA-FLS beobachtet wird, bestätigt sich erneut die Hypothese, dass die APRIL induzierte IL-6-Bildung durch die hormoninduzierte IL-6-Hemmung kompensiert wird, zumal Progesteron NF- κ B-supprimierende Wirkung in diversen Arbeiten bei Versuchen mit verschiedenen Zelltypen zeigt.^{174,175,176} Analog zu den Beobachtungen bei Behandlungen mit DHT und E2 kann also auch hier eine Interaktion auf Transkriptionsebene vermutet werden.

4.6 Sympathomimetische Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion in OA- und RA-Synovial-Fibroblasten

Das sympathische Nervensystem wirkt über seine entsprechenden Neurotransmitter immunmodulatorisch, beispielsweise bei rheumatoider Arthritis (vgl. dazu Kapitel 1.5.3). Aus diesem Grund wurde die Modulation der APRIL-induzierten IL-6 Produktion in Kombination mit einer Behandlung durch rezeptorselektive Sympathomimetika untersucht.

In Bezug auf eine Behandlung mit dem selektiven α_2 -Agonisten Clonidin zeigen sich keine relevanten Unterschiede bezüglich der IL-6-Konzentrationen weder zwischen OA und RA noch im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit APRIL (vgl. Abb. 22). Bei der Behandlung mit dem selektiven α_1 -Agonisten Phenylephrin wird für eine Konzentration von 10nmol/l eine Hemmung der IL-6-Produktion durch OA-FLS beobachtet. Frühere Untersuchungen von RA-FLS haben gezeigt, dass Behandlungen mit Noradrenalin in niedrigen Konzentrationen (10nmol/l) die Sekretion von IL-6 signifikant hemmen.¹⁷⁷ Dies geschieht am ehesten via α -Rezeptor vermittelter Noradrenalinwirkung. Dass diese Hemmung in dieser Arbeit für RA-FLS nicht beobachtet wird, stützt erneut die Hypothese, dass ein gleichzeitig APRIL-induzierter positiver Effekt auf die IL-6-Produktion diese kompensiert.

Eine weitere signifikante Beobachtung kann für OA-FLS bei einer Behandlung mit dem Betamimetikum Isoproterenol in einer Konzentration von 1nmol/l gemacht werden: Die IL-6-Konzentration ist hierbei im Vergleich zur alleinigen APRIL-Behandlung signifikant gehemmt. Immunsuppressive Effekte auf verschiedene Zelltypen durch Stimulationen von β -Rezeptoren mit Hemmung der TNF- α -, IL-1- und zum Teil auch der IL-6-Bildung sind bekannt.^{178,179,180,181} Die APRIL-induzierte IL-6-Produktion durch RA-FLS bleibt wiederum unverändert und verdeutlicht erneut den APRIL-vermittelten antagonisierenden Effekt. (vgl. Abb. 22)

Für Behandlungen mit höheren Konzentrationen an Isoproterenol zeigt sich in der vorliegenden Arbeit dieser Unterschied zwischen OA- und RA-FLS nicht. Insgesamt werden hier höhere IL-6-Konzentrationen beobachtet. Eine weitere Reihe an Arbeiten beschreibt für diverse Zelltypen in Zusammenhang mit Katecholaminen und speziell β -Rezeptor-vermittelt eine IL-6-Induktion.^{182,183,184,185,186} Dies könnte die Beobachtung erklären. Beispielsweise wurde speziell für OA-FLS auf eine Behandlung mit Noradrenalin hin (ab Konzentrationen von 100nmol/l) ein signifikanter Anstieg der IL-6-Sekretion beschrieben.¹⁷⁷ Vermittelt durch β -Rezeptor-Wirkung könnte der APRIL-Effekt bei höheren Ligandenkonzentrationen also zusätzlich verstärkt werden.

4.7 Modulation der APRIL-induzierten IL-6-Produktion in OA- und RA-Synovial-Fibroblasten durch Liganden des Endocannabinoidsystems

Auch für FLS-Behandlungen mit Liganden des Endocannabinoidsystems wurde schon eine Beeinflussung der IL-6-Produktion beobachtet (Lowin; unpublished data), so dass auch dieses Zytokinsystem in Zusammenhang mit APRIL untersucht wurde.

Für AEA-behandelte RA-FLS zeigt sich bei höheren Behandlungskonzentrationen eine signifikante Hemmung der IL-6-Konzentration (vgl. Abb. 23). Dieses Ergebnis passt zu bereits gefundenen Beobachtungen, die auf die Behandlung mit AEA hin eine Reduktion der durch IL-1 induzierten IL-6-Menge um etwa 30% beschreiben (Lowin; unpublished data). Verstärkt tritt dieser Effekt bei gleichzeitiger Behandlung mit einem Inhibitor der FAAH (dem Abbauenzym von AEA¹⁸⁷) auf (vgl. Abb. 24). Dies spricht deutlich dafür, dass der gefundene Effekt auf AEA zurückzuführen ist.

Diese Hemmung zeigt sich trotz gleichzeitiger Behandlung mit dem proinflammatorisch wirkenden Zytokin APRIL. Ein Grund hierfür könnte eine gemeinsame Zielstruktur verschiedener Signalwege sein, die aktiviert werden, wenn entweder APRIL oder AEA an ihre jeweiligen Rezeptoren binden. Es wurde bereits beschrieben, dass APRIL wahrscheinlich über BCMA aktivierend auf NF- κ B und damit positiv auf die IL-6-Bildung wirkt. Bei den Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ handelt es sich um inhibitorische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, mit hemmendem Effekt auf die Adenylatzyklaseaktivität und damit auf die cAMP-Bildung.^{188,189,190} Es gibt eine Reihe an Veröffentlichungen, die einen hemmenden Effekt von cAMP auf NF- κ B beschreiben.^{191,192} Aber schon in frühen Arbeiten, wurde auch ein aktivierender Effekt von cAMP auf NF- κ B beobachtet.¹⁹³ Eine NF- κ B-Aktivierung wiederum führt zu einer gesteigerten IL-6-Genexpression.¹³¹ Für Enterozyten wurde beschrieben, dass verschiedene durch cAMP-aktivierte Transkriptionsfaktoren – unter anderem NF- κ B – zur IL-6-Genregulation beitragen.¹⁹⁴ Es ist also durchaus denkbar, dass die durch AEA-Behandlung verursachte IL-6-Hemmung über einen inhibitorischen Effekt auf NF- κ B vermittelt wird.

In dieser Arbeit wird für OA-FLS ein ähnlicher Effekt beobachtet wie für RA-FLS, auch wenn die IL-6-Hemmung hierbei nicht in gleichem Maß wie für RA-FLS signifikant wird.

AEA wirkt im Wesentlichen äquipotent an CB₁ und CB₂.¹⁹⁵ Bei weiterer Differenzierung zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Hemmung bei OA-FLS signifikant über CB₁-Rezeptoren und bei RA-FLS signifikant via CB₂-Rezeptoren vermittelt wird (vgl. Abb. 25). Zudem lässt sich aus diesem Versuchsansatz indirekt ableiten, dass beide Rezeptortypen in der Peripherie

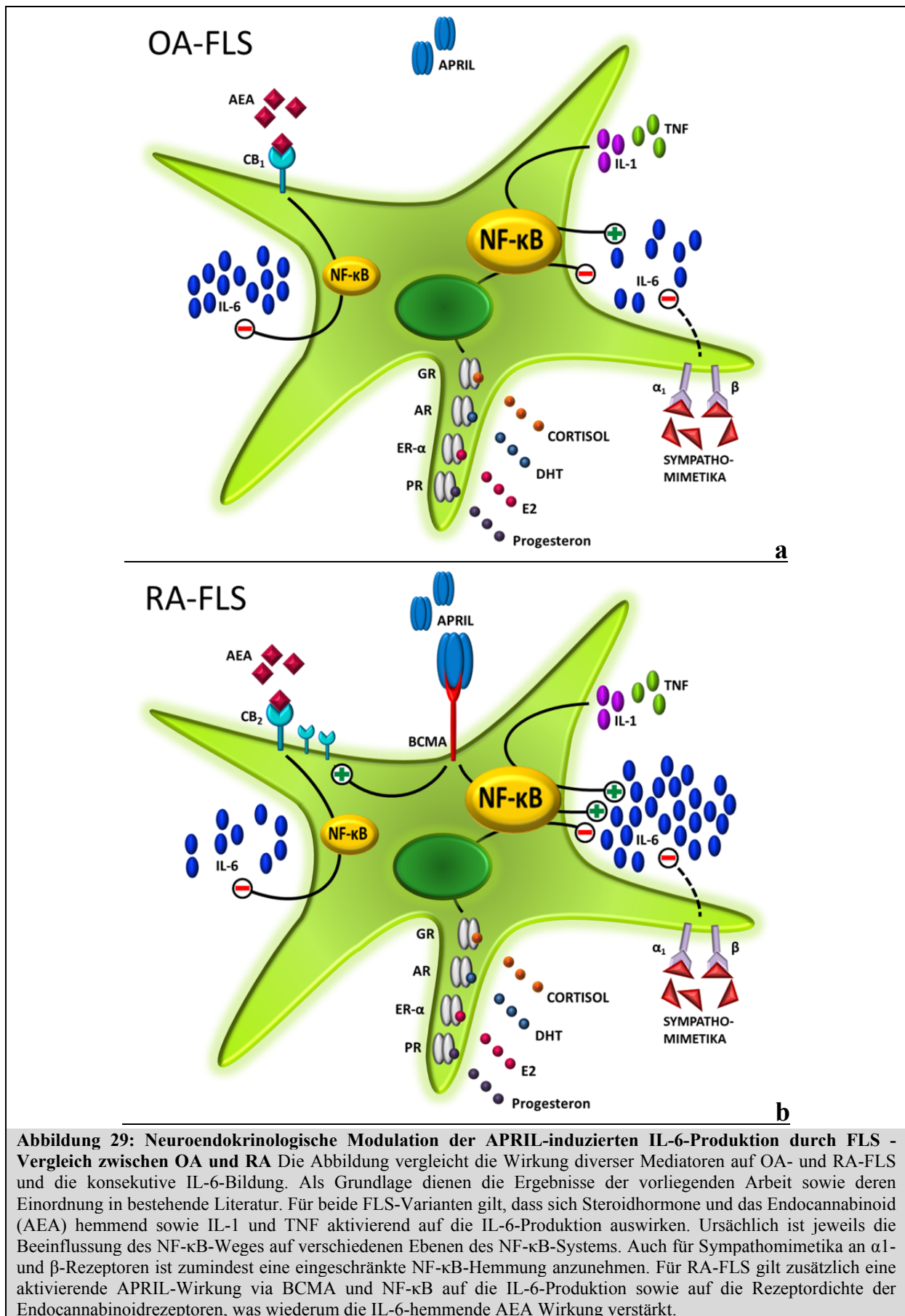
von FLS exprimiert werden. Gleichzeitig betrachtet wurden die Behandlungen mit Cannabinoidrezeptorantagonisten (vgl. Abb. 26). Interessanterweise führen niedrige Behandlungskonzentrationen sowohl mit CB₁- (Rimonabant) als auch mit CB₂- (JTE-907) Rezeptorantagonisten bei RA- und OA-FLS zu signifikant erniedrigter IL-6-Bildung. Auch in der Literatur wurde ein solcher Eigeneffekt bereits beschrieben. In Versuchen mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurde gezeigt, dass Rimonabant (der CB₁-Rezeptorantagonist, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde) die TNF- α -induzierte IL-6-Sekretion via CB₁-Rezeptor cAMP-abhängig hemmt.¹⁹⁶ Ergänzend kann jetzt als Ergebnis dieser Arbeit hinzugefügt werden, dass in FLS durch Rimonabant auch die spontan in Zellkultur gebildete und die APRIL-induzierte IL-6-Sekretion via CB₁-Rezeptor gehemmt wird. JTE-907, als inverser CB₂-Agonist, stimuliert laut Literatur die cAMP-Produktion.¹⁹⁷ Zudem werden JTE-907 antiinflammatorische Effekte zugeschrieben.¹⁹⁷ In Adipozyten wurde – im Gegensatz zu den Ergebnissen mit FLS in dieser Arbeit – durch JTE-907 ein Anstieg inflammatorischer Marker wie beispielsweise IL-6 beschrieben.¹⁹⁸

Dass die hemmenden Effekte auf IL-6 bei höheren Behandlungskonzentrationen mit den CB-Rezeptorantagonisten nicht mehr zu beobachten sind, könnte auf unspezifische Effekte zurückzuführen sein.

Bei Beurteilung der Reaktion auf CB-Antagonisten ist die CB₁-vermittelte IL-6-Hemmung für OA-FLS und die CB₂-vermittelte IL-6 Hemmung für RA-FLS ausgeprägter (vgl. Abb. 26). Dieses Ergebnis passt zu der bereits zuvor gemachten Beobachtung mit den CB-Agonisten (vgl. Abb. 25) und lässt die Schlussfolgerung zu, dass der CB₁-Rezeptor eher in Zusammenhang mit der degenerativen Erkrankung OA und der CB₂-Rezeptor eher in Zusammenhang mit der Autoimmunerkrankung RA stehen könnte. Dabei ist interessant, dass über periphere CB₂-Rezeptoren unter anderem die Knochendichte reguliert wird.¹⁹⁹ Außerdem passt die Beobachtung gut zu dem Wissen, dass CB₂-Rezeptoren speziell von Immunzellen exprimiert werden und dass eine Aktivierung des CB₂-Rezeptors mit einer reduzierten Aktivität der Immunzellen einhergeht. Dies impliziert ebenfalls eine erniedrigte Zytokinfreisetzung.^{200,201,202} Tatsächlich wurden kürzlich auf RA-FLS CB₂-Rezeptoren nachgewiesen und das in höheren Konzentrationen als auf OA-FLS. Deren Aktivierung führte zu einer Reduktion der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (wie IL-6) sowie MMPs.²⁰³ Hierbei zeigte sich zudem, dass proinflammatorische Mediatoren wie TNF und IL-1 die Zahl der CB₂-Rezeptoren auf RA-FLS heraufregulieren.²⁰³ Eine Hypothese, die sich daraus sowie aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt, ist, dass APRIL als

proinflammatorisch wirkender Ligand ebenfalls eine Steigerung von CB₂-Rezeptoren auf RA-FLS bewirkt (entweder direkt oder durch die Induktion weiterer entzündungsfördernder Substanzen) und dadurch eine verstärkte Endocannabinoid-induzierte Hemmung der IL-6-Produktion stattfindet. Dies könnte erklären warum die APRIL-induzierte IL-6-Produktion von RA-FLS durch gleichzeitige Behandlung mit Liganden des Endocannabinoidsystems abfällt und der Endocannabinoideneffekt nicht durch den APRIL-Effekt kompensiert wird (vgl. Abb. 23, 24 und 25).

Aufgrund des beobachteten unterschiedlichen Rezeptorprofils von OA- und RA-FLS wird noch die Rolle eines weiteren Cannabinoids und seines Rezeptors beleuchtet. O-1602 wirkt am atypischen Cannabinoidrezeptor GPR55.²⁰⁴ Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikant gehemmte IL-6-Bildung durch OA-FLS bei niedrigen Behandlungskonzentrationen an O-1602 und eine signifikant gesteigerte IL-6-Bildung durch RA-FLS bei hoher O-1602-Behandlungskonzentration. Sowohl OA- als auch RA-FLS scheinen also GPR55 zu exprimieren, auch wenn dessen Stimulation unterschiedliche Effekte hervorruft. Über die Rolle von GPR55 bei RA ist noch wenig bekannt. Beschrieben wurde allerdings, dass im Tierversuch durch O-1602 via GPR55 die Nozizeption bei akuter Arthritis reduziert werden konnte.²⁰⁵ Für den Einsatz von O-1602 im Tierversuch mit akuter Pankreatitis wurde ein antiinflammatorischer Effekt mit erniedrigten IL-6-Spiegeln gezeigt.²⁰⁶ Außerdem ist zu erwähnen, dass in Bezug auf andere Autoimmunerkrankungen (CED) auch schon protektive GPR55-unabhängige Effekte durch O-1602 beschrieben wurden.²⁰⁷



4.8 Grenzen der Arbeit und Ausblick

Um die Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit für weitere experimentelle und klinische Forschung zu beurteilen, sollen diese im Kontext beleuchtet werden. Zum einen handelt es sich bei dem zum Einsatz kommenden Gewebe um FLS aus ersatzbedürftigen Kniegelenken und damit um Zellen fortgeschrittener RA. Eventuelle zusätzliche Faktoren, Zytokine oder Interaktionen, die bei FLS in frühen Erkrankungsstadien oder der Krankheitsentwicklung eine Rolle spielen, könnten unberücksichtigt bleiben. Zum zweiten sind in der Synovialmembran der RA – genau wie die Fibroblasten-artigen Typ-B-Synoviozyten – auch die Makrophagen-ähnlichen Typ-A-Synoviozyten proliferiert.¹²¹ In dieser Arbeit werden jedoch nur die FLS analysiert. Die Auswirkungen von Typ-A-Synoviozyten auf FLS werden jedoch insofern berücksichtigt, dass Typ-B-Synoviozyten mit in erster Linie durch Typ-A-Synoviozyten gebildeten Zytokinen (wie IL-1 β und TNF)^{208,209} versetzt werden. Zuletzt soll noch eine weitere Besonderheit in der RA-Pathogenese angesprochen werden. Vor allem in jüngerer Forschung zeigten sich in der Ätiologie Unterschiede zwischen seropositiver und -negativer, bzw. anti-CCP-positiver und anti-CCP-negativer RA in Bezug auf verschiedene genetische Faktoren und Umweltfaktoren.³ Auch wurde bei Männern aktuell über niedrige Testosteronspiegel als prädiktiven Faktor speziell für RF-negative RA berichtet.¹⁰⁴ Eine Differenzierung in dieser Arbeit zwischen seropositiver und seronegativer rheumatoider Arthritis ist nicht möglich, könnte jedoch von Interesse sein, zumal jüngst beschrieben wurde, dass die APRIL-Serumspiegel seropositiver RA-Patienten signifikant höher als die von seronegativen RA-Patienten sind.²¹⁰

Da eine kausale Therapie der rheumatoiden Arthritis bisher nicht möglich ist, zielt die Forschung bezüglich RA-Therapien in erster Linie Richtung Entwicklung und Verbesserung von Biologika. Dabei stellen Zytokine, die eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der RA spielen, die Zielstrukturen dar. Beispiele hierfür sind Interleukine (IL-1, IL-6) sowie Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie (TNF, RANK-L). Auch APRIL stellt – was nicht zuletzt die Resultate dieser Arbeit zeigen – ein interessantes therapeutisches Ziel dar. Biologisch nicht zu vernachlässigende Phase-II-Studienergebnisse zu Atacicept wurden bereits veröffentlicht. Klinisch relevante Erfolge zeigten diese Studien jedoch nicht^{94,95,96}, so dass weitere dementsprechende Forschung zum APRIL-System auch auf Zellebene nötig ist. Diesbezüglich wichtig sein könnten auch die Ergebnisse dieser Arbeit, in denen sich eine lokale Wirkung durch APRIL auf RA-FLS zeigt und sich verschiedene Interaktionen zwischen APRIL und anderen zur RA-Pathogenese beitragenden Faktoren andeuten.

5 Zusammenfassung

Vgl. hierzu auch Abb. 28 und 29.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass APRIL die IL-6-Produktion in FLS von Patienten mit RA induziert. Damit kann die Hauptthese, die einen proinflammatorischen Effekt von APRIL auf RA-FLS impliziert, bestätigt werden. Zwar zeigte sich APRIL verglichen mit TNF und IL-1 β als schwächerer IL-6-Inducer, war jedoch in physiologischen Konzentrationen wirksam. Bemerkenswerterweise war APRIL im Gegensatz zu anderen Zytokinen eindeutig selektiv für RA. Zukünftige Forschungsansätze könnten hierbei die konkrete Rezeptoranalyse auf RA-FLS in Verbindung mit der Differenzierung der durch APRIL-Bindung aktivierten Signalkaskade sein. Die Beobachtungen dieser Arbeit für APRIL und auch BAFF – gemeinsam mit bestehender Literatur – lassen vermuten, dass eine BCMA-abhängige NF- κ B-Aktivierung zugrunde liegt. Insgesamt kann aufgrund der Ergebnisse von einer pathogenetischen Beteiligung von APRIL bei RA ausgegangen werden. Somit rücken die Interaktionen von APRIL mit weiteren zur Pathogenese der RA beitragenden Faktoren in den Fokus.

Dabei hilft der Vergleich mit nicht auf APRIL reagierenden Osteoarthrosezellen. Es zeigt sich, dass APRIL und Cortisol bei gleichzeitigem Einsatz entgegengesetzte Effekte auf die IL-6-Produktion durch RA-FLS haben. Die Analyse der IL-6-Reaktion auf Kombinationen aus Sexualhormonen und APRIL lässt ebenfalls gleichzeitig auftretende gegensinnige Wirkungen vermuten. Auch ein immunsuppressiver alpha1- und betamimetisch vermittelter Effekt könnte durch APRIL antagonisiert werden. Außerdem zeigen sich Liganden des Endocannabinoidsystems in der Lage APRIL induzierte IL-6-Produktion signifikant zu hemmen, wahrscheinlich da APRIL Rezeptoren für diese Liganden induziert.

Zusätzlich können einige Unterschiede im Hormon- und Endocannabinoidrezeptorprofil von OA- und RA-FLS aus den Ergebnissen dieser Arbeit indirekt abgeleitet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Schneider M, Lelgemann M, Abholz H, Blumenroth M, Flügge C, Gerken M, Jäniche H, Kunz R, Krüger K, Mau W, Specker C, Zellner M: Interdisziplinäre Leitlinie Management der frühen rheumatoiden Arthritis. [Www.dgrh.de/leitlinien.html](http://www.dgrh.de/leitlinien.html). Berlin, Heidelberg, New York, NY, SpringerMedizin, 2011.
2. Symmons DPM: Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002, 16:707–722.
3. Klareskog L, Catrina AI, Paget S: Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009, 373:659–672.
4. Kriterien zur Diagnose und Klassifikation Rheumatischer Erkrankungen http://dgrh.de/fileadmin/media/Praxis_Klinik/Therapie-Empfehlungen/61798_kriterien_zur_diagnose_und_klassifikation_rheumatischer_erkrankungen.pdf. Accessed 24 February 2013.
5. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G: 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010, 62:2569–2581.
6. Klareskog L, Forsum U, Scheynius A, Kabelitz D, Wigzell H: Evidence in support of a self-perpetuating HLA-DR-dependent delayed-type cell reaction in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982, 79:3632–3636.
7. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoeerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SP, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK: A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2004, 75:330–337.
8. Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH: Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J. Immunol.* 2007, 179:4704–4710.
9. McInnes IB, Schett G: Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7:429–442.
10. Feldmann M: Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2:364–371.
11. Schett G: Erosive arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2007, 9 Suppl 1:S2.
12. S1-Leitlinie: Medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis - http://dgrh.de/fileadmin/media/Praxis_Klinik/Leitlinien/2012/leitlinie_s1_medikamentoese_therapie_ra.pdf. Accessed 24 February 2013.
13. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K: Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.* 2000, 63:17–31.
14. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S: Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000, 2:361–367.
15. Firestein GS: Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.* 1996, 39:1781–1790.
16. Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K, Maciag T, Wilder RL: Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J. Cell Biol.* 1990, 110:1417–1426.
17. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T: Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995, 372:83–87.

18. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA, Kipps TJ: Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 2005, 174:864–870.
19. Nagatani K, Itoh K, Nakajima K, Kuroki H, Katsuragawa Y, Mochizuki M, Aotsuka S, Mimori A: Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and are stimulated by APRIL. *Arthritis Rheum* 2007, 56:3554–3563.
20. Yoshizaki K, Nakagawa T, Fukunaga K, Tseng LT, Yamamura Y, Kishimoto T: Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *J. Immunol.* 1984, 132:2948–2954.
21. Wolvekamp MC, Marquet RL: Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol. Lett.* 1990, 24:1–9.
22. Nishimoto N, Kishimoto T: Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006, 2:619–626.
23. Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F: Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 1993, 13:45–51.
24. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA: Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* 1993, 52:232–234.
25. Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M: IL-6 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2005, 34:109–113.
26. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104:487–501.
27. Hehlhans T, Pfeffer K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005, 115:1–20.
28. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994, 76:959–962.
29. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:4961–4965.
30. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G: The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, 14:193–209.
31. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D: Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16:35–53.
32. Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J: APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* 1998, 188:1185–1190.
33. Mackay F, Silveira PA, Brink R: B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 2007, 19:327–336.
34. Liu Y, Hong X, Kappler J, Jiang L, Zhang R, Xu L, Pan C, Martin WE, Murphy RC, Shu H, Dai S, Zhang G: Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature* 2003, 423:49–56.
35. López-Fraga M, Fernández R, Albar JP, Hahne M: Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep.* 2001, 2:945–951.
36. Kolfshoten GM, Pradet-Balade B, Hahne M, Medema JP: TWE-PRIL; a fusion protein of TWEAK and APRIL. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 66:1427–1432.
37. Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ: An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:235–246.
38. Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V, Stohl W, Baker KP, Ullrich S, Nardelli B, Hilbert DM, Migone T: BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J. Immunol.* 2002, 169:4314–4321.
39. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J: BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu. Rev. Immunol.* 2003, 21:231–264.

40. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA: Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol. Lett.* 2008, 116:1–6.
41. Mackay F, Schneider P: Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009, 9:491–502.
42. Alsaleh G, Messer L, Semaan N, Boulanger N, Gottenberg J, Sibilia J, Wachsmann D: BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. *Arthritis Rheum.* 2007, 56:3202–3214.
43. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg J, Sellam J, Eid P, Lebon P, Pallier C, Lepajolec C, Mariette X: Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 2008, 38:1058–1064.
44. Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, Donze O, Frossard C, Chizzolini C, Favre C, Zubler R, Guyot JP, Schneider P, Roosnek E: APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J. Clin. Invest.* 2008, 118:2887–2895.
45. Kato A, Truong-Tran AQ, Scott AL, Matsumoto K, Schleimer RP: Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2006, 177:7164–7172.
46. Langat DL, Wheaton DA, Platt JS, Sifers T, Hunt JS: Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am. J. Pathol.* 2008, 172:1303–1311.
47. Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, Darivianaki K, Sanidas E, Tsiftsis DD, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E: Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC Cancer* 2008, 8:76.
48. Abe M, Kido S, Hiasa M, Nakano A, Oda A, Amou H, Matsumoto T: BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2006, 20:1313–1315.
49. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu C, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E: BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J. Exp. Med.* 2005, 201:195–200.
50. Thangarajh M, Masterman T, Hillert J, Moerk S, Jonsson R: A proliferation-inducing ligand (APRIL) is expressed by astrocytes and is increased in multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.* 2007, 65:92–98.
51. Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner Q, Cachero TG, Qiang F, Gorelik L, Kalled SL, Acha-Orbea H, Rennert PD, Tschopp J, Schneider P: Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J. Exp. Med.* 2005, 201:1375–1383.
52. Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A: Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr. Biol.* 2000, 10:785–788.
53. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF: Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J. Immunol.* 2007, 179:7276–7286.
54. Pradet-Balade B, Medema JP, López-Fraga M, Lozano JC, Kolfshoten GM, Picard A, Martínez-A C, Garcia-Sanz JA, Hahne M: An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *EMBO J.* 2002, 21:5711–5720.
55. Bischof D, Elswa SF, Mantchev G, Yoon J, Michels GE, Nilson A, Sutor SL, Platt JL, Ansell SM, Bulow G von, Bram RJ: Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* 2006, 107:3235–3242.
56. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ: Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1992, 8:365–393.

57. Kimberley FC, van Bostelen L, Cameron K, Hardenberg G, Marquart JA, Hahne M, Medema JP: The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. *FASEB J.* 2009, 23:1584–1595.
58. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, Scott ML, Maquelin A, Belnoue E, Siegrist C, Chevrier S, Acha-Orbea H, Leung H, Mackay F, Tschopp J, Schneider P: TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* 2008, 111:1004–1012.
59. Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF: A role for BLYS in the activation of innate immune cells. *Blood* 2006, 108:2687–2694.
60. Chang SK, Mihalcik SA, Jelinek DF: B lymphocyte stimulator regulates adaptive immune responses by directly promoting dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 2008, 180:7394–7403.
61. Ye H, Wu H: Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97:8961–8966.
62. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M: Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* 1999, 13:1297–1308.
63. Ng LG, Sutherland APR, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Groom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalled SL, Mackay F, Mackay CR: B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J. Immunol.* 2004, 173:807–817.
64. Mantchev GT, Cortesão CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ: TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J. Immunol.* 2007, 179:2282–2288.
65. Bülow GU von, van Deursen JM, Bram RJ: Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 2001, 14:573–582.
66. Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, Tumas D, Grewal IS, Dixit VM: Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat. Immunol.* 2001, 2:638–643.
67. Mackay F, Schneider P: TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008, 19:263–276.
68. Xu L, Shu H: TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. *J. Immunol.* 2002, 169:6883–6889.
69. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun S: Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J. Biol. Chem.* 2004, 279:26243–26250.
70. Gardam S, Sierro F, Basten A, Mackay F, Brink R: TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity* 2008, 28:391–401.
71. Asano J, Nakano A, Oda A, Amou H, Hiasa M, Takeuchi K, Miki H, Nakamura S, Harada T, Fujii S, Kagawa K, Endo I, Yata K, Sakai A, Ozaki S, Matsumoto T, Abe M: The serine/threonine kinase Pim-2 is a novel anti-apoptotic mediator in myeloma cells. *Leukemia* 2011, 25:1182–1188.
72. Coquery CM, Erickson LD: Regulatory roles of the tumor necrosis factor receptor BCMA. *Crit. Rev. Immunol.* 2012, 32:287–305.
73. Matsuzawa A, Tseng P, Vallabhapurapu S, Luo J, Zhang W, Wang H, Vignali DAA, Gallagher E, Karin M: Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* 2008, 321:663–668.
74. Mackay F, Leung H: The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin. Immunol.* 2006, 18:284–289.
75. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML: An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001, 293:2111–2114.

76. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C: BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001, 293:2108–2111.
77. Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam K, Noelle RJ: Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol.* 2008, 180:3655–3659.
78. Day ES, Cachero TG, Qian F, Sun Y, Wen D, Pelletier M, Hsu Y, Whitty A: Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 2005, 44:1919–1931.
79. Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, Rogier E, Madry C, Inoue J, Devergne O, Tsapis A: TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* 2000, 165:1322–1330.
80. Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT: B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J. Immunol.* 2005, 175:2814–2824.
81. Madry C, Laabi Y, Callebaut I, Roussel J, Hatzoglou A, Le Coniat M, Mornon JP, Berger R, Tsapis A: The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Int. Immunol.* 1998, 10:1693–1702.
82. Smirnova AS, Andrade-Oliveira V, Gerbase-DeLima M: Identification of new splice variants of the genes BAFF and BCMA. *Mol. Immunol.* 2008, 45:1179–1183.
83. Hatzoglou A, Deshayes F, Madry C, Laprée G, Castanas E, Tsapis A: Natural antisense RNA inhibits the expression of BCMA, a tumour necrosis factor receptor homologue. *BMC Mol. Biol.* 2002, 3:4.
84. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J: BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J. Exp. Med.* 1999, 189:1747–1756.
85. Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossman A, Haugen H, Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH: TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 2000, 404:995–999.
86. Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcón GS, Fessler BJ, Bastian H, Kimberly RP, Zhou T: Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2001, 166:6–10.
87. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, Tschopp J, Cachero TG, Batten M, Wheway J, Mauri D, Cavill D, Gordon TP, Mackay CR, Mackay F: Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 2002, 109:59–68.
88. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W: Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2001, 44:1313–1319.
89. Thangarajh M, Kisiswa L, Pirskanen R, Hillert J: The expression of BAFF-binding receptors is not altered in multiple sclerosis or myasthenia gravis. *Scand. J. Immunol.* 2007, 65:461–466.
90. Dillon SR, Harder B, Lewis KB, Moore MD, Liu H, Bukowski TR, Hamacher NB, Lantry MM, Maurer M, Krejsa CM, Ellsworth JL, Pederson S, Elkon KB, Wener MH, Dall'Era M, Gross JA: B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin. *Arthritis Res Ther* 2010, 12:R48.
91. Ramanujam M, Wang X, Huang W, Liu Z, Schiffer L, Tao H, Frank D, Rice J, Diamond B, Yu KOA, Porcelli S, Davidson A: Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J. Clin. Invest.* 2006, 116:724–734.
92. Redakteur: Einleitung. <http://dgrh.de/8907.html>. Accessed 15 February 2013.

93. IQWiG – Belimumab bei Lupus: Zusatznutzen ist nicht belegt, 2012. <https://www.iqwig.de/index.1450.html>. Accessed 15 February 2013.
94. Engel P, Gómez-Puerta JA, Ramos-Casals M, Lozano F, Bosch X: Therapeutic targeting of B cells for rheumatic autoimmune diseases. *Pharmacol. Rev.* 2011, 63:127–156.
95. Genovese MC, Kinnman N, La Bourdonnaye G de, Pena Rossi C, Tak PP: Atacept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to tumor necrosis factor antagonist therapy: results of a phase II, randomized, placebo-controlled, dose-finding trial. *Arthritis Rheum.* 2011, 63:1793–1803.
96. van Vollenhoven RF, Kinnman N, Vincent E, Wax S, Bathon J: Atacept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase II, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2011, 63:1782–1792.
97. Chikanza IC: Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology* 2004, 43:1337–1345.
98. Jessop DS: A defect in cortisol production in rheumatoid arthritis: why are we still looking? *Rheumatology* 2005, 44:1097–1100.
99. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Secchi ME, Soldano S, Seriola B, Straub RH, Otsa K, Maestroni GJ: Circadian rhythms: glucocorticoids and arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, 1069:289–299.
100. Gerabek W: *Enzyklopädie Medizingeschichte*. Berlin, New York, Walter de Gruyter, 2005.
101. Farage MA, Miller KW, Maibach HI: Effects of menopause on autoimmune diseases. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2012, 7:557–571.
102. Weidler C, Härle P, Schedel J, Schmidt M, Schölmerich J, Straub RH: Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. *J. Rheumatol.* 2004, 31:489–494.
103. Cutolo M: Estrogen metabolites: increasing evidence for their role in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2004, 31:419–421.
104. Pikwer M, Giwercman A, Bergström U, Nilsson J, Jacobsson LTH, Turesson C: Association between testosterone levels and risk of future rheumatoid arthritis in men: a population-based case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* 2013.
105. Xu J, Itoh Y, Hayashi H, Takii T, Miyazawa K, Onozaki K: Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1 α or tumor necrosis factor α -induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor- κ B activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biol. Pharm. Bull.* 2011, 34:1724–1730.
106. Straub RH: The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews* 2007, 28:521–574.
107. Yamaguchi A, Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I, Takasaki Y: Estrogen inhibits apoptosis and promotes CC motif chemokine ligand 13 expression on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012, 34:852–857.
108. Sakaguchi S, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Sakaguchi N. *Arthritis Res Ther* 2003, 5:10.
109. Inoue K, Inoue E, Imai Y: Female sex hormones ameliorate arthritis in SKG mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013.
110. Pongratz G, Straub RH: Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012, 9:117–126.
111. Straub RH, Härle P: Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2005, 31:43-59, viii.
112. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES: The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52:595–638.
113. Greineisen WE, Turner H: Immunoactive effects of cannabinoids: Considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. *International Immunopharmacology* 2010, 10:547–555.
114. Alger BE, Kim J: Supply and demand for endocannabinoids. *Trends in Neurosciences* 2011, 34:304–315.

115. Tanasescu R, Constantinescu CS: Cannabinoids and the immune system: An overview. *Immunobiology* 2010, 215:588–597.
116. Richardson D, Pearson RG, Kurian N, Latif ML, Garle MJ, Barrett DA, Kendall DA, Scammell BE, Reeve AJ, Chapman V: Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10:R43.
117. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF: Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007, 2:1269–1275.
118. Kinsey SG, Naidu PS, Cravatt BF, Dudley DT, Lichtman AH: Fatty acid amide hydrolase blockade attenuates the development of collagen-induced arthritis and related thermal hyperalgesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011, 99:718–725.
119. Blake DR, Robson P, Ho M, Jubb RW, McCabe CS: Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006, 45:50–52.
120. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H: Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1. *Am. J. Pathol.* 1998, 152:793–803.
121. Bartok B, Firestein GS: Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 2010, 233:233–255.
122. Kokebie R, Aggarwal R, Lidder S, Hakimiyan AA, Rueger DC, Block JA, Chubinskaya S: The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis Res Ther* 2011, 13:R50.
123. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK: Aging and proinflammatory cytokines. *Curr. Opin. Hematol.* 2001, 8:131–136.
124. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP: Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci.* 1992, 51:1953–1956.
125. Miyazawa K, Mori A, Okudaira H: Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by glucocorticoids. *J. Biochem.* 1998, 124:1130–1137.
126. Castellana B, Marín-Juez R, Planas JV: Transcriptional regulation of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) interleukin-6 gene promoter. *Fish Shellfish Immunol.* 2013.
127. Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, Okawa-Takatsuji M, Fujii T, Kuroki H, Katsuragawa Y, Aotsuka S, Mimori A: Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rehabil Med* 2007, 36:365–372.
128. Perry MG, Jessop DS, Hunt LP, Sharif M, Kirwan JR: Overnight variations in IL-6 in synovial fluid and plasma in patients with active rheumatoid arthritis. *International Journal of Clinical Rheumatology* 2010, 5:593–600.
129. Moura RA, Canhao H, Polido-Pereira J, Rodrigues AM, Navalho M, Mourao AF, Resende C, Campanilho-Marques R, Madruga Dias J, da Silva JAP, Graca L, Fonseca JE: BAFF and TACI Gene Expression Are Increased in Patients with Untreated Very Early Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2013, 40:1293–1302.
130. Asahara H, Asanuma M, Ogawa N, Nishibayashi S, Inoue H: High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995, 37:827–832.
131. Libermann TA, Baltimore D: Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10:2327–2334.
132. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS: Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol. Med.* 2007, 135:365–375.
133. Yoshida S, Katoh T, Tetsuka T, Uno K, Matsui N, Okamoto T: Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. *J. Immunol.* 1999, 163:351–358.
134. Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM: Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J. Immunol.* 2000, 165:7199–7206.

135. Choi HM, Oh DH, Bang JS, Yang H, Yoo MC, Kim KS: Differential effect of IL-1 β and TNF- α on the production of IL-6, IL-8 and PGE2 in fibroblast-like synoviocytes and THP-1 macrophages. *Rheumatol Int* 2010, 30:1025–1033.
136. Kay J: The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004, 43:iii2.
137. MCNEARNEY T, BAETHGE BA, CAO S, ALAM R, LISSE JR, WESTLUND KN: Excitatory amino acids, TNF-alpha , and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies. *Clin Exp Immunol* 2004, 137:621–627.
138. Sacerdote P, Carrabba M, Galante A, Pisati R, Manfredi B, Panerai AE: Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. *Inflamm. Res.* 1995, 44:486–490.
139. Rooney M, Symons JA, Duff GW: Interleukin 1 beta in synovial fluid is related to local disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 1990, 10:217–219.
140. Lee Y, Choi HM, Lee S, Yang H, Yoo MC, Hong S, Kim KS: Synergy between adiponectin and interleukin-1 β on the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. *Exp Mol Med* 2012, 44:440.
141. Amling M, Greten H, Greten T, Rinninger F: *Innere Medizin. 395 Tabellen.* Stuttgart [u.a.], Thieme, 2010.
142. Karin M: New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998, 93:487–490.
143. Ito K, Chung KF, Adcock IM: Update on glucocorticoid action and resistance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 117:522–543.
144. Tak PP, Gerlag DM, Aupperle KR, van de Geest DA, Overbeek M, Bennett BL, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS: Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum.* 2001, 44:1897–1907.
145. Gold R, Buttgereit F, Toyka KV: Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J. Neuroimmunol.* 2001, 117:1–8.
146. Cato ACB, Wade E: Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 1996, 18:371–378.
147. Kino T, Charmandari E, Chrousos GP: Glucocorticoid receptor: implications for rheumatic diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2011, 29:S32-41.
148. Bamberger CM, Bamberger AM, Castro M de, Chrousos GP: Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.* 1995, 95:2435–2441.
149. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, Kloet ER de, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD: A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2001, 28:2383–2388.
150. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester G, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 2004, 18:70–80.
151. Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. *Immunobiology* 2010, 215:521–526.
152. Marchetti PM, Barth JH: Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Ann. Clin. Biochem.* 2013, 50:95–107.
153. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD: Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 1990, 126:1165–1172.
154. Harris MG, Coleman SG, Faulds D, Chrisp P: Nilutamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in prostate cancer. *Drugs Aging* 1993, 3:9–25.

155. CUTOLO M, SULLI A, VILLAGGIO B, SERIOLO B, ACCARDO S: Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1998, 57:573–577.
156. Dalal M, Kim S, Voskuhl RR: Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J. Immunol.* 1997, 159:3–6.
157. Giltay EJ, Fonk JC, Blomberg BM von, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ: In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85:1648–1657.
158. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC: Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J. Clin. Invest.* 1995, 95:2886–2895.
159. Rovensky J, Kvetnansky R, Radikova Z, Imrich R, Greguska O, Vigas M, Macho L: Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2005, 23:292–296.
160. Castagnetta L, CUTOLO M, Granata OM, Di Falco M, Bellavia V, Carruba G: Endocrine endpoints in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999, 876:180-91; discussion 191-2.
161. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, Cutolo M, Straub RH: Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2003, 30:2597–2605.
162. Purohit A, Ghilchik MW, Duncan L, Wang DY, Singh A, Walker MM, Reed MJ: Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995, 80:3052–3058.
163. Le Bail J, Liagre B, Vergne P, Bertin P, Beneytout J, Habrioux G: Aromatase in synovial cells from postmenopausal women. *Steroids* 2001, 66:749–757.
164. CUTOLO M, SULLI A, Capellino S, VILLAGGIO B, Montagna P, SERIOLO B, Straub RH: Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004, 13:635–638.
165. Galien R, Garcia T: Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25:2424–2429.
166. Kurebayashi S, Miyashita Y, Hirose T, Kasayama S, Akira S, Kishimoto T: Characterization of mechanisms of interleukin-6 gene repression by estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997, 60:11–17.
167. Stein B, Yang MX: Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15:4971–4979.
168. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK: The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. *Endocrinology* 2000, 141:3403–3411.
169. Dechering K, Boersma C, Mosselman S: Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr. Med. Chem.* 2000, 7:561–576.
170. Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Nieva DR, Handa RJ, Price RH, Kirschmann DA, Baragi VM, Sharma RV, Bhalla RC, Moore TL, Hendrix MJ: Estrogen and progesterone regulation of human fibroblast-like synoviocyte function in vitro: implications in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2000, 27:1622–1631.
171. Liu H, Liu K, Bodenner DL: Estrogen receptor inhibits interleukin-6 gene expression by disruption of nuclear factor kappaB transactivation. *Cytokine* 2005, 31:251–257.
172. Straub RH, Buttgerit F, CUTOLO M: Benefit of pregnancy in inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64:801–803.
173. Tchórzewski H, Krasomski G, Biesiada L, Głowacka E, Banasik M, Lewkowicz P: IL-12, IL-6 and IFN-gamma production by lymphocytes of pregnant women with rheumatoid arthritis remission during pregnancy. *Mediators Inflamm.* 2000, 9:289–293.
174. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, van der Saag PT: Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid

- receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 1995, 9:401–412.
175. Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J: Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol. Lett.* 2009, 125:151–155.
 176. Chen G, Shi J, Jin W, Wang L, Xie W, Sun J, Hang C: Progesterone administration modulates TLRs/NF-kappaB signaling pathway in rat brain after cortical contusion. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2008, 38:65–74.
 177. Raap T, Jüsten HP, Miller LE, CUTOLO M, Schölmerich J, Straub RH: Neurotransmitter modulation of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 secretion of synovial fibroblasts in patients with rheumatoid arthritis compared to osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 2000, 27:2558–2565.
 178. Hetier E, Ayala J, Bousseau A, Prochiantz A: Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by beta-adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp Brain Res* 1991, 86:407–413.
 179. Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY: Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J. Immunol.* 1992, 148:3441–3445.
 180. Nakamura A, Johns EJ, Imaizumi A, Abe T, Kohsaka T: Regulation of tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by beta2-adrenoceptor in the rat astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 1998, 88:144–153.
 181. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF: Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 1996, 97:713–719.
 182. Maimone D, Cioni C, Rosa S, Macchia G, Aloisi F, Annunziata P: Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. *J. Neuroimmunol.* 1993, 47:73–81.
 183. Norris JG, Benveniste EN: Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J. Neuroimmunol.* 1993, 45:137–145.
 184. Patay B von, Kurz B, Mentlein R: Effect of transmitters and co-transmitters of the sympathetic nervous system on interleukin-6 synthesis in thymic epithelial cells. *Neuroimmunomodulation* 1999, 6:45–50.
 185. Burýsek L, Houstek J: beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett.* 1997, 411:83–86.
 186. Bürger A, Benicke M, Deten A, Zimmer HG: Catecholamines stimulate interleukin-6 synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, 281:H14-21.
 187. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH: Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98:9371–9376.
 188. Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL: Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.* 1986, 29:307–313.
 189. Pacheco MA, Ward SJ, Childers SR: Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells. *Brain Res.* 1993, 603:102–110.
 190. Mackie K: Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 46:101–122.
 191. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WWA, Reth M, Brummer T: Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35:31–41.
 192. Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T: Inhibition of the NF-κB transcriptional activity by protein kinase A. *European Journal of Biochemistry* 2002, 269:4559–4565.
 193. Serkkola E, Hurme M: Activation of NF-kappa B by cAMP in human myeloid cells. *FEBS Lett.* 1993, 334:327–330.
 194. Hershko DD, Robb BW, Luo G, Hasselgren P: Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002, 283:R1140-8.

195. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL: Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* 1995, 48:443–450.
196. Huang N, Juang J, Wang Y, Hsueh C, Liang Y, Lin J, Tsai C, Lai L: Rimonabant inhibits TNF- α -induced endothelial IL-6 secretion via CB1 receptor and cAMP-dependent protein kinase pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2010, 31:1447–1453.
197. Iwamura H, Suzuki H, Ueda Y, Kaya T, Inaba T: In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 296:420–425.
198. González-Muniesa P, Bing C, Trayhurn P: Upregulation of the Expression of Inflammatory and Angiogenic Markers in Human Adipocytes by a Synthetic Cannabinoid, JTE-907. *Horm Metab Res* 2010, 42:710–717.
199. Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I: Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103:696–701.
200. Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H: The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000, 225:1–8.
201. Croxford JL, Yamamura T: Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J. Neuroimmunol.* 2005, 166:3–18.
202. Massi P, Vaccani A, Parolaro D: Cannabinoids, immune system and cytokine network. *Curr. Pharm. Des.* 2006, 12:3135–3146.
203. Gui H, Liu X, Wang Z, He D, Su D, Dai S: Expression of cannabinoid receptor 2 and its inhibitory effects on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2014, 53:802–809.
204. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue T, Brown AJ, Morrison AD, Douglas SA: The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br. J. Pharmacol.* 2007, 152:825–831.
205. Schuelert N, McDougall JJ: The abnormal cannabidiol analogue O-1602 reduces nociception in a rat model of acute arthritis via the putative cannabinoid receptor GPR55. *Neurosci. Lett.* 2011, 500:72–76.
206. Li K, Feng J, Li Y, Yuece B, Lin X, Yu L, Li Y, Feng Y, Storr M: Anti-Inflammatory Role of Cannabidiol and O-1602 in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas* 2013, 42:123–129.
207. Schicho R, Bashashati M, Bawa M, McHugh D, Saur D, Hu H, Zimmer A, Lutz B, Mackie K, Bradshaw HB, McCafferty D, Sharkey KA, Storr M: The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011, 17:1651–1664.
208. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R, Alvaro-Garcia JM: Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 1990, 144:3347–3353.
209. Arend WP, Dayer JM: Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990, 33:305–315.
210. Zhao J, Guo J, Wang L, Zhou W, Zhang Z: The role of a proliferation-inducing ligand (APRIL) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2014:1–8.

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

8 Danksagung

Insbesondere danke ich meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. Georg Pongratz für die interessante Themenstellung und die durchgehend hervorragende, sehr kompetente und nette Betreuung.

Ebenfalls für die tolle Betreuung vor Ort danke ich Herrn Dr. Torsten Lowin, der mir insbesondere in der Phase der Laborarbeit mit guten Ideen, Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlichen Dank verdient das gesamte Laborteam und insbesondere Frau Madlen Melzer für viel Geduld und die stets freundliche und tatkräftige Unterstützung. Auch wegen euch bin ich immer sehr gerne ins Labor gegangen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben indem sie mich in allen erdenklichen Belangen unterstützt und durch jede Lebenssituation begleitet haben. Meinem Freund danke ich für seinen großen Beistand und seine viele Geduld.
