

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von Cortisol, Anandamid, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β auf die IFN- γ -abhängige
Aktivierung von STAT1, STAT3, p38 und ERK in synovialen Fibroblasten bei Rheumatoider
Arthritis

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Hanna Müller

2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von Cortisol, Anandamid, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β auf die IFN- γ -abhängige
Aktivierung von STAT1, STAT3, p38 und ERK in synovialen Fibroblasten bei Rheumatoider
Arthritis

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Hanna Müller

2019

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Juni 2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Rheumatoide Arthritis (RA)	9
1.1. Pathogenese	9
1.2. Etablierte Therapiekonzepte	10
2. Interferon gamma (IFN-γ)	11
2.1. Die Rolle bei RA	11
2.2. Der IFN- γ -Signalweg	14
3. Entzündungsmodulierende Substanzen bei RA	14
3.1. Capsaicin	14
3.2. Anandamid	15
4. Ziel der Arbeit	16
5. Material und Methoden	17
5.1. Gewinnung von Synovialen Fibroblasten (SF) aus Synovialgewebe	17
5.2. Zellkultur	17
5.3. Zellstimulation und Gewinnung von Zelllysat	17
5.4. Bradford Assay	18
5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	18
5.6. Western Blot	19
5.7. Auswertung der Ergebnisse	20
5.8. Geräte	20
5.9. Verbrauchsmaterialien	21
5.10 Chemikalien und Zusammensetzung von Standardlösungen	22

6. Ergebnisse	30
6.1. Aktivierung der Signalmoleküle STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 in OASF und RASF durch IFN- γ	30
6.2. Aktivierung der Signalmoleküle STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 in OASF und RASF durch IL-1 β	32
6.3. Modulation der IFN- γ -induzierten Kurzzeitaktivierung von STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 durch Cortisol, AEA, Capsaicin und Nimesulid	34
6.4. Modulation der IFN- γ -induzierten Aktivierung von STAT1, STAT3, ERK1/2 über 48 h durch Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β	37
6.5. Modulation der IFN- γ -abhängigen Kurzzeitaktivierung von STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 durch IL-1 β	41
6.6. Veränderung der Menge von unphosphoryliertem STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 durch IFN- γ über 48 h und zusätzlicher Einfluss von Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β	44
7. Diskussion	47
8. Zusammenfassung und Ausblick	56
9. Literaturverzeichnis	57
10. Lebenslauf	65
11. Erklärung	66
12. Danksagung	67

Abkürzungsverzeichnis

ACPA: Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine
AEA: Anandamid
BAFF: B cell activating factor
CB1: Cannabinoidrezeptor 1
CB2: Cannabinoidrezeptor 2
COX-2: Cyclooxygenase-2
CXCL 10: C-X-C motiv Chemokine 10
DMARD: Disease modifying antirheumatic drug (b: biologisch; cs: konventionell-synthetisch; ts: zielgerichtet-synthetisch)
DUSP1: Dual specificity Phosphatase 1
ECS: endogens Cannabinoidsystem
FAAH: fatty acid amide hydrolase
GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HLA: Humanes Leukozyten-Antigen
IDO: Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ : Interferon gamma
IFN- γ R: Interferon- γ -Rezeptor
JAK: Janus Kinase
LPS: Lipopolysaccharide
MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase
OA: Osteoarthritis
PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
RA: Rheumatoide Arthritis
SDS-Page: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF: Synoviale Fibroblasten
SMI: „Small molecule“-Inhibitor
„Small molecule“-Modulatoren: Cortisol, Anandamid, Capsaicin, Nimesulid
SOCS: Suppressor of Cytokine Signaling
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TEP: Totalendoprothese
TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1
15d-PGJ₂: 15-deoxy-delta^{12,14}-Prostaglandin J₂

1. Rheumatoide Arthritis

1.1. Pathogenese

An Rheumatoider Arthritis (RA) erkranken im Schnitt 0,5 – 0,8 % der erwachsenen Bevölkerung. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter und liegt bei Frauen höher als bei Männern (2). Es liegt eine Assoziation mit positivem Raucherstatus, bestimmter Human-Leukozyten-Antigen (HLA)-Disposition und Infektionen mit Viren und Bakterien vor (3). Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die typischerweise die kleinen Gelenke von Händen und Füßen in symmetrischem Muster befällt (4). Neben der Anzahl und Lokalisation der befallenen Gelenke sind für die Diagnosestellung sowohl die Symptomdauer als auch der Anstieg von C-reaktivem Protein im Blut sowie das Vorliegen von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide/Proteine (ACPA) und Rheumafaktoren von Bedeutung (2). Im gesunden Gelenk gewährleistet die Synovialmembran, die innerste Schicht der Gelenkkapsel, durch Produktion von Synovialflüssigkeit die reibungsfreie Beweglichkeit des Gelenks und die Ernährung des Knorpels. Die Synovialmembran wird in die synoviale Intima und Subintima unterteilt. Während sich die synoviale Subintima aus einem lockeren Geflecht aus Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Blutgefäßen, Nerven und Lymphozyten zusammensetzt, besteht die synoviale Intima aus einer zwei- bis dreilagigen Zellschicht aus A- und B-Synoviozyten, die nicht durch eine Basalmembran unterlegt ist (4, 5). B-Synoviozyten werden im Folgenden als synoviale Fibroblasten (SF) bezeichnet. Ihre Funktion liegt in der Produktion von Synovialflüssigkeit und extrazellulärer Matrix (5). Aufgrund hoher Proteinproduktion weisen SF ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum auf. Als Merkmal des mesenchymalen Gewebeursprungs zeichnen sich SF durch Produktion charakteristischer Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ IV und V, Integrine der Klasse $\alpha 5\beta 1$ und Oberflächenmarker wie CD90 aus (6). Als spezifisch für den synovialen Ursprung gilt die Expression von UDP-glucose-6-dehydrogenase und der Oberflächenmarker CD55 (6). A-Synoviozyten der Intima sind synoviale Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, und bedingt durch hohe phagozytotische Aktivität eine Vielzahl an Lysosomen aufweisen (4, 5). Bei RA weisen die beschriebenen Strukturen tiefgreifende Veränderungen auf. Die synoviale Subintima, normalerweise zellarm, wird von Immunzellen infiltriert (7). Die Mehrzahl der Immunzellen sind CD4+ T-Zellen, während CD8+ T-Zellen und B-Zellen in geringerem Maße vorkommen. Die klonale Expansion der B-Zellen weist auf eine Antigen-induzierte Stimulation hin und führt zu lokaler Produktion von Antikörpern, die sich gegen citrullinierte Peptide, Kollagen und den Fc-Teil von IgG richten (8). Dysfunktionale Neovaskularisation führt zur

Einsprossung unreifer Gefäße, die die Sauerstoffversorgung des Synovialgewebes bei gleichzeitig entzündungsbedingtem erhöhtem Bedarf nicht ausreichend gewährleisten können (9). Das hypoxische Milieu mit erniedrigten pO₂-Werten von 1-3% in vivo (3) bedingt oxidativen Stress und metabolische Veränderungen im Zellstoffwechsel mit Tendenz zum Wechsel vom oxidativen in den glykolytischen Status (9). Die synoviale Intima verdickt sich auf bis zu 20 Zellschichten. Typ-A-Zellen weisen dabei einen aktivierten Phänotyp auf und produzieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (8). Diese aktivieren SF und regen deren eigene Produktion von Mediatoren wie IL-6, Prostaglandinen und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) an (8). Es etabliert sich ein Netzwerk parakriner und autokriner Stimulation, das die Aufrechterhaltung der Entzündung, die Zellmigration ins Gewebe und Zerstörung der extrazellulären Matrix fördert. Neben weitreichender Interaktion mit T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und Neutrophilen (4) weisen SF bei RA intrinsisch einen aggressiven invasiven Phänotyp auf, der auch T-Zell-unabhängige Knorpeldestruktion bei Vascular cell adhesion molecule-1-Expression und Proteasenproduktion bedingt (10). Hyperproliferierendes Synovialgewebe, welches vorwiegend aus Makrophagen, Osteoklasten und SF besteht, überzieht die Knorpel-Knochengrenze und erodiert den Knochen. SF sind dabei der hauptverantwortliche Zelltyp für die Knorpelzerstörung (8).

1.2. Etablierte Therapiekonzepte

Als bewährte Therapie stehen die klassischen krankheitsmodifizierenden Antirheumatika (DMARD = disease modifying antirheumatic drugs) zur Verfügung. Als erste Wahl wird Methotrexat verwendet, alternativ sind Leflunomide oder Sulfasalazin möglich. Bei Ersttherapie werden konventionelle synthetische DMARD (csDMARD) mit einem Glukokortikoid kombiniert. Die Glukokortikoidtherapie sollte aufgrund des Nebenwirkungsprofils zügig auf ein Minimum von 5mg Prednisolonäquivalent per os/Tag rückdosiert werden und eine Dauer von 6 Monaten nicht überschreiten. Bei unzureichendem Ansprechen kann eine Kombination aus zwei csDMARD eingesetzt werden (11). Zur Therapieeskalation stehen biologische DMARD (bDMARD) und neuerdings zielgerichtete synthetische DMARD (tsDMARD) zur Verfügung (11). Aus spezifischen monoklonalen Antikörpern oder Fusionsproteinen bestehende bDMARD neutralisieren je nach Spezifität die Aktivität von TNF oder IL-6 oder modulieren die Kostimulation von T-Zellen oder führen zu B-Zell-Depletion (12). Der Langzeiteinsatz von bDMARD erhöht jedoch einigen Studien zufolge unter anderem das Risiko für Infektionen und Tumoren (13,14). Neuere Therapieansätze zielen deshalb auf intrazelluläre Signalkaskaden, welche die Zellantwort auf inflammatorische Stimuli unterbinden. Erwähnenswert ist in diesem

Zusammenhang das oral zu verabreichende tsDMARD Tofacitinib, ein Hemmer der Janus Kinasen (JAK). Tofacitinib, das seit November 2012 in den USA und März 2017 in der EU zugelassen ist (15), inhibiert vorwiegend JAK1 und JAK3 (16). In klinischen Studien zeigte sich die therapeutische Wirksamkeit und ein akzeptables Sicherheitsprofil (17). Der „small molecule“-Inhibitor (SMI) SB203580 ist ein Hemmer der p38 MAPK, der in präklinischen Versuchen bereits antiinflammatorische Effekte bei Kollagen-induzierter Arthritis und Antigen-induzierter Arthritis bei Ratten und Mäusen gezeigt hat, wobei er die LPS-induzierte TNF-Produktion hemmt und Arthritis-symptome abschwächt (18). In klinischen Studien zeigen p38-Inhibitoren hingegen keine eindeutigen therapeutischen Effekte im Gegensatz zu Placebo. Dies wird zum Teil auf die durch das Nebenwirkungsprofil bedingte niedrige Dosierung und die Aktivierung kompensierend wirkender Proteinkinasen zurückgeführt (16).

2. Interferon gamma (IFN- γ)

2.1. Die Rolle bei Rheumatoider Arthritis

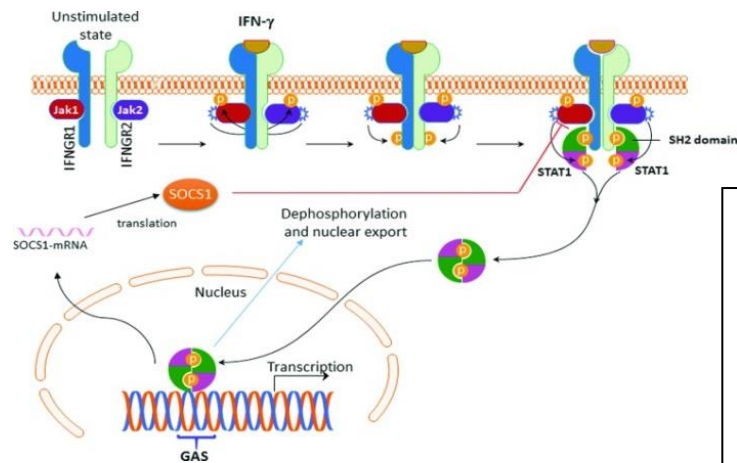
Interferone wurden 1957 als Hemmer der viralen Replikation des Influenzavirus in Hühnerembryonen entdeckt (19). Interferon- γ (IFN- γ), ein Interferon der Klasse II, setzt sich aus 146 Aminosäuren zusammen, kommt als Dimer vor und weist zu 62% eine α -helikale Struktur auf (20,21). IFN- γ wird von T-Zellen, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen, in geringerem Maße auch von B-Zellen freigesetzt (22,23). IFN- γ fördert die Differenzierung von naiven CD4⁺ Zellen in TH1-Zellen und inhibiert die TH2-Zelldifferenzierung (24). Zudem fördert IFN- γ die adaptive Immunantwort durch Induktion von MHCII-Präsentation auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (25). In SF aus Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RASF) kann ebenfalls durch IFN- γ MHCII-Präsentation getriggert werden (26). Peritoneale Makrophagen von IFN- γ -Knockout-Mäusen zeigen erniedrigte MHCII-Expression und Stickstoffmonoxidproduktion als Antwort auf eine Bacille Calmette-Guerin-Infektion (27). IFN- γ fördert außerdem die MHCI-Präsentation, wodurch CD8⁺ Zellen die Elimination viral infizierter Zellen erleichtert wird (25). Zudem stimuliert IFN- γ die immunologische Zellantwort durch Priming. Unterschwellige IFN- γ -Spiegel, die noch keine konkrete Reaktion hervorrufen, bewirken hierbei, dass die Immunantwort auf extrazelluläre Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS), virale Infektionen oder Zytokine verstärkt wird (28). Letztlich leiten IFN- γ -induzierte Chemokine und Adhäsionsmoleküle Leukozyten in entzündetes Gewebe (24). Mauritz et al. konnten zeigen, dass Mäuse nach Immunisierung mit IFN- γ -Behandlung in höherer Zahl

Arthritis entwickeln und schwerere histopathologische Symptomatik aufweisen als Kontrolltiere (29). Neben genannten proinflammatorischen Effekten vermittelt IFN- γ , abhängig vom immunologischen Kontext, auch antiinflammatorische Effekte. IFN- γ verbessert die Morgensteifigkeit und Gelenkschwellung bei RA-Patienten in einer klinischen Doppel-Blindstudie (30). In synovialen Fibroblasten aktiviert IFN- γ IL18BP, einen natürlichen Antagonisten des proinflammatorischen Zytokins IL18 (31). IL18 induziert in T-Zellen und in NK-Zellen die Produktion von IFN- γ als auch weiterer proinflammatorischer Faktoren (32,33). DBA/1-Mäuse mit defektem IFN- γ -Rezeptorgen entwickeln im CIA-Modell schneller und mindestens im Anfangsstadium schwerwiegendere klinische Symptome als Wildtyp DBA/1-Mäuse (34,35). Mit neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- γ behandelte DBA/1-Mäuse zeigen nach Immunisierung mit Kollagen II einen früheren Krankheitsbeginn als mit Kontroll-IgG behandelte Artgenossen. Die kumulative RA-Inzidenz erreichte zudem bei den mit Antikörpern gegen IFN- γ behandelten Mäusen 100% bis zu Tag 65 nach Immunisierung, während die Vergleichsgruppe bis dahin nur zu 50% relevante Symptomatik entwickelt hatte (35). Die erhöhte Arthritisinzidenz und Ausprägung bei Mäusen ohne intaktes IFN- γ -Signalling könnte auf fehlendes negatives Feedback von IFN- γ auf die IL-17-Produktion zurückzuführen sein. IL-17 wirkt in Makrophagen und SF proinflammatorisch und ist an der Knorpelzerstörung bei RA beteiligt. In vitro hemmt IFN- γ die IL-17-Produktion von TH17-Zellen (36). T-Zellen von IFN- γ -Knockout-Mäusen zeigen auf Immunisierung mit Kollagen II eine höhere IL-17 Produktion im Vergleich zu Kontrolltieren. Durch Antikörperblockade von IL-17 kann die kumulative RA-Inzidenz und Symptomausprägung stark gesenkt werden. In der für RA suszeptiblen Stammlinie der DBA1-Mäuse verringert sich durch die Anti-IL-17-Therapie ebenfalls die Schwere des Krankheitsbildes (36). IFN- γ ist zudem ein wichtiger Regulator der Aktivität von regulatorischen Treg-Zellen und Inhibitor der Osteoklasten- und TH17-Differenzierung (24).

2.2. Der IFN- γ -Signalweg

IFN- γ bindet mit hoher Affinität an seinen Rezeptor (IFN- γ R), dessen Signalkaskade vorwiegend über JAKs und Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs), einer Familie von 6 zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, vermittelt wird (37). Der IFN- γ R setzt sich aus den zwei Untereinheiten IFN- γ R1 und IFN- γ R2 zusammen (22). JAK1 und JAK2 sind mit dem IFN- γ R assoziiert und phosphorylieren sich gegenseitig infolge von IFN- γ -Bindung an den Rezeptor, was wiederum die Phosphorylierung von IFN- γ R1 durch JAK2 an einem Tyrosinrest zur Folge hat. STAT1 bindet anschließend über eine SH2-Domäne und wird ebenfalls über Tyrosinphosphorylierung aktiviert (23). Als Homodimer, auch genannt Gamma-Activating

Factor (GAS), wandert STAT1 in den Zellkern und nimmt über GAS-Bindungssequenzen Einfluss auf die Transkription (22). Die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5 bilden Homodimere, jedoch können verschiedene Vertreter der STAT-Familie auch Heteromere (STAT1-STAT3 oder STAT1-STAT2) bilden (38).



Der Signalweg von IFN- γ .
aus "Interferons, signal transduction pathways, and the central nervous system" von Nallar und Kalvakolanu (1)

Neben dem JAK-STAT-Signalweg induziert der IFN- γ R auch andere Signalwege (23). Bei RA-SF sind besonders die Signalwege über Mitogen-activated Protein Kinasen (MAPK), die auch von den Zytokinen TNF und IL-1 β aktiviert werden, von Relevanz (6,39). Die Bindung von IFN- γ an den IFN- γ R bewirkt die Rekrutierung der Raf1-Serinkinase an JAK2, was letztendlich in der Phosphorylierung von ERK1/2 resultiert. Auch Ras spielt in dieser Querverbindung wahrscheinlich eine Rolle, wobei die genauen Mechanismen nicht bekannt sind (23). Von der p38 MAPK sind die Unterformen α , β , γ und δ bekannt (40). Der Signalweg von p38 infolge von IFN- γ R-Aktivierung ist nicht eindeutig beschrieben (23). IFN- γ aktiviert MyD88 in peritonealen Makrophagen, was zu Aktivierung des MKK6/p38-Signalwegs führt (41). In Keratinozyten triggert IFN- γ ein Downstream-Signalling über Mekk4, MKK6 und p38 (23,42). Für die Phosphorylierung von p38 speziell in SF sind MKK3 und MKK6 von entscheidender Bedeutung. Dies konnte über die Transfektion von Plasmiden mit dominant-negativem MKK3 und MMK6 in SF nachgewiesen werden (40).

3. Entzündungsmodulierende Substanzen bei RA

3.1. Capsaicin

Als entzündungsmodulierende Substanz bei RA ist Capsaicin, die scharfe Komponente der Chilischote, bekannt (43). Capsaicin ist ein exogener Ligand des transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Dieser wird der TRP-Familie, einer Gruppe von Transmembrankanälen für monovalente und divalente Kationen, zugeordnet, die gesteuert durch äußere Stimuli eine Änderung des Zellmembranpotenzials und Depolarisation hervorrufen können (44). Neben Capsaicin wird TRPV1 sowohl durch den endogenen Ligand Anandamid als auch durch Temperaturen über 43 Grad und niedrige pH-Werte stimuliert (44). TRPV1 wurde zuerst an sensorischen Nervenfasern vom Typ C nachgewiesen, die auch Gelenkkapseln innervieren, und so bei Arthritis die Nozizeption vermitteln (43). Bei Aktivierung durch Capsaicin kommt es zur Ausschüttung von Substanz P und CGRP aus sensorischen Neuronen, was inflammatorische und vasoaktive Effekte nach sich zieht (43). Der TRPV1 Agonist Capsaicin kann in hohen Konzentrationen eine Desensitivierung von TRPV1 hervorrufen (45). Der bekannteste Mechanismus ist die Depletion von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) durch Ca²⁺-induzierte Aktivierung von Phospholipase C (45). Nach Stimulation durchläuft TRPV1 dabei eine refraktäre Phase, in der keine Erregung mehr auftreten kann. Dieser Mechanismus wird für die schmerzlindernde Wirkung von Capsaicin in der Arthritisbehandlung verantwortlich gemacht (43). Eine Studie untersuchte den Zusammenhang von ERK-Aktivierung und der inflammatorischen Wirkung von TRPV1 bei RA anhand von Zellen aus dem Spinalganglion und aus dem dorsalen Horn des Rückenmarks. Diese Zellen zeigten in TRPV1-KO Mäusen im Vergleich mit Wildtyp Artgenossen eine herabgesetzte ERK-Aktivierung, was gleichzeitig mit abgeschwächter mechanischer Allodynie und geringerer histopathologischer RA-Phänotypausprägung einherging (46). Dies deutet auf Signalling von TRPV1 über ERK hin. Gen- und Proteinexpression von TRPV1 ist sowohl in Neuronen als auch in SF vorhanden (47). Inwiefern auf Ebene der MAPK eine Interaktion der Signalwege zwischen Capsaicin und IFN- γ in SF besteht, ist nicht genau bekannt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.2. Anandamid (AEA)

AEA ist das endogene Pendant von THC, dem psychoaktiven Bestandteil von Marihuana (48). Es bindet im Körper mit höherer Affinität an den Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) als an den Cannabinoidrezeptor 2 (CB2). Während CB1 eher für die psychomodulatorische Effekte zuständig ist, vermittelt CB2 vorwiegend anti-entzündliche und immunmodulatorische Effekte und ist deshalb als therapeutisches Ziel bei RA interessant (48). Bei höheren Anandamidkonzentrationen erfolgt die Signaltransduktion auch über TRPV1 (49). Die Endocannabinoidmetabolisierung wird über FAAH (fatty acid amide hydrolase) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) vorgenommen (49,50). Antientzündliche Effekte von endogenen Cannabinoiden bei RA wurden bei Steigerung des Endocannabinoidspiegels durch FAAH-Inhibition oder CB1/2-Agonisten mehrfach nachgewiesen (51). Beispielsweise zeigen Mäuse im CIA-Modell ohne FAAH-Expression in nicht-neuronalem Gewebe abgeschwächte klinische Arthritissymptome (52). Sowohl die Synthese von AEA als auch die Expression von CB1 und CB2 sind in humanem Synovialgewebe nachgewiesen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen RA- und OA-Patienten besteht (53). In SF ist die Wirkung von Cannabinoiden über den MAPK-Signalweg beschrieben. HU210, ein unselektiver Agonist von CB1 und CB2 bewirkt eine zeitabhängige Aktivierung von ERK und p38 (53). Es gibt deutliche Hinweise, dass Cannabinoide die Zytokinproduktion als Antwort auf inflammatorische Stimuli über den MAPK-Signalweg modulieren. Beta-Caryophyllen, ein selektiver CB2-Agonist, vermindert die LPS-induzierte TNF-Produktion im Blut. LPS-Stimulation von humanen Blutmonozyten führte zu starker p38- und geringer ausgeprägter ERK1/2- Aktivierung. Die LPS-induzierte Aktivierung von ERK1/2 konnte durch den CB2-Agonisten verringert werden (54). Auch speziell an SF konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide die Produktion von inflammatorischen Proteinen über MAPKs beeinflussen. IL-1 β -Stimulation ruft eine erhöhte Expression von ERK und pERK sowie p38 und pp38 in RA-SF hervor. Ein CB2-Agonist (HU-308) dämpft die IL-1 β -vermittelte Aktivierung von ERK und p38. HU-308 bewirkt gleichzeitig eine verminderte IL-1 β vermittelte mRNA- und Proteinproduktion von MMP-6 und MMP-13 in SF (55). Noch nicht genau beschrieben ist in diesem Zusammenhang die Beeinflussung der inflammatorischen Wirkung von IFN- γ durch AEA an der Schnittstelle des MAPK-Signallings.

4. Ziel der Arbeit

Für die Entwicklung neuer, verbesserter SMI ist es von großem Interesse, den Verlauf der intrazellulären Signalkaskaden von SF und deren Veränderung durch Medikation genau zu verstehen. Ziel dieser Arbeit ist es, das Signalling von IFN- γ und dessen Modulation in synovialen Fibroblasten in vitro zu untersuchen. Dafür wird zunächst anhand einer Zeitreihe die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren/Signalkinasen STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 MAPK durch IFN- γ dargestellt. Anschließend wird die Veränderung der Aktivierung dieser Signalmoleküle durch Behandlung mit antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Substanzen untersucht. Als positive Wirkungskontrolle fungiert das antiinflammatorische endogene Glukokortikoid Cortisol. Als Modulatoren werden Capsaicin, der Hauptinhaltsstoff der Chilischote und TRPV1-Agonist, und Anandamid, ein Botenstoff des endogenen Cannabinoidsystems (ECS), getestet. Endocannabinoide könnten nicht nur über FAAH, sondern auch über COX-2 abgebaut werden (49,50). Produkte letzterer Reaktion könnten ebenfalls in die Modulation IFN- γ -vermittelter Signalpfade eingreifen. Deshalb soll insbesondere AEA in Kombination mit dem COX-2-Hemmer Nimesulid getestet werden. Zusätzlich soll die Beeinflussung des IFN- γ -Signalwegs durch IL-1 β untersucht werden, da IL-1 β seine Signale überwiegend über die MAPKs ERK und p38 vermittelt (39). Außerdem konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Aktivierung des IL-1 β -Signalwegs die IFN- γ -vermittelte Produktion von B-cell activating factor (BAFF), einem Zytokin der TNF-Familie, in SF teilweise antagonisiert. Daher kann von einer gegenseitigen Beeinflussung der Signalwege von IL-1 β und IFN- γ ausgegangen werden. Es wird eine Zeitreihe der Aktivierung der ERK, p38, STAT1 und STAT3 erstellt, anschließend mit dem Zeitintervall des maximalen Effekts die Modulation der Aktivierung dieser Signalmoleküle durch IFN- γ untersucht.

5. Methoden

5.1. Gewinnung von Synovialen Fibroblasten (SF) aus Synovialgewebe

Das Synovialgewebe wurde bei RA- und OA-Patienten intraoperativ beim Einsatz von Totalendoprothesen (TEP) aus dem geschädigten Knie- oder Hüftgelenk entnommen. Das Gewebe wurde in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelagert, auf Eis gekühlt und im Labor unter sterilen Bedingungen zügig weiter verarbeitet. Dabei wurde das Gewebe mit dem Skalpell zerkleinert und in verdünnter Liberase (0,26 Wunsch units/ml = 0,05mg/ml) für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler verdaut, bis eine Zellsuspension vorlag. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von 20ml Medium gestoppt. Um die aus dem Gewebeverband gelösten Zellen zu gewinnen, wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 70µm Porengröße gegeben und anschließend bei 1600rpm für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Lyse der Erythrozyten wurde durch 5- bis 10-minütige Inkubation in hyperosmolarem Erythrozytenlysepuffer herbeigeführt und durch Zugabe von 15ml PBS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde wiederum bei 1600rpm für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellzahl wurde anschließend mit Neubauer-Zählkammern ermittelt.

5.2. Zellkultur

Zur Propagierung und Bildung einer konfluenten Zellpopulation wurden die Zellen in Zellkulturflaschen bei 37° und 5% CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde aufgrund des Verbrauchs von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen wöchentlich getauscht. Bei Konfluenz wurden die Zellen für weiteres Wachstum auf Zellkulturflaschen mit 75cm² aufgesplittet oder für Versuche in Petrischalen oder 6-Well-Platten ausgesät. Zum Herauslösen der Zellen aus der ursprünglichen Zellkulturflasche wurde der konfluente Zellrasen zunächst mit 10ml PBS gewaschen und für 10 min bei 37°C mit 10ml Trypsin verdaut. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 10ml Medium mit FCS gestoppt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen resuspendiert und auf Zellkulturflaschen oder Petrischalen verteilt. Da makrophagenähnliche A-Synoviozyten terminal differenziert sind und ihre Überlebenszeit in vitro auf wenige Wochen begrenzt ist, dominieren ab der zweiten Passage die B-Synoviozyten in Zellkultur (6).

5.3. Zellstimulation und Gewinnung von Zellysat

Am Vortag der Stimulation wurde durch Mediaustausch der FCS Gehalt auf 2% reduziert, um die Zellen zu synchronisieren. Die Zellen wurden wie in den einzelnen Versuchen

angegeben behandelt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen. Danach erfolgten die Zugabe von 800µl Proteaseinhibitor+Phosphataseinhibitor-Cocktail und das Abschaben der Zellen mit anschließender Überführung in 1,5ml-Reaktionsgefäße. Intakte Zellen und größere Zellfragmente wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in eisgekühltem RIPA-Zellysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend mit Ultraschall in einem Ultraschallhomogenisator für jeweils 10 Sekunden auf niedrigster Stufe behandelt. Die Proben wurden im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

5.4. Bradford Assay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Probe jedes Zelllysates 1:10 mit PBS verdünnt. 10µl der verdünnten Lysate wurden dann mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt. Zur Normierung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve von Bovinem Serum Albumin (BSA) in verschiedenen PBS-Verdünnungen (Konzentrationen in µg/ml: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,032) erzeugt. Die photometrische Proteinbestimmung wurde bei 595nm mit einem Microplate Reader durchgeführt. Das Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie-Brilliant-blue G-250, der in saurem Milieu in der kationischen Form mit dem Absorptionsmaximum für Licht der Wellenlänge von 470nm vorliegt. Bindet der Farbstoff an Proteine, geht er in die blaue, anionische Form über. Sein Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei auf 595nm. Mittels Spektrophotometrie kann der blaue Farbstoff detektiert werden und so auf die Proteinkonzentration in der Probe geschlossen werden (56). Es wurden jeweils zwei Werte für die Standardkurve und drei Werte für jedes Zelllysate ermittelt. Mit Hilfe der Microplate Manager Software wurde der Mittelwert für Standard und Proben errechnet.

5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse. Für die Vorbereitung wurden 16µl der Probe mit 4µl fünffach konzentriertem Lämmli-Puffer versetzt. Lämmli-Puffer reguliert den pH-Wert und enthält β-Mercaptoethanol, ein Reduktionsmittel zur Auflösung von Disulfidbrücken. Das im Puffer enthaltene Bromphenolblau sorgt für die Farbmarkierung der Lauffront während des Gellaufs. SDS versieht alle Proteine unabhängig von ihrer eigenen Ladung mit einer negativen Ladung, die Voraussetzung für elektro-phoretische Wanderung im Gel. Das Erhitzen der Proben vor dem Gelauftrag auf 95°C

für 5 min führt zur Denaturierung aller Proteine. In dieser Arbeit wurde 15%iges Laufgel und 4%iges Sammelgel verwendet. Für die Herstellung wurde die Laufgellösung mit den Polymerisationskatalysatoren Tetramethylethyldiamin (TEMED, 5µl/ml) und Ammoniumpersulfat (APS, 3µl/ml) vermischt und zwischen Glasplatten gegossen. Die Überschichtung mit Propanol gewährleistete einen glatten Oberrand des Laufgels. Nach Polymerisation des Laufgels wurde die Sammelgellösung mit TEMED (5µl/ml) und APS (3µl/ml) versetzt in die Gelkammer gegossen. Dann wurde das Gel in die Laufapparatur eingespannt und mit 1x Laufpuffer bedeckt. Im Folgenden wurden die Taschen mit jeweils 20µl der Proben beladen. Für die Bestimmung der molekularen Masse anhand der während der Elektrophorese zurückgelegten Laufstrecke wurde eine Tasche mit 4µl Proteinmarker mit farbmarkierten Proteinen mit bekannter Masse befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 90 min bei 25 mA/Gel.

5.6. Western Blot

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in Wetttransferpuffer zwischengelagert. Der Western Blot wurde im Tank-Verfahren durchgeführt. Dabei wurde eine in 100% Methanol prähydratisierte PVDF Membran mit dem Gel zwischen Whatman Papieren und zwei Schwämmen in die Apparatur gespannt. Nach dem Einbau des „Blot-Sandwichs“ in die Blotapparatur fand der Proteinübertrag bei 90 Volt über einen Zeitraum von 70 min statt.

Für die Detektion der geblotteten Proteine auf der PVDF Membran wurde wie folgt vorgegangen:

- 1 h Blocken der unspezifischen Proteinbindestellen mittels Blockpuffer, der den Milchbestandteil Kasein enthält
- 3 x 10 min Waschen mit Waschpuffer (TBS + 0,05% Tween 20, TBST)
- Inkubation mit primärem Antikörper in Blockpuffer über Nacht
- 3 x 10 min Waschen mit TBST
- 1h Inkubation mit HRP-konjugiertem sekundären Antikörper in Blockpuffer
- 3 x 10 min Waschen mit TBST
- Detektion der gebundenen sekundären Antikörper mittels ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz (angewandt nach Beschreibung im Verhältnis 1:1)

Anschließend wurden die Signale der Chemilumineszenz mit Hilfe eines ChemiDoc™ MP Imagers über einen Zeitraum von bis zu 5 min visualisiert und mit der Image Lab™ Software

bearbeitet. Die Quantifizierung der Lichtsignale wurde mit der Software ImageJ über die Ermittlung der Fläche unter der Kurve der Pixeldichte durchgeführt. Für die Coomassie-Färbung wurden die Membranen 30 min mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution inkubiert. Die Proteine im Gel bilden nicht-kovalente Komplexe mit dem Coomassie-Farbstoff und werden als blaue Banden sichtbar. Mit dieser Methode kann der Gesamtproteingehalt jeder Bande beurteilt werden und Rückschlüsse getroffen werden, ob im entsprechenden Versuch die Geltaschen gleichmäßig mit Protein beladen worden waren und der Proteintransfer beim Blotten effizient gewesen war.

5.7. Auswertung der Ergebnisse

Um die Aktivierung der STATs und MAPKs darzustellen, wurde der Quotient aus phosphorylierter und unphosphorylierter Form gebildet. Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Softwareprogramm Sigmaplot herangezogen.

Unterschiede zur Kontrolle wurden mit dem paired t-test oder Wilcoxon Signed Rank Test berechnet, sonstige Unterschiede mit dem t-test oder Mann-Whitney Rank Sum Test.

5.8. Geräte

Beschallungsgerät HD2070	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Brutschrank (CO ₂ -Inkubator)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
ChemiDoc™ MP Imager XRS+	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Heizblock (Thermoleader, Model HB-110)	LTF Labortechnik GmbH (Wasserburg, Deutschland)
ImageJ	National Institut of Health (Bethesda, Maryland, USA)
Image Lab™ Software	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Micro-Zentrifuge	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Microplate Manager Software	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Microplate Reader	Bio-Rad (Hercules, California, USA)

Mikroskop (Primo Vert)	Zeiss (Jena, Deutschland)
Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Multipette® plus	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
PH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettierhelfer accu-jet	Brand (Wertheim, Deutschland)
Präzisionswaage PCB 1000-1	Kern (Balingen, Deutschland)
Schüttler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
SigmaPlot	Systat Software GmbH (Erkrath, Deutschland)
Sterilbank, Safe 2020	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Tetra Blotting Module	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Tischzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Vortexer, Model K-550-GE	Bender & Hobein AG (Bruchsal, Deutschland)
Warmwasserbad	Labortechnik Medingen (Arnsdorf, Deutschland)
Zellzähler, Scepter™	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

5.9. Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (2ml)	Schubert und Weiss Omnilab (München, Deutschland)
Combitips plus	Diagonal (Münster, Deutschland)
EASYstrainer™ (70µm)	Schubert und Weiss Omnilab (München, Deutschland)
Elektrophorese Tips	Bio-Rad (Hercules, California, USA)

Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2µm)	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettensatz Research	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2,0ml)	Diagonal (Münster, Deutschland)
Scepter™ Sensors, 60µm	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Serologische Einwegpipetten (5, 10, 20 und 50ml)	Schubert und Weiss Omnilab (München, Deutschland)
Skalpell Feather® (Nr. 22)	Pfm medical ag (Köln, Deutschland)
TC-Flaschen 75cm ²	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vakuumfiltrationseinheit	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Vakuumfiltrationssystem, 100µm Nylonnetzfilter	Merck, Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Whatman GB005	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturplatten (96-Loch, 6-Loch)	Schubert und Weiss Omnilab (München, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Schubert und Weiss Omnilab (München, Deutschland)
Neubauer-Zählkammern	A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

5.10. Chemikalien und Zusammensetzung von Standardlösungen

40%ige Acrylamidlösung	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Serumalbumin-Standard	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Ammonium Persulfat (APS)	Bio-Rad (Hercules, California, USA)

Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb (München, Deutschland)
Anandamid	Tocris (Bristol, England)
2%ige Bisacrylamidlösung	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bovines Serumalbumin, Fraktion V (BSA)	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Capsaicin	Tocris (Bristol, England)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbereagenz	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Cortisol	Tocris (Bristol, England)
Desoxycholsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulphoxid)	Tocris (Bristol, England)
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare Life Science (Freiburg, Germany)
Erythrozytenlysepuffer	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycin Pufferan $\geq 99\%$, p.a.	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glyzerin	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
IFN- γ	PeptoTech (Rocky Hill, New Jersey, USA)
Igepal	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
IL1- β	PeptoTech (Rocky Hill, New Jersey, USA)

L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Liberase™ Research Grade Purified Enzyme Blends	Roche (Penzberg, Deutschland)
Frema Magermilchpulver (instant)	ReformKontor GmbH (Zarrentin, Deutschland)
Methanol, technisch vergällt	Chemikalienausgabe (Universität Regensburg, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Natriumazid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat 20% (SDS)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Nimesulid	Tocris (Bristol, England)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
peqGold Protein Marker	VWR (Darmstadt, Deutschland)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
p-Propanol	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Quick Start™ Bradford 1x Färbereagenz	Bio-Rad (Hercules, California, USA)
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Salzsäure rauchend	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TNF- α	PeptoTech (Rocky Hill, New Jersey, USA)
Trishydroxyaminomethan hydrochloride (Tris-HCL)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin (10x)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween® 20	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Urinbecher	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Antikörper

Primär:

Antikörper	Firma	Nummer	kDa	Isotyp
STAT1	Abcam	92506	87	Rabbit mAb
pSTAT1	Abcam	29045	87	Mouse mAB
pSTAT3	Abcam	76315	88	Rabbit mAb
STAT3	Abcam	32500	88	Rabbit mAb
ERK (1/2)	Cell Signaling	9107	42/44	Mouse mAB
pERK(1/2)	Cell Signaling	4370	42/44	Rabbit mAb
p38	Abcam	170099	42	Rabbit mAb
pp38	Abcam	178867	41	Rabbit mAb
GAPDH	Cell Signaling	2118	37	Rabbit mAb

Sekundär:

Antikörper	Firma	Nummer	Isotyp
Anti-Rabbit, HRP-konjugiert	Jackson ImmunoResearch	711035152	Donkey IgG
Anti-Mouse, HRP-konjugiert	Abcam	98665	Donkey IgG

Standardlösungen

RIPA-Zellysepuffer:

- 5,5ml 3M NaCl
- 1,1ml Igepal NP40 (1%)
- 0,55g Deoxylat
- 550µl 20% SDS
- 5,5ml 1M TRIS pH 7,5
- 900µl 10x PhosSTOP+Proteaseinhibitor Cocktail (frisch zugesetzt)

5x Lämmli

- 5ml 87% Glycerin
- 300µl 1M Tris-HCL pH 6,8
- 2,0ml 20% SDS
- 10µg Bromphenolblau
 - ⇒ Wird bei Raumtemperatur gelagert.
- 1,0ml β-Mercaptoethanol wird vor der Verwendung frisch hinzugesetzt

Blockpuffer

- 10g Magermilchpulver
- 200ml TBST

1x Trypsin

- 450ml PBS
- 5ml 10x Trypsin

15%ige Laufgellösung

- 45ml 40%ige Acrylamidlösung
- 10,5ml 2%iges Bisacrylamidlösung
- 15ml 3M Tris pH 8,7
- 20% SDS
- 59ml H₂O

4%ige Sammelgellösung

- 5ml 40%ige Acrylamidlösung
- 2,6ml 2%ige Bisacrylamidlösung
- 5ml 1M Tris pH 6,8
- 20% SDS
- 24ml H₂O

10x Laufpuffer

- 144g Glycin
- 30g Tris-Base
- 50ml 20 % SDS

10x Tankpuffer

- 140g Glycin
- 30g Tris-Base
- 5g 20 % SDS
- ad 1L mit ddH₂O

Wetttransferpuffer

- 200ml Methanol (tech.)
- 80ml 10x Tank-Buffer
- ad 1L mit ddH₂O

10 x Laufpuffer

- 144g Glycin
- 30g Tris-Base
- 50ml 20% SDS
- ad 1L mit ddH₂O

1 M Tris pH 6,8

- 121,14g Tris-Base
- 700ml ddH₂O
- ≈ 100ml rauchende HCl
- ad 1000ml

3 M Tris pH 8,7

- 363g Tris-Base
- ≈ 75ml rauchende HCl
- ad 1000ml ddH₂O

Antikörperlösung

- 7,5g BSA
- 0,5ml Tween
- 50mg Natriumazid
- ad 500ml

Tris Buffered Saline und Tween (TBST)

- 160g Natriumchlorid
- 97g Tris-Base
- 10ml rauchende Salzsäure
- ad 2000ml ddH₂O
- 20ml Tween

Tris Buffered Saline (TBS)

- 160g Natriumchlorid
- 97g Tris-Base
- 10ml rauchende Salzsäure
- ad 2L mit ddH₂O

10%iges FCS-Medium (Kulturmedium)

- 500ml RPMI-1640 Medium
- 5ml HEPES
- 5ml Penicillin/Streptomycin
- 500µl Amphotericin B
- 50ml FCS

2%iges FCS-Medium

- 500ml RPMI-1640 Medium
- 5ml HEPES
- 5ml Penicillin/Streptomycin
- 500µl Amphotericin B
- 10ml FCS

6. Ergebnisse

6.1. Aktivierung der Signalmoleküle STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 in RASF und OASF durch IFN- γ

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren durch IFN- γ untersucht. Phosphoryliertes STAT1 war unter Basalbedingungen in RASF und OASF nur in sehr geringem Maße vorhanden. Durch Stimulation mit IFN- γ wurde STAT1 nach 5, 15, 30 und 90 min in OASF signifikant aktiviert. Die Aktivierung stieg innerhalb von 15 min Inkubationszeit auf $2467\% \pm 1477\%$ ($p=0,001$) und innerhalb von 30 min auf $2185\% \pm 1351\%$ ($p=0,002$). Die Aktivierung von STAT1 in RASF erreichte nach 15 min IFN- γ -Stimulation eine Erhöhung auf $1233\% \pm 939\%$ ($p=0,031$) und nach 30 min auf $673\% \pm 466\%$ (siehe Abb.1 A, B) des Ausgangswertes. IFN- γ induzierte auch eine starke Phosphorylierung von STAT3

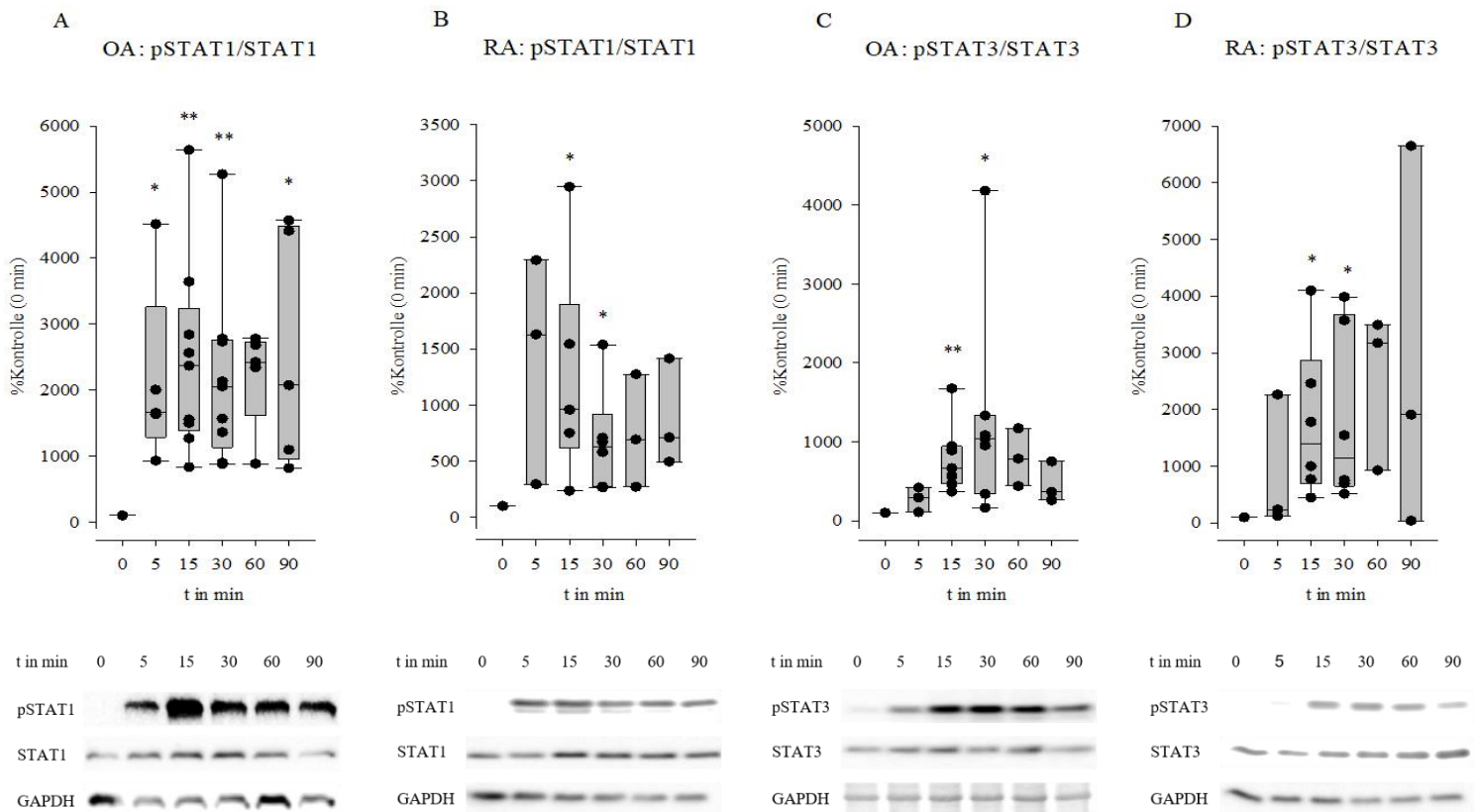


Abb.1

Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 in OASF und RASF nach Stimulation mit 10ng/ml IFN- γ .

Die Aktivierung von STAT1 (A, B) und STAT3 (C, D) wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 bzw. STAT3 dargestellt. Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt $t = 0$ sind im Graph mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median. Unterhalb jedes Graphen wird ein repräsentativer Western Blot gezeigt.

in OASF und RASF. In OASF stieg die Aktivierung signifikant auf $797\% \pm 440\%$ ($p=0,006$) der Kontrolle nach 15 min und auf 1045% ($p=0,016$) der Kontrolle nach 30 min. Bei RASF wurde eine Zunahme der Aktivierung von STAT3 auf $1762\% \pm 1358\%$ des Kontrollniveaus nach 15 min und auf $1846\% \pm 1544\%$ nach 30 min beobachtet (siehe Abb.1 C, D).

Im Folgenden wurde die IFN- γ -induzierte Aktivierung der MAPKs untersucht. In den hier durchgeführten Versuchen wies die Aktivierung von ERK1/2 bei der Untersuchung verschiedener Patientenproben einen sehr variablen Verlauf auf, sodass kein signifikantes Maximum festgestellt werden konnte (siehe Abb.2 A, B). Die p38-Aktivierung durch IFN- γ -Stimulation hingegen konnte in OASF und RASF signifikant nachgewiesen werden. In OASF lag ein signifikantes Maximum von $136\% \pm 17\%$ nach 60 min vor, während die maximale Aktivierung bei RASF von $132\% \pm 111\%$ nach 15 min erreicht war. Tendenziell lag auch nach 30 min in RASF noch Aktivierung vor ($p=0,083$) (siehe Abb.2 C, D).

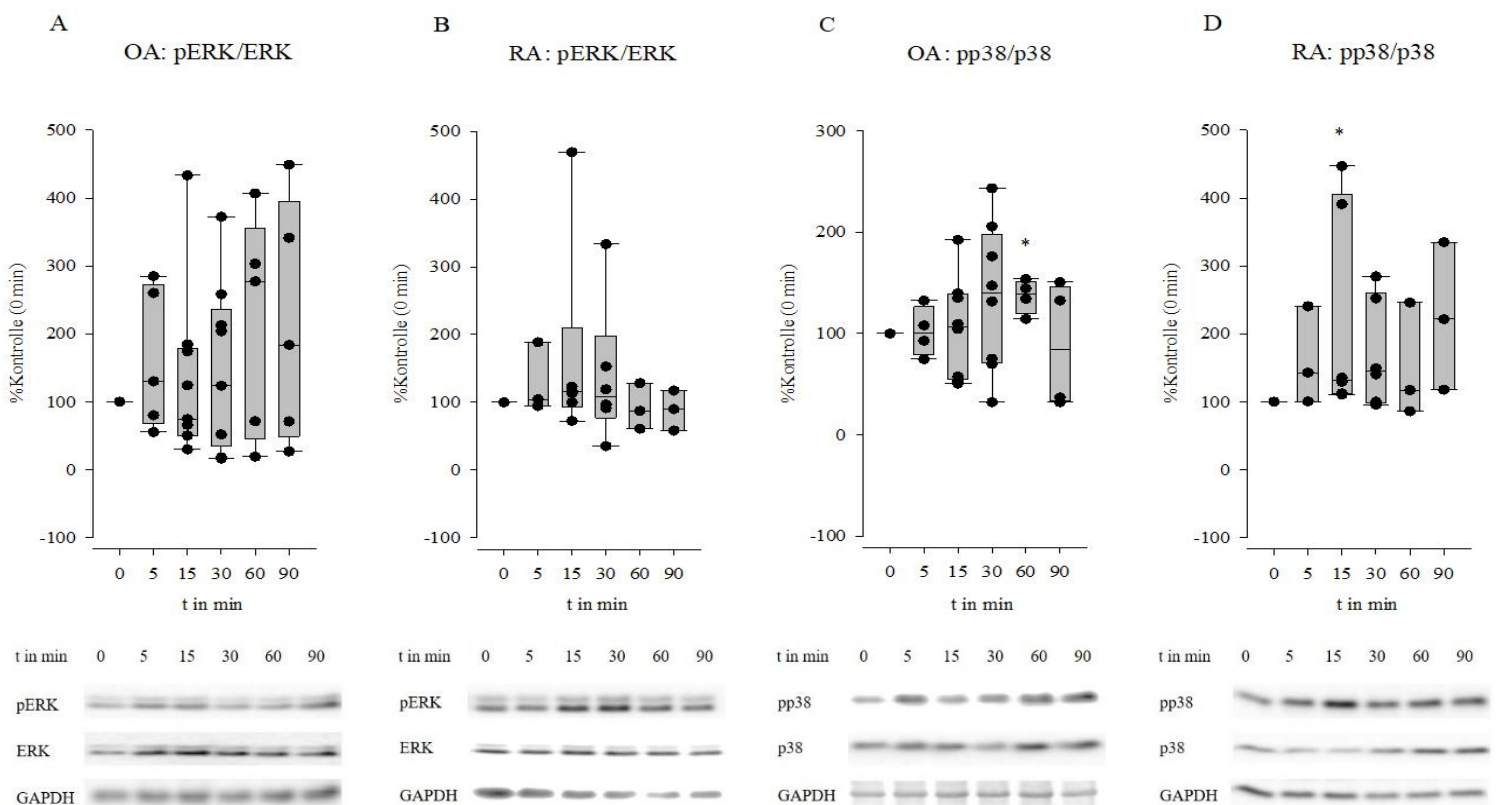


Abb.2

Phosphorylierung von ERK und p38 in OASF und RASF nach Stimulation mit 10ng/ml IFN- γ .

Die Aktivierung/Phosphorylierung von ERK (A, B) und p38 (C, D) wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem ERK bzw. p38 graphisch dargestellt. Unterschiede zum zur unstimulierten Kontrolle $t = 0$ wurden mit dem paired t-test berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt $t = 0$ sind im Graphen mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median. Unterhalb jedes Graphen wird ein repräsentativer Western Blot gezeigt.

6.2. Aktivierung der Signalmoleküle STAT1, STAT3, ERK und p38 in OASF und RASF durch IL-1 β

Phosphoryliertes STAT1 war nach Inkubation mit IL-1 β über den Zeitraum von 5 bis 90 min nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). Die basale STAT3-Aktivierung in OASF wurde durch IL-1 β eher vermindert. In RASF zeigte sich nach 30 min eine signifikante Reduktion der STAT3-Phosphorylierung auf 59% \pm 25% ($p=0,009$) im Vergleich zur Ausgangsaktivierung. Im Sinne eines Wiederanstiegs der Aktivierung bestand zwischen den Zeitpunkten 15 min und 90 min ($p=0,048$) als auch den Zeitpunkten 30 min und 90 min ($p=0,024$) jeweils ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney Rank Sum Test) (siehe Abb.3 A und B).

Im Gegensatz zur Inaktivierung von STATs wurden MAPKs durch IL-1 β aktiviert (siehe Abb.3 C und D). Bei OASF wurde die Aktivierung von ERK durch IL-1 β signifikant auf 555,3% \pm 359% nach 15 min gesteigert. Nach 30 min war die Aktivierung tendenziell weiterhin vorhanden ($p=0,07$). Bei RASF wurde die ERK-Aktivierung nach 15 min tendenziell ($p=0,056$) und nach 30 min signifikant auf 725% \pm 540% ($p=0,037$) erhöht.

Die Phosphorylierung von p38 in OASF durch IL-1 β konnte nicht signifikant belegt werden. Ein signifikanter Unterschied zur 0-Kontrolle ergab sich für die p38-Phosphorylierung bei RASF bei Steigerung auf 457% \pm 186% ($p=0,005$) des Ausgangsniveaus nach 15 min und auf 437% \pm 128% ($p=0,001$) nach 30 min. Auf Grundlage der qualitativen Auswertung ist jedoch bei RASF und OASF von einer maximalen Aktivierung von ERK nach 15min und von p38 nach 30 min auszugehen. Dieses Ergebnis korreliert mit der Studie von Schett et al., die p38-Phosphorylierung nur in RA-, nicht aber in OA-Synovialgewebe nachwies (39).

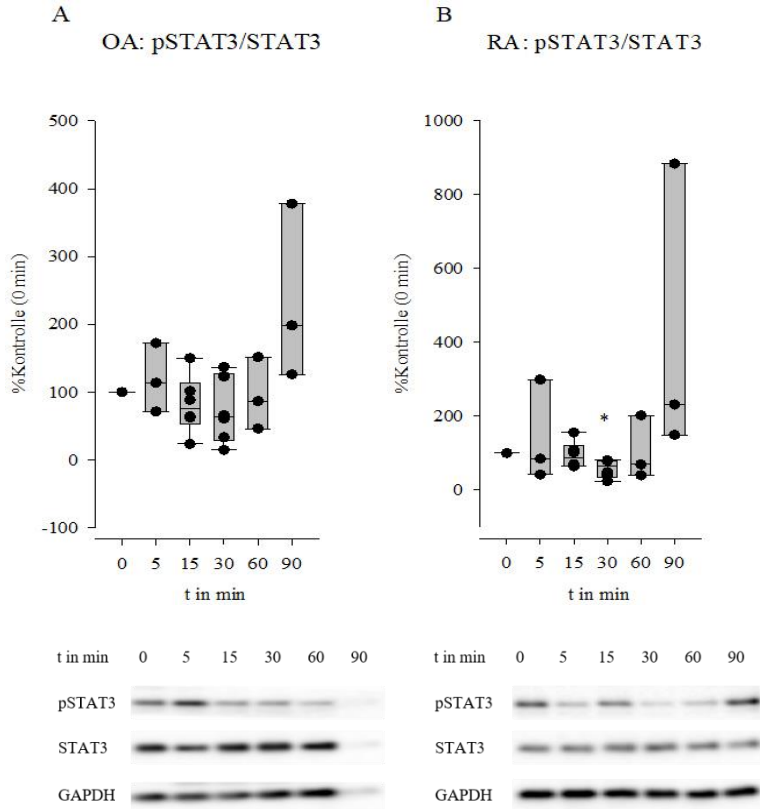
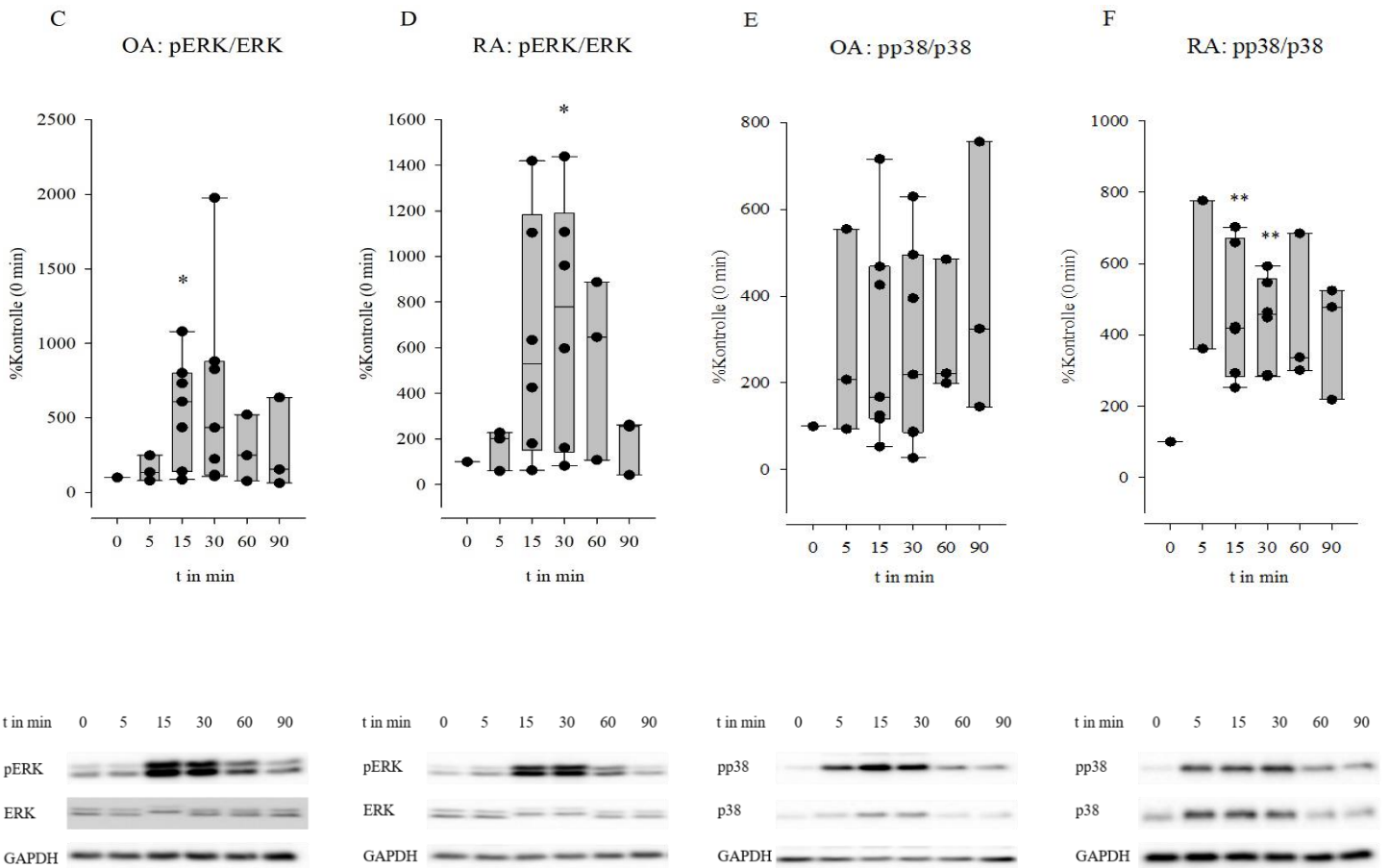


Abb.3

Phosphorylierung von STAT3, ERK und p38 in OASF und RASF nach Stimulation mit 1ng/ml IL-1 β

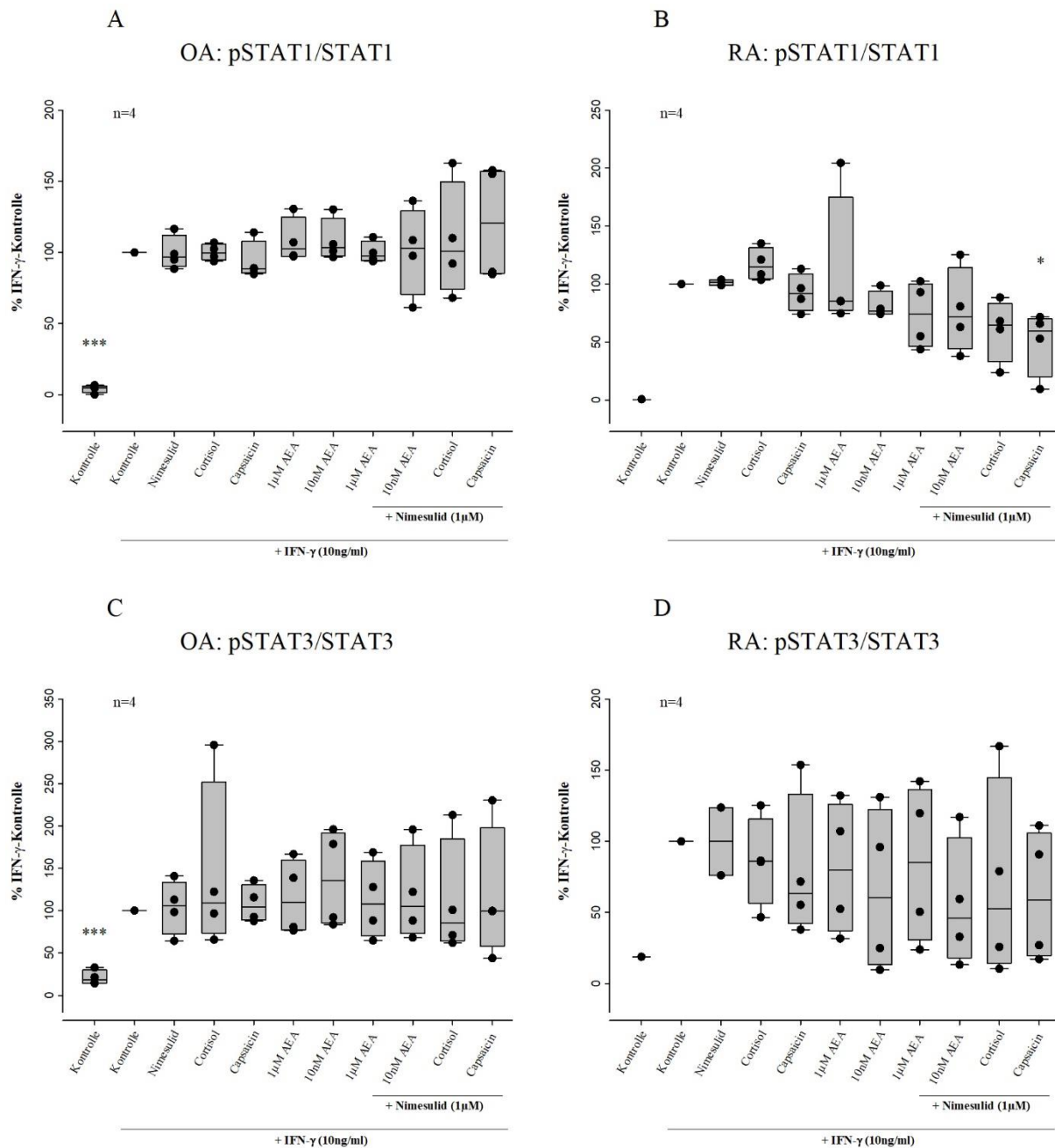
Die Aktivierung von STAT3(A, B) ERK (C, D) und p38 (E, F) wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT3, ERK bzw. p38 dargestellt. Unterschiede zum Zeitpunkt t = 0 wurden mit dem paired t-test berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zum Zeitpunkt t = 0 sind im Graphen mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median. Unterhalb jedes Graphen wird ein repräsentativer Westernblot gezeigt.



6.3. Modulation der IFN- γ -induzierten Kurzzeitaktivierung von STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 durch Cortisol, AEA, Capsaicin und Nimesulid

Um die IFN- γ -vermittelte Aktivierung der untersuchten Signalwege zu modulieren, wurden die SF mit Cortisol, AEA und Capsaicin alleine und dann in Kombination mit dem COX-2-Inhibitor Nimesulid für 5 h vorinkubiert. OASF zeigten, wie bereits im vorhergehenden Versuchsteil nachgewiesen, nach 30 min Stimulation mit IFN- γ eine hochsignifikante Aktivierung ($p < 0,001$) von STAT1 ($100\% \pm 0\%$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($4,2\% \pm 2,7\%$). Die IFN- γ -induzierte STAT1-Aktivierung konnte bei OASF durch Zugabe der Modulatoren nicht signifikant beeinflusst werden. Bei RASF konnte die Aktivierung durch Capsaicin in Kombination mit Nimesulid ($50\% \pm 28\%$) signifikant gesenkt werden. Cortisol bewirkte, wenn auch nicht signifikant, bei RASF tendenziell eine Verstärkung der IFN- γ -induzierten STAT1-Phosphorylierung ($p = 0,09$), während Cortisol in Kombination mit Nimesulid die STAT1-Phosphorylierung hemmte ($p = 0,06$). Durch AEA zeigte sich keine Beeinflussung der STAT1-Aktivierung. Die INF- γ -induzierte STAT3-Aktivierung konnte weder bei RASF noch bei OASF signifikant beeinflusst werden (siehe Abb.4).

Die IFN- γ -induzierte Aktivierung von ERK konnte im Versuchsteil 6.1. nicht nachgewiesen werden. In OASF wurde die Aktivierung von ERK sowohl durch Cortisol alleine als auch durch Cortisol in Kombination mit Nimesulid signifikant erhöht (siehe Abb.5 A). Diese Modulation war in RASF nicht feststellbar (siehe Abb.5 B). Im Versuchsteil 6.1. dargestellt, konnte die INF- γ -vermittelte Aktivierung von p38 nach 15 bzw. 30 min bei OASF signifikant gezeigt werden. Bei OASF wurde die IFN- γ -induzierte Aktivierung von p38 durch Zugabe von Modulatoren nicht weiter beeinflusst (siehe Abb.5 C). In RASF hingegen verminderte Cortisol die IFN- γ -Aktivierung von p38 auf $52\% \pm 16\%$. AEA in der Konzentration von 10nM, nicht aber 1 μ M, verminderte die p38-Aktivierung alleine auf $58\% \pm 14\%$ und in Kombination mit Nimesulid auf $58\% \pm 15\%$. Auch Capsaicin reduzierte die p38-Aktivierung alleine signifikant auf $63\% \pm 14\%$ und in Kombination mit Nimesulid sehr signifikant auf $51\% \pm 12\%$ (siehe Abb.5 D).

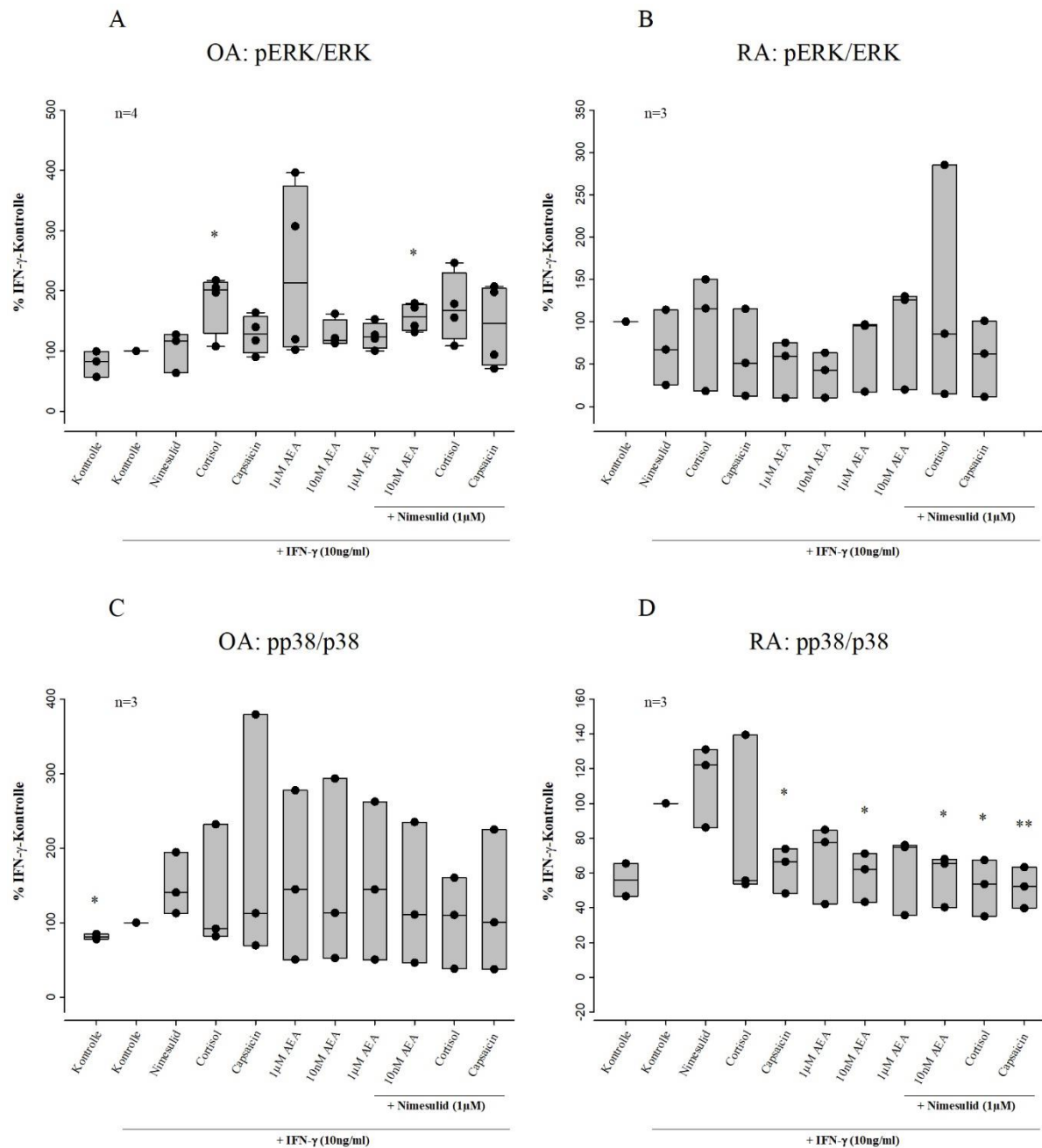
**Abb.4****Veränderung der IFN- γ -abhängigen Kurzzeitaktivierung von pSTAT1 (A, B) und pSTAT3 (C, D) in OASF und RASF durch Nimesulid, Cortisol, AEA und Capsaicin**

Die SF wurden 5 h mit „small molecule“ Modulatoren vorinkubiert, dann 30 min mit IFN- γ (10ng/ml) stimuliert. Die Aktivierung wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 bzw. STAT3 ausgedrückt und prozentual auf die nur mit IFN- γ stimulierte Kontrolle bezogen. Die Unterschiede zur IFN- γ -Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

* signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.05$)

*** hochsignifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.001$)

Abweichung von der angegebenen Stichprobenzahl n bei B und D:
 unstimulierte Kontrolle: n=1, Nimesulid: n=2

**Abb.5****Veränderung der IFN- γ -abhängigen Kurzzeitaktivierung von ERK (A, B) und p38 (C, D) in OASF und RASF durch Nimesulid, Cortisol, AEA und Capsaicin**

Die SF wurden 5 h mit den oben genannten Modulatoren vorinkubiert, dann für ERK (A, B) über 5 min und für p38 (C, D) über 30 min mit IFN- γ stimuliert. Die Aktivierung wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem ERK bzw. p38 ausgedrückt und prozentual auf die nur mit IFN- γ stimulierte Kontrolle bezogen. Die Unterschiede zur IFN- γ -Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

* signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.05$)

** sehr signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.01$)

Abweichung von der angegebenen Stichprobenzahl n.

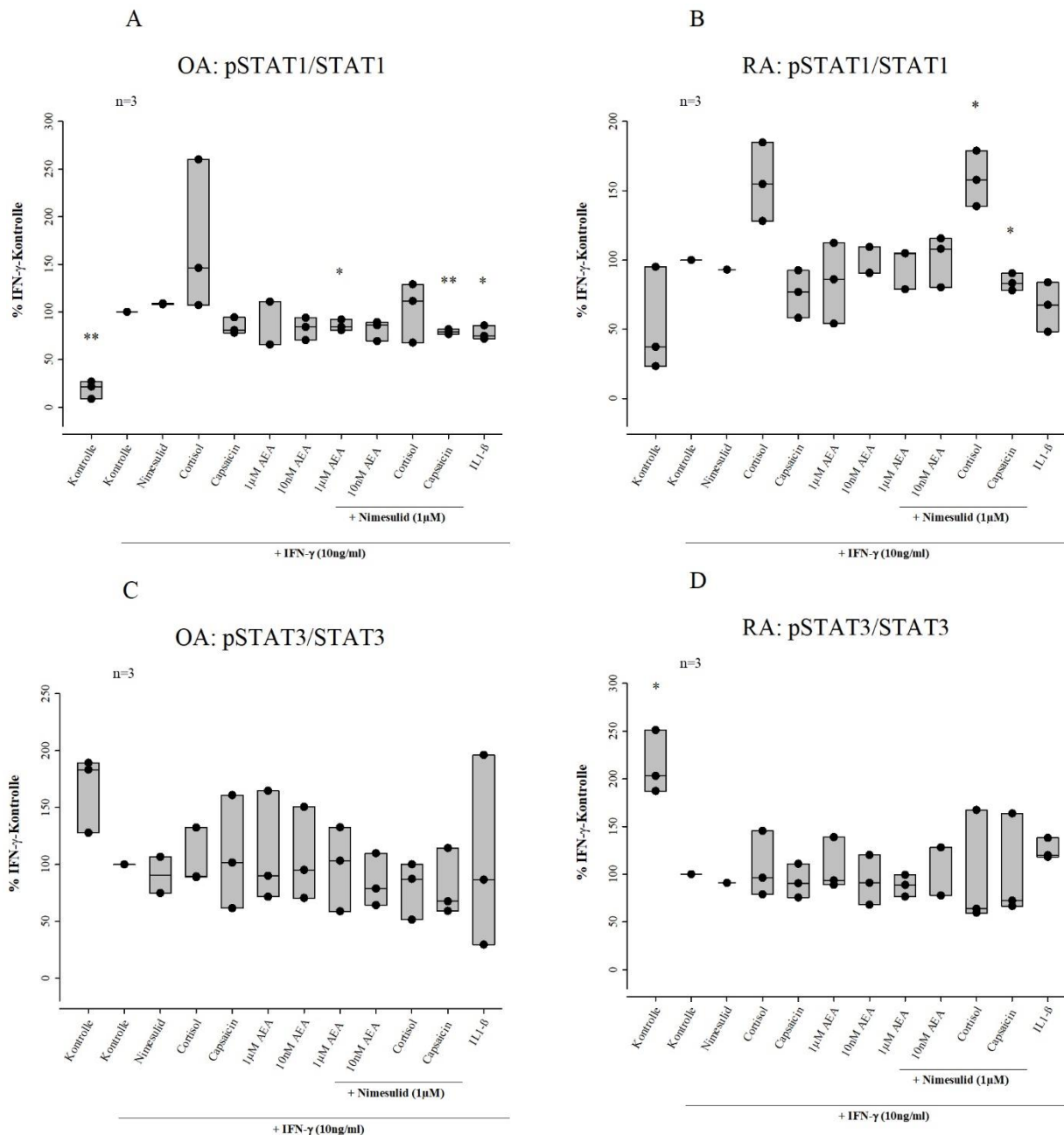
A: unstimulierte Kontrolle: n=3, Nimesulid: n=3

D: unstimulierte Kontrolle: n=2

6.4. Modulation der IFN- γ -induzierten Aktivierung von STAT1, STAT3, ERK und p38 über 48 h durch Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β

Nachdem bei kurzzeitiger Stimulation mit IFN- γ kaum Effekte auf die STAT1-Phosphorylierung durch Cortisol, AEA, Capsaicin und Nimesulid detektierbar waren, wurde in einem weiteren Schritt der Effekt dieser Verbindungen auf die Langzeitaktivierung von STAT1 durch IFN- γ getestet. Hierfür wurden OASF und RASF 5 h mit Cortisol, AEA und Capsaicin jeweils einzeln und in Kombination mit Nimesulid oder alleine mit IL-1 β vorinkubiert. Anschließend wurde für 48 h mit IFN- γ stimuliert. Die Aktivierung von STAT1 stieg in OASF nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($19\% \pm 9\%$) signifikant auf 100% ($p=0,005$) (siehe Abb.6 A). In RASF zeigte sich ein ähnlicher Trend, erreichte aber keine Signifikanz ($p=0,16$) (siehe Abb.6 B). Capsaicin alleine verminderte die IFN- γ -induzierte STAT1-Aktivierung sowohl in OASF ($p=0,09$) als auch in RASF ($p=0,14$) nicht. In Kombination mit Nimesulid senkte Capsaicin die STAT1-Aktivierung signifikant auf $79\% \pm 3\%$ in OASF ($p=0,005$) und $84\% \pm 6\%$ ($p=0,046$) in RASF. Während AEA in RASF keine Beeinflussung der STAT1-Phosphorylierung in allen getesteten Konzentrationen zeigte, konnte in OASF bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ in Kombination mit Nimesulid ein Abfall der Aktivierung auf $86\% \pm 6\%$ beobachtet werden ($p=0,049$). Cortisol hatte keine Auswirkungen auf die STAT1-Aktivierung in OASF, verstärkte aber tendenziell die Aktivierung von STAT1 in RASF ($p=0,08$). In Kombination mit Nimesulid förderte Cortisol die STAT1-Aktivierung in RASF ($159\% \pm 20\%$) signifikant ($p=0,037$). Das Zytokin IL-1 β erniedrigte die STAT1-Aktivierung signifikant in OASF auf $78\% \pm 7\%$ ($p=0,034$) und tendenziell in RASF ($p=0,083$) (siehe Abb.6 A und B).

Die Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit IFN- γ fiel im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle über 48 h in RASF im Sinne einer Deaktivierung signifikant von $214\% \pm 33\%$ auf 100% ab ($p=0,027$) (siehe Abb.6 D). In OASF zeichnete sich ein ähnlicher Trend der Deaktivierung von STAT3 durch IFN- γ ab ($p=0,08$) (siehe Abb.6 C). Im direkten Vergleich zwischen OASF und RASF zeigte sich bei letzterem eine signifikant stärkere Aktivierung von STAT3 nach 48 h. 5-stündige Vorinkubation mit Cortisol, AEA; Capsaicin und Nimesulid zeigte keine signifikante Beeinflussung der Aktivierung. Das Zytokin IL-1 β bewirkte in OASF keinen eindeutigen Effekt. Bei RASF vermittelte IL-1 β tendenziell eine verstärkte STAT3-Aktivierung ($p=0,06$) (siehe Abb.6 C und D).

**Abb.6****Veränderung der IFN- γ -abhängigen Langzeitaktivierung von pSTAT1 (A, B) und pSTAT3 (C, D) in OASF und RASF durch Cortisol, Capsaicin, AEA, Nimesulid und IL-1 β**

Die SF wurden 5 h mit den oben genannten „small molecule“-Modulatoren oder IL-1 β vorinkubiert, dann 48 h mit IFN- γ stimuliert. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 bzw. STAT3 ausgedrückt und prozentual auf die nur mit IFN- γ stimulierte Kontrolle bezogen. Die Unterschiede zur IFN- γ -Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

* signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.05$)

** sehr signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.01$)

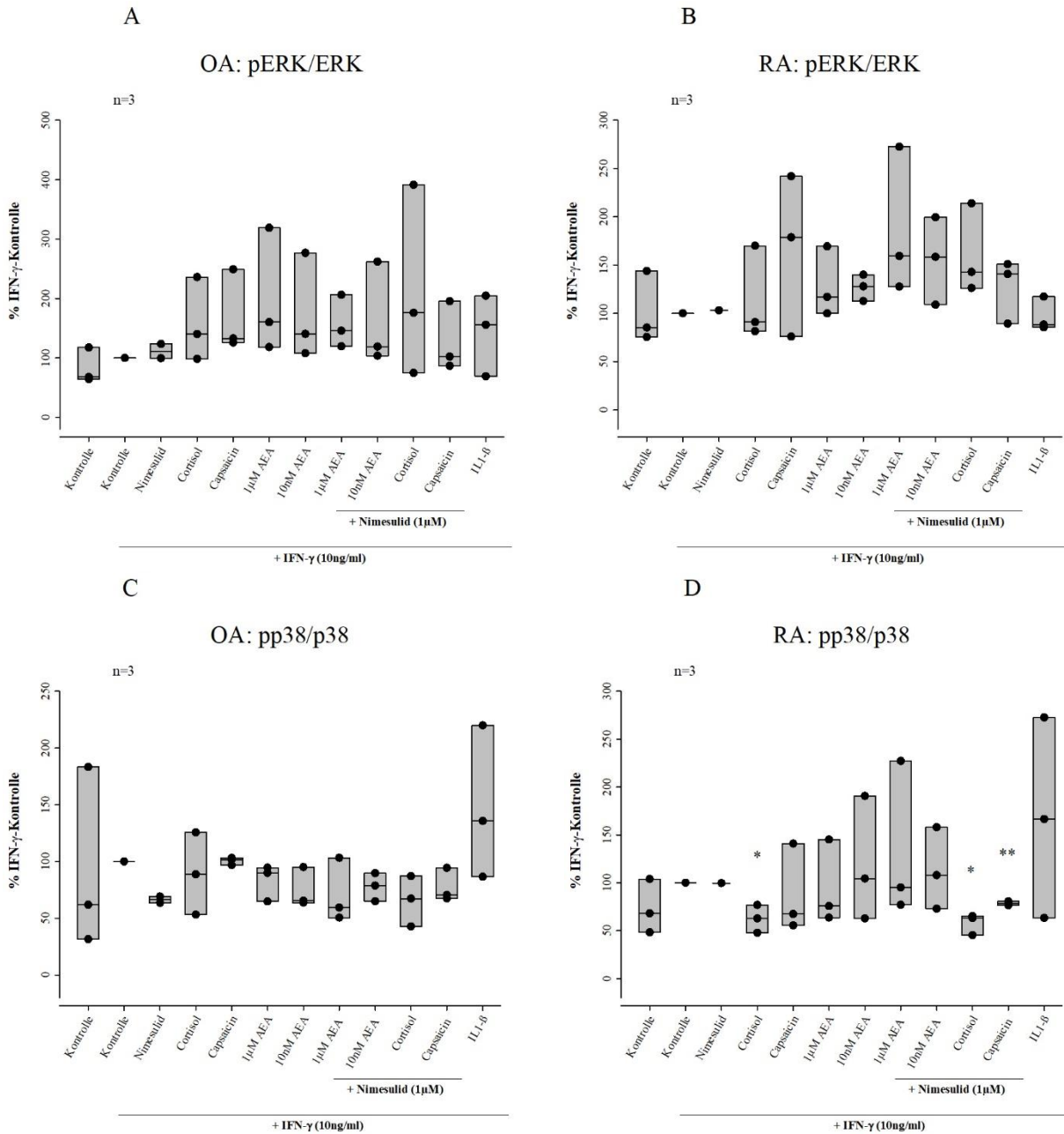
Abweichung von der angegebenen Stichprobenzahl n bei Versuchsteil „nur Nimesulid“:

A und C: n=2

B und D: n=1

Wie schon nach Kurzzeitstimulation über 30 min mit $\text{INF-}\gamma$, ergab sich auch nach 48-stündiger $\text{INF-}\gamma$ -Stimulation keine eindeutige Änderung der Aktivierung von ERK1/2 (siehe Abb.7 A und B). Es ergab sich zudem keine Modulation der ERK-Aktivierung nach Vorinkubation mit AEA, Capsaicin, Cortisol und Nimesulid. In RASF und OASF war die Erhöhung der $\text{INF-}\gamma$ -induzierten ERK-Aktivierung sowohl durch AEA alleine (1 μM und 10nM) als auch in Kombination mit Nimesulid nur in der qualitativen Auswertung sichtbar, da sich eine weite Streubreite der Werte zeigte. Das Zytokin IL-1 β bewirkte keine signifikante Modulation der ERK1/2-Aktivierung nach 48 h.

Eine Modulation der Aktivierung von p38 nach 48 h durch $\text{INF-}\gamma$ konnte ebenfalls nicht signifikant gezeigt werden (siehe Abb.7 C und D). Auffallend war die signifikante Hemmung der p38-Aktivierung durch Cortisol alleine ($p=0.046$) und in Kombination mit Nimesulid ($p=0.022$) in RASF, nicht aber in OASF. Des Weiteren inhibierte auch Capsaicin die p38-Phosphorylierung in RASF signifikant ($p=0.003$).

**Abb.7****Modulation der IFN- γ -abhängigen Langzeitaktivierung der MAPKs ERK1/2 (A, B) und p38 (C, D) in OASF und RASF durch Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β**

Die SF wurden 5 h mit den genannten Modulatoren oder IL-1 β vorinkubiert, dann 48 h mit IFN- γ stimuliert. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wird durch den Quotienten aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem ERK bzw. p38 ausgedrückt und prozentual auf die nur mit IFN- γ stimulierte Kontrolle bezogen. Unterschiede zur IFN- γ -Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

* signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.05$)

** sehr signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.01$)

Abweichung von der angegebenen Stichprobenzahl n bei Versuchsteil „nur Nimesulid“:

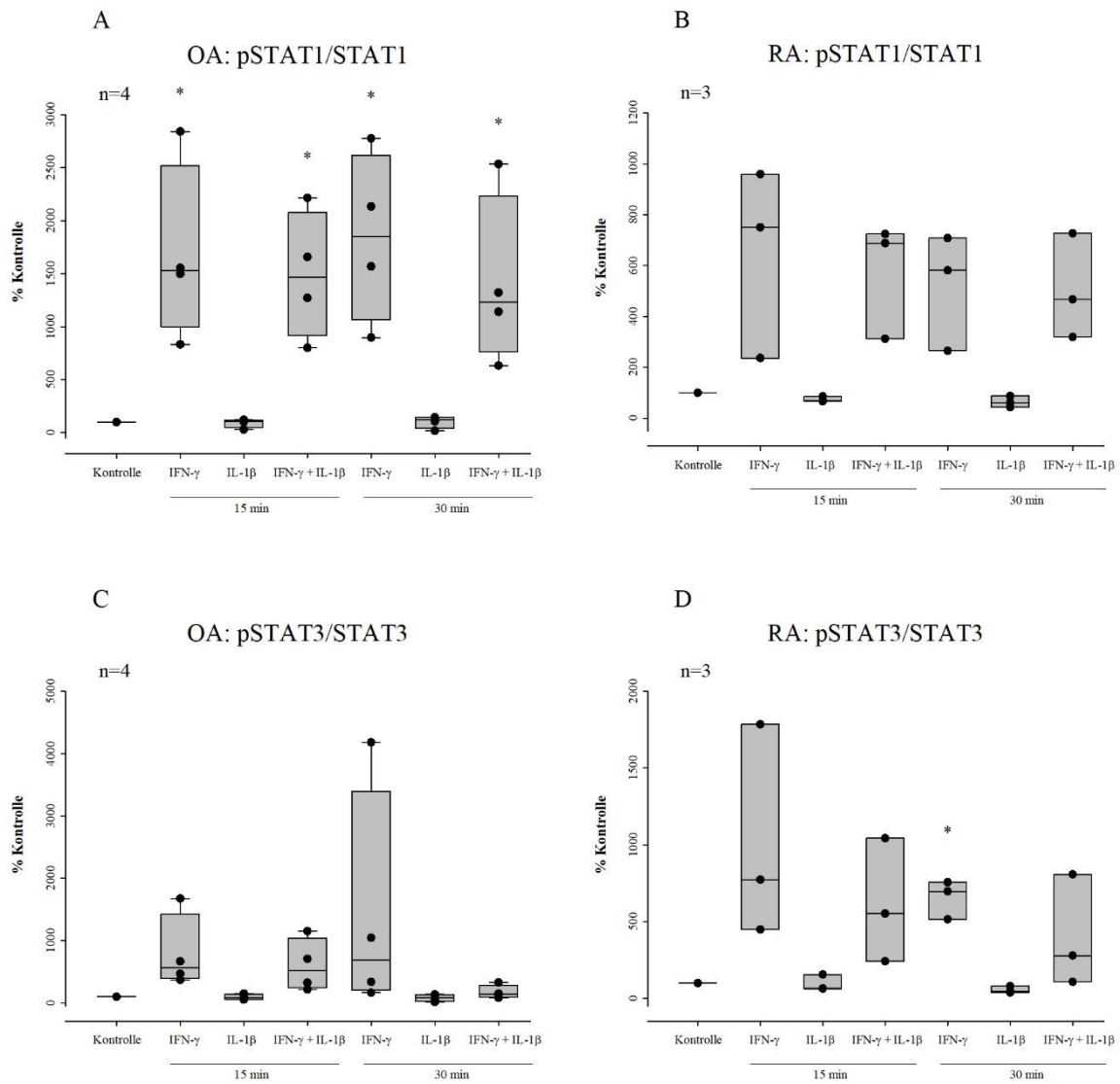
A und C: n=2

B und D: n=1

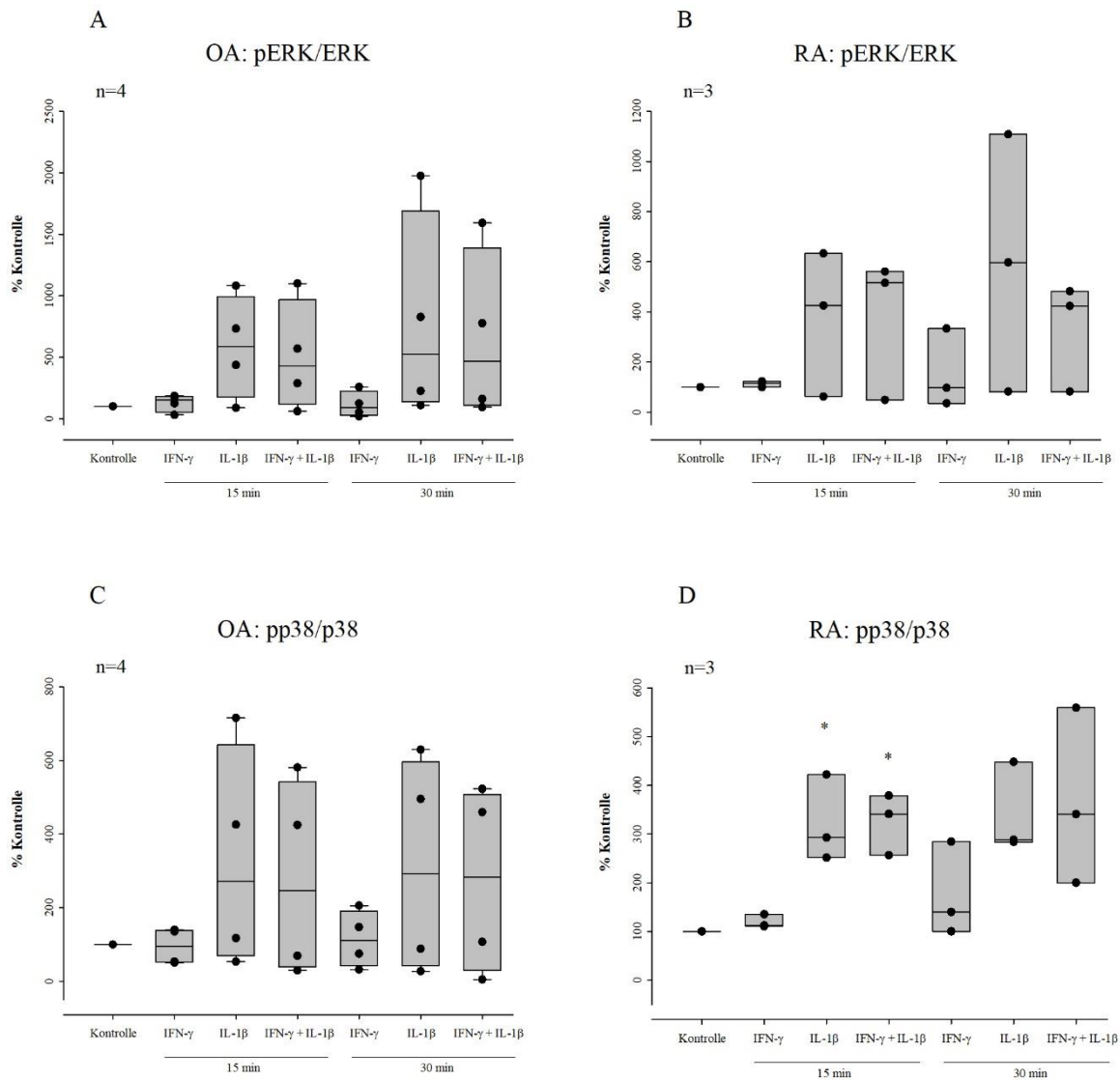
6.5. Modulation der IFN- γ -abhängigen Kurzzeitaktivierung von STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 durch IL-1 β

In diesem Teilversuch wurden OASF und RASF für jeweils 15 und 30 min mit IFN- γ und IL-1 β inkubiert. Um die gegenseitige Beeinflussung der Signalwege dieser Zytokine zu untersuchen, wurde mit IFN- γ und IL-1 β zudem für 15 min und 30 min kombiniert stimuliert. Wie in den Vorversuchen bestätigte dieser Versuchsteil, dass IFN- γ , nicht aber IL-1 β , die Aktivierung von STAT1 (siehe Abb.8 A und B) und STAT3 (siehe Abb.8 C und D) induziert. Die IFN- γ -induzierte-Aktivierung von STAT1 stieg in OASF im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant nach 15 min auf $1681\% \pm 840\%$ ($p=0,033$) und nach 30 min auf $1844\% \pm 802\%$ ($p=0,022$). In OASF stieg die Aktivierung nach Kostimulation mit IFN- γ und IL-1 β nach 15 min auf $1487\% \pm 600\%$ ($p=0,019$) und nach 30 min auf $1408\% \pm 806$ ($p=0,048$). Aufgrund niedriger Versuchszahl und Schwankungen im Ausmaß der Aktivierung war die Aktivierung von STAT1 in RASF und von STAT3 in OASF nicht signifikant. IFN- γ wurde nach 30 min in RASF signifikant aktiviert. Da sich im t-test keine signifikanten Unterschiede zwischen Kostimulation und IFN- γ -Kontrolle ergaben, ist von keiner Beeinflussung der IFN- γ -induzierten Aktivierung durch IL-1 β auszugehen. In der quantitativen Analyse ergab sich bei RASF keine signifikante Hemmung der IFN- γ -induzierten STAT3-Aktivierung durch IL-1 β über 30 min ($p=0,298$).

Die MAPKs ERK und p38 wurden stark durch IL-1 β aktiviert. Aufgrund niedriger Versuchszahlen wurde keine Signifikanz erreicht (siehe Abb.9). Die IL-1 β -induzierte ERK-Aktivierung fiel nach 30 min tendenziell stärker aus als nach 15 min. Wie im Vorversuch war die Aktivierung von p38 durch IL-1 β nach 15 min in RASF auf $322\% \pm 89\%$ ($p=0,050$) signifikant gesteigert. Bei zusätzlicher Inkubation mit IFN- γ blieb die Aktivierung weiterhin signifikant auf $325\% \pm 63\%$ ($p=0,025$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erhöht. Weder für ERK noch für p38 ergab sich bei gleichzeitiger Inkubation mit IFN- γ und IL-1 β ein signifikanter Unterschied zur Aktivierung durch alleinige IL-1 β -Stimulation.

**Abb.8****Einfluss von IL-1 β auf die IFN- γ -induzierte Aktivierung von STATs.**

OASF und RASF wurden für jeweils 15 und 30 min mit 10ng/ml IFN- γ und 1ng/ml IL-1 β alleine und in Kombination stimuliert. Die Aktivierung von STAT1 (A, B) und STAT3 (C, D) wird durch den Quotienten aus phosphorylierter und unphosphorylierter Form dargestellt. Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind im Graph mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

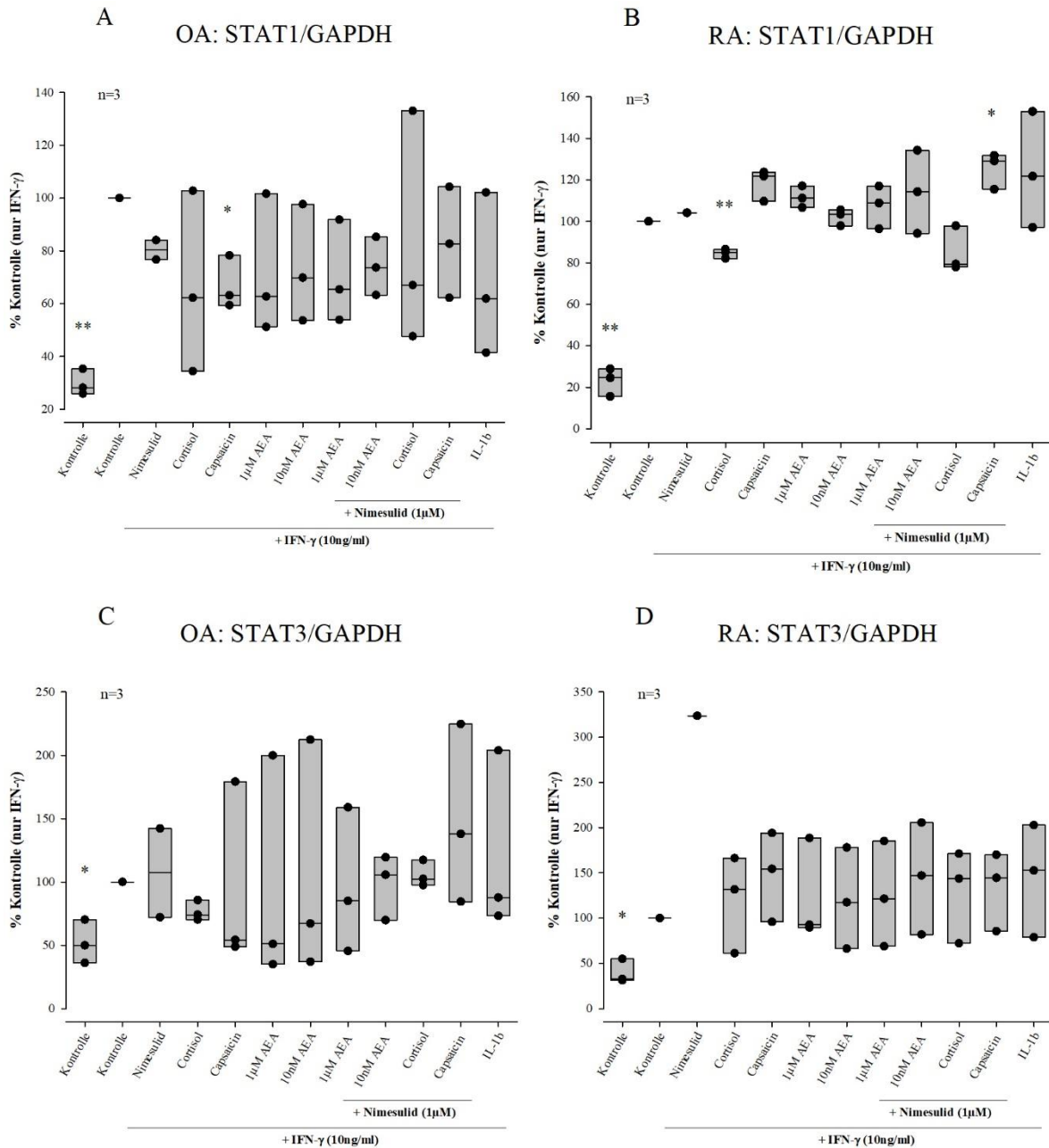
**Abb.9****Einfluss von IFN- γ auf die IL-1 β -induzierte Aktivierung von p38 und ERK.**

OASF und RASF wurden für jeweils 15 und 30 min mit 10ng/ml IFN- γ und 1ng/ml IL-1 β alleine und in Kombination stimuliert. Die Aktivierung von ERK (A, B) und p38 (C, D) wird durch den Quotienten aus phosphorylierter und unphosphorylierter Form dargestellt. Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

6.6. Veränderung der Menge von unphosphoryliertem STAT1, STAT3, ERK und p38 durch IFN- γ über 48 h und zusätzlicher Einfluss von Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β

Da neben den phosphorylierten Formen auch die nicht-phosphorylierten Formen von STAT1 und STAT3 Signale in der Zelle übertragen können (57), wurde im nächsten Versuchsteil die Änderung der Gesamtmenge von STAT1 und STAT3 in OASF und RASF untersucht. Die Menge von unphosphoryliertem STAT1 stieg signifikant durch 48-stündige IFN- γ -Stimulation in OASF auf 330% ($30\% \pm 5\%$ auf 100%) und in RASF auf 420% ($23\% \pm 7\%$ auf 100%) der unstimulierten Ausgangsmenge (siehe Abb.10 A und B). Vorinkubation mit Cortisol verringerte die STAT1-Expression in RASF signifikant auf $84\% \pm 2\%$ ($p=0.007$) im Vergleich zur IFN- γ -Kontrolle. Die Kombination aus Cortisol und Nimesulid reduzierte die IFN- γ -induzierte STAT1-Menge ebenfalls, wenn auch nicht signifikant auf $85\% \pm 11\%$ ($p=0,145$). Capsaicin steigerte die IFN- γ - induzierte STAT1-Menge in RASF tendenziell auf $118 \pm 8\%$ ($p=0,053$) und in Kombination mit Nimesulid signifikant auf $125\% \pm 9\%$ ($p=0,037$). Interessanterweise wurde die IFN- γ -induzierte STAT1-Menge in OASF durch Capsaicin dagegen auf $66\% \pm 10\%$ ($p=0,029$) reduziert. Die Menge von STAT3 wurde durch 48-stündige IFN- γ -Stimulation signifikant in RASF auf 250 % ($40\% \pm 13\%$ auf 100%) und in OASF auf 190% ($52\% \pm 17\%$ auf 100%) erhöht (siehe Abb. 10 C und D). Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β nahmen keinen Einfluss auf die INF- γ -induzierte STAT3-Expression.

Die Gesamtmenge von ERK wurde durch 48-stündige IFN- γ -Stimulation in OASF von $123\% \pm 5\%$ auf 100% reduziert ($p=0,014$) (siehe Abb. 11 A), während sich bei RASF die ERK-Menge nicht änderte (siehe Abb. 11B). IFN- γ in Kombination mit AEA (1 μ M) verminderte die ERK-Expression weiter auf $80\% \pm 8\%$ ($p=0,046$) in OASF. Die übrigen getesteten „small molecule“-Modulatoren beeinflussten die IFN- γ -induzierte Minderung der ERK-Menge nicht (siehe Abb.11 A und B). Bezüglich der Menge von p38 in RASF und OASF ergab sich keine Veränderung durch IFN- γ -Stimulation alleine und in Kombination mit „small molecule“-Modulatoren (siehe Abb.11 C und D).

**Abb.10****Veränderung der STAT1- und STAT3-Menge durch IFN- γ und zusätzliche Stimulation mit Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β .**

OASF und RASF wurden 5 h mit den oben genannten „small molecule“-Modulatoren oder 1ng/ml IL-1 β vorinkubiert, dann für weitere 48 h zusätzlich mit 10ng/ml IFN- γ stimuliert. Die intrazelluläre Menge von STAT1 (A, B) und STAT3 (C, D) wird durch den Quotienten aus unphosphorylierter Form und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) dargestellt. Unterschiede zur IFN- γ -Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

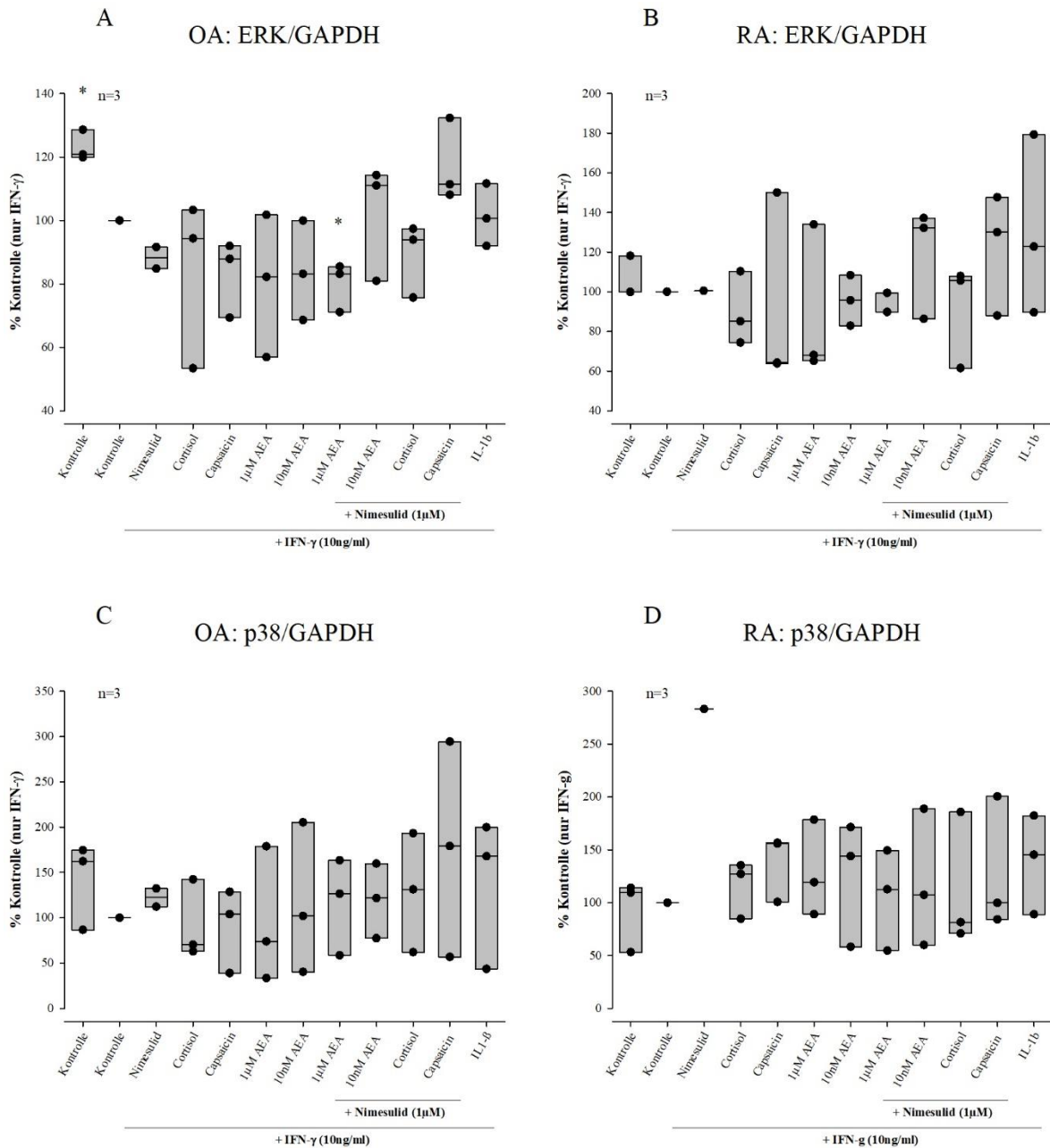
* signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.05$)

** sehr signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.01$)

Abweichung von der angegebenen Stichprobenzahl n bei A und C:

Abbildung A und C: Nimesulid n=2

Abbildung B und D: Nimesulid n=1

**Abb.11****Veränderung der ERK1/2- und p38 Menge durch IFN- γ und zusätzliche Stimulation mit Cortisol, AEA, Capsaicin, Nimesulid und IL-1 β .**

OASF und RASF wurden 5 h mit den oben genannten „small molecule“-Modulatoren oder 1 ng/ml IL-1 β vorinkubiert, dann für weitere 48 h zusätzlich mit 10 ng/ml IFN- γ stimuliert. Die intrazelluläre Menge von ERK (A, B) und p38 (C, D) wird durch den Quotienten aus unphosphorylierter Form und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) dargestellt. Unterschiede zur IFN- γ -Kontrolle wurden mit dem paired t-test berechnet. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Jede Box markiert den Abstand zwischen 25. und 75. Perzentile. Horizontale Striche außerhalb der Boxplots markieren die 10. und 90. Perzentile, die horizontale Linie im Boxplot den Median.

* signifikant zur IFN- γ -Kontrolle ($p < 0.05$)

Abweichung von der angegebenen Stichprobenzahl n bei Versuchsteil „nur Nimesulid“:

A und C: n=2

B und D: n=1

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von IFN- γ auf die Aktivierung/Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 in synovialen Fibroblasten untersucht. Dabei wurden sowohl die Effekte von IFN- γ alleine als auch in Kombination mit Cortisol, den TRPV-Liganden Capsaicin und AEA, dem COX-2-Inhibitor Nimesulid und dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β betrachtet.

Mit Ausnahme von IL-1 β und Capsaicin sind diese Substanzen in der Literatur als antiinflammatorisch bei RA beschrieben, wobei außer bei Cortisol der intrazelluläre Wirkmechanismus noch nicht genau aufgeklärt wurde (58). In dieser Studie sollte daher der Einfluss auf den wichtigen proinflammatorischen Signalweg von IFN- γ geklärt werden. Eine Modulation des IFN- γ -Signalwegs könnte die Produktion von Zytokinen und Chemokinen beeinflussen und deshalb die Entzündung im Rahmen der RA modulieren. Neben IFN- γ wurde auch das Signalling von IL-1 β untersucht, da IL-1 β andere intrazelluläre Signalwege aktiviert und in unserem Labor bereits eine gegenseitige, negative Beeinflussung von IFN- γ und IL-1 β in Bezug auf Zytokinproduktion gezeigt wurde.

In ersten Versuchen wurde die Aktivierungskinetik der intrazellulären Kinasen von STAT1/STAT3, ERK und p38 nach Stimulation mit IFN- γ herausgearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass die IFN- γ -induzierte Aktivierung von STAT1 und STAT3 in OASF und RASF nach 15 bis 30 min ein Maximum erreicht und anschließend wieder abfällt. Nach 48 h Inkubation mit IFN- γ war nach wie vor ein starkes pSTAT1-Signal detektierbar, während bei STAT3 keine Phosphorylierung mehr nachweisbar war.

Die starke Aktivierung von STAT1 nach 30-minütiger IFN- γ -Stimulation deckt sich mit Ergebnissen von Haspel et al., in denen eine ähnliche STAT1-Aktivierungskinetik nach IFN- γ -Stimulation in Bud-8-Fibroblasten gezeigt wurde (59). In dieser Studie erreichte die DNA-Bindungsaktivität von STAT1 nach 30 min ein Maximum, blieb über 90 min stark erhöht und fiel über 4 h bis auf 5-10% der Maximalbindungsaktivität ab (59). Haspel et al. belegten, dass ein Proteinkinaseinhibitor die Signalübertragung vom Rezeptor hemmt und damit die pSTAT1-Menge und die DNA-Aktivierung gleichermaßen senkt. Aus der zeitlichen Korrelation der DNA-Bindungsaktivität von STAT1 mit der Präsenz von phosphoryliertem STAT1 im Kern leiteten Haspel et al. ein zusammenhängendes Downstream-Signalling ab (59). Bei maximaler Aktivierung nach 30 min befanden sich 25% der STAT1-Menge der Zelle in phosphoryliertem Zustand im Kern. Die Gesamtmenge von phosphoryliertem und

unphosphoryliertem STAT1 in der Zelle blieb dabei in dem getesteten Zeitraum von 4 h laut Studie von Haspel et al. konstant. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung pSTAT1/STAT1 in unserem Versuch in den ersten Versuch als quantitative Aussage betrachtet werden kann. Versuche mit Phosphataseinhibitoren und einem Proteasominhibitor zeigten, dass Proteolyse als Inaktivator der STAT1 Aktivierung nicht im Kern, sondern lediglich auf der Ebene der α -Kette des IFN- γ -Rezeptors angreift, während für die Beendigung der DNA-Bindungsaktivität von aktiviertem STAT1 hauptsächlich Phosphatasen verantwortlich sind (59).

Die IFN- γ -induzierte Aktivierung von STAT3 erreichte in der vorgelegten Studie ebenfalls nach 30 min ein Maximum. Dies korreliert mit dem Ergebnis von Quing et al., die ebenfalls nach 30 bis 60 min ein Maximum der STAT3-Aktivierung durch Stimulation mit IFN- γ in embryonalen Mausfibroblasten feststellten (60).

Nach prolongierter Inkubation mit IFN- γ konnte in der vorliegenden Studie nach 48 h weiterhin eine deutliche Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden. Im Ergebnisteil 6.6. wurde festgestellt, dass auch die Expression von unphosphoryliertem STAT1 nach 48 h stark erhöht ist. Cheon et al. zeigten übereinstimmend mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie an immortalisierten Epithelzellen der Brustdrüse eine erhöhte Synthese von unphosphoryliertem STAT1 noch nicht nach 8 h, jedoch nach 24 h und 48 h (38). Der STAT1-Anstieg war gleichbleibend und unabhängig von der INF- γ -Konzentration, während der Anstieg von pSTAT1 proportional zur INF- γ -Konzentration verlief (38). Cheon et al. konnten nach 8 h kein phosphoryliertes STAT1 mehr nachweisen. Quing et al. hingegen zeigten in embryonalen Mausfibroblasten in Übereinstimmung mit dem vorliegenden Ergebnis einen initialen INF- γ -induzierten Anstieg der pSTAT1-Menge, die dann mindestens über den untersuchten Zeitraum von 16 h konstant blieb. Dabei induzierte IFN- γ über diesen Zeitraum auch hier die Synthese von STAT1 (60). Um den Anstieg von STAT1 über 48 h zu berücksichtigen, wurde für die Beschreibung der Aktivierung von STAT1 in der vorliegenden Studie nicht allein die pSTAT1-Menge, sondern der Quotient der Gesamtmenge von pSTAT1 und STAT1 in der Zelle herangezogen. Unphosphoryliertes STAT1 kann selbst Genexpression von IFI27, OAS1 und LMP2 initiieren, welche vorwiegend immunmodulatorische Funktion aufweisen (57,61). Der größte Anteil des infolge von IFN- γ -Stimulation neu synthetisierten, unphosphorylierten STAT1 befindet sich nach 48 h im Kern (57). Die STAT1-induzierte Genexpression überschneidet sich nur teilweise mit dem

pSTAT1-induzierbaren Genspektrum (57). Interessanterweise unterliegt der Kerntransport von pSTAT1 und STAT1 unterschiedlichen Importmechanismen (62).

Die Aktivierung von STAT3 fiel in vorliegendem Versuch nach 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ unter das Ausgangsniveau, während die Gesamtmenge von unphosphoryliertem STAT3 anstieg. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Studie von Quing et al., die an Versuchen mit embryonalen Mausfibroblasten maximale IFN- γ -induzierte Phosphorylierung von STAT3 nach 30 bis 60 min und deren kontinuierlichen Abfall über 6 h nachwies. Im untersuchten Zeitrahmen von 16 h stieg die Menge von nicht-phosphoryliertem STAT3 bei Quing et al. kontinuierlich an (60). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Trend der Aktivierung von STAT1 und STAT3 in Korrelation mit den Ergebnissen der Studie von Quing et al. über 48 h fortsetzt.

Die in dieser Studie gezeigte IFN- γ -induzierte STAT1-Aktivierung blieb über Tage erhalten, während die STAT3-Aktivierung wieder abfiel. STAT1-Signalling aktiviert antiproliferative Prozesse (63). In einer Studie an Sarkomzellen wurde beispielsweise nachgewiesen, dass STAT1-defiziente Zellen eine verminderte IFN- γ -vermittelte Expression protektiver Apoptoseproteine zeigen, was durch STAT1-Transfektion reinduziert werden kann (64). IFN γ R- oder STAT1-Knockout-mäuse entwickeln schneller und früher chemisch induzierte oder durch p53-Defizienz getriggerte Tumore als Wildtypmäuse (65). In Chondrozyten von Wildtypmäusen im Vergleich mit STAT1-Knockout-Mäusen wirkt FGF-induziertes STAT1 antiproliferativ (66). Aus diesen Studien kann in der Zusammenschau eine antiproliferative Funktion von STAT1 abgeleitet werden. Die langfristige STAT1-aktivierende Wirkung von IFN- γ im Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann damit protektiv im Hinblick auf Intimahyperproliferation und Pannusbildung bei RA bewertet werden.

Die Wirkung von STAT3 auf die Zellproliferation ist weniger eindeutig als bei STAT1, wobei zelltypabhängig proliferative, antiapoptotische Signale überwiegen (63). RASF mit funktionslosem STAT3 zeigen vermindertes Wachstum und verstärkte Apoptoseneigung (67). Zudem vermittelt STAT3 die IL17-induzierte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in RASF (68) und vermindert die Expression des Apoptose-induzierenden Proteins FAS an der Zelloberfläche von Melanomzellen (69). Als weitere pathogene Eigenschaft fördert STAT3 die Differenzierung von TH17-Zellen, die wiederum die Differenzierung von TREG-Zellen inhibieren (70). Außerdem vermittelt STAT3 hypoxieinduzierte Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL6 und IL8, Zellmigration und -invasion (71). Hypoxie aktiviert STAT3 in RA, was zur Produktion von MMPs und Knochendestruktion führt (71).

Antiinflammatorisch wirkt der IFN- γ -Signalweg sowohl über STAT1 als auch STAT3 in SF durch Aktivierung der Transkription der Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IFN- γ induziert IDO1 in SF, was zu Tryptophankatabolismus und -depletion führt und dadurch die TH1-Antwort in Synovialgewebe hemmt (72). Dabei ist von einer STAT-abhängigen IDO-Induktion auszugehen, da auch in neonatalen Makrophagen IL27-induziertes aktiviertes STAT1 und STAT3 an die IDO-Promotorregion bindet (73). In der Zusammenschau der Funktionen von STAT1 und STAT3 ist bei langfristiger Aktivierung von STAT1 über 48 h bei lediglich kurzfristiger Aktivierung von STAT3 nach dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit in SF, übereinstimmend mit Studien in vivo, von einem überwiegend protektiven Effekt von IFN- γ in RA auszugehen. Eine Studie von Vermeire et al. zeigte beispielsweise, dass Mäuse mit defektem IFN- γ -R schneller Arthritis entwickeln als die Kontrollgruppe (35).

Es ist bekannt, dass sich STAT1 und STAT3 in Bezug auf ihre Aktivierung gegenseitig beeinflussen (74). Der zugrundeliegende Signalmechanismus in SF muss in weiterführenden Studien geklärt werden. Das gezeigte Phänomen könnte durch gegenseitige Inhibition von STAT1 und STAT3 über die rückkoppelnde Induktion von Suppressors of cytokine signalling (SOCS), Konkurrenz um die Bindungsstelle am IFN- γ -Rezeptor und direkte Hemmung über DNA-Bindung an negativ regulatorische Elementen bedingt sein (74). Zudem begrenzen STAT1 und STAT3 die jeweilige Homodimerbildung über Heterodimerbildung STAT1-STAT3 (74). Die Funktion der STAT1-STAT3-Heterodimere als Transkriptionsfaktoren ist noch unzureichend verstanden (63).

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wird STAT1 durch IFN- γ über 90 min in OASF stärker aktiviert als in RASF. Interessanterweise beobachteten Kasperkovitz et al. als Ausgangssituation, dass die STAT1-Menge in RASF in vitro höher ist als in OASF (75). In Korrelation mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit ergab sich in einer Studie von Chan et al. an peripheren Blutmonozyten, dass die IFN- γ -induzierte SOCS1-mRNA-Expression bei OA-Patienten höher ist als bei RA-Patienten (76). Die Transkription von SOCS wird bekannterweise über den JAK-STAT-Signalweg induziert (77,78).

STAT3 hingegen wird durch IFN- γ in RASF stärker aktiviert als in OASF. Dies korreliert mit Ergebnissen von Gao und McCormick, die gezeigt haben, dass STAT3 in Synovialgewebe bei RA im Vergleich zur gesunden Kontrolle ebenso basal stärker aktiviert ist (71). In Folge wird die Produktion proinflammatorischer Signalmoleküle wie IL6 und IL8 in RASF verstärkt (71).

In vorliegender Arbeit wurde außerdem der Einfluss von IFN- γ auf die Aktivierung der p38 MAPK und ERK1/2 untersucht. Eine Aktivierung von ERK durch IFN- γ konnte in den durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit einer Studie von Schett et al., die TNF und IL-1 β , nicht jedoch IFN- γ (30ng/ml) als potenteste Induktoren der ERK-Phosphorylierung in SF identifiziert haben (39). In einer Studie von Gough et al. hingegen konnte eine IFN- γ (1000 IU/ml)-induzierte Aktivierung von ERK mit Maximum nach 5 - 15 min an embryonalen Mausfibroblasten gezeigt werden (79). Der Einsatz unterschiedlicher IFN- γ -Konzentrationen könnte die unterschiedlichen Studienergebnisse bedingen. Es ist bekannt, dass ERK1/2 zum Teil STAT-abhängig, aber auch STAT-unabhängig aktiviert wird und eine andere Kinetik als die Aktivierung von STAT1 und STAT3 aufweist (23). In einer Makrophagenzelllinie belegten Hu et al. eine RAF1-unabhängige, aber STAT1-abhängige ERK-Aktivierung über den IFN- γ -Stimulationszeitraum von 30 min bis 8 h (80). Das Zusammenspiel multipler, noch nicht abschließend verstandener Signalwege der IFN- γ -induzierten ERK1/2-Aktivierung, unter anderem über den transaktivierten EGF-Rezeptor, Ras und JAK2-assoziiertem Raf1, könnte zudem die Variabilität der ERK1/2-Phosphorylierung im vorliegenden Versuch erklären (23).

In vorliegender Studie wurde eine Reduktion von unphosphoryliertem ERK in OASF nach 48-stündiger Inkubation mit IFN- γ festgestellt. In Korrelation zu diesem Ergebnis stellte eine Arbeit von Hu et al. ebenfalls eine Verringerung der ERK-Menge nach IFN- γ -Stimulation in einer Makrophagenzelllinie nach 2 bis 8 h fest (80).

Die ausbleibende ERK-Aktivierung kann als protektive Wirkung von IFN- γ in RA gewertet werden. Schett et al. konnten ERK-Aktivierung in Synovialgewebe von RA, nicht aber in OA nachweisen (39). Proinflammatorische Mediatoren wie TNF und IL- β aktivieren in SF über ERK die E3-Ubiquitin-Ligase Synoviolin, was zu Hyperproliferation beiträgt (81). Eindämmung von Migration und Knorpelerosion sowie weitere protektive Effekte von Glukokortikoiden in SF treten in Zusammenhang mit ERK-Inhibition auf (82).

Neben ERK wurde in dieser Studie auch die IFN- γ -induzierte Aktivierung von p38 untersucht. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte p38-Phosphorylierung bei OASF nach 60 min und bei RASF nach 15 min. Die frühere signifikante Aktivierung von p38 in RASF korreliert mit einer Studie von Schett et al., die zeigte, dass in Synovialgewebe von RA-Patienten die p38-Aktivierung deutlicher ausgeprägt ist als in Synovialgewebe von OA-Patienten (39). In der genannten Studie wird aber ebenfalls gezeigt, dass p38 vorwiegend durch IL-1 β und TNF- α , nicht jedoch durch IFN- γ aktiviert wird (39).

Nach Etablierung der Aktivierungskinetik von STAT1, STAT3, ERK1/2 und p38 wurde IFN- γ mit Cortisol, Capsaicin, AEA, Nimesulid oder IL-1 β kombiniert, um die Modulation der Phosphorylierung dieser Signalproteine zu untersuchen.

Inkubation mit Capsaicin senkte in Kombination mit Nimesulid signifikant die durch 30-minütige INF- γ -induzierte STAT1 Aktivierung in RASF. Dasselbe Ergebnis zeigte sich nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation in OASF und RASF. Die Modulation des IFN- γ -STAT1-Signalwegs könnte durch Metabolite von COX-Produkten wie 15-deoxy-delta^{12,14}-Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) hervorgerufen werden. Das Eingreifen von 15d-PGJ₂ in den STAT1-Signalweg ist beschrieben. 15d-PGJ₂ inhibiert beispielsweise die IFN- γ -induzierte STAT1-Aktivierung in pankreatischen Inselzellen von Ratten (83). 15d-PGJ₂ inhibiert über den gleichen Mechanismus die NO-Synthase in Makrophagen (84).

Vorinkubation mit Capsaicin reduzierte alleine und in Kombination mit Nimesulid die nach 30-minütiger IFN- γ -Stimulation bestehende p38-Aktivierung. Die p38-Aktivierung nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation konnte in dieser Arbeit nicht signifikant belegt werden. Die nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation bestehende p38-Aktivierung wurde durch Kostimulation mit Capsaicin und Nimesulid in RASF signifikant verringert. Capsaicin aktiviert in Fibroblasten TRPV1, einen nicht-selektiven Kationenkanal (85), dessen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 bereits in humanen dentalen Fibroblasten und humanen kornealen Fibroblasten nachgewiesen wurde (86,87). In beiden Fällen erhöhte Capsaicin dosisabhängig die IL-6-Produktion über TRPV1-induzierte p38-Phosphorylierung. In dentalen Fibroblasten hemmte Capsazepine, ein TRPV1-Antagonist, sowohl p38-Phosphorylierung als auch die IL-6-Produktion (86). In kornealen Fibroblasten wurde der gleiche Effekt durch p38-Inhibitoren hervorgerufen (87). Eine Modulation des IFN- γ -Signalwegs über TRPV1-Agonismus konnte bereits in Vorversuchen bestätigt werden. Hier zeigte der TRPV1-Agonist Resiniferatoxin eine Erhöhung der IFN- γ -induzierten Produktion von BAFF in SF. In dieser Studie konnte die Interaktion der Signalwege über den IFN- γ R und TRPV1 in RASF belegt werden.

Interessanterweise ist TRPV1 in RASF und OASF in gleichem Maße exprimiert (47). Dass TRPV1-abhängige Effekte in vorliegender Arbeit nur in RASF auftreten, kann durch Sensibilisierung von TRPV1 in proinflammatorischem Milieu erklärt werden. Der Ionenstrom durch TRPV1 wird durch den pH-Wert potenziert (88). Zudem kann das TRPV1-Signalling durch Translokation von TRPV1 aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zellmembran erhöht werden (89). Dieser Mechanismus der Translokation von TRPV1 ist beispielsweise in humanen pulmonalen Epithelzellen beschrieben (90).

Die Hemmung der nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation bestehenden p38-Aktivierung durch Capsaicin ist nur bei Kostimulation mit Nimesulid signifikant. Dieses Ergebnis könnte durch zusätzliche Aktivierung von TRPV1 durch ein COX-Produkt bedingt sein. Die Aktivierung von TRP-Kanälen durch COX-Metabolite ist bekannt (91,92). 15d-PGJ₂, ein Metabolit des COX-Produkts PGD₂, vermittelt beispielsweise TRPV1-Aktivierung und TRPV1-vermittelten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle (93). Erst bei Wegfall dieses Störfaktors durch den COX-Inhibitor Nimesulid kann die p38-Inhibition Capsaicin signifikant nachgewiesen werden.

Nachdem die IFN- γ -induzierte ERK-Aktivierung nicht signifikant belegt werden konnte, kann über die Modulation der ERK-Aktivierung keine weiterführende Aussage getroffen werden. Ob die Aktivierung von ERK speziell in synovialen Fibroblasten durch TRPV1 beeinflusst wird muss in weiterführenden Studien geklärt werden. Dies konnte an humanen kornealen Fibroblasten, nicht aber an humanen dentalen Pulpafibroblasten nachgewiesen werden (86,87). In epithelialen Linsenzellen ist TRPV1-abhängige ERK-Aktivierung gezeigt worden (94). Ebenso verläuft bei Mäusen mit Antigen-induzierter Arthritis die Schmerzleitung in dorsalen Wurzelganglien und im Rückenmarkshinterhorn gesichert über TRPV1-induzierte ERK-Aktivierung (46).

Neben Capsaicin wurde als weiterer endogener TRPV1-Agonist das Endocannabinoid AEA als Modulator der IFN- γ -abhängigen Signalwege getestet. AEA verminderte sowohl alleine als auch in Kombination mit Nimesulid die durch 30-minütige IFN- γ -Stimulation induzierte p38-Phosphorylierung in RASF. Die nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation bestehende p38-Phosphorylierung wurde durch AEA nicht moduliert. ERK-Aktivierung nach 5-minütiger IFN- γ -Stimulation wurde durch AEA-Kostimulation in OASF, nicht aber in RASF gesteigert. Das Endocannabinoid AEA bindet in erster Linie an CB₁ und CB₂ und mit geringerer Affinität an TRPV1 (95). Es ist bekannt, dass Cannabinoidrezeptoren sowohl ERK als auch p38 aktivieren (96). Da die IFN- γ -induzierte p38-Aktivierung durch AEA in vorliegendem Ergebnis gehemmt wird, ist am ehesten von einem TRPV1-vermittelten Signalling durch AEA auszugehen. AEA kann Desensitivierung von TRPV1 auslösen, die durch Phosphorylierung des TRPV1 durch die Proteinkinase C moduliert wird (97). Auch die TNF-induzierte p38-Phosphorylierung wird in RASF durch AEA reduziert (98). Da Nimesulid die Modulation der p38-Aktivierung nicht beeinflusste, besteht kein Hinweis auf eine mögliche Einflussnahme durch COX-Metabolite. Dies ist von besonderem Interesse, weil AEA selbst durch COX metabolisiert werden kann (50). Die Hemmung der IFN- γ -induzierten p38-Aktivierung durch AEA kann als protektive Wirkung bei RA gewertet werden, da p38-

Inhibitoren proinflammatorische Mediatoren in RASF hemmen (99). Interessanterweise wurde die IFN- γ -induzierte MAPK-Aktivierung bei der AEA-Konzentration 10nM signifikant verändert, nicht jedoch bei der höheren AEA-Konzentration von 1 μ M.

Weiterhin wurde der Einfluss von Cortisol auf die IFN- γ -induzierte Aktivierung von MAPK und STATs untersucht. Eine IFN- γ -induzierte ERK-Aktivierung konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Glukokortikoide induzieren Dual specificity Phosphatase 1 (DUSP1), die p38 und ERK inaktiviert (100). Dies führt in RASF und OASF zu protektiven Effekten (101,102). Die proinflammatorische TNF- α -induzierte ERK-Aktivierung wird beispielsweise durch Cortisol in SF inhibiert (82). 5-stündige Inkubation mit Cortisol kombiniert mit 5-minütiger IFN- γ -Stimulation zeigte in vorliegender Studie interessanterweise eine deutliche ERK-Aktivierung in OASF.

Obwohl eine Modulation der p38-Aktivierung durch 48-minütige IFN- γ -Stimulation in dieser Studie nicht signifikant belegt werden konnte, zeigte sich bei Kostimulation mit Cortisol eine Hemmung der p38-Phosphorylierung in RASF. Die p38-Inhibition könnte durch Glukokortikoid-getriggerte DUSP-Induktion hervorgerufen werden (100). In Korrelation mit diesem Ergebnis zeigten Toh et al., dass Dexamethason die Expression der DUSP in RASF stimuliert, was mit einer Inhibition von p38 assoziiert ist (103). In OASF zeigte sich in vorliegender Studie interessanterweise keine p38-Inhibition durch Cortisol, obgleich DUSP-Expression auch in OASF nachgewiesen ist (101)

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Vorinkubation mit Cortisol insbesondere in Kombination mit Nimesulid die IFN- γ -induzierte STAT1-Aktivierung in RASF, nicht aber in OASF, erhöht. Dieses Phänomen zeigt sich noch nicht nach 30-minütiger, aber nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation. Auffällig ist dabei, dass die Verstärkung der STAT1-Aktivierung nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation, ausgedrückt durch den Quotienten pSTAT1/STAT1, in RASF laut den Ergebnissen der vorliegenden Studie auch durch die Verminderung der STAT1-Menge bedingt ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von Hu et al. an peripheren Blutmonozyten (104). Vorinkubation mit Dexamethason verringert die durch IFN- γ -Stimulation erhöhte STAT1-Proteinexpression (104). Bei der Stimulation mit IFN- γ alleine wird über 48 h die STAT1-Menge erhöht, da pSTAT1 die Synthese von STAT induziert (57). Die Cortisol-getriggerte Verminderung der STAT1-Menge nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation könnte durch Modulation dieses Induktionsmechanismus bedingt sein. Zudem ist die die IFN- γ -induzierte Phosphorylierung von STAT1 in pulmonalen Epithelzellen nicht durch Glukokortikoide modulierbar. Dies ist spezifisch für IFN- γ , da die Induktion des

STAT1-Signalwegs über andere bekannte Aktivatoren weiterhin durch Glukokortikoide inhibierbar war (105). Neben dem Phänomen der Insensibilität für Glukokortikoid-induzierte STAT1-Inaktivierung ist in pulmonalen Epithelzellen der Mechanismus für Aktivierung des IFN- γ -STAT1-Signalwegs über Glukokortikoide bekannt. Glukokortikoide verstärken in einer pulmonalen Zelllinie DUSP-abhängig die IL-1 β -induzierte mRNA-Expression von IRF1 und C-X-C motif Protein 10 (CXCL10) (106). Da die Expression von IRF1 und C-X-C motif Protein 10 (CXCL10) auch durch den IFN- γ -STAT1-Signalling getriggert wird (107), ist eine aktivierende Verschränkung des IFN- γ -STAT1-Signalwegs und Glukokortikoid-induzierter DUSP-Aktivierung denkbar. Ob bei der Verstärkung der IFN- γ -induzierten STAT1-Aktivierung nach vorliegenden Ergebnissen in SF vergleichbar mit dem Signalling in pulmonalen Epithelzellen Glukokortikoid-induzierte DUSP-Aktivierung eine Rolle spielt, muss in Folgestudien geklärt werden. Der Signalweg der Glukokortikoid-induzierten DUSP-Aktivierung ist als Signalweg für p38- und ERK-Hemmung bekannt (100).

In dieser Arbeit führte die Stimulation von SF mit 1ng/ml IL-1 β zur Aktivierung von ERK und p38 mit einem Maximum nach 15-30min. SF reagierten somit ähnlich wie primäre humane Makrophagen, bei denen sich durch Inkubation mit 100ng/ml IL-1 β ebenfalls eine Aktivierung von ERK und p38 mit einem Maximum nach 20 min nachweisen ließ (108).

Im Folgenden wurde untersucht, ob an der Schnittstelle von STATs und MAPKs eine Interaktion der Signalwege von IFN- γ und IL-1 β vorliegt. Eine Interaktion der Signalwege in synovialen Fibroblasten ist bekannt, da IFN- γ die IL-1 β induzierte MMP1 und MMP3 in SF hemmt (109).

Die Frage gegenseitiger Beeinflussung des IL-1 β - und IFN- γ -Signallings bezüglich der Modulation der STATs und MAPKs nach dem Stimulationszeitraum von 15 und 30 min konnte aufgrund der niedrigen Versuchszahl nicht abschließend beantwortet werden. Auch wenn keine Signifikanz erreicht wurde, zeigte sich andeutungsweise, dass bei simultaner Inkubation mit IL-1 β die IFN- γ -induzierte Aktivierung von STAT1 und STAT3 nach 15 bis 30 min gehemmt wird. Bei Simultaninkubation mit IL-1 β und IFN- γ wird die Aktivierung von STAT1 im Vergleich zur Aktivierung nach alleiniger 48-stündiger IFN- γ -Stimulation in OASF signifikant, in RASF tendenziell inhibiert.

Es zeigte sich zudem keine Hemmung der IL-1 β -induzierten Aktivierung von p38 und ERK nach 30 min durch IFN- γ . Dies könnte an einer zu kurzen Inkubation mit IFN- γ liegen, da Daten von Hu et al. darauf hinweisen, dass eine Vorinkubation mit IFN- γ über Tage nötig ist,

um die IL-1 β -induzierte Signalkaskade zu beeinflussen. In primären humanen Makrophagen reduziert Vorinkubation mit IFN- γ die IL-1 β -induzierte Phosphorylierung von p38 und ERK (108). Dieser inhibitorische Effekt stellt sich allerdings nur ein, wenn IFN- γ länger als 4 h, bestenfalls 24 h, vorinkubiert wurde (108).

8. Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Grundlagen für das Verständnis der Aktivierungskinetik von STATs und MAPKs durch IFN- γ und die Wirkungsweise von „small molecule“-Modulatoren in OASF und RASF. IFN- γ aktivierte STAT1 und STAT3. Während die IFN- γ -induzierte Aktivierung von STAT1 nach 48 h weiterhin erhöht war, zeigte sich die STAT3-Aktivierung rückläufig. In geringerem Maße aktivierte IFN- γ zudem p38. IL-1 β aktivierte MAPKs stark, nicht aber STAT1 und STAT3. Signifikante Modulation der STAT1-Aktivierung durch „small-molecule“-Modulatoren zeigte sich insbesondere nach 48-stündiger IFN- γ -Stimulation jeweils bei Kostimulation mit Nimesulid: Cortisol verstärkte die STAT1-Aktivierung in RASF. AEA hingegen verminderte die STAT1-Aktivierung in OASF. Capsaicin verminderte außerdem die STAT1 Aktivierung in RASF und OASF. Cortisol, AEA und Capsaicin hemmten zudem die durch 30-minütige IFN- γ -Stimulation getriggerte p38-Aktivierung in RASF. Infolge der explorativen Herangehensweise in der vorliegenden Studie müssen die Ergebnisse mit erhöhter Stichprobenzahl reproduziert werden. Außerdem könnten die Versuche unter für arthritisches Gewebe typischen hypoxischen Bedingungen (110) wiederholt werden, da Hypoxie beispielsweise die TRPV1-Proteinexpression beeinflussen könnte. TRPV1-Expression in RASF wird nur unter Hypoxie durch TNF signifikant verstärkt (98). Erniedrigter Sauerstoffpartialdruck in Synovialgewebe bei RA korreliert sowohl mit vermehrter T- und B-Zellpräsenz in der synovialen Subintima als auch mit inflammatorischer Zytokinexpression von IFN- γ und IL-1 β in der Gelenkflüssigkeit (3). Letztendlich gilt es zu bedenken, dass STATs und MAPKs neben INF- γ mit vielen weiteren Signalwegen vernetzt sind. So werden STATs, außer über den IFN- γ -Rezeptor, auch über den EGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor und FDG-Rezeptor aktiviert (111). Letztendlich müssen deshalb die Erkenntnisse über die Modulation des IFN- γ -Signalwegs in vitro mittels in vivo-Experimenten in den Gesamtzusammenhang der RA-Pathologie integriert werden.

9. Literaturverzeichnis

References

1. Nallar SC, Kalvakolanu DV. Interferons, signal transduction pathways, and the central nervous system. *J Interferon Cytokine Res.* 2014;34(8):559–76. doi:10.1089/jir.2014.0021
2. Schneider M, Krüger K. Rheumatoid arthritis-early diagnosis and disease management. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(27-28):477–84. doi:10.3238/arztebl.2013.0477
3. Veale DJ, Orr C, Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):343–54. doi:10.1007/s00281-017-0633-1
4. Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2008;223(6):252–70. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00648.x
5. Lüllmann-Rauch R. *Histologie.* 3rd ed. Kiel: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
6. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(1):24–33. doi:10.1038/nrrheum.2012.190
7. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(12):917–26. doi:10.1089/jir.2011.0056
8. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):233–55. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x
9. Fearon U, Hanlon MM, Wade SM, Fletcher J. Altered metabolic pathways regulate synovial inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2018. doi:10.1111/cei.13228
10. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 1996;149(5):1607–15.
11. Fiehn C. S2e-Leitlinie: Therapie der Rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten [Internet] [cited 2018 Nov 13]. Available from: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/060-004.html>
12. Damjanov N, Vojinovic J. Biologic therapy of rheumatoid arthritis. *Serbian Archives for the Whole Medicine.* 2009;137(3-4):205–10. doi:10.2298/SARH0904205D
13. Khraishi M. Comparative overview of safety of the biologics in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl.* 2009;82(6):25–32. doi:10.3899/jrheum.090128
14. Keystone EC. Does anti-tumor necrosis factor- α therapy affect risk of serious infection and cancer in patients with rheumatoid arthritis?: a review of longterm data. *J Rheumatol.* 2011;38(8):1552–62. doi:10.3899/jrheum.100995
15. Caporali R, Zavaglia D. Real-world experience with tofacitinib for treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2018.
16. Kytтарыс VC. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des Devel Ther.* 2012;6(1):245–50. doi:10.2147/DDDT.S25426
17. Fleischmann R, Wollenhaupt J, Takiya L, Maniccia A, Kwok K, Wang L, van Vollenhoven RF. Safety and maintenance of response for tofacitinib monotherapy and combination therapy in

- rheumatoid arthritis: an analysis of pooled data from open-label long-term extension studies. *RMD Open*. 2017;3(2):e000491. doi:10.1136/rmdopen-2017-000491
18. Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adams JL, Griswold DE. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;279(3):1453–61.
 19. Renauld J-C. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(8):667–76. doi:10.1038/nri1153
 20. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature*. 1982;298(5877):859–63.
 21. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*. 1991;252(5006):698–702.
 22. Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010;50(1):1–14. doi:10.1016/j.cyto.2009.11.021
 23. Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ. IFN γ signaling—does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5-6):383–94. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.004
 24. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(12):917–26. doi:10.1089/jir.2011.0056
 25. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163–89. doi:10.1189/jlb.0603252
 26. Boots AM, Wimmers-Bertens AJ, Rijnders AW. Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology*. 1994;82(2):268–74.
 27. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*. 1993;259(5102):1739–42.
 28. Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev*. 2008;226(12):41–56. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00707.x
 29. Mauritz NJ, Holmdahl R, Jonsson R, van der Meide PH, Scheynius A, Klareskog L. Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*. 1988;31(10):1297–304.
 30. Machold KP, Neumann K, Smolen JS. Recombinant human interferon gamma in the treatment of rheumatoid arthritis: double blind placebo controlled study. *Ann Rheum Dis*. 1992;51(9):1039–43.
 31. Möller B, Paulukat J, Nold M, Behrens M, Kukoc-Zivojnov N, Kaltwasser JP, Pfeilschifter J, Mühl H. Interferon-gamma induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(3):442–5.
 32. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1999;104(10):1393–401. doi:10.1172/JCI7317

33. Dinarello CA. IL-18: A TH1 -inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;103(1):11–24. doi:10.1016/S0091-6749(99)70518-X
34. Manoury-Schwartz B, Chiocchia G, Bessis N, Abehsira-Amar O, BAteux F, Müller S, Huand S, Biossier M-C, Fournier C. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol*. 1997;158(11):5501–6.
35. Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol*. 1997;158(11):5507–13.
36. Chu C-Q, Swart D, Alcorn D, Tocker J, Elkon KB. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum*. 2007;56(4):1145–51. doi:10.1002/art.22453
37. Brierley MM, Fish EN. Stats: Multifaceted Regulators of Transcription. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the official journal of the International Society*. 2005;25(12):733–44. doi:10.1089/jir.2005.25.733
38. Cheon H, Yang J, Stark GR. The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(1):33–40. doi:10.1089/jir.2010.0100
39. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner C-W, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2000;43(11):2501–12. doi:10.1002/1529-0131(200011)43:11<2501:AID-ANR18>3.0.CO;2-K
40. Inoue T, Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of p38 MAPK by MAPK Kinases 3 and 6 in Fibroblast-Like Synoviocytes. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):4301–6. doi:10.4049/jimmunol.174.7.4301
41. Sun D, Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat Immunol*. 2006;7(4):375–81. doi:10.1038/ni1308
42. Halfter UM, Derbyshire ZE, Vaillancourt RR. Interferon-gamma-dependent tyrosine phosphorylation of MEKK4 via Pyk2 is regulated by annexin II and SHP2 in keratinocytes. *Biochem J*. 2005;388(Pt 1):17–28. doi:10.1042/BJ20041236
43. Fernandes ES. TRP Receptors in Arthritis, Gaining Knowledge for Translation from Experimental Models. *TOPAINJ*. 2013;6(1):50–61. doi:10.2174/1876386301306010050
44. Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacol Ther*. 2010;125(2):181–95. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.10.005
45. Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(3). doi:10.3390/ph9030052
46. Chen Y, Willcockson HH, Valtschanoff JG. Vanilloid receptor TRPV1-mediated phosphorylation of ERK in murine adjuvant arthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2009;17(2):244–51. doi:10.1016/j.joca.2008.06.015
47. Engler A, Aeschlimann A, Simmen BR, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sprott H. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with

- osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(4):884–8. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.178
48. Miller AM, Stella N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *British Journal of Pharmacology.* 2008;153(2):299–308. doi:10.1038/sj.bjp.0707523
 49. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):389–462. doi:10.1124/pr.58.3.2
 50. Alhouayek M, Muccioli GG. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. *Trends Pharmacol Sci.* 2014;35(6):284–92. doi:10.1016/j.tips.2014.03.001
 51. Sido JM, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of Endocannabinoid Activation of Peripheral CB1 Receptors in the Regulation of Autoimmune Disease. *Int Rev Immunol.* 2014;34(5):403–14. doi:10.3109/08830185.2014.921165
 52. 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(4):718–25. doi:10.1016/j.pbb.2011.06.022
 53. 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(2):R43. doi:10.1186/ar2401
 54. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen J-Z, Xie X-Q, Altmann K-H, Karsak M, Zimmer A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(26):9099–104. doi:10.1073/pnas.0803601105
 55. Gui H, Liu X, Wang Z-W, He D-Y, Su D-F, Dai S-M. Expression of cannabinoid receptor 2 and its inhibitory effects on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(5):802–9. doi:10.1093/rheumatology/ket447
 56. Bio-Rad. Quick Start™ Bradford Protein Assay: Instrucion Manual.
 57. Cheon H, Stark GR. Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(23):9373–8. doi:10.1073/pnas.0903487106
 58. Bosscher K de, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* 2003;24(4):488–522. doi:10.1210/er.2002-0006
 59. Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J.* 1996;15(22):6262–8.
 60. Qing Y, Stark GR. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41679–85. doi:10.1074/jbc.M406413200
 61. Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* 2000;19(15):4111–22. doi:10.1093/emboj/19.15.4111
 62. Meyer T, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem.* 2004;271(23-24):4606–12. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04423.x

63. Bromberg JF. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*. 2001;23(2):161–9. doi:10.1002/1521-1878(200102)23:2<161:AID-BIES1023>3.0.CO;2-0
64. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*. 1998;58(13):2832–7.
65. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(13):7556–61. doi:10.1073/pnas.95.13.7556
66. Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev*. 1999;13(11):1361–6.
67. Krause A, Scaletta N, Ji J-D, Ivashkiv LB. Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Survival Is Dependent on Stat3. *The Journal of Immunology*. 2002;169(11):6610–6. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6610
68. Lee S-Y, Kwok S-K, Son H-J, Ryu J-G, Kim E-K, Oh H-J, Cho M-L, Ju JH, Park S-H, Kim H-Y. IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):R31. doi:10.1186/ar4179
69. Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, Horvath CM, Ronai Z. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell*. 2001;7(3):517–28.
70. Ju JH, Heo Y-J, Cho M-L, Jhun J-Y, Park J-S, Lee S-Y, Oh H-J, Moon S-J, Kwok S-K, Park K-S, Park S-H, Kim H-Y. Modulation of STAT-3 in rheumatoid synovial T cells suppresses Th17 differentiation and increases the proportion of Treg cells. *Arthritis Rheum*. 2012;64(11):3543–52. doi:10.1002/art.34601
71. Gao W, McCormick J, Connolly M, Balogh E, Veale DJ, Fearon U. Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1275–83. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204105
72. Tykocinski L-O, Lauffer AM, Bohnen A, Kaul N-C, Krienke S, Tretter T, Adam I, Mohapatra SR, Saikali P, Löhning M, Neidhart M, Gay S, Oezen I, Platten M, Opitz CA, Lorenz H-M. Synovial Fibroblasts Selectively Suppress Th1 Cell Responses through IDO1-Mediated Tryptophan Catabolism. *J Immunol*. 2017;198(8):3109–17. doi:10.4049/jimmunol.1600600
73. Jung J-Y, Gleave Parson M, Kraft JD, Lyda L, Kobe B, Davis C, Robinson J, Peña MMO, Robinson CM. Elevated interleukin-27 levels in human neonatal macrophages regulate indoleamine dioxygenase in a STAT-1 and STAT-3-dependent manner. *Immunology*. 2016;149(1):35–47. doi:10.1111/imm.12625
74. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*. 2009;31(4):539–50. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.002
75. Kasperkovitz PV. Activation of the STAT1 pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(3):233–9. doi:10.1136/ard.2003.013276
76. Chan H-C, Ke L-Y, Liu C-C, Chang L-L, Tsai W-C, Liu H-W, Yen J-H. Increased Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 1 mRNA in Patients With Rheumatoid Arthritis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2010;26(6):290–8. doi:10.1016/S1607-551X(10)70042-5

77. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1169–76. doi:10.1038/ni1012
78. Liang Y, Xu W-D, Peng H, Pan H-F, Ye D-Q. SOCS signaling in autoimmune diseases: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Eur J Immunol.* 2014;44(5):1265–75.
79. Gough DJ, Sabapathy K, Ko EY-N, Arthur HA, Schreiber RD, Trapani JA, Clarke CJP, Johnstone RW. A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. *J Biol Chem.* 2007;282(2):938–46. doi:10.1074/jbc.M607674200
80. Hu J, Roy SK, Shapiro PS, Rodig SR, Reddy SP, Plataniias LC, Schreiber RD, Kalvakolanu DV. ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* 2001;276(1):287–97. doi:10.1074/jbc.M004885200
81. Gao B, Calhoun K, Fang D. The proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase, in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(6):R172. doi:10.1186/ar2081
82. Lowin T, Straub RH, Neumann E, Bosserhoff A, Vogel C, Moissl C, Anders S, Müller-Ladner U, Schedel J. Glucocorticoids increase α 5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3623–32. doi:10.1002/art.24985
83. Weber SM, Scarim AL, Corbett JA. Inhibition of IFN-gamma -induced STAT1 activation by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(5):E883-91. doi:10.1152/ajpendo.00515.2002
84. Chen C-W, Chang Y-H, Tsi C-J, Lin W-W. Inhibition of IFN- γ -Mediated Inducible Nitric Oxide Synthase Induction by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist, 15-Deoxy-12,14-Prostaglandin J2, Involves Inhibition of the Upstream Janus Kinase/STAT1 Signaling Pathway. *J Immunol.* 2003;171(2):979–88. doi:10.4049/jimmunol.171.2.979
85. Kim S-J, Lee S-A, Yun SJ, Kim J-K, Park J-S, Jeong H-S, Lee J-H, Moon S-J, Won Y-H. Expression of vanilloid receptor 1 in cultured fibroblast. *Exp Dermatol.* 2006;15(5):362–7. doi:10.1111/j.0906-6705.2006.00418.x
86. Miyamoto R, Tokuda M, Sakuta T, Nagaoka S, Torii M. Expression and Characterization of Vanilloid Receptor Subtype 1 in Human Dental Pulp Cell Cultures. *Journal of Endodontics.* 2005;31(9):652–8. doi:10.1097/01.don.0000155259.22746.ae
87. Yang Y, Yang H, Wang Z, Mergler S, Wolosin JM, Reinach PS. Functional TRPV1 expression in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2013;107(2):121–9. doi:10.1016/j.exer.2012.11.004
88. Tsvetkov EA, Potatieva NN, Bolshakov KV. Voltage-Dependent Interaction of Capsaicine and Protons on TRPV1-Receptors. *Acta Naturae.* 2017;9(1):75–80.
89. Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes (Basel).* 2014;4(3):525–64. doi:10.3390/membranes4030525
90. Johansen ME, Reilly CA, Yost GS. TRPV1 Antagonists Elevate Cell Surface Populations of Receptor Protein and Exacerbate TRPV1-Mediated Toxicities in Human Lung Epithelial Cells. *Toxicol Sci.* 2005;89(1):278–86. doi:10.1093/toxsci/kfi292

91. Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW, Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol.* 2008;73(2):274–81. doi:10.1124/mol.107.040832
92. Materazzi S, Nassini R, Andrè E, Campi B, Amadesi S, Trevisani M, Bunnett NW, Patacchini R, Geppetti P. Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):12045–50. doi:10.1073/pnas.0802354105
93. Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10459–66. doi:10.1074/jbc.M110314200
94. Mandal A, Shahidullah M, Delamere NA. TRPV1-dependent ERK1/2 activation in porcine lens epithelium. *Exp Eye Res.* 2018;172(7):128–36. doi:10.1016/j.exer.2018.04.006
95. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease-- successes and failures. *FEBS J.* 2013;280(9):1918–43. doi:10.1111/febs.12260
96. Turu G, Hunyady L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2010;44(2):75–85. doi:10.1677/JME-08-0190
97. Lizanecz E, Bagi Z, Pásztor ET, Papp Z, Edes I, Kedei N, Blumberg PM, Tóth A. Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Mol Pharmacol.* 2006;69(3):1015–23. doi:10.1124/mol.105.015644
98. Lowin T, Apitz M, Anders S, Straub RH. Anti-inflammatory effects of N-acylethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by TRPV1 and TRPA1 in a COX-2 dependent manner. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(321). doi:10.1186/s13075-015-0845-5
99. Westra J, Limburg P, Boer P de, van Rijswijk MH. Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(11):1453–9. doi:10.1136/ard.2003.013011
100. Newton R, Shah S, Altonsy MO, Gerber AN. Glucocorticoid and cytokine crosstalk: Feedback, feedforward, and co-regulatory interactions determine repression or resistance. *J Biol Chem.* 2017;292(17):7163–72. doi:10.1074/jbc.R117.777318
101. Peng H-Z, Yun Z, Wang W, Ma B-A. Dual specificity phosphatase 1 has a protective role in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes via inhibition of the MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):8441–7. doi:10.3892/mmr.2017.7617
102. Marotte H, Ahmed S, Ruth JH, Koch AE. Blocking ERK-1/2 reduces tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-18 bioactivity in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by induction of interleukin-18 binding protein A. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):722–31. doi:10.1002/art.27269
103. Toh M-L, Yang Y, Leech M, Santos L, Morand EF. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1beta and glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 2004;50(10):3118–28. doi:10.1002/art.20580
104. Hu X, Li W-P, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol.* 2003;170(9):4833–9.

105. O'Connell D, Bouazza B, Kokalari B, Amrani Y, Khatib A, Ganther JD, Tliba O. IFN-gamma-induced JAK/STAT, but not NF-kappaB, signaling pathway is insensitive to glucocorticoid in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(4):348–59. doi:10.1152/ajplung.00099.2015
106. Shah S, King EM, Mostafa MM, Altonsy MO, Newton R. DUSP1 Maintains IRF1 and Leads to Increased Expression of IRF1-dependent Genes: a mechanism promoting glucocorticoid insensitivity. *J Biol Chem*. 2016;291(41):21802–16. doi:10.1074/jbc.M116.728964
107. Burke SJ, Goff MR, Lu D, Proud D, Karlstad MD, Collier JJ. Synergistic expression of the CXCL10 gene in response to IL-1 β and IFN- γ involves NF- κ B, phosphorylation of STAT1 at Tyr701, and acetylation of histones H3 and H4. *J Immunol*. 2013;191(1):323–36. doi:10.4049/jimmunol.1300344
108. Hu X, Ho HH, Lou O, Hidaka C, Ivashkiv LB. Homeostatic Role of Interferons Conferred by Inhibition of IL-1-Mediated Inflammation and Tissue Destruction. *The Journal of Immunology*. 2005;175(1):131–8. doi:10.4049/jimmunol.175.1.131
109. Page CE, Smale S, Carty SM, Amos N, Lauder SN, Goodfellow RM, Richards PJ, Jones SA, Topley N, Williams AS. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R49. doi:10.1186/ar2960
110. Ng CT, Biniiecka M, Kennedy A, McCormick J, FitzGerald O, Bresnihan B, Buggy D, Taylor CT, O'Sullivan J, Fearon U, Veale DJ. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(7):1389–95. doi:10.1136/ard.2009.119776
111. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst*. 2006;2(11):536–50. doi:10.1039/B606246F

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Hanna Müller

Geburtsdatum: 4.1.1992

Geburtsstadt: Bayreuth

Schulische Ausbildung:

1998-2002: Grundschule Bayreuth-Meyernberg

2002-2011: Markgräfin-Wilhelmine-Gymnasium Bayreuth

Universitäre Ausbildung:

2011-2018: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

06/2018: Approbation als Ärztin

Regensburg, den 20.1.2019

Hanna Müller

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, 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 Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hanna Müller

12. Danksagung

Vielen herzlichen Dank an Tanja für die gute Einarbeitung und an Torsten für die zahlreichen Erklärungen und zuverlässige Betreuung von nah und fern.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern und Onkel Peter für die langjährige Unterstützung meines Studiums bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Nina für die gute Freundschaft auf dem Weg durch eine ereignisreiche gemeinsame Studienzeit.