

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

**DIE ROLLE DES CAMP- DEGRADIERENDEN ENZYMS PHOSPHODIESTERASE
TYP IV BEI RHEUMATOIDER ARTHRITIS**

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janika Zwingenberg

2021

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

**DIE ROLLE DES CAMP- DEGRADIERENDEN ENZYMS PHOSPHODIESTERASE
TYP IV BEI RHEUMATOIDER ARTHRITIS**

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janika Zwingenberg

2021

Dekan: Prof. Dr. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer. H. Straub
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Grifka
Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
Die rheumatoide Arthritis	4
Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.....	5
Das Sympathische Nervensystem im Verlauf der Entzündungsreaktion bei rheumatoider Arthritis	7
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP	10
Therapie der rheumatoiden Arthritis.....	12
Hypothese	14
Material und Methoden.....	15
Patienten	15
Synovialgewebe- und Synovialzell-Gewinnung	15
Zellstimulation.....	17
ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).....	19
LUMINEX.....	19
Immunhistochemischer Nachweis von Phosphodiesterase 4 und β -Arrestin.....	20
Proximity Ligation Assay (PLA) zur Darstellung der Nachbarschaft zwischen Phosphodiesterase 4 und β -Arrestin	21
Datenanalyse.....	24
Ergebnisse	25
Phosphodiesterase 4-Inhibition	25
Nachweis von PDE 4 und β -Arrestin in menschlichem Synovialgewebe	26
Gai Protein-gekoppelte Rezeptor-Antagonisten	28
Gas Protein-gekoppelte Rezeptor-Antagonisten	32
Switch vom Gas zum Gai Signalweg in menschlichem Synovialgewebe	37
Proteinkinase A Inhibition	39
Hemmung des Gai-Signalwegs.....	43
Hemmung der <i>Extracellular-signal regulated Kinase</i>	45
Hemmung der Interaktion zwischen <i>cAMP response element-binding protein</i> und Partnern	46
Hemmung von Nuklear Faktor κ B	48
Hemmung des Ca^{2+} Signalweges	50
Hemmung von <i>Hypoxia inducible factor-1α</i>	51
Diskussion.....	56
Literatur zur Arbeit.....	70
Anhang: Danksagung, Erklärung, Publikation	

Einleitung

Die rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die zu den Autoimmunerkrankungen gezählt wird. Weltweit ist rund 1% der Bevölkerung von RA betroffen (1,2). Frauen sind 2-3mal häufiger betroffen als Männer. Liegt eine genetische Disposition vor, ist das Risiko an RA zu erkranken deutlich erhöht. Für den Ausbruch der Erkrankung werden externe Trigger, wie z.B. Rauchen, verantwortlich gemacht (3). Zum typischen Krankheitsbild der RA gehören Synovialitis und Arthritis der kleinen Hand- und Fußgelenke, insbesondere der Metacarpo- und -tarsophalangealgelenke und der proximalen Interdigitalgelenke, aber auch der Kniegelenke (3,4). Werden die Patienten nicht rechtzeitig adäquat und entschlossen behandelt, kann die RA in einem schubweise progredienten Verlauf zur Zerstörung der Gelenke und damit zu deren Funktionsverlust und zur Invalidität der Patienten führen (3–5). Zusätzlich haben die Patienten ein erhöhtes Risiko, von begleitenden Systemerkrankungen, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Insulinresistenz, metabolischem Syndrom, Osteoporose und Depressionen betroffen zu sein (3–5).

Bei bis zu 80% der Patienten gelingt der Nachweis von Autoantikörpern im Serum, wie dem Rheumafaktor (RF) gegen das Fc-Fragment des IgG und den Antikörpern gegen das citrullinierte-cyclische Peptid (Anti-CCP-AK oder ACPA) (6). In den letzten Jahrzehnten konnten verschiedene Risiko-Allele identifiziert werden, die in der Lage sind, autoimmune Mechanismen auszulösen und mit einem erhöhten Risiko für das Ausbrechen der RA einherzugehen (3). Besonders wichtig scheint hier das HLA-DRB1 Gen zu sein, das für das HLA-DRB-Protein, ein MHCII (Major Histocompatibility Complex Typ II) Molekül, kodiert und in einem starken Zusammenhang mit der Anwesenheit von RF und ACPA im Serum steht (1,3,5). Mittlerweile wurde aber eine Vielzahl weiterer Gene entdeckt, die an der Leukozyten- und insbesondere der Lymphozytenaktivierung und anderen inflammatorischen Signalwegen des erworbenen Immunsystems beteiligt sind (5).

Seit 2010 gibt es die neue ACR/EULAR Klassifikation für die RA, die aus einer Zusammenarbeit des American College of Rheumatology mit der European League Against Rheumatism entstanden ist (4). Sie legt den Fokus auf eine Früherkennung der RA, um durch eine rechtzeitige entschlossene Therapie strukturellen

Langzeitschäden besser vorbeugen zu können (4). Ihre Kriterien können auf jeden Patienten angewandt werden, der aktuell eine klinisch aktive Synovitis in mindestens einem Gelenk hat, die nicht durch eine andere plausible Diagnose erklärt werden kann (z.B. systemischer Lupus erythematoses [SLE], Gicht, aktivierte Arthrose) (4). In die Klassifikation fließen die Art und Anzahl der betroffenen Gelenke, die Antikörper-Serologie, der Nachweis von Akut-Phase-Proteinen im Blut und die subjektive Dauer der Beschwerden mit ein (4,6). Definitiv an RA erkrankt gilt der Patient, wenn er mindestens 6 aus 10 Punkte der Kriterien erfüllt und eine gesicherte Synovitis in einem typischen Gelenk ohne erkennbare andere Ursache hat (4).

- Geschwollene oder schmerzhafte Gelenke
 - ≤ 1 (mittel)großes Gelenk = 0 Punkte
 - 2-10 (mittel)große Gelenke = 1 Punkt
 - 1-3 kleine Gelenke = 2 Punkte
 - 4-10 kleine Gelenke = 3 Punkte
 - >10 Gelenke, davon ≥1 kleines Gelenk = 5 Punkte
- Serologie
 - RF+Anti-CCP-AK negativ = 0 Punkte
 - RF oder Anti-CCP-AK erhöht = 2 Punkte
 - RF oder Anti-CCP-AK >3-fach über der Norm = 3 Punkte
- Entzündungsparameter im Blut
 - C-reaktives Protein (CRP)+Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)normal = 0 Punkte
 - CRP oder BSG erhöht = 1 Punkt
- Symptombdauer
 - < 6 Wochen = 0 Punkte
 - ≥ 6 Wochen = 1 Punkt

Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Die Synovialmembran, eigentlich das Stratum synoviale der Gelenkkapsel, besteht aus einer Deckschicht von Synoviozyten, mit Makrophagen und Fibroblasten und einem darunterliegenden lockeren, Gefäß- und Fettgewebsreichen, hypozellulären Bindegewebe. Sie umschließt das Gelenk und produziert Gelenkflüssigkeit und Bindegewebsmatrix zur Ernährung und zum Strukturerehalt des Gelenkknorpels (7).

Bei der RA kommt es über einen chemotaktischen Gradienten zur Einwanderung von aktivierten Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, CD4 und CD8 T-Zellen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und Plasmazellen ins synoviale Bindegewebe (5,8). Die Deckschicht (lining layer) wird hyperplastisch, die Zotten der Synovia sind ödematös geschwollen und hypervaskularisiert (7). Dennoch ist die Umgebung im entzündeten Gelenk stark hypoxisch (5,9–11).

Es bildet sich ein entzündlich verändertes Granulationsgewebe, ein sogenannter Pannus, der sich im Gelenk ausbreitet und den Knorpel angreift (8). Matrix-Metalloproteinasen, Membran-Typ-Matrix-Metalloproteinasen und Kathepsine, die von T-Zellen und aktivierten Fibroblasten gebildet werden, sorgen für einen strukturellen Abbau des Knorpels (2,7). Über eine Störung des Gleichgewichts zwischen Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität zugunsten der Knochenabbauenden Osteoklasten durch verschiedene Zytokine, u.a. Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), über das RANK/RANK-Ligand (RANKL)-System kommt es zur Destruktion des Knochens und letztendlich zu einer Infiltration des Knochenmarks (2,8). Der Gelenkschaden stellt seinerseits eine Quelle für weitere Antigene dar und verstärkt so in einem Circulus vitiosus die entzündlichen Prozesse (8).

Welche Entzündungszellen vorrangig an der Entstehung der RA beteiligt sind konnte bislang nicht zufriedenstellend geklärt werden. Ursprünglich wurde die RA als eine TH1-Zell-gesteuerte Autoimmunerkrankung betrachtet. Mittlerweile geht man aber davon aus, dass gerade TH17-Zellen eine viel größere Rolle spielen als angenommen und auch TH2-Zellen an der Pathogenese beteiligt sind (5). Das Zytokin-Profil ändert sich im Verlauf der Erkrankung (8). TNF α nimmt unbestritten eine tragende Rolle für die Entwicklung der RA ein. Von Makrophagen gebildet ist es an der Aktivierung verschiedener anderer Immunzellen, Endothelzellen und synovialer Fibroblasten beteiligt und sorgt für die Ausschüttung verschiedener nachgeschalteter Zytokine, z.B. IL-6. Es unterstützt die proliferative Neovaskularisation im Gelenk, sensibilisiert lokale Schmerzrezeptoren und wirkt als Cofaktor von RANKL an der Knochendestruktion mit (8). 70% der Patienten profitieren von einer therapeutischen Blockade von TNF α in unterschiedlichem Ausmaß (8).

Entscheidend für die Krankheitsausprägung und Entwicklung ist auch IL-6 (8), das unter anderem die Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen aus der Leber reguliert, via IL-17 ebenfalls stimulierend auf den RANK-Liganden wirkt und die Produktion von Matrix-Metalloproteasen triggert. Außerdem induziert es die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, stimuliert die Entwicklung von T-Zellen zu TH17-Helfer-Zellen und ist maßgeblich an der systemischen Manifestation der RA mit Fatigue, Osteoporose, Akut-Phase-Reaktion und Anämie der chronischen Entzündung beteiligt (12). Damit sind sowohl das angeborene (Zytokine, Makrophagen, Chemotaxis) als auch das erworbene (Antigenpräsentation, T-Zellen, Antikörperproduktion, B-Zellen) Immunsystem für die Entwicklung der Entzündung im Gelenk und der degenerativen Prozesse im Rahmen der RA verantwortlich (5).

Das Sympathische Nervensystem im Verlauf der Entzündungsreaktion bei rheumatoider Arthritis

Die Rolle des peripheren Nervensystems in der Entstehung der Entzündungsreaktion bei RA ist bereits intensiv erforscht und in mehreren Reviews diskutiert worden (2,13–16). Während das sensorische Nervensystem vor allem proinflammatorische Prozesse zu begünstigen scheint (14) und das parasympathische Nervensystem soweit bekannt antiinflammatorisch wirkt (14), ist die Funktion des sympathischen Nervensystems komplizierter. Sein Effekt auf die Entzündungsreaktion kann sowohl pro-als auch antiinflammatorisch sein und ist hierbei abhängig von der Lokalisation (zentral-peripher), der Neurotransmitterkonzentration und der Rezeptorverteilung, und vor allem vom Zeitpunkt im Krankheitsverlauf (13–16).

Insgesamt zeigt sich beim Patienten mit RA klinisch das Bild einer autonomen Dysregulation mit einer gesteigerten Aktivität des sympathischen Nervensystems. Man erkennt es durch eine erhöhte Herzfrequenz, verstärktes Schwitzen, vertiefte Atmung, mehr Noradrenalin-Stoffwechselprodukte im Urin, eine verstärkte Reflexantwort auf orthostatische Reize und erweiterte Pupillen (13,14). Eine Erklärung hierfür wäre, dass im Verlauf der RA die Konzentration an Cortisol im Blut in Anbetracht der Entzündungsreaktion relativ gesehen zu niedrig ist- der Quotient aus aktivem Serumcortisol zu Serum-IL-6 oder Serumcortisol zu Serum-TNF sinkt- und der Sympathikus, der in Bezug auf Kreislaufregulation und Energiebereitstellung synergistisch zur Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse wirkt, versucht diesen Ausfall zu kompensieren (2,14).

Physiologischerweise ist das Gelenk reich mit sympathischen Nervenfasern innerviert (15), die mittels ihrer Neurotransmitter der Katecholamine (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Adenosin) an verschiedenen Rezeptorsubtypen (beta-adrenerg, alpha-adrenerg) ihren Aufgaben nachkommen. Unter anderem senken sie die Temperatur und den O₂-Partialdruck im Gelenk (15). Im Verlauf der Entzündungsreaktion bei RA ändern sich jedoch Struktur und Funktionen des sympathischen Nervensystems (Abbildung 1).

In der akuten Phase einer Entzündung (bis zu 12h) wirkt der Sympathikus proinflammatorisch (14,16). Immunzellen werden aus zentralen Lagern mobilisiert und über chemotaktische Wirkung der Katecholamine ins Gelenk gelockt, sympathisch induzierte Matrix-Metalloproteinasen erleichtern den Entzündungszellen den Weg durchs Gewebe, Noradrenalin (NE) wirkt synergistisch mit Bradykinin und sorgt für eine gesteigerte Plasmaextravasation und Nozizeptoren werden über α 2-Rezeptoren und Prostaglandine sensibilisiert (14–16). Lokal steht im Vordergrund, möglichst rasch und endgültig das feindliche Antigen zu beseitigen, während zentral die Energiebereitstellung für das aktivierte Immunsystem gewährleistet werden muss (14). In verschiedenen Tiermodellen der Arthritis konnte gezeigt werden, dass eine chemische, systemische Sympathektomie kurz vor Entzündungsausbruch den Verlauf der Arthritis abmildert oder sogar ihren Ausbruch verzögert (13–16).

In der sogenannten Intermediärphase (12h bis 4-6 w) kommt es zu einer strukturellen Veränderung der Innervation des Gelenks (16). Durch spezifische Nervenrepulsionsfaktoren (Semaphorin 3C und 3F) und unspezifische Wachstumsfaktoren (Nerve Growth Factors, NGFs) kommt es zu einem Verlust von sympathischen Nervenfasern, während gleichzeitig neue sensorische Fasern ins Gelenk einsprossen, sodass insgesamt ein proinflammatorisches Milieu entsteht (14). Die Konzentration an sympathischen Neurotransmittern z.B. NE im Entzündungsherd sinkt. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Signalvermittlung über α -Adrenorezeptoren (α 2-AR), die physiologischer Weise eine höhere Affinität zu NE aufweisen und deshalb schon bei geringerer Neurotransmitterkonzentration aktiviert werden können (2,14). Verstärkt wird dieser α/β Adrenorezeptorswitch noch durch eine vermehrte Expression von α -Rezeptoren auf peripheren Blutzellen und einer proinflammatorischen Änderung in β -Adrenorezeptorsignalwegen (2,13).

Gelingt es dem Körper nicht das feindliche Antigen zu eliminieren kommt es zu einer chronischen Entzündung im Gelenk (ab 6 Wochen) (16). Interessanterweise scheint der Sympathikus in dieser Phase einen vornehmlich antiinflammatorischen Effekt zu haben (16), führt doch eine chemische Sympathektomie im Arthritismodell zu diesem Zeitpunkt zu einer Aggravation der Entzündungssymptome (13,15,16).

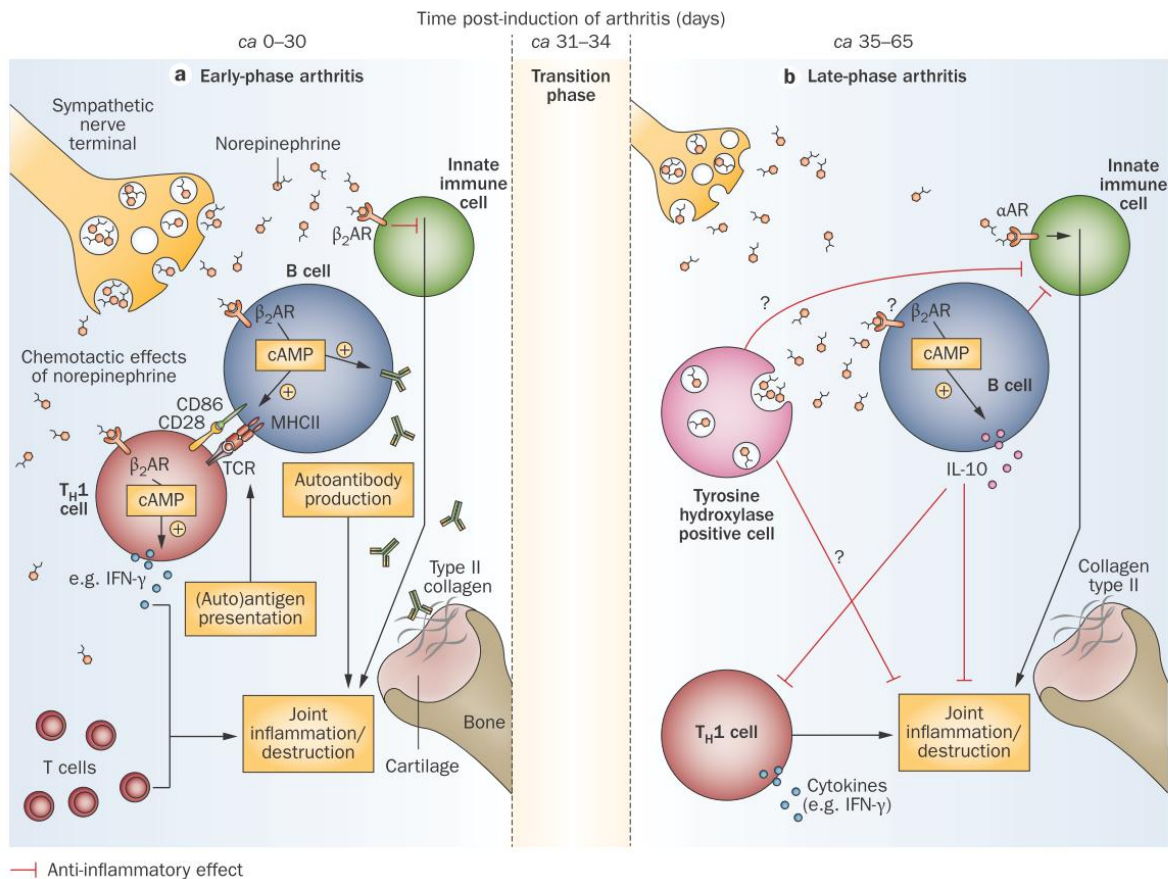


Abbildung 1 Modell der sympathischen neuroimmunologischen Steuerung in Kollagen-Typ 2 induzierter Arthritis (14)

- In der Frühphase der Arthritis sorgen viele sympathische Nerven für eine hohe NE Konzentration. Die Aktivierung des β -AR- Signalwegs führt zu einer proinflammatorischen Antwort mit Rekrutierung von Immunzellen, Aktivierung von proinflammatorischen T-Zellen, verstärkter Antikörperproduktion und Co-Stimulation durch B-Zellen.
- In der späten Phase der Arthritis ziehen sich die sympathischen Nervenendigungen aus dem Entzündungsherd zurück, die Immunzellen sind nun niedrigeren NE Konzentrationen ausgesetzt und es überwiegen α -adrenerge Signalwege. Ausnahmen bilden Pools an höheren NE Konzentrationen rund um TH+ Zellen, die in der späten Phase der Arthritis antiinflammatorische Effekte zu haben scheinen. Diese Effekte können dem insgesamt proinflammatorischen Milieu allerdings nichts entgegensetzen.

Dabei wird die Aufgabe des Sympathikus im Gelenk zumindest teilweise von sogenannten Tyrosin-Hydroxylase-positiven (TH+) Zellen übernommen, die kurz

nach Entzündungsbeginn zum ersten Mal im Gelenk erscheinen und sich im Verlauf der Entzündung vermehren, wobei sie Katecholamine produzieren und sezernieren (17). Auf Rezeptorebene können diese ambivalenten Effekte des sympathischen Nervensystems über unterschiedliche Konzentrationen an Neurotransmittern, die zu verschiedenen Zeitpunkten im Gelenk vorherrschen und verschiedene Rezeptorsubtypen stimulieren, erklärt werden (18,19). Niedrige Konzentrationen an sympathischen Neurotransmittern binden dabei an hochaffine G α i-Protein-gekoppelte Rezeptoren (wie die α 2-AR), die über ein niedriges cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) Level proinflammatorisch wirken, während bei hohen Neurotransmitterkonzentrationen niedrigaffine G α s- Protein-gekoppelte Rezeptoren (wie der β 2-Adrenorezeptor [β 2-AR]) aktiviert werden, die über eine hohe Konzentration an cAMP antiinflammatorisch wirken.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP

Entscheidend für die Signalübertragung mittels Katecholaminen sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie stellen die größte Familie der Transmembranproteine dar und bilden einen wichtigen Knotenpunkt für die Kommunikation zwischen dem Extra- und Intrazellulärraum (20). Dabei sind sie verantwortlich für die Übertragung der meisten zellulären Antworten auf Hormon- und Neurotransmitterstimulation im Körper und sind entscheidend für die Vermittlung der Sinneseindrücke Sehen, Riechen und Schmecken (20). Aufgebaut sind die GPCRs aus sieben Transmembrandomänen mit jeweils unterschiedlichen intra- und extrazellulären „Loops“, die zum Ansteuern verschiedenster Signalwege dienen (20). Klassischerweise aktivieren die GPCRs spezifische heterotrimere G-Proteine, die selbst entsprechende Effektorproteine aktivieren oder hemmen können und somit ein Signal in die Zelle vermitteln (20).

Eine Aufgabe des β 2-AR zum Beispiel ist es, über Bindung an ein stimulatorisches G-Protein (G α s) nachfolgend die membrangebundene Adenylatcyclase (AC) und über eine erhöhte Konzentration des second messenger cAMP die Proteinkinase A (PKA) zu aktivieren, die wiederum über Phosphorylierung u.a. den GPCR selbst und den L-Typ Calcium Kanal reguliert (20,21).

Außerdem kann der β 2-AR über Bindung an das inhibitorische G-Protein (G α i) die AC hemmen, er kann die Enzyme ERK (Extrazelluläre Rezeptor Kinase), Phosphoinositid-3-Kinase und einige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivieren (22–24),

und unabhängig von G-Proteinen durch Bindung von Arrestin den MAP (Mitogen-activated-protein)-Kinase Signalweg in Gang setzen (20,21,23–25).

Reguliert wird die Aktivität der GPCR über Phosphorylierung. Dies geschieht einerseits durch die PKA, die dadurch für eine verminderte Bindung von Gas- und eine vermehrte Bindung von Gai-Proteinen an den Rezeptor sorgt (21,22,26). Andererseits können auch G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRKs) die GPCRs regulieren. Dies funktioniert aber nur am Agonist gebundenen Rezeptor. Hier führt eine Phosphorylierung durch die GRKs zur Bindung von Arrestinen (21,23). Am β 2-AR binden β -Arrestin 1 und 2 und sorgen für eine verminderte Affinität des Rezeptors zu Gas und letztendlich zur Clathrin-vermittelten Internalisierung des Rezeptors in Endosomen. Hier wird der Rezeptor entweder degradiert oder recycelt (23,24,27). Entscheidend sind hierbei die Isoenzyme GRK 2 und GRK 3 (23,28,29). Außerdem fungiert β -Arrestin als Adapter für andere Proteine und kann damit den β -AR an verschiedene Signalwege koppeln (27), beziehungsweise die lokale cAMP Konzentration beeinflussen (23).

Intrazelluläres cAMP ist der zentrale second messenger der GPCRs und damit verantwortlich für die Weiterleitung von Informationen zur Regulation von Gedächtnisfunktionen, Stoffwechsel, Gen-Regulation und Immunfunktion (30,31). Nach Aktivierung des Gas-gebundenen GPCRs kommt es zu einem Austausch des gebundenen Guanosin-Diphosphats (GDP) mit Guanosin-Triphosphat (GTP) und zum Abdissoziieren der Gas-Untereinheit von der β -Untereinheit des G-Proteins. Die aktivierte Gas-Untereinheit kann die AC aktivieren, die die Reaktion von Adenosin-tri-phosphat (ATP) zu cAMP und Pyrophosphat katalysiert (30). Einer der wichtigsten Effektoren von cAMP ist die PKA, die über Phosphorylierung von Serin und Threonin-Resten an nachfolgenden Zielproteinen, wie z.B. cAMP response elements binding proteins (CREBs), wirkt (30). Weitere Effektoren von cAMP sind *Cyclic nucleotid gated channels* und *exchange proteins directly activated by cAMP* (Epacs) (30). Über den Transkriptionsfaktor CREB reguliert cAMP die Expression von verschiedenen Genen (30,32).

Auf das angeborene Immunsystem hat cAMP eine hemmende Wirkung (30). Dabei beeinflusst es sowohl die Bereitstellung von Entzündungsmediatoren, als auch Phagozytose und Vernichtung von intrazellulär aufgenommenen Pathogenen (30). Es kann eine Vielzahl an Zytokinen regulieren, z.B. unterdrückt es die Expression des proinflammatorischen TNFs während es die Produktion des

antiinflammatorischen IL-10 stimuliert (30,33–39). Vereinfacht dargestellt hat cAMP eine starke antiinflammatorische Wirkung.

Abgebaut wird cAMP in Entzündungszellen wie Makrophagen, Eosinophilen, Neutrophilen, T-Zellen und Monozyten einzig durch die Phosphodiesterase 4 (PDE4) (40–42). Es sind 11, bzw. eventuell 12, Phosphodiesterasefamilien bekannt, die die Fähigkeit haben 3´-5´- cAMP bzw. 3´-5´-cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu ihrer inaktiven Form 5´-AMP und 5´-GMP zu hydrolysieren (41,42). Die verschiedenen Isoformen der PDEs sind in unterschiedlichen Geweben mit unterschiedlicher Häufigkeit verteilt (41,42). Die PDE4-Familie umfasst 4 Subfamilien (PDE4 A-D) und nochmals mehrere Splice-Varianten (41,42). Insgesamt gibt es ca. 20 verschiedene Isoenzyme und 35 verschiedene PDE4 Proteine in Zellen von Säugetieren (41,42). Die PDE4 zeichnet sich durch ihre hohe Affinität zu cAMP und ihre geringe Affinität zu cGMP und Insensitivität gegenüber Regulation über Calmodulin und Calcium aus (42). Die katalytischen Domänen am C-Terminus der Isoenzyme bestehen aus 320-350 Aminosäuren und stimmen in bis zu 80% überein, wohingegen die regulatorischen Domänen am N-Terminus sich bis auf zwei *upstream conserved regions* (UCR1 und UCR2), die für die PDE4 Familie einzigartig sind, unterscheiden (41,42). UCR2 hat eine autoinhibitorische Funktion auf das Enzym, während UCR1 einen Serinrest aufweist, der durch die PKA phosphoryliert werden kann. Dadurch wird das Enzym nicht nur aktiviert sondern auch sensitiver für den PDE4-Inhibitor Rolipram (41). Langfristig wird die PDE4 Konzentration über eine cAMP Akkumulation gesteigert (42). Die Bindung von Inhibitoren hängt auch von der Konformation der katalytischen Einheit des Enzyms ab. Rolipram bindet und hemmt eher die low-affinity PDE4 im peripheren Gewebe (42).

Therapie der rheumatoiden Arthritis

Ziele und Strategien in der Therapie der RA haben sich Ende des letzten Jahrhunderts geändert. Die vormals vorsichtig aufgebaute Therapie gemäß eines Pyramiden-Modells, die mit *Non-Steroid-Anti-Rheumatic Drugs* (NSARs) startete und erst im zweiten Schritt *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs* (DMARDs), wie z.B. Glukokortikoide, umfasste, gilt mittlerweile als überholt (43,44). In mehreren Studien wurde festgestellt, dass Patienten davon profitieren, wenn man bereits früh im Krankheitsverlauf energisch medikamentös eingreift und vor allem, wenn der Arzt zielgerichtet, also in Hinblick auf einen bestimmten DAS-Score (*Disease Activity Score*) bzw. mit dem Ziel der Remission therapiert (5,43).

Als First-Line-Therapie gilt nach wie vor eine Monotherapie mit DMARDs, allen voran Methotrexat (MTX), das u.a. über eine Akkumulation von extrazellulärem Adenosin die Entzündungsreaktion positiv beeinflusst (45) und durch seine gute Wirksamkeit, seine gute Verträglichkeit und damit gute Compliance und seine relativ geringen Kosten besticht (5). Ob und inwiefern eine Ergänzung durch Glukokortikoide als „low-dose“ Steroidtherapie erfolgen sollte, bleibt nach wie vor umstritten (5). Für den Fall, dass die Entzündungsaktivität im Gelenk trotz MTX Therapie hoch bleibt, oder starke Nebenwirkungen auftreten, sollte zunächst eine Monotherapie mit einem anderen DMARD, wie Leflunomid (ein Dihydroorotat-Dehydrogenase Blocker), oder Sulfasalazin, versucht werden (5). Erst danach ist eine Kombinationstherapie einzuleiten.

Anker-Medikament für Kombinationstherapien ist wiederum MTX. Dazu kombiniert werden sowohl weitere DMARDS als auch neu entwickelte Medikamente, die aufgrund ihrer Antikörper- oder Protein-verwandten Struktur nur als `Biologicals´ bezeichnet werden (5). Sie greifen zielgerichtet in immunologische Entzündungsprozesse ein, und konnten seit ihrer Entdeckung in der Therapie der RA große Erfolge erzielen. Allerdings sind sie in der Regel schweren Verlaufsformen der RA vorbehalten, da sie mitunter schwere Nebenwirkungen nach sich ziehen und bislang sehr kostenintensiv in der Herstellung bleiben (5,6). Das Interesse mit diesen Biologicals die TNF α Konzentration zu beeinflussen – ein Zytokin mit einer Hauptrolle in der Pathogenese der RA - ist groß. Es gibt bereits einige direkte TNF α -Inhibitoren, die zu Therapie der RA zugelassen sind. Dazu zählen Infliximab, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab und Etanercept (ein Fusionsmolekül aus löslichem TNF-Rezeptor und IgG1-Fc-Teil) (5).

Die Suche nach Wegen, die TNF α Konzentration auch indirekt, z.B. über die Konzentration des second messengers cAMP, zu beeinflussen geht weiter, in der Hoffnung noch wirksamere oder besser verfügbare Medikamente für die Therapie der RA zu finden (46). TNF α -Inhibitoren wirken zum Beispiel über eine Normalisierung der T-Zell-Funktion sowie ein rasches Absinken des Serum IL-6 innerhalb von Stunden (47) Auch gegen IL-6 werden klinisch effizient und sicher bereits verschiedenste Antikörper eingesetzt (47).

Die Phosphodiesterasen sind die einzigen Enzyme, die in der Lage sind cAMP abzubauen (40). Demnach wäre es ein interessanter therapeutischer Ansatz, über die Hemmung der PDE4 die Konzentration an cAMP zu erhöhen und damit indirekt

die TNF α Konzentration zu senken. Tatsächlich gibt es einige zugelassene PDE4-Inhibitoren für bestimmte chronisch entzündliche Erkrankungen. So haben sich Rolipram und Apremilast insbesondere in der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen der Atemwege bewährt (41,42,48–50). Seit März 2014 ist Apremilast in den USA auch für die Behandlung von Psoriasis-Arthritis zugelassen (50).

Obwohl TNF α eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Entzündung und Destruktion der Gelenke bei RA hat, die durch direkte Inhibitoren des Zytokins wirksam bekämpft werden können (5), konnte keine Wirksamkeit von PDE4-Inhibitoren bei RA festgestellt werden. Eine Phase II- Studie in den USA musste 2015 aufgrund von ausbleibender Wirksamkeit vorzeitig abgebrochen werden (51). Dies geschah trotz zahlreicher vorangehender vielversprechender Studien, die eine gute Wirkung von PDE4-Hemmern in vitro und im Mausmodell der RA feststellen konnten (41,46,48,49,52,53).

Hypothese

In dieser Arbeit wurde betrachtet, wie sich die TNF α - und die IL-6-Konzentrationen in gemischten RA-Synoviozyten im Vergleich zu gemischten Osteoarthritis-Synoviozyten (OA-Synoviozyten) verhalten, wenn man die Katecholaminrezeptoren hemmt und/oder den PDE4-Hemmer Rolipram hinzugibt. Kann ein antientzündlicher Effekt wie bei Jiminez et al. 2001 oder McCann et al. 2010 gezeigt werden? Wenn nicht, welche Faktoren unterscheiden sich bei den Versuchen und könnten somit verantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse sein?

Außerdem wurde ausgehend von Veröffentlichungen der Gruppe um Lefkowitz untersucht, ob es bei RA-Synoviozyten einen proinflammatorischen Rezeptorswitch vom G α s- zum G α i-Rezeptor gibt. Diese Gruppe hatte gezeigt, dass in menschlichen Kardiomyozyten und genetisch veränderten human-embryonalen Nierenzellen ein solcher durch Rolipram induzierter Switch stattfinden kann (65). Dabei wird das Protein β -Arrestin an den zuvor phosphorylierten GPCR gebunden und rekrutiert seinerseits PDE4. Gehemmt durch Rolipram, kann die PDE4 cAMP nicht abbauen und es kommt verstärkt zu einem Ablaufen des dem G α i-Rezeptor nachfolgenden MAP-Kinase Signalwegs, der proinflammatorische Signale in die Zelle weitergibt (65). Dieser Switch könnte folglich eine Erklärung für proinflammatorische Effekte von PDE4-Hemmern bei RA sein. Wir stellten uns die Frage, ob es bei RA Entzündungszellen einen solchen Rezeptorswitch geben könnte. Kommen die hierfür entscheidenden Proteine β -Arrestin und PDE4 in den RA-Synoviozyten vor und

liegen sie eng genug beinander, um interagieren zu können? Kann ein vermehrtes Ablaufen des Gai-Signalwegs nachgewiesen werden? Und können die Effekte auf TNF α durch Hemmung des Gai-Signalwegs rückgängig gemacht werden?

Material und Methoden

Patienten

Die Primärzellen wurden aus Synovialgewebe gewonnen, das bei Knie-Totalendoprothesen-Operationen in den Asklepios-Kliniken Bad Abbach, Prof. Grifka, routinemäßig entfernt wird.

Es wurde Synovialgewebe von Patienten mit OA und RA verwendet und verglichen. Die Diagnose RA basierte auf den Kriterien des American College of Rheumatology (54). Die Patienten waren über den Zweck der Studie aufgeklärt und haben schriftlich eingewilligt. Die Ethikkommission der Universität Regensburg hat das Konzept genehmigt (Geschäftszeichen: 15-101-0210).

Synovialgewebe- und Synovialzell-Gewinnung

Alle folgenden Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien statt. Die verwendeten Materialien für die Zellgewinnung sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Das Synovialgewebe wurde im OP direkt nach der Eröffnung der Kniegelenkscapsel entnommen. Dabei wurden Gewebestücke mit einer Größe von bis zu 9 cm² exzidiert. Unmittelbar nach Entnahme wurde das Gewebe in *Phosphate buffered saline* (PBS) gelegt und auf Eis zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert.

Im Labor wurde das Gewebe aus der isotonen Flüssigkeit entnommen und auf einer sterilen Unterlage, z.B. einer Petrischale, mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde das verarbeitete Gewebe in ca. 25 ml Dispase I für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler unter kräftiger Bewegung inkubiert und dabei vom Enzym verdaut.

Mit ungefähr 20 ml PBS konnte die Enzymaktivität und damit die Reaktion abgestoppt werden. Danach wurde die Zellemlusion durch ein 70 μ m Zellsieb passiert, um die Zellen zu gewinnen, die aus dem Gewebeverband herausgelöst wurden, und diese wurden schließlich bei 16000 (300g) Umdrehungen für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Die Gewebemasse, die im Sieb hängen blieb, wurde nochmals in

25 ml verdünnte Enzymlösung gegeben, bei 37°C für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert, erneut durch das Sieb gestrichen und ebenfalls zentrifugiert.

Hiernach wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu nahm man den Überstand vom Pellet ab und resuspendierte das Pellet mit 5ml Erythrozyten-Lysepuffer. Nach 5-10 min Inkubationszeit konnte die Reaktion mit mindestens 15 ml PBS abgestoppt werden.

Nun wurde das Gemisch wieder bei 16000 Umdrehungen bei 4°C für 8 min zentrifugiert.

Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 aufgenommen. Bei Bedarf konnten sie vorher nochmals durch einen 70 µl Zellfilter gegeben werden, um letzte Verklumpungen und Fettzellen zurückzuhalten. Diese Prozeduren wurden standardmäßig von den TAs des Labors durchgeführt.

Die zweite Hälfte der Gewebestücke wurde für immunhistochemische Färbungen mit 3,7%igem Paraformaldehyd fixiert, mit steigenden Konzentrationen an Succrose (10-30%) getränkt, in Tissue-Tek eingebettet und in 6-8 µm dünne Scheiben mittels Kryotom geschnitten. Ebenfalls für immunhistochemische Färbungen wurden unbehandelte Zellen in den Zytospin gegeben, auf Objektträger übertragen und mit 3,7%igem Paraformaldehyd fixiert. Die Objektträger wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Für die Stimulation wurden die ausgelösten Zellen mit Medium auf eine Konzentration von 50.000 Zellen á 200 µl verdünnt (das entspricht 50.000 Zellen pro Well auf einer 96 Well-Kultur-Platte). Nach dem Aussäen verblieben die Zellen über Nacht bei 37° C im Brutschrank. Gemischte Synovialzellen beinhalten Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen (17).

Das hier verwendete Medium war RPMI-1640 ohne Zusatz von Phenol-Rot mit 10% FCS, 0,57 mM Ascorbinsäure 100 U/ml Penicillin und 100 ng/ml Streptomycin, 2,0 g/l NaHCO₃, 1% 1M HEPES, 0,1% Amphotericin B und 10 ml/l L-Glutamin. Der pH-Wert wurde auf Werte zwischen 7,4 und 7,5 eingestellt.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen stimuliert.

Tabelle 1. Substanzen zur Zellgewinnung und Kultivierung

Zellgewinnung	
Dispase I	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Erythrozyten-Lysepuffer	QUIAGEN, Hilden, Deutschland oder Buffer EL, Venlo, Niederlande
Liberase TM Research Grade	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
PBS Dulbeccos`s Phosphate Buffered Saline	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, Deutschland
Fibroblastenmedium	
Amphotericin B	SIGMA-ALDRICH
Ascorbinsäure	SIGMA-ALDRICH
FCS (10%) (fetal calf serum)	SIGMA-ALDRICH
Hepes Buffer	SIGMA-ALDRICH
L-Glutamine	SIGMA-ALDRICH
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot	SIGMA-ALDRICH

Zellstimulation

Zur Vorbereitung wurden die benötigten Substanzen -wenn nicht bereits aliquotiert- mit der Feinwaage abgewogen, im passenden Lösungsmittel auf eine Konzentration von $10^{-3}M$ verdünnt und an der Sterilbank steril filtriert. Die gemischten Synovialzellen wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert (Tabelle 2).

Tabelle 2. Auflistung der Substanzen zur Zellstimulation, inklusive Cofaktoren der Tyrosinhydroxylase, PDE4-Inhibitoren und Antagonisten der verschiedenen Katecholaminrezeptoren, sowie Substanzen, die den cAMP-Signalweg beeinflussen

Substanz	Konzentration (mol/L)	Wirkung	Hersteller
BH4 = 6R-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride	10^{-6}	Cofaktor der Tyrosinhydroxylase	SIGMA-ALDRICH
Fe ²⁺ sulfate heptahydrate	10^{-6}	Cofaktor der Tyrosinhydroxylase	SIGMA-ALDRICH
(R)-(-)-Rolipram	10^{-5}	PDE4 Inhibitor	TOCRIS Bioscience; Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Doxazosin mesylate	$10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}$	α 1AR Antagonist	TOCRIS
Yohimbine	$10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}$	α 2AR Antagonist	TOCRIS
VUF 5574	$10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}$	Adenosin A ₃ -Rezeptor Antagonist	TOCRIS
PSB 603	$10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}$	Adenosin A _{2B} -Rezeptor Antagonist	TOCRIS

Propranolol hydrochloride	10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}	β_2 AR Antagonist	TOCRIS
SCH 39166 hydrobromide	10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8}	D ₁ /D ₅ Dopaminrezeptor Antagonist	TOCRIS
L-741,626	10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8}	D ₂ DR Antagonist	TOCRIS
PNU 177864 hydrochloride	10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8}	D ₃ DR Antagonist	TOCRIS
L-745,870 trihydrochloride	10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8}	D ₄ DR Antagonist	TOCRIS
ANR 94	10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7}	Adenosin A _{2A} AR Antagonist	TOCRIS
SLV 320	10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8}	Adenosin A ₁ AR Antagonist	TOCRIS
Formoterol hemifumarate	10^{-7}	β_2 AR Agonist	TOCRIS
KT	10^{-7}	PKA-Inhibitor	SIGMA-ALDRICH
H89	10^{-6}	PKA-Inhibitor	TOCRIS
CBP-CREB-CREB interaction inhibitor (CB)	10^{-5}	CBP-CREB Interaction Inhibitor	MERCK Millipore, Darmstadt, Deutschland
Pertussis toxin	25ng	G α_i PCR-Signalweg-inhibitor	SIGMA-ALDRICH
Ruthenium red ab120264	10^{-7}	Calcium Signalweg Inhibitor	Abcam, Cambridge, UK
Chetomin	10^{-8}	HIF Inhibitor	TOCRIS/SIGMA-ALDRICH
Caffeic acid phenethyl ester	10^{-5}	NF κ B Inhibitor	TOCRIS
FR 180204	10^{-6}	ERK Inhibitor	TOCRIS
KC7F2	5×10^{-5}	HIF-1 α Inhibitor	TOCRIS

Für die verschiedenen Antagonisten an den GPCRs wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die sich an den Angaben des Herstellers für die optimale Konzentration und damit Wirksamkeit der entsprechenden Substanz orientierte. Es wurde jeweils die optimale Konzentration und eine 10er Potenz höher und niedriger hergestellt. Alle übrigen Substanzen wurden in der vom Hersteller als optimal angegebenen Konzentration verwendet. Eisen ($22,2 \mu\text{l}$, 10^{-5}M) und BH4 ($22,2\mu\text{l}$, 10^{-6}M) wurden zu jedem Well hinzugegeben, um für die Tyrosin-Hydroxylase (TH) überall gleich optimale Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die übrigen Substanzen wurden in absteigender Verdünnung nach Schema pipettiert (jeweils $22,2 \mu\text{l}$ von jeder Substanz

in ein Well). Abschließend erfolgte jeweils ein Volumenausgleich mit Medium, um in jedem Well vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Dann wurden die Platten 24 h bei 37° C im Brutschrank unter Normoxie (20% O₂) und Hypoxie (1% O₂) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Überstände für die Messung von TNF α und IL-6 mittels Elisa bzw. Luminex abgenommen und bei -20°C eingefroren.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Die quantitative Bestimmung von IL-6 aus den Überständen der stimulierten Primärzellen gelang mithilfe eines kommerziellen ELISA Kits von BD OptEIA™. Es handelte sich hierbei um einen *solid phase sandwich* ELISA, dessen Prinzip im Folgenden kurz beschrieben wird. Ein monoklonaler IL-6 spezifischer Antikörper wurde auf 96-Well Platten aufgetragen und blieb auf dem Boden der Wells haften. Anschließend wurden Standards und Proben auf die Platten aufgetragen. Alles IL-6, das in den Proben bzw. Standards vorhanden war, band dabei an die immobilisierten Antikörper. Nach einem Waschgang wurde ein Gemisch aus Streptavidin-Horseradish Peroxidase-Konjugat und biotinyliertem Antikörper gegen humanes IL-6 in die Wells gegeben, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper „Sandwich“ entstand. Es folgte ein erneuter Waschgang. Schließlich wurde die *TMB substrat solution* hinzugegeben, die mit der Peroxidase reagierte, wobei direkt proportional zur Menge an gebundenem IL-6 ein blauer Farbstoff entstand. Mittels der *Stop Solution* (Schwefelsäure) wurde dieser Vorgang abgestoppt und es kam zu einem Farbumschwung von blau zu gelb. Die Absorbanz wurde bei 450 nm im Photometer bestimmt.

LUMINEX

Zur quantitativen Bestimmung von IL-10 und TNF α aus den Überständen der stimulierten Primärzellen wurde auf die Technologie von Luminex bzw. Magpix zurückgegriffen, die nach folgendem Prinzip funktioniert. Probenmaterial wurde zu farbkodierten, magnetischen Beads gegeben, die an spezifische Antikörper gebunden waren. Diese Antikörper banden wiederum an die in den Proben vorhandenen gewünschten Analyte- in diesem Fall TNF α . Anschließend wurden biotinylierte Antikörper gegen die zu detektierenden Interleukine zugegeben, und es formte sich auch hier ein Antikörper-Antigen-Antikörper „Sandwich“. Hinzugegebenes PE-konjugiertes Streptavidin heftete sich an die biotinylierten Antikörper. Nun wurden mithilfe der Magpix Technologie die Analysate qualitativ und quantitativ bestimmt.

Dazu wurden die Beads von einem Magneten im Magpixgerät eingefangen und in einer Schicht auf dem Magneten festgehalten, während zwei LEDs mit spezifischem Spektrum die Beads abtasteten. Eine der LEDs identifizierte das gesuchte Analysat, während die andere LED das Ausmaß des PE generierten Signals bestimmte. Jedes Well wurde dabei von einer CCD-Kamera dargestellt (siehe: <https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>). Die für ELISA und Luminex verwendeten Substanzen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Substanzen für ELISA und Luminex

Blocklösung	
20ml PBS (1-fach)	PBS (10-fach)= 4l Aqua dest.+ 320g NaCl (ROTH) + 8g KH ₂ PO ₄ (MERCK Millipore) + 56,96g Na ₂ HPO ₄ (MERCK Millipore)
2ml FCS	SIGMA-ALDRICH
Coating Buffer	MERCK Millipore
ELISA Kit	BD OptEIA™, BD Biosciences, US
Luminex Kit	
Milliplex® ^{MAP} High Sensitivity Human Cytokine Magnetic Bead Panel Immunoassay	MERCK Millipore
Substrat Solution (TMB)	
1 Tabl. TMB-Dihydrochlorid	SIGMA-ALDRICH
10ml Phosphat-Citrat-Puffer	SIGMA-ALDRICH
10µl 30% H ₂ O ₂	MERCK Millipore
Stopplösung	
946ml Aqua dest.	
54 ml 96%ige H ₂ SO ₄	MERCK Millipore
Wash Buffer	
2L Aqua dest.	
1Tabl. PBS	SIGMA-ALDRICH
1ml Tween-20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

PBS= Phosphat-buffered-saline; FCS= fetal calf serum; TMB= 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; Tween-20 = Polysorbat 20

Immunhistochemischer Nachweis von Phosphodiesterase 4 und β-Arrestin

Die Objektträger mit synovialen Gewebeschnitten aus dem Kryotom oder synovialen Zellen (mittels Zytospin aufgetragen) wurden in einem mit Millipore-Vek Wasser gefüllten Objektträgerhalter rehydriert. Anschließend wurden die Objektträger mit Hilfe von PBS vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen in einen Objektträgerhalter eingespannt. Dann wurde mit einer Mischung aus 10% bovinem Serum-Albumin

(BSA), 10% Hühnerserum und 10% Ziegenserum-Mischung für 45 min bis 1h geblockt. Hiernach wurde der mit 10%igem BSA verdünnte Primärantikörper gegen PDE4 (1:500, rabbit-anti-PDE4), bzw. gegen β -Arrestin (1:100, mouse anti- β -arrestin2; beide von Abcam) alleine oder in Kombination (Doppelfärbung) auf jeweils 2 Objektträger gegeben. Je eine Negativkontrolle blieb ohne Primärantikörper. Außerdem wurde je eine Isotypkontrolle mit unspezifischem rabbit IgG (1mg/ml; 1:1000) für PDE4 bzw. mouse IgG₂ für β -Arrestin (0,5mg/ml; 1:50) hergestellt, um später differenzieren zu können, ob wirklich spezifisch gefärbt wurde. Dann wurden die Objektträger über Nacht bei 8°C feucht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit 1xPBS (ohne Triton) gewaschen, bevor der mit 10%igem BSA verdünnte Sekundärantikörper aufgetragen wurde. Dabei wurde für die PDE4-Färbungen der goat anti-rabbit Antikörper Alexa Fluor 488 und für die β -Arrestin-Färbungen der goat anti-mouse Antikörper Alexa Fluor 594 verwendet (beide 1:500 verdünnt). Nach 90 min Inkubationszeit wurde einmal mit 1xPBS mit 0,03%igem Triton und zweimal mit 1xPBS ohne Triton gewaschen. DAPI, zur Visualisierung der Zellkerne, (1:1000 mit 1xPBS verdünnt) wurde für 3 min auf die Objektträger gegeben und anschließend abgeklopft. Zuletzt wurden Deckgläschen mithilfe von Mounting Medium auf das Objekt gesetzt. Die Objektträger wurden nun maximal eine Woche bei 4°C gelagert, in der Regel wurde aber spätestens am nächsten Tag mikroskopiert.

Proximity Ligation Assay (PLA) zur Darstellung der Nachbarschaft zwischen Phosphodiesterase 4 und β -Arrestin

Der PLA (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) wurde benutzt, um aufzudecken, ob sich β -Arrestin und PDE4 im untersuchten Gewebe in unmittelbarer Nähe zueinander befanden. Das Prinzip ist in Abbildung 2 dargestellt.

Dazu wurden die Objektträger zunächst wieder in einem mit Millipore-Vek Wasser gefüllten Objektträgerhalter rehydriert. Dann wurde mit einer Mischung aus 10% BSA, 10 % Hühnerserum und 10% Ziegenserum für 45 min bis 1h geblockt. Jetzt wurden der mit 10%igem BSA verdünnte Primärantikörper gegen PDE4 (1:500) und gegen β -Arrestin (1:100) (beide von Abcam) auf die Objektträger gegeben. Je eine Negativkontrolle blieb ohne Primärantikörper. Außerdem wurde je eine Isotypkontrolle mit rabbit IgG (1mg/ml; 1:1000) für PDE4 bzw. mouse IgG₂ für β -Arrestin (0,5mg/ml; 1:50) zur Kontrolle hergestellt. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 8°C feucht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit 1xPBS (ohne Triton) gewaschen. Die beiden mit Oligonukleotiden

konjugierten sekundären Antikörper (anti-mouse PLUS, anti-rabbit MINUS) wurden jetzt 1:5 verdünnt und auf die Objektträger aufgetragen.

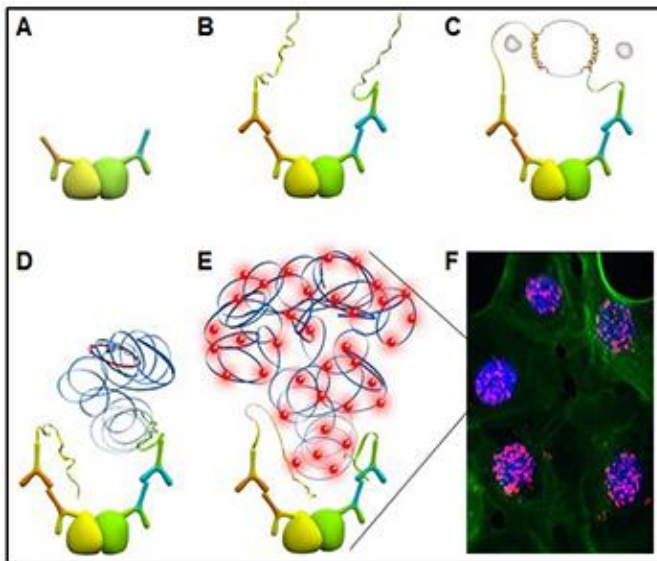


Abbildung 2. PLA Prinzip: Zwei Primärantikörper aus verschiedenen Spezies erkennen die beiden Zielantigene und binden an sie (A). Anschließend können Spezies-spezifische Sekundärantikörper (PLA Proben) mit einem einzigartigen kurzen DNA-Strang an die Primärantikörper binden (B). Wenn die PLA Proben sehr nah aneinander zu liegen kommen (<40nm), können die DNA-Stränge mithilfe von zwei weiteren kreisbildenden DNA-Oligonukleotiden interagieren (C). Nachdem diese Oligonukleotide Enzym-vermittelt ligieren konnten, werden sie mittels *rolling circle amplification* durch eine Polymerase vervielfacht (D). Da hierbei Nukleotide eingebaut werden, die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet wurden, kann man das resultierende Produkt im Fluoreszenzmikroskop als klaren leuchtenden Punkt nachweisen (E und F).

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biology/schematic-of-a-duolink.png>
aufgerufen am 19.05.19 um 21:37

Anschließend wurden die Objektträger für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Ligations-Sud 1:5 mit destilliertem Wasser gelöst und gut gemischt. Die sekundären Antikörper wurden nun von den Objektträgern geklopft, und es folgte ein Waschgang mit Waschpuffer A (3x stärker konzentriert als Waschpuffer B) 2-mal für 5 min. Danach erst wurde die Ligase (bei -20°C gelagert) aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:40 zur Ligationslösung gegeben. Nach dem Auftragen der Ligase-Ligations-Lösung inkubierten die Objektträger für 30 min bei 37°C. Nachdem der Amplifikations-Sud 1:5 in destilliertem Wasser gelöst wurde, wurden die Objektträger erneut mit Waschpuffer A 2-mal für 2 min gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt, da einige Reagenzien lichtempfindlich waren. Die Polymerase wurde auf Eis langsam aufgetaut und in

einem Verhältnis von 1:80 zur Amplifikations-Lösung gegeben und gründlich gemischt. Diese Lösung wurde jetzt auf die Objektträger aufgetragen und für 100 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Amplifikations-Lösung abgeklopft und die Objektträger 2mal mit Waschpuffer B für 10 min und 1x mit 0,01x Waschpuffer B für 1 min gewaschen. Schließlich wurden die Objektträger bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet und danach mit *Duolink In Situ Mounting Medium* mit DAPI und einem Deckgläschen bedeckt. Nach frühestens 15 min wurden die Objektträger mikroskopiert. Die verwendeten Reagenzien und Geräte sind in Tabelle 4, 5 und 6 aufgelistet.

Tabelle 4. Auflistung der verwendeten Zutaten der immunhistochemischen Färbungen und PLA

Immunhistochemie/PLA	
Antikörper	
Rabbit-anti-PDE4	Ab14628, Abcam
Mouse- anti-β-Arrestin 2	Ab54790, Abcam
Goat-anti-rabbit-AK Alexa Fluor 488	Thermo Fischer scientific corporation, Massachusetts, USA
Goat-anti-mouse-AK Alexa Fluor 594	Thermo Fischer
Isotypkontrolle rabbit IgG Antikörper	AB-105-C, R&D Systems, Minnesota, USA
Isotypkontrolle mouse IgG _{2A} Antikörper	MAB0031, R&D Systems
Blocklösung	
10% Bovines Serum Albumin	Biomol, Hamburg, Deutschland
10% Hühnerserum	
10% Ziegenserum	
Duolink PLA Essay	Olink Proteomics, Uppsala, Schweden
DAPI	D9542, SIGMA-ALDRICH
Mounting Medium	HC08, MERCK Millipore
Triton	
Tissue Tec	Sakura Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

DAPI= 4', 6-Diamin-2-phenylindol; Triton = (4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)-phenyl)-deca(ethylenglycol)ether)

Tabelle 5. Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Zellgewinnung,-stimulation, Elisa und Luminex

Verbrauchsmaterialien	
96-Well Platten-Cell Culture Plate	CoStar [®] SIGMA-ALDRICH
BD Falcon Tubes 50ml/15ml	BD Biosciences
Einzelstreifen für ELISA	Nunc MaxiSorp [®] Thermo Fischer
Eppendorf Cups diverse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen diverse	Eppendorf
Schraubbecher mit Deckel	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Stripette 5/10/25/50ml	CoStar [®] SIGMA-ALDRICH

Tabelle 6. Liste der verwendeten Geräte

Brutschrank	Haereus Instruments, Hanau, Deutschland
Microplate Reader	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Microplate Manager Software	Bio-Rad
Feinwaage	Sartorius Research Kern 440-33, Göttingen, Deutschland
Hypoxieschrank	New Brunswick Galaxy 14 S, Eppendorf
LUMINEX Reader	MAGPIX, MERCK Millipore
Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific corp. Variomag MONO KOMET
Mikroskop	Axiovert 200M MAT, Software: Axio Vision, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PH-Meter	Mettler Toledo FiveEasy pH, Columbus, Ohio
Schüttler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sterilbank	Haereus Instruments SAFE 2020
Vortexer	IKA MS1 Minishaker, Staufen im Breisgau, Germany
Wasserbad	julabo SW- 20C, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	eppendorf Centrifuge 5424 R Thermo Fisher Scientific corp. Megafuge 1.0R

Datenanalyse

Für jedes Experiment wurden Synovialzellen von mindestens 4 Patienten verwendet. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mittels ANOVA on ranks (SigmaPlot V.11, Systat Software, Erkrath, Germany) durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Software findet sich in Tabelle 7. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Die Daten wurden als vertikale Boxplots mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile dargestellt. Die Werte wurden aufgrund der hohen Varianz bei Primärzellen in Prozent der Normoxiekontrolle angegeben. Signifikante Veränderungen wurden durch eine blaue Linie zwischen Normoxiekontrolle und entsprechender Box angezeigt. Grüne Boxen zeigen Ergebnisse von Stimulationen unter Normoxie, rote Boxen entsprechend Ergebnisse unter Hypoxie. Jeder Punkt symbolisiert den Messwert eines Patienten. Auf der X-Achse sind die zur Stimulation verwendeten Substanzen mit entsprechender Konzentration angegeben.

Tabelle 7. Liste der verwendeten Software zur Datenanalyse

Citavi	5, Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Office Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Sigmaplot 11.0	Systat Software Inc., Erkrath, Deutschland

Ergebnisse

Phosphodiesterase 4-Inhibition

Bei einer Hemmung der Phosphodiesterase 4 mittels Rolipram würde man einen erhöhten cAMP Spiegel und entsprechend einen Abfall der TNF α und einen Anstieg der IL-6 Konzentration erwarten.

Beim OA Patienten zeigt sich unter Normoxie eine signifikant verminderte TNF α Freisetzung und zwar Dosis-abhängig bei Rolipram 10⁻⁷M und 10⁻⁶M. Bei Hypoxie lässt sich hier kein Effekt beobachten (Abbildung 3, A).

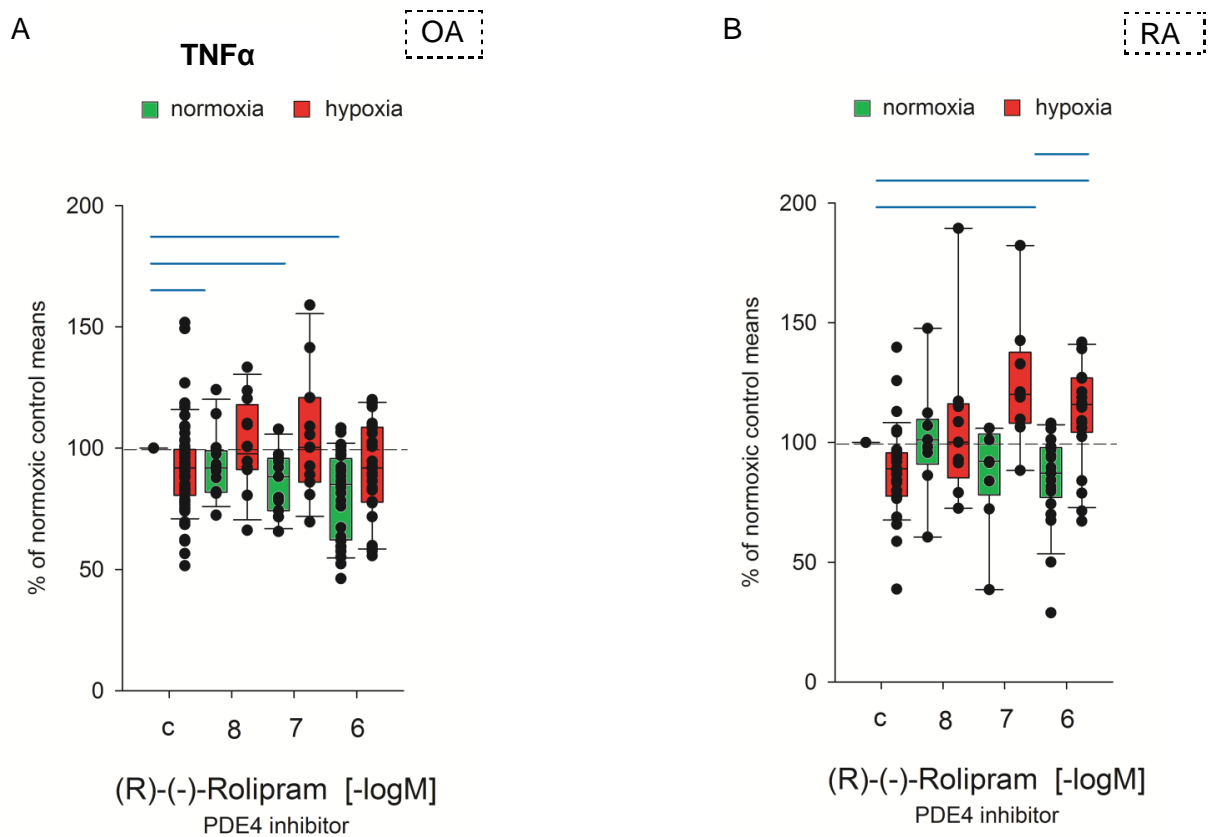


Abbildung 3. Einfluss von PDE4-Hemmer Rolipram auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle = 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzien in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt.

Beim RA Patienten zeigt Rolipram unter Normoxie keinen signifikanten Effekt auf die TNF α Konzentration. Dagegen zeigt sich hier unter Hypoxie eine signifikant

verstärkte Freisetzung von TNF α durch Rolipram bei einer Konzentration von 10^{-7} und 10^{-6} M im Vergleich zur Hypoxiekontrolle (Abbildung 3, B).

Für die IL-6 Konzentration kann man beim OA Patienten unter Hypoxie einen signifikanten Abfall der IL-6-Konzentration bei einer Rolipram-Konzentration von 10^{-6} M beobachten (Abbildung 4, A). Beim RA Patienten gibt es keine signifikante Änderung der IL-6 Konzentration bei Hemmung der PDE4 mit Rolipram (Abbildung 4, B).

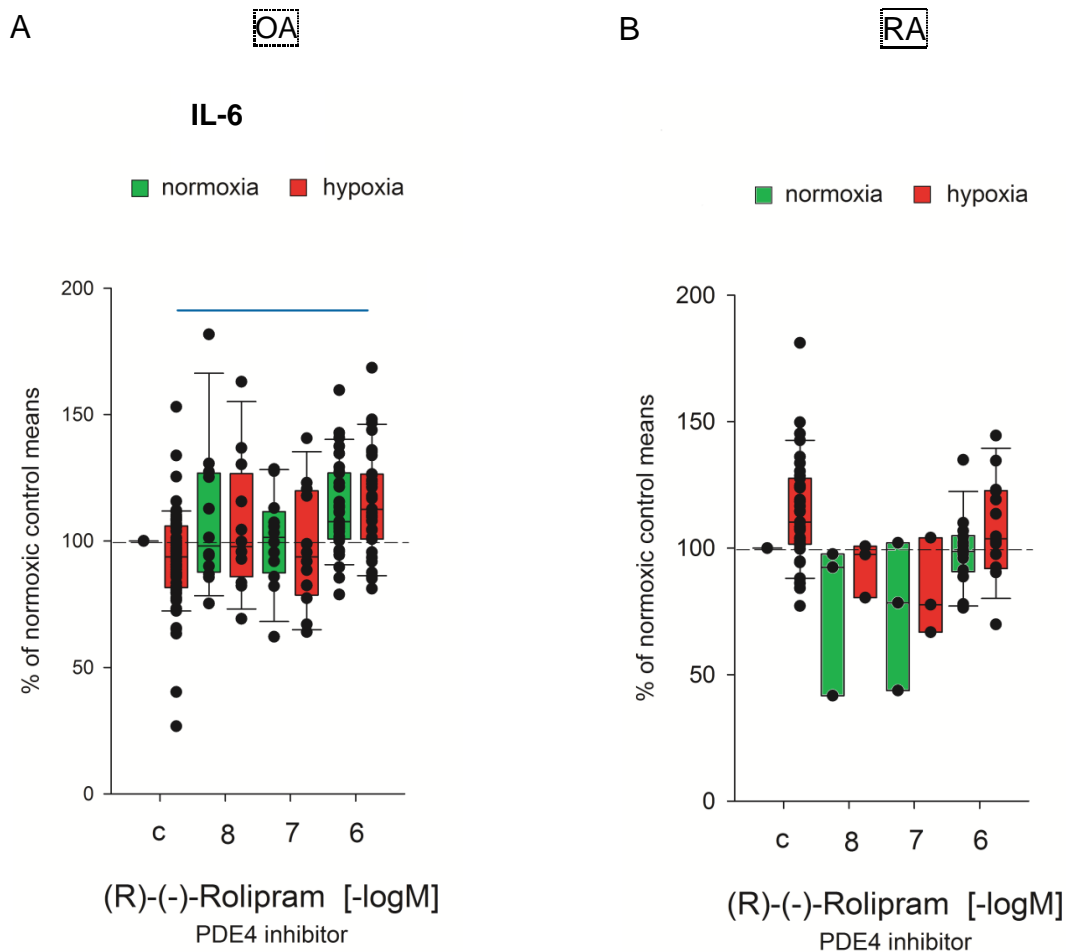


Abbildung 4. Einfluss von PDE4-Hemmer Rolipram auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle = 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt.

Nachweis von PDE 4 und β -Arrestin in menschlichem Synovialgewebe

Wie Baille et al. 2003 gezeigt haben, bindet PDE4 in menschlichen embryonalen Nierenzellen 293 an β -Arrestin und ist damit vermutlich für einen Switch vom Gas-

gekoppelten Signalweg zum Gai-gekoppelten Signalweg verantwortlich. Die beiden Moleküle, die einen solchen Switch möglicherweise auslösen können, nämlich β -Arrestin und PDE4, konnten in OA und RA Synovialgewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 5).

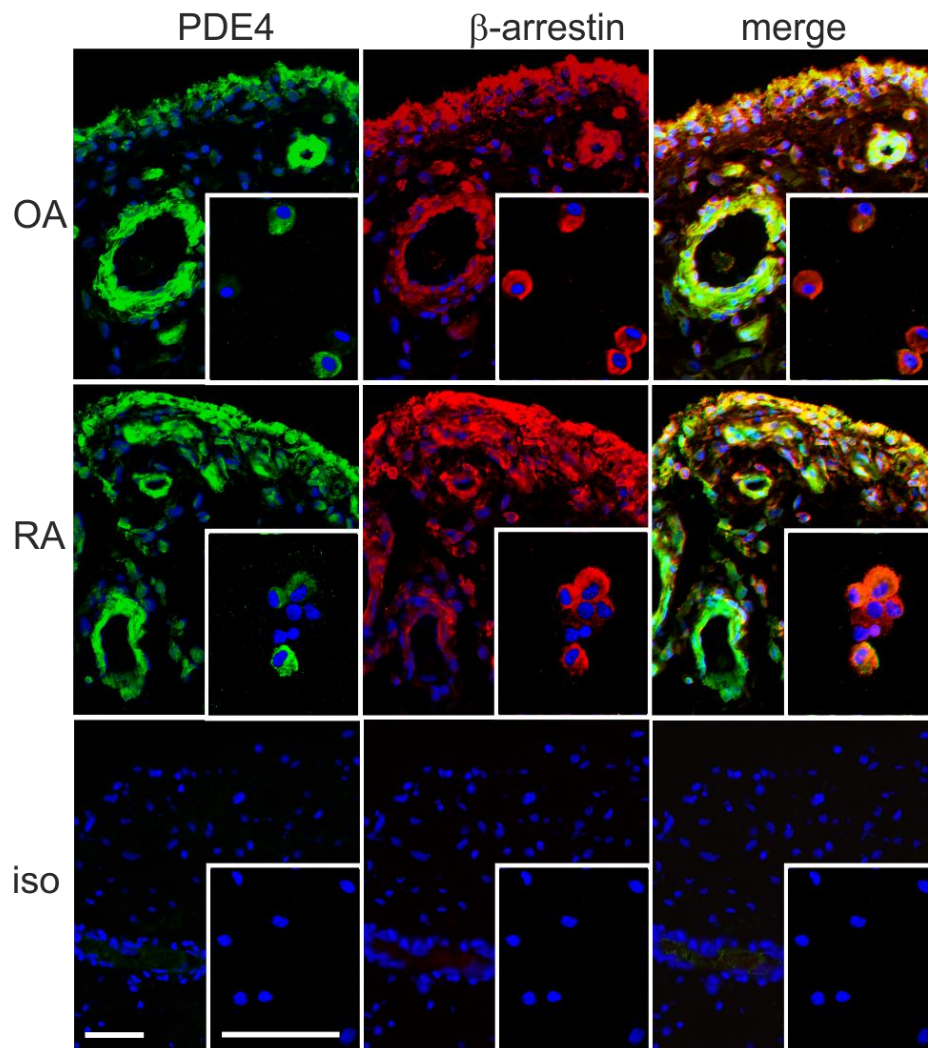


Abbildung 5. Aus Jenei-Lanzl et al (55); Immunhistochemischer Nachweis von PDE4 (grüne Färbung) und β -Arrestin (rote Färbung) in menschlichen Synovialgewebeschnitten aus dem Kryotom und menschlichen Synovialzellen mittels Zytospin auf Objektträger aufgebracht (jeweils rechts unten im Bild) von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis. Der Balken entspricht 50 μ m. Die zusammengeführten Bilder zeigen die Überlagerung der PDE4 und β -Arrestin-Färbung. Zum Vergleich ist die Isotyp-Kontrolle mit abgebildet. Sie zeigt ebenfalls Synovialgewebe bzw. Synovialzellen von Patienten, die mit unspezifischem rabbit IgG für PDE4 bzw. mouse IgG₂ für β -Arrestin behandelt wurden, um differenzieren zu können, ob spezifisch gefärbt wurde. Zellkerne erscheinen nach Färbung mit DAPI blau. Die hier gezeigten Mikroskopbilder wurden von Frau Dr. rer. nat. Zsuzsa Jenei-Lanzl angefertigt.

Im Bereich der Deckschicht (Lining layer) und um Blutgefäße herum war die Färbung besonders intensiv. Eine Doppel-Färbung von PDE4 und β -Arrestin legte nahe, dass beide Moleküle benachbart sind (Abbildung 5).

Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei den Färbungen der einzelnen Synovialzellen von OA und RA Patienten beobachten (Abbildung 5, weiß umrandete, rechte untere Ecke). Beide Moleküle, PDE4 und β -Arrestin waren vorhanden und in ähnlicher Lokalisation anzutreffen.

Gai Protein-gekoppelte Rezeptor-Antagonisten

Da bestimmte Synovialzellen in der Lage sind, selbstständig Katecholamine zu produzieren und zu sezernieren (56,57), wollten wir beobachten, ob Experimente mit Antagonisten an G α s- und Gai-Rezeptoren die zuvor gesehenen Effekten mit Agonisten (55) unterstützen können.

Der Signalweg, der dem Gai-Rezeptor nachfolgt, wirkt über die ERK1/2 letztendlich stimulierend auf die TNF α -Produktion und hemmend auf die IL-6 Produktion. Man könnte folglich erwarten, dass eine Hemmung dieses Signalwegs zu einem Abfall der TNF α -Konzentration und respektive einem Anstieg von IL-6 führt.

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zeigten sich beim OA Patienten unter Einfluss von Antagonisten am Gai-Rezeptor keine Effekte auf TNF α (Daten nicht gezeigt). Bei RA Patienten kam es dagegen unter Normoxie bei verschiedenen Antagonisten zu einem Abfall der TNF α Konzentration.

Dies war signifikant für Yohimbine (α 2AR Antagonist) bei 10^{-9} und 10^{-8} M (Abbildung 6, A), für VUF 5574 (AR $_A3$ Antagonist) bei 10^{-7} M (Abbildung 6, B), für L-741,626 (D2DR Antagonist) bei 10^{-8} M (Abbildung 7, A), für PNU 177864 hydrochloride (D3DR Antagonist) bei 10^{-9} und 10^{-8} M (Abbildung 7, B) und für L-745,870 trihydrochloride (D4DR Antagonist) bei 10^{-10} und 10^{-9} M (Abbildung 7,C). Unter Hypoxie ließen sich hier keine signifikanten Effekte beobachten (Abbildung 6 und 7).

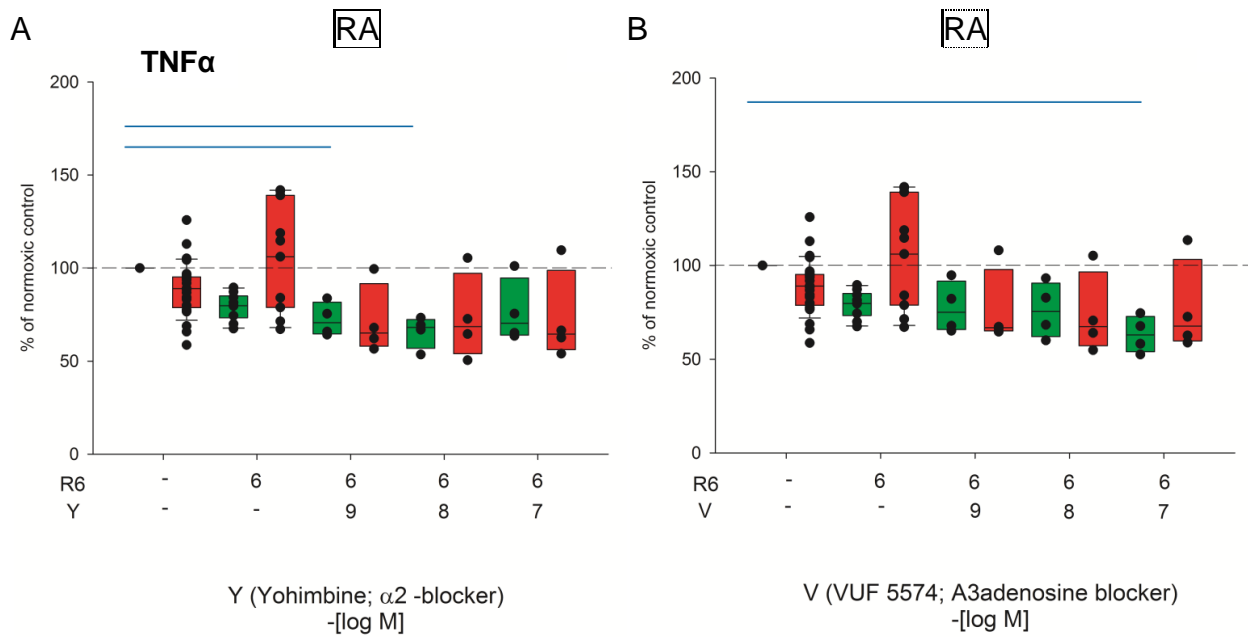


Abbildung 6. Einfluss von G α i Protein-gekoppelten Rezeptor Antagonisten (A: Yohimbine= α 2-Blocker; B: VUF 5574= A3-Adenosin Blocker) auf die TNF Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M.

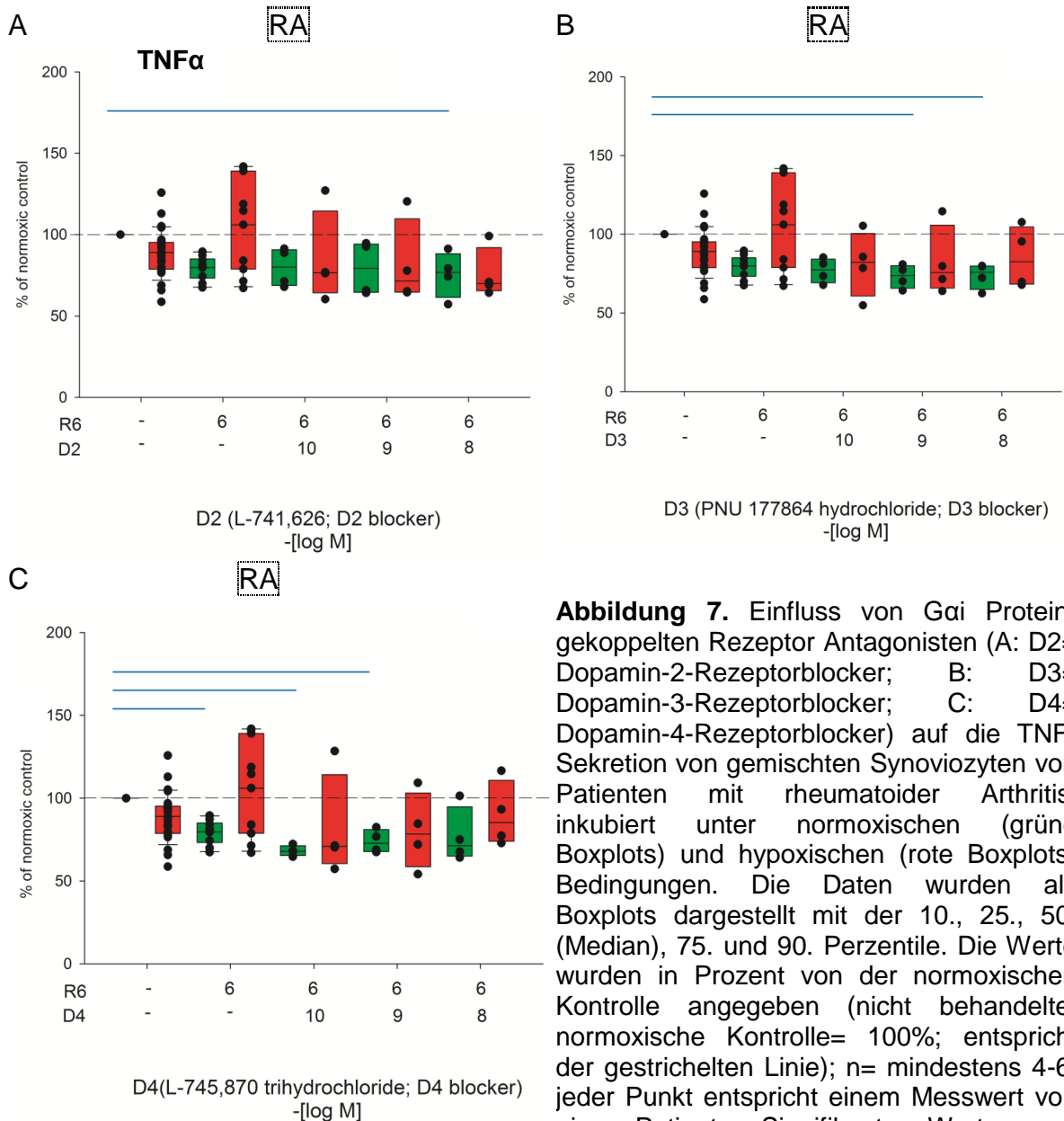


Abbildung 7. Einfluss von Gai Proteingekoppelten Rezeptor Antagonisten (A: D2= Dopamin-2-Rezeptorblocker; B: D3= Dopamin-3-Rezeptorblocker; C: D4= Dopamin-4-Rezeptorblocker) auf die TNF-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte

($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$.

Für die IL-6 Konzentrationen lassen sich für OA und RA Patienten nur unter Hypoxie signifikante Effekte beobachten. Beim OA Patienten kommt es bei Stimulation mit VUF 5574 (AR_{A3} Antagonist) $10^{-7}M$ (Abbildung 8, A), für L-741,626 (D2DR Antagonist) (Abbildung 8, B) und PNU 177864 hydrochloride (D3DR Antagonist) (Abbildung 8, C) jeweils bei $10^{-8}M$ zu einem signifikanten Abfall der IL-6 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram.

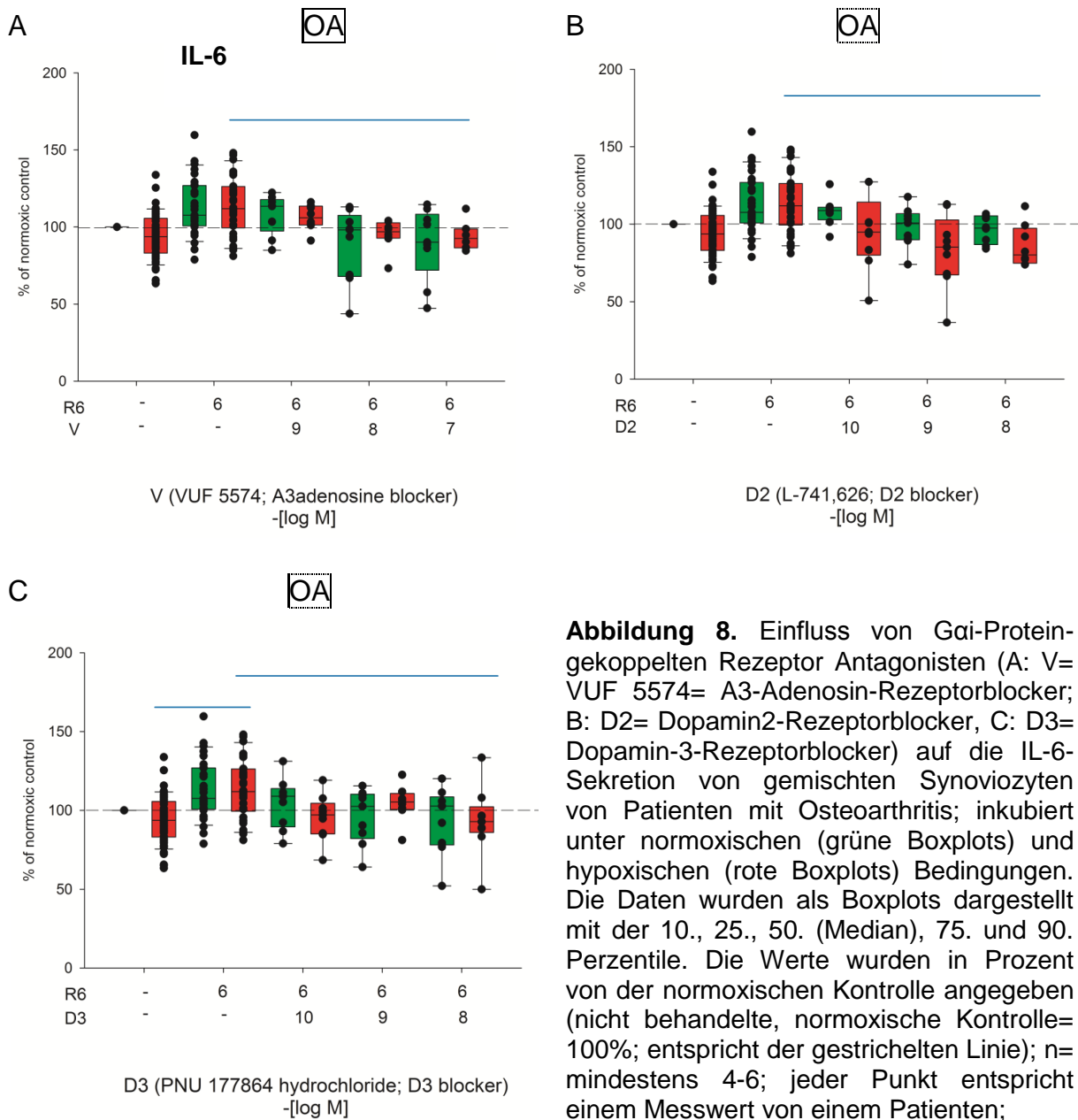


Abbildung 8. Einfluss von Gai-Proteingekoppelten Rezeptor Antagonisten (A: V= VUF 5574= A3-Adenosin-Rezeptorblocker; B: D2= Dopamin2-Rezeptorblocker, C: D3= Dopamin-3-Rezeptorblocker) auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten;

Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$.

Beim RA Patienten kommt es bei Stimulation mit L-741,626 (D2DR Antagonist) bei einer Konzentration von $10^{-10}M$ zu einem signifikanten Abfall von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle ohne Rolipram (Abbildung 9).

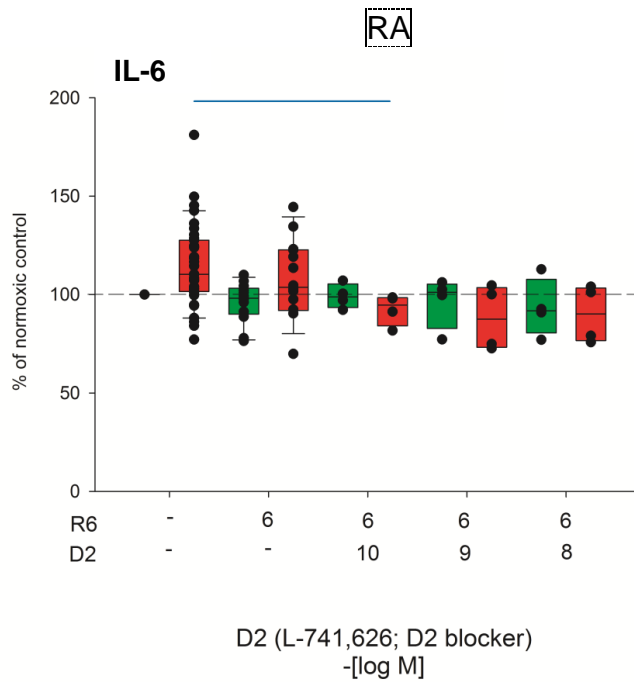


Abbildung 9. Einfluss von Gai-Protein-gekoppelten Rezeptor Antagonisten (D2= Dopamin2-Rezeptorantagonist) auf die IL6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten;

Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$.

Gas Protein-gekoppelte Rezeptor-Antagonisten

Die Physiologie des Gas-gesteuerten-Signalwegs ist dem Gai-Rezeptor-Weg entgegengesetzt. Über eine Gas-Stimulation der Adenylatcyclase kommt es zu einem Anstieg von cAMP, das sich hemmend auf die TNF α Produktion und stimulierend auf die IL-6 Konzentration auswirkt. Bei einer Inhibition dieser Rezeptoren könnte man dementsprechend eine erhöhte TNF α -Konzentration und eine erniedrigte IL-6 Konzentration erwarten.

Für OA Patienten zeigte sich bei der Inhibition der Gas-Rezeptoren ein signifikanter Abfall der TNF α Konzentration. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie ließ sich bei Hemmung des Adenosinrezeptors A2A (ARA2A) durch den Antagonisten ANR94 in den Konzentrationen $10^{-9}M$, $10^{-8}M$ und $10^{-7}M$ im Vergleich zur Kontrolle ein signifikantes Absinken von TNF α beobachten (Abbildung 10, A).

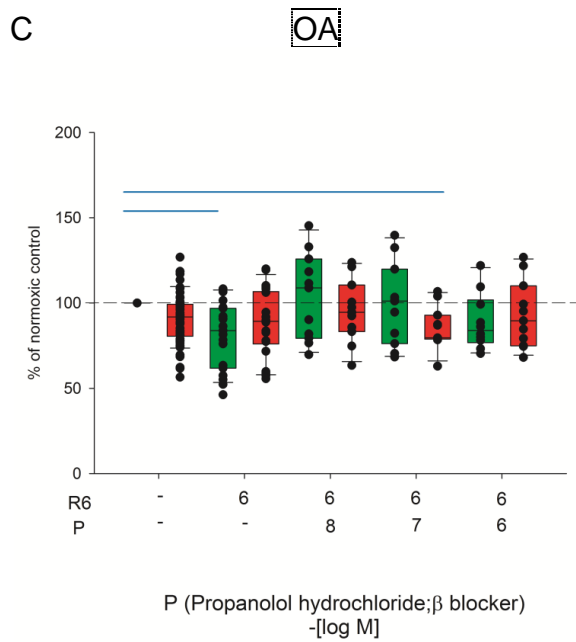
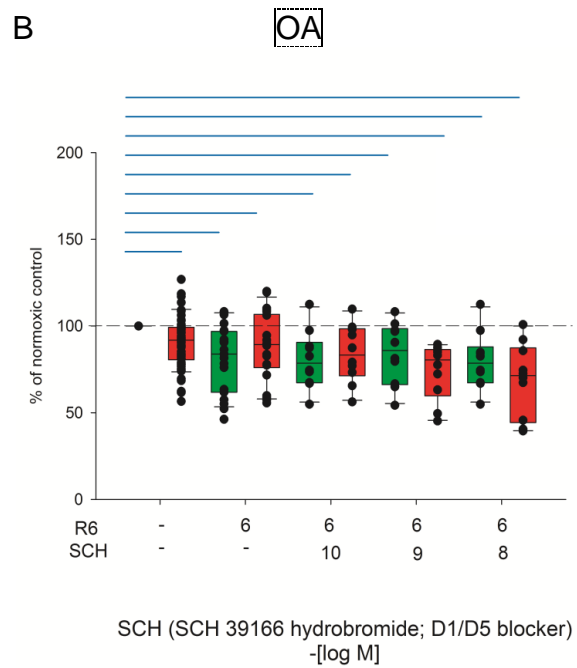
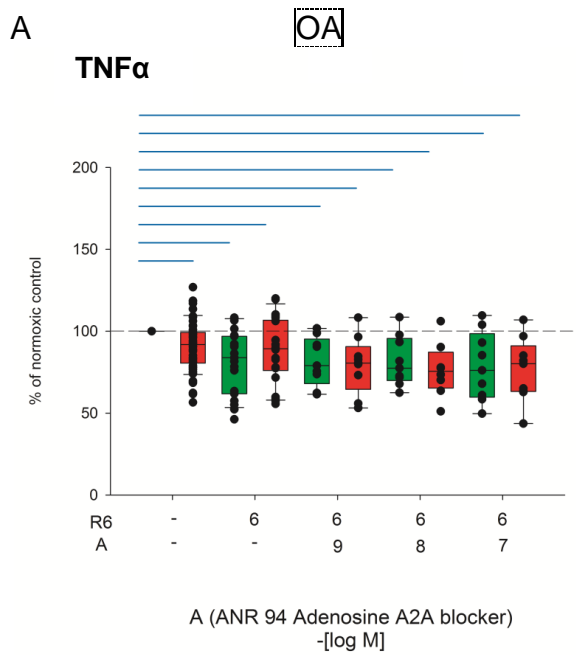


Abbildung 10. Einfluss von Gas Protein-gekoppelten Rezeptor Antagonisten (A: A= ANR94 Adenosine A2A blocker; B: SCH= SCH 39166 hydrobromide= D1/D5 Blocker; C: P= Propranolol hydrochloride= β -Blocker) auf die TNF-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen; Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden

als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M.

Die gleichen Effekte findet man beim Dopaminrezeptor 1 und 5 (D1/D5) Blocker SCH 39166 hydrobromide bei 10^{-10} M, 10^{-9} M und 10^{-8} M (Abbildung 10, B). Der β -AR-Antagonist Propranolol hydrochlorid vermochte dagegen nur unter Hypoxie bei einer Konzentration von 10^{-7} M die TNF α Konzentration signifikant zu senken (Abbildung 10, C).

Beim RA Patienten zeigte sich ein ähnliches Bild. Unter Normoxie führte eine Stimulation mit Propanolol in allen drei Konzentrationen (10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M) (Abbildung 11, A), mit ANR94 (10^{-9}M , 10^{-8}M und 10^{-7}M) (Abbildung 11, B) mit SCH 39166 hydrobromide bei 10^{-10}M , 10^{-9}M und 10^{-8}M (Abbildung 11, C) oder mit PSB603 bei 10^{-10}M und 10^{-9}M (Abbildung 11, D) zu einem signifikanten Abfall der TNF Konzentration. Unter Hypoxie führte eine Stimulation ebenfalls zu einem Absinken der TNF Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

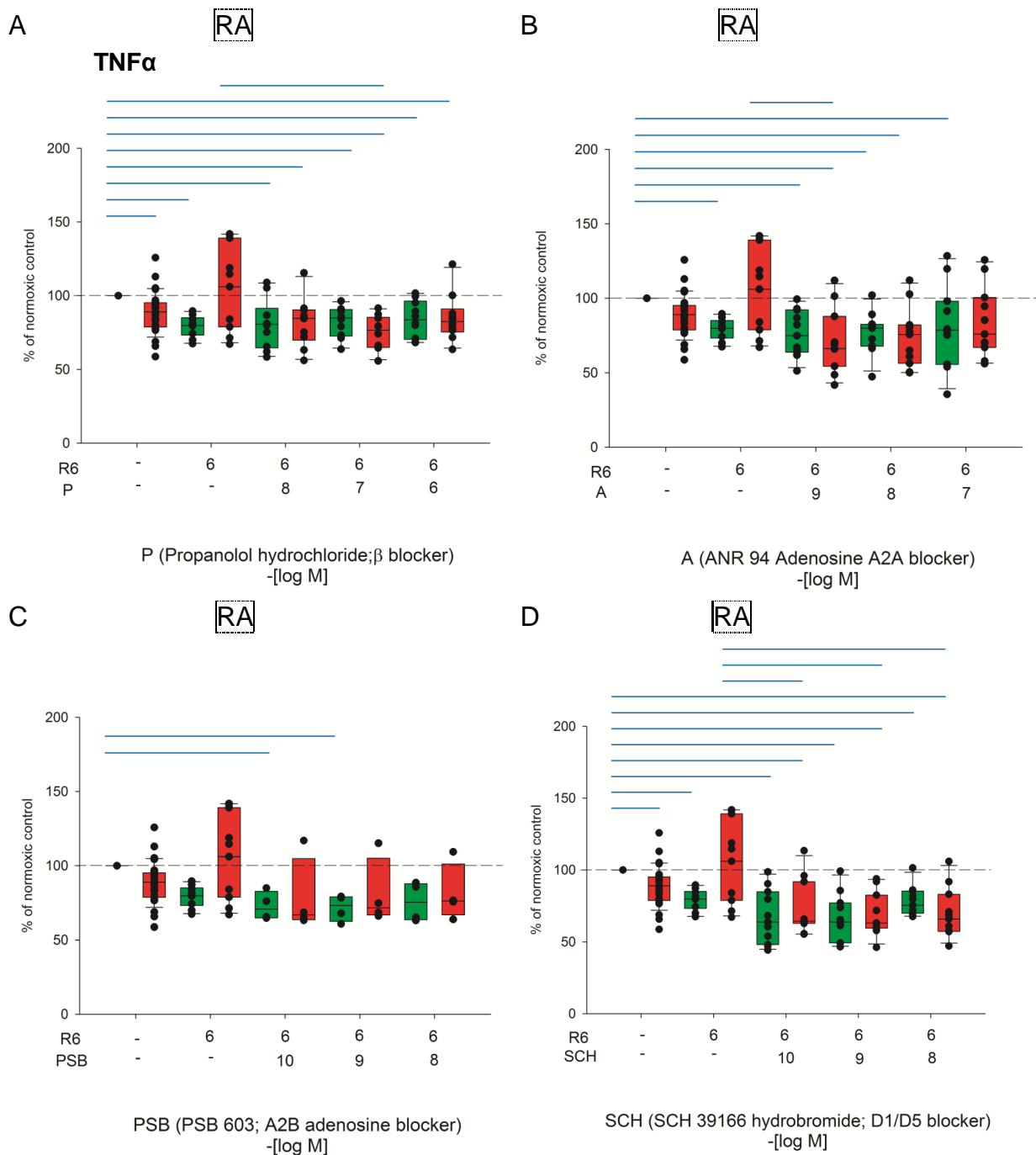


Abbildung 11. Einfluss von Gas Protein-gekoppelten Rezeptor Antagonisten auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M.

Bei der IL-6 Konzentration zeigte sich bei OA ein signifikanter Abfall unter Hypoxie bei Stimulation mit PSB 603 (Adenosin A_{2B} AR Antagonist) bei 10⁻⁸M (Abbildung 12, A) und SCH 39166 hydrobromide (D₁/D₅ Dopaminrezeptor Antagonist) bei 10⁻¹⁰M (Abbildung 12, B) im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram. Bei Stimulation mit PSB 603 (Adenosin A_{2B} AR Antagonist) bei 10⁻¹⁰M kam es unter Hypoxie dagegen im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentration (Abbildung 12, A). Bei RA Patienten zeigten sich hier keine signifikanten Effekte auf die IL-6 Konzentration- dies lag vermutlich an der zu geringen Zahl an auswertbaren Daten (Daten nicht gezeigt).

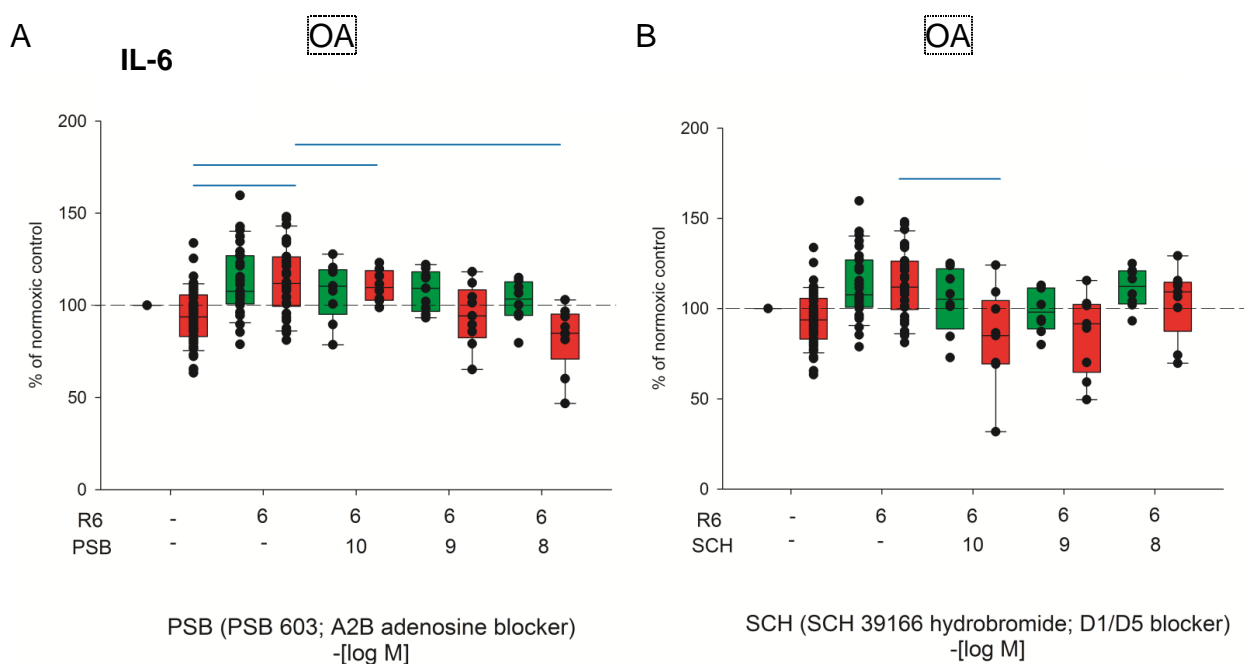


Abbildung 12. Einfluss von Gas-Protein-gekoppelten Rezeptor Antagonisten (A: PSB= PSB 603= A_{2B}-Adenosin-Blocker; B: SCH= SCH 39166 hydrobromide= D₁/D₅ Blocker) auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte (p≤ 0,05%) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10⁻⁶M.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der 1. Stimulation findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8. Übersicht über das Verhalten von TNF α und IL-6 bei Stimulation verschiedener Katecholaminrezeptoren mit ihren Antagonisten; Pfeil nach oben= Anstieg, Pfeil nach unten= Abfall der TNF α bzw. IL6 Konzentration.

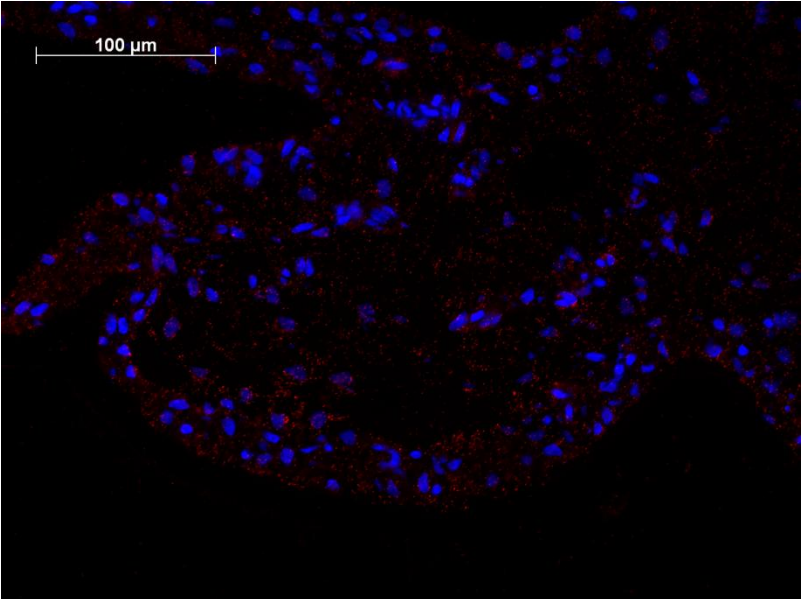
1.Stimulation			OA						RA					
			TNF α			IL-6			TNF α			IL-6		
			Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3
R PDE4 Hemmer (-6)	Normoxie	Kontrolle		↓	↓									
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle						↑		↑	↑			
		Rolipram												
P β Anta- gonist (-8,-7,-6)	Normoxie	Kontrolle							↓	↓	↓			
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle		↓					↓	↓	↓			
		Rolipram								↓				
A AR _{2A} Anta- gonist (-9,-8,-7)	Normoxie	Kontrolle	↓	↓	↓				↓	↓	↓			
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle	↓	↓	↓				↓	↓				
		Rolipram								↓				
PSB AR _{2B} Anta- gonist (-10,-9,-8)	Normoxie	Kontrolle							↓	↓				
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle					↑							
		Rolipram							↓					
SCH D1/D5- Anta- gonist (-10,-9,-8)	Normoxie	Kontrolle	↓	↓	↓				↓	↓	↓			
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle	↓	↓	↓				↓	↓	↓			
		Rolipram				↓			↓	↓	↓			
D α 1Anta- gonist (-9,-8,-7)	Normoxie	Kontrolle												
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle												
		Rolipram												
Y α 2Anta- gonist (-9,-8,-7)	Normoxie	Kontrolle							↓	↓				
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle												
		Rolipram												
S AR ₁ Anta- gonist (-10,-9,-8)	Normoxie	Kontrolle												
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle												
		Rolipram												
V AR ₃ Anta- gonist (-9,-8,-7)	Normoxie	Kontrolle									↓			
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle												
		Rolipram						↓						
D2 D2Anta- gonist (-10,-9,-8)	Normoxie	Kontrolle									↓			
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle										↓		
		Rolipram						↓						
D3 D3Anta- gonist (-10,-9,-8)	Normoxie	Kontrolle								↓	↓			
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle												
		Rolipram						↓						
D4 D4Anta- gonist (-10,-9,-8)	Normoxie	Kontrolle							↓	↓				
		Rolipram												
	Hypoxie	Kontrolle												
		Rolipram												

OA=Osteoarthritis, RA=Rheumatoide Arthritis; Konzentrationen angegeben als negativer dekadischer Logarithmus unter dem Namen des jeweiligen Antagonisten in Molar

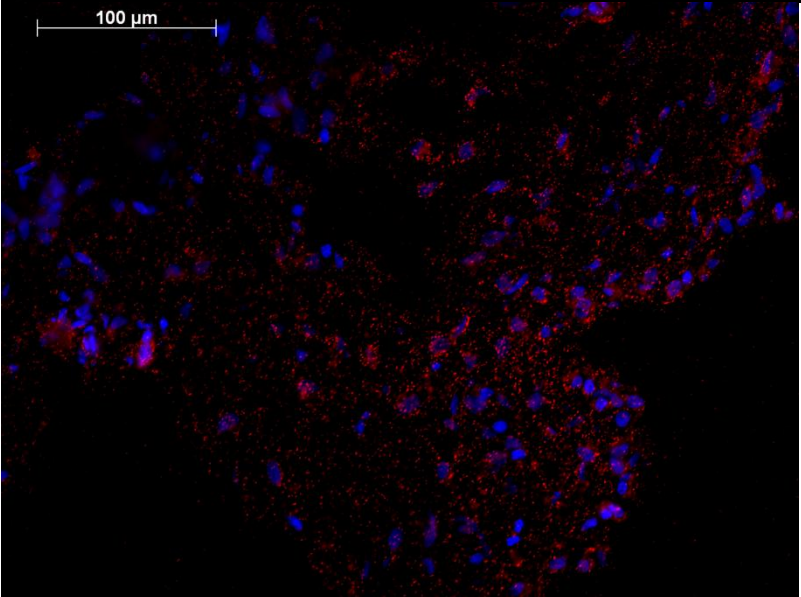
Switch vom Gas zum Gai Signalweg in menschlichem Synovialgewebe

Im *Proximity-Ligation-Assay* konnte weiterhin gezeigt werden, dass PDE4 und β -Arrestin nahe genug beieinander lagen (< 40nm), um miteinander interagieren zu können. Sowohl im Synovialgewebe von OA Patienten, als auch im Synovialgewebe von RA Patienten konnten die roten fluoreszierenden Signalpunkte, die einen Komplex aus PDE4 und β -Arrestin anzeigen, nachgewiesen werden (Abbildung 13).

OA



RA



ISO

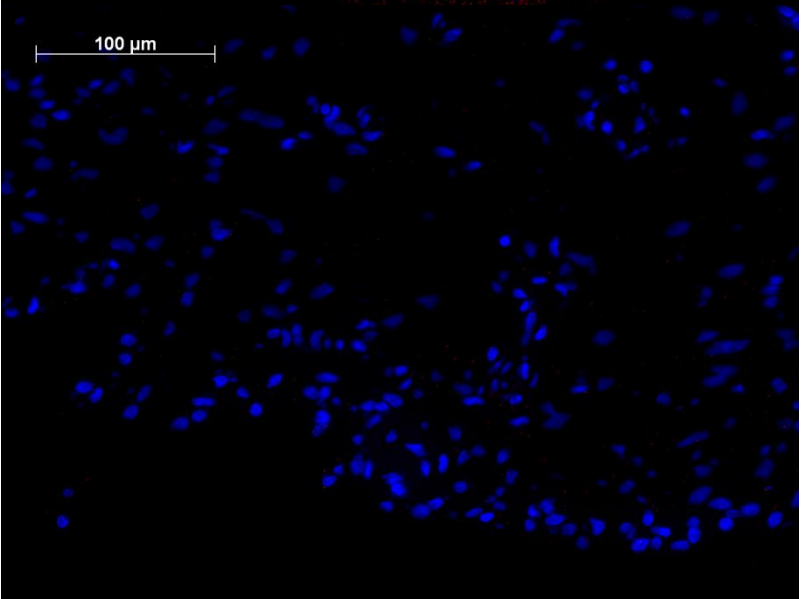


Abbildung 13. Nachweis einer engen Nachbarschaft (<40nm) von PDE4 und β -Arrestin in menschlichem Synovialgewebe von Patienten mit Osteoarthritis bzw. Rheumatoider Arthritis mittels *Proximity Ligation Assay*. Die Roten Punkte zeigen Stellen an, wo PDE4 und β -Arrestin nah beieinander liegen (<40nm). Zum Vergleich wird eine Isotypkontrolle mit rabbit IgG für PDE4 bzw. mouse IgG₂ für β -Arrestin zur Kontrolle gezeigt. Zellkerne erscheinen nach Färbung mit DAPI blau.

Auch in den einzelnen Synovialzellen der Zytospins konnte ein ähnliches Ergebnis gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Ein solcher Switch würde zu einer Betonung des Gai-Signalwegs in den untersuchten Primärzellen führen. Komponenten dieses Weges werden deshalb genauer betrachtet.

Proteinkinase A Inhibition

Hemmte man die PKA mit verschiedenen Antagonisten und in Kombination mit Rolipram und Agonisten am β 2-AR, kam es beim OA Patienten unter Normoxie zu einem signifikanten Absinken von TNF α (Abbildung 14, A). Signifikant war das für eine Stimulation mit KT 10^{-7} M alleine, KT in Kombination mit Rolipram 10^{-6} M und KT mit Rolipram und Formoterol hemifumarate (β 2 AR Agonist) (Abbildung 14, A) und für eine Stimulation mit H89 10^{-6} M und eine Kombination aus H89 und Rolipram (Abbildung 14, B). Unter Hypoxie fand sich ein signifikanter Abfall der TNF α Konzentration bei einer Stimulation mit H89 in Kombination mit Rolipram (Abbildung 14, B).

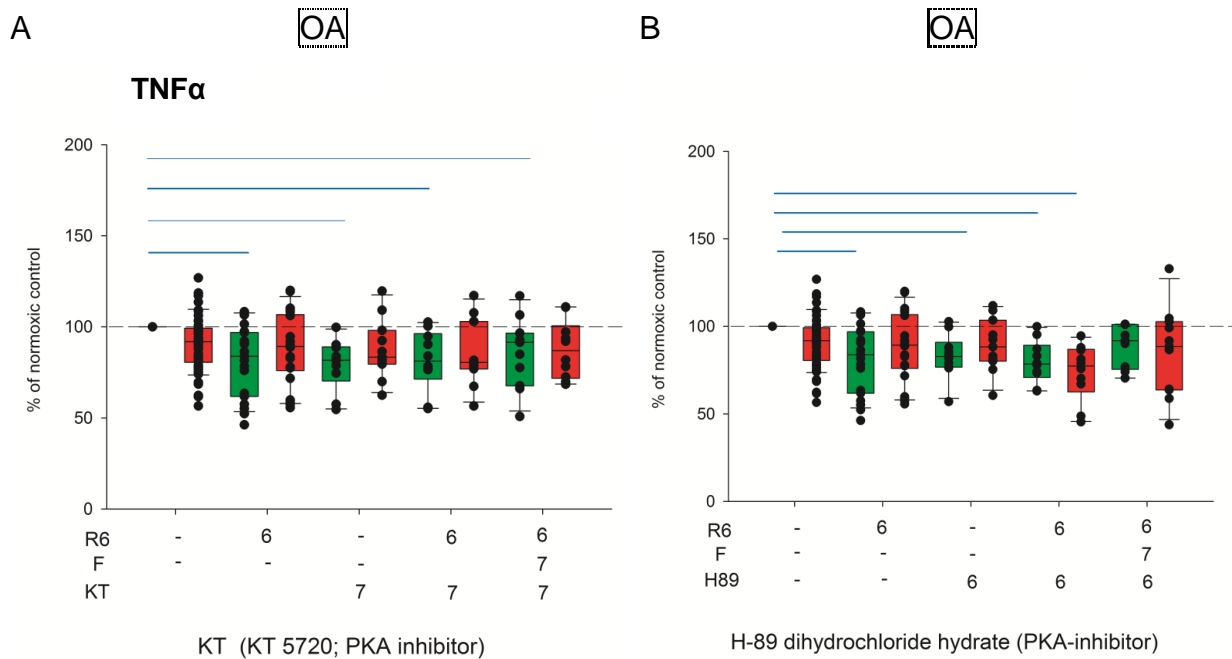


Abbildung 14. Einfluss von Proteinkinase-A-Inhibitoren (A: KT5720, B: H-89 dihydrochloride hydrate) auf die TNF Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 -Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

Beim RA Patienten konnte man unter Hypoxie den gleichen Effekt für H89 in Kombination mit Rolipram und Formoterol nachweisen. Unter Normoxie fanden sich hier keine Effekte für die Stimulation mit H89 (Abbildung 15).

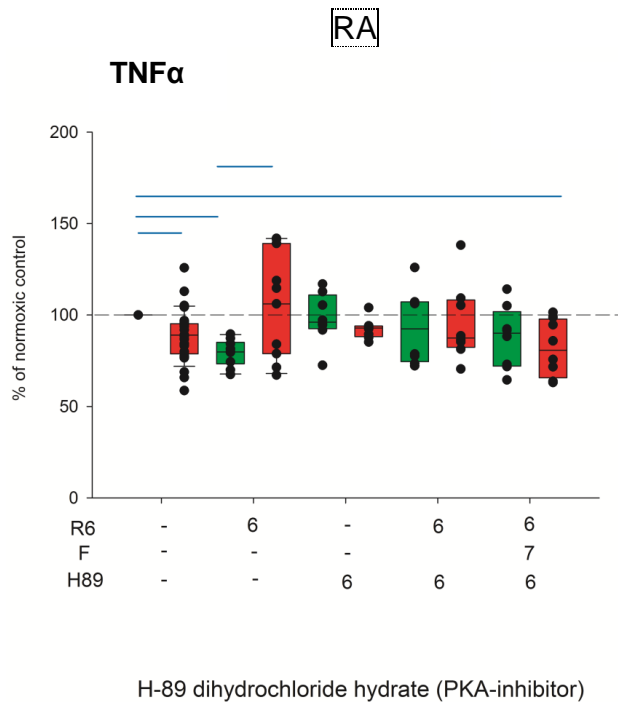


Abbildung 15. Einfluss von Proteinkinase-A-Inhibitor (H-89 dihydrochloride hydrate) auf die TNF Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen

Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate (β_2 -Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

Die IL-6 Konzentration sank ebenfalls unter Stimulation mit PKA Inhibitoren und zwar bei Normoxie und OA bei einer Stimulation alleine mit H89 10^{-6} M im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram (Abbildung 16) und bei Hypoxie und RA bei einer Stimulation mit KT 10^{-7} M in der Kombination mit Rolipram und Formoterol und mit H89 10^{-6} M alleine jeweils im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 17).

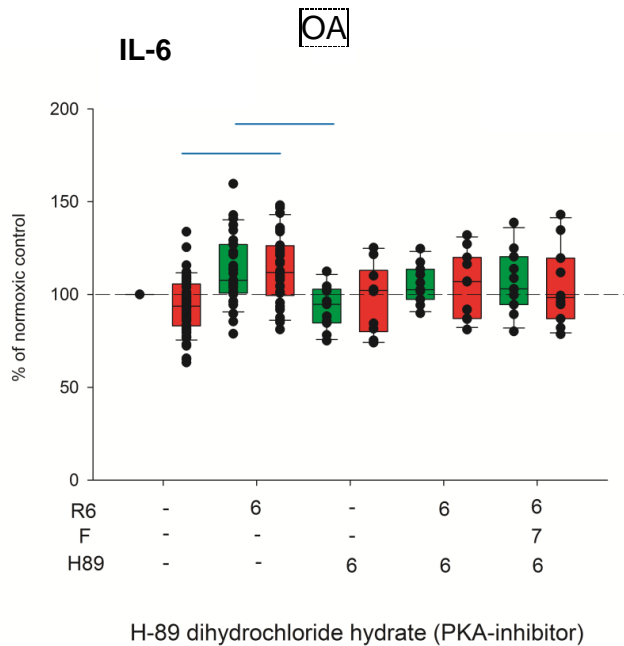


Abbildung 16. Einfluss von Proteinkinase-A-Inhibitor (H-89 dihydrochloride hydrate) auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

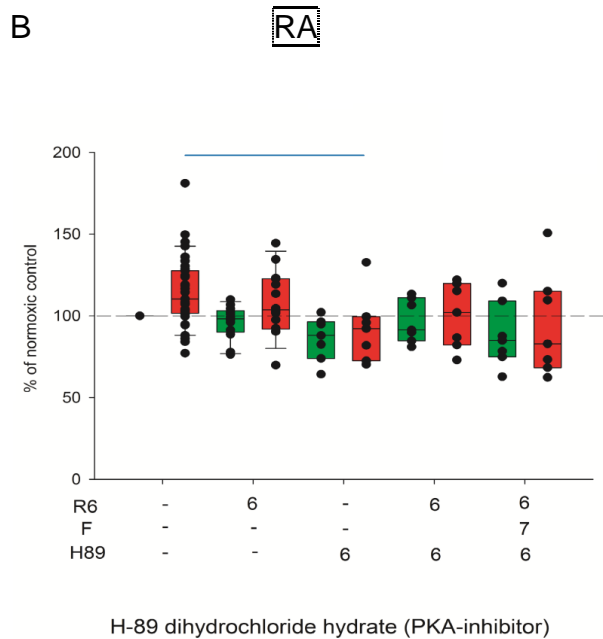
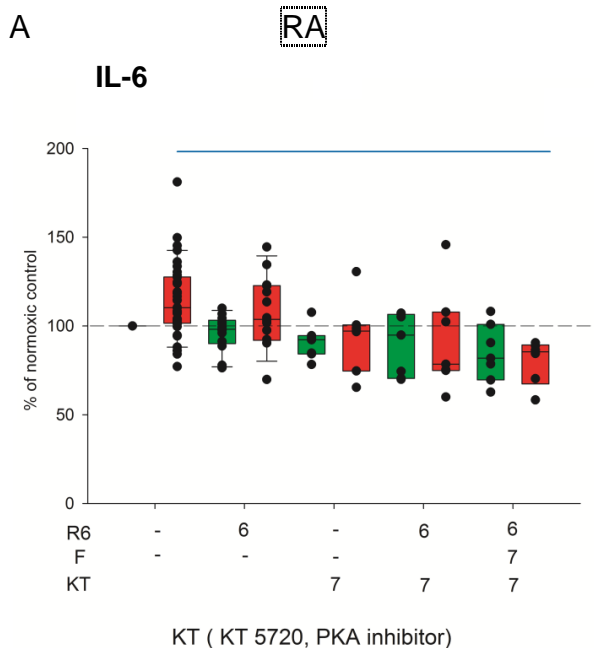


Abbildung 17. Einfluss von Proteinkinase-A-Inhibitor (A: KT 5720; B: H-89 dihydrochloride hydrate) auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

Hemmung des Gai-Signalwegs

Hemmt man beim OA Patienten den Gai-Signalweg mit Pertussis Toxin (PT), kam es unter Normoxie bei alleiniger Zugabe von PT, in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol zu einem signifikanten Abfall der TNF α Konzentration. Unter Hypoxie konnte man bei Stimulation mit PT in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol ebenfalls ein signifikantes Absinken der TNF Konzentration feststellen (Abbildung 18, A). Beim RA Patienten fanden sich keine signifikanten Effekte (Abbildung 18,B).

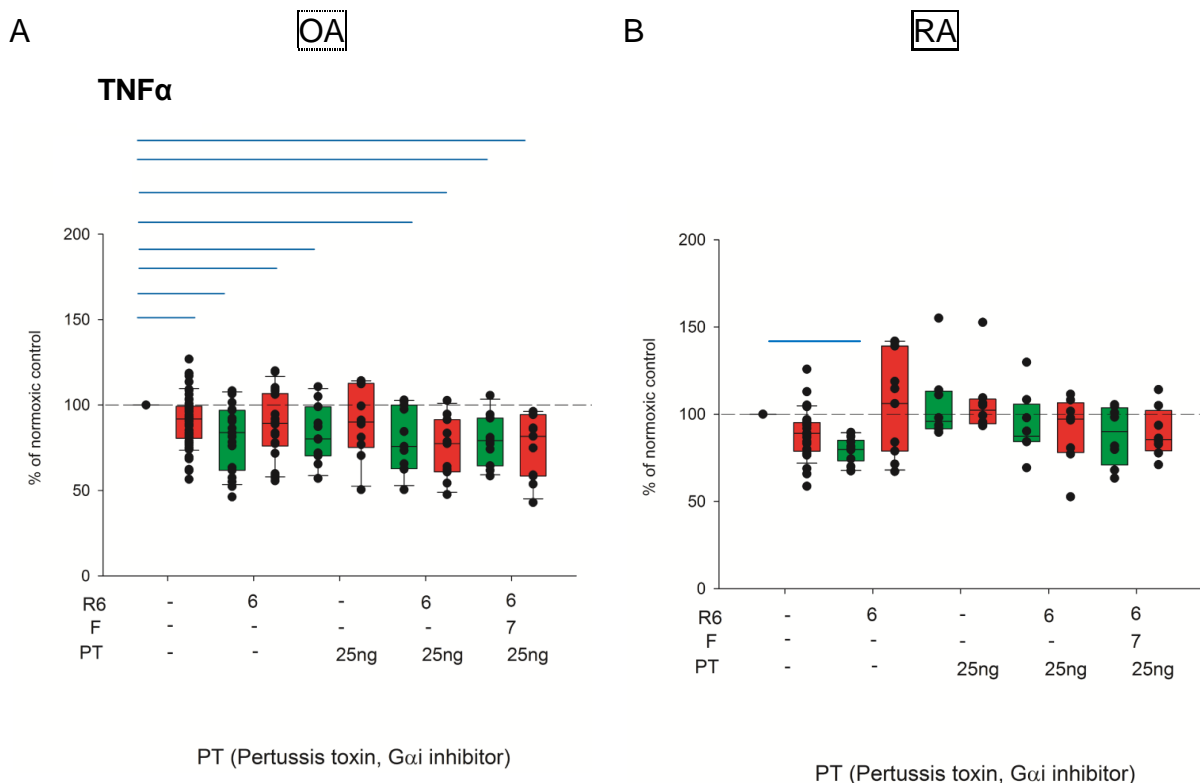


Abbildung 18. Einfluss der Hemmung des Gai-Signalwegs mit Pertussis Toxin auf die TNF-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p < 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzien in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

Beim OA Patienten führte die Stimulation mit PT alleine, in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol zu einem signifikanten Abfall der IL-6 Konzentration unter Normoxie im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram

(Abbildung 19, A). Unter Hypoxie führte eine Stimulation mit PT alleine und mit einer Kombination aus PT und Rolipram ebenfalls zu einem signifikanten Absinken der IL-6 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram (Abbildung 19, A). Bei RA Patienten kam es unter Hypoxie mit PT und Rolipram zu einem signifikanten Absinken der IL-6 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19, B). Bei Normoxie passierte hier nichts.

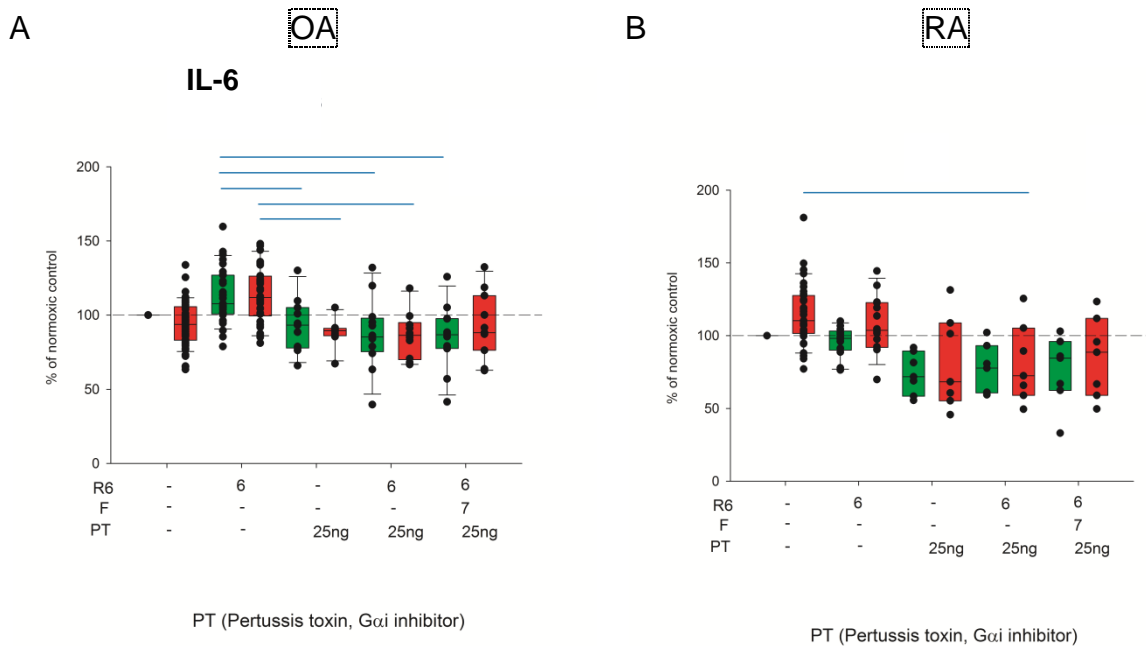


Abbildung 19. Einfluss der Hemmung des Gai-Signalwegs mit Pertussis Toxin auf die IL-6 - Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

Hemmung der *Extracellular-signal regulated Kinase*

Bei OA Patienten kam es unter Normoxie zum signifikanten Absinken von TNF α bei einer Stimulation mit FR 180204 10^{-6} M alleine und in Kombination mit Rolipram im Vergleich zur Kontrolle. Unter Hypoxie gab es keinen signifikanten Effekt (Abbildung 20, A). Bei RA Patienten unter Normoxie sah man dagegen einen Anstieg von TNF α bei der Stimulation mit FR 180204 10^{-6} M im Vergleich zur Kontrolle mit R6 (Abbildung 20, B). Unter Hypoxie fand man hier keinen Effekt.

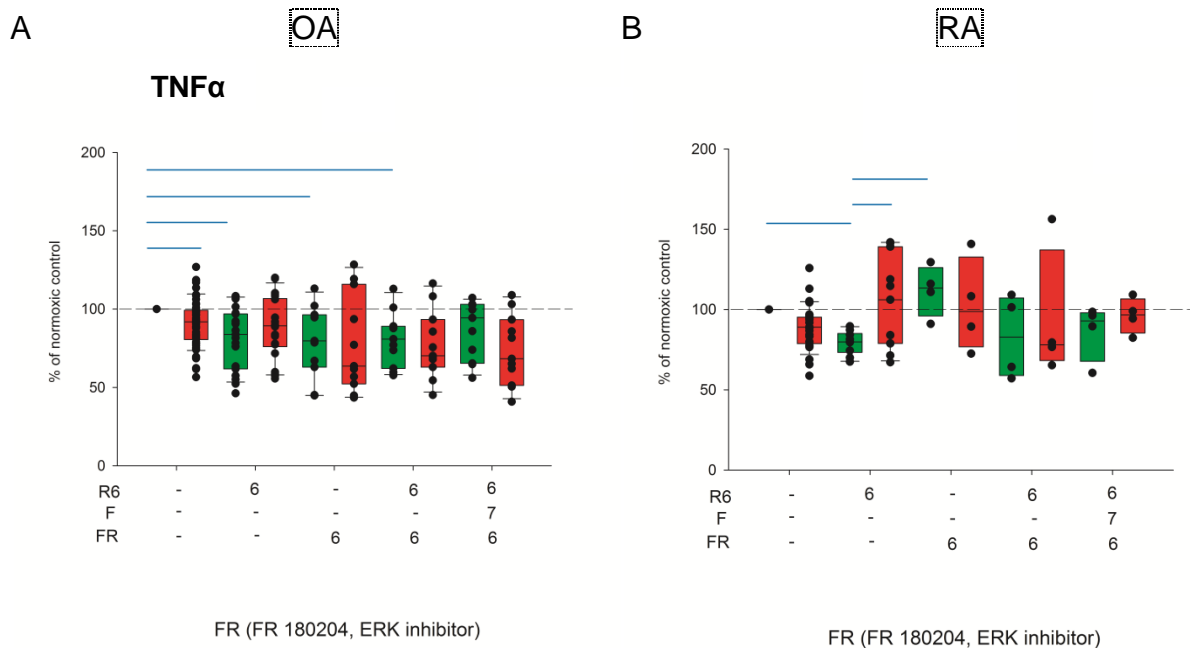


Abbildung 20. Einfluss der Hemmung der Extrazellulären Rezeptor Kinase mit FR 180204 auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulationen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

In Bezug auf die IL-6 Konzentration kam es bei OA Patienten unter Normoxie zu keinen Effekten. Unter Hypoxie konnte man dagegen einen signifikanten Abfall von IL-6 bei Stimulation mit FR 180204 10^{-6} M alleine und in Kombination mit Rolipram im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram feststellen (Abbildung 21). Beim RA Patienten änderten sich die IL-6 Konzentrationen unter Hemmungen der ERK nicht (Daten nicht gezeigt).

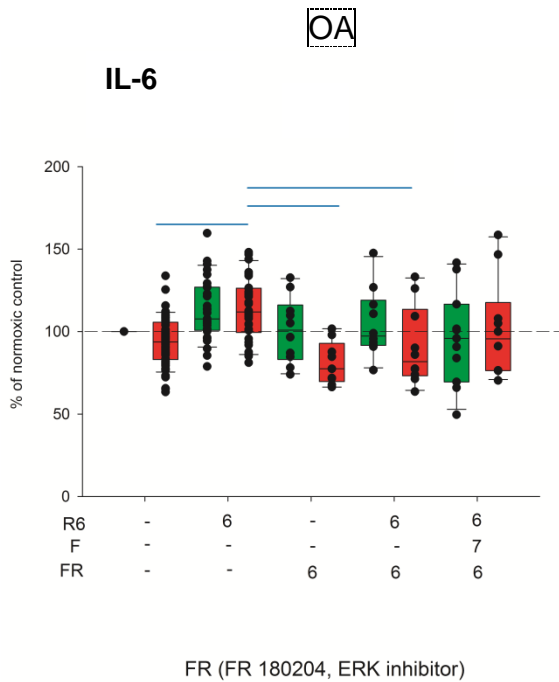


Abbildung 21. Einfluss der Hemmung der Extrazellulären Rezeptor Kinase mit FR 180204 auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzien in verschie-

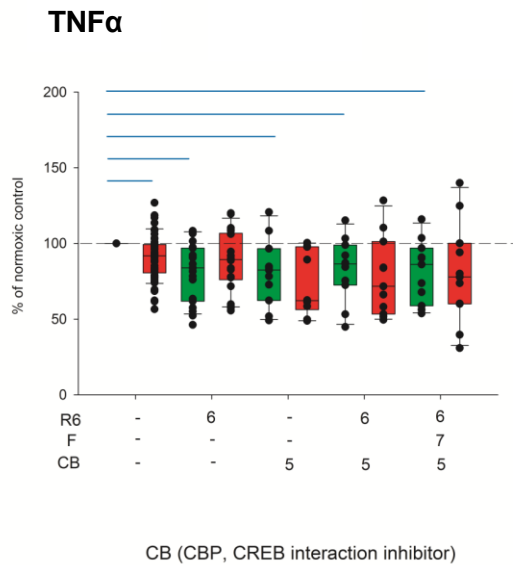
denen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

Hemmung der Interaktion zwischen *cAMP response element-binding protein* und Partnern

Bei einer Stimulation mit dem Hemmer der Interaktion zwischen CREB und CBP $10^{-5}M$ kam es beim OA Patienten unter Normoxie zu einem signifikanten Abfall der TNF α Konzentration und zwar sowohl bei alleiniger Stimulation mit CBP als auch in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol im Vergleich zur Kontrolle. Unter Hypoxie gab es keine signifikanten Effekte bei OA (Abbildung 22, A). Beim RA Patienten führte unter Normoxie eine Stimulation mit CBP und mit CBP und Rolipram im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram zu einem signifikanten Anstieg der TNF α Konzentration (Abbildung 22, B). Es ließen sich wiederum keine signifikanten Effekte unter Hypoxie nachweisen.

A

OA



B

RA

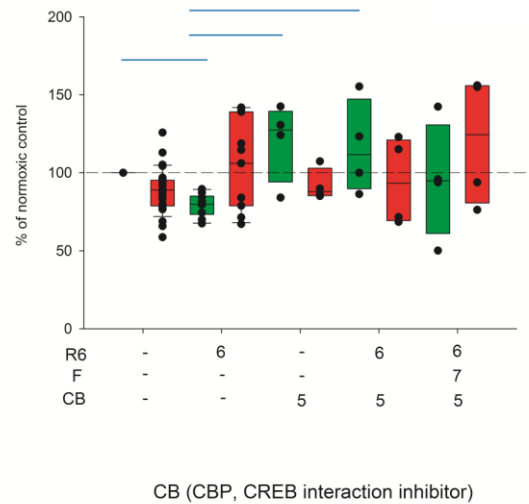


Abbildung 22. Einfluss der Hemmung der Interaktion von *cAMP response elements binding proteins* (CREB) auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate ($\beta 2$ Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

Die IL-6 Konzentration sank beim OA Patienten unter Normoxie bei Stimulation mit CBP alleine im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram und unter Hypoxie bei Stimulation mit CBP alleine und in Kombination mit Rolipram im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram signifikant (Abbildung 23, A). Beim RA Patienten sank die IL-6 Konzentration unter Stimulation mit CBP und der Kombination aus CBP und Rolipram nur bei Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Abbildung 23, B).

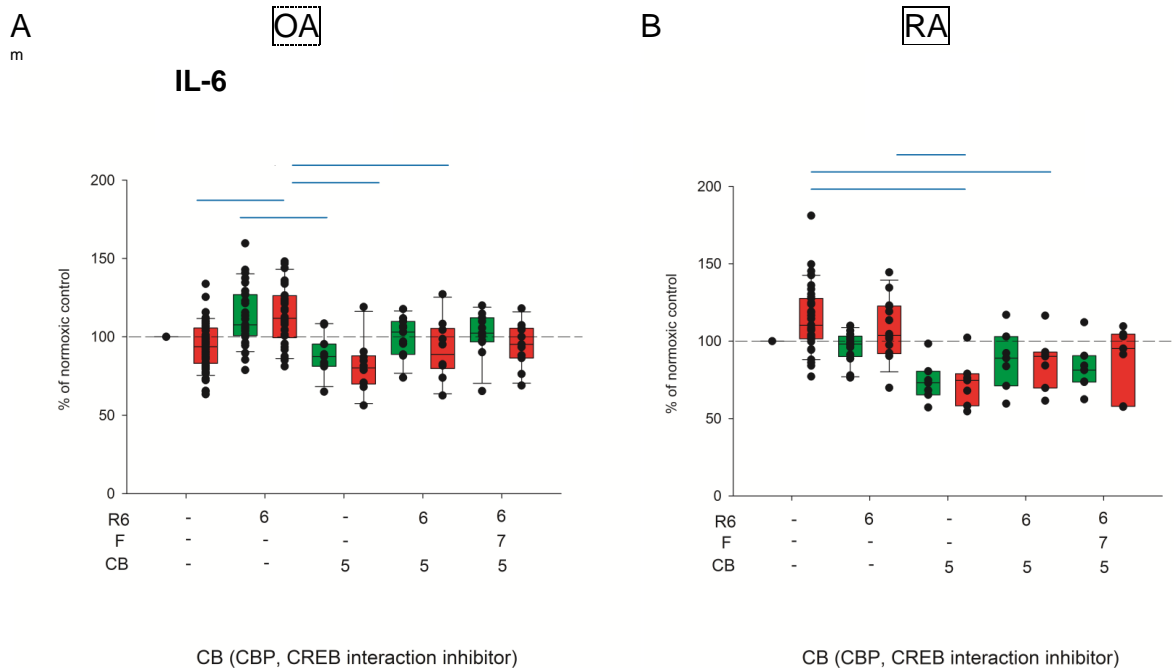


Abbildung 23. Einfluss der Hemmung der Interaktion von *CAMP response Elements Bindung Proteins* (CREB) auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate ($\beta 2$ Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

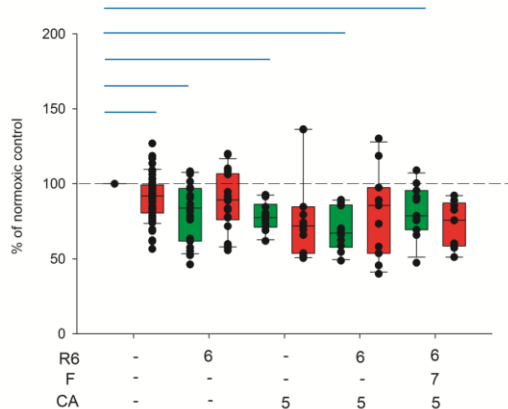
Hemmung von Nuklear Faktor κB

Beim OA Patienten sank die Konzentration an $TNF\alpha$ unter Normoxie signifikant ab, wenn man die Primärzellen mit dem Nuklear Faktor κB (NF κB) Inhibitor Caffeic acid phenethyl ester $10^{-5}M$ alleine oder in Kombination mit Rolipram oder mit Rolipram und Formoterol stimulierte. Unter Hypoxie gab es keinen signifikanten Effekt (Abbildung 24, A). Beim RA Patienten zeigten sich keine signifikanten Effekte unter NF κB Inhibition (Abbildung 24, B).

Bei der IL-6 Konzentration bei OA Primärzellen führte eine Stimulation mit Caffeic acid phenethyl ester $10^{-5}M$ alleine und in Kombination mit Rolipram und Rolipram und Formoterol unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram zu einem signifikanten Abfall (Abbildung 25). Unter Normoxie und beim RA Patienten zeigten sich hier keine signifikanten Effekte (RA-Daten nicht gezeigt).

A

OA

TNF α CA (Caffeic acid phenethyl ester, NF- κ B inhibitor)

B

RA

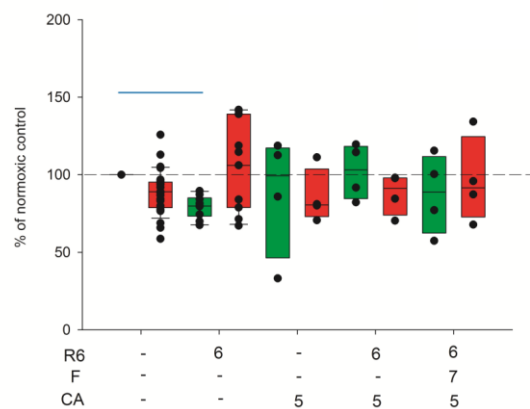
CA (Caffeic acid phenethyl ester, NF- κ B inhibitor)

Abbildung 24. Einfluss der Hemmung von Nuklear Faktor κ B auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate (β 2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

OA

IL-6

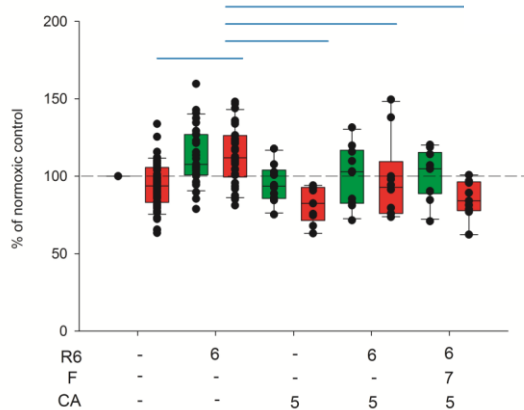
CA (Caffeic acid phenethyl ester, NF- κ B inhibitor)

Abbildung 25. Einfluss der Hemmung von Nuklear Faktor κ B auf die IL6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate (β 2 AdrenoRezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

tiver, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate (β 2 AdrenoRezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

Hemmung des Ca²⁺ Signalweges

Hemmt man den Ca²⁺ Signalweg mit Ruthenium red ab120264 (10⁻⁷M) kam es beim OA Patienten unter Normoxie bei einer Stimulation von Ruthenium red in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol zu einem signifikanten Abfall der TNF α Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 26, A). Unter Hypoxie und beim RA Patienten zeigten sich keine signifikanten Veränderungen für TNF α (Abbildung 26,B).

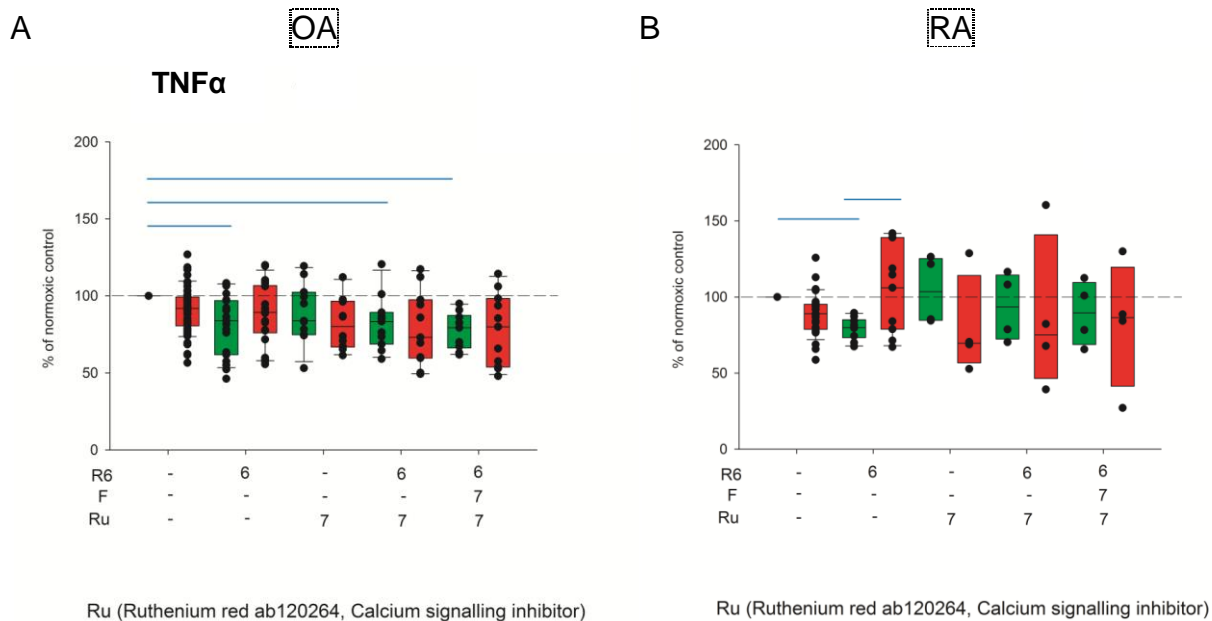


Abbildung 26. Einfluss der Hemmung des Calciumsignalwegs mittels Ruthenium red ab 120264 auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzien in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10⁻⁶M; F= Formoterol hemifumarate (β_2 AdrenoRezeptor Agonist) in der Konzentration 10⁻⁷M.

Die IL-6 Konzentration sank signifikant, wenn man OA Primärzellen unter Hypoxie mit Ruthenium red alleine oder in Kombination mit Rolipram und Formoterol behandelte (Abbildung 27). Bei Normoxie und beim RA Patienten änderte sich die IL-6 Konzentration nicht signifikant (Daten für RA nicht gezeigt).

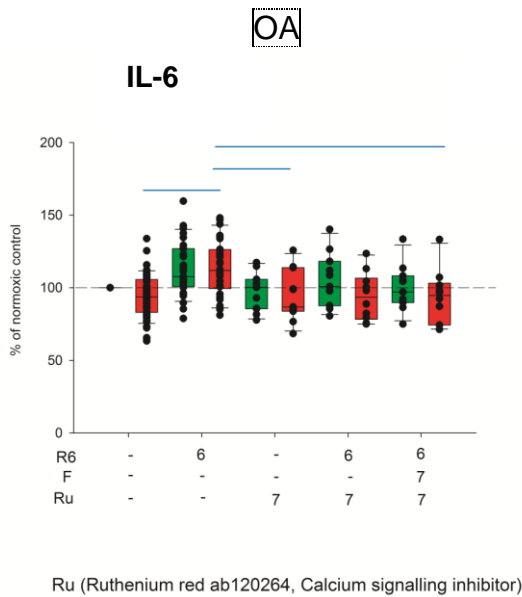


Abbildung 27. Einfluss der Hemmung des Calciumsignalwegs mittels Ruthenium red ab 120264 auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis; inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten;

Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzien in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration $10^{-6}M$; F= Formoterol hemifumarate (β_2 AdrenoRezeptor Agonist) in der Konzentration $10^{-7}M$.

Hemmung von *Hypoxia inducible factor-1 α*

Beim OA Patienten unter Normoxie führte eine Stimulation mit dem *Hypoxia inducible factor* (HIF) -Hemmer Chetomin ($10^{-8}M$) alleine und in Kombination mit Rolipram und Formoterol zu einem signifikanten Abfall der TNF α Konzentration (Abbildung 28, A). Der HIF-1 α -Hemmer KC7F2 ($5 \times 10^{-5}M$) zeigte hier keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Unter Hypoxie zeigte sich ebenfalls keine signifikante Änderung. Beim RA Patienten konnte man unter Normoxie bei der Kombination von Chetomin mit Rolipram und Formoterol einen signifikanten Anstieg von TNF α im Vergleich zur Kontrolle mit R6 zeigen (Abbildung 28, B). Bei Hypoxie und Stimulation mit KC7F2 fiel dieser Effekt aus.

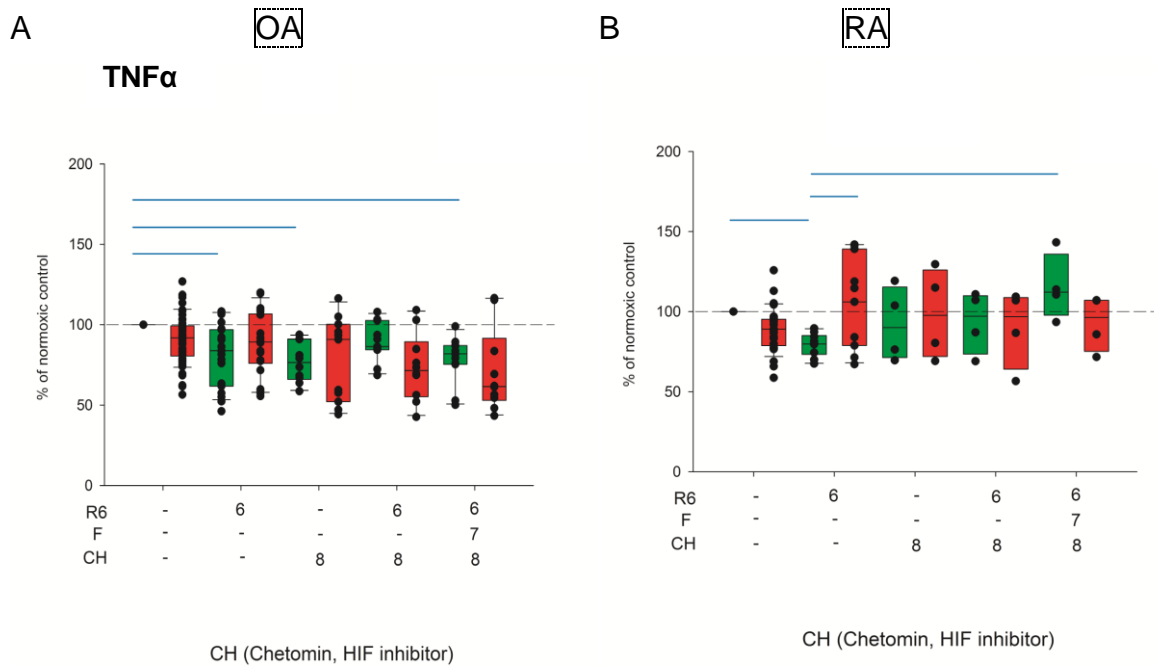


Abbildung 28. Einfluss der Hemmung von *Hypoxia-inducible-factor-1 α* mittels Chetomin auf die TNF α -Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate ($\beta 2$ Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

Deutlichere Änderungen zeigten sich bei Hemmung der Hypoxiefaktoren für IL-6. Beim OA Patienten kam es hier unter Normoxie bei alleiniger Stimulation mit Chetomin zu einem signifikanten Abfall von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle und zur Kontrolle mit Rolipram (Abbildung 29, A). Auch KC7F2 führte unter Normoxie zu einem signifikanten Abfall von IL-6 und zwar alleine und in Kombination mit Rolipram und mit Rolipram und Formoterol sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram (Abbildung 30, A). Auch unter Hypoxie zeigten sich starke Auswirkungen auf die IL-6-Konzentration beim OA Patienten. Stimulation mit Chetomin alleine, in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol führte hier zu einem signifikanten Abfall von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram (Abbildung 29, A). Auch KC7F2 führte hier alleine, in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol zu einem

signifikanten Absinken von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle und auch im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram (Abbildung 30, A).

Auch beim RA Patienten zeigen sich für IL-6 signifikante Effekte. Bei Stimulation mit Chetomin alleine kam es unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle zu einem Absinken der IL-6 Konzentration (Abbildung 29, B). Bei Stimulation mit K7F2 kam es unter Normoxie alleine, in Kombination mit Rolipram und in Kombination mit Rolipram und Formoterol im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Abfall der IL-6 Konzentration. Auch unter Hypoxie konnte man für K7F2 und beide Kombinationen sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch im Vergleich zur Kontrolle mit Rolipram eine signifikante Verminderung an IL-6 verzeichnen (Abbildung 30, B).

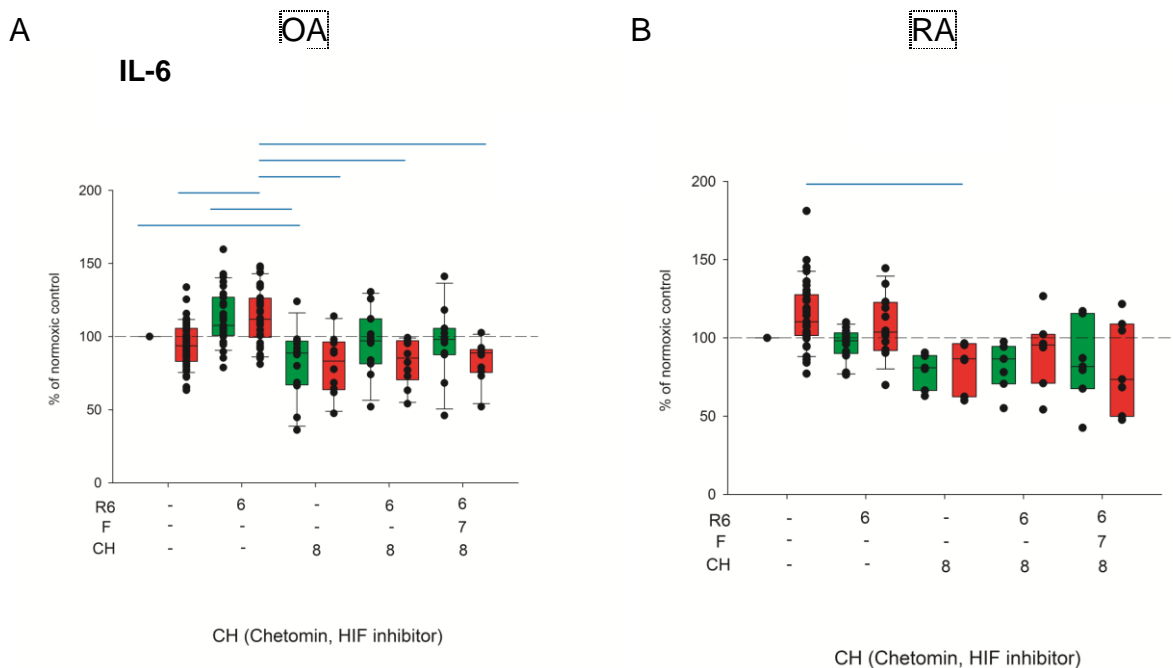


Abbildung 29. Einfluss der Hemmung von *Hypoxia-inducibel-factor-1 α* mittels Chetomin auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate (β_2 Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

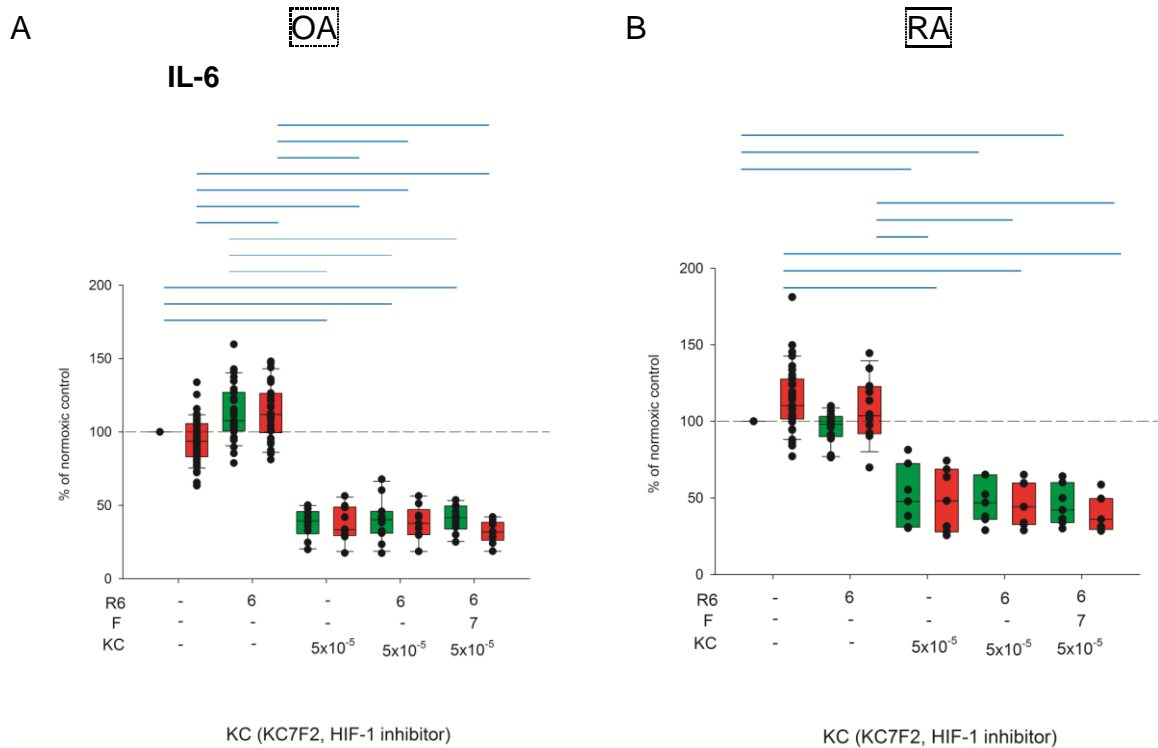


Abbildung 30. Einfluss der Hemmung von *Hypoxia-inducible-factor-1 α* mittels KC7F2 auf die IL-6-Sekretion von gemischten Synoviozyten von Patienten mit Osteoarthritis (A) und rheumatoider Arthritis (B); inkubiert unter normoxischen (grüne Boxplots) und hypoxischen (rote Boxplots) Bedingungen. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt mit der 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentile. Die Werte wurden in Prozent von der normoxischen Kontrolle angegeben (nicht behandelte, normoxische Kontrolle= 100%; entspricht der gestrichelten Linie); n= mindestens 4-6; jeder Punkt entspricht einem Messwert von einem Patienten; Signifikante p-Werte ($p \leq 0,05\%$) zur normoxischen Kontrolle wurden als blaue Linie dargestellt; auf der X-Achse sind die verschiedenen Stimulanzien in verschiedenen Konzentrationen als negativer, dekadischer Logarithmus dargestellt; R6= Rolipram in der Konzentration 10^{-6} M; F= Formoterol hemifumarate ($\beta 2$ Adrenorezeptor Agonist) in der Konzentration 10^{-7} M.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der 2. Stimulationsreihe findet sich in Tabelle 9.

Tabelle 9. Übersicht über das Verhalten von TNF α und IL-6 bei Stimulation verschiedener Mitspieler im Signalweg des β 2-Adrenorezeptors; Pfeil nach oben= Anstieg, Pfeil nach unten= Abfall der TNF α bzw. IL-6 Konzentration.

2. Stimulation			OA						RA							
			TNF		N=11		IL-6		TNF		N=4		IL-6		N=7	
			pur	+R6	+R6+F7	pur	+R6	+R6+F7	pur	+R6	+R6+F7	pur	+R6	+R6+F7		
R PDE4- Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓													
		Rolipram														
	Hypoxie	Kontrolle				↑										
		Rolipram														
F β 2Agonist	Normoxie	Kontrolle														
		Rolipram														
	Hypoxie	Kontrolle														
		Rolipram														
KT PKA- Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓	↓	↓											
		Rolipram														
	Hypoxie	Kontrolle												↓		
		Rolipram														
H89 PKA - Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓	↓												
		Rolipram				↓										
	Hypoxie	Kontrolle		↓						↓	↓					
		Rolipram														
PT Gai- Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓	↓	↓											
		Rolipram				↓	↓	↓								
	Hypoxie	Kontrolle		↓	↓								↓			
		Rolipram				↓	↓									
FR Erk- Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓	↓												
		Rolipram						↑								
	Hypoxie	Kontrolle														
		Rolipram				↓	↓									
CH HIF Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓		↓	↓										
		Rolipram				↓				↑						
	Hypoxie	Kontrolle				↓	↓				↓					
		Rolipram				↓	↓	↓								
KC HIF1 α - Hemmer	Normoxie	Kontrolle				↓↓	↓↓	↓↓			↓	↓	↓			
		Rolipram				↓↓	↓↓	↓↓								
	Hypoxie	Kontrolle				↓↓	↓↓	↓↓			↓	↓	↓			
		Rolipram				↓↓	↓↓	↓↓								
CA NF κ B- Hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓	↓	↓											
		Rolipram														
	Hypoxie	Kontrolle				↓	↓									
		Rolipram														
CBP CREB Interaktions- -hemmer	Normoxie	Kontrolle	↓	↓	↓											
		Rolipram				↓			↑	↑						
	Hypoxie	Kontrolle				↓	↓				↓	↓				
		Rolipram														
Ru Ca ²⁺ -Signal- weg- hemmer	Normoxie	Kontrolle		↓	↓											
		Rolipram														
	Hypoxie	Kontrolle				↓										
		Rolipram						↓								

OA: Osteoarthritis; RA: Rheumatoide Arthritis; die Konzentrationen sind als negativer dekadischer Logarithmus angeben, Einheit Molar; R6= Rolipram in der Konzentration 10⁻⁶M; F7= Formoterol hemifumarate in der Konzentration 10⁻⁷M

Diskussion

Das Molekül cAMP ist der zentrale second messenger der GPCR, den Rezeptoren des sympathischen Nervensystems, und reguliert damit unter anderem die TNF α Konzentration in Entzündungszellen. Die Phosphodiesterase 4 ist das Enzym, das in Zellen des Immunsystems alleine für den Abbau von cAMP verantwortlich ist. Will man die Konzentration von cAMP und damit von TNF α und anderen Entzündungsmediatoren in Entzündungszellen verändern, ist die PDE4 ein Angriffspunkt. Seit gut 20 Jahren war dieses Enzym deshalb ein begehrter Forschungsgegenstand für eine mögliche Therapie der RA und vieler anderer chronisch entzündlicher Erkrankungen, in deren Entstehung und Verlauf TNF α eine Rolle spielt. Doch während es für Krankheiten wie COPD und Psoriasis-Arthritis mittlerweile gut wirksame zugelassene PDE4-Hemmer gibt, wie z.B. Apremilast, mussten die klinischen Studien für die RA aufgrund ausbleibender Wirksamkeit abgebrochen werden. Bei guten Ergebnissen bezüglich einer TNF α -Hemmung in vitro- auch bei humanen RA-Synovialzellen- und bei Rückgang der Klinik und Gelenkdestruktion in vivo in verschiedenen Mausmodellen der RA bleibt die Frage, warum dieses vielversprechende Medikament bei RA-Patienten seine Wirkung verfehlt. Wo ist der Unterschied in den Pathomechanismen zum Beispiel zur Psoriasis-Arthritis, die ansonsten einige Ähnlichkeit mit der RA aufweist? Warum können die positiven Ergebnisse der in vitro und in vivo Vorversuche beim Patienten in der Klinik nicht erzielt werden?

Ein Aspekt der sowohl in den Versuchen von Jimenez et al. 2001 als auch bei McCann et al. 2010 nicht beachtet wurde ist Hypoxie. Bei Jimenez et al. wird die Sauerstoffkonzentration bei Inkubation der Zellkulturen nicht erwähnt (52). McCann arbeitet mit einer CO₂ Konzentration von 5% und macht ebenfalls keine Aussage zur Sauerstoffkonzentration, und man muss annehmen, dass er unter Normoxie arbeitete (53). Dabei ist das Milieu bei chronischen Entzündungen wie der RA stark hypoxisch, mit Sauerstoffkonzentrationen zwischen 1-3% (9–11). Ein größerer Kapillar-Zell-Abstand aufgrund der hyperplastischen, entzündlichen Zellmasse im Gelenk, ein erhöhter Verbrauch an Sauerstoff durch vermehrte Zellproliferation und eine Dysregulation der Angiogenese tragen zu einem hypoxischen Mikrokosmos mit vornehmlich anaerober Stoffwechsellage bei (9,58). Über HIF-1 α kommt es Hypoxie-abhängig zu einer vermehrten Transkription *Hypoxy-response-elements* abhängiger

Gene, die wiederum einen Beitrag zur Entzündungsreaktion im Gelenk leisten (9). Niedrige Sauerstoff-Partialdrücke (22.5 mmHg) gehen mit einer Migration von Entzündungszellen ins Gelenk und erhöhten Entzündungsmediatoren in der Gelenkflüssigkeit wie z.B. TNF α einher (10). Trotz dieser deutlichen Hinweise auf einen Einfluss von Hypoxie auf die Entzündungsreaktion im Gelenk gibt es bislang keine Studien, die cAMP-vermittelte oder PDE4-Hemmer-manipulierte entzündliche Effekte vergleichend unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen betrachtet haben.

Ein weiterer Einflussfaktor ist der Zeitpunkt, zu welchem Rolipram oder andere PDE4-Inhibitoren im Tiermodell appliziert wurden. So gaben Francischi et al. 2000 ihren Mäusen bereits am Tag 10 nach Induktion der Arthritis, als die ersten Symptome auftraten, Rolipram (46). McCann et al. machten 2010 ihre Experimente mit Apremilast an zwei verschiedenen Mausmodellen. Bei der monoklonale Antikörper (mAb)-induzierten Arthritis begann die Behandlung mit Apremilast bereits am Tag drei nach der Initiierung der Entzündungsreaktion. Im *Collagen-induced arthritis model* wurde Apremilast gegeben, sobald die ersten Symptome der Entzündung an den Gelenken (Rötung, Schwellung) auftraten. Da cAMP ein second messenger ist, könnte der Zeitpunkt der PDE4 Hemmer Gabe entscheidend für seine Wirkung bzw. Nicht-Wirkung sein. Während sich die Mäuse im Modell höchstens in der intermediären Entzündungsphase befanden, waren die Patienten, die klinisch getestet wurden langjährige Patienten im chronischen Stadium (51).

Andererseits ist auch die Psoriasis-Arthritis eine primär chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung. Sie hat Ähnlichkeiten mit der RA in Bezug auf die Pathogenese und steht zum Beispiel unter ähnlichen Einflüssen des SNS wie die RA (16). Synovialhyperplasie und Immunzellinfiltration werden auch bei der Psoriasis-Arthritis durch aktivierte T-Zellen und Makrophagen gesteuert, und es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung verschiedener Zytokine, darunter TNF α und IL-6. Auch in der Therapie der Psoriasis-Arthritis und der RA gibt es Gemeinsamkeiten. In frühen Stadien hilft bei beiden Erkrankungen MTX, und die Anti-TNF α Therapie spielt eine große Rolle (59).

Bezüglich des Zeitpunkts im Krankheitsverlauf bzw. der Wirkung des SNS als Einflussfaktor auf die Wirkung der PDE ist auch ein Vergleich zur nicht primär chronisch-entzündlichen degenerativen OA interessant. Die OA wurde bis vor einigen Jahren als eine rein degenerative Gelenkerkrankung behandelt, bei der

primär entzündliche Prozesse eine eher untergeordnete Rolle für die Gelenkzerstörung spielen (60–62). Stattdessen ging man davon aus, dass die Gelenkzerstörung vornehmlich durch mechanische Belastung mit Abbau der Strukturen des hyalinen Knorpelgerüsts und Verlust der Elastizität verursacht wurde. In jüngeren Studien konnte gezeigt werden, dass die OA bereits im Frühstadium auch Zeichen einer entzündlichen Erkrankung aufweist. Sie geht einher mit Infiltration des Synovialgewebes durch Makrophagen, einer vermehrten dysfunktionalen Gefäßproliferation (60), mildem Anstieg des systemischen C-reaktiven Proteins und bestimmter Interleukine in der Synovialflüssigkeit wie TNF α und IL-6 und Hypoxie im Gelenk mit einem Anstieg des HIF-1 α (61). Auch kommt es zu einer Betonung von Stress-induzierten Signalwegen wie dem MAP-Kinase Signalweg über ERK in den Chondrozyten (62). Trotzdem bleiben die entzündlichen Veränderungen in ihrer Intensität hinter den Entzündungsprozessen der primär inflammatorischen RA zurück, und von einem zeitlichen Einfluss des SNS ähnlich zur RA ist nicht auszugehen. Das kann eine Erklärung dafür sein, dass wir bei OA Gewebe ähnliche aber durchweg schwächer ausgeprägte Effekte als bei RA Gewebe messen konnten.

In dieser Arbeit wurden Zellkulturen von RA-Synovia-Primärzellen aus Kniegelenksgewebe von langjährigen RA-Patienten in Bezug auf TNF α und IL-6 Ausschüttung bei Hemmung mit verschiedenen Inhibitoren der GPCRs und dem PDE4 Hemmer Rolipram untersucht. Dabei wurden die Zellkulturen vergleichend unter Inkubation bei Normoxie (5% O₂) und Hypoxie (<1% O₂) betrachtet. Synovialgewebe von Patienten mit OA wurden in unseren Versuchen als Kontrolle verwendet.

In vorangehenden Versuchen mit Agonisten am Gas-Rezeptor in unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen aus früheren Studien, in denen Agonisten am Gas-Rezeptor die TNF α -Konzentration über eine vermehrte cAMP Konzentration senkten (33–39,63), eine Stimulation von Gas-Rezeptoren bei gemischten Synovialzellen aus Kniegelenksynovia von RA Patienten unter Hypoxie zu einem signifikanten Anstieg der TNF α Konzentration führte (55).

Da gemischte Synovialzellen in der Lage sind Katecholamine zu produzieren (56), war es interessant, ob Versuche mit gemischten Synovialzellen und Antagonisten am Gas-Rezeptor bzw. am Gai-Rezeptor in Kombination mit Rolipram die Ergebnisse

der vorangehenden Versuche bestätigen könnten. Interessant war außerdem die Betrachtung eines weiteren aktiven Entzündungsmediators der RA: IL-6. Bezüglich der IL-6 Konzentration konnte in Studien bisher gezeigt werden, dass eine erhöhte cAMP Konzentration zu einer vermehrten IL-6 Freisetzung führt (63–66).

Bei Hemmung verschiedener Gai-Rezeptoren kam es beim RA Patienten sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie zu einem Abfall der TNF α Konzentration (Abbildung 6,7).

Anders sah es bei der Hemmung von Gas-Rezeptoren aus. Ein Abfall der cAMP Konzentration über eine verminderte Aktivität dieser Rezeptoren sollte eigentlich proinflammatorisch wirken, also zu einer Erhöhung der TNF α Produktion führen. Dem zum Trotz kam es bei Hemmung verschiedener Gas-Rezeptoren vor allem unter Hypoxie aber auch unter Normoxie zu einem Abfall der TNF α Konzentration. Insbesondere bei RA Patienten und unter Hypoxie fand sich ein signifikant senkender Effekt auf die TNF α Sekretion, der ebenfalls -allerdings schwächer- unter Normoxie beobachtet werden konnte (Abbildung 11). Auch bei OA Patienten führte eine Hemmung der Gas-Rezeptoren zu einem Abfall von TNF α sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie (Abbildung 10). Die Effekte waren hier aber nicht ganz so deutlich wie bei RA.

Dies bestätigt die Ergebnisse der Experimente von Jenei-Lanzl et al. (55) mit Agonisten am Gas-Rezeptor. Am Gas-Rezeptor scheint es unter hypoxischen Bedingungen insbesondere bei RA-Synovialgewebe zu einer veränderten Rezeptorwirkung der GPCRs zu kommen.

Das Verhalten von IL-6 nach Modulation des Gas-Rezeptors zeigte weniger klare Tendenzen. Da IL-6 durch eine erhöhte cAMP Konzentration und CREB Aktivierung induziert wird (63–66), war zu erwarten, dass sich die Konzentration an IL-6 entgegengesetzt zur TNF α Konzentration verhält. Bei der Hemmung von Gas-Rezeptoren, sollte es somit zu einem Abfall von IL-6 kommen. TNF α hat allerdings gleichzeitig einen direkt stimulierenden Effekt auf die IL-6 Konzentration. Hierdurch ergibt sich eine deutlich komplexere Regulation von IL-6, die in Abbildung 31 gezeigt ist. IL-6 kann also stark von der vorausgehenden TNF-Sekretion abhängig sein. Hemmt man Gas-Rezeptoren, kommt es folglich durch ein Absinken der cAMP-Konzentration zu einem Anstieg von TNF α und damit ebenfalls zu einem Anstieg von IL-6.

Unter Hypoxie im OA Gewebe zeigten sich nach Hemmung des Adenosin Rezeptors A2B bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antagonisten sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der IL-6 Konzentration (Abbildung 12). Bei Hemmung des Dopamin 1/5 Rezeptors kam es bei OA unter Hypoxie zu einem Abfall der IL-6 Konzentration (Abbildung 12). Für RA ließen sich keine signifikanten Veränderungen der IL-6 Konzentration nachweisen.

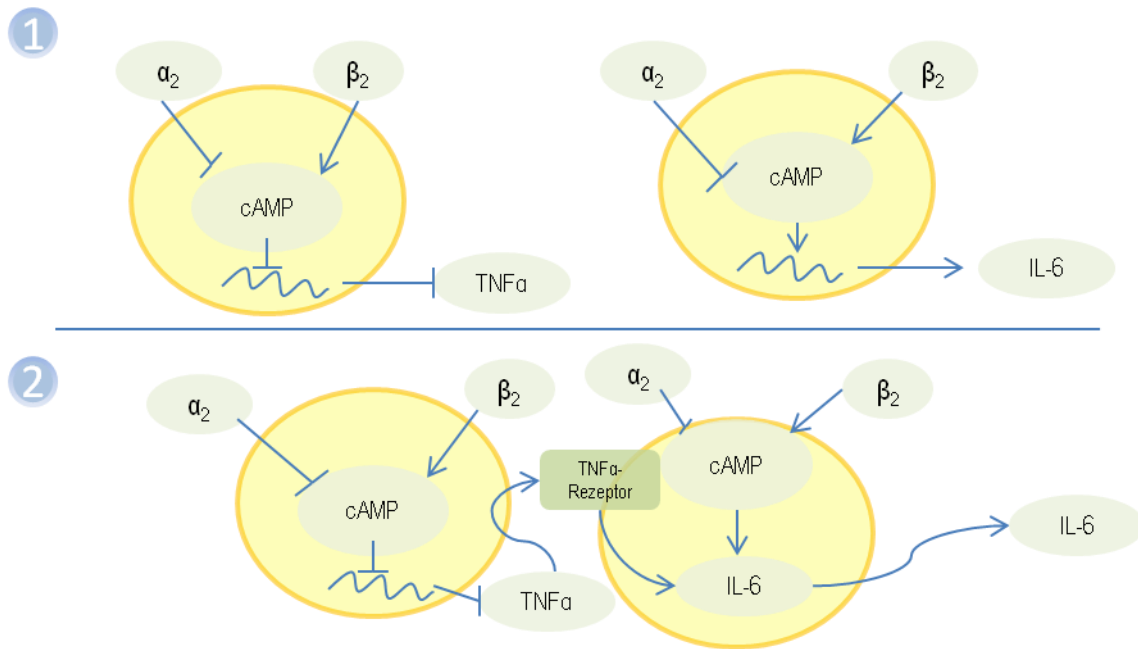


Abbildung 31. Einfluss von TNF α auf die IL-6 Konzentration. Bei Stimulation eines GPCR kommt es zu einem Anstieg an cAMP, sollte er an ein stimulatorisches G-Protein gekoppelt sein (β_2 -Rezeptor), und zu einem Abfall des cAMP, wenn der Rezeptor an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist (α_2 -Rezeptor). Viel cAMP in der Zelle führt zu einer Hemmung der TNF α -Synthese und zu einer Stimulation der Synthese von IL-6 (1). TNF α wiederum führt über die Stimulation des TNF α -Rezeptors ebenfalls zu einer Stimulation von IL-6. Damit beeinflusst TNF α direkt die IL-6 Konzentration in der Zelle (2).

Interessanter sind die Ergebnisse für IL-6 bei Inhibition von Gai-Rezeptoren. Hier würde man physiologischerweise einen Anstieg der IL-6 Konzentration vermuten, wobei wiederum die direkte Stimulation von IL-6 durch TNF α schwächer ausfallen dürfte. Sowohl bei OA als auch bei RA konnte unter Hypoxie allerdings ein signifikanter Abfall der IL-6 Konzentrationen gezeigt werden. Für OA galt dies bei Antagonisten am Adenosinrezeptor A3, am Dopamin D2 Rezeptor und Dopamin D3 Rezeptor und für RA-Gewebe am Dopamin D2 Rezeptor (Abbildung 8). Dieses Verhalten könnte ein Hinweis auf eine erhöhte Gai-Aktivität im OA- und RA-Gewebe insbesondere unter Hypoxie sein. Durch den direkten stimulierenden Effekt von

TNF α auf IL-6 wird die Beurteilung der Effekte auf IL-6 allerdings komplizierter (Abbildung 31).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der PDE4 mittels Rolipram bei RA-Synovialzellen unter hypoxischen Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg der TNF α Konzentration führte (55) und nicht, wie erwartet, über eine gesteigerte cAMP Konzentration zu antiinflammatorischen Effekten im Sinne eines TNF α Abfalls (Abbildung 3, B).

Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte Signalweiterleitung am GPCR zugunsten einer Verstärkung des G α i-Signalwegs über die ERK hin, die über Steuerung von Transkription, Translation und Transport zu einer vermehrten TNF α Konzentration führt (67). Die nachgewiesenen Effekte traten zwar unter Hypoxie deutlicher hervor, waren aber auch unter Normoxie zum Teil zu erkennen. Hypoxie kann folglich nur zum Teil eine Erklärung für die ausbleibende Wirkung von PDE4-Inhibitoren bei RA Patienten sein.

Auch der Zeitpunkt der PDE4-Hemmer-Gabe in Bezug auf das Fortschreiten der Entzündung kann nur bedingt eine Erklärung für das Ausbleiben der Entzündungshemmung sein, da wir auch bei OA widersprüchliche Effekte für Rolipram und Hemmung am Gas-Rezeptor feststellen konnten- wenn auch nicht so ausgeprägt. OA ist keine klassisch primär entzündliche Erkrankung im engeren Sinne. Von einer ähnlichen Wirkung des sympathischen Nervensystems auf den Entzündungsverlauf ist nicht auszugehen (60–62). Eine zufriedenstellende Erklärung für die Frage warum eine Stimulation der Gas-Rezeptoren bzw. eine Hemmung der G α i-Rezeptoren sowie eine Hemmung der Phosphodiesterase zu einem proinflammatorischen Anstieg der TNF α Konzentration unter Hypoxie bei RA-Zellen führten, gibt es bislang nicht. Welche molekularen Mechanismen liegen dieser scheinbar widersprüchlichen Rezeptorwirkung zugrunde und verhindern so den Einsatz von PDE4-Hemmern in der Therapie der RA?

Eine mögliche Erklärung findet sich in Veröffentlichungen der Lefkowitz-Gruppe, die zeigen konnte, dass eine Interaktion von β -Arrestin und PDE4 am β -Adrenorezeptor zu einer Umwandlung des Rezeptors vom stimulatorischen Gas-Rezeptor zum inhibitorischen G α i-Rezeptor führt (68,69) (Abbildung 32). In seiner inhibitorischen Form aktiviert der β -Adrenorezeptor daraufhin den nachfolgenden ERK1/2 Signalweg. Entscheidend für diesen Wechsel auf den G α i-Signalweg scheint eine Phosphorylierung des Rezeptors durch die PKA zu sein (22,68). Kontrolliert wird die

PKA am Rezeptor durch PDE4D3 und PDE4D5. Adapter für die PDE4 am Rezeptor sind β -Arrestin 1 und 2, die durch Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs nach Stimulierung mittels Gas-Agonisten wie z.B. Isoproterenol rekrutiert werden (68). Außerdem konnte diese Gruppe zeigen, dass dieser „Switch“ offenbar durch Hemmung der PDE4 mit Rolipram induziert wird (68). Ein solcher Vorgang könnte ein proinflammatorisches Signal im RA-Gewebe erklären.

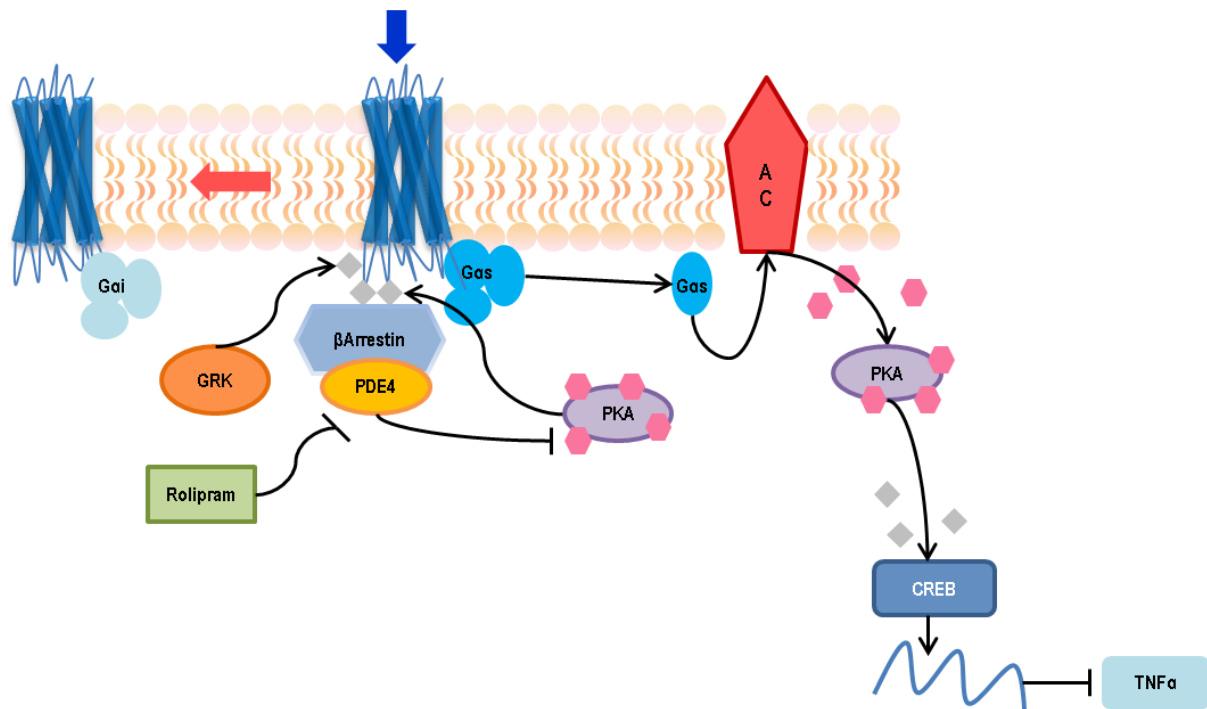


Abbildung 32. Rolipram-vermittelter Switch vom Gas zum Gai-Signalweg. Durch Stimulation mittels eines Agonisten am β_2 -Adrenorezeptor kommt es zum Abdiffundieren des stimulatorischen G-Proteins hin zur membrangebundenen Adenylatcyclase (AC). Diese bildet cAMP aus ATP. Durch cAMP wird die PKA aktiviert, die ihrerseits über Steigerung von CREB die Transkription für TNF α hemmt. Gleichzeitig phosphoryliert die PKA gemeinsam mit der GRK wiederum den GPCR. Dies ist Voraussetzung für das Binden von β -Arrestin an den Rezeptor. β -Arrestin rekrutiert die PDE4, die über einen Abbau von cAMP die PKA hemmt. Durch Hemmung der PDE4 mit Rolipram wird ein Switch hin zum inhibitorischen GPCR getriggert.

Tatsächlich konnte die Präsenz der beiden verantwortlichen Moleküle für den „Switch“, wie er in der Lefkowitz-Gruppe gezeigt wurde im RA Gewebe nachgewiesen werden. In vorangehenden Studien konnte bereits das Vorkommen von β -Arrestin im Synovialgewebe gezeigt werden (70,71), aber das Vorkommen von PDE4 und eine Ko-Lokalisation zu β -Arrestin war bislang nicht untersucht worden. Sowohl die Präsenz von β -Arrestin als auch von PDE4 konnten in dieser Arbeit gezeigt werden (Abbildung 5). Im *Proximity Ligation Assay* konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die beiden Moleküle sowohl im Synovialgewebe als

auch in den einzelnen Synovialzellen offenbar sehr eng (<40nm) nebeneinander liegen und eine Interaktion somit wahrscheinlich wird (Abbildung 13).

Nach dieser Beobachtung wurde hinterfragt, ob die gezeigten Effekte tatsächlich mit einer Verstärkung des Gai-Signalweges zusammenhängen. Dazu wurden die möglichen Gai-Effekte im RA-Gewebe mit Pertussis Toxin gehemmt, und es konnte gezeigt werden, dass damit eine Umkehr der zuvor analysierten Effekte auf TNF möglich war (Abbildung 18). Hemmte man die ERK mittels FR 180204 kam es beim OA Patienten ohne Rolipram, wie zu erwarten, zu einem Abfall der TNF α Konzentration. In Kombination mit Rolipram beim RA Synovialgewebe zeigte sich dagegen ein Anstieg der TNF α Konzentration, der ebenfalls durch eine durch Rolipram induzierte Betonung des Gai-Signalwegs beim RA Patienten erklärt werden könnte (Abbildung 20).

Ähnlich den Ergebnissen der Lefkowitz-Gruppe (68) konnte in unserer Arbeitsgruppe auch eine erhöhte Expression von pERK im Western-Blot nach Stimulation mit β -adrenergen Agonisten oder Rolipram nachgewiesen werden- ein Effekt der über Pertussis Toxin umgekehrt werden konnte. Auch dieses Ergebnis stärkt die Vermutung, dass eine Umkehr vom Gas- zum Gai-Signalweg stattgefunden hat (55). Drittens zeigte sich auch in unseren Versuchen ein Beitrag der PKA zur erhöhten Gai-Aktivität wie bei Baillie et al. 2003 beschrieben. Die beiden PKA-Inhibitoren KT und H89 konnten den beobachteten Anstieg von TNF verhindern (Abbildung 14, 15). Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass eine erhöhte Gai-Aktivität verantwortlich für die zuvor beobachteten TNF Konzentrationen war, und dies macht einen „Switch“ wahrscheinlich.

Ein solcher „Switch“ könnte eine Erklärung dafür sein, warum PDE4 Inhibitoren als therapeutischer Ansatz bei RA-Patienten bislang nicht erfolgreich waren (50). Es bleibt die Frage offen, warum ein solcher Switch nicht auch bei der Psoriasis-Arthritis die Wirkung von Rolipram und anderen PDE4-Inhibitoren verhindert. Allerdings scheinen die hier gezeigten Regelkreisläufe am β -Adrenorezeptor stark zelltypabhängig zu sein (22), und es ist durchaus möglich, dass die Zellen, die bei der Psoriasis-Arthritis im Gelenk die Entzündungsreaktion gestalten, schlicht anderen Regelkreisläufen als die RA-Synovialzellen unterworfen sind.

Die Hemmung der Phosphodiesterase- trotz ihrer Stellung als einzigem cAMP abbauenden Enzym- führt nicht in jeder Zelle zu einem Anstieg von cAMP. Eine Erhöhung von cAMP in der Zelle ist auch nicht *per se* antiinflammatorisch. Über

komplexe Regelkreise kommt es zu unterschiedlichsten Auswirkungen der PDE4-Hemmung auf die cAMP-Level, je nachdem wo und wann in der Zelle und unter welchen äußeren Bedingungen ein bestimmter Stimulus auftritt. Im Angesicht der Vielfalt unterschiedlicher Enzyme, Substrate, Rezeptoren und Agonisten, mit denen sich die Zelle auseinandersetzen muss, ist eine solche Trennung unbedingt notwendig, um der Zelle die Möglichkeit zu geben auf verschiedene Reize eine spezifische Antwort zu geben (72).

Dafür sorgen Signalosome, wie z.B. β -Arrestin, die Moleküle räumlich und örtlich zueinander bringen und in Mikrodomänen innerhalb der Zelle miteinander interagieren lassen (72). Obwohl verschiedenste Rezeptoren in Kardiozyten die cAMP-Konzentration beeinflussen, können sie unterschiedliche physiologische Antworten provozieren (73). Ob eine Synovialzelle mehr pro- oder mehr antiinflammatorische Botschaften verbreitet, hängt davon ab, welcher Weg zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle überwiegend angesteuert wird.

Das G α s-Protein kann nach Stimulation des β -Adrenorezeptors durch ein Katecholamin seine Wirkung entfalten, was wiederum die membrangebundene Adenylatcyclase aktiviert und so zu einem Anstieg des cAMPs an dieser Stelle der Zelle führt. Über die PKA kann dann der Signalweg über NF κ B zu einer vermehrten Transkription von cAMP abhängigen Genen führen, die für antiinflammatorische Proteine kodieren (74). Eine Hemmung der PDE4 in der Zelle führt hier zu einer erhöhten PKA Aktivität und damit zu einem vermehrten Ablaufen dieses Signalwegs. Gleichzeitig kann die PKA in einem negativen Feedback-Loop den G-Protein gekoppelten Rezeptor phosphorylieren und damit zu einem Abdiffundieren des G α s-Proteins zugunsten eines G α i-Proteins mit entsprechend nachfolgendem Signalweg (z.B. über die ERK) führen (67).

Eine Aktivierung des β -Adrenorezeptors über einen Agonisten ermöglicht es weiterhin den GRKs denselben zu phosphorylieren- mit dem Ergebnis, dass das *scaffolding-protein* β -Arrestin binden kann. β -Arrestin wiederum bringt die PDE4, die über eine Regulation der lokalen cAMP-Level Einfluss auf die PKA vor Ort nimmt, zum Rezeptor. Die PKA wird über das Ankerprotein AKAP79 zum Rezeptor gebracht (73). Dieser Komplex aus β -Arrestin, PDE4 und PKA desensibilisiert den aktivierten G α s-Rezeptor und führt zu einer Reprogrammierung desselben zum G α i-Rezeptor (72). Eine PDE4-Hemmung auf dieser Ebene kann über eine erhöhte PKA-Aktivität zur vermehrten G α i- Aktivität führen und wäre damit proinflammatorisch, wie es in

den durchgeführten Versuchen der Fall zu sein scheint (Abbildung 33).

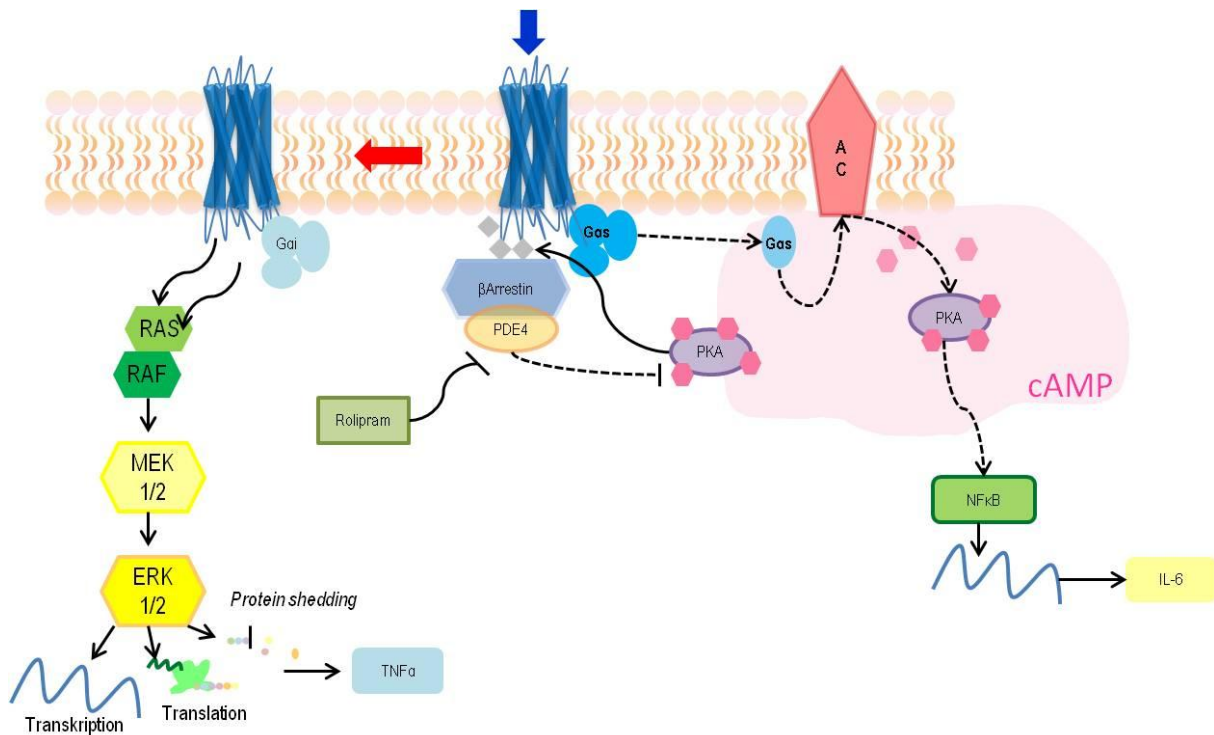


Abbildung 33. Die Rolle der PKA für die GPCR-Signalwege. Eine Hemmung der PDE4 am β_2 -Adrenorezeptor führt zu einem verminderten Abbau von cAMP und somit zu einer erhöhten PKA Aktivität. Die PKA kann ihrerseits über Phosphorylierung nachfolgender Proteine letztendlich zu einer Stimulation der NFκB-abhängigen IL-6-Produktion führen (74). Gleichzeitig führt die PKA über Phosphorylierung des β_2 -Adrenorezeptor zu einem Switch hin zum inhibitorischen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor. Hierdurch kann u.a. der MAP-Kinase Signalweg über RAS/RAF und MEK1/2 und schließlich ERK1/2 aktiviert werden (75). Die ERK schließlich beeinflusst über Transkription, Translation und *Protein shedding* die TNFα-Produktion positiv (67).

Die Phosphodiesterase 4 zu hemmen, kann hier nicht zu eindeutigen Ergebnissen führen, da sie wichtiger Bestandteil der Regulierung sowohl von pro- als auch antiinflammatorischen Signalwegen ist.

Gleichzeitig darf man nicht vergessen, dass jede Zelle unzählig viele GPCRs auf ihrer Oberfläche trägt, die je nach Stimulus unterschiedlich reagieren. Möchte man den Signalweg der GPCRs nachfolgend verändern, darf man nicht dem Zufall überlassen durch welchen Agonisten der Rezeptor gerade aktiviert wird. Gerade im entzündeten RA-Synovium findet durch die niedrige Neurotransmitter- Konzentration eine vermehrte Aktivierung von α -Rezeptoren statt, die *per se* vermehrt den Gai-Weg ansprechen (2,14). Um überhaupt einen antiinflammatorischen Effekt über den β -Adrenorezeptor zu bewirken, müsste man die Katecholaminkonzentration im Synovialgewebe erhöhen. Ein interessanter Therapieansatz könnte zum Beispiel eine Kombination aus Tyrosinhydroxylase-positiven Stammzellen, die Katecholamine

produzieren, und PDE4-Hemmern sein (55,56). Trotzdem wäre es möglich, dass auch eine erhöhte Noradrenalin-Konzentration im Synovium durch den oben beschriebenen Switch ihre antiinflammatorische Wirkung nicht entfalten könnte.

GPCRs als einfache An-/Ausschalter zu sehen, die nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip nach Aktivierung durch einen bestimmten Agonisten einen einzigen Signalweg aktivieren, ist nicht mehr zeitgemäß. Passender wäre vielleicht sie sich als eine Art Dimmschalter oder Trimmerschalter vorzustellen (20). Die Rezeptoren brauchen auch nicht unbedingt einen Agonisten, um ihren Aktivitätszustand zu verändern. So springt der β -AR spontan zwischen seinem aktiven und inaktiven Status hin und her (27). Mehr noch die GPCRs scheinen nicht nur zwei Zustände - einen aktiven und einen inaktiven - zu haben, sondern oszillieren zwischen vielen verschiedenen Konformationen. Ein bestimmter Agonist hat vermutlich die Eigenschaft einen entsprechenden Zustand zu stabilisieren und damit einen spezifischen nachfolgenden Signalweg zu ermöglichen (23,27).

Das macht das Verständnis der Auswirkungen von Ligandenbindung auf die nachfolgenden Signalwege kompliziert und nahezu unüberschaubar (20). Ein Therapieansatz über Katecholamin-produzierende Stammzellen wäre also riskant, lässt aber auch die Chance auf einen Erfolg offen.

Die Phosphodiesterase 4 ist ein entscheidender Knotenpunkt für den Austausch zwischen dem ERK-Map-Kinase- und cAMP-abhängigen Signalwegen (Abbildung 34). Im Angesicht ihrer faszinierend feinen Regulation am β 2-Adrenorezeptor, die abhängig von Reaktionspartnern, Zelltyp, Zeitpunkt, Umgebungsmilieu und vielen anderen Faktoren ist, ist es nicht verwunderlich, dass eine simple Hemmung dieses zentralen Enzyms zu unüberschaubaren Masseneffekten führen kann (76).

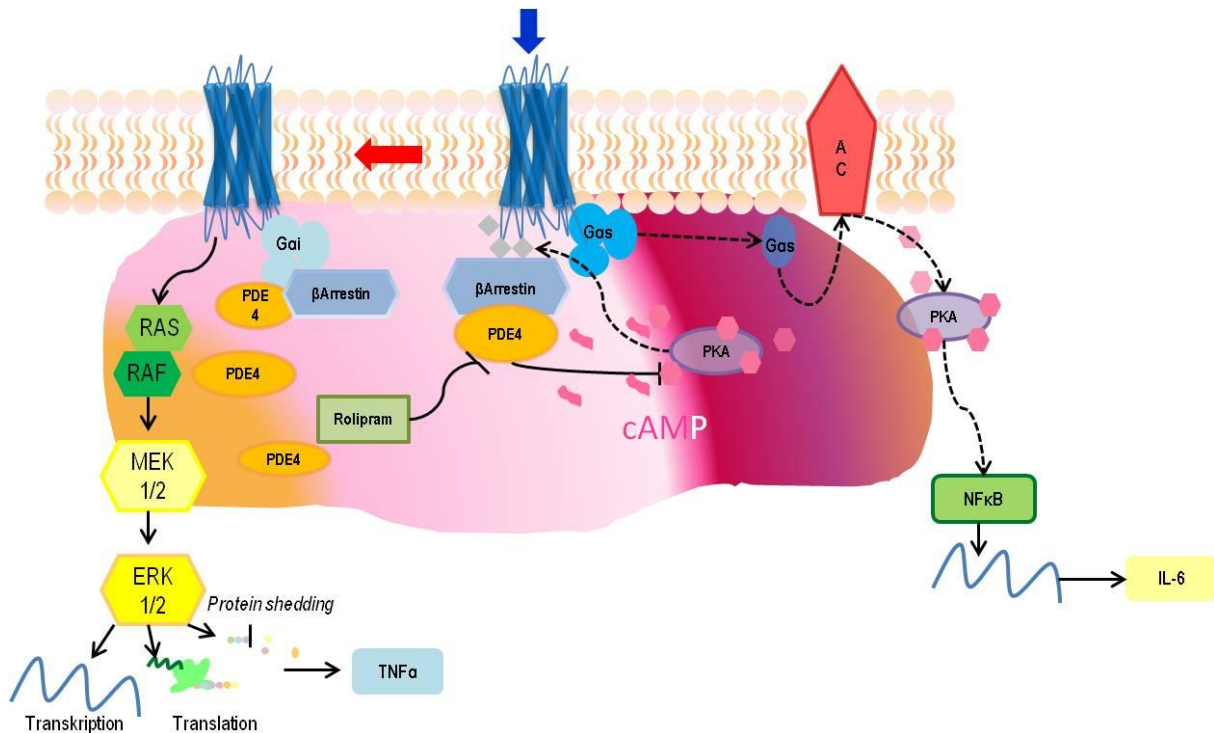


Abbildung 34. Die Phosphodiesterase als Knotenpunkt zwischen cAMP und ERK-Map-Kinase Signalwegen. Durch ein vermehrtes Vorkommen von PDE4 in der Nähe des GPCR vermittelt durch das *scaffolding protein* β -Arrestin wird hier vermehrt cAMP abgebaut. Dadurch wird die PKA in ihrer Funktion eingeschränkt. Der Rezeptor kann nicht durch die PKA phosphoryliert werden und wird dadurch nicht inaktiviert. Gleichzeitig kann weniger β -Arrestin am Rezeptor binden und es wird wiederum weniger PDE4 zum Rezeptor gebracht. Wird die PDE andererseits durch Rolipram gehemmt, kommt es nicht zum Abbau von cAMP und die PKA ist voll aktiv. Es kommt zur vermehrten Phosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung des G α i-abhängigen Signalwegs über die MAP-Kinasen und ERK.

Trotzdem hat sie als alleiniges Abbauenzym für cAMP eine entscheidende Rolle und bleibt deshalb spannender Gegenstand zukünftiger Wissenschaft. Hypoxie und auch die Hemmung von Hypoxia-inducible-Faktor-1 hatten z.B. in dieser Arbeit deutlich signifikante Auswirkungen auf die TNF α -Konzentration –insbesondere auch in Kombination mit Rolipram, und es wäre interessant genauer zu verstehen, wie sich ein hypoxisches Milieu auf die Regelkreisläufe um den β 2-Adrenorezeptor und die Phosphodiesterase auswirkt.

Zusammenfassung

Die RA ist weltweit eine sowohl von ihrer Prävalenz als auch ihrer einschneidenden Auswirkung auf die Lebensqualität der betroffenen Patienten höchst relevante Autoimmunerkrankung. Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem spielen für die Pathogenese der RA eine entscheidende Rolle. Insbesondere die Aktivität von TNF und IL-6 ist für das Fortschreiten der Entzündungsreaktion bei RA wichtig. Es kommt weiterhin zu einer autonomen Dysregulation mit gesteigerter Sympathikusaktivität zum Ausgleich der relativ zum Entzündungsgeschehen zu niedrigen Cortisol-Konzentration im Serum. Dabei kommt dem sympathischen Nervensystem je nach Krankheitsstadium eine andere Funktion zu. In der Akut-Phase wirkt es proinflammatorisch, in der Intermediärphase kommt es zu einer Umstrukturierung im Gelenk und in der chronischen Phase wirkt der Sympathikus –vermutlich über Katecholamin-produzierende TH+-Zellen im Gelenk-antiinflammatorisch. Vermittelt werden die Effekte der Katecholamine über GPCRs und damit über die Konzentration des second messengers cAMP. Eine erhöhte Konzentration von cAMP führt über die PKA und CREB zu einer verminderten TNF Konzentration und umgekehrt eine erniedrigte cAMP Konzentration zu einer erhöhten TNF Aktivität. IL-6 verhält sich jeweils entgegengesetzt zu TNF, wird allerdings zusätzlich direkt durch eine erhöhte TNF-Konzentration stimuliert. Die PDE4 ist das einzige Enzym, das in den Entzündungszellen cAMP abbaut und dadurch seine Konzentration reguliert. Die Therapie der RA ist am wirkungsvollsten, wenn möglichst früh im Krankheitsverlauf zielgerichtet und entschlossen therapiert wird. First-line Therapie ist weiterhin die Gabe von MTX. Wenn diese Therapie nicht ausreichend wirkt, wird MTX mit einem anderen Präparat kombiniert. In den letzten Jahrzehnten sind dies oftmals `Biologicals´ mit denen zielgenau in die Immunantwort eingegriffen werden kann. Auch die Hemmung von TNF war hierbei erfolgreich. Bislang nicht zu erklären war, warum Hemmer der PDE4 -eine Medikamentengruppe, die z.B. für die Therapie der Psoriasis Arthritis schon große Erfolge verzeichnen konnte, bei der RA nicht wirksam waren. Möglicherweise wurden bei den zunächst erfolgversprechenden Studien mit PDE4-Hemmern in RA-Modellen für die Pathogenese wichtige Faktoren nicht mit berücksichtigt. Die Hypoxie, die gerade in der chronischen Entzündung im Gelenk eine wichtige Rolle spielt, wurde z.B. nicht in die Versuche mit einbezogen. Auch dem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf, der für die

Wirkung des SNS entscheidend wäre, wird z.T. keine Beachtung geschenkt. In unserer Arbeitsgruppe fiel weiterhin auf, dass insbesondere unter Hypoxie die Hemmung der Phosphodiesterase aber auch die Stimulation und Antagonisierung von GPCRs zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der TNF- und IL-6-Sekretion führten. So kam es bei PDE4 Hemmung mit Rolipram zu einem Anstieg der TNF-Konzentration, nicht zu dem erwarteten Abfall. Ebenso stieg die TNF-Konzentration bei Stimulation am Gas-Rezeptor bzw. sank durch dessen Hemmung. Für IL-6 sah man diese widersprüchlichen Effekte insbesondere am Gai-Rezeptor. Es lag die Vermutung nahe, dass es bei der chronischen RA im stark entzündlichen, hypoxischen Milieu zu einer Veränderung der Signalweiterleitung auf Rezeptorebene kommt. Eine solche Änderung an den GPCRs war bereits von der Lefkowitz-Gruppe für (genetisch veränderte) menschliche embryonale Nierenzellen sowie menschliche Kardiomyozyten gezeigt worden (65). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit ein proinflammatorischer Switch vom Gas- zum Gai-Rezeptor im RA-Synovialgewebe gezeigt werden. Dieser Switch wurde höchstwahrscheinlich -über eine Interaktion von β -Arrestin und PDE4 am Rezeptor induziert- durch Rolipram (einen PDE4-Inhibitor) ausgelöst. Der Nachweis beider Moleküle sowie ihre enge Nachbarschaft und damit wahrscheinliche Interaktion gelang. Außerdem konnten die zuvor beobachteten Effekte durch eine Hemmung des Gai-Signalwegs umgekehrt werden. Dieser Switch könnte eine Erklärung für die Nicht-Wirksamkeit von PDE4-Hemmern in der Therapie von RA Patienten sein.

Literatur zur Arbeit

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423(6937):356–61.
2. Straub RH, editor. *Spezielle Pathophysiologie: Psycho-Neuro-Endokrino-Immunologie*, Rainer H. Straub (Hg.) ; Bd. 2. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007.
3. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 2011;365(23):2205–19.
4. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2010;62(9):2569–81.
5. McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: Rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69(11):1898–906.
6. Herold G, editor. *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung*; Köln: Herold; 2014.
7. Welsch U, Deller T. *Lehrbuch Histologie*, 3rd ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010.
8. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Immunology* 2007;7(6):429–42.
9. Muz B, Khan MN, Kiriakidis S, Paleolog EM. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2009;11(1):201.
10. Ng CT, Biniiecka M, Kennedy A, McCormick J, Fitzgerald O, Bresnihan B, et al. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69(7):1389–95.
11. Lee Y-A, Kim JY, Hong S-J, Lee S-H, Yoo MC, Kim KS, et al. Synovial proliferation differentially affects hypoxia in the joint cavities of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clinical rheumatology* 2007;26(12):2023–29.
12. Yusof MY, Emery P. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Drugs* 2013;73(4):341–56.
13. Bellinger DL, Millar BA, Perez S, Carter J, Wood C, ThyagaRajan S, et al. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cellular immunology* 2008;252(1-2):27–56.
14. Pongratz G, Straub RH. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2012;9(2):117–26.
15. Schaible H-G, Straub RH. Function of the sympathetic supply in acute and chronic experimental joint inflammation. *Autonomic neuroscience basic & clinical* 2014;182:55–64.
16. Straub RH, Bijlsma JWJ, Masi A, Cutolo M. Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases—the 10-year update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2013;43(3):392–404.
17. Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: Modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69(10):1853–60.
18. Straub RH, editor. *Tables of Molecular and Functional Neuroendocrine Immune Interactions*. Eching, Germany: Biozol; 2000.
19. Watling KJ, editor. *The RBI handbook of receptor classification and signal transduction*, 3rd ed. Natick, MA: Research Biochemicals International; 1998.
20. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009;459(7245):356–63.
21. Benovic JL. Novel beta2-adrenergic receptor signaling pathways. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002;110(6 Suppl):S229-35.
22. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with different partners: Protein kinase A phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Molecular pharmacology* 2002;62(5):971–74.

23. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2006;17(4):159–65.
24. Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacology & therapeutics* 2004;103(3):203–21.
25. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(5):2449–54.
26. Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277(34):31249–56.
27. Liggett SB. Update on current concepts of the molecular basis of beta2-adrenergic receptor signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002;110(6 Suppl):S223-7.
28. Métayé T, Gibelin H, Perdrisot R, Kraimps J-L. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cellular signalling* 2005;17(8):917–28.
29. Evron T, Daigle TL, Caron MG. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends in pharmacological sciences* 2012;33(3):154–64.
30. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;39(2):127–32.
31. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WWA, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *European journal of immunology* 2005;35(1):31–41.
32. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*; 31st ed. Springer-Lehrbuch. Heidelberg: Springer Medizin; 2010.
33. Foey AD, Field S, Ahmed S, Jain A, Feldmann M, Brennan FM, et al. Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF-alpha and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2003;5(6):28.
34. Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1988;141(7):2388–93.
35. Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1992;148(11):3441–45.
36. Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1994;152(6):3024–31.
37. Taffet SM, Singhel KJ, Overholtzer JF, Shurtleff SA. Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cellular immunology* 1989;120(2):291–300.
38. Tannenbaum CS, Hamilton TA. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1989;142(4):1274–80.
39. van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP, van Deventer SJ. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infection and immunity* 1994;62(5):2046–50.
40. Kobayashi K, Suda T, Manabe H, Miki I. Administration of PDE4 inhibitors suppressed the pannus-like inflammation by inhibition of cytokine production by macrophages and synovial fibroblast proliferation. *Mediators of inflammation* 2007;2007:58901.
41. Jin S-LC, Ding S-L, Lin S-C. Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases. *Chang Gung medical journal* 2012;35(3):197–210.

42. Eskandari N, Mirmosayyeb O, Bordbari G, Bastan R, Yousefi Z, Andalib A. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. *Journal of Research in Pharmacy Practice* 2015;4(4):175.
43. Bakker MF, Jacobs JWG, Verstappen SMM, Bijlsma JWJ. Tight control in the treatment of rheumatoid arthritis: Efficacy and feasibility. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66 Suppl 3:iii56-60.
44. Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48(7):1771–74.
45. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(20):5023.
46. Francischi JN, Yokoro CM, Poole S, Tafuri WL, Cunha FQ, Teixeira MM. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *European journal of pharmacology* 2000;399(2-3):243–49.
47. Feldmann M, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: An education in pathophysiology and therapeutics. *Immunological reviews* 2008;223:7–19.
48. Cho JY, Park JS, Baik KU, Lee JG, Kim HP, Yoo ES, et al. Differential effect of phosphodiesterase IV inhibitor RP73401 on various inflammatory and immune responses relevant to rheumatoid arthritis. *Pharmacological research* 2004;49(5):423–31.
49. Schett G, Sloan VS, Stevens RM, Schafer P. Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 2010;2(5):271–78.
50. Poole RM, Ballantyne AD. Apremilast: First Global Approval. *Drugs* 2014;74(7):825–37.
51. Genovese MC, Jarosova K, Cieślak D, Alper J, Kivitz A, Hough DR, et al. Apremilast in Patients With Active Rheumatoid Arthritis: A Phase II, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2015;67(7):1703–10.
52. Jimenez JL, Punzón C, Navarro J, Muñoz-Fernández MA, Fresno M. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001;299(2):753–59.
53. McCann FE, Palfreeman AC, Andrews M, Perocheau DP, Inglis JJ, Schafer P, et al. Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010;12(3):R107.
54. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1988;31(3):315–24.
55. Jenei-Lanzl Z, Zwingenberg J, Lowin T, Anders S, Straub RH. Proinflammatory receptor switch from Gas to Gai signaling by β -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. *Brain, behavior, and immunity* 2015;50:266–74.
56. Jenei-Lanzl Z, Capellino S, Kees F, Fleck M, Lowin T, Straub RH. Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;74(2):444–51.
57. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB journal* 2000;14(13):2097–107.
58. Kennedy A, Ng CT, Binięcka M, Saber T, Taylor C, O'Sullivan J, et al. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2010;62(3):711–21.
59. Coates LC, FitzGerald O, Helliwell PS, Paul C. Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same? *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2016;46(3):291–304.

60. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2003;48(8):2173–77.
61. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 2005;44(1):7–16.
62. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 2011;23(5):471–78.
63. Judd AM, MacLeod RM. Differential release of tumor necrosis factor and IL-6 from adrenal zona glomerulosa cells in vitro. *The American journal of physiology* 1995;268(1 Pt 1):20.
64. Schandené L, Vandenbussche P, Crusiaux A, Alègre ML, Abramowicz D, Dupont E, et al. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology* 1992;76(1):30–34.
65. Zhang Y, Lin JX, Vilcek J. Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263(13):6177–82.
66. Zhang YH, Lin JX, Yip YK, Vilcek J. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: Role in the induction of interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85(18):6802–05.
67. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology* 2014;26(3):237–45.
68. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, et al. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(3):940–45.
69. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997;390(6655):88–91.
70. Li P, Cook JA, Gilkeson GS, Luttrell LM, Wang L, Borg KT, et al. Increased expression of beta-arrestin 1 and 2 in murine models of rheumatoid arthritis: Isoform specific regulation of inflammation. *Molecular Immunology* 2011;49(1-2):64–74.
71. Wu H-X, Chen J-Y, Wang Q-T, Sun W-Y, Liu L-H, Zhang L-L, et al. Expression and function of β -arrestin 2 stimulated by IL-1 β in human fibroblast-like synoviocytes and the effect of paeoniflorin. *International Immunopharmacology* 2012;12(4):701–06.
72. Baillie GS, Scott JD, Houslay MD. Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. *FEBS (Federation of European Biochemical societies) letters* 2005;579(15):3264–70.
73. Baillie GS, Houslay MD. Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Current opinion in cell biology* 2005;17(2):129–34.
74. Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K, Zheng SG. Interleukin-6 Synthesis in Human Chondrocytes Is Regulated via the Antagonistic Actions of Prostaglandin (PG)E2 and 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2. *PLoS ONE* 2011;6(11):e27630.
75. Dumaz N, Marais R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. *FEBS (Federation of European Biochemical societies) Journal* 2005;272(14):3491–504.
76. Fertig BA, Baillie GS. PDE4-Mediated cAMP Signalling. *Journal of cardiovascular development and disease* 2018;5(1).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rainer Straub für die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit und sein damit in mich gezeigtes Vertrauen, sowie seine exzellenten fachlichen Erklärungen und Ratschläge und seine beständige und zuverlässige Betreuung der Arbeit herzlich bedanken.

Einen besonderen Dank an Frau Dr. rer. nat. Zsuzsa Jenei-Lanzl für die herzliche Betreuung meiner Arbeit, zahlreiche Erklärungen, wertvolle Ratschläge und Diskussionen. Es war wirklich schön, mit dir zusammenzuarbeiten.

Vielen herzlichen Dank ans ehemalige Team des Labors – insbesondere Elena Neumann für die gute Einarbeitung und an Madlen Melzer, Tanja Späth, Angelika Gräber und Luise Rauch für die umfassende und herzliche Unterstützung bei allen technischen und organisatorischen Fragen.

Danke an meine Eltern, an meinen Bruder und Vroni. Ihr seid immer für mich da, wenn ich euch brauche.

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.

Regensburg, März 2021

Janika Zwingenberg

Publikation

Jenei-Lanzl Z, Zwingenberg J, Lowin T, Anders S, Straub RH. *Proinflammatory receptor switch from Gas to Gai signaling by β -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells*. Brain, behavior, and immunity 07/2015