

Aus der Klinik für Rheumatologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

# Resolvine: Rezeptoren, Synthese und Wirkung in Fibroblasten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Clara Marie Kißmann

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

## Zusammenfassung

Eine Vielzahl an chronischen Erkrankungen, z.B. die rheumatoide Arthritis, sind durch eine unkontrollierte, persistierende Entzündung des Gewebes gekennzeichnet. Studien zeigen, dass die Auflösung einer Entzündungsreaktion einen aktiven Prozess, eingeleitet durch anti-entzündliche Mediatoren, darstellt. Klinische Studien konnten ebenfalls nachweisen, dass sich die Einnahme von Omega-3 Fettsäuren positiv auf den Krankheitsverlauf einer rheumatoiden Arthritis auswirken kann. Verantwortlich für diesen antiinflammatorischen Effekt sind Resolvine. Resolvine, die zu den anti-entzündlichen Mediatoren zählen, vermitteln ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren und Enzyme. Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des Resolvin-Systems in synovialen Fibroblasten. Dazu sollten bereits bekannte Resolvin Rezeptoren und Enzyme (z.B. der GPR 18, GPR 32 oder die 5-Lipoxygenase) in synovialen Fibroblasten mittels Western Blot und Immunfluoreszenz detektiert und deren Regulation durch Zytokine untersucht werden. Im Anschluss sollte die Wirkung von Resolvin Vorstufen auf die Ausschüttung von IL-6, IL-8 und MMP-3 mittels ELISA getestet werden. Im Western Blot konnten der GPR18, GPR 32 und Chem 23 Rezeptor auf synovialen Fibroblasten detektiert werden. Die 5- und 15-Lipoxygenase konnten mittels Immunzytochemie in synovialen Fibroblasten dargestellt werden. Im ELISA zeigte sich keine eindeutige Veränderung der Zytokinausschüttung nach Stimulation mit Resolvin Vorstufen. Im Allgemeinen führte die Hinzunahme des Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nimesulid zu einer Reduktion der Zytokinausschüttung. Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis zeigten eine höhere Zytokinausschüttung als Patienten mit einer Osteoarthritis. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Rezeptoren der Resolvine in synovialen Fibroblasten detektiert werden konnten und deren Expression durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst werden kann. In welchem Maß Resolvin Vorstufen die Interleukin Ausschüttung von Fibroblasten beeinflussen, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Zur vollständigen Charakterisierung des Resolvin-Systems in synovialen Fibroblasten bedarf es außerdem dem Nachweis aller für die Synthese benötigter Enzyme sowie Resolvin Vorstufen.

## Summary (English)

Several chronic diseases, such as rheumatoid arthritis, are characterized by uncontrolled, persistent tissue inflammation. Studies have shown that the resolution of an inflammatory response is an active process initiated by anti-inflammatory mediators. Clinical trials have also shown that the intake of omega-3 fatty acids can have a positive effect on the course of rheumatoid arthritis. Resolvins are responsible for this anti-inflammatory effect. Resolvins, which are defined as anti-inflammatory mediators, mediate their effects through specific receptors and enzymes. The aim of this work was to characterize the resolvin system in synovial fibroblasts. GPR 18, GPR 32 and 5-lipoxygenase have been classified as resolvin receptors and enzymes in previous studies. Their detection in synovial fibroblasts by Western blotting and immunofluorescence and the investigation of their regulation by cytokines were the aim of this work. Subsequently, the effect of resolvin precursors on the release of IL-6, IL-8 and MMP-3 was tested by ELISA.

In this study the GPR18, GPR 32 and Chem 23 were detected by Western blotting on synovial fibroblasts. The 5- and 15-lipoxygenase were detected by immunocytochemistry in synovial fibroblasts. No clear change in cytokine release was observed after stimulation with resolvin precursors by ELISA. In general, the addition of the cyclooxygenase-2 inhibitor Nimesulid reduced cytokine release. Patients with rheumatoid arthritis showed a higher cytokine release than patients with osteoarthritis. In conclusion, it can be stated that resolvin receptors were detected in synovial fibroblasts and their expression was influenced by pro-inflammatory cytokines. The extent to which resolvin precursors influence interleukin release from synovial fibroblasts could not be clearly determined. For a complete characterization of the resolvin system in synovial fibroblasts, it is necessary to identify all of the enzymes required for synthesis as well as the resolvin precursors.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
12-LO	12-Lipoxygenase
15-LO	15-Lipoxygenase
15R-HETE	<i>15R-hydroxy-eicosatetraenoic acid</i>
17R-HDHA	<i>17R-hydroxy-docosahexaenoic acid</i>
17S-HpDHA	17S-hydroperoxy-docosahexaensäure
18R-HEPE	<i>18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid</i>
5-LO	5-Lipoxygenase
AK	Antikörper
ALX-Rezeptor	Lipoxin A <sub>4</sub> Rezeptor
BLT1 Rezeptor	Leukotrien B <sub>4</sub> Rezeptor
ChemR23	<i>chemokine like receptor 23</i>
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYP P450	Cytochrome P450 Monooxygenase
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DMARD	<i>disease modifying anti-rheumatic drug</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

<b>EPA</b>	.....	Eicosapentaensäure
<b>g</b>	.....	Gramm
<b>GPR 18</b>	.....	G-Protein gekoppelter Rezeptor 18
<b>GPR 32</b>	.....	G-Protein gekoppelter Rezeptor 32
<b>h</b>	.....	Stunde
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	.....	Interleukin-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	.....	Interleukin-6
<b>IL-8</b>	.....	Interleukin-8
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	.....	Interferon- $\gamma$
<b>kDa</b>	.....	Kilodalton
<b>LTB<sub>4</sub></b>	.....	Leukotrien B <sub>4</sub>
<b>M</b>	.....	Molar
<b>mA</b>	.....	Milliampere
<b>MCP</b>	.....	Metacarpalgelenk
<b>min</b>	.....	Minute
<b>ml</b>	.....	Milliliter
<b>mm</b>	.....	Millimeter
<b>MMP</b>	.....	Metalloproteinasen
<b>ms</b>	.....	Millisekunde
<b>ng</b>	.....	Nanogramm
<b>nm</b>	.....	Nanometer
<b>NSAD</b>	.....	Nicht-Steroidale Anti-Rheumatika
<b>OA</b>	.....	Osteoarthrose
<b>OASF</b>	.....	<i>osteoarthritic synovial fibroblasts</i>
<b>PFA</b>	.....	Paraformaldehyd
<b>PIP</b>	.....	Interphalangealgelenk
<b>PMN</b>	.....	polymorphkernige Neutrophile

**RA** .....rheumatoide Arthritis  
**RASF** ..... *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*  
**rpm** ..... *rounds per minute*  
**RT** .....Raumtemperatur  
**RvD1** ..... Resolvin D1  
**RvD2** ..... Resolvin D2  
**RvE1** .....Resolvin E1  
**SF** ..... synoviale Fibroblasten  
**TNF- $\alpha$** ..... Tumornekrosefaktor- $\alpha$   
**V.E. Wasser**..... vollentsalztes Wasser

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Definition der rheumatoiden Arthritis .....	1
1.2. Klinisches Bild .....	1
1.3. Ätiologie und Pathogenese .....	3
1.3.1. Genetische Einflüsse .....	3
1.3.2. Umwelteinflüsse .....	3
1.3.3. Immunantwort .....	4
1.3.3.1. Synoviale Fibroblasten .....	4
1.3.3.2. Zytokine .....	5
1.4. Klinische Studien zur Wirkung von Omega-3 Fettsäuren.....	6
1.5. Resolvine .....	7
1.5.1. Resolvine: aktive, anti-entzündliche Mediatoren .....	8
1.5.2. Synthese der Resolvine .....	8
1.5.3. Eicosapentaensäure .....	9
1.5.3.1. Synthese.....	9
1.5.3.2. Rezeptoren .....	10
1.5.4. Docosahexaensäure .....	11
1.5.4.1. Synthese.....	11
1.5.4.2. Rezeptoren .....	12
1.6. Ziele der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Patienten .....	16
2.2. Zellkultivierung .....	16
2.3. Stimulationen .....	17
2.3.1. Stimulationen Western Blot.....	17
2.3.2. Stimulationen ELISA .....	17
2.4. Antikörper (AK).....	19
2.5. Western Blot.....	20
2.5.1. Proteingewinnung .....	20
2.5.2. Proteinquantifizierung .....	21
2.5.3. Vorbereitung der Polyacrylamid-Gele .....	22
2.5.3.1. Materialien .....	22
2.5.3.2. Aufbau und Ablauf .....	22
2.5.4. Gelelektrophorese .....	23
2.5.4.1. Materialien .....	23
2.5.4.2. Aufbau und Ablauf .....	23
2.5.5. Western Blot und Proteinvisualisierung.....	24
2.5.5.1. Materialien .....	24

2.5.5.2. Aufbau und Ablauf .....	24
2.5.6. Auswertung .....	25
2.6. Fluoreszierende Verfahren.....	26
2.6.1. Immunfluoreszenz.....	26
2.6.1.1. Materialien .....	26
2.6.1.2. Aufbau und Ablauf .....	26
2.6.2. Immunzytochemie .....	27
2.6.2.1. Materialien .....	27
2.6.2.2. Aufbau und Ablauf .....	28
2.6.3. Auswertung .....	28
2.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
2.7.1. Materialien.....	29
2.7.2. Ablauf .....	30
2.7.3. Auslesen und Auswertung der ELISA Daten.....	31
2.8. Statistische Auswertung .....	31
2.9. Allgemeiner Laborbedarf .....	31
2.9.1. Materialien.....	31
2.9.2. Geräte .....	32
2.9.3. Programme .....	34
3. Ergebnisse .....	35
3.1. Expression von Resolvin-relevanten Proteinen.....	35
3.1.1. GPR 32 .....	35
3.1.2. GPR 18 .....	37
3.1.3. CMKLR1.....	39
3.1.4. Leukotrien B <sub>4</sub> Rezeptor .....	41
3.1.5. FPRL1 .....	42
3.1.6. 15-Lipoxygenase.....	43
3.1.7. 12-Lipoxygenase.....	44
3.1.8. 5-oxo-ETE .....	44
3.2. Nachweis von Resolvin-assoziierten Proteinen mittels Immunfluoreszenz .....	45
3.2.1. 5-Lipoxygenase.....	46
3.2.2. 15-Lipoxygenase.....	48
3.2.3. FPRL1 .....	50
3.2.4. GPR 18 .....	52
3.2.5. GPR 32 .....	54
3.3. Quantifizierung der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion nach Stimulation mit Omega-3 Fettsäuren und Resolvin-Vorstufen von SF mittels ELISA .....	56
3.3.1. Modulation der IL-6 Produktion .....	56
3.3.1.1. EPA .....	57
3.3.1.2. 18(S)-HEPE .....	58
3.3.1.3. 18R-HEPE .....	59
3.3.1.4. 17(18)-EEQ .....	60
3.3.1.5. Rac18-HEPE .....	61
3.3.2. Modulation der IL-8 Produktion .....	62

3.3.2.1. EPA .....	62
3.3.2.2. 18(S)-HEPE .....	63
3.3.2.3. 18R HEPE .....	64
3.3.2.4. 17(18)-EEQ .....	65
3.3.2.5. Rac18-HEPE .....	66
3.3.3. Modulation der MMP-3 Produktion .....	66
3.3.3.1. EPA .....	67
3.3.3.2. 18(S)-HEPE .....	68
3.3.3.3. 18R-HEPE .....	69
3.3.3.4. 17(18)-EEQ .....	70
3.3.3.5. Rac18-HEPE .....	71
4. Diskussion .....	72
4.1. Fibroblasten .....	72
4.2. Western Blot.....	72
4.3. Immunfluoreszierende Verfahren .....	72
4.4. Rezeptorbesatz synovialer Fibroblasten .....	73
4.4.1. GPR32 .....	73
4.4.2. GPR 18 .....	74
4.4.3. ChemR23 .....	75
4.4.4. FPRL1 Rezeptor .....	76
4.4.5. 5-Lipoxygenase .....	77
4.4.6. 15-Lipoxygenase .....	77
4.4.7. 12-Lipoxygenase .....	77
4.4.8. 5-oxo-ETE Rezeptor .....	78
4.4.9. Leukotrien B4 Rezeptor (BLT1 Rezeptor) .....	78
4.5. Charakterisierung des Synthesewegs der Resolvine .....	79
4.6. Schlussfolgerungen.....	84

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Systemerkrankung, die sich typischerweise als destruktive, symmetrische Entzündung der peripheren Gelenke zeigt (Firestein, 2003, Smolen et al., 2016). Extraartikulär können zusätzlich unter anderem die Lunge, das Herzkreislaufsystem sowie die Haut betroffen sein (Hurd, 1979). Dies hat zur Folge, dass die Prävalenz von kardialen Ereignissen wie dem Myokardinfarkt bei Patienten mit einer RA deutlich erhöht ist. Auch treten Erkrankungen wie Arteriosklerose, Hyperlipidämie oder arterielle Hypertonie häufiger auf (Han et al., 2006). Die Prävalenz der RA liegt weltweit bei 0,46%. In Westeuropa liegt sie mit 0,54% deutlich über dem globalen Durchschnitt. Frauen sind meist doppelt so häufig betroffen wie Männer (Cross et al., 2014, Almutairi et al., 2021).

## 1.2. Klinisches Bild

Erstes klinisches Zeichen einer beginnenden RA kann eine palpierbare Schwellung der kleinen Gelenke der Hand mit einhergehender Bewegungseinschränkung sein. Betroffen sind in diesen Fällen meist die Metacarpalgelenke (MCP), die proximalen Interphalangealgelenke (PIP) und das Handgelenk. Häufig lassen sich zu diesem Zeitpunkt noch keine radiologischen Korrelate finden. Im Verlauf wird allerdings meist eine periartikuläre Osteopenie und diffuse Demineralisierung des Knochens deutlich. Durch den schubweisen Verlauf der RA kommt es im Verlauf der Zeit zu einem Befall weiterer Gelenke, unter anderem des Metatarsophalangeal-, Knie- und Schultergelenks. Klinische Zeichen einer fortgeschrittenen Erkrankung können eine Ulnardeviation (Subluxation der MCP-Gelenke nach ulnar) sowie eine Schwanenhalsdeformität (Hyperextension des distalen Interphalangealgelenks (DIP) mit Flexion des PIP-Gelenks) und eine Knopflochdeformität (Flexion des DIP-Gelenks mit Hyperextension des PIP-Gelenks) der Hand sein. Sie entstehen durch eine chronische Tendovaginitis der Handsehnen, die bei Fortschreiten der Erkrankung zu Gelenkinstabilität, Dislokation und Deformität führt (Grassi et al., 1998, Shah and St. Clair, 2016).

Auch extraartikuläre Beteiligungen können auftreten. Eine Beteiligung der Haut zeigt sich durch sogenannte Rheumaknoten. Diese subkutanen, meist benignen, Knoten

finden sich häufig an druckbelasteten Stellen der Haut (Grassi et al., 1998). Weitere extraartikuläre Manifestationen zeigen sich insbesondere in der Lunge, an Gefäßen und im Herz-Kreislauf-System. Die chronische Perikarditis gilt als eine der häufigsten Formen der kardialen Beteiligung (Hurd, 1979), während im Rahmen einer Lungenbeteiligung typischerweise ein Pleuraerguss, Lungenknoten, eine diffuse intestinale Fibrose oder eine Pleuritis vorzufinden sind (Boulware et al., 1985). Eine Vaskulitis der kleinen Gefäße ist ebenfalls möglich (Hurd, 1979).

Als systemische Erkrankung geht die RA häufig auch mit Allgemeinsymptomen wie Fatigue, Fieber und einem Gewichtsverlust (Grassi et al., 1998) sowie einer meist einständigen Morgensteifigkeit der Gelenke einher (Bellamy et al., 1991).

Zur klinischen Diagnose einer RA werden die 2010 *Rheumatoid Arthritis classification criteria* des *American College of Rheumatology* genutzt (Aletaha et al., 2010). Anhand eines Punktesystems werden Patienten mit einer nicht anderweitig erkläraren Gelenkschwellung an mindestens einem Gelenk untersucht. Ausschlaggebende Kriterien sind die Art und Anzahl der Gelenkbeteiligung sowie eine positive Serologie, beispielsweise ein positiver Rheumafaktor, Antikörper gegen citrullinierte Proteine, ein erhöhtes C-reaktives-Protein oder eine positive Blutsenkungsgeschwindigkeit. Auch sollten die Symptome länger als sechs Wochen bestehen. Bei einem Punktwert von 6 oder höher gilt der Verdacht einer RA als bestätigt (Aletaha et al., 2010). Dieses überarbeitete Klassifikationssystem hilft bei der frühzeitigen Diagnosestellung und erleichtert einen zeitnahen therapeutischen Eingriff, um auftretende Folgeerkrankungen zu vermeiden. Bei Diagnose einer RA wird laut S2e-Leitlinie meist zeitnah mit einer *disease modifying anti-rheumatic drug* (DMARD) Therapie in Kombination mit Glukokortikoiden und gegebenenfalls nicht steroidalen Antirheumatika wie Ibuprofen begonnen. Hierzu zählt unter anderem der Einsatz von Methotrexat oder Leflunomid. Bei fehlendem Ansprechen kann diese Therapie auf die Anwendung von weiteren DMARDs, beispielsweise TNF- $\alpha$ - (z.B. Adalimumab, Infliximab) oder Interleukin-Inhibitoren (z.B. Anakinra) erweitert werden (Fiehn et al., 2018).

### 1.3. Ätiologie und Pathogenese

Im Verlauf der Zeit haben sich verschiedene Modelle zur Erläuterung der Pathogenese einer RA etabliert. Die genaue Ätiologie und Pathogenese sind bis heute nicht eindeutig belegt. Als Richtlinie wurde im Folgenden das Modell von McInnes und Schett verwendet (McInnes and Schett, 2011).

In der Ätiologie der RA spielen durch Genetik und Umwelteinflüsse hervorgerufene autoimmune Prozesse eine entscheidende Rolle.

#### 1.3.1. Genetische Einflüsse

Studien belegen, dass bis zu 60% der Entstehung einer RA auf genetische Einflüsse zurückgeführt werden kann (MacGregor et al., 2000). Als wichtigster genetischer Einfluss gilt hier die *shared-epitope* Hypothese. Sie geht davon aus, dass individuelle Variationen des HLA-DRB1 Gens, welches für MHCII-Moleküle codiert, direkten Einfluss auf die Ätiologie und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen haben können. Die entsprechenden MHCII Moleküle befinden sich auf antigenpräsentierenden Zellen und interagieren mit T-Zellen. Bei strukturellen Veränderungen der Moleküle kann dies eine Veränderung der Immunantwort bedeuten (Gregersen et al., 1987, Silver J, 1985). Neben dem *shared-epitope* gibt es über hundert *single nucleotide polymorphisms* die das Risiko für das Auftreten einer RA ebenfalls, wenn auch nur geringfügig, erhöhen können (Okada et al., 2014).

#### 1.3.2. Umwelteinflüsse

Umwelteinflüsse die, bei Exposition, mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer RA assoziiert sein können, gliedern sich in infektiöse und externe Faktoren.

Zu den infektiösen Einflüssen zählen unter anderem eine vorausgegangene Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Takeda et al., 2000), dem Cytomegalie-Virus, *Proteus mirabilis* (Ebringer and Wilson, 2000) und *E.coli*. Es ist möglich, dass durch diese Mikrobakterien und Viren die Entstehung einer RA verstärkt werden kann. Eine Form von Molekularer Mimikry wird diskutiert. Beispielsweise kann der Kontakt mit *E.coli* über bestimmte Proteinsequenzen eine verstärkte T-Zell-Antwort hervorrufen (McInnes and Schett, 2011, Auger and Roudier, 1997). Studien zeigen, dass auch *Porphyromonas gingivalis*, ein Bakterium ursächlich für die Entstehung einer Peridontitis, die Entstehung einer RA begünstigen kann. Das Bakterium citrulliniert

Peptide und Proteine und begünstigt so die Entstehung von neuen Epitopen (Wegner et al., 2010).

Wichtige externe Risikofaktoren sind Rauchen und Übergewicht (Symmons et al., 1997).

### **1.3.3. Immunantwort**

Die beschriebenen Faktoren können einen Toleranzverlust des Immunsystems auslösen. Die Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems sorgt für eine pathologische Immunantwort, die eine synoviale Hyperplasie mit Knorpel- und Knochenerosion und eine chronisch, systemische Entzündung zur Folge hat (Firestein, 2003, Müller-Ladner et al., 2005).

Bei der Entstehung und Entwicklung einer RA sind verschiedene Zellen und Zytokine beteiligt. Hierzu zählen sowohl Immunzellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen, B- und T-Zellen sowie differenzierte Monozyten, Osteoklasten, Chondrozyten und Fibroblasten (Smolen et al., 2016). Die Synovia von Patienten mit RA weist außerdem eine spezielle Zellpopulation auf, die synovialen Fibroblasten. Sie sind maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA beteiligt (Huber et al., 2006).

#### **1.3.3.1. Synoviale Fibroblasten**

Die Synovialmembran stellt den Übergang zwischen Synovia und der Gelenkkapsel dar. In gesunden Patienten besteht die Membran aus ein bis zwei Schichten an locker angeordneten Zellen, von denen der Hauptteil aus synovialen Fibroblasten (SF) und synovialen Makrophagen besteht. Dies ist sowohl bei Patienten mit einer Hyperplasie der Membran, wie sie im Rahmen einer RA auftritt, als auch bei gesunden Patienten der Fall (Edwards and Willoughby, 1982, Henderson and Pettipher, 1985).

Fibroblasten sind der wichtigste Bestandteil des Bindegewebes. Durch die Produktion von strukturgebenden Proteinen (z.B. Kollagen und Elastan) sorgen sie für den Aufbau und Erhalt der extrazellulären Matrix. Ebenfalls wichtig sind sie für die Bildung von Adhäsionsmolekülen (z.B. Fibronectin und Laminin) sowie Glycosaminoglykanen. Neben dem Erhalt der extrazellulären Matrix sind Fibroblasten in vielfältige Prozesse eingebunden. Sie spielen unter anderem in der Wundheilung sowie bei Entzündungen oder der Angiogenese von Gewebe (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014) eine entscheidende Rolle. Ähnlich der Wandlung von Fibroblasten in der Wundheilung,

vollziehen auch die in der Entstehung einer RA beteiligten SF eine Änderung ihres Phänotyps von einem „ruhenden“ Phänotyp zu einer aktiven Form (van Beurden et al., 2003, Lafyatis et al., 1989). SF produzieren nach ihrer Aktivierung eine Vielzahl an Botenstoffen, unter anderem Chemokine, Zytokine und Matrix-zerstörende Enzyme. Diese Botenstoffe können mit Endothelzellen und Immunzellen interagieren und tragen so zur Knochen- und Knorpelzerstörung bei (Huber et al., 2006, Pierer et al., 2004, Lafyatis et al., 1989).

Dass Fibroblasten auch unabhängig vom angeborenen und erworbenen Immunsystem ihre destruirenden Eigenschaften behalten, wurde von Müller-Ladner et al. anhand des *severe combined immunodeficiency*-Maus-Modells (SCID-Maus-Modell) gezeigt. Es wurden sowohl SF von Patienten mit einer RA sowie SF von Patienten mit einer Osteoarthrose (OA) in Mäuse implantiert. Es konnte gezeigt werden, dass die SF auch nach Herauslösen aus dem Gewebsverbund ihre destruktiven und autonomen Eigenschaften im Knorpel beibehalten und so auch unabhängig vom ursprünglichen Immunsystem des Spenders aktiv sind (Müller-Ladner et al., 1996). Zusätzlich tragen SF zur Knochenzerstörung bei, indem sie Osteoklasten aktivieren und differenzieren (McInnes and Schett, 2011).

### **1.3.3.2. Zytokine**

An der Entstehung und Progression der RA sind verschiedenste Zytokine beteiligt. Sie werden unter anderem von SF, Makrophagen, B- und T-Zellen ausgeschüttet, beeinflussen aber auch deren Funktion. Im Folgenden werden ausgewählte Zytokine und deren Interaktion mit SF näher beschrieben.

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gilt als Zytokin, welches maßgeblich zur Verstärkung der Entzündungsreaktion und Knochendestruktion beiträgt. TNF- $\alpha$  wird, ebenso wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL-6), besonders von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet (Brennan and McInnes, 2008). *In vitro* können sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  eine Proliferation von SF bewirken (Gitter et al., 1989) und durch die Induktion von Kollagenasen in synovialen Zellen (Dayer et al., 1985, Dayer et al., 1986) und der Knochenresorption *in vitro* (Bertolini et al., 1986) entscheidend zur Progression der Erkrankung beitragen. Die wichtige Rolle von TNF- $\alpha$  zeigt sich ebenfalls durch die Nutzung von TNF- $\alpha$  Inhibitoren in der Therapie einer RA. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass eine Therapie mit TNF- $\alpha$  Inhibitoren zu

einer klinischen Verbesserung von Patienten und zur Minderung deren Erwerbsunfähigkeit beiträgt (Olofsson et al., 2017).

Interleukin-8 (IL-8) ist als Chemokin unter anderem für die Infiltration von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) in entzündetes Gewebe verantwortlich und wird sowohl von Makrophagen als auch von SF ausgeschüttet. Insbesondere SF zeigen eine verstärkte Ausschüttung von IL-8 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ . Es zeigte sich, dass die Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA deutlich höhere Level an IL-8 aufweist als die von Patienten mit einer OA (Koch et al., 1991).

Auch Metalloproteinasen (MMP), unter anderem MMP-1 und MMP-3, die maßgeblich zur Destruktion von Knorpel und Knochen beitragen, können von SF oder Endothelzellen freigesetzt werden. Distler et al. beschrieben eine Freisetzung von MMP durch sogenannte Mikropartikel. Als Mikropartikel werden von Immunzellen, wie z.B. T-Lymphozyten, freigesetzte membrangebundene Vesikel bezeichnet, welche im Rahmen einer Entzündungsreaktion vermehrt ausgeschüttet werden und so die Sekretion von MMP durch SF steigern können (Distler et al., 2005, Kikuchi et al., 1996).

#### **1.4. Klinische Studien zur Wirkung von Omega-3 Fettsäuren**

In den 1970er Jahren gewann eine epidemiologische Studie aus Grönland an großer Bedeutung. Sie konnte zeigen, dass Grönländische Inuit von 1950 bis 1974 im Vergleich zur Bevölkerung des westlichen Europas deutlich seltener an Krankheiten wie einem Myokardinfarkt, Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Asthma Bronchiale, Multiple Sklerose oder Psoriasis erkrankten (Kromann and Green, 1980). Da die Nahrung der Inuit deutlich mehr Fischöl enthielt als die in industrialisierten Ländern üblichen Mengen (Dyerberg et al., 1975), warfen diese Erkenntnisse die Frage auf, ob sich Bestandteile des Fischöls möglicherweise positiv auf die Vermeidung solcher Krankheiten auswirken können.

Im Verlauf der letzten Jahre konnten viele Studien die positiven gesundheitlichen Auswirkungen von Omega-3 Fettsäuren nachweisen. Die größten Quellen für Omega-3 Fettsäuren sind Fische und Meeresfrüchte sowie Nüsse und pflanzliche Öle. Besonders im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen zeigten sich protektive Effekte durch eine ausreichende Zufuhr von Omega-3 Fettsäuren (Kris-Etherton et al., 2002). Die *American Heart Association* empfiehlt daher mindestens zweimal wöchentlich Fisch zu essen und Patienten mit diagnostizierter kardiovaskulärer

Erkrankung zusätzlich die Aufnahme von insgesamt 1g Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure täglich. Beide Säuren sind in Fischöl enthalten (Kris-Etherton et al., 2003).

Auch im Rahmen der RA wurden klinische Studien zur Wirkung von Omega-3 Fettsäuren auf den Krankheitsverlauf durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Einnahme von Omega-3 Fettsäuren die Dauer der Morgensteifigkeit verkürzen, die Anzahl an geschwollenen Gelenken verringern (Kremer et al., 1985, van der Tempel et al., 1990, Nielsen et al., 1992) sowie die Einnahme von Nicht-Steroidalen Anti-Rheumatika (NSAD) reduzieren kann (Sköldstam et al., 1992, Lau et al., 1993). Auch inflammatorische Parameter wurden untersucht. Hier wurden verminderte Level des Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), produziert durch Neutrophile, (Kremer et al., 1987, Kremer et al., 1990) sowie verminderte Level an IL-1 $\beta$ , produziert durch Makrophagen (Kremer et al., 1990), nach regelmäßiger Einnahme von Omega-3 Fettsäuren festgestellt.

## **1.5. Resolveine**

Serhan et al. konnten 2000 erstmalig nachweisen, dass in entzündlichen Exsudaten von Mäusen, die mit mehrfach ungesättigten Omega-3 Fettsäuren sowie Aspirin therapiert wurden, neuartige Signalmoleküle aufzufinden waren. Die Produktion dieser Substanzen konnte auch in humanen Granulozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden. *In vitro* inhibieren sie die transendotheliale Migration und Infiltration von Granulozyten ins Gewebe (Serhan et al., 2000). Da diese neuartigen Signalmoleküle während der Auflösungsphase einer Entzündung endogen entstehen und zu dieser beitragen, wurden sie in späteren Publikationen als Resolveine (*resolution-phase interaction products*) bezeichnet (Serhan et al., 2002).

### **1.5.1. Resolvine: aktive, anti-entzündliche Mediatoren**

Im Allgemeinen bezeichnet eine Entzündung eine Immunantwort, die durch verschiedenste Noxen, Infektionen oder Verletzungen ausgelöst werden kann und versucht, die Homöostase im Körper wiederherzustellen. Dabei besteht die Immunantwort an sich aus vier verschiedenen Komponenten. Den Auslösern der Entzündung, Sensoren, Mediatoren und dem betroffenen Gewebe. Sind diese Komponenten im Gleichgewicht, besteht eine adäquate Immunantwort (Medzhitov, 2010). Eine Vielzahl von chronischen Erkrankungen, beispielsweise die RA, Atherosklerose oder Diabetes mellitus sind durch eine unkontrollierte, kontinuierliche Entzündung des Gewebes gekennzeichnet (Pradhan et al., 2001, McInnes and Schett, 2011, Libby, 2002).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Auflösung einer Entzündung einen passiven Prozess darstellt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass es sich vielmehr um einen aktiven, koordinierten Prozess handelt, der anti-entzündliche Mediatoren, sogenannte *pro-resolving mediators*, nötig macht. Zu diesen zählen unter anderem Lipoxine und Resolvine. Studien belegen, dass diese Mediatoren die Infiltration von Neutrophilen in entzündetes Gewebe vermindern können, die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen inhibieren sowie die nicht-entzündliche Phagozytose apoptotischer Zellen verstärken und auf diesem Weg aktiv zur Auflösung einer Entzündung beitragen (Serhan et al., 2002, Levy et al., 2001, Bannenberg et al., 2005). Eine bestehende, unkontrollierte Entzündung wie sie bei der RA auftritt, könnte so durch das Fehlen dieser Mediatoren begünstigt werden und eine Verbesserung der Entzündung bzw. Erkrankung durch Substitution möglich sein (Bannenberg et al., 2005, Serhan and Savill, 2005).

### **1.5.2. Synthese der Resolvine**

Zur näheren Erläuterung der Synthese von Resolvinen der Gruppe D und E und deren Wirkung im Körper wurde als Leitfaden das Modell von Serhan und Petasis verwendet (Serhan and Petasis, 2011).

## 1.5.3. Eicosapentaensäure

### 1.5.3.1. Synthese

Die mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA) bildet das Ausgangssubstrat für die Entstehung von Resolvinen der Gruppe E. Diese Resolvine können auf zwei Wegen entstehen. Entweder durch die von Aspirin acetylierte Cyclooxygenase-2 (COX-2) wie erstmals von Serhan et al. 2000 beschrieben oder durch die Cytochrome P450 Monooxygenase (CYP P450). Beide Enzyme sorgen für die Entstehung eines Zwischenprodukts *18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid* (18R-HEPE). Die 5-Lipoxygenase (5-LO), ein Enzym in Leukozyten, sorgt im Anschluss für die Entstehung der Resolvine. Durch Oxidierung und Hydrolyse an verschiedenen Stellen des Moleküls entstehen die Resolvine E1 und E2 (RvE1 und RvE2). Als Inhibitor der 5-LO wurde BW B70C identifiziert, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Jatana et al., 2006).

Sowohl COX-2 als auch CYP P450 konnten in Endothelzellen nachgewiesen werden. Auch eine in Bakterien nachgewiesene CYP P450 konnte aus EPA 18R-HEPE synthetisieren (Serhan et al., 2000, Arita et al., 2005b). Die exakte chemische Formel des RvE1 lautet 18R-trihydroxy6Z,8E,10E,14Z,16E-EPA (Arita et al., 2005a).

In der heutigen Medizin zählt Aspirin, neben dem hier verwendeten Nimesulide, zu den NSADs. Aspirin acetyliert eine Hydroxygruppe eines in der COX-2 enthaltenen Serins, wodurch es zu einer strukturellen Veränderung der Bindungsstelle und Enzymaktivität kommt und somit die Entstehung von Prostaglandinen verhindert wird. (Cashman and McNulty, 1995). Aus Arachidonsäure entsteht durch diese Strukturveränderung die Vorstufe der Lipoxine, *15R-hydroxy-eicosatetraenoic acid* (15R-HETE), aus EPA die Vorstufe der E-Resolvine 18R-HEPE und aus Docosahexaensäure die Vorstufe der D-Resolvine, *17R-hydroxy-docosahexaenoic acid* (17R-HDHA) (Arita et al., 2005b, Herschman, 1998, Cashman and McNulty, 1995). Während EPA als Omega-3 Fettsäure die Vorstufe zur Entstehung der E-Resolvine darstellt, ist auch 18(S)-HEPE ein Zwischenprodukt, das nach Oxidierung von EPA durch COX-2 oder CYP P450 entsteht (Serhan et al., 2000, Arita et al., 2005b). Studien konnten zeigen, dass nicht nur 18R-HEPE als Zwischenprodukt entsteht, sondern auch das Enantiomer 18(S)-HEPE (Oh et al., 2011). Eine weitere Resolvin Vorstufe 17(18)-EEQ entsteht aus EPA durch die Cytochrom P450 Epoxygenase (McDougle et al., 2017).

Experimentelle Studien am Mausmodell zeigen, dass bei einer Dosis von 100ng RvE1/ Maus die Infiltration von Leukozyten ins Gewebe um bis zu 50-70% reduziert werden kann. Der gleiche Versuchsaufbau ergab bei Dexamethason-Gabe eine Reduktion der Leukozyten Infiltration um bis zu 60%, in Kombination mit Aspirin um bis zu 70% (Arita et al., 2005a).

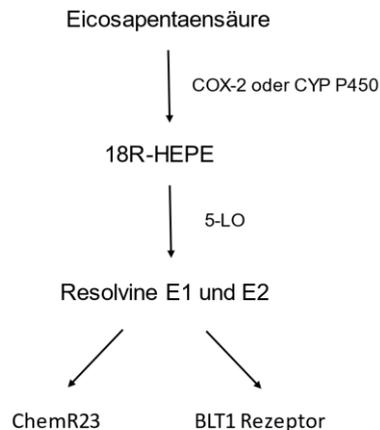
### **1.5.3.2. Rezeptoren**

Für die Wirkung des RvE1 im Körper wurden zwei verschiedene Rezeptoren identifiziert, der *chemokine like receptor 23* (ChemR23) sowie der Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptor (BLT1) (Arita et al., 2005a, Arita et al., 2007).

Der ChemR23 ist ein G-Protein gekoppelten Rezeptor. Während EPA und 18R-HEPE keine Wirkung an diesem Rezeptor zeigten, konnte durch RvE1 die TNF- $\alpha$  induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs inhibiert werden. ChemR23 ist unter anderem auf Monozyten, T-Lymphozyten, Gliomzellen, auf Zellen des Gehirns und der Leber (Arita et al., 2005a) sowie auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen vorzufinden (Samson et al., 1998). Der NF- $\kappa$ B Signalweg ist im Synovium von Patienten mit einer RA aktiviert und reguliert die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, beispielsweise IL-6 und IL-8, sowie von COX-2 und Metalloproteinasen (Han et al., 1998). Bei *in vivo* Behandlung mit RvE1 zeigte sich außerdem eine verminderte Ausschüttung von Interleukin 12, sowie eine verminderte Migration von Dendritischen Zellen in T-Zell Gebiete der Milz. (Arita et al., 2005a).

Als zweiter Rezeptor wurde der BLT1 Rezeptor, eigentlich ein Rezeptor für LTB<sub>4</sub>, identifiziert (Yokomizo et al., 1997). LTB<sub>4</sub> entsteht pro-inflammatorisch aus Arachidonsäure, ist unter anderem für die Diapedese von Leukozyten, insbesondere PMNs, in entzündetes Gewebe verantwortlich und findet sich daher insbesondere auf diesen Zellen (Samuelsson et al., 1987). Durch eine Bindung von RvE1 an diesen Rezeptor kann die durch LTB<sub>4</sub> induzierte Calciummobilisierung in humanen Leukozyten und die Wirkung auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg inhibiert (Arita et al., 2007) und somit die Diapedese vermindert werden (Samuelsson et al., 1987). Darüber hinaus ist

LTB<sub>4</sub> ein Chemokin für T-Zellen und stellt so eine Verknüpfung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar (Tager et al., 2003).



#### Abb. 1: Syntheseweg der E-Resolvine

Die Abbildung zeigt den Syntheseweg der aus Eicosapentaensäure entstehenden Resolvine E1 und E2 und deren Rezeptoren ChemR23 und BLT1. COX-2= Cyclooxygenase 2, CYP P450= Cytochrome P450 Monooxygenase, 18R-HEPE= *18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid*, 5-LO= 5-Lipoxygenase, ChemR23= *chemokine like receptor 23*, BLT1= LeukotrienB<sub>4</sub> Rezeptor.

### 1.5.4. Docosahexaensäure

#### 1.5.4.1. Synthese

Die zweite, mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäure, Docosahexaensäure (DHA) stellt das Ausgangssubstrat für die zweite Gruppe an Resolvinen, Resolvine der Gruppe D, dar.

Resolvine der Gruppe D entstehen ebenfalls auf zwei Wegen. Durch die 15-Lipoxygenase (15-LO) oder durch die von Aspirin acetylierte COX-2 bildet sich ein Zwischenprodukt, aus dem im weiteren Verlauf Resolvine der Gruppe D entstehen.

Die 15-LO ist in Leukozyten zu finden und wird verstärkt während der Auflösungsphase einer Entzündung aktiv (Levy et al., 2001). Sie wandelt DHA in das Zwischenprodukt 17S-hydroperoxy-docosahexaensäure (17S-HpDHA) um, das von auf PMNs exprimierter 5-LO weiter umgewandelt wird. Hierbei entstehen durch Oxidierung sowie Hydrolyse die 17S-Resolvine, Resolvine D1 bis D6. Die exakte Formel von Resolvin D1 (RvD1) lautet: *7S,8R,17S-trihydroxy4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid* (Hong et al., 2003, Sun et al., 2007).

Alternativ sorgt die von Aspirin acetylierte COX-2 für die Entstehung von 17R-Resolvinen. Hierzu bildet der Komplex aus DHA das Zwischenprodukt 17R-HDHA, vorzufinden in entzündlichen Exsudaten, Leukozyten oder neuronalen Zellen. Die 5-LO sorgt auch hier über Oxidierung und Hydrolyse für die Entstehung von Resolvinen der Gruppe D, die Resolvine D1 bis D4 (Serhan et al., 2002).

Experimentelle Studien zeigen die Wirkung von D-Resolvinen ebenfalls im Mausmodell. Bei einer Dosis zwischen 10 bis 100ng können D-Resolvine die Infiltration von PMNs in entzündetes Gewebe um bis zu 42% reduzieren. Sie sind damit in ihrer Wirkung genauso potent wie Indomethacin im gleichen Versuchsaufbau. Dies konnte die Infiltration von Neutrophilen um bis zu 40% reduzieren. Zusätzlich vermindern Resolvine die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen, insbesondere die durch TNF- $\alpha$  induzierte Bildung von IL-1 $\beta$  (Sun et al., 2007, Hong et al., 2003).

#### **1.5.4.2. Rezeptoren**

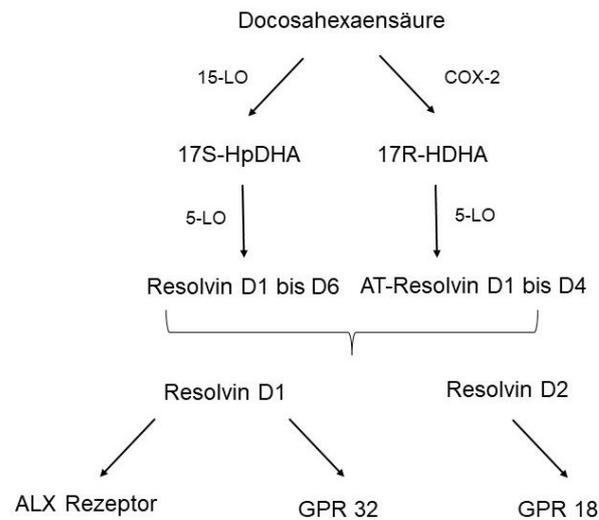
Zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden als spezifische Bindungsstelle für RvD1 identifiziert: der Lipoxin A<sub>4</sub> Rezeptor (ALX-Rezeptor), ursprünglich FPRL2 Rezeptor, sowie der G-Protein gekoppelte Rezeptor 32 (GPR 32) (Krishnamoorthy et al., 2010, Sodin-Semrl et al., 2000). Für das Resolvin D2 (RvD2) konnte ebenfalls ein Rezeptor identifiziert werden, der G-Protein gekoppelte Rezeptor 18 (GPR 18) (Chiang et al., 2015).

Die RNA des GPR32 konnte in arteriellem und venösem Gewebe sowie in PMNs, Monozyten und Makrophagen identifiziert werden. Über ihn kann die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen verstärkt werden. Durch die Bindung von RvD1 an diesen Rezeptor, können Resolvine ebenfalls aktiv diesen Prozess beeinflussen (Krishnamoorthy et al., 2010).

Der ALX Rezeptor, ebenfalls ein Lipoxin A<sub>4</sub> Rezeptor, ist auf verschiedenen Zellen vorhanden. Auf PMNs vermindert er die Migration der Zellen in entzündetes Gewebe, über Makrophagen verstärkt er die Phagozytose von apoptotischen Zellen und über seine Wirkung an Epithelzellen vermindert er die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, beispielsweise IL-8 (Chiang et al., 2006). In Fibroblasten kommt ihm eine besondere Bedeutung in Bezug auf die RA zu. Lipoxin A<sub>4</sub> inhibiert über diesen Rezeptor die IL-1 $\beta$  abhängige Ausschüttung von IL-6, MMP-1 und MMP-3. Über seine Wirkung an diesem Rezeptor kann auch RvD1 die Ausschüttung dieser Zytokine vermindern (Sodin-Semrl et al., 2000). Besonders die Abnahme von IL-6

durch Lipoxin A<sub>4</sub> oder RvD1 ist hierfür von besonderer Bedeutung. Erhöhte IL-6 Serumspiegel wurden unter anderem im Synovium von Patienten mit einer diagnostizierten RA festgestellt (Okamoto et al., 1997). Auch experimentelle Studien messen einer IL-6 Erhöhung einen pathogenen Effekt bei. So konnte gezeigt werden, dass eine funktionierende IL-6 Produktion essentiell für die Entstehung einer Kollagen-II induzierten Arthritis in Mäusen ist (Alonzi et al., 1998), dementsprechend eine Inhibierung bzw. Verminderung der IL-6 Ausschüttung die Progression einer RA verlangsamen kann. Es zeigt sich, dass RvD1 durch die Bindung an zwei Rezeptoren und somit an verschiedensten Zelltypen, umfangreich in das Entzündungsgeschehen eingreifen kann.

Auch RvD2 moduliert auf ähnliche Weise die Entzündung. Im experimentellen Mausmodell zeigte sich eine Verminderung der Leukozytenzahl und eine begleitende Reduktion der Infiltration von PMNs ins entzündete Peritoneum der Mäuse nach Gabe von RvD2. Zusätzlich reduziert RvD2 die Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 $\beta$ , Interleukin-23 oder TNF- $\alpha$  (Spite et al., 2009). Auch konnte gezeigt werden, dass eine periphere oder zentrale Gabe von RvD2 den sogenannten „Entzündungsschmerz“ in Gelenken bei Patienten reduzieren kann (Park et al., 2011). Der für die Wirkung des RvD2 verantwortliche Rezeptor ist der GPR 18. Er findet sich auf im peripheren Blut vorkommenden PMNs, Monozyten und Makrophagen. Über die spezifische Bindung von RvD2 und GPR 18 kann auf diese Weise die Auflösung einer Entzündungsreaktion beschleunigt werden (Chiang et al., 2015).



### Abb. 2: Syntheseweg der D-Resolvine

Die Abbildung zeigt den Syntheseweg der aus Docosahexaensäure entstehenden D-Resolvine. Der linksseitige Weg zeigt die Entstehung bei Umwandlung durch die 15-LO im ersten Schritt, während im rechtsseitigen Weg die durch Aspirin acetylierte COX-2 zur Entstehung von Aspirin getriggerten Resolvinen (AT-Resolvine) führt. Für das Resolvin D1 wurden der ALX Rezeptor und GPR 32 als Bindungsstelle identifiziert, der GPR 18 als Bindungsstelle für das Resolvin D2. 15-LO= 15-Lipoxygenase, COX-2= Cyclooxygenase-2, 17S-HpDHA= 17S-hydroperoxy-docosahexaensäure, 17R-HDHA= 17R-hydroxy-docosahexaenoic acid. 5-LO= 5-Lipoxygenase, ALX Rezeptor= Lipoxin A<sub>4</sub> Rezeptor, GPR 32= G-Protein gekoppelter Rezeptor 32, GPR 18= G-Protein gekoppelter Rezeptor 18

## 1.6. Ziele der Arbeit

Die Pathophysiologie der RA ist in den letzten Jahren vielfältig untersucht worden. Es wurde nachgewiesen, dass insbesondere SF, durch eine verstärkte Expression von Zytokinen und ihre destruirenden Eigenschaften, eine entscheidende Rolle in Entstehung und Progression der Erkrankung darstellen (Lafyatis et al., 1989, Pierer et al., 2004, Huber et al., 2006). Auch Omega-3 Fettsäuren wurden aufgrund ihrer in klinischen Studien nachgewiesenen positiven Effekte auf eine symptomatische RA näher untersucht. Die Entdeckung der Resolvine und ihrer Rezeptoren sowie Enzyme könnte neue Ansätze im Hinblick auf die Entstehung und Therapie einer RA darstellen (Kremer et al., 1985, Serhan et al., 2000). Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des Resolvin-Systems in SF. Dabei sollte zunächst der Rezeptorbesatz und dessen Regulation und anschließend die Synthesewege und Wirkung von Resolvinen auf SF untersucht werden.

Die beschriebenen Rezeptoren und die für die Entstehung notwendigen Enzyme sollten sowohl mittels eines Western Blots als auch durch Immunfluoreszenz und -zytochemie in bzw. auf SF dargestellt werden. Darüber hinaus wurde geprüft, ob eine Stimulation der Zellen durch TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) oder IL-1 $\beta$  die Expressionsmenge der Rezeptoren/Enzyme verändert. Zusätzlich wurde die Wirkung von Omega-3 Fettsäuren und einzelner Zwischenstufen auf die Zytokinausschüttung der Fibroblasten mittels eines ELISA untersucht. Untersuchte Zytokine waren hier IL-6, IL-8 sowie MMP-3.

Die aufgeführten Ergebnisse beziehen sich sowohl auf die im Rahmen einer aktiven RA gewonnenen Ergebnisse als auch auf vergleichende Untersuchungen von Patienten mit einer OA.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden humane synoviale Fibroblasten genutzt. Diese Fibroblasten wurden aus Gewebe, welches von Patienten während einer elektiven Kniegelenkersatzoperation gewonnen wurde, isoliert. Teile des Gewebes wurde für das spätere Anfertigen von Gefrierschnitten für die Immunfluoreszenz eingefroren. Die Patienten waren über die Verwendung der Zellen aufgeklärt und hatten zuvor ihr schriftliches Einverständnis gegeben (Referenznummer Ethikvoten: 4944, 2018-296-KFogU, 2018-87-KFogU). Es wurden sowohl Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis als auch Zellen von Patienten mit Osteoarthritis, als Vergleichsgruppe, genutzt.

### 2.2. Zellkultivierung

Die gewonnenen Zellen wurden bei  $-196$  Grad Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut. Es erfolgte das Aussähen von Zellen in Zellkultur Flaschen und die Inkubation im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5% Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ). Die ausgesäten Zellen wurden in Nährmedium (RPMI 1640 Nährmedium (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 10% FBS (*Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated, gibico® by life technologies™*, Carlsbad, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml), ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), 1% GlutaMAX (GlutaMAX™- I (100X), ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), 2,5% HEPES-Puffer (HEPES solution 1M, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)), im Folgenden als 10% Medium bezeichnet, kultiviert und bei einer Konfluenz von 80% passagiert. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte zweimal wöchentlich. Eine Passagierung der Zellen war im Regelfall alle ein bis zwei Wochen nötig. Hierzu wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen und 10 Milliliter (ml) Trypsin (Trypsin-EDTA Solution (10x), Sigma-Aldrich, USA), verdünnt 1:10 in PBS, in die Flaschen gegeben. Die Flaschen wurden 10 Minuten (min) im Brutschrank inkubiert und das erfolgreiche Ablösen der Zellen im Auflichtmikroskop kontrolliert. Daraufhin erfolgte die Hinzugabe von 10ml 10% Medium, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, und das Überführen in ein Falcon®-Tube. Die Zellen wurden im Anschluss

bei 18°C für 10 min mit 350 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10% Nährmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Für die spätere Nutzung der Zellkulturüberstände im ELISA wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren in 2% Medium (RPMI 1640 Nährmedium mit 2% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% GlutaMAX, 2,5% Hepes-Puffer) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zellzahlbestimmung elektronisch oder mittels einer Neubauer Zählkammer. Die Arbeit in der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen.

## **2.3. Stimulationen**

### **2.3.1. Stimulationen Western Blot**

Die für den Western Blot genutzten Fibroblasten wurden in 60x15mm Petrischalen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Pro Stimulationsbedingung wurde dabei eine Schale verwendet. Die Stimulation der Zellen erfolgte in Medium mit reduziertem FBS Gehalt (2%), um mögliche Veränderungen der Proliferation unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu minimieren. Die fünf Stimulationsbedingungen setzten sich zusammen aus einer Kontrollgruppe, einer Stimulation mit 10 Nanogramm (ng)/ml Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (*Recombinant Human TNF- $\alpha$* , PeproTech, Rocky Hill, USA), einer Stimulation mit 10ng/ml Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (*Recombinant Human IFN*, PeproTech, Rocky Hill, USA), einer Stimulation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$  und 10ng/ml IFN- $\gamma$  sowie einer Stimulation mit 10ng/ml Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (*Recombinant Human IL-1 $\beta$* , PeproTech, Rocky Hill, USA). Nach dreitägiger Inkubationszeit startete die Proteingewinnung aus den Fibroblasten.

### **2.3.2. Stimulationen ELISA**

Für die Stimulation der Fibroblasten mit Vorstufen von Resolvinen wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche mit einer Zellzahl von 5000 Zellen pro *Well* in eine 96-*Well*-Platte ausgesät. Um Verdunstungen zu verhindern, wurden die äußeren *Wells* der Platte mit Aqua dest. gefüllt, aber nicht für die Stimulation genutzt. Nach Aussäen in 96-*Well*-Platten wurden die Zellen 72h im Brutschrank inkubiert. Um eine Steigerung der GPR 18 Menge und eine vermeintlich höhere Suszeptibilität gegenüber Resolvinen zu bewirken, erfolgte im Anschluss die Stimulation der Zellen mit 10ng/ml INF- $\gamma$  in 2% Medium und die erneute Inkubation für 72h im Brutschrank. Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Fibroblasten mit Resolvinen und 10ng/ml TNF- $\alpha$ . Nach einer

Inkubationszeit von 20h wurden die Überstände auf eine separate 96-Well Platte überführt und bei -20°C eingefroren.

Verwendete Resolvinvorstufen bzw. Omega-3 Fettsäure waren:

- EPA in den Konzentrationen EPA  $10^{-5}$ Molar (M),  $10^{-6}$ M und  $10^{-7}$ M
- 17(18)-EEQ in den Konzentrationen 17(18)-EEQ  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M und  $10^{-7}$ M
- 18(S)-HEPE in den Konzentrationen 18(S)-HEPE  $10^{-5}$ M und  $10^{-6}$ M
- 18R-HEPE in den Konzentrationen 18R-HEPE  $10^{-5}$ M und  $10^{-6}$ M
- Rac19-HEPE  $10^{-5}$ M

Die Vorstufen der Resolvine und die Omega-3 Fettsäure EPA, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) (*Dimethyl sulfoxid*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Nils-Helge Schebb, Leiter des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität Wuppertal.

Insgesamt wurden die einzelnen Substanzen unter drei verschiedenen Stimulationsbedingungen getestet. Die Fibroblasten wurden neben einer Stimulation mit TNF- $\alpha$  auch zusätzlich mit jeweils 1 Mikromolar ( $\mu$ M) Nimesulid (*Nimesulid*, abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich), gelöst in DMSO, oder 2 $\mu$ M BW B70C (BW B70C, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), gelöst in DMSO, stimuliert. Es wurden jeweils Triplikate einer Stimulationsbedingung erzeugt. Ebenso gab es eine Kontrollgruppe ohne Hinzugabe der Stimulationsprodukte, Nimesulid oder BW B70C.

## 2.4. Antikörper (AK)

	Antikörper	Western Blot	Immun-fluoreszenz	Immunzyto-chemie	Her-steller
Primärer AK	Anti-GPCR GPR 18 <i>antibody</i> [EPR12359], ab174835	1:2500 in TBS-T (=0,4µg/ml)			Abcam
Primärer AK	Anti-GPCR GPR 18 <i>antibody</i> , ab76258		10/5/2,5 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% <i>Goat Serum</i>	5 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Abcam
Primärer AK	Anti-PCR GPR 32 <i>antibody- N-terminal</i> , ab153989	1:1500 in TBS-T (=0,67µg/ml)	10/2/1 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% <i>Goat Serum</i>	5 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Abcam
Primärer AK	Anti-5 Lipoxygenase [EP6072(2)], ab169755		13/11/6,65 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% <i>Goat Serum</i>	6,55 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Abcam
Primärer AK	Anti-FPRL1 <i>antibody</i> , ab63022	1:5000 in TBS-T (=0,2µg/ml)	10/2/1 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% <i>Goat Serum</i>	2 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Abcam
Primärer AK	Anti-5-oxo-ETE GPCR <i>antibody</i> , ab115032	1:3000 in TBS-T (=0,17µg/ml)			Abcam
Primärer AK	Anti-15 Lipoxygenase 1 <i>antibody</i> , ab80221	1:3000 in TBS-T (=0,17µg/ml)	5/2,5 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% <i>Goat Serum</i>	5 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Abcam
Primärer AK	Anti-12 Lipoxygenase <i>antibody</i> [EPR11380(B)], ab168384	1:5000 in TBS-T (=0,26µg/ml)			Abcam
Primärer AK	Anti-Leukotriene B4 Receptor <i>antibody</i> [EPR7113], ab131041	1:25 000 in TBS-T (=0,0019µg/ml)			Abcam
Primärer AK	Anti-CMKLR1 <i>antibody</i> , ab82773	1:2000 in TBS-T (=0,5µg/ml)			Abcam
Beladungs-kontrolle	Anti-Cyclophilin B <i>antibody</i> [EPR12703(B)], ab178397	1:5000 in TBS-T (=0,18µg/ml)			Abcam
Sekundärer AK	<i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulines/H</i> RP, P0448	1:2000 in 5%Milch/TBS-T			Aglient/ Dako,
Sekundärer AK	<i>Donkey Anti-Goat IgG H&amp;L (HRP)</i> , ab97110	1:10000 in 5% Milch/TBS-T			Abcam
Isotyp polyklonal	<i>Rabbit IgG Isotyp Control</i> , 02 - 6102		10/5/2,5 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% <i>Goat Serum</i>	5 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Thermo Fisher Scientific

Isotyp monoklonal	<i>Rabbit IgG, monoklonal [EPR25A] - Isotyp Control, ab172730</i>		13/17/ 6,58 µg/ml in PBS+ 0,3% Triton+ 2% Goat Serum	6,584 µg/ml in Casein + 0,1% Triton	Abcam
Sekundärer AK	<i>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594, A- 11037</i>		1:1500 in PBS+ 2% Goat Serum	1:1000 in PBS	Thermo Fisher Scientific

### Tabelle 1: Antikörper

Die Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper mit entsprechender Verdünnung und Herstellerangaben. Für den Anti-5-oxo-ETE GPCR AK wurde der *Donkey Anti-Goat IgG H&L (HRP)* AK als sekundärer AK genutzt. Für alle restlichen primären AK, inklusive der Beladungskontrolle, wurde der *Polyclonal Goat Anti-Rabbit* AK als sekundärer AK im Western Blot genutzt.

In der Immunfluoreszenz und Immunzytochemie richtet sich die Konzentration der Isotypen jeweils nach der höchsten Konzentration des verwendeten AK. Für den Anti-5 LO AK wurde der monoklonale Isotyp verwendet. Für alle restlichen AK galt der polyklonale Isotyp

Herstellerangaben:

Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Aglient/Dako, Santa Clara, USA

ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

AK= Antikörper, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter, GPR18= G-Protein gekoppelter Rezeptor 18, GPR 32= G-Protein gekoppelter Rezeptor 32

## 2.5. Western Blot

### 2.5.1. Proteingewinnung

Zunächst erfolgte die Herstellung des Zellyse-Puffers (*Radioimmunprecipitation Assay (RIPA) (RIPA-Buffer, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)* mit 1% PIC (*Proteinase Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)) auf Eis. In diesem Puffer wurden die später gewonnenen Zellen lysiert. Zu jeder Probe wurden 250 Mikroliter (µl) Zellyse-Puffer hinzugegeben. Die Fibroblasten wurden vom Boden der Petrischale durch eine Mischung aus Accutase (StemPro Accutase, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) und PBS im Verhältnis 1:1 abgelöst (4ml insgesamt). Die Schalen wurden 10min im Brutschrank inkubiert und die erfolgreiche Ablösung im Auflichtmikroskop kontrolliert. Danach erfolgte die Überführung der Suspension in 15ml Falcon®-Tubes. Anschließend wurden die Fibroblasten bei 4°C für 10min mit 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1ml PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Dann wurde die Suspension in ein Eppendorf-Tube

überführt, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet anschließend in 250µl Zelllyse-Puffer auf Eis resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden, zum Aufbrechen der Zellstruktur, in flüssigen Stickstoff (Stickstoff flüssig, Linde plc, Dublin, Irland) gegeben und im Anschluss auf Eis aufgetaut. Im letzten Schritt wurden die Zellen erneut bei 4°C für 10min mit 10000g zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-*Tube* überführt und bei -80 °C eingefroren, bis er zur Proteinquantifizierung oder für den Western Blot weiter genutzt wurde.

### **2.5.2. Proteinquantifizierung**

Um gleiche Proteinmengen beim Gelauftrag zu gewährleisten, wurde in allen Proben die Proteinkonzentration bestimmt. Die Durchführung der Proteinquantifizierung geschah in Duplikaten mittels Roti®-Quant universal (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in 96-*Well* Platten.

Zu Beginn wurden die Standardlösungen (BSA von 0 bis 0.75 mg/ml in H<sub>2</sub>O) und die zuvor gewonnenen Proteinlysate auf Eis aufgetaut. Pro *Well* wurde eine Menge von 50µl Probenlösung oder Standard zugegeben. Jede verwendete Standardlösung und jedes Proteinlysate wurde zusätzlich 1:10 mit Aqua dest. (Aqua dest., Ampuwa® Spüllösung 1000ml Plastipur, Fresenius Kabi, Bad Homburg von der Höhe, Deutschland) verdünnt. Nach Pipettieren der Substrate oder des Standards, wurde die Arbeitslösung (Reagenz 1 (15 Teile) und Reagenz 2 (1 Teil), 100µl/Well) hinzugegeben. Danach wurde die Platte bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Nach 30min erfolgte der Stopp des Vorgangs durch das Herunterkühlen der Platte auf Raumtemperatur (RT). Das Auslesen der Platten erfolgte innerhalb von 15min nach Reaktionsstopp durch einen *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad, Hercules, USA) bei einer Wellenlänge von 490 Nanometer (nm). Mit der *Microplate Manager® Software* wurden im Anschluss die Absorptionswerte anhand einer 4-Punkte Kurve in Proteinkonzentrationen (mg/ml) konvertiert.

## 2.5.3. Vorbereitung der Polyacrylamid-Gele

### 2.5.3.1. Materialien

Deckplatte	Mini-PROTEAN® <i>Short Plates</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Platte	Mini-PROTEAN® <i>Spacer Plates with 1.0mm Integrated Spacers</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Kamm	Mini-PROTEAN® <i>Comb, 10-well, 1,0mm</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Gießvorrichtung	Mini-PROTEAN® <i>Tetra Cell Casting Stand &amp; Clamps</i> , Bio-Rad, Hercules, USA

### 2.5.3.2. Aufbau und Ablauf

Die im Western Blot verwendeten Gele wurden selbst gegossen. Hierzu wurden Platte und Deckplatte durch etwas Wasser aneinander befestigt und im Anschluss in die entsprechende Gießvorrichtung geklemmt.

Die verwendeten Gele bestanden aus einem 12,5% Trenngel und einem 5% Sammelgel.

Trenngel:	<u>5ml</u> Trisaminomethan (TRIS) 1,5 M, pH 8,8 (Trizma®base, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Einstellung des pH-Wertes durch HCL (Salzsäure rauchend 37%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) <u>6,7ml</u> Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Acrylamid, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) <u>0,2ml</u> SDS 10% ( <i>Sodium dodecyl sulfat solution 10% in H<sub>2</sub>O</i> , Sigma Aldrich, St. Louis, USA) <u>6,22ml</u> Aqua dest. <u>0,2ml</u> APS 100mg/ml ( <i>Ammonium Persulfate</i> , Bio-Rad, Hercules, USA) <u>0,08ml</u> TEMED (TEMED, Bio-Rad, Hercules, USA)
-----------	---

Die Zugabe von APS erfolgte als Letztes, um eine vorzeitige Polymerisierung des Gels zu verhindern.

Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen, sodass noch 2,5 Zentimeter (cm) Platz für das Sammelgel blieben. Das Gel wurde mit Isopropanol

(Isopropanol 99+%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) überschichtet, um eine glatte Kante zu erhalten und Austrocknung zu minimieren. Nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, die Sammelgellösung zugegeben und der Kamm eingebracht.

Sammelgel:

- 1ml TRIS (1,5M), pH 6,8
- 1,3ml Acrylamid 30%
- 0,16ml SDS 10%
- 5,38ml Aqua dest.
- 0,08ml APS 100mg/ml
- 0,08ml TEMED

Das Sammelgel polymerisierte ebenfalls für 30min. Die gegossenen Gele wurden in feuchten Tüchern bis zu einer Woche im Kühlschrank gelagert.

## 2.5.4. Gelelektrophorese

### 2.5.4.1. Materialien

Elektrophorese Vorrichtung	Mini-PROTEAN® <i>Tetra Cell</i> , Bio Rad, Hercules, USA
Einspannvorrichtung Gele	Mini-PROTEAN® <i>Tetra Electrode Assembly</i> , Bio-Rad, Hercules, USA

### 2.5.4.2. Aufbau und Ablauf

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde der benötigte Laufpuffer (10x *Tris/Glycin/SDS eletrophoresis running buffer*, Bio-Rad, Hercules, USA) 1:10 mit vollentsalztem Wasser (V.E. Wasser) verdünnt. Im Anschluss wurden die Glasplatten, mit den zuvor gegossenen Gelen, in die Einspannvorrichtung eingespannt und mit Laufpuffer gefüllt. Die Kämmen wurden gezogen und die vorbereiteten Proben in die Taschen eingebracht.

Vor dem Auftrag wurden sowohl die Standardlösung als auch alle Proteinproben 5min bei 95°C denaturiert. Pro Tasche wurden 5µg Protein aufgetragen. Die entsprechende Proteinmenge wurde auf 20 µl Gesamtvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt wobei jeweils ¼ der Gesamtmenge aus Roti®-Load (Roti®-Load 1 reduzierend, 4x konzentriert, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) bestand. Die erste Kammer wurde mit einer Proteinstandard Lösung beladen (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*,

ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Die Einspannvorrichtung wurde in die Elektrophorese Vorrichtung gesetzt und alles mit Laufpuffer gefüllt. In der Einlaufphase lag die Spannung 10-20min bei 10-15 Milliampere (mA) (konstant) pro Gel. Danach wurde die Spannung für 30-50min auf 25-30mA pro Gel erhöht. Im Verlauf wurde die durch Roti®-Load sichtbar gemachte Lauffront beobachtet. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreichte, war die Gelelektrophorese beendet.

## **2.5.5. Western Blot und Proteinvisualisierung**

### **2.5.5.1. Materialien**

Haltevorrichtung	<i>Mini Gel Holder Cassette</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Blotting Schwämme	<i>Foam Pads for Mini Trans-Blot® Cell</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Blotting Membran	<i>Nitrocellulose Membranes 0.2 µm</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Blotting Papier	<i>Whatman® Chromatography Paper</i> , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Blotting Vorrichtung	<i>Mini Trans-Blot Central Core</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Kühlakku	<i>Blue Cooling Unit</i> , Bio Rad, Hercules, USA
Gel Ablöser	<i>Mini-PROTEAN® Gel releasers</i> , Bio-Rad, Hercules, USA

### **2.5.5.2. Aufbau und Ablauf**

Nach erfolgreicher Elektrophorese wurde das Trenngel von den Glasplatten gelöst und vom Sammelgel getrennt. Im Anschluss erfolgte die Vorbereitung der Blotting Kassetten. In diese wurde ein Blotting Schwamm, 3x Blotting Papier, eine Blotting Membran, das Trenngel, 3x Blotting Papier und ein Blotting Schwamm aufeinandergelegt und in die Kassette eingelegt. Die Kassetten wurden anschließend in das Blotting Modul eingesetzt und in die Pufferkammer gesteckt. Diese wurde anschließend mit gekühltem Blottingpuffer (100ml Blottingpuffer (10x), 200ml Methanol (Emsure® Methanol for analysis, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 700ml V.E. Wasser) aufgefüllt.

Der 10x Blotting-Puffer wurde aus 30,285 Gramm (g) Tris-Base (0,25M) und 144,1344g Glycin (1,92 M) (*Glycin for electrophoresis*, >99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hergestellt und mit V.E. Wasser auf 1l aufgefüllt. Während des gesamten Blottingvorgangs wurde der Puffer gekühlt. Das Blotting erfolgte bei 300mA (konstant) für 1,5 Stunden (h). Nach Beendigung wurde die Membran aus der Blotting Kassette entfernt und zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers mit Ponceau (Ponceau S, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Anschließend wurde die Membran 3x5min mit Waschpuffer (10x: 60,57g Tris-Base (0,5 M) und 87,66g NaCl (1,5 M) (*Emsure® Sodium chloride for analysis*, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, 1% Tween (Tween®20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Unspezifische Bindungen in der Membran wurden durch die einstündige Zugabe bei RT von 5% Milch (*Blotting-Grad Blocker, nonfat dry milk for western blotting applications*, Bio-Rad, Hercules, USA) in Waschpuffer blockiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut 3x5min gewaschen und dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (s. Tabelle 1). Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (s. Tabelle 1) für 2h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran abgedunkelt für 1min in ECL-Lösung (*Clarity™ Western ECL Substrat*, Bio-Rad, Hercules, USA) entwickelt. Mittels *ChemiDoc™ Touch Imaging System* (Bio-Rad, Hercules, USA) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Entwicklung der Proteinbanden erfolgte unter der Einstellung *chemoluminescence* bei einer Belichtungszeit von 3-90s und die Entwicklung des Standards unter *colormetric*.

### **2.5.6. Auswertung**

Die Bestimmung der Bandenintensitäten auf der Membran erfolgte mittels *Image Lab™ Software* (Bio-Rad, Hercules, USA). Wichtig für die weitere Auswertung der Banden war die Nutzung einer Beladungskontrolle bzw. eines *Housekeeper*-Proteins. Dabei handelt es sich um ein nicht-reguliertes hochexprimiertes Protein wie Actin oder GAPDH, welches wie die untersuchten Proteine über einen primären Antikörper detektiert und entsprechend ausgewertet wird. In den in dieser Arbeit gezeigten Auswertungen wurde die Intensität der Bande der Beladungskontrolle durch die entsprechende Intensität der Bande des zu untersuchenden Proteins geteilt. Der entstandene Quotient stellte die Intensität der Bande vergleichbarer dar, da Schwankungen im Proteinauftrag so minimiert wurden und durch den *Housekeeper*

ein Referenzpunkt für alle untersuchten Stimulationsbedingungen geschaffen wurde. Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse in Bezug zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierzu wurde der Wert der Kontrollgruppe als 100% festgehalten und die restlichen Bandenintensitäten darauf bezogen. Die prozentuale Veränderung der Bandenstärken gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle geben Aufschluss über die Veränderung der Expression des untersuchten Rezeptors bei Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder IL-1 $\beta$ .

## 2.6. Fluoreszierende Verfahren

### 2.6.1. Immunfluoreszenz

#### 2.6.1.1. Materialien

Objektträger	<i>SuperFrost® Plus</i> Objektträger, VWR International, Radnor, USA
Wachsstift	<i>Super PAP Pen</i> , Invitrogen, Carlsbad, USA
Feuchte Kammer	<i>Humidity Chamber</i> , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deckgläser	<i>Cover Slips</i> , Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Glasküvette	OPTICYT® Fixationsgefäß, Frankfurt am Main, Deutschland

#### 2.6.1.2. Aufbau und Ablauf

Die Kniegelenkspräparate wurden im gekühlten Kryostaten auf 0,5 Millimeter (mm) Dicke geschnitten, auf Objektträgern aufgelegt und mit einem Wachsstift umkreist. Die Gewebefixierung und Dehydrierung erfolgte mittels 3% Paraformaldehyd (PFA) Lösung und Ethanol. Zur Herstellung der 3% PFA-Lösung wurden 225ml Aqua dest. auf 60°C erhitzt und mit 7,5g PFA (*Paraform-Aldehyde*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gemischt. Nun wurde, bis die Flüssigkeit wieder klar wurde, Natronlauge (*Sodium hydroxide*/ Natronlauge 5mol/l, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die Hinzugabe von 25ml PBS (PBS pH 7,4 (10x), gibico® by life technologies™, Carlsbad, USA) und das Herunterkühlen der Lösung auf RT. Nun wurde der pH-Wert der Lösung gemessen und bis zu Erreichen eines pH-Wertes von 7 rauchende Salzsäure (Salzsäure rauchend 37%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben.

Die Fixierung erfolgte für 10min in der zuvor hergestellten 3% PFA-Lösung. Danach wurden die Objektträger 10min in PBS, 1:10 verdünnt in Aqua dest., gewaschen. Bei sofortiger Nutzung der fixierten Schnitte erfolgte keine Dehydrierung der Präparate. Ansonsten wurden die Präparate für jeweils 2 min in 70% Ethanol, dann 80% Ethanol und im Anschluss in 95% Ethanol dehydriert. Die entsprechenden Ethanollösungen wurde jeweils aus 100% Ethanol (*Ethanol 99,5%, denatured with 1% MEK*, VWR Chemicals, Radnor, USA) hergestellt und mit V.E. Wasser verdünnt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Vorbereitung für das eigentliche Anfärben der Zielproteine in den Zellen. Zuvor dehydrierte Präparate wurden 2x10min in PBS rehydriert. Die nicht dehydrierten Präparate wurden zeitgleich hydriert. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger mit den einzelnen Schnitten für 1h mit PBS, 0,3% Triton (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 2% *Goat Serum* (*Goat Serum Normal*, Aglient/Dako, Santa Clara, USA) bei 4°C geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern (s. Tabelle 1) bei 4°C über Nacht. Pro Schnitt wurde ein Antikörper verwendet. Im Anschluss wurden die Objektträger in PBS mit 0,3% Triton für 3x10min unter Schütteln bei 15rpm gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s. Tabelle 1) erfolgte dann für 2h bei RT im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen der Objektträger für 3x10min wurden die gewaschenen Objektträger mit ProLong Gold (*ProLong™ Gold antifade reagent with Dapi*, Invitrogen, Carlsbad, USA) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Es erfolgte das Trocknen der Objektträger über Nacht bei RT. Danach wurden die Objektträger bei 4°C gelagert.

## **2.6.2. Immunzytochemie**

### **2.6.2.1. Materialien**

Objektträger	<i>Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ System, 8 Wells, Permax® Slide</i> , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deckgläser	<i>Cover Slips</i> , Engelbrecht, Edermünde, Deutschland

### 2.6.2.2. Aufbau und Ablauf

Für die durchgeführte Immunzytofluoreszenz wurden jeweils 5000 Zellen pro Kammer in 10% Medium auf den 8 Kammer-Objektträgern ausgesät. Die Zellen wurden zum Anheften über Nacht im Brutschrank inkubiert und nach 1-3 Tagen (d) (je nach Zelldichte) wurde auf ein Medium mit 2% FCS (2% Medium) gewechselt, um die Proliferation zu minimieren. Eine Kammer pro Objektträger wurde mit 10ng/ml INF- $\gamma$  stimuliert und 72h inkubiert. Die Zellen wurden mit 3,7% Formalin (*Formaldehyde solution, ACS reagent, 37wt % in H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) verdünnt 1:10 in H<sub>2</sub>O für 20min fixiert. Im Anschluss erfolgte entweder die Dehydrierung mit 100% Methanol für 20min bei 4°C oder die direkte Weiterverarbeitung. Im Folgenden wurden die fixierten Objektträger einmalig mit Waschpuffer (PBS mit 0,1% Triton) gewaschen. Das Blocken der Objektträger erfolgte eine Stunde durch Zugabe von Elisa Casein (*Phosphate Buffered Saline (PBS) Casein Elisa Reagent, abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich*) mit 0,1% Triton gelöst in V.E. Wasser. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper (s. Tabelle 1), verdünnt in oben genanntem Block Puffer, für 2h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s. Tabelle 1) für 1,5h bei RT im Dunkeln. Danach wurden die Objektträger für 3x5min in PBS gewaschen und mit ProlongGold eingedeckt. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT getrocknet und im Anschluss im Kühlschrank gelagert.

### 2.6.3. Auswertung

Die Mikroskopie der Objektträger erfolgte durch das Axioskop 2 plus Mikroskop. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung und anschließender Belichtung von 2 Millisekunden (ms). Zur Darstellung des an den primären Antikörper gekoppelten, fluoreszierenden sekundären Antikörpers, wurde der Objektträger im Anschluss für 67ms belichtet. Ein *Overlay* der Bilder wurde mittels *Image J<sup>TM</sup>* erstellt. Die Einstellung des Kontrastes erfolgte mit einem *gain* von +20. Die Helligkeit der Bilder wurde nicht verändert. Es erfolgte zusätzliche eine automatische Tonwertkontrolle. Die Bilder der durch die Antikörper markierten Zellstrukturen wurden mit denen der Isotypen in gleicher Konzentration verglichen.

## 2.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ob eine Stimulation von Fibroblasten mit Vorstufen der Resolvine oder der Omega-3 Fettsäure EPA eine Veränderung in deren Zytokinausschüttung bewirkt, sollte durch einen ELISA festgestellt werden. Untersucht wurde die Ausschüttung von IL-6, IL-8 und MMP-3.

Die Durchführung des IL-6 ELISA (*Human IL-6 Elisa Set*, BD OptEIA™, Franklin Lakes, USA), des IL-8 ELISA (*Human IL-6 Elisa Set*, BD OptEIA™, Franklin Lakes, USA) sowie des MMP-3 ELISA (*DuoSet® Human Total MMP-3, Research and Diagnostic Systems, Inc.*, Minneapolis, USA) erfolgte nach Herstelleranweisungen.

### 2.7.1. Materialien

<i>Coating-Puffer</i>	<u>IL-6 &amp; IL-8 ELISA</u> <i>Carbonate-Bicarbonate Buffer</i> , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA 1 Kapsel auf 100ml V.E. Wasser <u>MMP-3 ELISA</u> <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Coating-Antikörper</i>	Enthalten im entsprechenden ELISA Set <u>IL-6 &amp; IL-8 ELISA</u> Verdünnt 1:300 in <i>Coating-Puffer</i> <u>MMP-3 ELISA</u> Verdünnt 1:180 in <i>Coating-Puffer</i>
<i>Block-Lösung</i>	<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) Casein Elisa Reagent</i> , abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich Verdünnt 1:5 in V.E. Wasser
<i>Waschpuffer</i>	PBS mit 0,05% Tween
<i>Standard</i>	Enthalten im entsprechenden ELISA Set Nach Herstellerangaben verdünnt
<i>Detection-Antikörper</i>	Enthalten im entsprechenden ELISA Set
<i>Enzym Reagent</i>	Enthalten im entsprechenden ELISA Set

*Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*  
(SAv-HRP)

#### MMP-3 ELISA

Verdünnt 1:200 in PBS

Arbeitslösung

#### IL-6 & IL-8 ELISA

Kombination aus *Detection*-Antikörper und *Enzym Reagent*

Beide 1:300 (LOT-abhängig) verdünnt in PBS

Entwicklerlösung

*1-Step™ ultra TMB-Elisa*, 1l, ThermoFisher Scientific, St. Louis, USA

Stopplösung

*Sulfuric acid* (Schwefelsäure 1mol/l), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### **2.7.2. Ablauf**

Das Beschichten (*Coaten*) der ELISA-Platte erfolgte mittels des oben genannten *Coating*-Antikörpers über Nacht bei 4°C. Hierzu wurden jeweils 100µl der *Coating*-Lösung, bestehend aus Puffer und Antikörper, pro *Well* pipettiert. Der MMP-3 ELISA wurde bei RT über Nacht inkubiert. Die *Coating*-Lösung wurde am nächsten Morgen verworfen und 250µl der Blocklösung hinzugefügt. Das Blocken erfolgte für 1h bei RT. Im Anschluss wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Hinzugabe von 100µl des Standards sowie die Hinzugabe der zuvor gewonnenen Überstände. Diese wurden beim IL-6 und IL-8 ELISA 1:10 mit PBS verdünnt. Beim MMP-3 ELISA erfolgte die Hinzugabe von 100µl der unverdünnten Überstände. Nach zweistündiger Inkubation bei RT erfolgte das viermalige Waschen mit Waschpuffer. Zum MMP-3 ELISA wurden im Anschluss 100µl des *Detection*-Antikörpers hinzugegeben und es erfolgte die lichtgeschützte Inkubation für 1,5h bei RT. Beim IL-6 und IL-8 ELISA erfolgte die Hinzugabe von 100µl der Arbeitslösung und die lichtgeschützte Inkubation für 1,5h bei RT. Die Platten des MMP-3 ELISA wurden nach entsprechender Inkubationszeit erneut viermalig gewaschen und im Anschluss wurde 100µl *Enzym Reagent* hinzugegeben und lichtgeschützt 20min bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen der Platten wurde bei allen ELISA als erstes 50µl der Entwicklerlösung und darauffolgend 50µl der Stopp-Lösung hinzugegeben. Es erfolgte das Auslesen der Platten.

### 2.7.3. Auslesen und Auswertung der ELISA Daten

Die Messung der Absorptionen in den einzelnen Wells erfolgte mittels des *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad, Hercules, USA) bei einer Wellenlänge von 450 und 570nm und einer *Pathlength Correction* von 100 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ). Eine Standardkurve zur Berechnung der Zytokinkonzentrationen in den unbekanntenen Proben wurde mittels einer 4-Punkte Kurve in der Software generiert. Die so gewonnenen Konzentrationen wurden jeweils ins Verhältnis zur nicht stimulierten Kontrollgruppe, die als 100% definiert wurde, gesetzt. Die entstandene Prozentzahl gibt Aufschluss über die Veränderung der Zytokinproduktion bei Stimulation mit Resolvinen.

## 2.8. Statistische Auswertung

Sowohl die statistische Auswertung der im Western Blot detektierten Banden als auch die Auswertung der im ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels *GraphPad PRISM 8* (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Mittels des Einstichproben-t-Tests wurde untersucht, inwieweit nach Stimulation eine Veränderung der Rezeptordichte im Western Blot in Bezug zur Kontrolle besteht. Die Auswertung des ELISA erfolgte mittels ANOVA und Dunnett's Test. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert von  $<0,05$  gewertet.

## 2.9. Allgemeiner Laborbedarf

### 2.9.1. Materialien

Zellkultur Flaschen	Cellstar® Zellkultur Flaschen, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich 550ml/175cm <sup>2</sup> 250ml/75cm <sup>2</sup>
Falcon®-Tubes	Cellstar® Polypropylen Röhren, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich 15ml 50ml
Petrischalen	<i>Cell Culture Dishes</i> , 60x15mm, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Eppendorf- <i>Tubes</i>	Eppendorf <i>Safe-Lock Tubes</i> , Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland 0,5ml 1,5ml 2ml
96- <i>Well</i> Platte Zellkultur	Zellkultur Mikroplatte 96- <i>Well</i> F-Boden, Greiner Bio- One, Kremsmünster, Österreich
96- <i>Well</i> Platte	Mikroplatte 96- <i>Well</i> F-Boden, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
ELISA Platte	<i>F96 Maxisorp NUAC-Immuno Plate</i> , ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen	TipOne® Pipettenspitzen steril & unsteril, Starlab International GmbH, Hamburg, Germany 10/20µl Spitze XL, graduiert 200µl Spitze 1000µl Spitze, graduiert
Stripetten	<i>Corning® Costar® Stripette®</i> , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA 5ml 10ml 25ml
Raue Tücher	Papierhandtücher, WEPA Professional GmbH, Arnsberg-Müschede, Deutschland
Handschuhe	VASCO® Nitril <i>blue</i> Untersuchungshandschuh, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

### 2.9.2. Geräte

Pipetten	Eppendorf Research® plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland 10µl, mittelgrau 100µl, gelb 1000 µl, blau Proline® Plus mechanische Pipette, 1 Kanal, 500- 5000 µl, Sartorius, Göttingen, Deutschland
----------	---

Pipettierhilfe	pipetus® 100-240Volt, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Multipipetten	Finnpipette™ <i>Multistepper</i> , ThermoFisher Scientific, Waltham, USA Picus® elektronische Pipette, 8 Kanäle, Sartorius, Göttingen, Deutschland 5-120 µl 10-300 µl
Elektronischer Zellzähler	Scepter: Automatischer Zellzähler im Pipettenformat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zählkammer	Neubauer <i>improved</i> , Optik Labor, Lancing, Vereinigtes Königreich
Zentrifugen	Rotina 420R Zentrifuge, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland Mikro 220R Zentrifuge, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland <i>FastGene</i> ® Minizentrifuge, Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Auflichtmikroskop	Axio Vert. A1 Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kühlschrank & Tiefkühler -20°C	Kühl-Gefrier-Kombination, Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Tiefkühler -80°C	Forma™ -86°C Ultratiefkühlschränke der Serie 900, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank	BB16 <i>Function Line CO<sub>2</sub> Incubator</i> , Heraeus, Hanau, Deutschland
Sterile Werkbank	HB 2472 K GS Sicherheitswerkbank/ <i>Laminarflow</i> , Heraeus, Hanau, Deutschland
ELISA & Proteinbestimmung	<i>iMark</i> ™ <i>Microplate Absorbance Reader</i> , Bio-Rad, Hercules, USA

Inkubator ELISA Platten	<i>Shaker DTS-2</i> , NeoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Western Blot Auswertung	<i>ChemiDoc™ Touch Imaging System</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Messgerät	pH-Meter CG820, Schott AG, Mainz, Deutschland
Magnetrührer	Magnetrührer MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Waage	Feinwaage Typ 1450, Sartorius, Göttingen, Deutschland
<i>Vortexer</i>	Reax 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
<i>Shaker Western Blot Gele</i>	<i>Mini Rocker-Shaker MR-1</i> , bioSan, Riga, Lettland
Heizblock	Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, Deutschland
Becherglas	Becherglas DURAN®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland 250ml 1000ml
Glasflasche	Gewindeflasche ROTILABO®, Klarglas, 1000ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 2.9.3. Programme

Western Blot	<i>Image Lab™ Software</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Immunzytochemie & Immunfluoreszenz	<i>ImageJ™</i>
ELISA Auswertung	<i>Microplate Manager® Software</i> , Bio-Rad, Hercules, USA
Textverarbeitung	Microsoft Word, Microsoft, Albuquerque, USA
Statistische Auswertung	Microsoft Excel, Microsoft, Albuquerque, USA GraphPad PRISM 8, GraphPad Software Inc., San Diego, USA

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Expression von Resolvin-relevanten Proteinen

Mittels Western Blot und Immunfluoreszierenden Verfahren wurde die Expression von Rezeptoren und Enzymen der Resolvine in SF nachgewiesen. Außerdem wurde begleitend eine mögliche Veränderung des Rezeptorbesatzes oder der Enzymmenge nach Stimulation mit Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  dargestellt.

#### 3.1.1. GPR 32

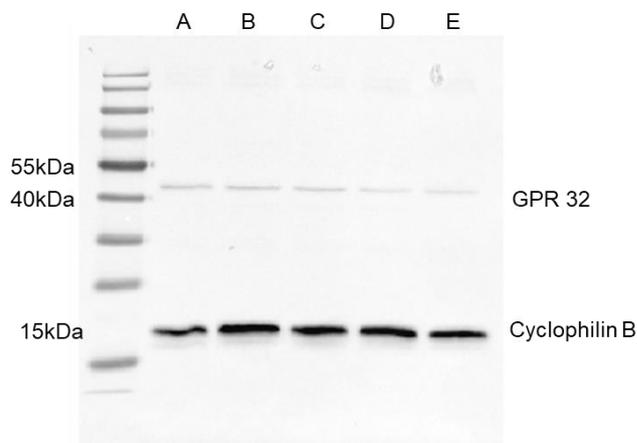
Zunächst wurde die Expression des RvD1 Rezeptors GPR32 untersucht (s. Abb. 3.). Im Western Blot zeigte sich eine stärker ausgeprägte Bande bei 40 Kilodalton (kDa) sowie eine schwächer ausgeprägte Bande bei 42kDa. Dies entspricht den Angaben in der Literatur für das Molekulargewicht des Rezeptors. Ein Nachweis gelang sowohl bei Patienten mit RA als auch mit OA. Quantitativ zeigte sich hier kein Unterschied.

Weiterhin erfolgte eine Stimulation der Proben mit jeweils 10ng/ml TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  sowie IL-1 $\beta$ . Hier zeigte sich eine Veränderung in der Expressionsmenge des Rezeptors nach Stimulation. Insgesamt scheint die Bandenintensität durch Stimulation vermindert zu sein. Veränderungen je nach Stimulationsbedingung zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  zeigte eine signifikante Reduktion der Bandenintensität von GPR32 um 43,5% (56,5%  $\pm$  30,4%,  $p=0,02$ ). Die Stimulation mit INF- $\gamma$  führte zu einer Reduktion um 28,3% (71,7%  $\pm$  29,4%) bei Kombination mit TNF- $\alpha$  um 34,6% (65,4%  $\pm$  37,7%). Die Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte ebenfalls eine Reduktion der Bandenintensität um 37% (62,6%  $\pm$  47,7%).

Zur näheren Differenzierung zwischen Patienten mit einer RA oder OA wurden die entsprechenden Proben ebenfalls getrennt ausgewertet. Hierbei handelte es sich um jeweils drei Proben von Patienten mit einer RA und jeweils drei Proben von Patienten mit einer OA. Bei Patienten mit einer RA zeigte eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine Reduktion der Bandenintensität um 58,6% (41,4%  $\pm$  31%). Die Stimulation mit INF- $\gamma$  zeigte eine Reduktion um 45,3% (54,7%  $\pm$  35,3%), in Kombination mit TNF- $\alpha$  um 58,2% (41,8%  $\pm$  42,5%) und die Stimulation mit IL-1 $\beta$  zeigte eine Reduktion um 69,3% (30,7%  $\pm$  1,6%,  $p=0,0002$ ).

Bei Patienten mit einer OA zeigte eine Stimulation der Fibroblasten mit TNF- $\alpha$  eine Reduktion der Rezeptordichte um 28,3% ( $71,7\% \pm 25,7\%$ ). Die Stimulation mit INF- $\gamma$  führte zu einer Reduktion um 11,3% ( $88,7\% \pm 7,1\%$ ), bei der Kombination mit TNF- $\alpha$  um 11% ( $89\% \pm 9\%$ ). Eine Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte eine Reduktion der Bandenintensität um 5,6% ( $94,4\% \pm 51,5\%$ ).

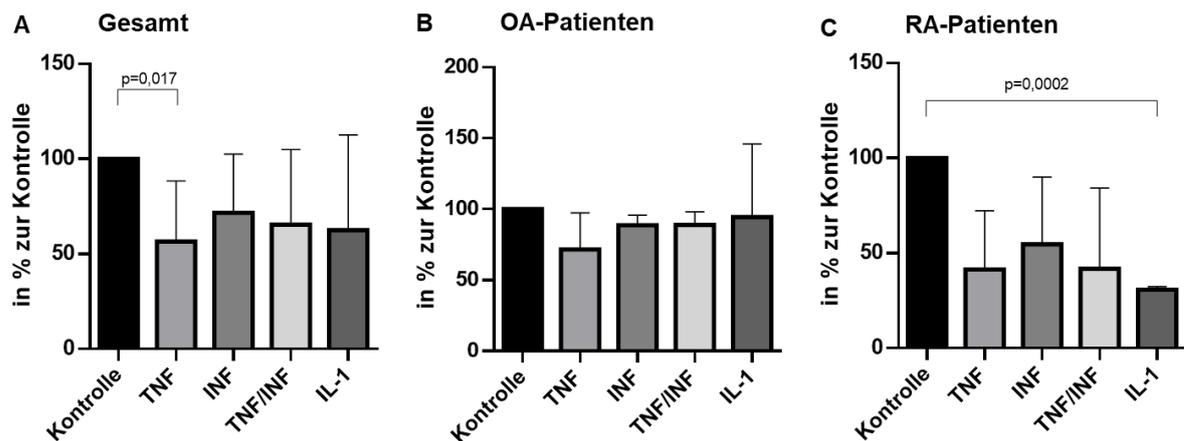
Insgesamt lässt sich festhalten, dass der GPR32 in Fibroblasten von Patienten mit RA sowie OA vorzufinden ist. Eine Stimulation der SF mit proinflammatorischen Zytokinen führte zu einer allgemeinen Reduktion des Rezeptors, jedoch in den meisten Fällen ohne statistische Signifikanz. Signifikant zeigte sich nur die Reduktion durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  unter Einbeziehung aller getesteten Patienten sowie die Reduktion der Rezeptordichte nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  in der Gruppe der RA-Patienten. Im allgemeinen Trend zeigte sich die Reduktion der Rezeptordichte in der Gruppe der RA-Patienten deutlich ausgeprägter als in der Gruppe der OA-Patienten (s. Abb. 4).



**Abb. 3: GPR 32 im Western Blot**

Darstellung des GPR 32 im Western Blot sowie des Referenzproteins Cyclophilin B. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF/IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines RA-Patienten.

GRP 32= G-Protein gekoppelter Rezeptor 32, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , INF- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis, kDa= Kilodalton



**Abb. 4: Bandenintensität des GPR 32 nach Stimulation**

Expression von GPR32 unter Kontrollbedingungen und nach 24h Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), IFN- $\gamma$  (10ng/ml), TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Es wurde jeweils das Ratio aus der Intensität der GPR32 Bande sowie des Referenzproteins (Cyclophilin B, 15kDa) gebildet. Die Verdünnung des primären Antikörpers war 1:1500 (0,67 $\mu$ g/ml). (A) zeigt die Ergebnisse aller getesteten Proben (OA und RA gepoolt, n=6). (B) zeigt die Gruppe der OA-Patienten (n=3) und (C) die Gruppe der RA-Patienten (n=3). Die Auswertung erfolgte mittels Einstichproben-t-Test. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

GRP 32= G-Protein gekoppelter Rezeptor 32, h= Stunde, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm,  $\mu$ g= Mikrogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis, OA= Osteoarthritis, kDa= Kilodalton

### 3.1.2. GPR 18

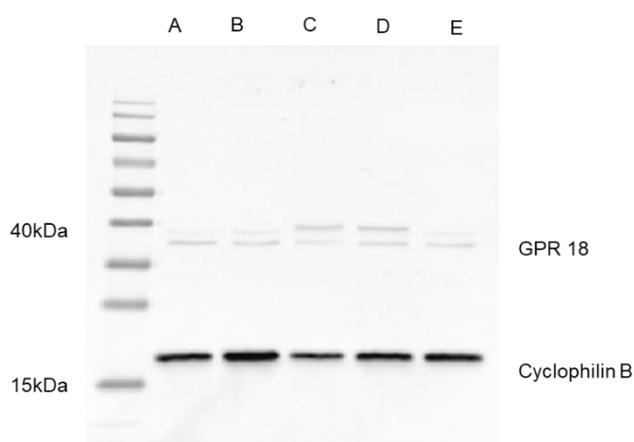
Der GPR 18, Rezeptor für RvD2, konnte ebenfalls mittels Western Blot detektiert werden. Es zeigten sich zwei Banden, eine Bande bei einem Molekulargewicht von 40kDa und eine Bande bei 38kDa, was dem Molekulargewicht des Rezeptors entspricht (s. Abb. 5). Es gelang ein Nachweis bei Patienten mit OA sowie RA. Zur weiteren Evaluation der Rezeptorregulation erfolgte auch hier eine Stimulation der Probe mit proinflammatorischen Zytokinen. Der GPR18 zeigte nach Stimulation unter allen Resolvin-Rezeptoren die stärkste Regulation (s. Abb. 6).

In der Gesamtauswertung aller stimulierten Proben zeigte eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine Verstärkung der Bandenintensität um 36% (136%  $\pm$  184%). Nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  kam es zu einer Verstärkung um 235,3% (335,3%  $\pm$  318%) und bei Kombination mit TNF- $\alpha$  zu einer Verstärkung um 223% (323%  $\pm$  260,6%). Die Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte wiederum eine Verminderung der Bandenintensität um 29,4% (70,6%  $\pm$  44,5%).

Bei Patienten mit einer RA führte die Zytokinstimulation zu einer verminderten Expression des Rezeptors. Eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  zeigte eine Reduktion um 20,8% ( $79,2\% \pm 76,3\%$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Stimulation mit INF- $\gamma$  zeigte eine Reduktion um 34,8% ( $65,2\% \pm 18,7\%$ ), während es bei der Kombination mit TNF- $\alpha$  zu einer Steigerung der Bandenintensität um 4% ( $104\% \pm 25,1\%$ ) kam. Signifikant erwies sich die Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$ . Hier kam es zu einer Reduktion der Bandenintensität um 48,2% ( $51,8\% \pm 8\%$ ,  $p=0,009$ ).

Patienten mit einer OA zeigten tendenziell eine verstärkte Rezeptorexpression nach Stimulation. Eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  zeigte eine Verstärkung um 78,7% ( $178,7\% \pm 241,7\%$ ) in Bezug zur Kontrollgruppe. Die Stimulation mit INF- $\gamma$  führte zu einer Steigerung um 437,8% ( $537,8\% \pm 273\%$ ,  $p=0,049$ ), in Kombination mit TNF- $\alpha$  um 387,2% ( $487,2\% \pm 227\%$ ,  $p=0,0421$ ). Lediglich die Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte eine Reduktion um 10,5% ( $89,5\% \pm 61,8\%$ ).

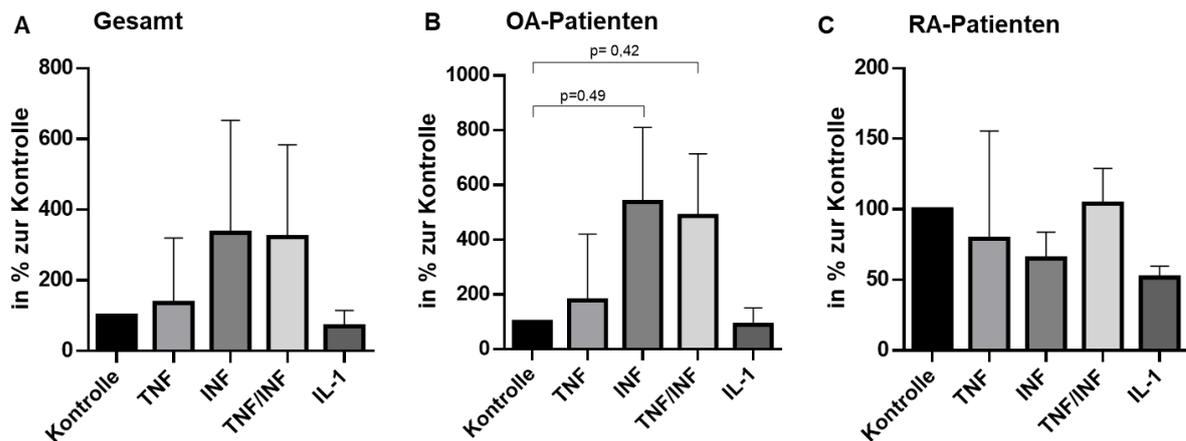
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auch dieser Rezeptor bei allen getesteten Proben nachgewiesen werden konnte und eine Veränderung der Rezeptorexpression nach Stimulation durch Zytokine besteht. Fibroblasten der OA-Patienten reagierten nach Stimulation mit einer verstärkten Expression des Rezeptors, während die Fibroblasten der RA-Patienten mit einer verminderten Expression reagierten. Einzige Ausnahme bildet hier die Stimulation mit IL-1 $\beta$ , welche in beiden Fällen zu einer Reduktion der Rezeptordichte führte.



**Abb. 5: GPR 18 im Western Blot**

Darstellung des GPR 18 im Western Blot sowie des Referenzproteins Cyclophilin B. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines OA-Patienten.

GRP 18= G-Protein gekoppelter Rezeptor 18, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , INF- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, OA= Osteoarthritis



**Abb. 6: Bandenintensität des GPR 18 nach Stimulation**

Expression von GPR18 unter Kontrollbedingungen und nach 24h Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), IFN- $\gamma$  (10ng/ml), TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Es wurde jeweils das Ratio aus der Intensität der GPR18 Bande sowie des Referenzproteins (Cyclophilin B, 15kDa) gebildet. Die Verdünnung des primären Antikörpers war 1:2500 (0,4 $\mu$ g/ml). (A) zeigt die Ergebnisse aller getesteten Proben (OA und RA gepoolt, n=6). (B) zeigt die Gruppe der OA-Patienten (n=3) und (C) die Gruppe der RA-Patienten (n=3). Die Auswertung erfolgte mittels Einstichproben-t-Test. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

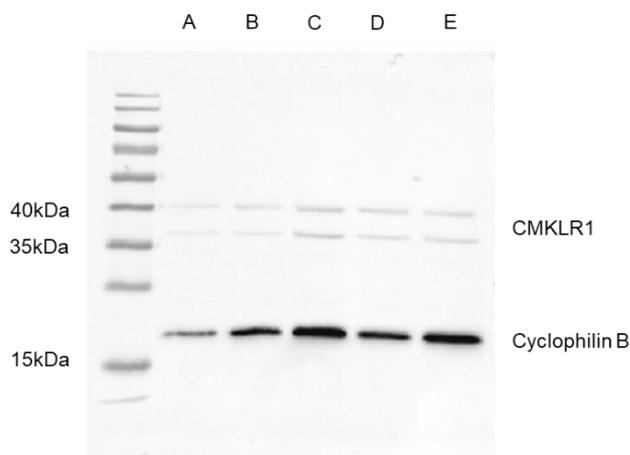
GRP 18= G-Protein gekoppelter Rezeptor 18, h= Stunde, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , INF- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm,  $\mu$ g= Mikrogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis, OA= Osteoarthrose, kDa= Kilodalton

### 3.1.3. CMKLR1

Der CMKLR1 wird auch als *Chemokine like receptor 1* oder Chem 23 Rezeptor bezeichnet und wurde als Rezeptor des RvE1 identifiziert. Der Nachweis des Rezeptors gelang im Western Blot. Hier konnten bei allen mit diesem Antikörper inkubierten Proben Banden im Bereich zwischen 35kDa und 40kDa detektiert werden (s. Abb. 7). Es zeigte sich eine Bande bei einer molekularen Masse von 40kDa und eine Bande bei einer molekularen Masse von weniger als 40kDa. Quantitativ zeigten sich zwischen RA und OA keine Unterschiede.

Der Chem 23 Rezeptor zeigte nach Stimulation insgesamt am ehesten eine Verstärkung der Rezeptordichte (s. Abb. 7). Nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  kam es zu einer Steigerung um 129,4% (229,4%  $\pm$  191,4%) in Bezug zur Kontrollgruppe. Nach Stimulation mit INF- $\gamma$  zeigte sich eine Reduktion der Rezeptordichte um 1,4% (98,6%  $\pm$  35%), in Kombination mit TNF- $\alpha$  jedoch eine Verstärkung um 116,5% (216,5%  $\pm$  168,5%). Eine Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte ebenfalls eine Verstärkung der Bandenintensität um 120,3% (220,3%  $\pm$  192,7%).

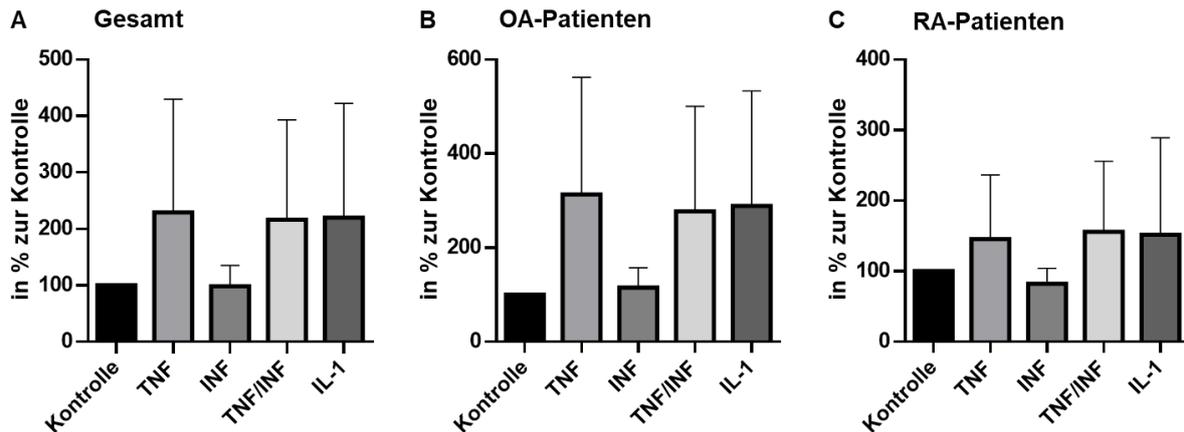
Bei Patienten mit einer RA führte die Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu einer Steigerung der Bandenintensität um 45,5% (145,5%  $\pm$  91%). Die Stimulation mit INF- $\gamma$  zeigte eine Verminderung der Bandenintensität um 18% (82%  $\pm$  22,1%), in Kombination mit TNF- $\alpha$  zeigte sich wiederum eine Steigerung um 55,8% (155,8%  $\pm$  100,1%). Die Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte eine Steigerung um 51,8% (151,8%  $\pm$  137,3%). Bei Patienten mit einer OA führte eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu einer Steigerung der Bandenintensität um 213,3% (313,3%  $\pm$  248,8%). Die Stimulation mit INF- $\gamma$  zeigte eine Steigerung um 15,2% (115,2%  $\pm$  41,9%), in Kombination mit TNF- $\alpha$  lag eine Steigerung der Rezeptordichte um 177,3% (277,3%  $\pm$  223,3%) vor. Eine Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 $\beta$  zeigte eine Steigerung der Bandenintensität um 188,7% (288,7%  $\pm$  244,7%). Beim Chem23 Rezeptor zeigte sich nach Auswertung keine eindeutige Tendenz bezüglich der Veränderung der Bandenintensität nach Stimulation mit Zytokinen. Sowohl in der Gruppe der OA- als auch RA-Patienten kam es insgesamt zu einer verstärkten Expression des Rezeptors nach Stimulation.



**Abb. 7: CMKLR1 im Western Blot**

Darstellung des CMKLR1 im Western Blot sowie des Referenzproteins Cyclophilin B. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit INF- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$ /INF- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines OA-Patienten.

CMKLR1= *chemokine like 1 receptor*, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , INF- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, OA= Osteoarthritis



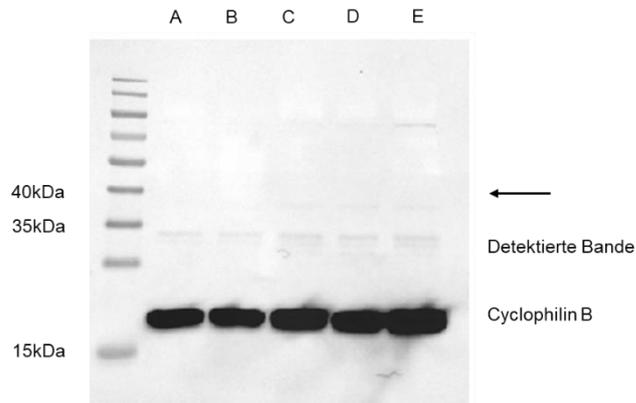
**Abb. 8: Bandenintensität des CMKLR1 nach Stimulation**

Expression von CMKLR1 unter Kontrollbedingungen und nach 24h Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), IFN- $\gamma$  (10ng/ml), TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Es wurde jeweils das Ratio aus der Intensität der CMKLR1 Bande sowie des Referenzproteins (Cyclophilin B, 15kDa) gebildet. Die Verdünnung des primären Antikörpers war 1:2000 (0,5 $\mu$ g/ml). (A) zeigt die Ergebnisse aller getesteten Proben (OA und RA gepoolt, n=6). (B) zeigt die Gruppe der OA-Patienten (n=3) und (C) die Gruppe der RA-Patienten (n=3). Die Auswertung erfolgte mittels Einstichproben-t-Test. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

CMKLR1= *chemerin like receptor 1*, h= Stunde, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , INF- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm,  $\mu$ g= Mikrogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis, OA= Osteoarthritis, kDa= Kilodalton

### 3.1.4. Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptor

Leukotrien B<sub>4</sub> bindet an den humanen Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptor, auch BLT Rezeptor genannt. Eine spezifische Bindung würde im Western Blot Banden bei einer Molekülgröße von 38kDa darstellen. In den durchgeführten Versuchen zeigten sich bei zwei Patienten mit einer OA schwache Banden bei einer molekularen Masse zwischen 30 und 35kDa, ebenso bei zwei Patienten mit einer RA (s.Abb. 9). Bei zwei Patienten, jeweils ein Patient mit OA und ein Patient mit RA, konnte keine Banden in diesem Bereich nachgewiesen werden. Da die detektierten Banden mit einer Masse zwischen 30 und 35kDa sowohl unterhalb der zu erwartenden Masse von 38kDa liegen und auch nicht in allen Proben dargestellt werden konnten, kann das Vorhandensein des Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptors in SF nicht sicher belegt werden.



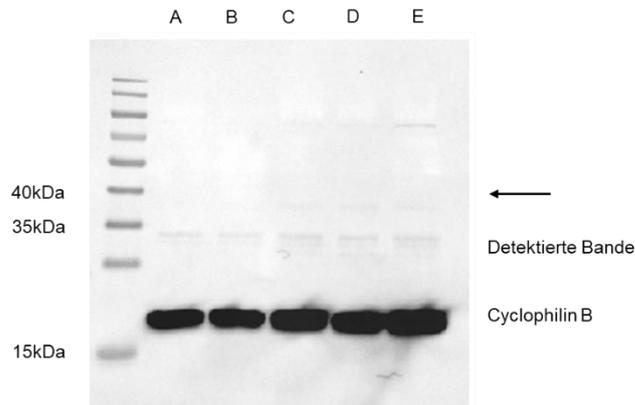
**Abb. 9: Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptor im Western Blot**

Darstellung des Leukotrien-B<sub>4</sub>-Rezeptors im Western Blot sowie des Referenzproteins Cyclophilin B. Der Pfeil zeigt die zu erwartende Bande. Die detektierte Bande liegt bei 35kDa. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigte die Probe eines OA-Patienten.

TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, OA= Osteoarthritis

### 3.1.5. FPRL1

Der Anti-FPRL1 Antikörper bindet an den *formyl peptide receptor-like 1* Rezeptor. Zum spezifischen Nachweis des Rezeptors wären im Western Blot Banden mit einer Masse von 39kDa erwartbar. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich bei fünf von sechs untersuchten Proben, hiervon drei Proben von Patienten mit einer RA und zwei Proben von Patienten mit einer OA, eine sehr schwache Banden bei einer Größe von 35kDa (s. Abb. 10). Die detektierten Banden liegen jedoch mit einer Masse von 35kDa unterhalb der zu erwarteten Masse von 39kDa. Dementsprechend spricht die detektierte Bande nicht sicher für einen Nachweis des *formyl peptide receptor-like 1* Rezeptors. Eine Probe eines Patienten mit einer OA wies keine Bande auf.



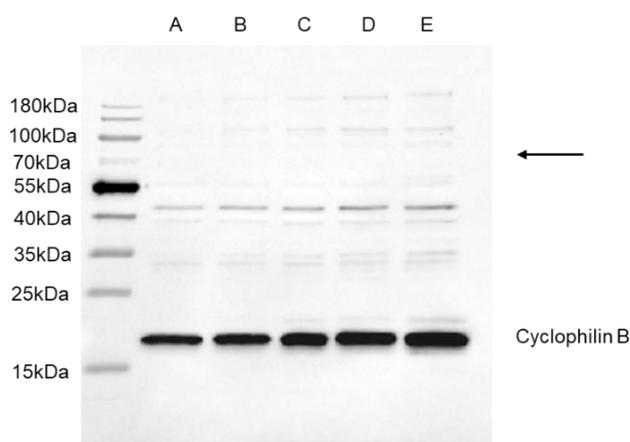
**Abb. 10: FPRL1 im Western Blot**

Darstellung des FPRL1 im Western Blot sowie des Referenzproteins Cyclophilin.B. Der Pfeil zeigt die zu erwartende Bande. Die detektierte Bande liegt bei 35kDa. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines RA-Patienten.

TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng=Nanogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis

### 3.1.6. 15-Lipoxygenase

Zum Nachweis der 15-LO mittels Western Blot müssten entsprechend der Literatur Banden bei einer Masse von 73kDa detektiert werden. In den durchgeführten Versuchen konnte sowohl bei Patienten mit einer OA als auch mit einer RA lediglich ein unspezifisches Bandenmuster, jedoch keine spezifische Bindung detektiert werden. Ein sicherer Nachweis der Zielstruktur war somit nicht möglich (s. Abb. 11).



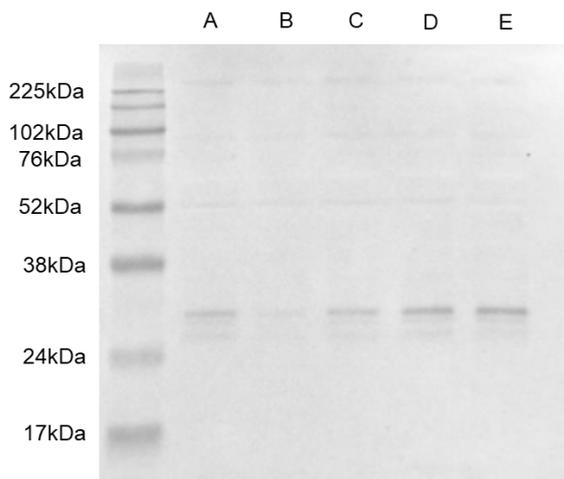
**Abb. 11: 15-LO im Western Blot**

Darstellung der 15-LO im Western Blot sowie des Referenzproteins Cyclophilin B. Der Pfeil zeigt die zu erwartende Bande. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines OA-Patienten.

15-LO= 15-Lipoxygenase, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, OA= Osteoarthritis

### 3.1.7. 12-Lipoxygenase

Bei erfolgreichem Nachweis der 12-Lipoxygenase (12-LO) zeigen sich laut Literaturangaben Banden bei einer Masse von 76kDa. In den durchgeführten Versuchen konnten nach Hinzugabe des Antikörpers bei vier Patienten, jeweils zwei Patienten mit einer OA sowie zwei Patienten mit einer RA, keine entsprechenden Banden nachgewiesen werden (s. Abb. 12).



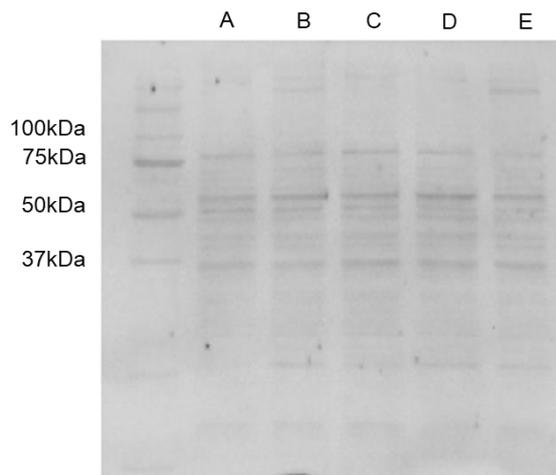
**Abb. 12: 12-LO im Western Blot**

Darstellung der 12-LO im Western Blot. Der Pfeil zeigt die zu erwartende Bande. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines RA-Patienten.

12-LO= 12-Lipoxygenase, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis

### 3.1.8. 5-oxo-EETE

Der 5-oxo-EETE Antikörper, welcher an den 5-oxo-EETE Rezeptor, ein Rezeptor für die Bindung von Eicosanoiden und mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäuren, bindet, konnte im Western Blot ebenfalls keine eindeutigen Banden darstellen. Ein spezifischer Nachweis wäre mittels einer Bande bei einer molekularen Masse von 52kDa zu erwarten. In fünf der sechs durchgeführten Versuche, hiervon zwei Patienten mit einer OA und drei Patienten mit einer RA, konnte nur ein unspezifisches Bindungsmuster dargestellt werden. Eine eindeutige Bande im Bereich der zu erwartenden Masse war lediglich bei einem Patienten mit einer OA detektierbar (s. Abb. 13).



**Abb. 13: 5-oxo-ETE- im Western Blot**

Darstellung der 5-oxo-ETE im Western Blot. Der Pfeil zeigt die zu erwartende Bande. (A) Kontrollgruppe, (B) Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml), (C) Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml), (D) Stimulation mit TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  (jeweils 10ng/ml), (E) Stimulation mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Die Abbildung zeigt die Probe eines RA-Patienten.

TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ = Interleukin-1 $\beta$ , ng= Nanogramm, ml= Milliliter, RA= rheumatoide Arthritis

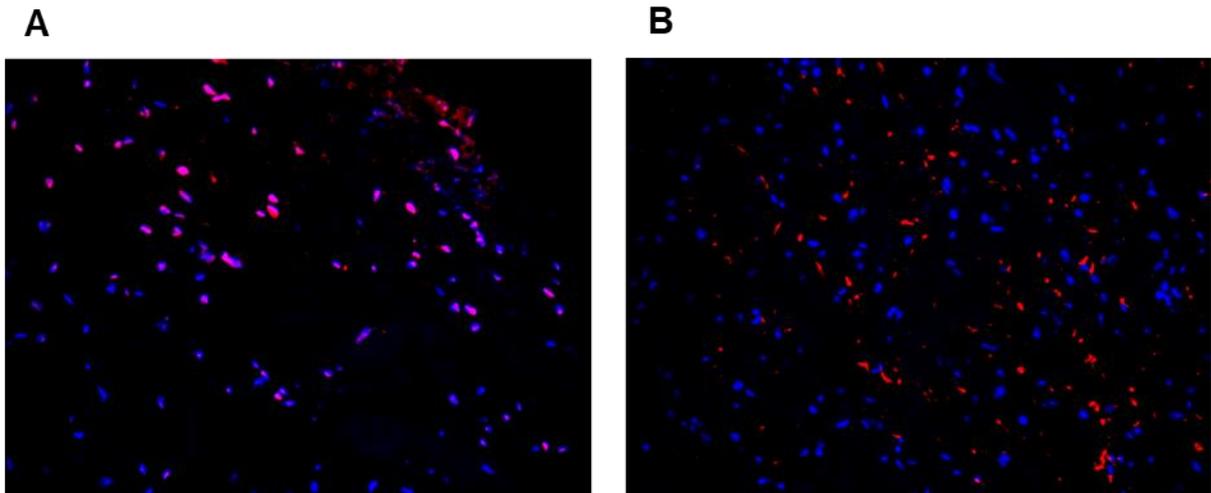
### 3.2. Nachweis von Resolvin-assoziierten Proteinen mittels Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz wurden die Zielproteine 5-LO, 15-LO, FPRL1, GPR18 und GPR32 durch einen unkonjugierten Primärantikörper gebunden und mit Hilfe eines fluoreszierenden, sekundären Antikörpers visualisiert. Der Zellkern aller im Präparat vorhandenen Zellen wurde mittels DAPI-Färbung visualisiert.

Insgesamt wurden in der Immunfluoreszenz Schnittpräparate von acht Patienten (4 RA und 4 OA) angefärbt. Die durch DAPI visualisierten Zellkerne repräsentieren alle in diesem synovialen Schnittbild vorhandenen Zellen. Jedes Bild einer fluoreszierenden Zielstruktur wurde mit einem Bild eines Isotyps in gleicher Konzentration verglichen, um mögliche zeitgleich vorliegende, unspezifische Bindungen darzustellen.

Die mittels Immunfluoreszenz gefärbten Kniegelenkspräparate enthalten verschiedene Zellen des Synoviums und umgebenden Gewebes. Inwieweit es sich bei den fluoreszierenden Zellen um SF handelt, sollte mittels Immunzytochemie durch das singuläre Kultivieren und Färben von SF erfolgen. Es wurden Proben von jeweils drei Patienten mit OA und drei Patienten mit RA verglichen. Zum Ausschluss eines unspezifischen Bindungsverhaltens wurde ebenfalls mit einem Isotyp in gleicher Konzentration verglichen.

### 3.2.1. 5-Lipoxygenase

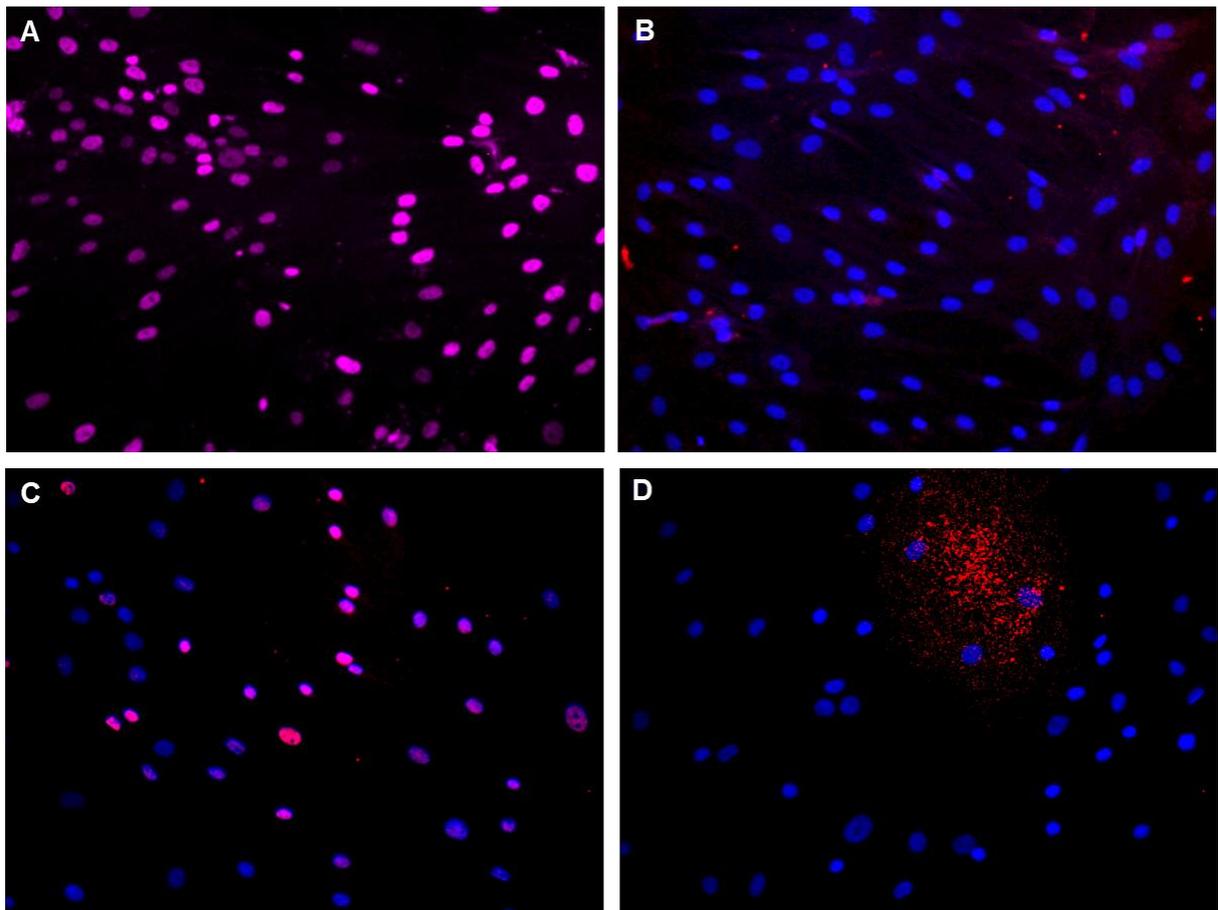


**Abb. 14: 5-LO in der Immunfluoreszenz**

Darstellung der 5-LO in Schnittpräparaten aus einer Kniegelenksarthroskopie eines RA-Patienten. Blau= DAPI-Färbung, Rot= Färbung der 5-LO durch den Antikörper. Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbter 5-LO (A) 5-LO mit 6,55µg/ml, (B) Isotyp monoklonal mit 6,6µg/ml und unspezifischer Hintergrundfärbung. Vergrößerungsfaktor: 32x.

5-LO= 5-Lipoxygenase, RA= rheumatoide Arthritis, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter

Zunächst wurde die 5-LO mittels Immunfluoreszenz in Gewebe (4 RA und 4 OA) nachgewiesen (s. Abb. 14). Die 5-LO katalysiert dabei die Konversion von 18R-HEPE zu RvE sowie von 17S-HpDHA und 17R-HDHA zu RvD (Serhan et al., 2000, Serhan et al., 2002). Sie stellt somit einen essenziellen Schritt in der Resolvin Synthese dar. Bei zwei RA- und drei OA-Proben konnte die 5-LO in den entsprechenden Schnittbildern dargestellt werden. Die restlichen Proben zeigten lediglich ein diffuses Färbemuster sowohl mit dem spezifischen Antikörper gegen die 5-LO als auch in der entsprechenden Isotypfärbung, vermutlich aufgrund des Alters der Kryopräparate.



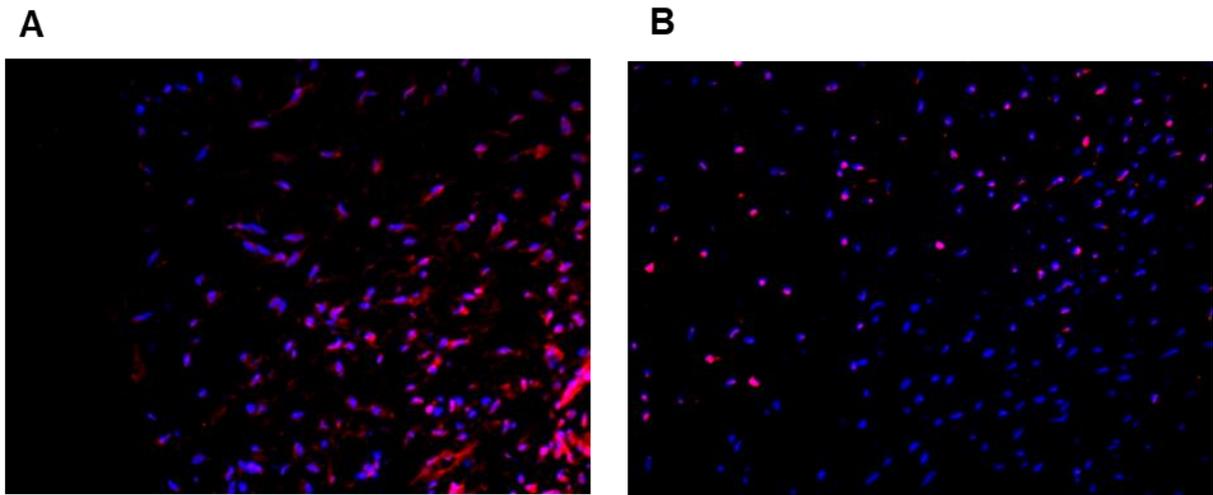
**Abb. 15: 5-Lipoxygenase in der Immunzytofluoreszenz**

(A) Expression der 5-LO im Zellkern von RASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Konzentration des Antikörpers von 6,55  $\mu\text{g/ml}$ . (B) zeigt den verwendeten monoklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. (C) Expression der 5-LO im Zellkern von OASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Antikörperkonzentration von 6,66  $\mu\text{g/ml}$ . (D) zeigt den verwendeten monoklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. Blau=DAPI, Rot= Anfärbung der 5-LO, Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbter 5-LO. Vergrößerungsfaktor: 63x.

5-LO= 5-Lipoxygenase, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*,  $\mu\text{g}$ = Mikrogramm, ml= Milliliter, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Zum Nachweis der 5-LO in SF, nach dem erfolgreichen Nachweis der 5-LO in Synovialschnitten, wurden zwei Proben von Patienten mit OA sowie drei von Patienten mit RA gefärbt. In allen Proben konnte die 5-LO im Zellkern detektiert werden (s. Abb. 15). Bezüglich der Färbeintensität bestand kein Unterschied zwischen *osteoarthritic synovial fibroblasts* (OASF) und *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts* (RASF).

### 3.2.2. 15-Lipoxygenase

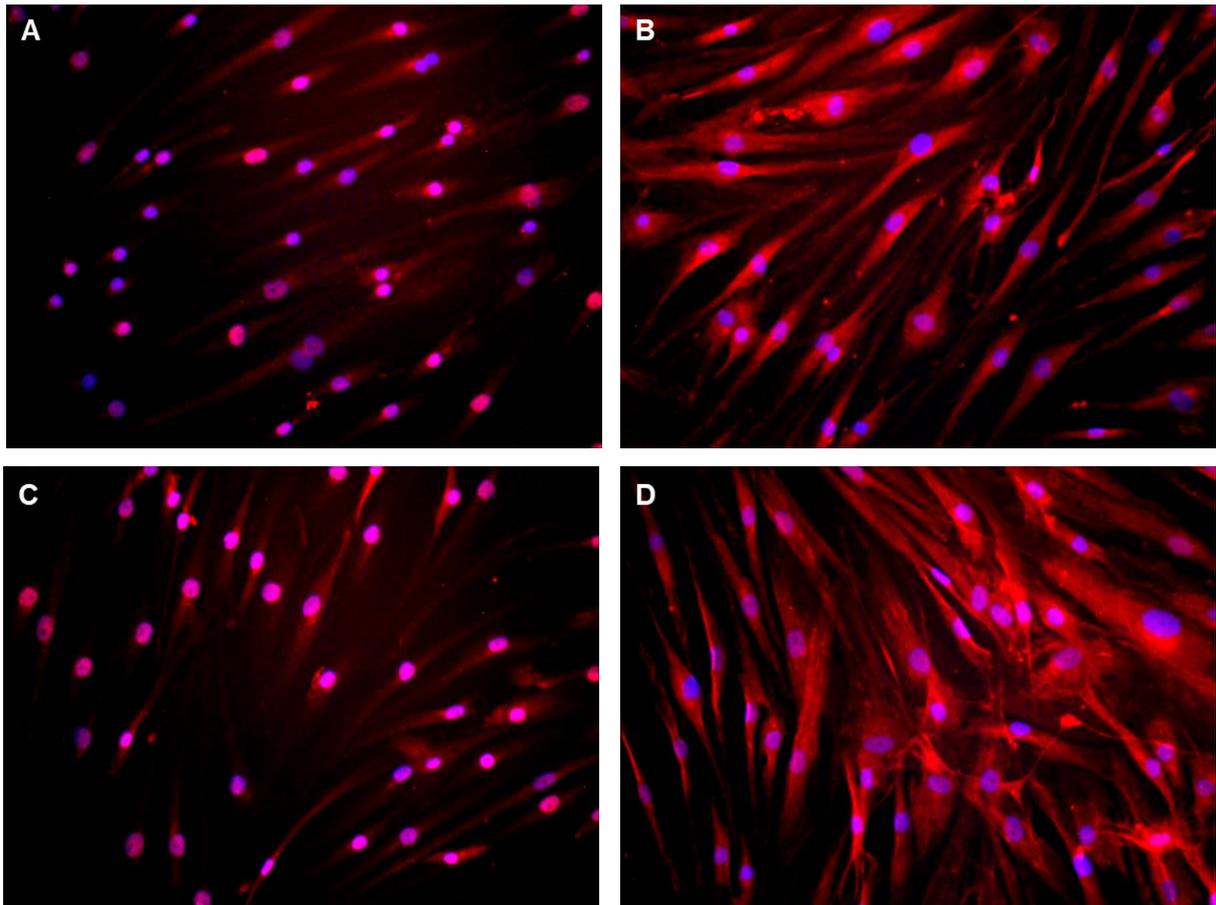


**Abb. 16: 15-LO in der Immunfluoreszenz**

Darstellung der 15-LO in Schnittpräparaten aus einer Kniegelenksarthroskopie eines OA-Patienten. Blau= DAPI-Färbung, Rot= Färbung der 15-LO durch den Antikörper. Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbter 15-LO (A) 15-LO mit 2,5µg/ml und unspezifischer Hintergrundfärbung, (B) Isotyp monoklonal mit 2,5µg/ml. Vergrößerungsfaktor: 32x.

15-LO= 15-Lipoxygenase, OA= Osteoarthritis, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter

Der Nachweis der 15-LO sollte in Schnittpräparaten aus Kniegelenksarthroskopien (4 RA und 4 OA) erfolgen. Die 15-LO katalysiert aus DHA das Zwischenprodukt 17S-HpDHA (Hong et al., 2003, Sun et al., 2007). In allen untersuchten Schnitten konnte kein eindeutiger Nachweis der 15-LO, sowohl bei Patienten mit RA als auch OA, erfolgen. Es zeigte sich begleitend eine sehr unspezifische Isotypfärbung, am ehesten aufgrund des Alters der Kryopräparate und entsprechender Bildung von Eiskristallen durch die lange Lagerung (s. Abb. 16).



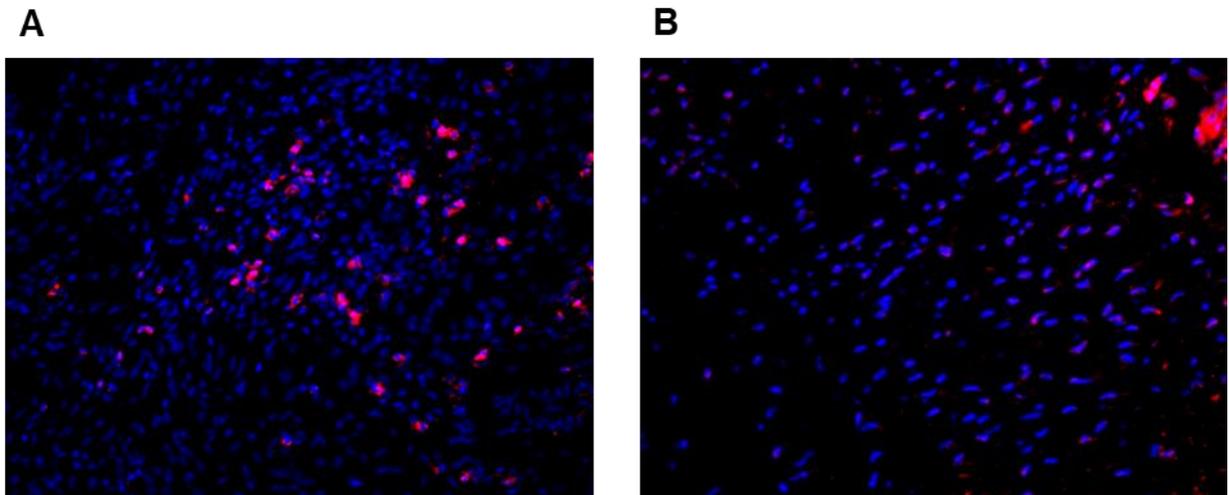
**Abb. 17: 15-Lipoxygenase in der Immunzytofluoreszenz**

(A) Expression der 15-LO im Zellkern von RASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Konzentration des Antikörpers von 5 µg/ml. (B) zeigt den verwendeten polyklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. (C) Expression der 15-LO im Zellkern von OASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Antikörperkonzentration von 5 µg/ml. (D) zeigt den verwendeten polyklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. Blau=DAPI, Rot= Anfärbung der 15-LO, Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbter 15-LO. Vergrößerungsfaktor: 63x.

15-LO= 15-Lipoxygenase, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Da ein Nachweis der 15-LO in SF nicht in Schnittbildern der Synovialschleimhaut, möglich war, erfolgte im Anschluss der Nachweis mittels Immunfluoreszenz in kultivierten SF. Der Nachweis der 15-LO gelang in RASF-Fibroblasten sowie in OASF-Fibroblasten (s. Abb. 17). Insgesamt zeigte sich bei allen sechs getesteten Proben, jeweils drei OA und drei RA, eine nukleäre und zytoplasmatische Färbung. Die Färbung des Isotyps in entsprechender Konzentration zeigt sich qualitativ anders, sodass von einer spezifischen Färbung der 15-LO in SF auszugehen ist.

### 3.2.3. FPRL1

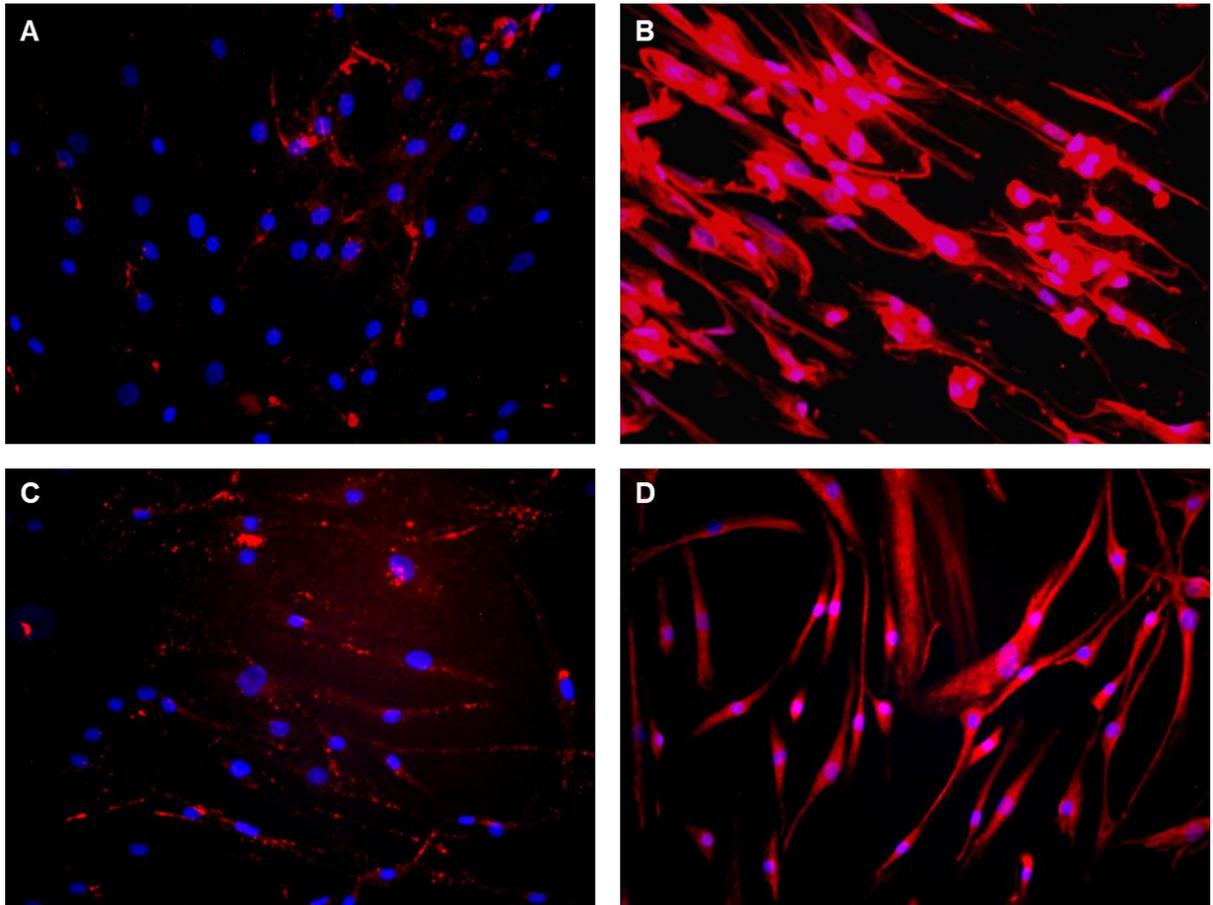


**Abb. 18: FPRL1 in der Immunfluoreszenz**

Darstellung des FPRL1 in Schnittpräparaten aus einer Kniegelenksarthroskopien eines OA-Patienten. Blau= DAPI-Färbung, Rot= Färbung des FPRL1 durch den Antikörper. Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbtem FPRL1 (A) FPRL1 mit 10µg/ml. (B) Isotyp monoklonal mit 10µg/ml. Vergrößerungsfaktor: 32x.

OA= Osteoarthritis, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter

Auch eine Darstellung des FPRL1 Rezeptors erfolgte in Schnittpräparaten von Patienten nach Kniegelenksarthroskopien (4 OA und 4 RA). Der FPRL1 Rezeptor, auch LXA Rezeptor, gilt neben seiner Funktion als Lipoxin A<sub>4</sub> Rezeptor auch als Rezeptor für RvD1 (Sodin-Semrl et al., 2000). Bei zwei Schnittbildern (1 OA und 1 RA) konnte der Rezeptor mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden (s. Abb. 18). In den restlichen Schnitten zeigte sich entweder ein unspezifisches Bindungsverhalten oder keine Bindung.



**Abb. 19: FPRL1 in der Immunzytofluoreszenz**

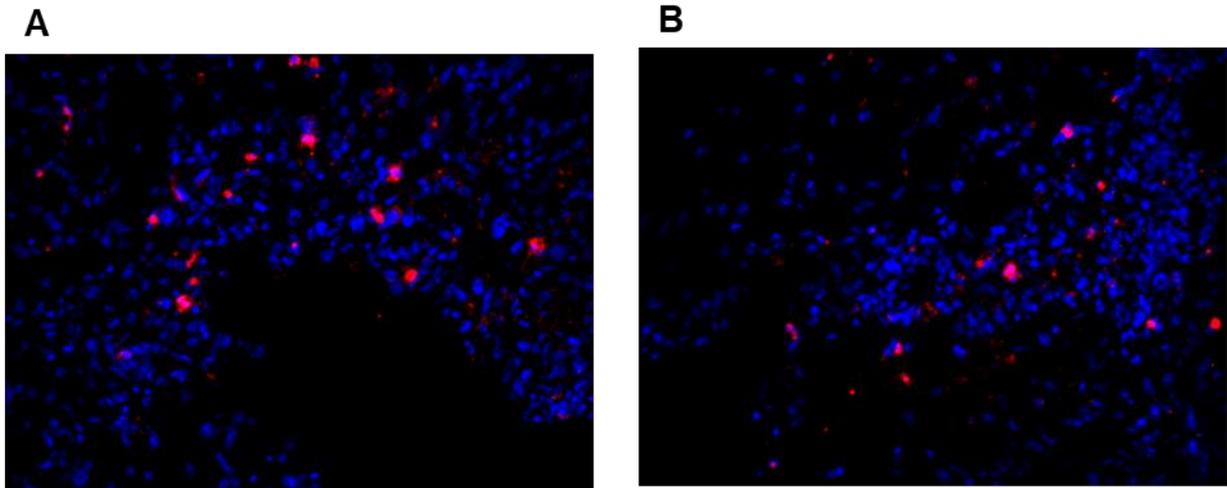
(A) Expression des FPRL1 im Zellkern von RASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Konzentration des Antikörpers von 2 µg/ml. (B) zeigt den verwendeten polyklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. (C) Expression des FPRL1 im Zellkern von OASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Antikörperkonzentration von 2 µg/ml. (D) zeigt den verwendeten polyklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. Blau=DAPI, Rot= Anfärbung des FPRL1, Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbtem FPRL1. Vergrößerungsfaktor: 63x.

RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Um einen Nachweis des FPRL1 in SF zu erzielen, erfolgte im Anschluss auch hier die Färbung von kultivierten SF. Der FPRL1 Rezeptor zeigte nach Bindung durch den entsprechenden Antikörper eine punktförmige, rote Fluoreszenz um den Zellkern der SF bei allen sechs Proben, drei RA sowie drei OA. Ein Unterschied im Färbemuster bei RASF-Fibroblasten oder OASF-Fibroblasten besteht nicht. Der polyklonale Isotyp zeigte eine deutliche Anfärbung der SF mit allerdings sehr unspezifischem Bindungsverhalten (s. Abb. 19). Ein Vorhandensein des FPRL1 in SF wäre dementsprechend anhand des sehr unterschiedlichen Färbemusters im Vergleich zum

Isotyp durchaus möglich, allerdings bedarf es weiterer Färbungen, um das unspezifische Bindungsverhalten des Istotyps zu minimieren,

### 3.2.4. GPR 18

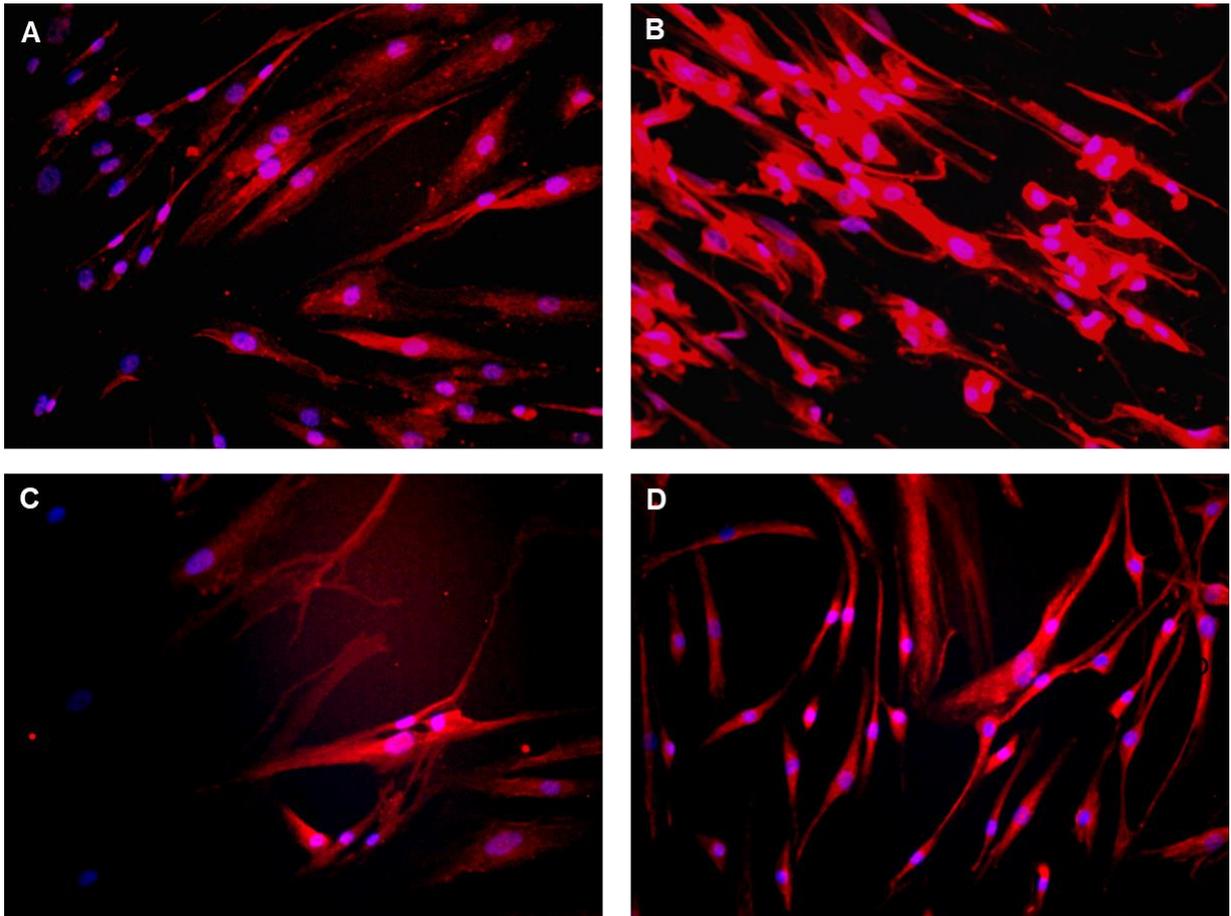


**Abb. 20: GPR 18 in der Immunfluoreszenz**

Darstellung des GPR18 in Schnittpräparaten aus einer Kniegelenksarthroskopie eines OA-Patienten. Blau= DAPI- Färbung, Rot= Färbung des GPR18 durch den Antikörper. Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbtem GPR18 (A) GPR18 mit 5 $\mu$ g/ml und unspezifischer Hintergrundfärbung, (B) Isotyp monoklonal mit 5 $\mu$ g/ml. Vergrößerungsfaktor: 32x.

GPR 18= G-Protein gekoppelter Rezeptor 18, OA= Osteoarthritis, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol,  $\mu$ g= Mikrogramm, ml= Milliliter

Zur Verifizierung des im Western Blot dargestellten GPR 18 erfolgte die Darstellung des GPR18 mittels Immunfluoreszenz. Der GPR 18 gilt als Rezeptor des RvD2 (Chiang et al., 2015). In drei der gefärbten Schnittpräparate zeigte sich eine Fluoreszenz um den mittels DAPI visualisierten Zellkern. Ein begleitend unspezifisches Färbeverhalten des Isotyps ermöglicht keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein des GPR18 in den hier verwendeten Schnittbildern (s. Abb. 20). Dies liegt vermutlich an dem Alter der Präparate und damit eingehender Degradation. Die Bildung von Eiskristallen aufgrund der langen Lagerung kann, trotz spezifischem Einbettungsmedium, ein unspezifisches Bindungsverhalten verstärken.



**Abb. 21: GPR18 in der Immunzytofluoreszenz**

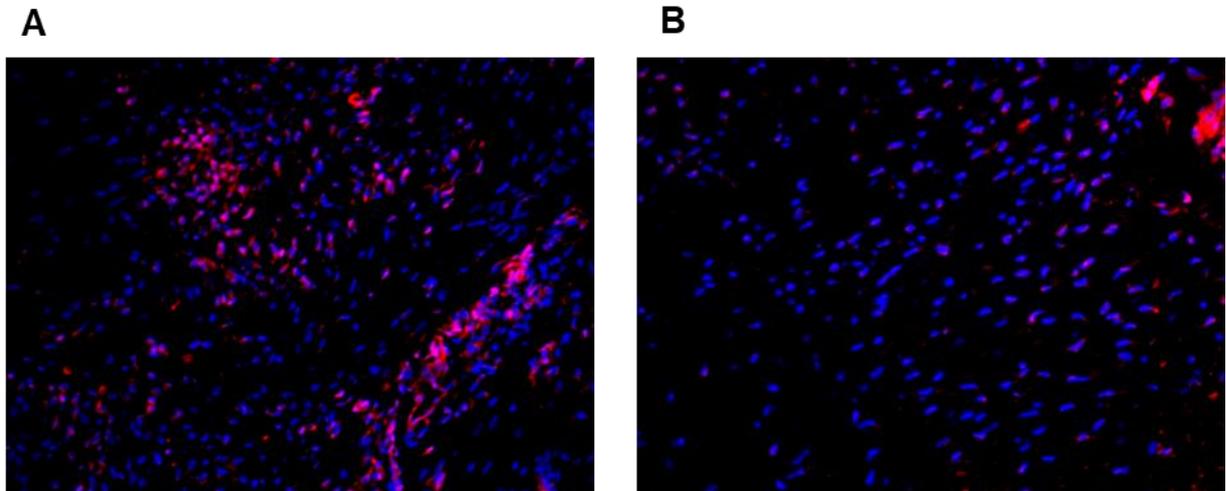
(A) Expression des GPR18 in RASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Konzentration des Antikörpers von 5 µg/ml. (B) zeigt den verwendeten polyklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. (C) Expression des GPR18 in OASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Antikörperkonzentration von 5 µg/ml. (D) zeigt den verwendeten polyklonalen Isotyp in gleicher Konzentration. Blau=DAPI, Rot= Anfärbung des GPR18, Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbtem GPR18. Vergrößerungsfaktor: 63x.

GPR 18= G-Protein gekoppelter Rezeptor 18, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Eine Darstellung des GPR18 in synovialen Schnittbildern des Knies war aufgrund eines unspezifischen Bindungsverhaltens nicht möglich, sodass der Versuch einer Darstellung in kultivierten SF erfolgte. Der GPR18 zeigte bei den verwendeten RA-Proben (zwei Proben) eine zytoplasmatische Färbung, die, im Gegensatz zum eher unspezifischen Bindungsverhalten des Isotypen, spezifisch erscheint, jedoch aufgrund des sehr unspezifischen Bindungsverhalten nicht hinreichend beurteilt werden konnte. Im Gegensatz hierzu lässt sich bei den Proben der OA-Patienten (drei Proben) keine eindeutige zytoplasmatische Färbung darstellen. Hier ist das Bindungsverhalten des Isotypen ebenfalls unspezifisch (s. Abb. 21). Zusätzlich wurde getestet, ob eine

Veränderung der Rezeptormenge nach Stimulation mit 10ng/ml INF- $\gamma$  sichtbar wird, was jedoch nicht dargestellt werden konnte.

### 3.2.5. GPR 32

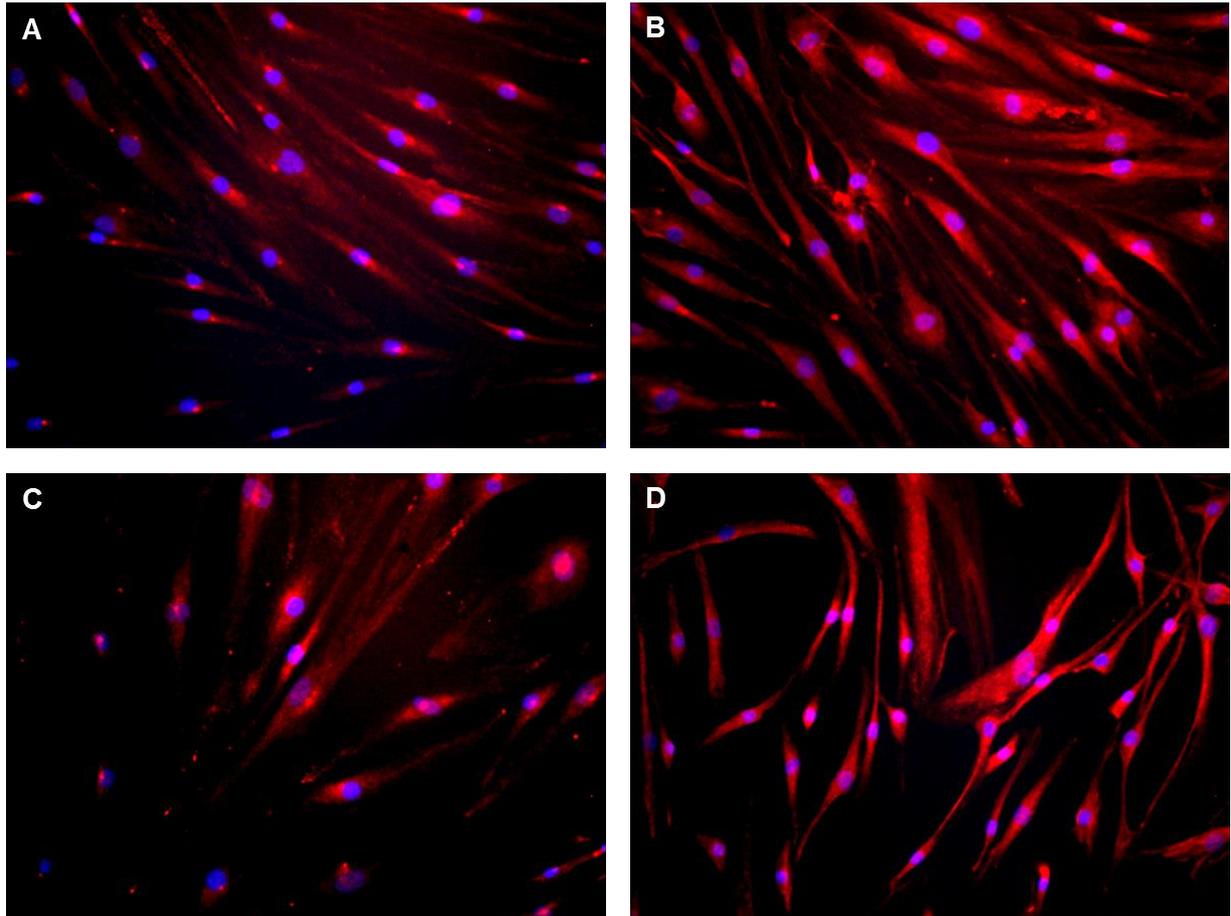


**Abb. 22:GPR 32 in der Immunfluoreszenz**

Darstellung des GPR32 in Schnittpräparaten aus einer Kniegelenksarthroskopie eines OA-Patienten. Blau= DAPI-Färbung, Rot= Färbung des GPR32 durch den Antikörper. Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbtem GPR32. (A) GPR32 mit 10 $\mu$ g/ml und unspezifischer Hintergrundfärbung, (B) Isotyp monoklonal mit 10 $\mu$ g/ml. Vergrößerungsfaktor: 32x.

GPR 32= G-Protein gekoppelter Rezeptor 32, OA= Osteoarthritis, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol,  $\mu$ g= Mikrogramm, ml= Milliliter

Zur Bestätigung des mittels Western Blot dargestellten GPR 32 erfolgte ebenfalls der Versuch einer Darstellung in der Immunfluoreszenz. Der GPR 32 gilt in der Literatur als Rezeptor des RvD1 (Krishnamoorthy et al., 2010). Insgesamt sechs der gefärbten Schnitte zeigten eine Fluoreszenz, die auf das Vorhandensein des GPR 32 hindeuten könnten. Auch hier zeigte sich der Isotyp, wahrscheinlich aufgrund des Alters der Schnittpräparate und der Bildung von Eiskristallen, unspezifisch angefärbt, sodass keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein des GPR 32 getroffen werden kann (s. Abb. 22).



**Abb. 23: GPR32 in der Immunzytofluoreszenz**

(A) Expression des GPR32 in RASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Konzentration des Antikörpers von 5 µg/ml. (B) zeigt den verwendeten polyclonalen Isotyp in gleicher Konzentration. (C) Expression des GPR32 in OASF-Fibroblasten. Verwendet wurde eine Antikörperkonzentration von 5 µg/ml. (D) zeigt den verwendeten polyclonalen Isotyp in gleicher Konzentration. Blau=DAPI, Rot= Anfärbung des GPR32, Lila=Überlagerung von DAPI-Färbung und angefärbtem GPR32. Vergrößerungsfaktor: 63x. GPR 32= G-Protein gekoppelter Rezeptor 32, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*, µg= Mikrogramm, ml= Milliliter, DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Nachdem keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein des GPR32 in synovialen Kniegelenksschnitten gemacht werden konnte, erfolgte der Versuch einer Färbung in kultivierten SF. Beim GPR 32 lag in allen Proben (drei OA, drei RA) eine zytoplasmatische Färbung der SF vor (s. Abb. 23). Ein Unterschied zwischen RASF oder OASF bestand nicht. Der verwendete polyclonale Isotyp zeigte allerdings ein ähnliches Färbemuster, sodass nicht zwischen spezifischem oder unspezifischem Bindungsverhalten unterschieden werden konnte und somit auch hier das Vorhandensein des GPR32 in SF nicht bestätigt werden konnte.

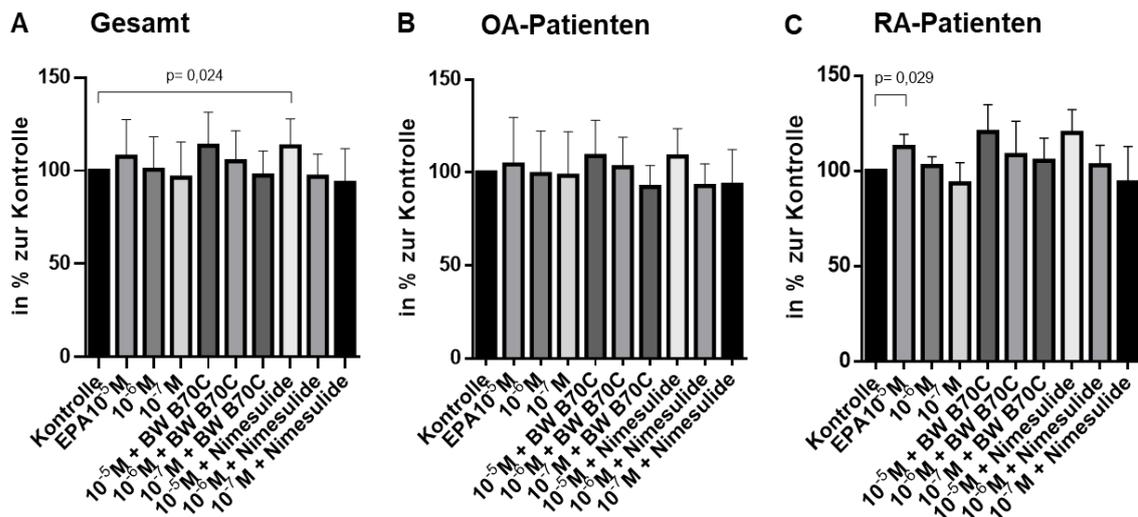
### **3.3. Quantifizierung der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion nach Stimulation mit Omega-3 Fettsäuren und Resolvin-Vorstufen von SF mittels ELISA**

Ziel der durchgeführten ELISA war es, eine mögliche Veränderung der Zytokinausschüttung von Fibroblasten nach Stimulation dieser mit Vorstufen von Resolvinen und der Omega-3 Fettsäure EPA zu messen. Ergänzend wurde die Hinzunahme von BW B70C oder Nimesulid getestet. BW B70C inhibiert die 5-Lipoxygenase (Jatana et al., 2006), während Nimesulide als NSAID die COX-2 inhibiert und so zur Entstehung von 18R-HEPE beiträgt (Singla et al., 2000, Arita et al., 2005b).

#### **3.3.1. Modulation der IL-6 Produktion**

Nachdem mittels Immunfluoreszenz und Western Blot die Expression der Rezeptoren für die Resolvine E1, D1 und D2 sowie zweier Synthesenzyme in SF verifiziert wurden, wurden verschiedene Omega-3 Fettsäuren sowie Resolvin-Vorstufen hinsichtlich einer Modulation der IL-6-Produktion getestet (s. Abb. 24- 28).

### 3.3.1.1. EPA



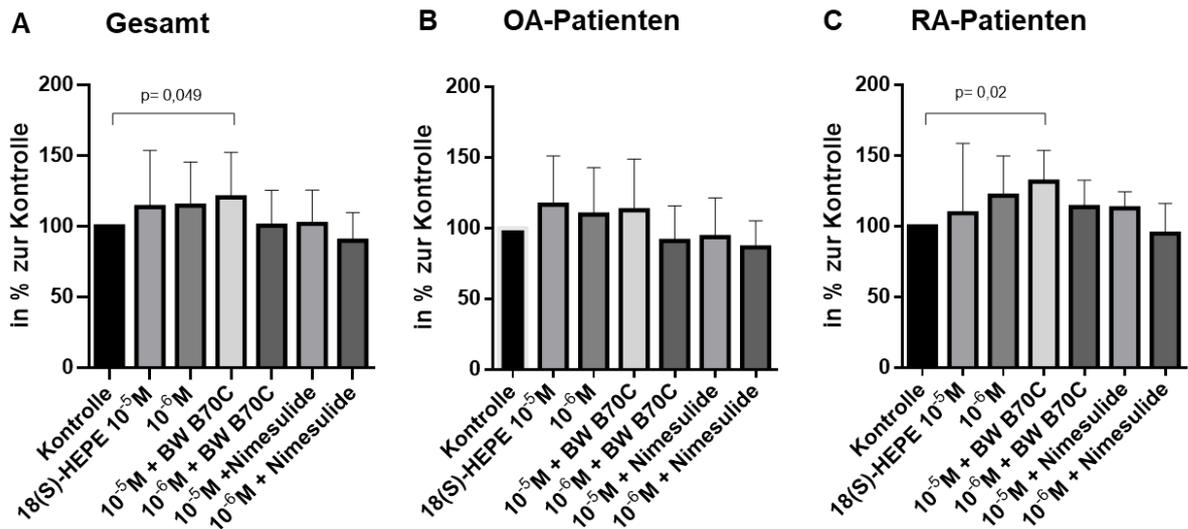
**Abb. 24: Modulation der IL-6 Produktion durch EPA**

(A) Veränderung der IL-6 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit EPA sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n=5). (B) Veränderung der IL-6 Produktion bei OASF (n=3). (C) Modulation der IL-6 Produktion bei RASF (n=2). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

EPA= Eicosapentaensäure, IL-6 = Interleukin-6, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

EPA ist eine mehrfachungesättigte Omega-3 Fettsäure und bildet das Ausgangssubstrat für die Entstehung von Resolvinen der Gruppe E (Serhan et al., 2000). Insgesamt konnte durch Stimulation mit EPA keine signifikante Modulation der IL-6 Produktion von SF beobachtet werden. Eine Kombination mit dem 5-LO Inhibitor BW B70C erbrachte ebenfalls keine signifikanten Effekte. Lediglich eine Kombination aus Nimesulide sowie EPA in einer Konzentration von 10<sup>-5</sup>M EPA zeigte eine signifikante Steigerung der IL-6 Ausschüttung um 13,1% (113,1% ± 14,65%, p= 0,024). Die Aufteilung der Patienten in OA- und RA-Patienten erbrachte ebenfalls insgesamt keine signifikante Veränderung der IL-6-Produktion. In der Gruppe der RA-Patienten zeigte lediglich die Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M EPA eine signifikante Steigerung der IL-6 Ausschüttung um 12,5% (112,5% ± 6,69%, p=0,029). Zusammenfassend zeigten somit sowohl RASF als auch OASF keine Veränderung ihrer IL-6 Ausschüttung durch Stimulation mit IL-6 sowie unter Hinzunahme von BW B70C oder Nimesulide.

### 3.3.1.2. 18(S)-HEPE



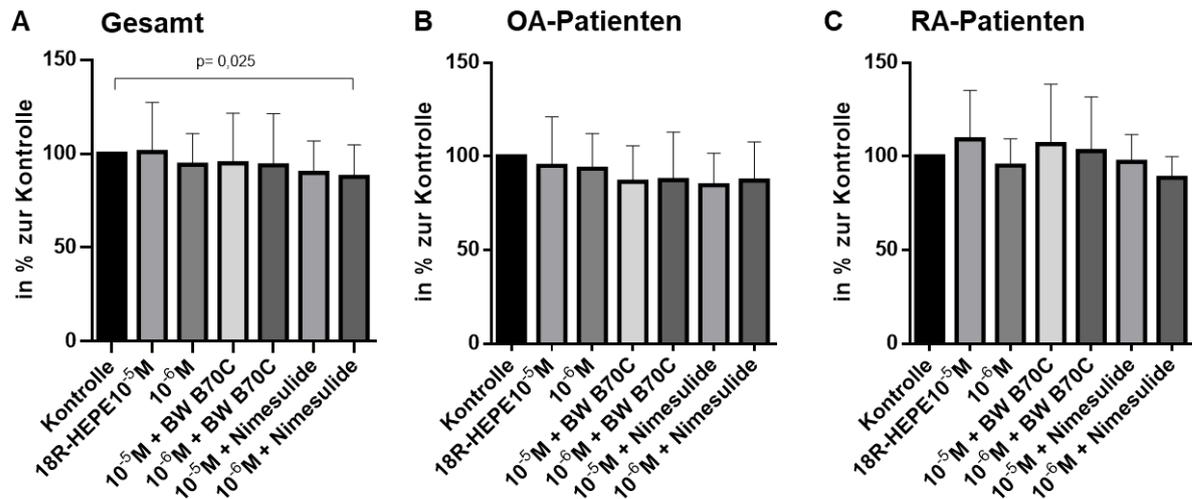
**Abb. 25: Modulation der IL-6 Produktion durch 18(S)-HEPE**

(A) Veränderung der IL-6 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 18(S)-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 7). (B) Veränderung der IL-6 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-6 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

IL-6 = Interleukin-6, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

18(S)-HEPE stellt ein Zwischenprodukt in der Entstehung der E-Resolvine dar und ist das Enantiomer von 18R-HEPE. Es entsteht ebenfalls nach Oxidierung von EPA durch COX-2 oder CYP P450 (Serhan et al., 2000, Arita et al., 2005a, Arita et al., 2005b, Oh et al., 2011). Im Allgemeinen zeigte sich nach Stimulation der SF mit 18(S)-HEPE keine einheitliche Modulation der IL-6 Ausschüttung. Lediglich bei einer Kombination mit BW B70C kam es, in der Auswertung aller stimulierten Proben, bei einer Konzentration von 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE zu einer Steigerung der IL-6 Ausschüttung um 20,7% (120,7% ± 30,89%, p=0,049). Dies zeigte sich ebenfalls in der Gruppe der RA-Patienten. Auch hier führte eine Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE in Kombination mit BW B70C zu einer Steigerung der IL-6 Ausschüttung um 31,7% (131,7% ± 22,09%, p=0,02). In der Gruppe der OA-Patienten ließ sich keine signifikante Modulation der IL-6 Ausschüttung nach Stimulation beobachten. Da sich lediglich zwei der getesteten Stimulationsbedingungen als signifikant erwiesen, kann hier im Allgemeinen nicht von einer Modulation der IL-6 Ausschüttung durch 18(S)-HEPE ausgegangen werden.

### 3.3.1.3. 18R-HEPE



**Abb. 26: Modulation der IL-6 Produktion durch 18R-HEPE**

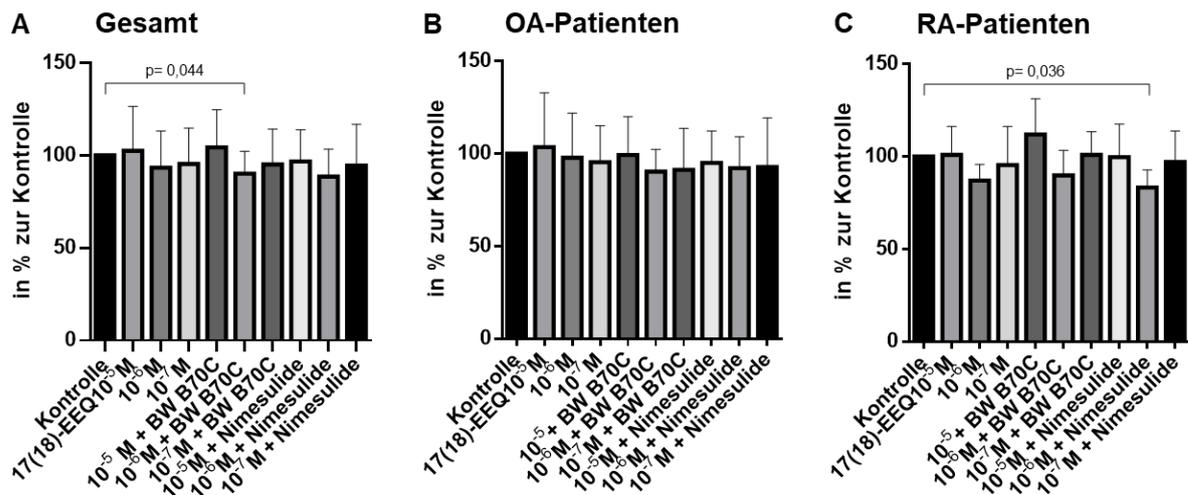
(A) Veränderung der IL-6 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 18R-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n=7). (B) Veränderung der IL-6 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-6 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

18R-HEPE= *18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid*, IL-6 = Interleukin-6, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoid arthriticsynovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

18R-HEPE entsteht aus EPA durch die COX-2 oder durch CYP P450 und stellt so das Zwischenprodukt in der Entstehung der E-Resolvine dar (Serhan et al., 2000).

Eine Stimulation der SF mit 18R-HEPE bewirkte eine Reduktion der IL-6 Ausschüttung, zeigte in der Auswertung jedoch keine statistische Signifikanz. In der Auswertung aller stimulierten Proben erwies sich lediglich die Stimulation der SF in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup>M 18R-HEPE und unter Hinzunahme von Nimesulide als signifikant. Es zeigte sich eine Reduktion der IL-6 Ausschüttung um 12,3% (87,7% ± 16,94%, p=0,025). Eine Differenzierung zwischen Proben von RA- oder OA-Patienten erbrachte ebenfalls keine signifikante Veränderung der IL-6 Ausschüttung.

### 3.3.1.4. 17(18)-EEQ



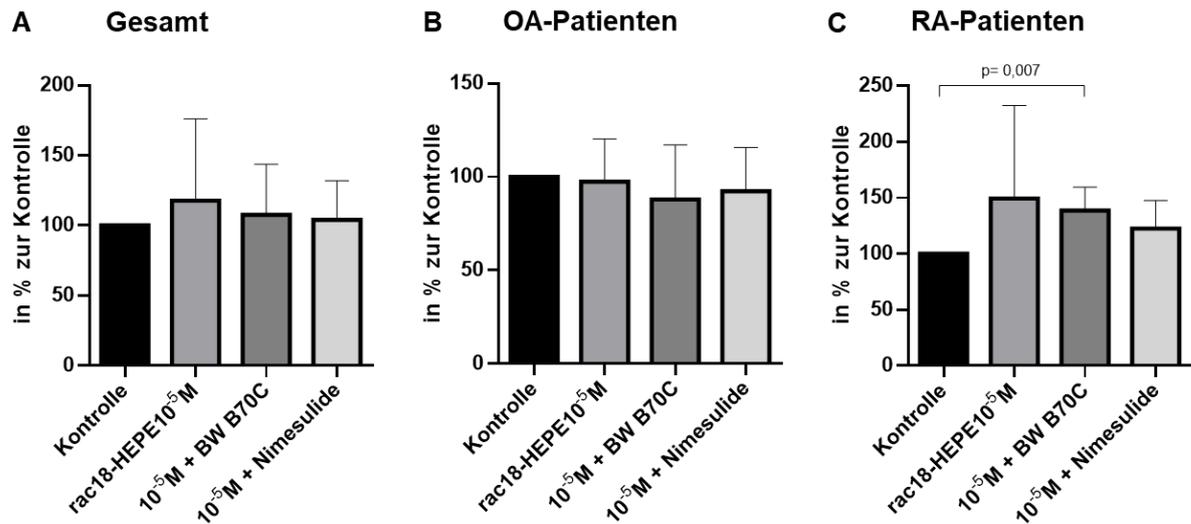
**Abb. 27: Modulation der IL-6 Produktion durch 17(18)-EEQ**

(A) Veränderung der IL-6 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 17(18)-EEQ sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 5). (B) Veränderung der IL-6 Produktion bei OASF (n=3). (C) Modulation der IL-6 Produktion bei RASF (n=2). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

IL-6 = Interleukin-6, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

17(18)-EEQ entsteht aus EPA durch die Cytochrom P450 Epoxygenase (McDougle et al., 2017). Nach Stimulation der SF mit 17(18)-EEQ konnte keine einheitliche Modulation der IL-6 Ausschüttung beobachtet werden. Lediglich bei einer Konzentration von 10<sup>-6</sup>M 17(18)-EEQ zeigte sich eine Reduktion der IL-6 Ausschüttung um 9,86% (90,14% ± 12,15%, p=0,044) in der Auswertung aller stimulierten Proben und in Kombination mit BW B70C. In der Gruppe der OA-Patienten konnte keine Veränderung der IL-6 Ausschüttung detektiert werden. In der Gruppe der RA-Patienten zeigte sich lediglich bei einer Konzentration von 10<sup>-6</sup>M 17(18)-EEQ und in Kombination mit Nimesulide eine Reduktion der IL-6 Ausschüttung um 16,73% (83,27% ± 9,5%, p=0,036).

### 3.3.1.5. Rac18-HEPE



**Abb. 28: Modulation der IL-6 Produktion durch rac18-HEPE**

(A) Veränderung der IL-6 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit rac18-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n=7). (B) Veränderung der IL-6 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-6 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

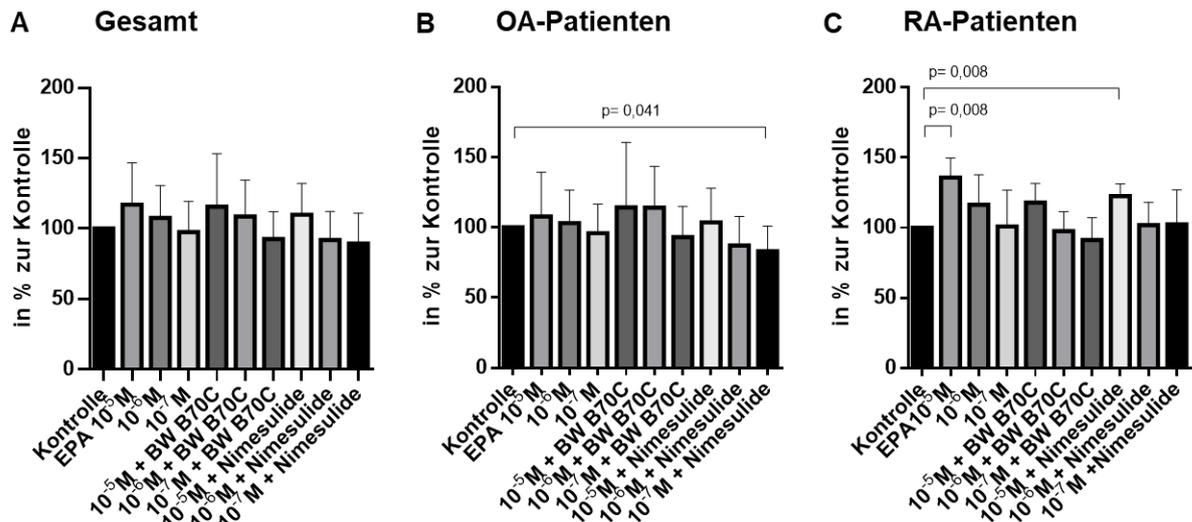
IL-6 = Interleukin-6, OA= Osteoarthrose, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

Rac18-HEPE ist ein Racemat aus 18(S)-HEPE und 18R-HEPE. Eine Stimulation der SF sollte untersuchen, inwieweit eine biologische Aktivität bei einer Kombination aus beiden Stoffen besteht (Arita et al., 2005a). In der Auswertung aller stimulierten Proben sowie in der Auswertung aller stimulierten OASF konnte keine Veränderung der IL-6 Ausschüttung nach Stimulation detektiert werden. In der Gruppe der RA-Patienten zeigten die stimulierten RASF nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M rac18-HEPE in Kombination mit BW B70C eine Steigerung der IL-6 Ausschüttung um 38,6% (138,6% ± 20,84%, p=0,007).

### 3.3.2. Modulation der IL-8 Produktion

Neben einer Veränderung der IL-6 Ausschüttung nach Stimulation mit EPA sowie Resolvin-Vorstufen wurde ebenfalls eine mögliche Modulation der IL-8 Produktion getestet (s. Abb. 29-33).

#### 3.3.2.1. EPA



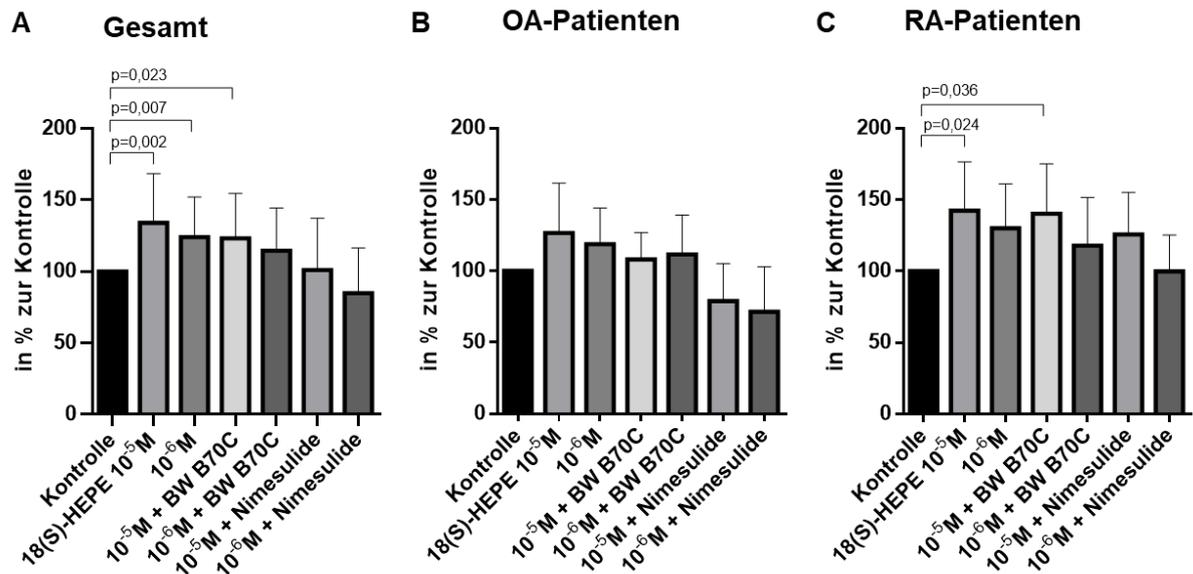
**Abb. 29: Modulation der IL-8 Produktion durch EPA**

(A) Veränderung der IL-8 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit EPA sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 6). (B) Veränderung der IL-8 Produktion bei OASF(n=4). (C) Modulation der IL-8 Produktion bei RASF (n=2). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

EPA= Eicosapentaensäure, IL-8 = Interleukin-8, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

In der Auswertung aller Proben konnte nach Stimulation mit EPA keine Veränderung der IL-8 Ausschüttung detektiert werden. In der Gruppe der OA-Patienten zeigte sich nur nach Stimulation mit 10<sup>-7</sup>M EPA in Kombination mit Nimesulide eine Reduktion der IL-8 Ausschüttung um 17% (83% ± 17,84%, p= 0,041). In der Gruppe der RA-Patienten zeigten die stimulierten RASF bei einer Konzentration von 10<sup>-5</sup>M EPA eine Steigerung der IL-8 Ausschüttung um 35,8% (135,8% ± 13,93%, p=0,008) sowie bei einer Konzentration von 10<sup>-5</sup>M EPA in Kombination mit Nimesulide eine Steigerung der IL-8 Produktion um 22,5% (122,5% ± 8,77%, p=0,008). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse keine einheitliche Modulation der IL-8 Ausschüttung.

### 3.3.2.2. 18(S)-HEPE



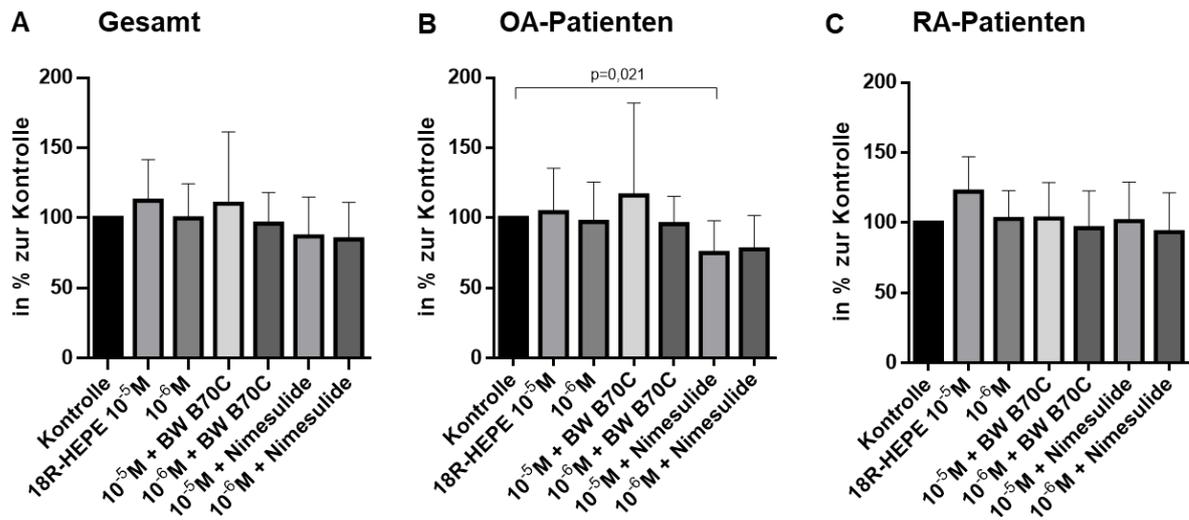
**Abb. 30: Modulation der IL-8 Produktion durch 18(S)-HEPE**

(A) Veränderung der IL-8 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 18(S)-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n=7). (B) Veränderung der IL-8 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-8 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

IL-8= Interleukin-8, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

In der Auswertung aller stimulierten Proben konnte eine signifikante Steigerung der IL-8 Ausschüttung nach Stimulation mit 18(S)-HEPE beobachtet werden. Eine Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE führte zu einer Steigerung der IL-8 Produktion um 34,1% (134,1% ± 34,53%, p=0,002), eine Stimulation mit 10<sup>-6</sup>M 18(S)-HEPE zu einer Steigerung um 24,2% (124,2% ± 27,94%, p=0,007). Auch die Kombination aus BW B70C und 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE führte zu einer gesteigerten IL-8 Menge um 23,3% (123% ± 31,5%, p=0,023). In der Gruppe der OA-Patienten konnte nach Stimulation mit 18(S)-HEPE keine Modulation der IL-8 Produktion detektiert werden. Eine Veränderung der IL-8 Produktion konnte jedoch in der Gruppe der RA-Patienten nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE um 42,5% (142,5% ± 34,16%, p=0,024) sowie nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE in Kombination mit BW B70C um 40,2% (140,2% ± 34,94%, p=0,036) beobachtet werden.

### 3.3.2.3. 18R HEPE



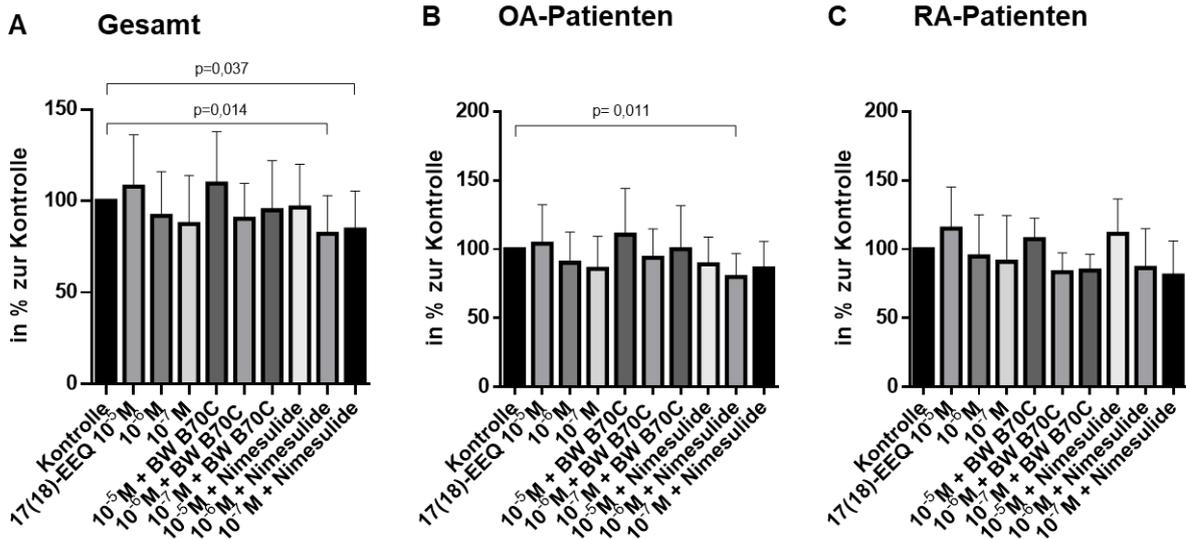
**Abb. 31: Modulation der IL-8 Produktion durch 18R-HEPE**

(A) Veränderung der IL-8 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 18R-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 7). (B) Veränderung der IL-8 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-8 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

18R-HEPE= *18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid*, IL-8= Interleukin-8, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

In der Auswertung aller stimulierten Proben sowie in der Gruppe der RA-Patienten konnte keine Modulation der IL-8 Produktion durch 18R-HEPE beobachtet werden. Lediglich in der Gruppe der OA-Patienten zeigten die mit 10<sup>-5</sup>M 18R-HEPE stimulierten OASF in Kombination mit Nimesulide eine Reduktion der IL-8 Ausschüttung um 24,88% (75,12% ± 22,92%, p=0,021). Im Allgemeinen ist anhand der erhobenen Befunde nicht von einer einheitlichen Veränderung der IL-8 Produktion durch 18R-HEPE auszugehen.

### 3.3.2.4. 17(18)-EEQ



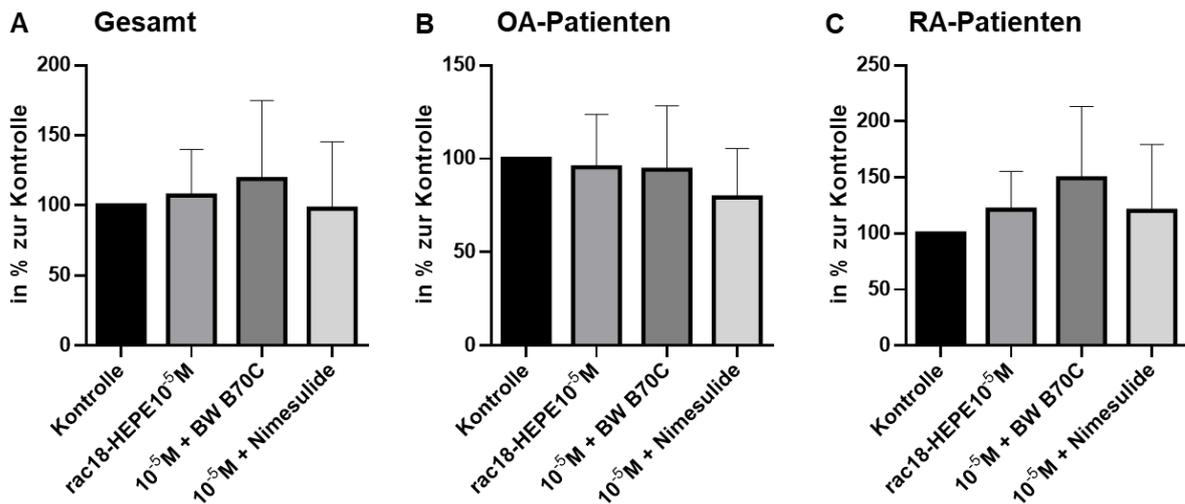
**Abb. 32: Modulation der IL-8 Produktion durch 17(18)-EEQ**

(A) Veränderung der IL-8 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 17(18)-EEQ sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 6). (B) Veränderung der IL-8 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-8 Produktion bei RASF (n=2). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

IL-8= Interleukin-8, OA= Osteoarthrose, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritisic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

Eine Stimulation von SF mit 17(18)-EEQ in Kombination mit Nimesulide zeigte in der Gesamtauswertung aller Proben eine Reduktion der IL-8 Ausschüttung. Eine Konzentration von 10<sup>-6</sup>M 17(18)-EEQ reduzierte die IL-8 Produktion um 17,91% (82,09% ± 20,85%, p=0,014), eine Konzentration von 10<sup>-7</sup>M 17(18)-EEQ um 15,66% (84,34% ± 21,07%, p=0,037). In der Gruppe der OA-Patienten konnte eine Reduktion der IL-8 Produktion um 20,11% (79,89% ± 17%, p=0,011) bei einer Konzentration von 10<sup>-6</sup>M 17(18)-EEQ in Kombination mit Nimesulide beobachtet werden. In der Gruppe der RA-Patienten zeigte sich keine Veränderung der IL-8 Ausschüttung.

### 3.3.2.5. Rac18-HEPE



**Abb. 33: Modulation der IL-8 Produktion durch rac18-HEPE**

(A) Veränderung der IL-8 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit rac18-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 7). (B) Veränderung der IL-8 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der IL-8 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

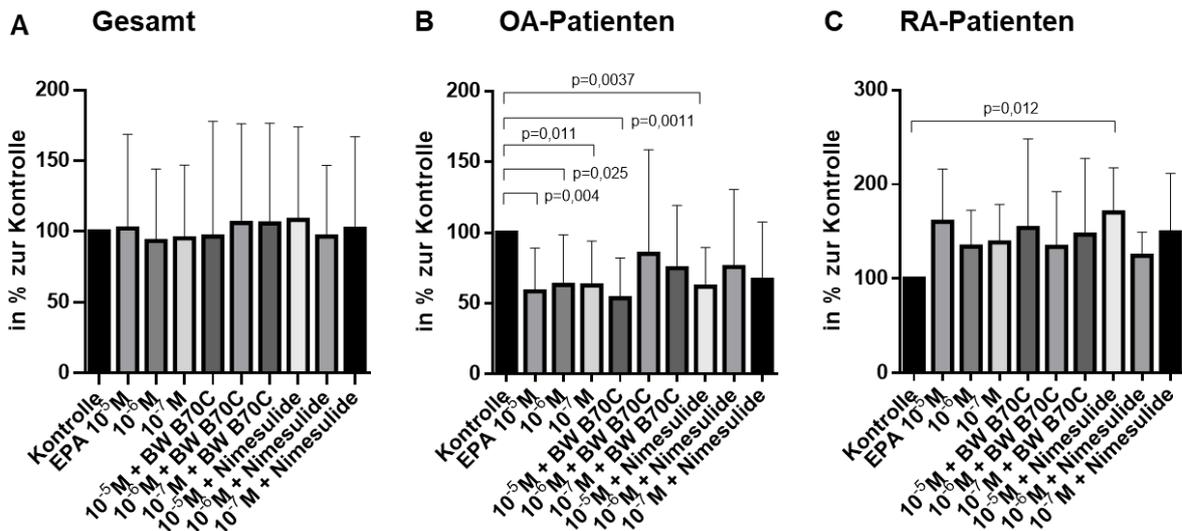
IL-8= Interleukin-8, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

Die Stimulation von SF mit  $10^{-5}$ M rac18-HEPE erbrachte keine Veränderung der IL-8 Produktion nach Stimulation. Sowohl in der Auswertung aller stimulierten Proben sowie nach Aufteilung in stimulierte RASF oder OASF konnte keine signifikante Modulation der IL-8 Ausschüttung beobachtet werden.

### 3.3.3. Modulation der MMP-3 Produktion

MMP-3 vermittelt den Abbau verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagene oder Fibronectin) und ist bei der RA für die Degradation von Knorpel verantwortlich. Eine Reduktion der MMP-3 Produktion könnte somit Knorpelschäden minimieren. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Omega-3 Fettsäuren sowie Resolvin-Vorstufen auf die MMP-3 Produktion untersucht (Distler et al., 2005, Kikuchi et al., 1996) (Abb. 34-38).

### 3.3.3.1. EPA



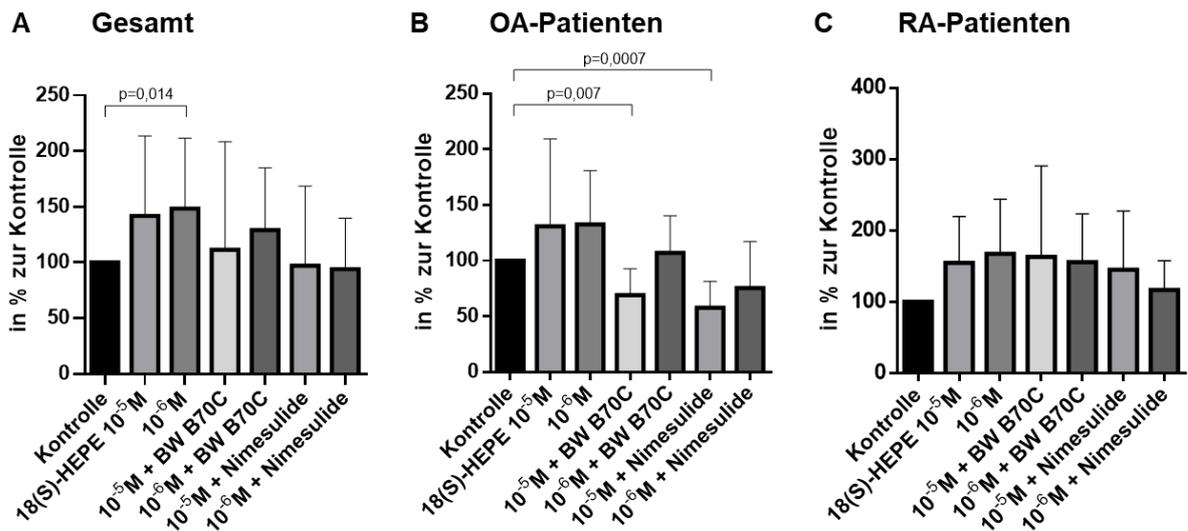
**Abb. 34: Modulation der MMP-3 Produktion durch EPA**

(A) Veränderung der MMP-3 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit EPA sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 7). (B) Veränderung der MMP-3 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der MMP-3 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

EPA= Eicosapentaensäure, MMP-3= Metalloproteinase-3, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

In der Auswertung aller stimulierten Proben konnte keine signifikante Veränderung der MMP-3 Produktion nach Stimulation mit EPA beobachtet werden. Die Gruppe der OA-Patienten zeigte allerdings eine konstante, signifikante Reduktion der MMP-3 Ausschüttung nach Stimulation mit EPA. Bei einer Konzentration von 10<sup>-5</sup>M EPA kam es zu einer Reduktion der MMP-3 Ausschüttung um 41,47% (58,53% ± 30,58%, p=0,004), bei einer Konzentration von 10<sup>-6</sup>M EPA zu einer Reduktion um 36,97% (63,03% ± 35,47%, p=0,025) sowie bei einer Konzentration von 10<sup>-7</sup>M EPA zu einer Reduktion von 37,31% (62,69% ± 31,39%, p=0,011). In Kombination mit BW B70C führte eine Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M EPA zu einer um 46,26% (53,74% ± 28,58%, p=0,0011) reduzierten MMP-3 Ausschüttung. Eine Kombination aus 10<sup>-5</sup>M EPA und Nimesulide führte zu einer Minderung der MMP-3 Produktion um 38,16% (61,84% ± 27,56%, p=0,0037). In der Gruppe der RA-Patienten zeigte sich bei einer Konzentration von 10<sup>-5</sup>M EPA in Kombination mit Nimesulide eine Steigerung der MMP-3 Produktion um 70,3% (170,3% ± 47,27%, p=0,012).

### 3.3.3.2. 18(S)-HEPE



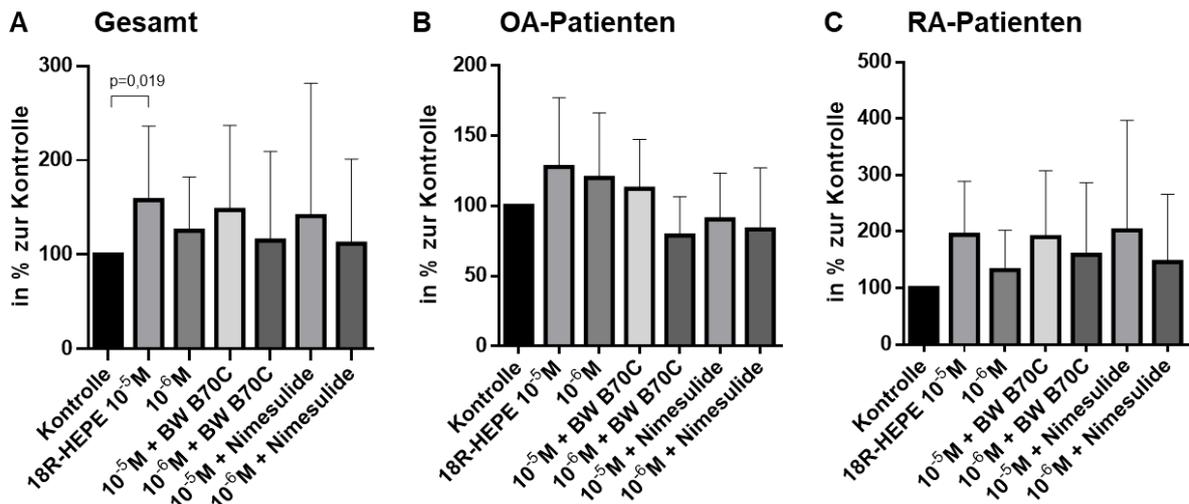
**Abb. 35: Modulation der MMP-3 Produktion durch 18(S)-HEPE**

(A) Veränderung der MMP-3 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 18(S)-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n=7). (B) Veränderung der MMP-3 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der MMP-3 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

MMP-3= Metalloproteinase-3, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= rheumatoidarthritis synovial fibroblasts, OASF= osteoarthritic synovial fibroblasts

Nach Stimulation von SF mit 10<sup>-6</sup>M 18(S)-HEPE konnte in der Auswertung aller stimulierten Proben eine signifikante Steigerung der MMP-3 Produktion um 48,4% (148,4% ± 63,14%, p=0,014) beobachtet werden. Weitere signifikante Veränderungen zeigten sich hier nicht. In der Gruppe der OA-Patienten zeigte sich eine Reduktion der MMP-3 Ausschüttung um 30,97% (69,03% ± 23,73%, p=0,007) nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE in Kombination mit BW B70C sowie nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18(S)-HEPE in Kombination mit Nimesulide um 42,23% (57,77% ± 23,65%, p=0,0007). Eine Stimulation von RASF erbrachte keine signifikante Modulation der MMP-3 Ausschüttung.

### 3.3.3.3. 18R-HEPE



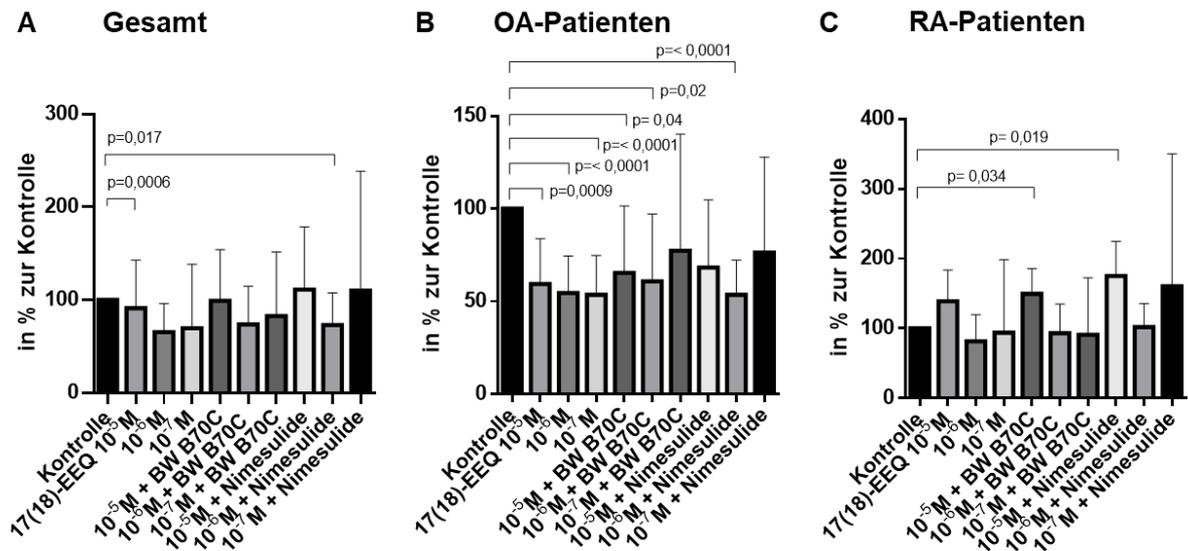
**Abb. 36: Modulation der MMP-3 Produktion durch 18R-HEPE**

(A) Veränderung der MMP-3 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 18R-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n= 7). (B) Veränderung der MMP-3 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der MMP-3 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

18R-HEPE= *18R-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid*, MMP-3= Metalloproteinase-3, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritic synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

Nach Stimulation von SF mit 18R-HEPE zeigte sich in der Gesamtauswertung aller stimulierten Proben lediglich eine Steigerung der MMP-3 Produktion um 57,8% (157,8% ± 78,64%, p=0,019) nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup>M 18R-HEPE. Eine Aufteilung der stimulierten Proben in RASF oder OASF erbrachte in der statistischen Auswertung keine signifikante Veränderung der MMP-3 Produktion.

### 3.3.3.4. 17(18)-EEQ



**Abb. 37: Modulation der MMP-3 Produktion durch 17(18)-EEQ**

(A) Veränderung der MMP-3 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit 17(18)-EEQ sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben (n=7). (B) Veränderung der MMP-3 Produktion bei OASF (n=4). (C) Modulation der MMP-3 Produktion bei RASF (n=3). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

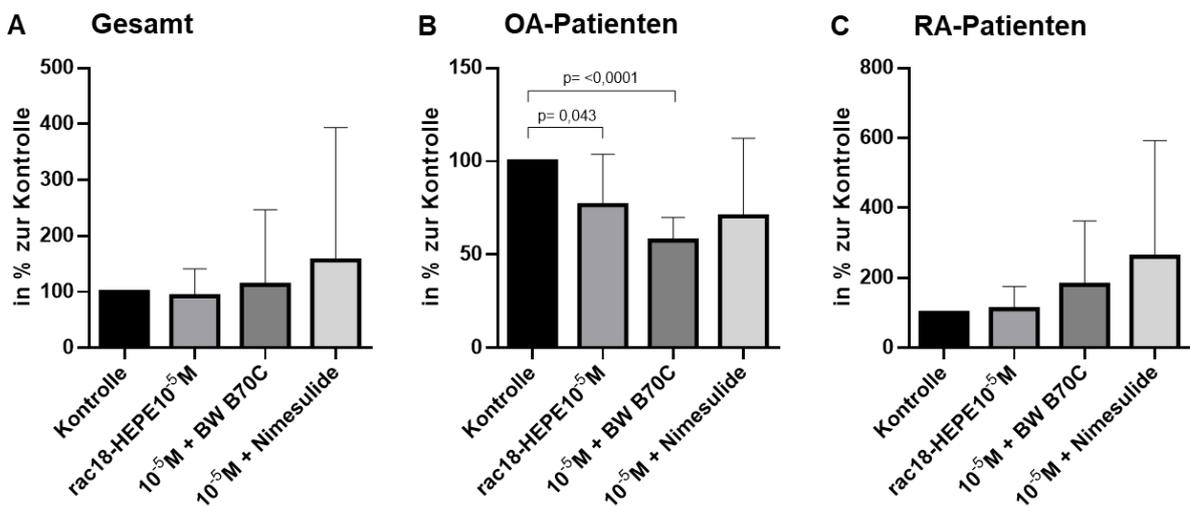
MMP-3= Metalloproteinase-3, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= *rheumatoidarthritis synovial fibroblasts*, OASF= *osteoarthritic synovial fibroblasts*

In der Gesamtauswertung aller stimulierten Proben konnte eine Reduktion der MMP-3 Produktion durch Stimulation mit  $10^{-6}$ M 17(18)-EEQ um 34,65% ( $65,35\% \pm 30,79\%$ ,  $p=0,0006$ ) beobachtet werden. Auch eine Kombination mit Nimesulide bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M 17(18)-EEQ erbrachte eine Reduktion um 27,06% ( $72,94\% \pm 34,79\%$ ,  $p=0,017$ ).

Eine einheitliche, signifikante Reduktion der MMP-3 Produktion nach Stimulation konnte in der Gruppe der OA-Patienten beobachtet werden. Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$ M 17(18)-EEQ zeigte sich eine Reduktion der MMP-3 Ausschüttung um 40,6% ( $59,4\% \pm 24,46\%$ ,  $p=0,0009$ ), bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M 17(18)-EEQ um 45,43% ( $54,47\% \pm 19,97\%$ ,  $p<0,0001$ ) sowie bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M 17(18)-EEQ um 46,43% ( $53,57\% \pm 21,2\%$ ,  $p<0,0001$ ). In Kombination mit BW B70C führte eine Stimulation mit  $10^{-5}$ M 17(18)-EEQ zu einer Reduktion der MMP-3 Ausschüttung um 34,52% ( $65,48\% \pm 35,94\%$ ,  $p=0,04$ ) sowie um 39,23% nach Stimulation mit  $10^{-6}$ M 17(18)-EEQ ( $60,77\% \pm 36,44\%$ ,  $p=0,02$ ). Die Kombination mit

Nimesulide führte lediglich bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M 17(18)-EEQ zu einer Reduktion der MMP-3 Ausschüttung um 46,41% ( $53,59\% \pm 18,68$ ,  $p < 0,0001$ ). Die Stimulation der RASF erbrachte eine gesteigerte MMP-3 Ausschüttung nach Stimulation mit  $10^{-5}$ M 17(18)-EEQ in Kombination mit BW B70C um 49,5% ( $149,5\% \pm 36,4$ ,  $p = 0,034$ ). Eine Kombination aus  $10^{-5}$ M 17(18)-EEQ und Nimesulide erbrachte ebenfalls eine gesteigerte MMP-3 Produktion um 75,3% ( $175,3\% \pm 49,17$ ,  $p = 0,019$ ).

### 3.3.3.5. Rac18-HEPE



**Abb. 38: Modulation der MMP-3 Produktion durch 18rac-HEPE**

(A) Veränderung der MMP-3 Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation mit rac18-HEPE sowie in Kombination mit BW B70C oder Nimesulide. Auswertung aller getesteten Proben ( $n = 7$ ). (B) Veränderung der MMP-3 Produktion bei OASF ( $n = 4$ ). (C) Modulation der MMP-3 Produktion bei RASF ( $n = 3$ ). Die Proben wurden mittels ANOVA und Dunnett's Test verglichen. Alle Werte sind als Mittelwert mit einfachem Standardfehler dargestellt.

MMP-3= Metalloproteinase-3, OA= Osteoarthritis, RA= rheumatoide Arthritis, RASF= rheumatoidarthritic synovial fibroblasts, OASF= osteoarthritic synovial fibroblasts

In der Gesamtauswertung aller stimulierten Proben zeigte sich keine Veränderung der MMP-3 Ausschüttung nach Stimulation mit  $10^{-5}$ M rac18-HEPE. In der Gruppe der OA-Patienten konnte eine Reduktion der MMP-3 Produktion nach Stimulation mit  $10^{-5}$ M rac18-HEPE um 23,44% ( $76,56\% \pm 27,28\%$ ,  $p = 0,043$ ) beobachtet werden sowie in Kombination mit BW B70C um 42,46% ( $57,54\% \pm 12,46$ ,  $p < 0,0001$ ). In der Gruppe der RA-Patienten konnte keine signifikante Veränderung der MMP-3 Modulation beobachtet werden.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Fibroblasten**

Die verwendeten Fibroblasten entstammten Materialproben, die während einer Kniegelenksarthroskopie von Patienten mit einer RA oder OA gewonnen wurden. Gheorge et al (Gheorge et al., 2009) und Westmann et al. (Westman et al., 2004) beschrieben eine ähnliche Vorgehensweise. Die Gewinnung sowie das Kultivieren der Fibroblasten waren vergleichbar mit den Versuchen von Liagre et al. (Liagre et al., 1997).

### **4.2. Western Blot**

Die Durchführung des Western Blots orientierte sich an laborinternen Standards. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Der GPR 18 wurde bereits in vorausgegangenen Publikationen verwendet. Die in diesem Fall durch Zhang et al. verwendete Proteinmenge aus murinen Endothelzellen belief sich, statt 5µg Protein pro Probe, auf 50µg Protein pro Probe. Die Gelelektrophorese, das Blocken der Membran sowie die Verwendung des primären und sekundären Antikörpers waren vergleichbar mit den durchgeführten Versuchen (Zhang et al., 2016). Der für die 12-Lipoxygenase verwendete Antikörper wurde bereits mittels Western Blot zur Detektion der 12-LO in Zellen eines Magenkarzinoms verwendet. Auch hier ähnelte sich der Versuchsaufbau bezüglich Elektrophorese, Blotting sowie Verwendung des primären und sekundären Antikörpers (Yang et al., 2019).

### **4.3. Immunfluoreszierende Verfahren**

Der Ablauf der Immunfluoreszenz und Immunzytochemie orientierte sich an laborinternen Standards. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Der GPR18 Antikörper wurde in der Literatur bereits zum Nachweis des Rezeptors in glatten Muskelzellen der A. umbilicalis mittels Immunzytochemie genutzt. Hier wurden die ausgesäten Zellen mit 10% Formalin-Lösung fixiert, aber ähnlich zu den durchgeführten Versuchen mit 0,2% Triton in PBS gewaschen und die entsprechenden Antikörper in gleichem Medium inkubiert (Ulu et al., 2019). Dakin et al. verwendeten den 15-LO Antikörper bereits, um das Enzym in Stromazellen einer Schultersehne durch Immunfluoreszenz zu detektieren. Ähnlich zu

den durchgeführten Versuchen erfolgte auch hier eine Stimulation der Zellen mit 10ng/ml IL-1 $\beta$ . Das Fixieren der Zellen erfolgte mittels 5% Methanol-Lösung, die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit 5% *Goat-Serum* in PBS, statt 2% *Goat-Serum*. Das Waschen sowie die Inkubation der Antikörper erfolgte für die gleiche Zeitspanne in PBS ohne Triton oder *Goat Serum* (Dakin et al., 2019, Dakin et al., 2015). Liagre et al. nutzen den 12-LO Antikörper bereits zur Visualisierung der 12-LO in Fibroblasten. Eine Stimulation der verwendeten Fibroblasten erfolgte mit 50ng/ml IL-1 $\beta$ . Die Fixierung der Fibroblasten erfolgte mit Methanol und Aceton, das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 3% BSA in PBS (Liagre et al., 1997). Auch der GPR32 konnte bereits mittels des verwendeten Antikörpers per Immunfluoreszenz auf Fibroblasten des Peridontiums dargestellt werden. Hier wurden die Fibroblasten mit 5% PFA fixiert, mit 5% *Goat-Serum* in PBS geblockt, der genutzte Antikörper 1:200 in 5% *Goat Serum* und PBS verdünnt und über Nacht sowie am Folgetag mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Zarrouh et al., 2022).

## **4.4. Rezeptorbesatz synovialer Fibroblasten**

### **4.4.1. GPR32**

Der GPR 32 konnte mittels Western Blot in SF, von Patienten mit einer RA und OA, nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang mittels Western Blot, ein Nachweis mittels Immunfloreszenz war nicht erfolgreich. Nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen scheint es sowohl bei Patienten mit einer RA als auch mit einer OA zu einer Reduktion der Bandenintensität zu kommen. Aktuell liegen keine weiteren publizierten Daten zum Nachweis des GPR32 in SF von Patienten mit RA oder OA vor. Ein Nachweis des GPR32 gelang allerdings bereits in Fibroblasten des Periodontiums. Mittels Immunfluoreszenz wurde der GPR32 auf Fibroblasten detektiert und zeigte in der FACS-Analyse eine Steigerung der Expressionsmenge nach Stimulation mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  (Zarrouh et al., 2022). Im Gegensatz dazu konnten Krishnamoorthy et al. keine Veränderung der Expressionsmenge des Rezeptors nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  detektieren. Die verwendete TNF- $\alpha$  Konzentration lag allerdings bei 5ng/ml, im Gegensatz zu der hier verwendeten Konzentration von 10ng/ml (Krishnamoorthy et al., 2010). Die Durchführung der Immunfluoreszenz glich der hier verwendeten Methodik. Weshalb der Nachweis des GPR32 in aus Kniegelenksarthroskopien gewonnenen Schnittpräparaten nicht

möglich war, könnte auf das Alter der verwendeten Proben und damit einhergehende Lagerungsdauer und Degradation zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mittels der verwendeten Methodik der GPR32, neben seinem Vorliegen auf Fibroblasten und Monozyten bzw. PMNs (Krishnamoorthy et al., 2010), auch auf SF detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Resolvine bzw. Resolvin D1 auch in SF ihre Wirkung über den GPR32 entfalten können. Unklar bleibt weiterhin, inwieweit eine Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen die Rezeptorexpression verändert. Anhand publizierter Daten wäre eine Steigerung des Rezeptorbesatzes nach Inkubation erwartbar gewesen, ebenso mutmaßlich eine Veränderung im Rezeptorbesatz zwischen Patienten mit einer OA oder RA.

#### **4.4.2. GPR 18**

Mittels Western Blots gelang der Nachweis des GPR18 in SF sowohl bei Patienten mit OA als auch mit RA. Es konnte eine signifikante Steigerung der Rezeptorexpression nach Stimulation mit INF- $\gamma$  sowie INF- $\gamma$  in Kombination mit TNF- $\alpha$  in der Gruppe der OA-Patienten nachgewiesen werden. Patienten mit einer RA zeigten eine Reduktion des Rezeptorbesatzes nach Stimulation, während es bei Patienten mit einer OA insgesamt zu einer Steigerung der Rezeptormenge kam. Neben der Steigerung der Rezeptormenge durch Stimulation mit INF- $\gamma$ , zeigte sich außerdem eine Reduktion der Rezeptormenge nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ , auch bei Patienten mit einer OA.

Der für Resolvin D2 selektive GPR18 wurde mittels FACS-Analyse auf PMNs, Monozyten und Makrophagen nachgewiesen (Chiang et al., 2015). Durch immunhistochemische Färbung gelang auf humanen Koronararterien der Nachweis des GPR18 mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Ein Nachweis des GPR18 in SF gelang bisher nicht. Ebenso wurde die Wirkungsweise von Resolvin D2 bisher nicht in SF untersucht. Vergleichswerte bezüglich der Darstellung des GPR18 in SF und der Wirkungsweise von proinflammatorischen Zytokinen auf den GPR18 liegen demnach nicht vor. Bisher publizierte Daten beschreiben lediglich, dass die Behandlung von Mäusen mit Resolvin D2 über den GPR18 die Menge an atherosklerotischen Läsionen reduzieren konnte (Bardin et al., 2022).

Insgesamt legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass eine Stimulation mit pro-entzündlichen Reizen auch zu einer Steigerung der anti-entzündlichen Mediatoren führt, um so zu einer schnellen Auflösung der Entzündungsreaktion beizutragen.

Bardin et al. konnten zeigen, dass die Expressionsmenge des GPR18 in einer frühen Phase der Atherosklerose gesteigert ist, während der Rezeptorbesatz mit fortschreitender Artherosklerose wieder abnimmt. Dieser Effekt könnte so auch bei einer persistierenden RA der Fall sein. Der Rezeptorbesatz von GPR18 nimmt mit fortschreitender Krankheitsdauer ab, sodass keine Steigerung der Rezeptormenge durch proinflammatorische Zytokine detektiert werden kann und somit die Auflösung einer Entzündungsreaktion durch antiinflammatorische Mediatoren erschwert wird (Bardin et al., 2022).

Liu et al. beschrieben eine Veränderung der SF zu einem antiinflammatorischen Phänotyp nach Stimulation mit INF- $\gamma$  (Liu et al., 2023). Auch die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung des Rezeptorbesatzes von GPR18 in der Gruppe der OA-Patienten, also einer Verstärkung eines antiinflammatorischen Signalweges, nach Stimulation mit INF- $\gamma$ , würde dieser These entsprechen. Ebenso zeigte eine weitere Studie eine Steigerung der TNF- $\alpha$ -induzierten Proliferation von SF durch simultane Stimulation mit INF- $\gamma$  bei gleichzeitiger Reduktion der IL-6 und IL-8 Produktion von SF (Lowin et al., 2020). Auch hier spielt INF- $\gamma$  eine antiinflammatorische Rolle.

Unklar bleibt wieso IL-1 $\beta$  zu einer generellen Reduktion des Rezeptorbesatzes sowohl bei Patienten mit RA als auch mit OA führt. Möglich wären antagonisierende Effekte der verschiedenen Zytokine und somit ein proinflammatorischer Effekt von IL-1 $\beta$  auf SF.

#### **4.4.3. ChemR23**

Der ChemR23 konnte mittels Western Blot auf SF detektiert werden. Insgesamt kam es zu einer Steigerung des Rezeptorbesatzes nach Stimulation mit Zytokinen. Arita et al. konnten den ChemR23 bereits auf Monozyten und in geringen Mengen T-Lymphozyten mittels RT-PCR nachweisen. Eine Steigerung der Expressionsmenge des Rezeptors konnte nach 6h bzw. 24h Inkubation nach Stimulation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$  sowie 25ng/ml IFN- $\gamma$  beobachtet werden (Arita et al., 2005a). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den hier durchgeführten Experimenten nur eine Steigerung der ChemR23 Expression nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , jedoch eine Reduktion nach Stimulation mit INF- $\gamma$ . Zu unterscheiden sind hier die zur Stimulation verwendeten Zytokin-Konzentrationen. Während Arita et al. eine Konzentration von 25ng/ml IFN- $\gamma$  nutzen, lag die verwendete Konzentration von INF- $\gamma$  bei 10ng/ml. Ein weiterer Nachweis des Chem23 Rezeptors gelang mittels Northern Blot. Auch hier gelang der

Nachweis auf aus peripherem Blut gewonnene Leukozyten. Der ChemR23 konnte auf Makrophagen sowie Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis des ChemR23 auf synovialen Proben von Patienten mit RA oder OA erfolgte bereits durch Kaneko et al. Es gelang die Darstellung des ChemR23 in SF mittels Immunfluoreszenz und Western Blot. Die Expressionsmenge des ChemR23 war bei Patienten mit RA im Vergleich zu Patienten mit OA erhöht. Weiterhin zeigte eine Stimulation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$ , 100ng/ml IFN- $\gamma$  sowie 5ng/ml IL-1 $\beta$  keine Veränderung der Expressionsmenge des Rezeptors bei Patienten mit RA (Kaneko et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der ChemR23, vergleichbar mit den Versuchen von Kaneko et al., ebenfalls mittels Western Blot auf SF dargestellt werden konnte. Eine Steigerung der Expressionsmenge nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen konnte in den durchgeführten Versuchen, ähnlich den Ergebnissen von Arita et al., dargestellt werden (Arita et al., 2005a).

#### **4.4.4. FPRL1 Rezeptor**

Der FPRL1 Rezeptor konnte als Rezeptor für Resolvin D1 mittels eines  $\beta$ -arrestin-Recruitment Assays identifiziert werden (Krishnamoorthy et al., 2010). Der Nachweis des Rezeptors, in oben genannter Studie als spezifischer Rezeptor für Lipoxin A4 identifiziert, gelang bereits in SF (Sodin-Semrl et al., 2000). Die verwendeten SF wurden ebenfalls im Rahmen von Kniegelenksarthroskopien gewonnen. Eine Stimulation der verwendeten Fibroblasten erfolgte mit 1 ng/ml IL-1 $\beta$ . Mittels RT-PCR konnte eine Steigerung der Expressionsmenge des amplifizierten Rezeptorfragmentes nach Stimulation dargestellt werden. Sodin-Semrl et al. konnten außerdem eine durch Lipoxin A4 hervorgerufene Inhibierung der MMP-3, IL-6 und IL-8 Ausschüttung darstellen. Auch O'Hara et al. wiesen den FPRL1 Rezeptor in SF bei Patienten mit RA mittels RT-PCR sowie *Southern Blotting* nach (O'Hara et al., 2004). Eine Steigerung des Rezeptorbesatzes konnte nach Stimulation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. In geringem Maße zeigte sich auch eine Steigerung des Rezeptors nach Stimulation mit 10ng/ml IL-1 $\beta$  (O'Hara et al., 2004). Ein Vorliegen des FPRL1 Rezeptors in den hier untersuchten SF von Patienten mit RA wäre dementsprechend passend zu den bereits publizierten Daten gewesen, da es sich ebenfalls um im Rahmen von Arthroskopien gewonnene Fibroblasten handelte. Zu unterscheiden ist jedoch, dass ein entsprechender Nachweis des FPRL1 Rezeptors auf SF mittels Immunfluoreszenz oder Western Blot bisher nicht publiziert wurde. Der hier

verwendete Antikörper wurde dementsprechend bisher nicht auf SF, sondern lediglich auf humanen Lungengewebsproben verwendet, sodass unklar ist inwieweit ein Nachweis des FPRL1 Rezeptors auf SF durch diesen Antikörper verlässlich möglich ist. (Hsiao et al., 2015).

#### **4.4.5. 5-Lipoxygenase**

Bei der 5-LO handelt es sich um ein bereits in Leukozyten nachgewiesenes Enzym, welches die Konversion von 18R-HEPE zu RvE sowie von 17S-HpDHA und 17R-HDHA zu RvD katalysiert (Serhan et al., 2000, Serhan et al., 2002).

Der Nachweis der 5-Lipoxygenase gelang mittels Immunzytochemie im Nucleus von SF. Bereits Gheorge et al. konnten die 5-LO mittels Immunfluoreszenz in synovialem Gewebe von Patienten mit einer RA sowie OA darstellen. Bei Patienten mit RA wiesen hauptsächlich Makrophagen, Neutrophile und Mastzellen die 5-LO auf. SF wurden jedoch nicht untersucht. Die Darstellung gelang in der synovialen Deckzell-Schicht sowie subsynovialem Gewebe. Patienten mit OA zeigten insgesamt eine geringere Expression der 5-LO als Patienten mit RA (Gheorghe et al., 2009).

#### **4.4.6. 15-Lipoxygenase**

Durch die 15-LO entsteht aus DHA das Zwischenprodukt 17S-HpDHA (Hong et al., 2003, Sun et al., 2007). Der Nachweis der 15-LO gelang ebenfalls durch Immunzytochemie in OASF und RASF. Mittels Western Blot ließ sich bei unspezifischem Bindungsverhalten kein sicherer Nachweis der 15-LO in SF erbringen. Gheorge et al. konnten die 15-LO insbesondere in der synovialen Zellschicht sowie um Gefäße darstellen. Ein Nachweis gelang in Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz. Sowohl Endothelzellen von Patienten mit OA als auch RA wiesen die 15-LO auf, wobei die 15-LO Expression bei Patienten mit RA in der synovialen Schicht stärker war (Gheorghe et al., 2009).

#### **4.4.7. 12-Lipoxygenase**

Die Darstellung der 12-LO gelang nicht mittels Western Blot. Die 12-LO wurde bisher auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs, insbesondere Thrombozyten und Leukozyten, beschrieben (Kulkarni et al., 2021). Die Datenlage bezüglich des Nachweises auf SF ist insgesamt dünn. Liagre et al konnten mittels Immunfluoreszenz

und RT-PCR die 12-LO in humanen RA Typ B Synoviozyten darstellen (Liagre et al., 1997). Eine Stimulation mit 50ng/ml IL-1 $\beta$  zeigte hier eine Steigerung der Expressionsmenge des Enzyms. Die im Rahmen des Western Blots verwendete Stimulationsmenge belief sich auf 10ng/ml IL-1 $\beta$ . Eine Darstellung der 12-LO mittels Western Blot und eine Steigerung der Expressionsmenge nach Stimulation wäre erwartbar gewesen. Jedoch unterscheiden sich die verwendeten Verfahren und Konzentrationen von IL-1 $\beta$ . Die Darstellung mittels Immunfluoreszenz oder RT-PCR erfolgte nicht. Der verwendete Antikörper konnte bereits mittels Western Blot das Vorhandensein der 12-LO in Magenkarzinomzellen, aber nicht SF, beweisen (Yang et al., 2019). Eine Verwendung des genutzten primären Antikörpers in SF ist bisher nicht publiziert.

#### **4.4.8. 5-oxo-ETE Rezeptor**

Ein Nachweis des 5-oxo-ETE Rezeptors auf SF mittels Western Blot war nicht möglich. 5-oxo-ETE wird mittels Lipoxygenasen aus Arachidonsäure synthetisiert und gilt als bioaktiver Marker. Der Nachweis gelang bereits in Leukozyten (Powell et al., 1992). Über seinen speziellen 5-oxo-ETE Rezeptor aktiviert es Neutrophile und wirkt im Rahmen von chronischen Entzündungen ähnlich, aber unabhängig von Leukotrien B<sub>4</sub> (Powell et al., 1993). Außerdem spielt 5-oxo-ETE eine Rolle in der Entwicklung von Asthma oder anderen über Eosinophile vermittelten allergischen Reaktionen (Sturm et al., 2005). Die Expression des 5-oxo-ETE Rezeptors in SF oder sein Zusammenhang mit Resolvinen und der RA wurde bisher nicht untersucht. Der 5-oxo-ETE Rezeptor konnte bereits mittels *Northern Blotting* und *Dot Blot* Analyse auf Leukozyten des Blutes, Lungen-, Leber- und Nierengewebe nachgewiesen werden (Hosoi et al., 2002). Mittels RT-PCR konnte der entsprechende Rezeptor ebenfalls in Eosinophilen, Neutrophilen, Lungenmakrophagen sowie in sehr geringer Menge auch in Fibroblasten detektiert werden (Jones et al., 2003).

#### **4.4.9. Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptor (BLT1 Rezeptor)**

Ein Nachweis des Leukotrien B<sub>4</sub> Rezeptors auf SF war mittels Western Blot ebenfalls nicht möglich. In vorausgegangenen Studien gelang der Nachweis des Liganden, Leukotrien B<sub>4</sub>, im Synovium von Patienten mit RA. Hier wurden Leukozyten als Syntheseort der Leukotriene identifiziert (Aletaha et al., 2010). Mittels RT-PCR und in-

situ Hybridisierung wiesen Hashimoto et al. den BLT1 und BLT2 Rezeptor in synovialem Gewebe von Patienten mit RA nach (Hashimoto et al., 2003). Es gelang der Nachweis von BLT2 in inflammatorischem Synovium, weshalb dieser Rezeptor als Hauptrezeptor der Leukotriene bei Patienten mit RA angesehen wurde. Der Nachweis von BLT1 gelang auf synovialen Makrophagen, allerdings nicht auf SF, Lymphozyten oder Endothelzellen. BLT2 konnte jedoch auf synovialen Makrophagen als auch SF in der Synovialmembran detektiert werden. Auch Xu et al. konnten den BLT2 Rezeptor auf SF in deutlich höheren Konzentrationen als den BTL1 Rezeptor mittels RT-PCR nachweisen (Xu et al., 2010)

Der Literatur entsprechend spielt der BLT1 Rezeptor in Zusammenhang mit Resolvinen eine entscheidende Rolle, da Resolvin E1 (RvE1) als Antagonist die Wirkung von Leukotrien B4 verhindert (Arita et al., 2005b). Der fehlende Nachweis von BLT1 auf SF mittels Western Blot entspricht daher den bereits publizierten Daten, da hier nur der BLT2 Rezeptor in SF detektiert werden konnte. Es wäre möglich, dass die vermutete Resolvin Wirkung durch z.B. Leukozyten vermittelt wird und nicht über SF in der Synovialschicht. Der verwendete Antikörper wurde bereits zum erfolgreichen Nachweis des BLT1 Rezeptors in humanem Brustdrüsengewebe zur immunhistochemischen Analyse verwendet (Jeon et al., 2015). Eine Verwendung im Rahmen einer Western Blot Analyse wurde bisher nicht publiziert.

#### **4.5. Charakterisierung des Synthesewegs der Resolveine**

Mittels ELISA sollte die Wirkungsweise von ungesättigten Fettsäuren und Resolvin-Vorstufen auf SF getestet werden. Untersucht wurde eine mögliche Veränderung der IL-6,-8 und MMP-3 Ausschüttung der SF nach Stimulation.

Da das Ziel der Arbeit die Charakterisierung des Synthesewegs der Resolveine in SF war, wurden die SF nicht mit Resolvinen, sondern mit deren Vorstufen stimuliert, um so anhand einer veränderten Zytokin Ausschüttung Rückschlüsse über die Synthese und Wirkungsweise von Resolvinen in SF zu erlangen. Die für die Synthese der Resolveine notwendigen Enzyme, die 5-LO und 15-LO, wurden bereits im Rahmen der Arbeit mittels Immunzytochemie in SF detektiert. Auch gelang der Nachweis der für die Wirkung von Resolvinen verantwortlichen Rezeptoren ChemR23, GPR18 sowie GPR32. Auf Basis der erhobenen Daten könnte dementsprechend eine Umwandlung der ungesättigten Fettsäure EPA in RvE in SF stattfinden und eine Veränderung der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung beobachtet werden. Vorstudien beschreiben,

dass durch 10nM Resolvin E die TNF- $\alpha$  induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs inhibiert werden konnte (Arita et al., 2005a). Auch die Leukozyten Infiltration in entzündetes Gewebe im Mausmodell konnte mittels RvE sowie ebenfalls zu geringem Anteil mittels 18R-HEPE inhibiert werden (Arita et al., 2005a). Über den NF- $\kappa$ B Signalweg wird die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, beispielsweise IL-6 und IL-8, sowie von COX-2 und Metalloproteinasen reguliert, sodass bei Stimulation mit RvE eine Reduktion der entsprechenden Mediatoren erwartbar wäre (Han et al., 1998). Zarrough et al. konnten mittels ELISA darstellen, dass durch 100nM RvD1 die durch IL-1 $\beta$  induzierte Produktion von u.a. IL-6, IL-8, MMP-1 und MMP3 in periodontalen Fibroblasten signifikant reduziert wird (Zarrough et al., 2022).

In den durchgeführten Versuchen konnte die anhand der Pathophysiologie vermutete Reduktion der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung nach Stimulation mit EPA oder entsprechenden Vorstufen nicht konsequent beobachtet werden.

Im Allgemeinen zeigte sich in den meisten Stimulationsbedingungen sogar eine Steigerung der Interleukin-Ausschüttung in hohen Konzentrationen und eine unveränderte Zytokinmenge bei niedrigen Konzentrationen. In Einzelfällen konnte allerdings auch eine Reduktion der Interleukin- und MMP-3-Ausschüttung beobachtet werden. So zeigte sich nach Stimulation der SF mit EPA eine signifikante Reduktion der IL-6-Ausschüttung. Diese reduzierte Ausschüttung zeigte sich insbesondere in der Gruppe der OA-Patienten. Ähnliches ließ sich auch nach Stimulation mit 17(18)-EEQ beobachten.

Weshalb hohe Konzentrationen der Substanzen mit einer gesteigerten Interleukin-Ausschüttung einhergeht, lässt sich pathophysiologisch nicht eindeutig erklären. Unklar ist bis dato auf welchem Wege EPA oder Resolvin-Vorstufen in SF verändert werden können. Die beobachteten Schwankungen könnten am ehesten Ausdruck statistischer Schwankungen bei der nur kleinen Patientengruppe von n=3 sein.

Weiterhin konnte, jedoch nicht statistisch signifikant, beobachtet werden, dass die Gruppe der RA-Patienten im Allgemeinen eine höhere Interleukin-Ausschüttung nach Stimulation aufweist als die Gruppe der OA-Patienten. Beispielsweise ist die MMP-3-Ausschüttung nach Stimulation mit EPA in der Gruppe der RA-Patienten deutlich höher als in der Gruppe der OA-Patienten. Da eine RA mit einer persistierenden Entzündung

und dementsprechend auch erhöhten Zytokin-Leveln einhergeht, könnten diese bereits vor Stimulation bestehenden hohen Zytokin-Level ursächlich für die vermeintlich höheren Level nach Stimulation sein, da insgesamt eine verstärkt pro-inflammatorisches Milieu besteht. Vorstudien beschreiben beispielsweise erhöhte IL-6- oder IL-8-Level im Synovium von Patienten mit RA (Koch et al., 1991, Okamoto et al., 1997). Sollten SF Resolvine synthetisieren, könnte dieses Phänomen auch Ausdruck einer verstärkten Bildung von Resolvinen als Antwort auf inflammatorische Reize bei Patienten mit einer OA sein. Dies kann allerdings erst nach einem direkten Nachweis von Resolvinen z.B. mittels Massenspektrometrie in OASF- und RASF-Zellkulturüberständen sicher bestätigt werden. Bis dato unklar ist wie sich der Rezeptorbesatz und die Funktionsweise anti-inflammatorischer Synthesewege bei Patienten mit RA oder OA unterscheiden. Eine persistierende Entzündung im Sinne einer RA könnte schlussendlich auch durch weniger antientzündlich wirkende Rezeptoren oder einen nicht adäquaten Syntheseweg anti-inflammatorischer Mediatoren begünstigt werden.

Durch Hinzugabe von BWB 70C, als 5-LO Inhibitor (Jatana et al., 2006), sollte der Syntheseweg des RvE inhibiert werden. Somit wären in diesem Falle Zytokinkonzentrationen ähnlich der Kontrollgruppe oder sogar gesteigerte Konzentrationen erwartbar gewesen.

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich sowohl eine Steigerung der Interleukin-8-Ausschüttung unter Hinzugabe von BWB 70C, beispielsweise nach Stimulation mit 18(S)-HEPE, als auch eine Reduktion z.B. der IL-8-Ausschüttung nach Stimulation mit 18R-HEPE. Die beobachtete Steigerung lässt sich pathophysiologisch durch die Inhibition der 5-LO erklären, ist in den durchgeführten Versuchen allerdings nicht konsistent und häufig nicht signifikant. Auch die reduzierte Zytokin-Ausschüttung nach Hinzugabe von BWB 70C widerspricht dieser These.

Die Acetylierung der COX-2 durch Aspirin sorgt für die Entstehung von 18R-HEPE in Endothelzellen und später für die Entstehung von Resolvinen der Gruppe E in Leukozyten durch die 5-LO (Serhan et al., 2000, Arita et al., 2005a, Arita et al., 2005b). Die COX-2 befindet sich neben Endothelzellen auch auf Makrophagen und SF (Cashman and McAnulty, 1995). Das in den Versuchen genutzte NSAID Nimesulid wirkt ähnlich zu Aspirin (Singla et al., 2000). In den Versuchen wäre dementsprechend

eine gesteigerte Resolvin-Produktion und damit eine Reduktion der Interleukin- und MMP-3-Ausschüttung erwartbar gewesen. Tatsächlich zeigte sich in vereinzelt Konstellationen, z.B. nach Stimulation mit EPA, eine Reduktion der IL-8- und MMP-3-Ausschüttung der SF in der Gruppe der OA-Patienten. Dies könnte auf eine mögliche Modulation der Resolvinproduktion der SF durch Nimesulide hinweisen. Gleichzeitig zeigte sich, dass es in der Gruppe der RA-Patienten zu einer Steigerung der IL-8- und MMP-3-Ausschüttung kommt. Auch eine Stimulation mit 18(S)HEPE und 18R-HEPE zeigte eine Reduktion der IL-6-Ausschüttung in der Gruppe der OA-Patienten. Da bereits der Nachweis der 5-LO in SF gelang ist, ist eine Umwandlung der Stimulanzien potenziell möglich, jedoch nicht auf das Vorhandensein von Nimesulide zurückzuführen, da dies lediglich die Entstehung von 18R-HEPE begünstigt, nicht aber den zweiten Syntheseschritt der Resolvine (Arita et al., 2005b). Insgesamt zeigt sich die Reduktion der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung jedoch nicht in jeder Versuchskonstellation und nicht immer signifikant, sodass schlussendlich keine eindeutige Aussage über die Wirkungsweise von Nimesulide auf die Resolvinsynthese der SF getroffen werden kann.

In Zusammenschau der erhobenen Befunde lässt sich keine eindeutige Aussage über den Syntheseweg der Resolvine in SF machen.

Primär stellte sich die Frage, ob Resolvin Vorstufen auch nur in SF in das Endprodukt RvE umgewandelt werden können. Dies konnte nur durch eine Veränderung der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung im ELISA dargestellt werden.

Unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen zeigte sich keine eindeutige Änderung der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung.

Bereits publizierte Studien beschreiben die Synthese von Resolvin E als transzelluläre Synthese, die Zell-Zell-Interaktionen notwendig macht. So findet der erste Syntheseschritt zu 18R-HEPE in Endothelzellen statt während sich die 5-LO in Leukozyten befindet (Arita et al., 2005a, Serhan and Petasis, 2011, Clària and Serhan, 1995). Da in den durchgeführten ELISA nur SF verwendet wurden, war diese Zell-Zell Interaktion nicht möglich. SF liefern zwar die entsprechenden Enzyme zur Synthese, sind schlussendlich wahrscheinlich aber auch auf Zell-Zell-Interaktionen angewiesen. So ließe sich auch der ausbleibende Effekt einer signifikanten Änderung der Zytokin-Konzentration nach Stimulation verstehen.

Einzige Ausnahme könnte die durch Aspirin oder Nimesulide eingeleitete Acetylierung der COX-2 sein, die zur Entstehung von 18R-HEPE führt (Arita et al., 2005a). Die hierfür notwendige COX-2 findet sich nachweislich auch auf SF (Cashman and McAnulty, 1995). In den durchgeführten Versuchen konnte vereinzelt eine Reduktion der Zytokin- oder MMP-3-Ausschüttung beobachtet werden, allerdings war diese meist nicht signifikant und nicht über alle Versuchsbedingungen konstant. Ob über diesen Syntheseschritt die Entstehung von Resolvinen der Gruppe E möglich ist, bedarf daher noch weiteren Versuchen.

Neben eines funktionierenden Synthesewegs in SF, der eine suffiziente Veränderung der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung bewirkt, könnten einzelne Vorstufen auch einzeln biologisch aktiv sein und so keiner weiterführenden Umwandlung in RvE bedürfen, um am ChemR23 zu wirken und zu einer Veränderung der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung beizutragen. Hier zeigten Arita et al. bereits eine fehlende biologische Aktivität von EPA und 18R-HEPE. Es konnte kein spezifisches Bindungsverhalten der entsprechenden Vorstufen in den durchgeführten Versuchen bei einer Konzentration von 100nM am ChemR23 detektiert werden. Höhere Konzentrationen wurden durch die Autoren jedoch nicht getestet (Arita et al., 2005a). Im Mausmodell zeigte sich eine antiinflammatorische Wirkung des aus 18(S)-HEPE gewonnenen 18S-Resolvin E. Über eine biologische Aktivität der 18(S)-HEPE wurde nicht berichtet (Oh et al., 2011). McDougale et al konnten bei Microglia Zellen der Maus eine Reduktion von IL-6 nach Stimulation mit 17,18-EEQ-EA darstellen und wiesen diesem Substrat dementsprechend eine antiinflammatorische Aktivität zu. EPA wird zu Eicosapentaenoicethanolamine (EPEA) umgewandelt. Mittels der Cytochrome P450 Epoxygenase entsteht 17,18-EEQ-EA. Anhand der erhobenen Befunde lässt sich jedoch in humanen Fibroblasten keine biologische Aktivität der 17,18-EEQ-EA detektieren (McDougale et al., 2017).

Bei rac18-HEPE handelt es sich um ein Racemat aus 18(S)-HEPE und 18R-HEPE. Da 18R-HEPE in der Literatur keine biologische Aktivität zugeschrieben wird und bisher keine Studien über die biologische Aktivität der 18(S)-HEPE publiziert wurden, ist eine Wirkung des Racemats am ChemR23 anhand der Datenlage unwahrscheinlich und wurde in den durchgeführten Versuchen nicht beobachtet (Arita et al., 2005a).

Im Zuge der Auswertung ist allerdings zu beachten, dass die entsprechenden Vorstufen nicht kommerziell erworben wurden, sondern von Prof. Dr. Nils-Helge

Schebb, Leiter des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität Wuppertal, zur Verfügung gestellt wurden. Es liegen dementsprechend keine Vorabinformationen bereits publizierter Studien zu diesen Produkten vor.

#### **4.6. Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mittels Western Blot und Immunfluoreszierenden Verfahren der GPR 18, GPR 32 sowie ChemR23 in SF detektiert werden konnten. Weiterhin wurden die 5- und 15-Lipoxygenase detektiert. Die Darstellung dieser Rezeptoren und Enzyme liefert wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der möglichen Entstehung und Wirkungsweise von Resolvinen in und an SF.

Die Synthese von RvE1 kann durch die 5-LO in SF begünstigt werden, da diese ein entscheidendes Enzym in der Synthese der E-Resolvine darstellt (Arita et al., 2005b). Gleichzeitig zeigt das Vorhandensein des ChemR23 auf SF die Möglichkeit einer potenziellen RvE1-Wirkung an SF. Ähnliches gilt für die Entstehung und Wirkung von RvD1 und RvD2 durch den Nachweis von 15-LO sowie des GPR 18 und GPR 32. Anhand der erhobenen Daten wäre dementsprechend die Synthese von Resolvinen in SF und auch deren Wirkung an SF möglich.

Eine Veränderung des Enzymbesatzes zwischen Patienten mit OA oder RA lässt sich nicht eindeutig festhalten. Es konnte nicht dargestellt werden inwieweit Patienten mit RA einen gesteigerten oder verminderten Besatz dieser antiinflammatorisch wirkenden Enzyme und Rezeptoren aufweisen.

Dass eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zur Steigerung des Rezeptorbesatzes führen kann, wurde anhand des GPR 18 dargestellt. Der GPR 18 zeigt im Western Blot eine Steigerung des Rezeptorbesatzes nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit OA während es bei Patienten mit RA zu einer Reduktion des Rezeptorbesatzes kam. Weshalb sich der Rezeptorbesatz der SF nach Stimulation auf diese Weise verändert, lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht differenzieren. Bisher publizierte Daten zeigten eine Steigerung der Rezeptormenge nach Stimulation, konnten allerdings nicht zwischen Patienten mit OA oder RA unterscheiden (Arita et al., 2005a, Krishnamoorthy et al., 2010). Eine Steigerung der Rezeptormenge bei OA-Patienten könnte als physiologische antiinflammatorische Antwort, also Ausgleich einer durch die Stimulation

überschießenden inflammatorischen Situation, gewertet werden. Diese physiologische Reaktion auf vermehrte Inflammation könnte bei Patienten mit RA verändert sein und so die Entstehung einer RA begünstigen.

Gleichzeitig stellen manche der hier detektierten Rezeptoren oder Enzyme auch einen wichtigen Schritt in der Entstehung von Entzündungsreaktionen dar. So ist der ChemR23 neben seiner durch Arita et al (Arita et al., 2005a) identifizierten Rolle als Rezeptor für RvE1 auch Rezeptor für Chemerin, einem Chemokin das proinflammatorisch auf Dendritische Zellen und Makrophagen wirkt und ebenfalls in erhöhtem Maße im Serum von Patienten mit RA gemessen werden konnte (Gonzalez-Ponce et al., 2021, Wittamer et al., 2003). Ob der in SF detektierte Rezeptor als Chemerin Rezeptor oder RvE Rezeptor interagiert, lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt nicht näher differenzieren. Auch spielen die 5-LO und 15-LO nicht nur in der Entstehung von RvD und RvE eine Rolle, sondern nutzen auch Arachidonsäure als Substrat zur Entstehung von Lipoxinen und sind somit ebenfalls an der Entstehung einer Entzündungsreaktion beteiligt (Samuelsson et al., 1987)

Mittels ELISA sollte indirekt der Syntheseweg und die Funktionsweise von RvE in SF getestet werden. Anhand der erhobenen Daten ließ sich die Synthese von RvE aus EPA und entsprechenden Vorstufen in SF nicht belegen. Ursächlich ist hier am ehesten die Notwendigkeit einer Zell-Zell Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen z.B. Leukozyten oder Endothelzellen wie es bereits in der Literatur vorbeschrieben ist (Clària and Serhan, 1995, Serhan and Petasis, 2011). Eine Synthese von Resolvinen allein in SF scheint nicht möglich. In der Zukunft bedarf es daher weiterer Versuche die dieses Konzept einer Zell-Zell Interaktion testen. Lediglich eine Synthese von RvE über die acetylierte COX-2 wäre in SF möglich, da es in den Versuchen zu vereinzelt Reduktionen der Interleukin- oder MMP-3-Ausschüttung kam. Um eine relevante Aussage über die Synthese in SF zu machen, bedarf es jedoch auch einer größeren Versuchsgröße als der hier verwendeten.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Syntheseweg der E-Resolvine .....	11
Abb. 2: Syntheseweg der D-Resolvine .....	14
Abb. 3: GPR 32 im Western Blot .....	36
Abb. 4: Bandenintensität des GPR 32 nach Stimulation .....	37
Abb. 5: GPR 18 im Western Blot .....	38
Abb. 6: Bandenintensität des GPR 18 nach Stimulation .....	39
Abb. 7: Bandenintensität des CMKLR1 nach Stimulation .....	41
Abb. 8: CMKLR1 im Western Blot .....	40
Abb. 9: Leukotrien B <sub>4</sub> Rezeptor im Western Blot .....	42
Abb. 10: FPRL1 im Western Blot .....	43
Abb. 11: 15-LO im Western Blot .....	43
Abb. 12: 12-LO im Western Blot .....	44
Abb. 13: 5-oxo-EET- im Western Blot .....	45
Abb. 14: 5-LO in der Immunfluoreszenz .....	46
Abb. 15: 5-Lipoxygenase in der Immunzytofluoreszenz .....	47
Abb. 16: 15-LO in der Immunfluoreszenz .....	48
Abb. 17: 15-Lipoxygenase in der Immunzytofluoreszenz .....	49
Abb. 18: FPRL1 in der Immunfluoreszenz .....	50
Abb. 19: FPRL1 in der Immunzytofluoreszenz .....	51
Abb. 20: GPR 18 in der Immunfluoreszenz .....	52
Abb. 21: GPR18 in der Immunzytofluoreszenz .....	53
Abb. 22: GPR 32 in der Immunfluoreszenz .....	54
Abb. 23: GPR32 in der Immunzytofluoreszenz .....	55
Abb. 24: Modulation der IL-6 Produktion durch EPA .....	57
Abb. 25: Modulation der IL-6 Produktion durch 18(S)-HEPE .....	58
Abb. 26: Modulation der IL-6 Produktion durch 18R-HEPE .....	59
Abb. 27: Modulation der IL-6 Produktion durch 17(18)-EEQ .....	60
Abb. 28: Modulation der IL-6 Produktion durch rac18-HEPE .....	61
Abb. 29: Modulation der IL-8 Produktion durch EPA .....	62
Abb. 30: Modulation der IL-8 Produktion durch 18(S)-HEPE .....	63
Abb. 31: Modulation der IL-8 Produktion durch 18R-HEPE .....	64
Abb. 32: Modulation der IL-8 Produktion durch 17(18)-EEQ .....	65
Abb. 33: Modulation der IL-8 Produktion durch rac18-HEPE .....	66
Abb. 34: Modulation der MMP-3 Produktion durch EPA .....	67
Abb. 35: Modulation der MMP-3 Produktion durch 18(S)-HEPE .....	68
Abb. 36: Modulation der MMP-3 Produktion durch 18R-HEPE .....	69
Abb. 37: Modulation der MMP-3 Produktion durch 17(18)-EEQ .....	70
Abb. 38: Modulation der MMP-3 Produktion durch 18rac-HEPE .....	71

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper .....	20
-----------------------------	----

## Literaturverzeichnis

- ALETAHA, D., NEOGI, T., SILMAN, A. J., FUNOVITS, J., FELSON, D. T., BINGHAM, C. O., BIRNBAUM, N. S., BURMESTER, G. R., BYKERK, V. P., COHEN, M. D., COMBE, B., COSTENBADER, K. H., DOUGADOS, M., EMERY, P., FERRACCIOLI, G., HAZES, J. M. W., HOBBS, K., HUIZINGA, T. W. J., KAVANAUGH, A., KAY, J., KVIEN, T. K., LAING, T., MEASE, P., MÉNARD, H. A., MORELAND, L. W., NADEN, R. L., PINCUS, T., SMOLEN, J. S., STANISLAWSKA-BIERNAT, E., SYMMONS, D., TAK, P. P., UPCHURCH, K. S., VENCOSKÝ, J., WOLFE, F. & HAWKER, G. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 1580.
- ALMUTAIRI, K., NOSENT, J., PREEN, D., KEEN, H. & INDERJEETH, C. 2021. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. *Rheumatol Int*, 41, 863-877.
- ALONZI, T., FATTORI, E., LAZZARO, D., COSTA, P., PROBERT, L., KOLLIAS, G., DE BENEDETTI, F., POLI, V. & CILIBERTO, G. 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 187, 461-468.
- ARITA, M., BIANCHINI, F., ALIBERTI, J., SHER, A., CHIANG, N., HONG, S., YANG, R., PETASIS, N. A. & SERHAN, C. N. 2005a. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*, 201, 713-22.
- ARITA, M., CLISH, C. B. & SERHAN, C. N. 2005b. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 149-57.
- ARITA, M., OHIRA, T., SUN, Y.-P., ELANGO VAN, S., CHIANG, N. & SERHAN, C. N. 2007. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. *The Journal of Immunology*, 178, 3912.
- AUGER, I. & ROUDIER, J. 1997. A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaJ to DnaK. Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *J Clin Invest*, 99, 1818-22.
- BANNENBERG, G. L., CHIANG, N., ARIEL, A., ARITA, M., TJONAHEN, E., GOTLINGER, K. H., HONG, S. & SERHAN, C. N. 2005. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol*, 174, 4345-55.
- BARDIN, M., PAWELZIK, S. C., LAGRANGE, J., MAHDI, A., ARNARDOTTIR, H., REGNAULT, V., FÈVE, B., LACOLLEY, P., MICHEL, J. B., MERCIER, N. & BÄCK, M. 2022. The resolvin D2 - GPR18 axis is expressed in human coronary atherosclerosis and transduces atheroprotection in apolipoprotein E deficient mice. *Biochem Pharmacol*, 201, 115075.
- BELLAMY, N., SOTHERN, R. B., CAMPBELL, J. & BUCHANAN, W. W. 1991. Circadian rhythm in pain, stiffness, and manual dexterity in rheumatoid arthritis: relation between discomfort and disability. *Ann Rheum Dis*, 50, 243-8.
- BERTOLINI, D. R., NEDWIN, G. E., BRINGMAN, T. S., SMITH, D. D. & MUNDY, G. R. 1986. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, 319, 516-8.
- BOULWARE, D. W., WEISSMAN, D. N. & DOLL, N. J. 1985. Pulmonary manifestations of the rheumatic diseases. *Clinical Reviews in Allergy*, 3, 249-267.
- BRENNAN, F. M. & MCINNES, I. B. 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 118, 3537-45.
- CASHMAN, J. & MCANULTY, G. 1995. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in perisurgical pain management. Mechanisms of action and rationale for optimum use. *Drugs*, 49, 51-70.

- CHIANG, N., DALLI, J., COLAS, R. A. & SERHAN, C. N. 2015. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *The Journal of experimental medicine*, 212, 1203-1217.
- CHIANG, N., SERHAN, C. N., DAHLÉN, S. E., DRAZEN, J. M., HAY, D. W., ROVATI, G. E., SHIMIZU, T., YOKOMIZO, T. & BRINK, C. 2006. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev*, 58, 463-87.
- CLÀRIA, J. & SERHAN, C. N. 1995. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9475-9.
- CROSS, M., SMITH, E., HOY, D., CARMONA, L., WOLFE, F., VOS, T., WILLIAMS, B., GABRIEL, S., LASSERE, M., JOHNS, N., BUCHBINDER, R., WOOLF, A. & MARCH, L. 2014. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73, 1316.
- DAKIN, S. G., COLAS, R. A., WHEWAY, K., WATKINS, B., APPLETON, L., REES, J., GWILYM, S., LITTLE, C., DALLI, J. & CARR, A. J. 2019. Proresolving Mediators LXB4 and RvE1 Regulate Inflammation in Stromal Cells from Patients with Shoulder Tendon Tears. *Am J Pathol*, 189, 2258-2268.
- DAKIN, S. G., MARTINEZ, F. O., YAPP, C., WELLS, G., OPPERMAN, U., DEAN, B. J., SMITH, R. D., WHEWAY, K., WATKINS, B., ROCHE, L. & CARR, A. J. 2015. Inflammation activation and resolution in human tendon disease. *Sci Transl Med*, 7, 311ra173.
- DAYER, J. M., BEUTLER, B. & CERAMI, A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine*, 162, 2163-2168.
- DAYER, J. M., DE ROCHEMONTEIX, B., BURRUS, B., DEMCZUK, S. & DINARELLO, C. A. 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 77, 645-648.
- DISTLER, J. H., JÜNGEL, A., HUBER, L. C., SEEMAYER, C. A., REICH, C. F., 3RD, GAY, R. E., MICHEL, B. A., FONTANA, A., GAY, S., PISETSKY, D. S. & DISTLER, O. 2005. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2892-7.
- DYERBERG, J., BANG, H. O. & HJORNE, N. 1975. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*, 28, 958-66.
- EBRINGER, A. & WILSON, C. 2000. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol*, 49, 305-311.
- EDWARDS, J. C. & WILLOUGHBY, D. A. 1982. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann Rheum Dis*, 41, 177-82.
- FIEHN, C., HOLLE, J., IKING-KONERT, C., LEIPE, J., WESELOH, C., FRERIX, M., ALTEN, R., BEHRENS, F., BAERWALD, C., BRAUN, J., BURKHARDT, H., BURMESTER, G., DETERT, J., GAUBITZ, M., GAUSE, A., GROMNICA-IHLE, E., KELLNER, H., KRAUSE, A., KUIPERS, J. G., LORENZ, H.-M., MÜLLER-LADNER, U., NOTHACKER, M., NÜSSLEIN, H., RUBBERT-ROTH, A., SCHNEIDER, M., SCHULZE-KOOPS, H., SEITZ, S., SITTER, H., SPECKER, C., TONY, H.-P., WASSENBERG, S., WOLLENHAUPT, J. & KRÜGER, K. 2018. S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. AWMF.
- FIRESTEIN, G. S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, 356-361.

- GHEORGHE, K. R., KOROTKOVA, M., CATRINA, A. I., BACKMAN, L., AF KLINT, E., CLAEISSON, H. E., RÅDMARK, O. & JAKOBSSON, P. J. 2009. Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids. *Arthritis Res Ther*, 11, R83.
- GITTER, B. D., LABUS, J. M., LEES, S. L. & SCHEETZ, M. E. 1989. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology*, 66, 196-200.
- GONZALEZ-PONCE, F., GAMEZ-NAVA, J. I., PEREZ-GUERRERO, E. E., SALDAÑA-CRUZ, A. M., VAZQUEZ-VILLEGAS, M. L., PONCE-GUARNEROS, J. M., HUERTA, M., TRUJILLO, X., CONTRERAS-HARO, B., ROCHA-MUÑOZ, A. D., CARRILLO-ESCALANTE, M. O., SANCHEZ-RODRIGUEZ, E. N., GOMEZ-RAMIREZ, E. E., NAVA-VALDIVIA, C. A., CARDONA-MUÑOZ, E. G. & GONZALEZ-LOPEZ, L. 2021. Serum chemerin levels: A potential biomarker of joint inflammation in women with rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 16, e0255854.
- GRASSI, W., DE ANGELIS, R., LAMANNA, G. & CERVINI, C. 1998. The clinical features of rheumatoid arthritis. *European Journal of Radiology*, 27, S18-S24.
- GREGERSEN, P. K., SILVER, J. & WINCHESTER, R. J. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30, 1205-13.
- HAN, C., ROBINSON, D. W., HACKETT, M. V., PARAMORE, L. C., FRAEMAN, K. H. & BALA, M. V. 2006. Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology*, 33, 2167.
- HAN, Z., BOYLE, D. L., MANNING, A. M. & FIRESTEIN, G. S. 1998. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*, 28, 197-208.
- HASHIMOTO, A., ENDO, H., HAYASHI, I., MURAKAMI, Y., KITASATO, H., KONO, S., MATSUI, T., TANAKA, S., NISHIMURA, A., URABE, K., ITOMAN, M. & KONDO, H. 2003. Differential expression of leukotriene B4 receptor subtypes (BLT1 and BLT2) in human synovial tissues and synovial fluid leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 30, 1712-8.
- HENDERSON, B. & PETTIPHER, E. R. 1985. The synovial lining cell: biology and pathobiology. *Semin Arthritis Rheum*, 15, 1-32.
- HERSCHMAN, H. R. 1998. Recent progress in the cellular and molecular biology of prostaglandin synthesis. *Trends Cardiovasc Med*, 8, 145-50.
- HONG, S., GRONERT, K., DEVCHAND, P. R., MOUSSIGNAC, R. L. & SERHAN, C. N. 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*, 278, 14677-87.
- HOSOI, T., KOGUCHI, Y., SUGIKAWA, E., CHIKADA, A., OGAWA, K., TSUDA, N., SUTO, N., TSUNODA, S., TANIGUCHI, T. & OHNUKI, T. 2002. Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J Biol Chem*, 277, 31459-65.
- HSIAO, H. M., THATCHER, T. H., COLAS, R. A., SERHAN, C. N., PHIPPS, R. P. & SIME, P. J. 2015. Resolvin D1 Reduces Emphysema and Chronic Inflammation. *Am J Pathol*, 185, 3189-201.
- HUBER, L. C., DISTLER, O., TARNER, I., GAY, R. E., GAY, S. & PAP, T. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 45, 669-75.
- HURD, E. R. 1979. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 8, 151-176.
- KENDALL, R. T. & FEGHALI-BOSTWICK, C. A. 2014. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol*, 5, 123.

- JATANA, M., GIRI, S., ANSARI, M. A., ELANGO, C., SINGH, A. K., SINGH, I. & KHAN, M. 2006. Inhibition of NF-kappaB activation by 5-lipoxygenase inhibitors protects brain against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation*, 3, 12.
- JEON, W. K., CHOI, J., PARK, S. J., JO, E. J., LEE, Y. K., LIM, S., KIM, J. H., LETTERIO, J. J., LIU, F., KIM, S. J. & KIM, B. C. 2015. The proinflammatory LTB4/BLT1 signal axis confers resistance to TGF- $\beta$ 1-induced growth inhibition by targeting Smad3 linker region. *Oncotarget*, 6, 41650-66.
- JONES, C. E., HOLDEN, S., TENAILLON, L., BHATIA, U., SEUWEN, K., TRANTER, P., TURNER, J., KETTLE, R., BOUHELAL, R., CHARLTON, S., NIRMALA, N. R., JARAI, G. & FINAN, P. 2003. Expression and characterization of a 5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid receptor highly expressed on human eosinophils and neutrophils. *Mol Pharmacol*, 63, 471-7.
- KANEKO, K., MIYABE, Y., TAKAYASU, A., FUKUDA, S., MIYABE, C., EBISAWA, M., YOKOYAMA, W., WATANABE, K., IMAI, T., MURAMOTO, K., TERASHIMA, Y., SUGIHARA, T., MATSUSHIMA, K., MIYASAKA, N. & NANKI, T. 2011. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 13, R158.
- KIKUCHI, H., SHIMADA, W., NONAKA, T., UESHIMA, S. & TANAKA, S. 1996. Significance of serine proteinase and matrix metalloproteinase systems in the destruction of human articular cartilage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23, 885-9
- KOCH, A. E., KUNKEL, S. L., BURROWS, J. C., EVANOFF, H. L., HAINES, G. K., POPE, R. M. & STRIETER, R. M. 1991. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *The Journal of Immunology*, 147, 2187.
- KREMER, J. M., BIGAUOETTE, J., MICHALEK, A. V., TIMCHALK, M. A., LININGER, L., RYNES, R. I., HUYCK, C., ZIEMINSKI, J. & BARTHOLOMEW, L. E. 1985. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1, 184-7.
- KREMER, J. M., JUBIZ, W., MICHALEK, A., RYNES, R. I., BARTHOLOMEW, L. E., BIGAUOETTE, J., TIMCHALK, M., BEELER, D. & LININGER, L. 1987. Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study. *Ann Intern Med*, 106, 497-503.
- KREMER, J. M., LAWRENCE, D. A., JUBIZ, W., DIGIACOMO, R., RYNES, R., BARTHOLOMEW, L. E. & SHERMAN, M. 1990. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum*, 33, 810-20.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S. & APPEL, L. J. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106, 2747-57.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S. & APPEL, L. J. 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 151-2.
- KRISHNAMOORTHY, S., RECCHIUTI, A., CHIANG, N., YACOUBIAN, S., LEE, C. H., YANG, R., PETASIS, N. A. & SERHAN, C. N. 2010. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 1660-5.
- KROMANN, N. & GREEN, A. 1980. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*, 208, 401-6.
- KULKARNI, A., NADLER, J. L., MIRMIRA, R. G. & CASIMIRO, I. 2021. Regulation of Tissue Inflammation by 12-Lipoxygenases. *Biomolecules*, 11.
- LAFYATIS, R., REMMERS, E. F., ROBERTS, A. B., YOCUM, D. E., SPORN, M. B. & WILDER, R. L. 1989. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest*, 83, 1267-76.
- LAU, C. S., MORLEY, K. D. & BELCH, J. J. 1993. Effects of fish oil supplementation on non-steroidal anti-inflammatory drug requirement in patients with mild rheumatoid arthritis--a double-blind placebo controlled study. *Br J Rheumatol*, 32, 982-9.

- LEVY, B. D., CLISH, C. B., SCHMIDT, B., GRONERT, K. & SERHAN, C. N. 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*, 2, 612-9.
- LIAGRE, B., VERGNE, P., RIGAUD, M. & BENEYTOU, J. L. 1997. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS Lett*, 414, 159-64.
- LIBBY, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 868-74.
- LIU, Y., RAO, P., QIAN, H., SHI, Y., CHEN, S., LAN, J., MU, D., CHEN, R., ZHANG, X., DENG, C., LIU, G. & SHI, G. 2023. Regulatory Fibroblast-Like Synoviocytes Cell Membrane Coated Nanoparticles: A Novel Targeted Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Adv Sci (Weinh)*, 10, e2204998.
- LOWIN, T., ANSSAR, T. M., BÄUML, M., CLASSEN, T., SCHNEIDER, M. & PONGRATZ, G. 2020. Positive and negative cooperativity of TNF and Interferon- $\gamma$  in regulating synovial fibroblast function and B cell survival in fibroblast/B cell co-cultures. *Sci Rep*, 10, 780.
- MACGREGOR, A. J., SNIEDER, H., RIGBY, A. S., KOSKENVUO, M., KAPRIO, J., AHO, K. & SILMAN, A. J. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*, 43, 30-7.
- MCDUGLE, D. R., WATSON, J. E., ABDEEN, A. A., ADILI, R., CAPUTO, M. P., KRAPF, J. E., JOHNSON, R. W., KILIAN, K. A., HOLINSTAT, M. & DAS, A. 2017. Anti-inflammatory omega-3 endocannabinoid epoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E6034-E6043.
- MCINNES, I. B. & SCHETT, G. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365, 2205-19.
- MEDZHITOV, R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140, 771-6.
- MÜLLER-LADNER, U., KRIEGSMANN, J., FRANKLIN, B. N., MATSUMOTO, S., GEILER, T., GAY, R. E. & GAY, S. 1996. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, 149, 1607-15.
- MÜLLER-LADNER, U., PAP, T., GAY, R. E., NEIDHART, M. & GAY, S. 2005. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 1, 102-10.
- NIELSEN, G. L., FAARVANG, K. L., THOMSEN, B. S., TEGLBJAERG, K. L., JENSEN, L. T., HANSEN, T. M., LERVANG, H. H., SCHMIDT, E. B., DYERBERG, J. & ERNST, E. 1992. The effects of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double blind trial. *Eur J Clin Invest*, 22, 687-91.
- OH, S. F., PILLAI, P. S., RECCHIUTI, A., YANG, R. & SERHAN, C. N. 2011. Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *J Clin Invest*, 121, 569-81.
- O'HARA, R., MURPHY, E. P., WHITEHEAD, A. S., FITZGERALD, O. & BRESNIHAN, B. 2004. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 50, 1788-99.
- OKADA, Y., WU, D., TRYNKA, G., RAJ, T., TERAOKA, C., IKARI, K., KOCHI, Y., OHMURA, K., SUZUKI, A., YOSHIDA, S., GRAHAM, R. R., MANOHARAN, A., ORTMANN, W., BHANGALE, T., DENNY, J. C., CARROLL, R. J., EYLER, A. E., GREENBERG, J. D., KREMER, J. M., PAPPAS, D. A., JIANG, L., YIN, J., YE, L., SU, D. F., YANG, J., XIE, G., KEYSTONE, E., WESTRA, H. J., ESKO, T., METSPALU, A., ZHOU, X., GUPTA, N., MIREL, D., STAHL, E. A., DIOGO, D., CUI, J., LIAO, K., GUO, M. H., MYOUZEN, K., KAWAGUCHI, T., COENEN, M. J., VAN RIEL, P. L., VAN DE LAAR, M. A., GUCHELAAR, H. J., HUIZINGA, T. W., DIEUDÉ, P., MARIETTE, X., BRIDGES, S. L., JR., ZHERNAKOVA, A., TOES, R. E., TAK, P. P., MICELI-RICHARD, C., BANG, S. Y., LEE, H. S.,

MARTIN, J., GONZALEZ-GAY, M. A., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L., RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S., ARLESTIG, L., CHOI, H. K., KAMATANI, Y., GALAN, P., LATHROP, M., EYRE, S., BOWES, J., BARTON, A., DE VRIES, N., MORELAND, L. W., CRISWELL, L. A., KARLSON, E. W., TANIGUCHI, A., YAMADA, R., KUBO, M., LIU, J. S., BAE, S. C., WORTHINGTON, J., PADYUKOV, L., KLARESKOG, L., GREGERSEN, P. K., RAYCHAUDHURI, S., STRANGER, B. E., DE JAGER, P. L., FRANKE, L., VISSCHER, P. M., BROWN, M. A., YAMANAKA, H., MIMORI, T., TAKAHASHI, A., XU, H., BEHRENS, T. W., SIMINOVITCH, K. A., MOMOHARA, S., MATSUDA, F., YAMAMOTO, K. & PLENGE, R. M. 2014. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*, 506, 376-81.

OKAMOTO, H., YAMAMURA, M., MORITA, Y., HARADA, S., MAKINO, H. & OTA, Z. 1997. The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 40, 1096-105.

OLOFSSON, T., PETERSSON, I. F., ERIKSSON, J. K., ENGLUND, M., NILSSON, J. A., GEBOREK, P., JACOBSSON, L. T. H., ASKLING, J. & NEOVIUS, M. 2017. Predictors of work disability after start of anti-TNF therapy in a national cohort of Swedish patients with rheumatoid arthritis: does early anti-TNF therapy bring patients back to work? *Ann Rheum Dis*, 76, 1245-1252.

PARK, C. K., XU, Z. Z., LIU, T., LÜ, N., SERHAN, C. N. & JI, R. R. 2011. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *J Neurosci*, 31, 18433-8.

PIERER, M., RETHAGE, J., SEIBL, R., LAUENER, R., BRENTANO, F., WAGNER, U., HANTZSCHEL, H., MICHEL, B. A., GAY, R. E., GAY, S. & KYBURZ, D. 2004. Chemokine Secretion of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Stimulated by Toll-Like Receptor 2 Ligands. *The Journal of Immunology*, 172, 1256.

POWELL, W. S., GRAVEL, S., MACLEOD, R. J., MILLS, E. & HASHEFI, M. 1993. Stimulation of human neutrophils by 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by a mechanism independent of the leukotriene B4 receptor. *J Biol Chem*, 268, 9280-6.

POWELL, W. S., GRAVELLE, F. & GRAVEL, S. 1992. Metabolism of 5(S)-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid and other 5(S)-hydroxyeicosanoids by a specific dehydrogenase in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*, 267, 19233-41.

PRADHAN, A. D., MANSON, J. E., RIFAI, N., BURING, J. E. & RIDKER, P. M. 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama*, 286, 327-34.

SAMSON, M., EDINGER, A. L., STORDEUR, P., RUCKER, J., VERHASSELT, V., SHARRON, M., GOVAERTS, C., MOLLEREAU, C., VASSART, G., DOMS, R. W. & PARMENTIER, M. 1998. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol*, 28, 1689-700.

SAMUELSSON, B., DAHLÉN, S. E., LINDGREN, J. A., ROUZER, C. A. & SERHAN, C. N. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 237, 1171-6.

SERHAN, C. N., CLISH, C. B., BRANNON, J., COLGAN, S. P., CHIANG, N. & GRONERT, K. 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, 192, 1197-204.

SERHAN, C. N., HONG, S., GRONERT, K., COLGAN, S. P., DEVCHAND, P. R., MIRICK, G. & MOUSSIGNAC, R. L. 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, 196, 1025-37.

SERHAN, C. N. & PETASIS, N. A. 2011. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev*, 111, 5922-43.

- SERHAN, C. N. & SAVILL, J. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, 6, 1191-7.
- SHAH, A. & ST. CLAIR, E. W. 2016. *Rheumatoide Arthritis In: Harrison, T R, Longo DL, Diemel M, editors, Harrison's Innere Medizin 19. überarbeitete Auflage, deutsche Herausgeber: Suttorp, N, Möckel, M, Siegmund, B, Diemel, M, Berlin, ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft.*
- SILVER J, G. S. 1985. *Epitopes are the functional units of Ia molecules and form the molecular basis for disease susceptibility, human class II histocompatibility antigens. In: Ferrone S, Solheim BG, Moller E, editors. HLA class II antigens: a comprehensive review of structure and function., Berlin, Springer.*
- SINGLA, A. K., CHAWLA, M. & SINGH, A. 2000. Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol*, 52, 467-86.
- SKÖLDSTAM, L., BÖRJESSON, O., KJÄLLMAN, A., SEIVING, B. & AKESSON, B. 1992. Effect of six months of fish oil supplementation in stable rheumatoid arthritis. A double-blind, controlled study. *Scand J Rheumatol*, 21, 178-85.
- SMOLEN, J. S., ALETAHA, D. & MCINNES, I. B. 2016. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 388, 2023-2038.
- SODIN-SEMRL, S., TADDEO, B., TSENG, D., VARGA, J. & FIORE, S. 2000. Lipoxin A4 Inhibits IL-1 - Induced IL-6, IL-8, and Matrix Metalloproteinase-3 Production in Human Synovial Fibroblasts and Enhances Synthesis of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *The Journal of Immunology*, 164, 2660-2666.
- STURM, G. J., SCHULIGOI, R., STURM, E. M., ROYER, J. F., LANG-LOIDOLT, D., STAMMBERGER, H., AMANN, R., PESKAR, B. A. & HEINEMANN, A. 2005. 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent chemoattractant for human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 1014-9.
- SUN, Y. P., OH, S. F., UDDIN, J., YANG, R., GOTLINGER, K., CAMPBELL, E., COLGAN, S. P., PETASIS, N. A. & SERHAN, C. N. 2007. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem*, 282, 9323-34.
- SPITE, M., NORLING, L. V., SUMMERS, L., YANG, R., COOPER, D., PETASIS, N. A., FLOWER, R. J., PERRETTI, M. & SERHAN, C. N. 2009. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*, 461, 1287-91.
- SYMMONS, D. P., BANKHEAD, C. R., HARRISON, B. J., BRENNAN, P., BARRETT, E. M., SCOTT, D. G. & SILMAN, A. J. 1997. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum*, 40, 1955-61.
- TAGER, A. M., BROMLEY, S. K., MEDOFF, B. D., ISLAM, S. A., BERCURY, S. D., FRIEDRICH, E. B., CARAFONE, A. D., GERSZTEN, R. E. & LUSTER, A. D. 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol*, 4, 982-90.
- TAKEDA, T., MIZUGAKI, Y., MATSUBARA, L., IMAI, S., KOIKE, T. & TAKADA, K. 2000. Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43, 1218-25.
- ULU, A., SAHOO, P. K., YUIL-VALDES, A. G., MUKHERJEE, M., VAN ORMER, M., MUTHURAJ, P. G., THOMPSON, M., ANDERSON BERRY, A., HANSON, C. K., NATARAJAN, S. K. & NORDGREN, T. M. 2019. Omega-3 Fatty Acid-Derived Resolvin D2 Regulates Human Placental Vascular Smooth Muscle and Extravillous Trophoblast Activities. *Int J Mol Sci*, 20.
- VAN BEURDEN, H. E., SNOEK, P. A., VON DEN HOFF, J. W., TORENSMA, R. & KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. 2003. Fibroblast subpopulations in intra-oral wound healing. *Wound Repair Regen*, 11, 55-63.

- VAN DER TEMPEL, H., TULLEKEN, J. E., LIMBURG, P. C., MUSKIET, F. A. & VAN RIJSWIJK, M. H. 1990. Effects of fish oil supplementation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 49, 76-80.
- WEGNER, N., WAIT, R., SROKA, A., EICK, S., NGUYEN, K. A., LUNDBERG, K., KINLOCH, A., CULSHAW, S., POTEMPA, J. & VENABLES, P. J. 2010. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 62, 2662-72.
- WESTMAN, M., KOROTKOVA, M., AF KLINT, E., STARK, A., AUDOLY, L. P., KLARESKOG, L., ULFGREN, A. K. & JAKOBSSON, P. J. 2004. Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*, 50, 1774-80.
- WITTAMER, V., FRANSSSEN, J. D., VULCANO, M., MIRJOLET, J. F., LE POUL, E., MIGEOTTE, I., BRÉZILLON, S., TYLDESLEY, R., BLANPAIN, C., DETHEUX, M., MANTOVANI, A., SOZZANI, S., VASSART, G., PARMENTIER, M. & COMMUNI, D. 2003. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*, 198, 977-85.
- XU, S., LU, H., LIN, J., CHEN, Z. & JIANG, D. 2010. Regulation of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B<sub>4</sub>. *Rheumatol Int*, 30, 1183-9.
- YANG, X. H., ZHUANG, M. K., XIE, W. H., DU, F., HUANG, Y. H., CHEN, Z. X., CHEN, F. L. & WANG, X. Z. 2019. 12-Lipoxygenase promotes epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer cells. *Oncotargets Ther*, 12, 5551-5561.
- YOKOMIZO, T., IZUMI, T., CHANG, K., TAKUWA, Y. & SHIMIZU, T. 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature*, 387, 620-4.
- ZARROUGH, A. E., HASTURK, H., STEPHENS, D. N., VAN DYKE, T. E. & KANTARCI, A. 2022. Resolvin D1 modulates periodontal ligament fibroblast function. *J Periodontol*.
- ZHANG, M. J., SANBURY, B. E., HELLMANN, J., BAKER, J. F., GUO, L., PARMER, C. M., PRENNER, J. C., CONKLIN, D. J., BHATNAGAR, A., CREAGER, M. A. & SPITE, M. 2016. Resolvin D2 Enhances Postischemic Revascularization While Resolving Inflammation. *Circulation*, 134, 666-680.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Georg Pongratz unter dessen Leitung ich meine Promotion absolvieren durfte.

An dieser Stelle bedanke ich mich außerdem besonders bei Herrn Dr. rer. nat. Torsten Lowin für die Anregung des Promotionsthemas, das Vermitteln wissenschaftlicher Fähigkeiten und sein herzliches Engagement.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Hiller Forschungszentrums für die Bereitstellung und Durchführung der Versuche, viele hilfreiche Tipps und für die sehr freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützt und mein Studium und meine Promotion erst ermöglicht haben.