

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

**Einfluss von Cannabigerol und Tetrahydrocannabinolsäure auf die Zytokin-
und Antikörperproduktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes
allein und in Ko-Kultur mit Synovialfibroblasten aus Patienten mit
rheumatoider Arthritis**

Dissertation

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

vorgelegt von

Marianne Sofia Tigges Pérez

2023

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Autoimmunerkrankung und nach der Gicht die häufigste Ursache von entzündlichem Gelenkbefall. Trotz verbesserter Prognose spricht nur ein Teil der Patient*innen auf die Therapie mit zielgerichteten krankheitsmodulierenden anti-rheumatischen Medikamenten an. Aufgrund immunmodulierender und schmerzlindernder Eigenschaften steigt die Nachfrage nach medizinischem Cannabis oder Cannabis-basierter Produkte zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der RA. Diese Nachfrage geht einher mit einer weltweit fortschreitenden Legalisierung von medizinischem Cannabis. Dennoch sind die meisten Cannabinoide nicht ausreichend erforscht.

Ziel dieser Arbeit ist es ein besseres Verständnis über die *in vitro* Wirkung und Wirkweise der beiden nicht-psychotropen, pflanzlichen Cannabinoide Cannabigerol (CBG) und Tetrahydrocannabinol-*acid* (THCA) zu erhalten. Hierzu wurden periphere mononukleäre Blutzellen von gesunden Probanden isoliert und in Monokultur oder in Ko-Kultur mit Synovialfibroblasten von Patienten mit RA analysiert. Um zu untersuchen ob CBG und THCA immunmodulatorische Eigenschaften über den *transient receptor potential ankyrin 1* (TRPA-1) Kanal vermitteln, erfolgte die zusätzliche Stimulation mit dem TRPA1-Antagonisten A967079. Mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde der Einfluss von CBG und THCA auf die Sekretion von Interleukin (IL-) 6, IL-10, Tumornekrosefaktor α , sowie Immunglobulin M und G der Zellen untersucht.

In diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass THCA und CBG die Sekretion der hier untersuchten Immunglobuline reduzierten. Insbesondere THCA zeigte anti-inflammatorische Effekte auf die Zytokinproduktion, während Cannabigerol stimulationsabhängig pro- oder anti-inflammatorische Einflüsse haben könnte. Eine TRPA1-vermittelte Wirkung der beiden Cannabinoide konnte nur inkonstant für bestimmte Stimulationen nachgewiesen werden.

Schlussendlich ist eine weitergehende Grundlagenforschung zur Wirkweise, Wirkung und Nebenwirkungen pflanzlicher Cannabinoide notwendig, bevor ein Einsatz als Therapie der rheumatoiden Arthritis erwägt werden sollte.

Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease and is, besides gout, the most common cause of inflammatory joint disease. Despite improved prognosis, only a proportion of patients respond to therapy with targeted disease-modifying anti-rheumatic drugs. Due to immunomodulatory and pain-relieving properties, there is an increasing demand for medical cannabis or cannabis-based products for the treatment of chronic inflammatory diseases such as RA. This demand is accompanied by a progressive legalization of medical cannabis worldwide. Yet, most cannabinoids are under-researched.

The aim of this work is to gain a better understanding of the in vitro effects and mode of action of the two non-psychoactive, plant-derived cannabinoids cannabigerol (CBG) and tetrahydrocannabinol-acid (THCA). For this purpose, peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers were isolated and analyzed in monoculture or in co-culture with synovial fibroblasts from patients with RA. To investigate whether CBG and THCA mediate immunomodulatory properties via the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA-1) channel, additional stimulation was performed with the TRPA1 antagonist A967079. By enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the effect of CBG and THCA on cell secretion of interleukin (IL-) 6, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and immunoglobulin M and G was investigated. In these experiments, THCA and CBG were shown to reduce the secretion of the immunoglobulins studied here. In particular THCA showed anti-inflammatory effects on cytokine production, while Cannabigerol may have stimulation-dependent pro- or anti-inflammatory influences. A TRPA1-mediated effect of the two cannabinoids could only be demonstrated inconstantly for certain stimulations.

Finally, further basic research on the mode of action, effects and side effects of herbal cannabinoids is necessary before their use as a therapy for rheumatoid arthritis should be considered.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| 2-AG | Arachidonylglycerol |
| ACP | <i>antigen presenting cell</i> |
| ACPA | Anti-citrulliniertes Protein Antikörper |
| ACR | <i>American College of Rheumatology</i> |
| AEA | Arachidonylethanolamid |
| BAFF | <i>B cell activating factor</i> |
| bDMARD | <i>biologic DMARD</i> |
| Breg | Regulatorische B-Zelle |
| CBD | Cannabidiol |
| CBG | Cannabigerol |
| CBGA | <i>cannabigerol acid</i> |
| CB-Rezeptor | Cannabinoid-Rezeptor |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CRP | C-reaktives Protein |
| csDMARD | <i>conventionel synthetic DMARD</i> |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> |
| CXCL | Chemokin-Ligand |
| DMARD | <i>disease modifying anti-rheumatic drug</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EULAR | <i>European League Against Rheumatism</i> |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |

| | |
|---------------|--|
| FAAH | Fettsäureamidhydrolase |
| FACS | <i>fluorescent-activated cell sorting</i> |
| Fc | <i>fragment crystallizable</i> |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| Foxp3+ | Forkhead-Box-Protein P3 |
| G-CSF | <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> |
| G-CSF | <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> |
| GPR55 | <i>G protein-coupled receptor 55</i> |
| HEPES | Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure |
| IFN- γ | Interferon gamma |
| IL- | Interleukin |
| ILD | <i>interstitial lung disease</i> |
| JAK | Januskinase |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAGL | Monoacylglycerollipase |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| MMP | Matrix Metalloproteinase |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| MTX | Methotrexat |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cell</i> |
| PI | Propidiumjodid |
| PPAR | Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RANK | <i>receptor activator of nuclear factor κB</i> |
| RASF | <i>rheumatoid arthritis synovial fibroblast</i> |

| | |
|---------------|--|
| RF | Rheumafaktor |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| RT-qPCR | <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> |
| RXR | <i>retinoid x receptor</i> |
| SFB | Synovialfibroblast |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| TCR | <i>T cell receptor</i> |
| TCZ | Tocilizumab |
| TGF- β | <i>transforming growth factor β</i> |
| Th-17 | Typ 17 T-Helferzelle |
| THC | trans δ^9 -Tetrahydrocannabinol |
| THCA | <i>trans δ^9-tetrahydrocannabinol acid</i> |
| TLR-9 | <i>Toll like receptor 9</i> |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| Treg | Regulatorische T-Zelle |
| TRPA1 | Transient receptor potential ankyrin 1 |
| TRPM8 | Transient receptor potential melastin 8 |
| TRPV1 | Transient receptor potential vanilloid 1 |
| tsDMARD | <i>targeted synthetic DMARD</i> |
| VCAM-1 | <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Zusammenfassung..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Inhaltsverzeichnis..... | VI |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Definition und Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis | 1 |
| 1.2 Mortalität und Komorbiditäten der RA | 1 |
| 1.3 Pathogenese der RA..... | 2 |
| 1.3.1 Autoantikörper | 2 |
| 1.3.2 Die Rolle der Synovialfibroblasten | 2 |
| 1.3.3 Die Rolle der Zytokine | 3 |
| 1.4 Therapie der rheumatoiden Arthritis..... | 6 |
| 1.4.1 Nebenwirkungen der DMARDs..... | 7 |
| 1.4.2 Therapieresistente RA | 8 |
| 1.5 Cannabinoide in der Medizin | 8 |
| 1.5.1 Das Endocannabinoid-System | 9 |
| 1.5.2 Cannabinoide und das Immunsystem..... | 9 |
| 1.5.3 Cannabigerol und Tetrahydrocannabinolsäure | 10 |
| 1.6 TRP-Kanäle | 11 |
| 1.7 Ziel der Arbeit | 13 |
| 2. Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Material..... | 14 |
| 2.1.1 Geräte..... | 14 |
| 2.1.2 Chemikalien..... | 14 |
| 2.1.3 Medien und Supplements | 15 |
| 2.1.4 Erstantikörper | 16 |
| 2.1.5 Zweitantikörper | 16 |
| 2.1.6 Reagenzien | 17 |
| 2.1.7 Verbrauchsmaterialien..... | 18 |
| 2.2 Methoden..... | 18 |
| 2.2.1 Patienten/Probanden..... | 18 |
| 2.2.2 Zellkultivierung..... | 19 |
| 2.2.3 Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen | 19 |
| 2.2.4 Stimulation der Synovialfibroblasten und PBMCs..... | 19 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2.5 | ELISA | 21 |
| 2.2.6 | Durchflusszytometrische-Analyse..... | 22 |
| 2.2.7 | Statistische Analyse..... | 22 |
| 3. | Ergebnisse..... | 23 |
| 3.1 | Basale Zytokin- und Antikörperproduktion von RASFs und PBMCs | 23 |
| 3.2 | Vergleich zwischen stimulierten Kontrollen der PBMC-Kultur und RASF Ko-Kultur..... | 24 |
| 3.3 | Einfluss des TRPA1 Antagonisten auf die Zytokin- und Antikörperproduktion | 28 |
| 3.4 | Einfluss von CBG auf die Zytokinproduktion von PBMCs und RASFs.... | 28 |
| 3.4.1 | Einfluss von CBG auf die TNF a Sekretion..... | 28 |
| 3.4.2 | Einfluss von CBG auf die IL-6 Sekretion..... | 31 |
| 3.4.3 | Einfluss von CBG auf die IL-10 Sekretion..... | 34 |
| 3.5 | Einfluss von CBG auf die Antikörpersekretion von PBMCs | 37 |
| 3.5.1 | Wirkung von CBG auf die IgM Sekretion | 37 |
| 3.5.2 | Wirkung von CBG auf die IgG Sekretion | 41 |
| 3.6 | Einfluss von THCA auf die Zytokinproduktion von stimulierten PBMCs und RASFs | 44 |
| 3.6.1 | Einfluss von THCA auf die TNF α Sekretion..... | 44 |
| 3.6.2 | Einfluss von THCA auf die IL-6 Sekretion..... | 46 |
| 3.6.3 | Einfluss von THCA auf die IL-10 Sekretion..... | 48 |
| 3.7 | Einfluss von THCA auf die Antikörpersekretion von stimulierten PBMCs 50 | |
| 3.7.1 | Wirkung von THCA auf die IgM Sekretion | 50 |
| 3.7.2 | Wirkung von THCA auf die IgG Sekretion | 53 |
| 3.8 | Ergebnisse der Zelltodfärbung mittels Durchflusszytometrie | 56 |
| 4. | Diskussion..... | 57 |
| 4.1 | Limitationen | 64 |
| 5. | Quellenverzeichnis..... | 66 |
| 6. | Danksagung..... | 1 |

1. Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch verlaufende, entzündliche Autoimmunerkrankung, die insbesondere die Gelenke befällt und mit der Bildung von Autoantikörpern verbunden ist (Smolen et al., 2016). Die Prävalenz beträgt international 0,8% während die Inzidenz bei 0,04% liegt. Für Deutschland bedeutet dies eine Anzahl von circa 27.000 Neuerkrankungen pro Jahr für die Population der Erwachsenen (Zink, 2014). Somit ist die rheumatoide Arthritis die zweithäufigste Erkrankung mit entzündlichem Gelenkbefall. Auch wenn in den letzten zwei Jahrzehnten große Fortschritte in der Therapie und Prognose der RA erzielt wurden, ist diese Erkrankung weiterhin nicht heilbar (Krüger, 2018). Der Erkrankungsgipfel liegt bei Frauen im Alter von 55-64 Jahren und damit rund 10 Jahre vor dem der Männer. Zudem erkranken Frauen etwa drei Mal häufiger als Männer an rheumatoider Arthritis (Zink & Albrecht, 2016).

1.2 Mortalität und Komorbiditäten der RA

Die RA geht immer noch mit einer erhöhten Sterblichkeit einher, auch wenn eine signifikante Abnahme der Mortalität in den letzten Jahren zu beobachten war. Zudem ist ein abnehmender Trend in Hinblick auf das Risiko kardiovaskulär bedingter Todesfälle zu beobachten (Abhishek et al., 2018). Hauptursächlich für die erhöhte Sterblichkeit sind die zahlreichen Komorbiditäten, die 80% der RA-Patient*innen betreffen und als Folge der RA oder ihrer Therapie auftreten. Die häufigste Todesursache stellen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems dar, gefolgt von interstitiellen Lungenerkrankungen. Weitere Komorbiditäten sind beispielsweise Osteoporose, Depression, sowie degenerative Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen (Schneider et al., 2020).

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind für fast 40% der Todesfälle im Rahmen der RA verantwortlich. Das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und der Anteil kardiovaskulär assoziierter Sterblichkeit ist bei der RA um circa 50% im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht (England et al., 2018). Dennoch kann eine frühzeitige, innerhalb von 2 Jahren nach Diagnosestellung beginnende, entzündungshemmende

Therapie das kardiovaskuläre Risiko senken und somit das Überleben verlängern (Hafström et al., 2019). Eine klinisch signifikante interstitielle Lungenerkrankung (engl.: ILD) entwickeln etwa 5-10% der Patienten mit RA. Das mittlere Überleben nach Diagnosestellung einer ILD beträgt circa 7 Jahre (England & Hershberger, 2020).

1.3 Pathogenese der RA

1.3.1 Autoantikörper

Die Pathogenese der RA zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel aus adaptiver und angeborener Immunantwort aus. Therapieerfolge durch B-Zell-Depletion verdeutlichen, dass auch B-Zellen einen wichtigen pathogenetischen Faktor im Rahmen der RA darstellen.

Autoantikörper lassen sich in circa 50-80% der Fälle im Serum von RA-Patient*innen finden, was als seropositive RA definiert wird. Die seropositive RA zeichnet sich durch einen aggravierteren Krankheitsverlauf und Prognose aus. Diagnostisch bedeutsam sind der Rheumafaktor (RF) und Anti-citrulliniertes Protein/Peptid-Antikörper (ACPA). Der RF ist in den meisten Fällen ein IgM-Antikörper, welcher sich gegen den Fc-Teil von humanem Immunglobulin der Klasse G (IgG) richtet. Antikörper gegen citrullinierte Proteine können der Gruppe der IgA-, IgM-, oder IgG-Antikörper angehören. ACPA besitzen eine höhere Spezifität (85-99%) als der RF und lassen sich zudem diagnostisch nutzen, da sie bereits 10 Jahre vor dem Einsetzen erster Symptome nachgewiesen werden können (Derksen et al., 2017). Neben ACPA gibt es noch weitere Autoantikörper, die sich gegen posttranslational modifizierte Proteine richten, hierzu zählen Anti-carbamyliertes- und Anti-azetyliertes Protein- Antikörper. Trotz dieser neu entdeckten Biomarker, wurde bislang noch nicht eindeutig geklärt, welche Rolle Autoantikörper im Allgemeinen in der Pathogenese der RA spielen (Volkov et al., 2020).

1.3.2 Die Rolle der Synovialfibroblasten

Synovialfibroblasten (SFBs) sind spezialisierte Mesenchymalzellen. Als Zellen der Membrana Synovialis sind sie im gesunden Gelenk essenziell für die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (EZM) und Bildung von Synovialflüssigkeit. Über epigenetische Veränderung im Rahmen der rheumatoiden Arthritis nehmen sie jedoch aktiv und auch unabhängig von anderen

inflammatorischen Stimuli an entzündlichen Prozessen im Gelenk teil. Zu diesen epigenetischen Veränderungen gehört eine verminderte DNA-Methylierung, eine Hyperacetylierung von Histonen und die Bildung spezifischer micro-RNAs (Karouzakis et al., 2009). Diese pathogenen Eigenschaften bleiben selbst bei kultivierten SFBs für mehrere Monate bestehen (Nygaard & Firestein, 2020). Das aggressive Verhalten der aktivierten SFBs zeigt sich unter anderem in der Zytokin-vermittelten Bildung und Sekretion von Matrix Metalloproteinasen (MMP). Beispielsweise werden durch MMP-1 und MMP-13 Kollagene, durch MMP-3 und -9 Proteoglykane der EZM aufgelöst, wodurch Gelenkknorpel schrittweise zerstört wird (Araki & Mimura, 2017). Des Weiteren sind SFBs zusammen mit aktivierten Immunzellen zur Produktion von *receptor activator of nuclear factor KB ligand* (RANK-L) fähig. Somit nehmen sie, über die Stimulation zur Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten, direkt Einfluss auf die Destruktion von Knochensubstanz (Lin et al., 2020).

Letztendlich sind aktivierte SFBs auch für den charakteristischen, symmetrischen Gelenkbefall bei der RA verantwortlich. Sie besitzen die Fähigkeit zur hämatogenen Migration, sowie Adhäsion und Invasion in Knorpelgewebe. Voraussetzung ist hierfür bereits vorgeschädigtes Gewebe und Freiliegen von Teilen der EZM, wodurch eine Adhäsion anhand von Molekülen wie VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) ermöglicht wird (Lefèvre et al., 2009).

1.3.3 Die Rolle der Zytokine

Zytokinen kommt eine zentrale Rolle in Pathogenese der RA zu, da sie die systemischen Entzündungsreaktionen im Körper vermitteln. Es handelt sich um Signalmoleküle, die zwischen Immunzellen und zwischen Immun- und Gewebszellen ausgetauscht werden. Ins Gelenk infiltrierende T-Zellen produzieren neben Interleukin 17-A (IL-17A), Interferon (IFN)- γ und RANK-L auch Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) (Lin et al., 2020).

TNF- α

Vor allem TNF- α gilt als einer der wichtigsten Mediatoren im Rahmen der Gelenkentzündung bei RA. Die erfolgreiche Therapie mit TNF- α Inhibitoren verdeutlicht die zentrale Rolle dieses Zytokins in der Pathogenese der RA. TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Typ 1 T-Helferzellen (Th1) sezerniert. Es aktiviert u.a. SFBs zur Synthese von MMPs und Kathepsinen. Hieraus resultiert wie

oben beschrieben ein Kollagen- und Proteoglykanabbau mit konsekutiver Erosion von Knorpel und Knochen (Jang et al., 2021). Darüber hinaus induziert es die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-1- β , was wiederum die Migration weiterer Leukozyten ins Gelenk fördert und das entzündliche Milieu im Gelenk aufrechterhält (Lin et al., 2020).

Interferon- γ

Interferon- γ ist ein Zytokin mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften. Zum einen induziert es die Expression von major histocompatibility complex class II (MHC-Klasse-II) Molekülen in SFBs, wodurch diese als antigenpräsentierende Zellen im Gelenk agieren und zur Aktivierung von T-Helferzellen beitragen (Boots et al., 1994). Des Weiteren induziert IFN- γ die Produktion der Chemokin-Liganden CXCL9 und CXCL11, wodurch aktivierte T-Zellen und natürliche Killerzellen chemotaktisch zum Ort der Entzündung gelockt werden (Proost et al., 2004).

Eine weitere wichtige proinflammatorische Wirkung erzielt IFN- γ , indem es die Expression des B-Zell aktivierenden Faktors (BAFF) in RASFs steigert (Boots et al., 1994; Ohata et al., 2005). BAFF wiederum fördert u.a. das Überleben autoreaktiver B-Zellen und spielt somit in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen eine wichtige Rolle (Liu & Davidson, 2011). Zusammenfassend spielt IFN- γ eine zentrale Rolle in der Aktivierung von B- und T-Zellen.

Im Gegensatz dazu induziert IFN- γ die Produktion des IL-18 bindenden Proteins, wodurch im Sinne eines negativen *feedbacks* die IL-18 abhängige IFN- γ Produktion reduziert wird (Möller et al., 2003). Letztlich reduziert IFN- γ indirekt die Produktion von Matrix-Metalloproteasen (Page et al., 2010). Auch eine Studie mit IFN- γ -Rezeptor *knock-out* Mäusen legt eine protektive Wirkung von IFN- γ bezogen auf die Gelenkentzündung nahe (Manoury-Schwartz et al., 1997; Page et al., 2010).

IL-6

Im Serum und in der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke von RA Patient*innen lassen sich erhöhte Spiegel an IL-6 und IL-6-Rezeptor (IL-6R) messen. Dies wird therapeutisch als Angriffspunkt genutzt. IL-6 Blocker und IL-6 Rezeptor-Inhibitoren wie z.B. Tocilizumab (TCZ) werden in der Therapie der RA bereits erfolgreich eingesetzt (Pandolfi et al., 2020).

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches nicht nur essenziell für die Bildung von Akute-Phase Proteinen in der Leber ist, sondern auch über andere Wege eine zentrale Rolle im Ablauf systemischer Entzündungsprozesse spielt. So wirkt es auf die Gefäße permeabilitätssteigernd und stimuliert im Knochenmark die Reifung von Megakaryozyten. Auf das erworbene Immunsystem nimmt IL-6 direkt Einfluss. Während B-Zellen zur vermehrten Produktion von Immunglobulinen angeregt werden, hat IL-6 auf T-Zellen im Wesentlichen zwei Effekte, die eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielen (Tanaka et al., 2018):

Erstens vermittelt IL-6 zusammen mit *transforming growth factor β* (TGF- β) die Differenzierung von naiven *cluster of differentiation 4* (CD4) positiven T-Zellen in Typ17-T-Helferzellen (Th-17 Lymphozyten). Diese Th-17 Lymphozyten produzieren wiederum IL-6, IL-17 und weitere proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1- β und IL-22, sodass die Entzündungsreaktion verstärkt und aufrechterhalten wird. Das von den Th17-Lymphozyten produzierte IL-17 stimuliert weiterhin Synovialfibroblasten zur Produktion von RANK-Ligand, sodass die Osteoklastenbildung und folglich die Osteolyse gefördert werden. Zweitens hemmt IL-6 die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg). Somit wird die Fähigkeit des Körpers Fremd- und Eigenproteine zu erkennen verstärkt, wodurch autoimmune Prozesse vermehrt auftreten können (Pandolfi et al., 2020). Letztlich induziert IL-6 die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), wodurch die Angiogenese im Gelenk gefördert wird (Cohen et al., 1996). Die Gefäßneubildung fördert somit auch das Auftreten klassischer Entzündungszeichen wie Rötung und Schwellung im Gelenk.

IL-10

IL-10 ist bekannt als anti-inflammatorisches Zytokin, welches vor allem von Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen (engl.: APCs) exprimiert wird. Zwei wesentliche Funktionen sind die Hemmung der MHC-Klasse-II-Molekül-Expression auf APCs, sowie die Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus steigert IL-10 die IL-1-Rezeptor-Antagonist Ausschüttung und reduziert die Produktion von MMPs in Makrophagen (Mosser & Zhang, 2008).

Im Kontext autoimmuner Erkrankungen wie der RA, spielen vor allem IL-10 produzierende regulatorische B-Zellen (sog. Bregs) eine wichtige Rolle. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Anzahl von IL-10+Bregs im Blut von

Patient*innen mit früher RA (Krankheitsdauer < 5 Jahre) vermindert ist und zudem eine negative Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Anzahl der IL10+Bregs besteht (Daien et al., 2014). Als Hauptproduzenten des IL-10 wurde ein spezieller Subtyp der Breg Population, sogenannte CD19⁺CD21^{hi}CD23^{hi}CD1d^{hi} *transitional 2 marginal zone precursor B cells* (T2-MZP), identifiziert. T2-MZP Bregs sind dazu in der Lage die Häufigkeit regulatorischer T-Zellen *in vivo* zu erhöhen. Über die Stimulation dieser Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen werden dann autoimmune Prozesse unterdrückt. Schließlich hemmen IL-10+Bregs die Differenzierung von Th1 und Th17 Lymphozyten und somit die proinflammatorische Immunantwort (Carter et al., 2011).

1.4 Therapie der rheumatoiden Arthritis

Ziel der Therapie ist die Remission (*treat-to-target-Prinzip*) oder zumindest eine geringe Krankheitsaktivität und dadurch die Vermeidung einer fortschreitenden Gelenkzerstörung und reduzierten Lebenserwartung (Krüger, 2018).

Laut American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) Definition, liegt eine Remission vor, wenn der *simple disease activity index* (SDAI) <3,3 ist, oder alle vier Variablen der Boolean-Definition einen Wert ≤ 1 ergeben: Anzahl druckdolenter Gelenke, Anzahl geschwollener Gelenke, C-reaktives Protein (CRP), Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten (Felson et al., 2011). Im Allgemeinen besteht die Therapie der RA in der Gabe von konventionellen und zielgerichteten, krankheitsmodulierenden Medikamenten, sogenannte DMARDs (engl.: *disease-modifying anti-rheumatic drugs*).

Konventionelle synthetische DMARDS

Die EULAR empfiehlt, dass bereits bei Diagnosestellung die Therapie mit einem konventionellen synthetischen (cs)DMARD begonnen werden soll. Wenn keine Kontraindikationen bestehen oder frühe Unverträglichkeiten auftreten, ist Methotrexat (MTX) die erste Wahl. Alternativ kommen Leflunomid oder Sulfasalazin als csDMARDs in Frage (Smolen et al., 2020).

Methotrexat ist ein Folsäure Analogon, welches die Dihydrofolatreduktase reversibel und kompetitiv hemmt. Somit wird die Nucleotidsynthese und folglich die Zellproliferation inhibiert. Die entscheidende antiinflammatorische Wirkung im Rahmen der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, vermittelt MTX wohl über eine

Inhibition des Januskinase (JAK) und *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Signalweges (siehe Kapitel zu tsDMARDs) und nicht über den Folsäure-Weg (Thomas et al., 2015).

Biologische und zielgerichtete synthetische DMARDs

Wenn das Therapieziel unter der first-line Therapie nicht erreicht wurde und zudem schlechte Prognosefaktoren vorliegen, sollte ein biologisches (b)DMARD oder ein *targeted synthetic* (ts)DMARD mit dem csDMARD kombiniert werden (Smolen et al., 2020). Die Gruppe der bDMARD lässt sich in TNF α -Inhibitoren (z.B. Adalimumab, Infliximab), IL-6 bzw. IL-6-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Tocilizumab), dem CD20-B-Zell-Antagonisten (Rituximab), dem IL-1-Antagonist (Anakinra) und dem CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)-Ig-Fusionsprotein (Abatecept) einteilen.

Die neuste Gruppe der DMARDs sind die Janus Kinase (JAK) Inhibitoren. Sie werden auch als tsDMARDs bezeichnet. Hierzu zählen Tofacitinib, Baricitinib, Filgotinib, Upadacitinib. Der Vorteil gegenüber den biologischen DMARDs ist ihre orale und damit einfachere Applikation. Januskinaseinhibitoren sind kleine zellmembrangängige Moleküle, die über eine Hemmung der Januskinasen die Phosphorylierung des STAT-Proteins verhindern. Die STAT-Proteine können nun nicht mehr die Transkription von Genabschnitten aktivieren, die beispielsweise für die Zytokine IL4, IL-6, IL 10, IL-12, IL-23 oder den *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) codieren. Die gemeinsame Endstrecke vieler proinflammatorischer Zytokine, die über den JAK-STAT-Weg wirken, wird somit geblockt (Harrington et al., 2020).

1.4.1 Nebenwirkungen der DMARDs

Eine Therapie mit MTX kann typischerweise eine Erhöhung der Transaminasen (Lebertoxizität), gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, abdominelle Schmerzen und Stomatitis, sowie eine Hemmung der Hämatopoese (Anämie, Zytopenie) bewirken. Diese Nebenwirkungen lassen sich allerdings durch die Einnahme von Folsäure abschwächen (Shea et al., 2013). Dennoch müssen innerhalb eines Jahres 10-30% der RA Patient*innen die Therapie mit MTX aufgrund von Nebenwirkungen abbrechen (Aletaha & Smolen, 2002).

Während der Therapie mit csDMARDs beträgt das Risiko für schwere Infektionen circa 2% pro Jahr. Schwere Infektionen werden meist je nach Studie entweder als solche definiert, die zu einer Hospitalisierung, Gabe intravenöser Antibiotika, oder zum Tode

führen. Darüber hinaus kommt es dosisabhängig zu einer zusätzlichen Risikoerhöhung für schwere Infektionen bei der Therapie mit Biologica. Verglichen mit csDMARDs beträgt die absolute Risikozunahme innerhalb eines Jahres 0,6% bei Standard-Dosierung bzw. 1,7% wenn hohe Dosen von Biologica verabreicht werden und sogar 5,5% wenn Biologica kombiniert werden (Singh et al., 2015).

1.4.2 Therapierefraktäre RA

In einer 2018 veröffentlichten, prospektiv angelegten Kohortenstudie der Britischen Gesellschaft für Rheumatologie lag der Anteil der Patient*innen mit bDMARD-refraktärer RA bei sechs Prozent. Als therapierefraktär wurden Patient*innen definiert, welche bereits die Therapie mit einer dritten bDMARD-Klasse gestartet hatten (Kearsley-Fleet et al., 2018).

Seit 2020 gibt es eine einheitliche EULAR-Definition der schwer zu therapierenden, refraktären RA (*difficult- to- treat RA*). Zu den Kriterien zählen ein zweifaches Versagen einer bDMARD oder tsDMARD Therapie, Zeichen aktiver und fortschreitender Erkrankung, sowie eine problematische Symptom-Management Einschätzung seitens der Patient*innen und/oder der behandelnden Rheumatolog*innen (Nagy et al., 2021).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz großer Erfolge in der Therapie und Prognose der rheumatoiden Arthritis ein relevanter Anteil der Patient*innen ohne effektive Therapie und Kontrolle der Krankheitsaktivität verbleibt. Ein tieferes pathophysiologisches Verständnis der RA, sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze sind deshalb immer noch dringlich gefragt.

1.5 Cannabinoide in der Medizin

Cannabinoide werden chemisch als C₂₁-Terpenophenole definiert. In der Hanf- bzw. Cannabispflanze (*Cannabis sativa* oder *C. indica*) lassen sich über 100 verschiedene Cannabinoide bestimmen. Diese werden auch als Phytocannabinoide bezeichnet. Darüber hinaus lassen sich Cannabinoide in körpereigene Endocannabinoide und synthetische Cannabinoide einteilen (Śledziński et al., 2020).

Ein breites öffentliches Interesse hat in vielen Ländern zur Legalisierung von medizinischem Cannabis und Cannabis-basierter Produkte geführt. In Deutschland ist Nabiximol (Handelsname Sativex) bei therapierefraktärer Spastik bei Multipler

Sklerose zugelassen. Dronabinol, pflanzliches Tetrahydrocannabinol (THC), darf bei chronischem Schmerz und in der Palliativmedizin verschrieben werden. Eine offizielle Zulassung für diese Anwendung besteht jedoch nicht. Schließlich findet das synthetische THC Analogon Nabilone Anwendung bei Chemotherapie-induzierter und therapierefraktärer Übelkeit und Erbrechen. Medizinisches Cannabis kann ebenfalls in Deutschland verschrieben werden. Die THC und Cannabidiol (CBD) Konzentration in den Blüten kann jedoch zwischen 1-22% bzw. 0,05-9% variieren. Eine Kostenübernahme durch die Krankenkassen ist bei allen Produkten möglich, erfordert jedoch eine ärztliche Antragstellung und wird meist nur in der Hälfte der Fälle gestattet (Krcevski-Skvarc et al., 2018).

1.5.1 Das Endocannabinoid-System

Klassischerweise versteht man unter dem Endocannabinoid-System die Gesamtheit aus den zwei G-protein-gekoppelten Cannabinoid-Rezeptoren (CB1- und CB2-Rezeptor), sowie deren Liganden und metabolischen Enzyme. Aufgrund der Vielzahl der weiterhin involvierten Rezeptoren und „*Endocannabinoid-like*“ Liganden, wird heutzutage der Begriff „Endocannabinoidome“, statt Endocannabinoid-System bevorzugt (Di Marzo & Piscitelli, 2015).

Während CB1 Rezeptoren vor allem im zentralen Nervensystem und auf peripheren Neuronen exprimiert werden, lässt sich der CB2-Rezeptor vor allem im Gewebe und Zellen des Immunsystems nachweisen. Die prominentesten endogenen Liganden der CB1- und CB2-Rezeptoren sind die Endocannabinoide Anandamid (Arachidonylethanolamid, AEA) und Arachidonylglycerol (2-AG). AEA und AG-2 sind Derivate der Arachidonsäure und besitzen nur eine kurze Wirkdauer, da sie zügig u.a. durch die Fettsäureamidhydrolase (FAAH) bzw. Monoacylglycerollipase (MAGL) hydrolysiert werden. Neben der klassischen Cannabinoidrezeptoren binden Endocannabinoide auch an *Transient receptor potential*-(TRP)-, *orphan G-protein-coupled receptor 55*- (GPR55), 5-HT₃- und Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) (Karst, 2018).

1.5.2 Cannabinoide und das Immunsystem

Cannabinoide besitzen nicht nur analgetische, sondern auch antientzündliche und immunmodulierende Eigenschaften. Die oben erwähnte Expression von CB2-

Rezeptoren auf Immunzellen und in lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten verdeutlicht die zentrale Rolle, die das Endocannabinoid-System in der Homöostase des Immunsystems spielt. Die höchste Cannabinoidrezeptordichte besitzen B-Zellen. CB2 Rezeptoren werden aber auch auf vielen anderen Zellen wie z.B. Mikroglia-Zellen, Chondro- und Osteozyten, sowie auf Fibroblasten exprimiert, welche in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der RA eine Rolle spielen (Giorgi et al., 2021).

Ein wichtiger immunmodulatorischer Effekt von Cannabinoiden wird vermutlich durch eine Hemmung der Immunzellmigration zum Ort der Entzündung vermittelt. In einem Mausmodell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass CB2-Rezeptor Agonisten die Migration von dendritischen Zellen reduzieren, indem die Expression von MMP-9 durch diese Zellen gehemmt wird (Adhikary et al., 2012).

Dass Cannabinoide in der Lage sind die Ausschüttung pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine zu modulieren, konnte beispielsweise anhand des nicht-psychoactiven Cannabidiol (CBD) in vitro gezeigt werden. Im Speziellen wurde für SFBs aus Patienten mit RA (RASFs) eine Verringerung der Zytokinproduktion (MMP-3, IL-6, IL-8) nachgewiesen (Lowin et al., 2020).

Ein weiteres Beispiel der immunmodulatorischen Wirkung von Cannabinoiden ist die Produktion von 2-AG durch aktivierte Antigenpräsentierende Zellen. Über eine Aktivierung der CB2-Rezeptoren kommt es u.a. zu einer verminderten MHC-II Molekül Expression und T-Helferzellantwort. Endocannabinoide können somit über ein negatives Feedback eine überschießende Immunantwort bremsen (Dotsey et al., 2017). Alles in allem sind die immunmodulatorischen Effekte von Cannabinoiden jedoch noch nicht vollständig verstanden.

1.5.3 Cannabigerol und Tetrahydrocannabinolsäure

Phytocannabinoide liegen in der Cannabispflanze als carboxylierte Säuren vor. Durch Hitze bzw. Trockenheit werden sie nicht-enzymatisch decarboxyliert und können dann ihre Wirkung im Körper entfalten. Cannabigerol-Säure (engl.: *cannabigerol acid*, [CBGA]) dient als gemeinsame Vorstufe der meisten Phytocannabinoide und ist deshalb oft nur in niedrigen Konzentrationen in der Cannabis Pflanze enthalten. CBGA wird in der Pflanze enzymatisch u.a. zu *trans* δ^9 -*tetrahydrocannabinol acid* (THCA)

umgewandelt. Anders als δ^9 -THC, gehören Cannabigerol (CBG) und THCA zur Gruppe der nicht-psychotropen Phytocannabinoide (Nachnani et al., 2021).

Cannabigerol bindet nur schwach an den CB1 und CB2-Rezeptor. Es ist jedoch ein starker Agonist am TRPM8 und TRPA1 Rezeptor. Darüber hinaus hat Cannabigerol eine Wirkung auf „Nicht-Cannabinoid-Rezeptoren“ wie z.B. dem α_2 -adrenergen Rezeptor und dem Serotonin (5HT_{1A}-) Rezeptor (Morales et al., 2017). Nicht-psychotrope Phytocannabinoide haben den Vorteil, dass Sie eine Immunmodulation bewirken können, ohne die für δ^9 -THC typischen, unerwünschten Nebenwirkungen hervorzurufen. Sie binden meist nicht oder nur schwach an klassische CB-Rezeptoren und vermitteln ihre Effekte oft über *transient receptor potential* Kanäle.

1.6 TRP-Kanäle

Die Superfamilie der Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle besteht aus 28 Kationenkanälen, die jeweils in sechs Subgruppen eingeteilt werden. Es handelt sich um Membranproteine mit je sechs Transmembrandomänen. Sie vermitteln vor allem sensorische Information, wie beispielsweise Temperatur, Druck und pH (Nilius & Flockerzi, 2014). Wie oben bereits beschrieben binden viele Cannabinoide mit einer höheren Affinität an TRP-Kanäle als an die klassischen CB1 und CB2 Rezeptoren. Folgende sechs Kanäle können von Cannabinoiden moduliert werden: TRP vanilloid 1-4 (TRPV), TRP ankyrin 1 (TRPA1), TRP melastatin 8 (TRPM8). Aus diesem Grund werden diese sechs TRP-Kanäle zum Teil auch als „ionotrope Cannabinoidrezeptoren“ bezeichnet (Muller et al., 2018).

TRPA1-Kanal

Die namengebenden 16 Ankyrin *repeat* Domänen des TRPA1 Kanals befinden sich am intrazellulär gelegenen N-Terminus des Proteins. Wichtig ist die enge Beziehung zwischen TRPA1 und TRPV1 Kanälen. Sie können sich zu Heterotetrameren zusammenschließen und als funktionale Komplexe interagieren (Meents et al., 2019).

Besonders ist die Vielzahl an Aktivatoren am TRPA1 Kanal. Neben Isothiocyanaten, welche sich als scharfe Bestandteile z.B. in Senf, Knoblauch und Zwiebeln finden, werden TRPA1 Kanäle auch durch Temperaturen unterhalb von 17°C aktiviert (Muller et al., 2018). Darüber hinaus kann der Kanal auch endogen über oxidative Stressprodukte wie Wasserstoffperoxid aktiviert werden (Andersson et al., 2008).

TRPA1 wird auf sensorischen Neuronen, sowie auf einer Vielzahl weiterer Zellen exprimiert, beispielsweise auf Synovialzellen (Kochukov et al., 2006), Chondrozyten und auf Immunzellen (Naert et al., 2021). Auch periphere mononukleäre Leukozyten exprimieren TRPA1. Bei Patient*innen mit kürzlich diagnostizierter RA ist die TRPA1-Proteinexpression auf ihren Leukozyten erhöht und korreliert zudem positiv mit Gelenkschmerzen und Behinderung. Eine Behandlung mit DMARDs (Leflunomid oder Adalimumab) vermag es die Rezeptorexpression herunterzuregulieren. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der TRPA1 Kanal auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Entzündung in der RA spielt (Pereira et al., 2017).

Während bislang nur zwei Endocannabinoide bekannt sind, die am TRPA1 Kanal binden, konnte für viele Phyto- und synthetische Cannabinoide gezeigt werden, dass sie den Kanal aktivieren, so auch für CBG und THCA. Zusammenfassend spielen TRP Kanäle eine wichtige Rolle bei neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen, weshalb sich hier potentielle neue Angriffspunkte in der Therapie der RA ergeben (Muller et al., 2018).

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften der nicht-psychotropen Cannabinoide Cannabigerol und Tetrahydrocannabinolsäure. Dabei wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus EDTA-Blutproben von gesunden Probanden isoliert und in Monokultur oder in Ko-Kultur mit Synovialfibroblasten aus Patienten mit RA analysiert. Zudem wurde untersucht, ob CBG und THCA ihre immunmodulatorischen Eigenschaften über den TRPA-1 Kanal vermitteln. Hierzu erfolgte die zusätzliche Stimulation mit dem TRPA1-Antagonisten A967079. Um den Einfluss von CBG und THCA auf die Zytokin- und Antikörpersekretion zu messen, wurden die Konzentrationen von IL-6, IL-10, TNF- α , IgM und IgG mittels ELISA bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller | Hauptsitz |
|---------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Durchflusszytometer | MACSQuant® FACScan | Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG | Bergisch Gladbach, DE |
| Inkubator | | BINDER GmbH | Tuttlingen, DE |
| Microplate Reader | iMark | Bio Rad | Hercules, California, USA |
| Mikroskop | SN: 3846001505 | Zeiss | Göttingen, DE |
| Sterilbank | HB 2472 | LaminAir® | |
| Tecan Reader | Infinite M200 Pro | Tecan | Grödig, AU |
| Zellzähler | Bio Rad TC20™ | Bio Rad | Hercules, California, USA |
| Zentrifuge | Rotina 420R | Hettich GmbH & Co KG | Tuttlingen, DE |

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

| | |
|---|---|
| Schwefelsäure 1 mol/l (2 N) in wässriger Lösung, AVS TITRINORM volumetrische Lösung | VWR Merck Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten |
|---|---|

| | |
|--|--|
| 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution | Thermo scientific |
| Bicarbonat-Puffer C6 | SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA |
| Sucrose | SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA |

2.1.3 Medien und Supplements

Tabelle 3 Medien und Supplements

| | |
|---|--|
| RPMI 1640 Medium | PAN Biotech Aidenbach, DE |
| HEPES Solution | SIGMA ALDRICH Life Science |
| Fetal Bovine Serum | Gibco® Paisley, UK |
| Penicillin/Streptomycin | SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA |
| Dulbecco's PBS (1x) | SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA |
| Trypsin/EDTA (1x) | Gibco® Thermo Fischer Scientific |
| EGF (<i>Epithelial growth factor</i>) | PeptoTech, Hamburg,DE |
| FGF (<i>fibroblast growth factor</i>) | PeptoTech, Hamburg,DE |

2.1.4 Erstantikörper

Tabelle 4 Erstantikörper

| | | |
|---|-------------------------|--------------------|
| <i>AffiniPure Goat Anti-Human IgM Fc5μ Fragment specific</i> | Jackson Immuno Research | Cambridgeshire, UK |
| <i>AffiniPure Goat Anti-Human IgG</i> | Jackson Immuno Research | Cambridgeshire, UK |

2.1.5 Zweitantikörper

Tabelle 5 Zweitantikörper

| Substanz | Hersteller | Hauptsitz |
|--|-------------------------|--------------------|
| <i>Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)</i> | Jackson Immuno Research | Cambridgeshire, UK |
| <i>Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM, Fc5μ Fragment Specific</i> | Jackson Immuno Research | Cambridgeshire, UK |

2.1.6 Reagenzien

Tabelle 6 Reagenzien

| Stimulanz | Hersteller | Hauptsitz |
|---|-------------------------|----------------------------|
| <i>AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat anti-Mouse IgM, μ chain specific (minimal cross-reaction to human, bovine and horse serum proteins)</i> | Jackson-Immuno Research | Cambridgeshire, UK |
| Cannabigerol (CRM) | Cayman Chemical | Ann Arbor, Michigan, USA |
| <i>CD28 Monoclonal Antibody (CD28.2), Functional Grade</i> | Thermo Fisher/Life Sc. | Waltham, Massachusetts USA |
| <i>CD3 Monoclonal Antibody (HIT3a), Functional Grade, eBioscience™, human</i> | Thermo Fisher/Life Sc. | Waltham, Massachusetts USA |
| <i>CpG Class B - human TLR9ligand (ODN2006)</i> | InvivoGen | San Diego, California, USA |
| <i>Recombinant Human IFN-γ</i> | PeproTech | Rocky Hill, USA |
| THCAcid | THC-Pharm | Frankfurt, DE |

| | | |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| TRPA1-Antagonist (A967079) | Cayman Chemical | Ann Arbor, Michigan, USA |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Alle nicht näher spezifizierten Materialien wurden von der Firma Eppendorf (DE) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten/Probanden

Die kultivierten Synovialfibroblasten, die für diese Arbeit verwendet wurden, stammen von Patient*innen mit langjähriger RA, die die überarbeiteten Kriterien des American College of Rheumatology erfüllt und eine elektive Kniegelenkspunktion erhalten hatten. Die Aufklärung der Patient*innen und deren schriftliche Einwilligung zur Verwendung des abgetragenen Gewebes für Forschungszwecke erfolgte vor dem elektiven Eingriff. Die Gewebeproben wurden von Dr. Tim Claßen aus der Klinik für Orthopädie und orthopädische Rheumatologie im St. Elisabeth Hospital Meerbusch Lank entnommen und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Studie war zuvor durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät Düsseldorf genehmigt worden (Studennummer: 2018-87-KfogU).

Für die Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (sog. PBMCs) wurden EDTA-Blutproben von jungen, gesunden Proband*innen entnommen, nachdem diese aufgeklärt worden waren und ihre schriftliche Einwilligung abgegeben hatten. Die Verwendung der Blutproben für Forschungszwecke war zuvor durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät Düsseldorf genehmigt worden (Studennummer: 2018-296-KfogU). Insgesamt wurden Blutproben von 10 männlichen und 8 weiblichen Personen im Alter von 23 bis 35 Jahren entnommen.

2.2.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in RPMI1640 Medium mit Zusatz von Glutamax (1%), HEPES (2,5%) und 10% fetalem Kälberserum (engl.: *fetal calf serum*, FCS) sowie Zusatz von (1%) Penicillin/Streptomycin bei 5 Vol% CO₂ und 37°C kultiviert.

Die Passagierung der Zellen erfolgte durch Ablösung mit einfacher Trypsin-EDTA-Lösung. Bis zur einschließlich sechsten Passage wurden die RASFs verwendet. Die Aussaat der RASFs erfolgte mit einer Dichte von 5.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte. Nach Erreichen einer Zelldichte von ~ 70% (nach etwa 72h) wurde das Medium (10% FCS) durch serumreduziertes Medium (2%FCS) ersetzt. Außerdem wurde der entsprechenden Stimulationsreihe auf der 96-Well Platte IFN- γ zugesetzt. Die RASFs wurden daraufhin für 72h bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

2.2.3 Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen

Für die Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (sog. PBMCs) wurden, EDTA-Blutproben von gesunden Proband*innen entnommen. Es wurden je Proband circa 30ml Blut entnommen. Nach einer Wartezeit von 30 min bis zu einer Stunde wurden die PBMCs aus dem humanen Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert. Hierzu wurde das mit EDTA-antikoagulierte Blut direkt aus dem Blutentnahmeröhrchen in die Leucosep™ Tubes (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) dekantiert. Als Separationsmedium wurde Lymphoprep™ (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE) verwendet. Um das Separationsergebnis zu verbessern, wurde das Blut mit MACSQuant® Running Buffer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE) 1:2 verdünnt.

Vor der Aussaat in 96- well-Platten wurden die Zellen wie unten beschrieben stimuliert.

2.2.4 Stimulation der Synovialfibroblasten und PBMCs

Nachfolgend aufgelistete Substanzen wurden zur Stimulation der PBMCs verwendet. Die Reagenzien (CpG und IFN- γ) wurden entsprechend der Herstellerangaben gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die restlichen Stimulanzen wurden bei 4°C gelagert. Angegeben sind die finalen Konzentrationen.

- CpG (ODN 2006) 2,5 μ g/ml

- IFN- γ 10ng/ml
- Anti-IgM 10 μ g/ml
- Anti-CD3 0,5 μ g/ml
- Anti-CD28 0,5 μ g/ml

Die Stimulanzen aktivieren jeweils bestimmte PBMC-Subpopulationen und initiieren deren Zytokinproduktion.

CpG-Oligodesoxynukleotid (ODN) ist ein synthetisch hergestellter *Toll-like receptor 9* (TLR-9) Agonist. Die in diesen Experimenten verwendete Klasse B CpG-ODNs aktivieren vor allem B-Zellen. Zudem wird die Produktion von TNF- α über die Aktivierung des NF- κ B Signalkaskadenweges in Monozyten und Makrophagen angeregt. Im Allgemeinen kommen unmethylierte CpG Motive vermehrt in bakterieller und viraler DNA vor und vermitteln über den TLR9 eine starke Th-1 vermittelte Entzündungsantwort (Hemmi et al., 2000).

Naive B-Zellen wurden mittels anti-IgM Stimulation zur Proliferation angeregt. Anti-IgM bewirkt dies durch eine Quervernetzung (*cross-linking*) der membrangebundenen B-Zell-Rezeptor-Untereinheit des IgM Isotyps (Mond & Brunswick, 2003; Yellen-Shaw & Monroe, 1992).

Zur Stimulation der T-Lymphozyten Population über den T-Zell-Rezeptor, wurden die Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 behandelt. Für eine vollständige Aktivierung von T-Lymphozyten ist das co-stimulatorische Signal via CD28 elementar. Die hierdurch initiierte Signalkaskade induziert die Synthese von Interleukin-2 (IL-2) in T-Lymphozyten (Baroja et al., 1989; Frauwirth & Thompson, 2002).

Die Stimulanzen wurden in der zweifachen Konzentration in Medium (10% FCS) angesetzt. Dann wurden je 100 μ l der jeweiligen Stimulussubstanz in die entsprechenden Vertiefungen einer sterilen 96-Well Platte gegeben. Um eine Modulation der Zytokinproduktion zu erreichen, wurde den isolierten PBMCs CBG, THCA (beide final: 2,5 μ M und 25 μ M) und A967079 (final: 10 μ M), sowie als Kontrolle DMSO zugegeben. Anschließend erfolgte die Aussaat der PBMCs als Duplikate bei einer Dichte von 250.000 Zellen/well in eine sterile 96- well-Platte. Hierfür wurden je 100 μ l der Zell-Suspension in die entsprechenden Wells gegeben.

Pro Proband wurde eine 96-well-Platte allein mit PBMCs, sowie eine Platte mit PBMCs in Ko-Kultur mit Synovialfibroblasten von Patient*innen mit rheumatoider Arthritis (RA-

SFs) ausgesät. Nach siebentägiger Inkubation bei 37° wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C eingefroren, oder direkt für die Durchführung des *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet.

2.2.5 ELISA

Für die Bestimmung von IL-10, IL-6 und TNF wurden ELISA Kits der Firma BD (BD, OptEIA, Heidelberg, Germany) verwendet. Die Immunoassays wurden analog den Herstellerangaben durchgeführt. Anstatt 96-Well Platten wurden in den meisten Fällen 384-Well Platten (*high binding*) verwendet.

IgM /IgG ELISA

Die IgM und IgG Konzentration wurde mittels ELISA unter Verwendung eines laborinternen Protokolls bestimmt. Als Primärantikörper wurde *AffiniPure Goat Anti-Human IgM Fc5 μ Fragment specific* bzw. *AffinePure Goat Anti-Human IgG* der Firma Jackson Immuno Research verwendet. Für den Standard wurde humanes IgM (*IgM from human serum*, SIGMA, St.Louis,MO,USA) verwendet.

Der Primärantikörper wurde 1:2400 in PBS verdünnt und je 20 μ l/well hiervon in eine 384-Well ELISA Platte gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde der Coating-Buffer verworfen und die Wells mit Waschpuffer (PBS+ 0,05% Tween 20) drei Mal gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 50 μ l/Well Blocking Buffer (PBS+ 10% FCS) für zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneuten zwei Waschgängen wurden je 20 μ l der aufgetauten Überstände verdünnt oder unverdünnt in die Wells gegeben und für zwei Stunden auf einem Plattenrüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach viermaligem Waschen wurden anschließend 20 μ l des Zweitantikörpers (*Peroxidase-conjugated AffiniPure Anti-Human IgG bzw. IgM*) zusammen mit der Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate in die Wells gegeben und die Platten dann für eine Stunde inkubiert. Nach vier Waschgängen wurden 20 μ l an Substrat-Lösung (TMB) in die Wells gegeben und die Platten anschließend für circa 15 min im Dunkeln inkubiert.

Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde mit 20 μ l/Well 1M Schwefelsäure-Lösung gestoppt. Die Extinktion der Farbänderung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm

bei einer Referenzwellenlänge von 595 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Ergebnisse wurden als Delta der optische Dichte angegeben (Delta OD).

2.2.6 Durchflusszytometrische-Analyse

Zur Darstellung apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie, erfolgte die Markierung unbehandelter, sowie in vitro inkubierter PBMCs mittels Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) Färbung. Die Untersuchung wurde exemplarisch an PBMCs von drei gesunden Probanden durchgeführt.

Die Analyse des Zelltodes erfolgte an einem FACScan Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG). Nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation und vor der weiteren Analyse (Zeitpunkt t^0) wurden die PBMCs in *Running Buffer* [autoMACS™ Running Buffer, (enthält BSA, EDTA, 0,09% Azide), Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG] resuspendiert, um eine Konzentration von 10 Millionen Zellen pro ml zu erhalten. Pro Färbung wurden 50µl der Zellsuspension verwendet. B-Zellen wurden mit CD19 *VioBlue®* (1:50) markiert. Zudem wurde Annexin-V FITC (1:10) hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln, wurden 150µl *Running Buffer* zugegeben. Vor Beginn jeder Messung wurde durch das Durchflusszytometer PI (1:100) automatisiert hinzugefügt.

Nach 7-tägiger Inkubation (Zeitpunkt t^7) wurden die mit CBG (2,5µM und 25µM) und anti-CD3/-CD28 (je 0,5µg/ml) stimulierten PBMCs, ebenfalls wie oben beschrieben, auf apoptotische und nekrotische Zellen untersucht.

2.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und Erstellung der Diagramme erfolgte über das Programm SPSS Statistics Version 27 der Firma IBM. Zwei Datensätze wurden mittels Mann-Whitney-U Test, mehr als zwei Datensätze mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit nachgeschaltetem *post-hoc*-Test nach Bonferroni bestimmt. Die Daten sind als vertikale Box Whisker Plots dargestellt. Die Box zeigt das 25.-75. Perzentil an, wobei eine Linie innerhalb der Box den Median markiert. Die Whisker (Linien oberhalb und unterhalb der Box) geben das 90 bzw. 10. Perzentil an. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $P < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Basale Zytokin- und Antikörperproduktion von RASFs und PBMCs

Um zu untersuchen, ob sich die basale Zytokin- und Antikörperproduktion von PBMCs in Monokultur und PBMCs in Ko-Kultur mit RASFs unterscheidet, wurden beide Kulturen in Medium für 7 Tage inkubiert. Nach 7 Tagen wurde mittels ELISA die Menge an TNF- α , IL-10, IL-6, sowie IgM und IgG in den Überständen detektiert. Die beiden Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U Test verglichen.

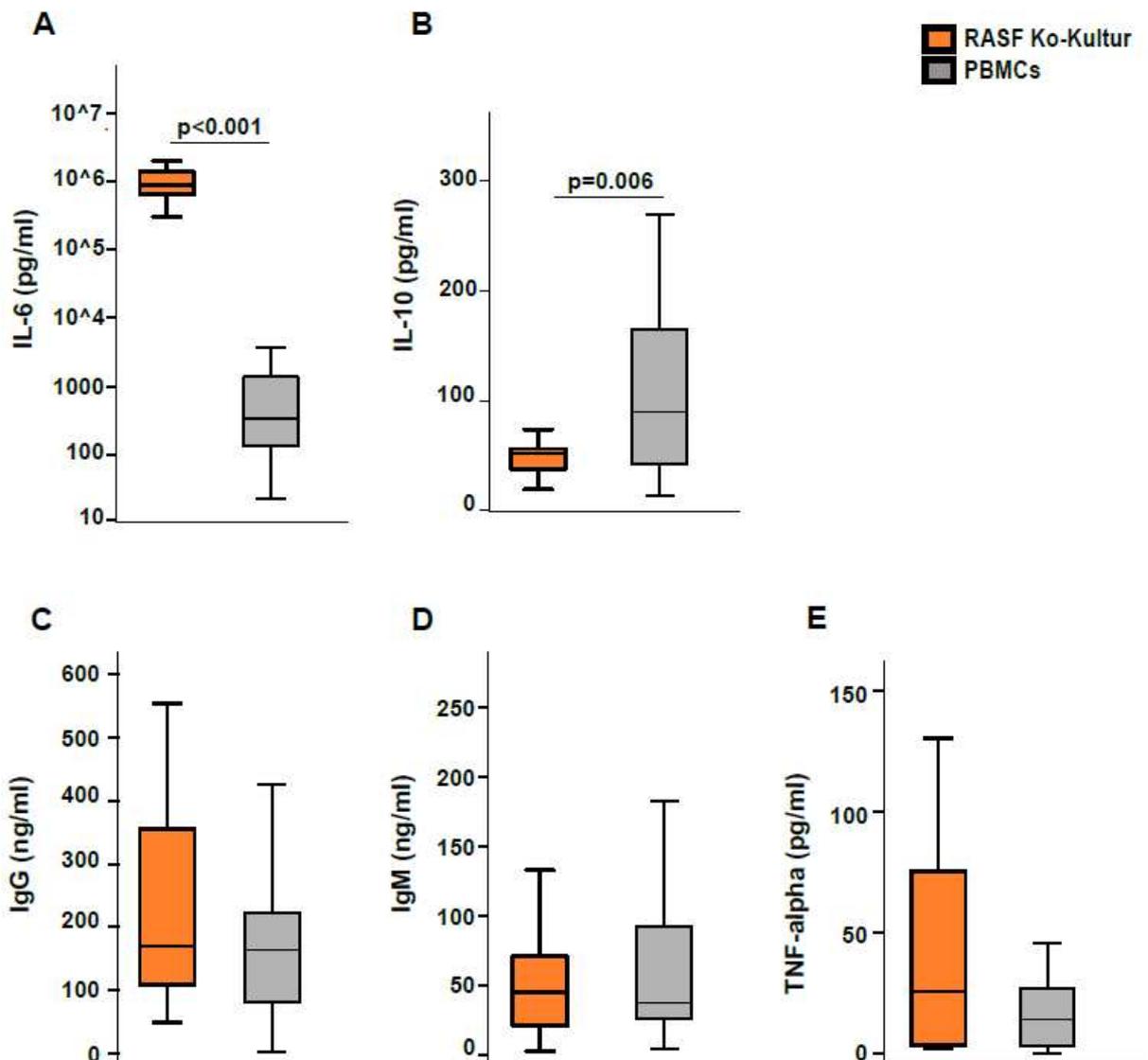


Abb.1: Basale IL-6, IL-10, IgM-, IgG-, und TNF- α Sekretion von PBMCs und RASFs nach siebentägiger Inkubation

Vergleich der IL-6 (A), IL-10 (B), IgG (C), IgM (D) und TNF (E) Produktion in PBMC-Monokultur und Ko-Kultur mit RASF. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Angegeben ist die asymptotische Signifikanz. Die Analyse der Mittelwertvergleiche erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. n ist die Anzahl der Replikate aus 18 verschiedenen Spender-Proben (**A** $n=30-35$; **B** $n=30-32$; **C** $n=33-36$; **D** $n=33-36$; **E** $n=7-11$). Die Werte in Abbildung A sind logarithmisch aufgetragen.

Die IL-6 Sekretion war in der RASF Ko-Kultur 100 bis 1000-fach höher als in der PBMC-Kultur (Abb.1A). Im Gegensatz dazu zeigte sich in der PBMC-Kultur verglichen zur RASF Ko-Kultur eine höhere IL-10 Sekretion (Abb.1B).

Die basale TNF- α , IgM und IgG Sekretion zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kulturen (siehe Abb. 1C-E bzw. 2B, 3F, 4D).

Zusammenfassend zeigten PBMCs in Monokultur und PBMCs in Ko-Kultur mit RASFs Unterschiede in der basalen Sekretion von IL-6 und IL-10. Hierbei zeigte sich eine stark erhöhte IL-6 Sekretion bzw. eine erniedrigte IL-10 Sekretion in der RASF Ko-Kultur im Vergleich zur PBMC-Kultur.

3.2 Vergleich zwischen stimulierten Kontrollen der PBMC-Kultur und RASF Ko-Kultur

Neben der unstimulierten Proben zeigten auch stimulierte (IFN- γ , CpG, anti-IgM, anti-CD3/-CD28, oder anti-CD3/-CD28/-IgM) Proben Unterschiede in der Zytokin -und Antikörperproduktion zwischen PBMC Mono- und Ko-Kultur, unabhängig von der zusätzlichen Gabe von Cannabinoiden.

Wie oben beschrieben zeigte sich für die basale TNF- α Sekretion kein signifikanter Unterschied zwischen der PBMC-Monokultur und Ko Kultur (Abb.2B). Wurden PBMCs und RASFs hingegen mit anti-CD3/-CD28 oder anti-CD3/-CD28/-IgM stimuliert, zeigte sich eine signifikant erniedrigte TNF- α Sekretion in den Überständen der Ko-Kultur verglichen mit der TNF- α Sekretion der PBMC-Monokultur (Abb.2A).

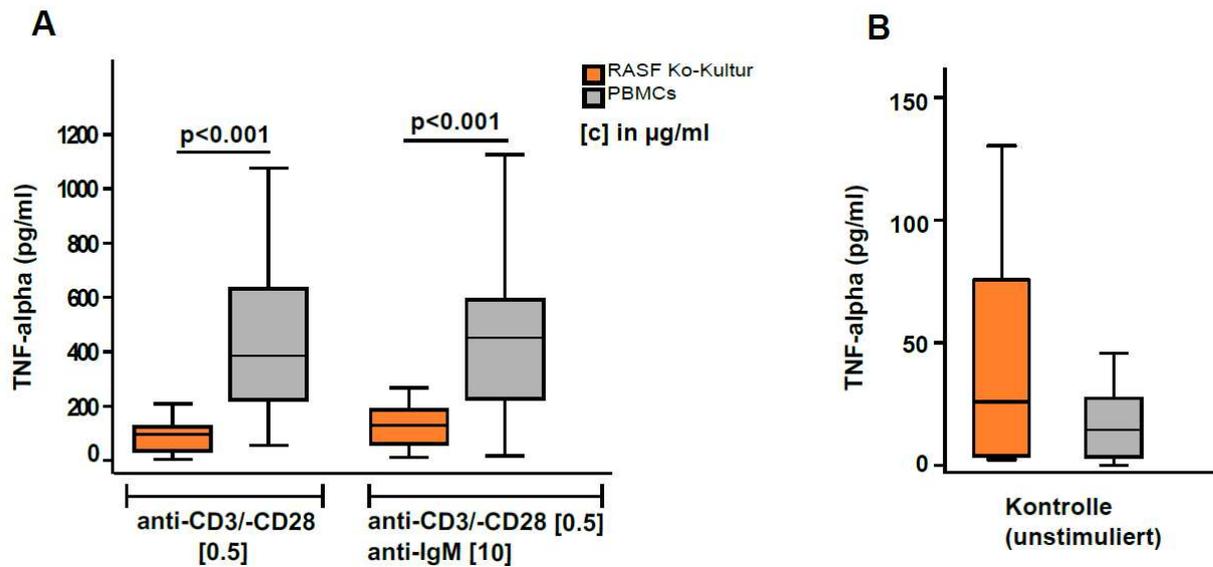


Abb.2: TNF- α Sekretion in PBMC Mono- und Ko-Kultur mit RASF nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti- CD3/-CD28-IgM (A) sowie unter Basalbedingungen (B)

Alle Konzentrationen [c] sind in µg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse der Mittelwertvergleiche erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. n ist die Anzahl der Replikate aus 18 verschiedenen Spender-Proben **A** ($n=28-34$); **B** ($n=7-11$).

Auch für die basale IgM Sekretion zeigte sich wie oben beschrieben kein Unterschied zwischen beiden Kulturen (Abb. 3F). Wurden PBMCs und RASFs hingegen mit IFN- γ , CpG, anti-CD3/-CD28 oder anti-CD3/-CD28-IgM stimuliert, war die IgM Sekretion in der Ko-Kultur im Vergleich zur PBMC-Monokultur vermindert (Abb. 3A, C-E). Nach Stimulation mit anti-IgM zeigte sich im Vergleich zur PBMC Kultur lediglich eine Tendenz ($p=0.071$) für eine verminderte IgM Sekretion in Ko-Kultur (Abb.3B).

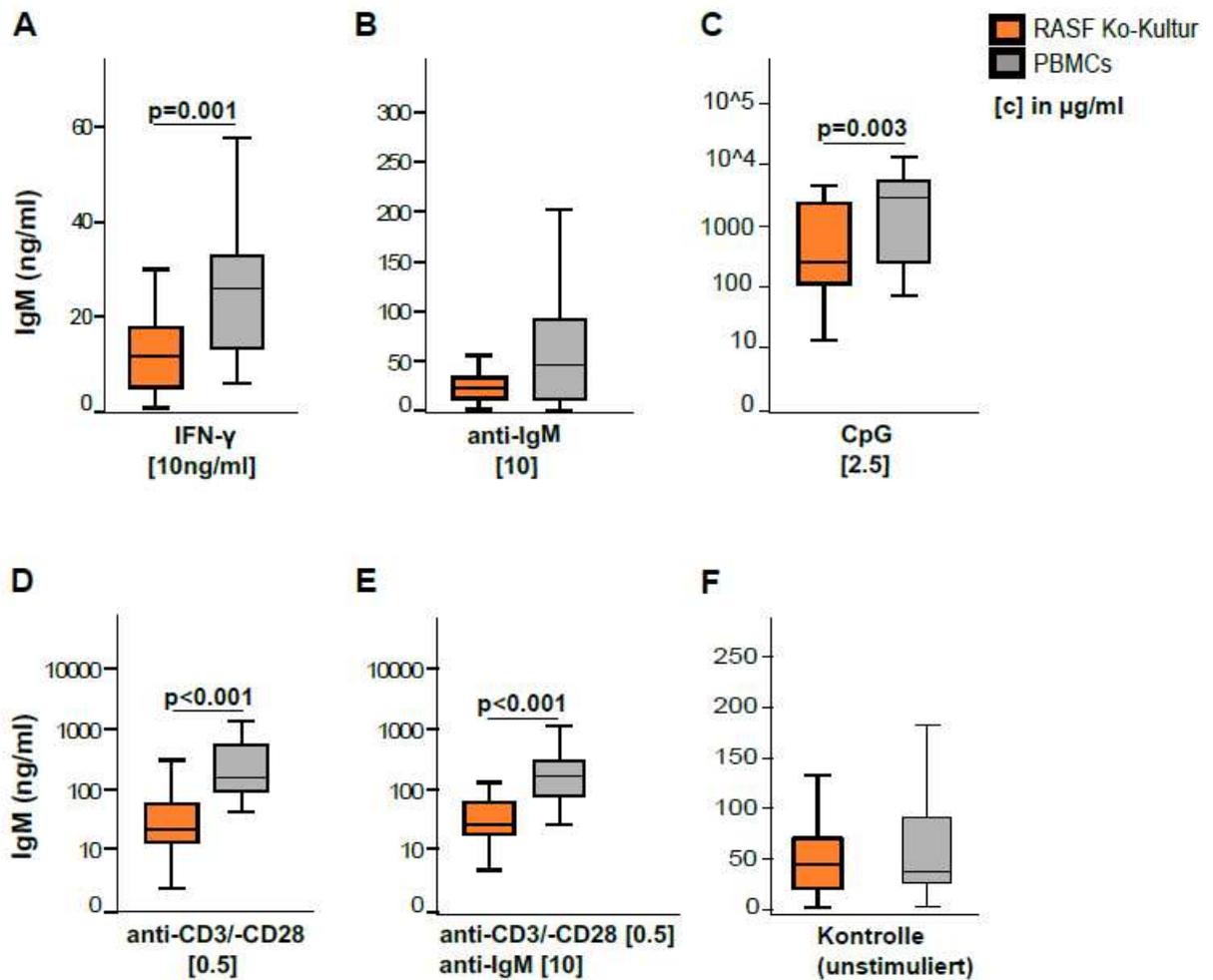


Abb.3: IgM Sekretion in PBMC Mono- und Ko-Kultur mit RASF nach Stimulation mit IFN-γ (A), anti-IgM (B), CpG (C), anti-CD3/-CD28 (D) und anti-CD3/-CD28/IgM (E) sowie unter Basalbedingungen (F)

Alle Konzentrationen [c] sind, wenn nicht anders angezeigt, in µg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Angegeben ist die asymptotische Signifikanz. Die Analyse der Mittelwertvergleiche erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. n ist die Anzahl der Replikate aus 18 verschiedenen Spender-Proben (A $n=32-34$; B $n=30-34$; C $n=31-35$; D $n=33-36$; E $n=28-35$; F ($n=33-36$)). Die Werte in Abbildung C, D und E sind logarithmisch aufgetragen.

Ebenso zeigte sich eine signifikant verminderte IgG Sekretion in Ko Kultur im Vergleich zur PBMC-Monokultur nach Stimulation der Kontrollen mit anti-CD3/-CD28, anti-IgM, oder nach Kombination der beiden erstgenannten Reagenzien (Abb.4). Nach Stimulation mit IFN-γ oder CpG zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Daten nicht gezeigt).

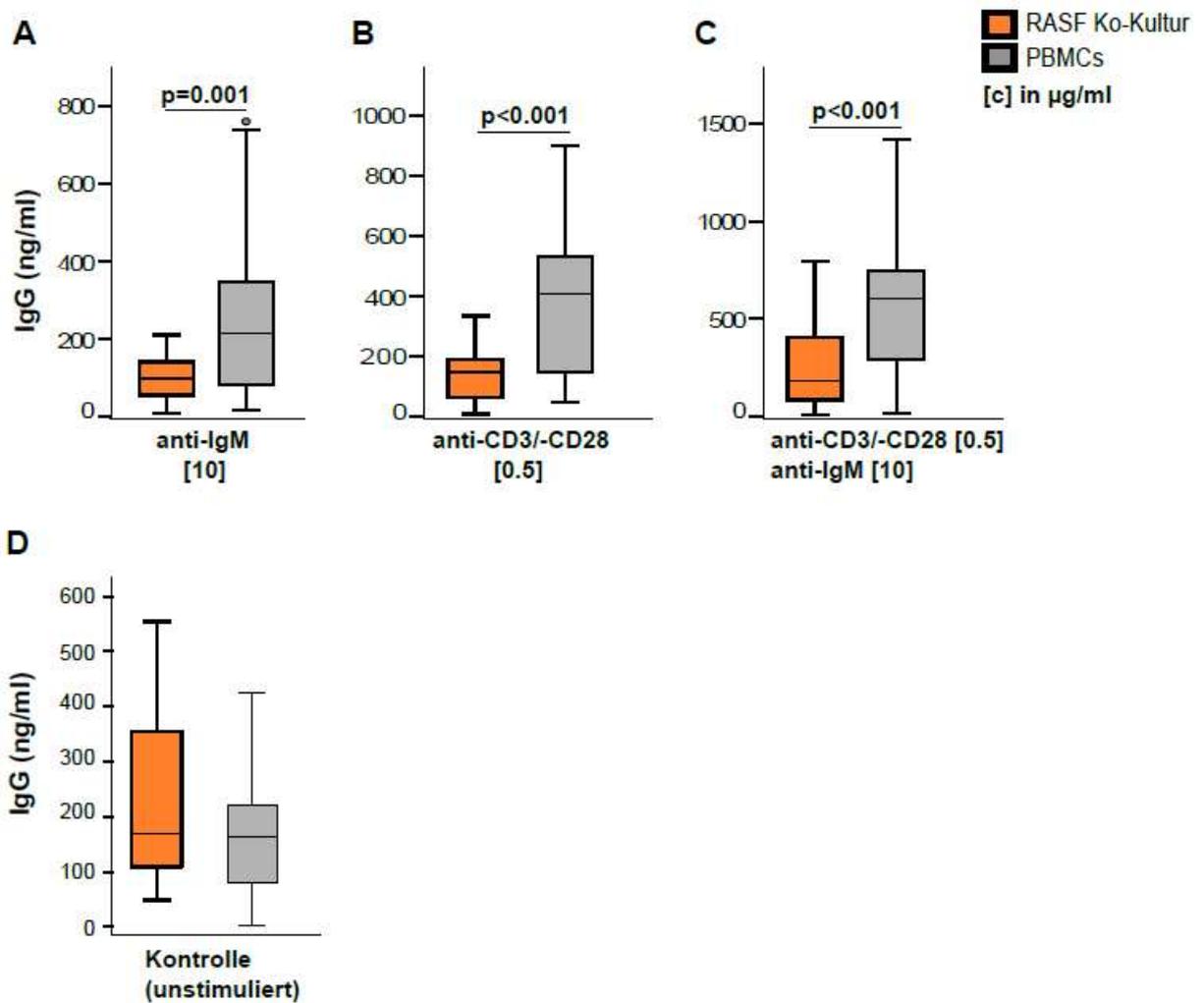


Abb.4: IgG Sekretion in PBMC Mono- und Ko-Kultur mit RASF nach Stimulation mit anti-IgM (A), anti-CD3/-CD28 (B) und anti-CD3/-CD28/-IgM (C) sowie unter Basalbedingungen (D)

Alle Konzentrationen [c] sind in µg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p<0.05$ definiert. Angegeben ist die asymptotische Signifikanz. Die Analyse der Mittelwertvergleiche erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. n ist die Anzahl der Replikate aus 18 verschiedenen Spender-Proben (**A** $n=28-33$; **B** $n=31-35$; **C** $n=35$; **D** ($n=33-36$)).

Die oben bereits erwähnte ausgeprägte basale IL-6 Sekretion in der RASF Ko-Kultur zeigte sich auch nach Stimulation mit allen hier eingesetzten Reagenzien.

Eine erhöhte basale IL-10 Sekretion in der PBMC-Monokultur im Vergleich zur Ko-Kultur konnte nur nach Stimulation der Kontrollen mit CpG oder anti-CD3/-CD28 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Einfluss des TRPA1 Antagonisten auf die Zytokin- und Antikörperproduktion

Da CBG und THCA ihre Wirkung über die Modulation des TRPA1 Kanals vermitteln können, wurde zunächst der Effekt eines TRPA1 Antagonisten (A967079) allein untersucht. A967079 erhöhte dabei die IL-6 (Abb. 7B) Produktion in PBMC-Monokultur sowie die IgM und IgG Produktion in PBMC Mono- und Ko-Kulturen (siehe unten).

3.4 Einfluss von CBG auf die Zytokinproduktion von PBMCs und RASFs

3.4.1 Einfluss von CBG auf die TNF α Sekretion

Für die Stimulation mit IFN- γ und CpG lagen keine ausreichenden Daten vor, um die Gruppenvergleiche durchzuführen. Die TNF- α Konzentrationen lagen hier unterhalb des *cut offs* des verwendeten ELISA Kits von BD (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation mit anti-IgM zeigte nur für die PBMC Kultur ausreichend Daten für eine Varianzanalyse; allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.4.1.1 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28, erhöhte CBG [25 μ M] die TNF α Sekretion im Vergleich zur nur mit anti-CD3/-CD28 stimulierten Kontrolle in der PBMC/RASF Ko-Kultur (Abb. 5A). Diese Erhöhung wurde durch gleichzeitige Zugabe des TRPA1 Antagonisten A967079 [10 μ M] inhibiert ($p=0.001$) (Abb. 5A). Eine geringere Konzentration von CBG oder die alleinige Zugabe von A967079 resultierte in keiner Veränderung der TNF-Produktion (Abb. 5A). In der PBMC-Monokultur zeigte sich kein Effekt von A967079 oder CBG allein, jedoch reduzierte CBG [25 μ M] in Kombination mit A967079 die TNF α Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.011$) und CBG [25 μ M] allein ($p=0.034$) (Abb. 5B).

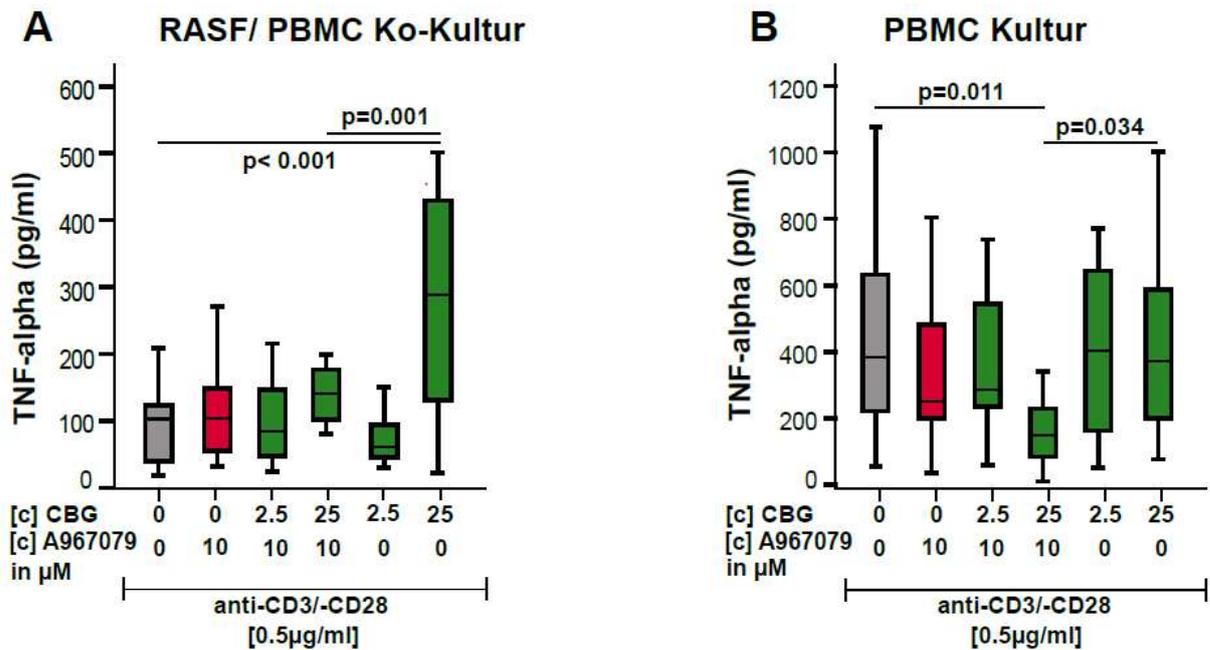


Abb.5: TNF- α -Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate aus 8-18 verschiedenen Spender-Proben (A $n=12-29$; B $n=15-34$).

Während bei einer Stimulation mit anti-CD3/-CD28 T Zellen polykonal aktiviert werden, bewirkt anti-IgM eine zusätzliche Aktivierung der B Zellen. Unter diesen Bedingungen (anti-CD3/-CD28/-IgM) erhöhte CBG [25 μ M] allein oder in Kombination mit dem TRPA1 Antagonisten A967079 die TNF- α Produktion in Ko-Kultur ($p < 0.001$). Die Erhöhung durch CBG [25 μ M] zusammen mit A967079 war auch signifikant gegenüber der alleinigen A967079 Modulation ($p < 0.001$, Abb. 6A)

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in der PBMC-Monokultur (Abb. 6B). Hier steigerte CBG [25 μ M] zusammen mit A967079, jedoch nicht CBG allein, die TNF- α Produktion signifikant gegenüber der Kontrolle und A967079 allein ($p < 0.001$).

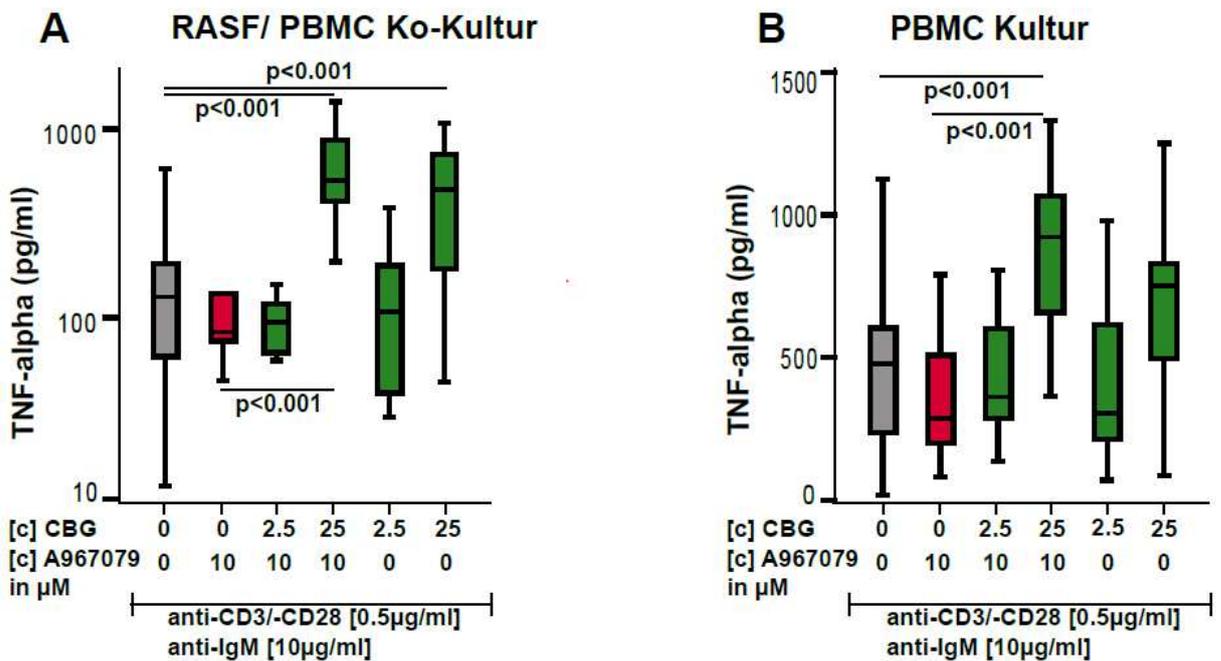


Abb.6: TNF- α -Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/anti-IgM und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=11-29$; **B** $n=15-33$). Die Werte in Abbildung A sind logarithmisch aufgetragen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur nach Stimulation der T-Lymphozyten Population (mit anti-CD3/-CD28) ausreichend TNF- α im Überstand detektiert werden konnte. Die Modulation mit CBG [25 μM] zeigte zwei wesentliche Effekte auf die TNF- α Sekretion: 1) Wurden nur T-Zellen stimuliert, steigerte CBG [25 μM] die TNF- α Sekretion. Dieser Effekt wurde durch Zugabe des TRPA1 Antagonisten A967079 blockiert. 2) Wurden gleichzeitig auch naive B-Zellen stimuliert, zeigte sich der gleiche Effekt auch für die Kombination aus CBG [25 μM] und A967079. Die zusätzliche Gabe von A967079 zeigte hier also keinen hemmenden Einfluss auf die CBG-Wirkung.

3.4.2 Einfluss von CBG auf die IL-6 Sekretion

3.4.2.1 Stimulation mit IFN- γ

In Ko-Kultur zeigten sich keine Effekte durch CBG oder A967079 auf die IL-6 Produktion (Abb. 7A). In PBMC-Monokultur erniedrigte CBG [25 μ M] die IL-6 Produktion ($p=0.015$), während A967079 diese erhöhte ($p=0.003$) (Abb. 7B). Die beobachtete Erhöhung durch A967079 wurde durch Gabe von CBG [25 μ M] inhibiert ($p<0.001$) (Abb. 7B). CBG [2.5 μ M] allein hatte keinen Einfluss auf die IL-6 Produktion, jedoch ergab sich ein signifikanter Unterschied zu CBG [2.5 μ M] zusammen mit A967079 ($p=0.049$).

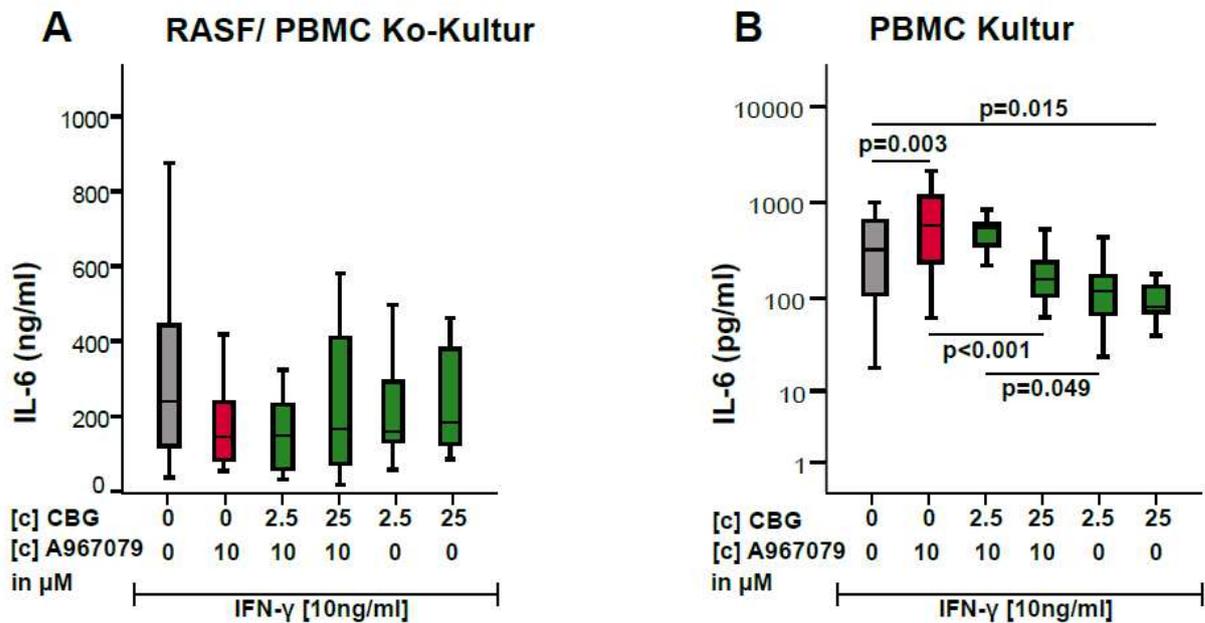


Abb.7: IL-6 Sekretion nach Stimulation mit IFN- γ und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p<0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=15-31$; **B** $n=13-34$). Die Werte in Abbildung B sind logarithmisch aufgetragen.

3.4.2.2 Stimulation mit CpG

Nach Stimulation mit CpG erhöhte CBG [2.5µM] in Kombination mit A967079 die IL-6 Sekretion in Ko-Kultur signifikant zur Kontrolle (p=0.039) und zu CBG [2.5µM] allein (p=0.001) (Abb. 8A).

In PBMC-Monokultur erhöhte A967079 die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (p=0.004) (Abb.8B). Die beobachtete Erhöhung durch A967079 wurde durch Gabe von CBG [25µM] inhibiert (p=0.001).

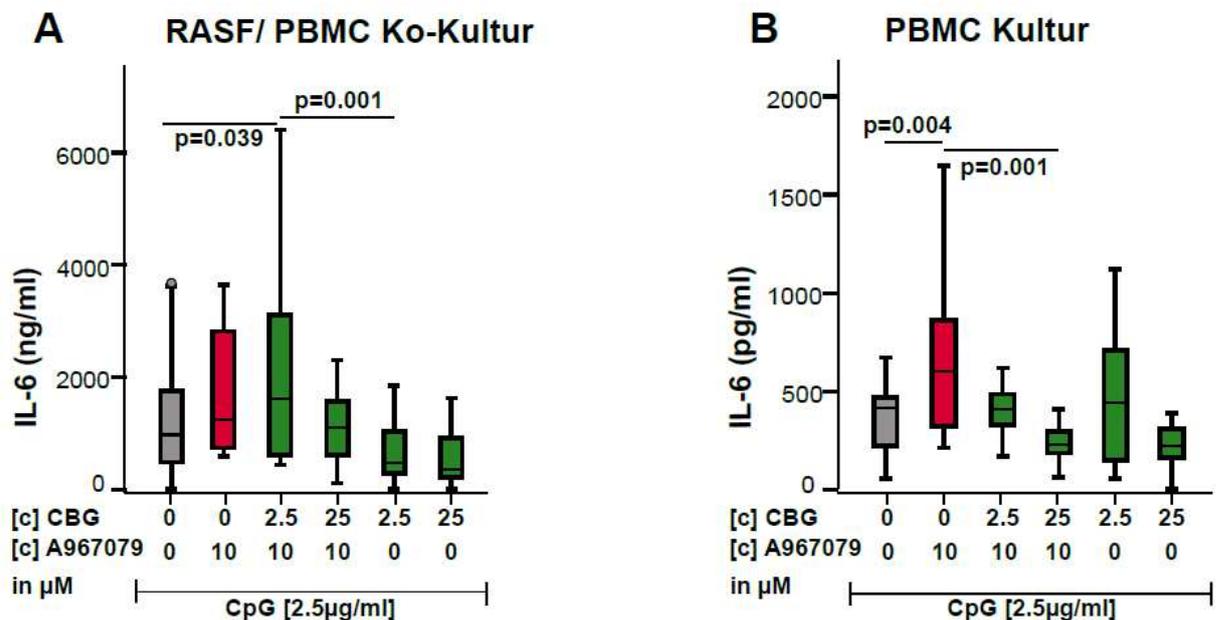


Abb.8: IL-6 Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als p<0.05 definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. *n* ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** n=15-31; **B** n=12-28).

3.4.2.3 Stimulation mit anti-IgM

In Ko-Kultur zeigten sich verglichen zur Kontrolle keine signifikanten Effekte. Allerdings erhöhte die Kombination aus A967079 und CBG [25µM] tendenziell (p=0.09) die IL-6 Sekretion im Vergleich zu CBG [25µM] allein (Abb. 9A).

In der PBMC-Monokultur erhöhte CBG [25µM] die IL-6 Sekretion im Vergleich zur nur mit anti-IgM stimulierten Kontrolle (Abb.9B). Unter gleichzeitiger Zugabe von A967079 stieg die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle, sowie zu A967079 und CBG [25µM] allein weiter an ($p < 0.001$) (Abb.9B).

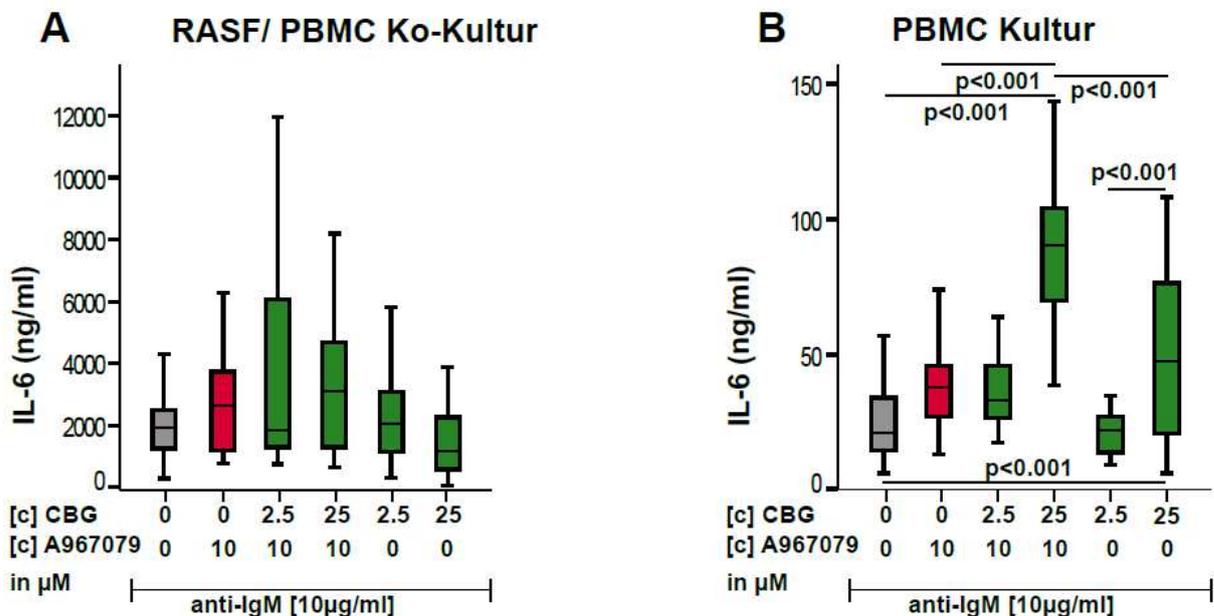


Abb.9: IL-6 Sekretion nach Stimulation mit anti-IgM und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=16-28$; **B** $n=16-36$).

3.4.2.4 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 zeigten sich keine signifikanten Effekte in Ko-Kultur. In PBMC-Monokultur hingegen steigerte die kombinierte Gabe aus CBG [2.5µM] und A967079 tendenziell die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.068$) und CBG [2.5µM] allein ($p=0.055$) (Daten nicht gezeigt).

In Ko-Kultur reduzierte CBG [25µM] nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.017$) (Abb.10A). Im Gegensatz hierzu steigerte CBG [25µM] in Kombination mit A967079 in PBMC-Monokultur signifikant die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$), zu A967079 allein ($p < 0.001$) und zu CBG [25µM] allein ($p=0.027$) (Abb.10B).

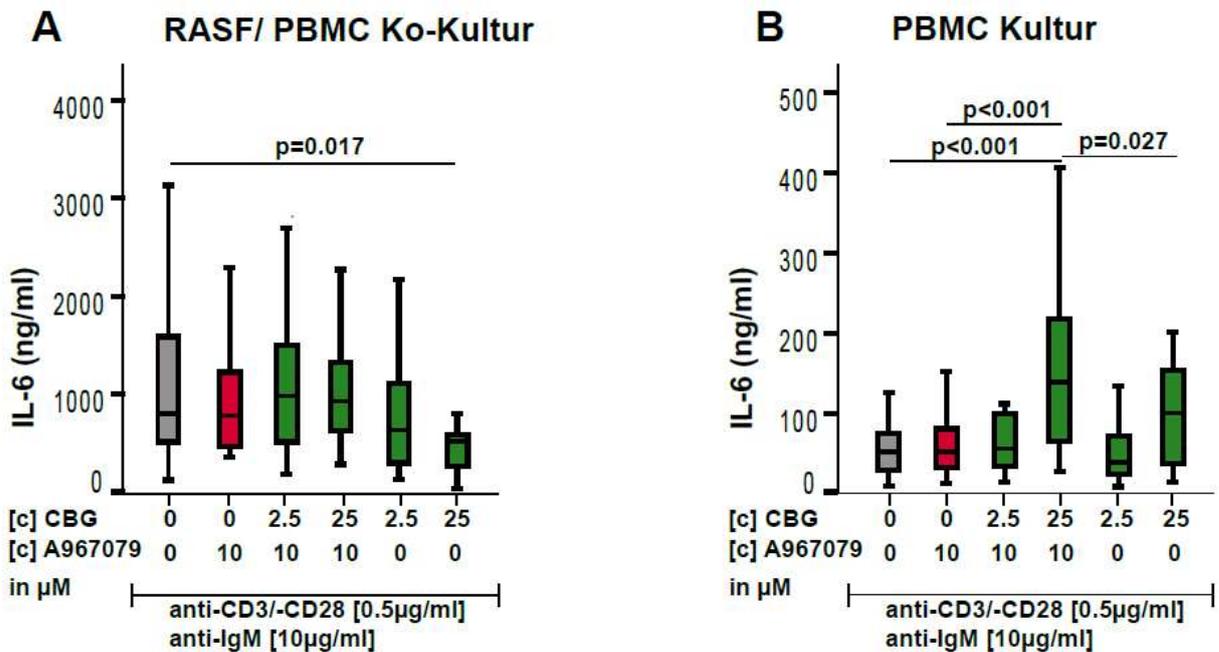


Abb.10: IL-6 Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/anti-IgM und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-32$; **B** $n=15-35$).

3.4.3 Einfluss von CBG auf die IL-10 Sekretion

Um einen möglichen direkten anti-inflammatorischen Wirkeffekt der Cannabinoide auf die Immunzellen zu untersuchen, erfolgte die Messung der Interleukin-10 Konzentration in den Überständen der Kulturen.

Bei den Proben, welche mit IFN- γ stimuliert und mit CBG [25 μ M] in Kombination mit A967079 moduliert wurden, konnte kein IL-10 mittels des ELISA Kits detektiert werden. Insgesamt lagen nur wenige Daten zur Modulation mit dem TRPA1 Antagonisten vor. Die Varianzanalyse der vorhandenen Gruppen ergab weder in der RASf Ko-Kultur noch in der PBMC Kultur signifikante Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.4.3.1 Stimulation mit CpG

In Ko-Kultur und in PBMC-Monokultur reduzierte CBG [25 μ M] mit und ohne A967079 die IL-10 Sekretion verglichen zur Kontrolle ($p=0.003$ bzw. $p < 0.001$) (Abb.11A/B). Die

alleinige Gabe von A967079 [10 μ M] resultierte in keiner Veränderung der IL-10 Produktion. Andererseits erhöhte CBG [2.5 μ M] in Ko-Kultur signifikant die IL-10 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle und zu CBG [2.5 μ M] kombiniert mit A967079 ($p < 0.001$) (Abb.11A).

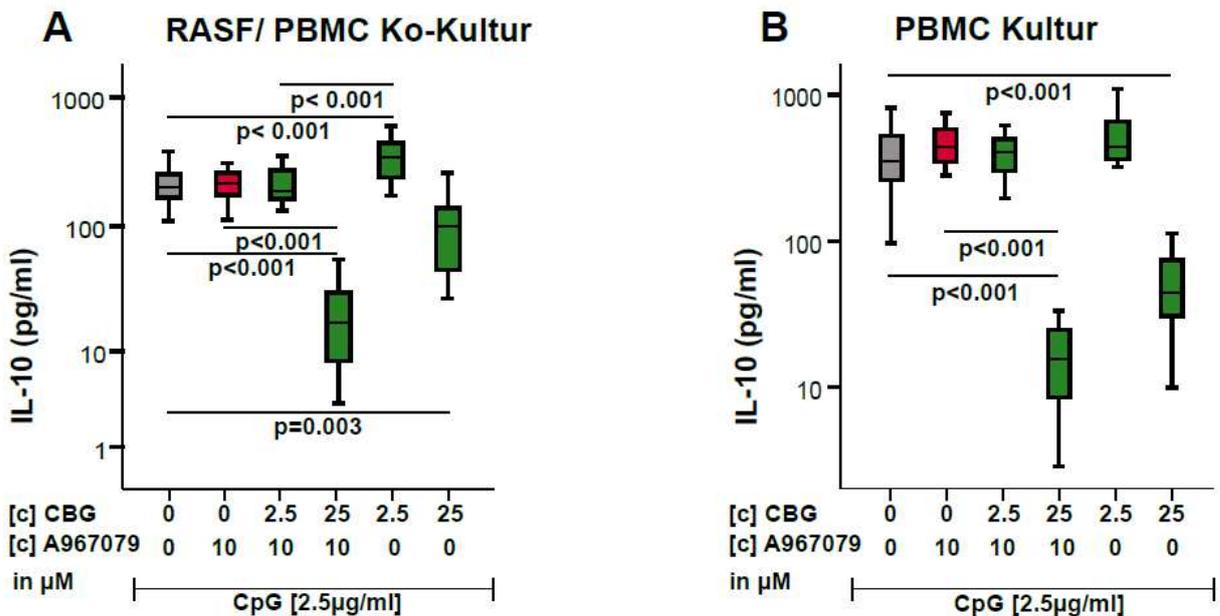


Abb.11: IL-10 Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-32$; **B** $n=10-36$). Die Werte in Abbildung A und B sind logarithmisch aufgetragen.

3.4.3.2 Stimulation mit anti-IgM

Überraschenderweise steigerte CBG [25 μ M] die IL-10 Sekretion in Ko-Kultur und in PBMC-Monokultur im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$) nach Stimulation mit anti-IgM (Abb.12). Diese Erhöhung wurde durch gleichzeitige Zugabe von A967079 in Ko-Kultur ($p=0.044$) und in PBMC-Monokultur ($p < 0.001$) inhibiert (Abb.12).

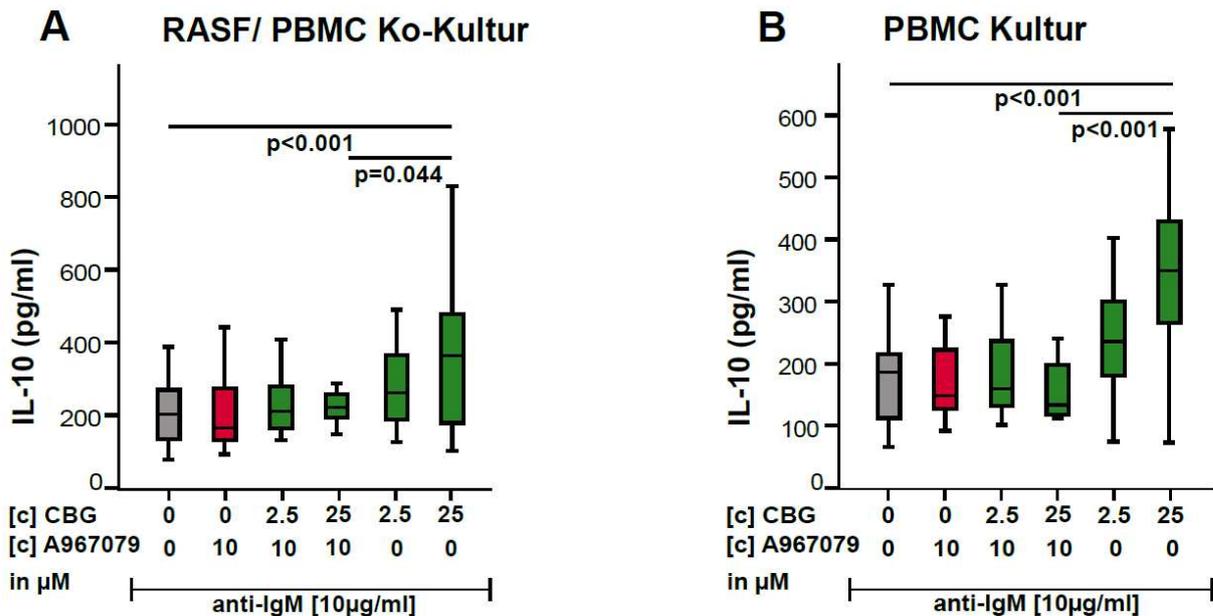


Abb.12: IL-10 Sekretion nach Stimulation mit anti-IgM und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=13-36$; **B** $n=14-36$).

3.4.3.3 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

In der PBMC Mono- und Ko-Kultur zeigte die alleinige Gabe von CBG oder A967079 keinen Effekt. Allerdings sank die IL-10 Sekretion in beiden Kulturen unter der Kombination aus anti-CD3/-CD28, CBG [25µM] und A967079 im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$) und zu CBG [25M] allein ($p=0.002$ bzw. $p=0.008$) (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM reduzierte CBG [25µM] die IL-10 Sekretion in PBMC-Monokultur im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.003$) (Abb.13B). Dieser hemmende Effekt durch CBG [25µM] zeigte sich sogar verstärkt nach zeitgleicher Zugabe von A967079 im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$) und zu A967079 allein ($p < 0.001$) (Abb.13B).

In Ko-Kultur reduzierte CBG [25µM] in Kombination mit A967079 die IL-10 Sekretion im Vergleich zu A967079 allein ($p=0.007$), jedoch nicht signifikant zur Kontrolle (Abb.13A).

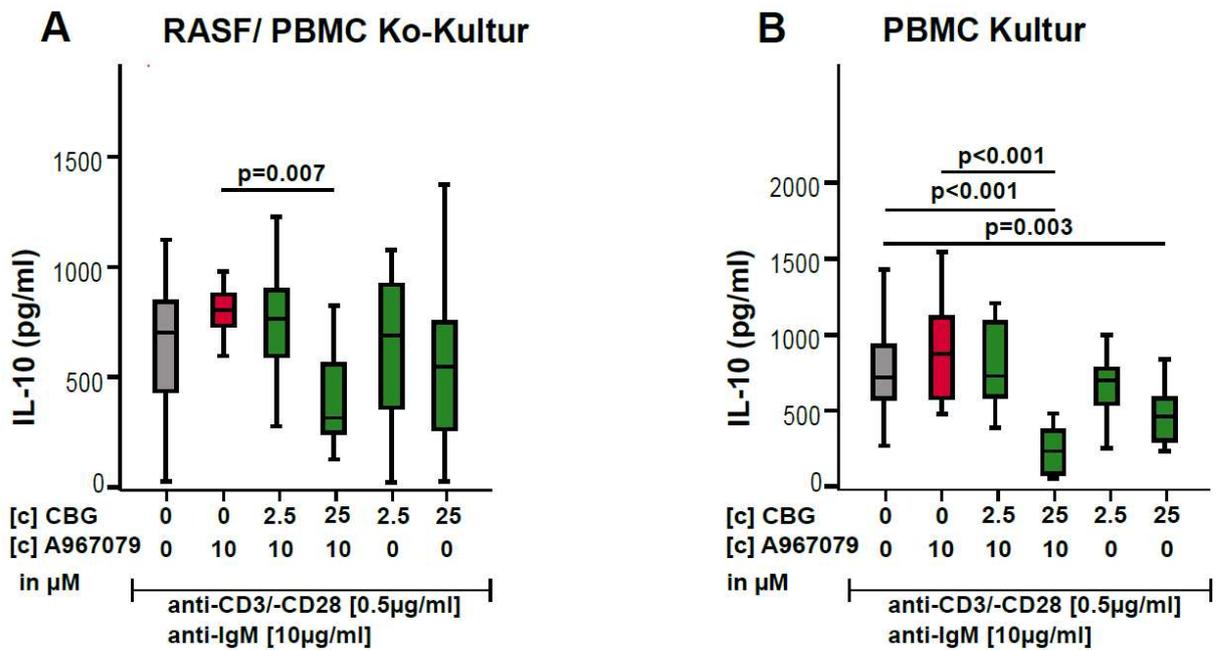


Abb.13: IL-10 Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/anti-IgM und Modulation mit CBG und A9s67079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p<0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (A $n=12-36$; B $n=16-35$).

3.5 Einfluss von CBG auf die Antikörpersekretion von PBMCs

3.5.1 Wirkung von CBG auf die IgM Sekretion

Da Autoantikörper möglicherweise selbst pathogene Eigenschaften im Rahmen der RA besitzen, wurde die Konzentration der Immunglobuline der Klasse M (IgM) und G (IgG) in den Überständen der RASF Ko-Kultur und PBMC Kultur bestimmt.

3.5.1.1 Stimulation mit IFN- γ

Im Vergleich zur nur mit IFN- γ stimulierten Kontrolle reduzierte CBG [25 μM] in Kombination mit A967079 die IgM Sekretion in PBMC Mono- und Ko-Kultur ($p=0.01$ bzw. $p<0.001$) (Abb.14). CBG oder A967079 allein zeigten im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt auf die IgM Sekretion (Abb.14).

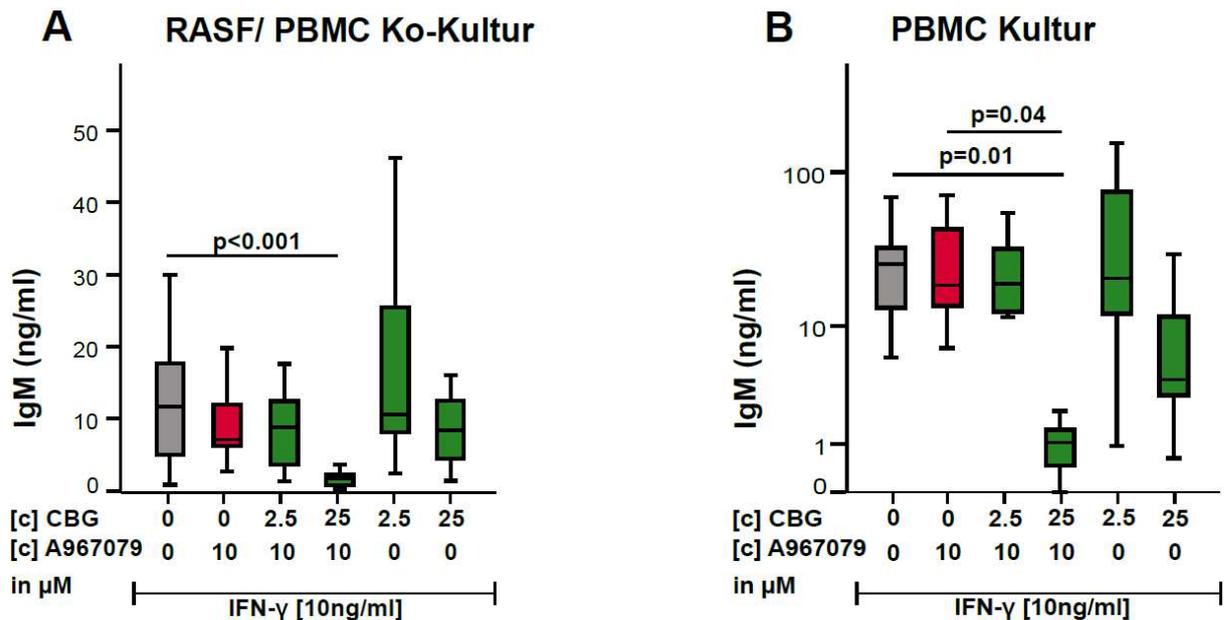


Abb.14: IgM Sekretion nach Stimulation mit Interferon-gamma und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-32$; **B** $n=13-34$). Die Werte in Abbildung B sind logarithmisch aufgetragen.

3.5.1.2 Stimulation mit CpG

Die Stimulation mit CpG führte aufgrund der direkten B-Zell Stimulation im Vergleich zu den anderen Reagenzien erwartungsgemäß zur stärksten Anregung der Antikörperproduktion.

In beiden Kulturen erhöhte A967079 allein und in Kombination mit CBG [2.5µM] die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle und zur alleinigen CBG [2.5µM] Gabe ($p < 0.001$) (Abb.15A/B). In PBMC-Monokultur zeigte sich zudem eine signifikante Reduktion der IgM Sekretion durch CBG [2.5µM; 25µM] allein im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.011$; $p=0.004$). CBG [25µM] kombiniert mit A967079 reduzierte ebenfalls die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.011$) (Abb.15B).

Zusammenfassend inhibierte die Zugabe von A967079 die Wirkung niedriger [2.5µM], nicht jedoch die hoher [25µM] CBG-Konzentrationen auf die IgM Sekretion in PBMC-Monokultur (Abb.15B).

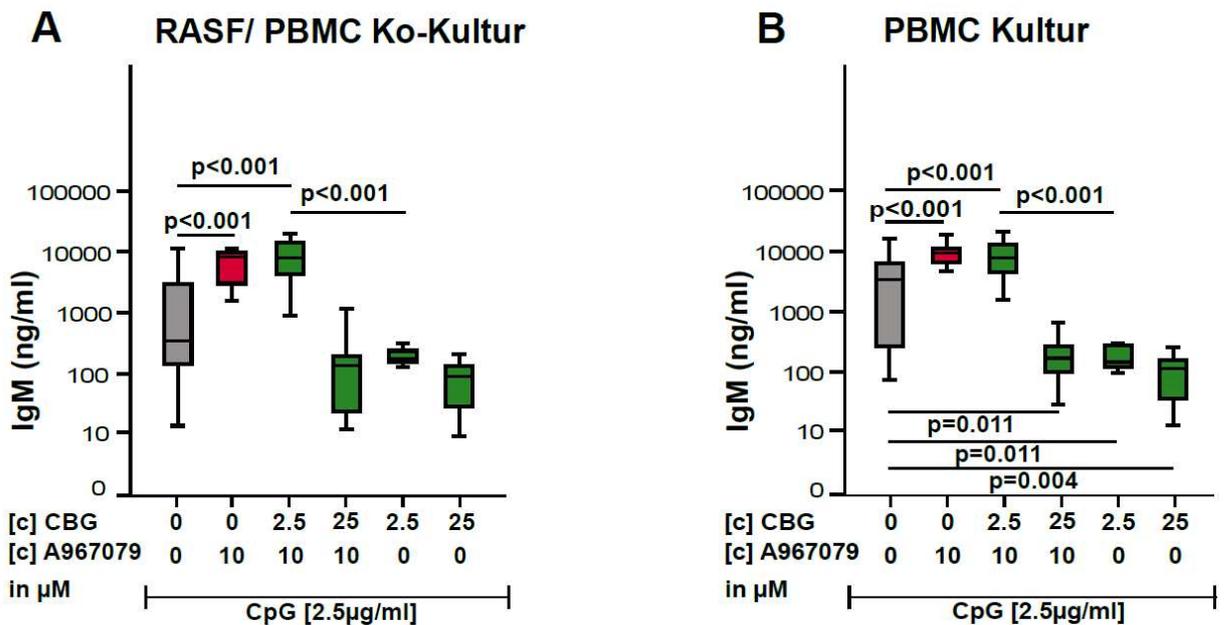


Abb.15: IgM Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Proben (**A** $n=13-34$; **B** $n=15-36$). Die Werte in Abbildung A und B sind logarithmisch aufgetragen.

3.5.1.3 Stimulation mit anti-IgM

Nach Stimulation mit anti-IgM reduzierte CBG [25 μM] kombiniert mit A967079 die IgM Sekretion in Ko-Kultur im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.026$) und zu A967079 allein ($p=0.012$), nicht jedoch zu CBG [25 μM] allein. Die alleinige Zugabe von A967079 oder CBG resultierte in keiner signifikanten Veränderung der IgM Sekretion.

In PBMC-Monokultur steigerte A967079 allein und kombiniert mit CBG [2.5 μM] die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$) und zu CBG [2.5 μM] allein ($p=0.002$) (Daten nicht gezeigt).

3.5.1.4 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

In Ko-Kultur erhöhte, nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28, A967079 allein oder in Kombination mit CBG [2.5 μM] die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle und zu CBG [2.5 μM] allein ($p < 0.001$) (Abb.16A). Im Gegensatz hierzu zeigte sich in PBMC-Monokultur kein signifikanter Effekt von A967079 allein. Allerdings reduzierte CBG in

niedriger [2.5µM] und hoher [25µM] Konzentration die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.034$; $p<0.001$) (Abb.16B). Die zeitgleiche Zugabe von A967079 zu CBG inhibierte diese Reduktion der IgM Sekretion nur bei niedrigen [2.5µM] CBG-Konzentrationen in PBMC-Monokultur ($p<0.001$) (Abb.15B). CBG [25µM] kombiniert mit A967079 reduzierte somit ebenfalls die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p<0.001$) und zu A967079 allein ($p<0.001$) (Abb.16B).

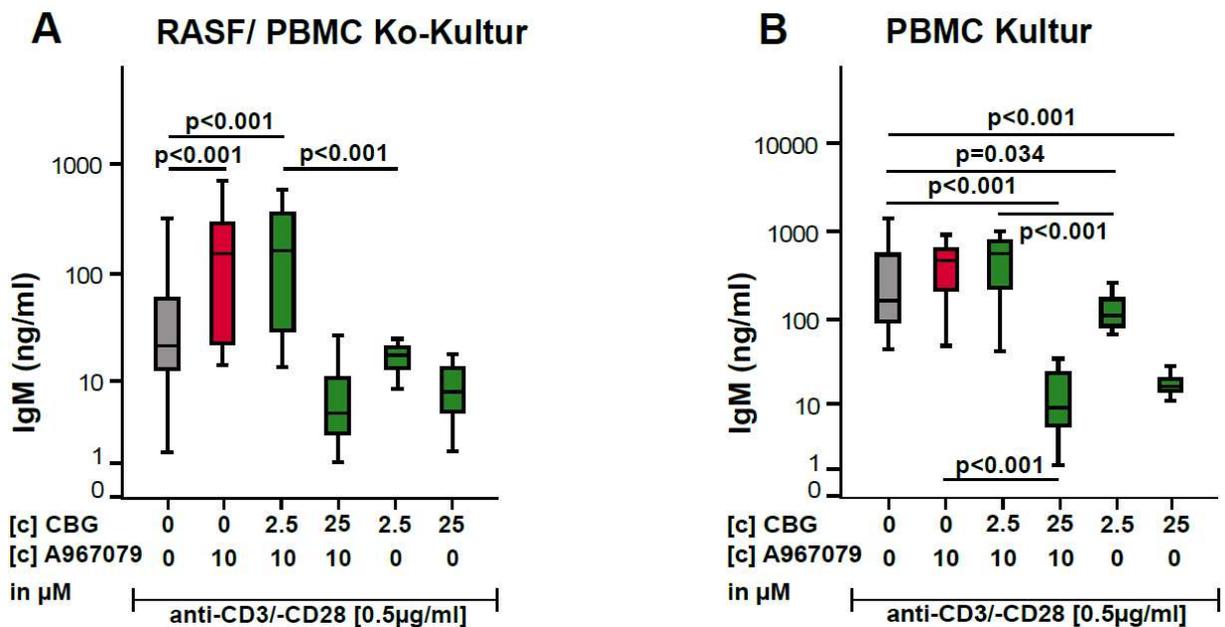


Abb.16: IgM Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p<0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-33$; **B** $n=16-36$). Die Werte in Abbildung A und B sind logarithmisch aufgetragen.

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM zeigten sich größtenteils die gleichen Effekte wie in der mit anti-CD3/-CD28 stimulierten PBMC Mono- und Ko-Kultur (s.o.). Zudem zeigte sich ein Anstieg der IgM Sekretion durch A967079 allein, sowie in Kombination mit CBG [2.5 µM] im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.002$; $p=0.007$) und zu CBG [2.5µM] allein ($p<0.001$) auch in PBMC Monokultur. Anders als nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 resultierte nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM die alleinige Gabe von CBG [2.5] in keiner Veränderung der IgM Sekretion (Daten nicht gezeigt).

Abschließend lassen sich drei wesentliche Effekte für den Einfluss von CBG auf die IgM Sekretion zusammenfassen. Erstens war die IgM Sekretion in der PBMC-Monokultur höher als in der RASF Ko-Kultur. Zweitens senkten hohe [25µM] CBG-Konzentrationen die IgM Sekretion. Dieser hemmende Einfluss war unabhängig von der Anwesenheit des TRPA1 Antagonisten A967079.

Letztlich zeigte sich eine Steigerung der IgM Sekretion unter dem Einfluss von A967079 [10µM] oder CBG [2.5µM] in Kombination mit A967079. CBG [2.5 µM] allein zeigte stimulationsabhängig (CpG und anti-CD3/-CD28) einen hemmenden oder keinen Effekt auf die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle.

3.5.2 Wirkung von CBG auf die IgG Sekretion

Für die IFN-γ Stimulation ergaben sich weder in der RASF Ko-Kultur noch in der PBMC Kultur signifikante Effekte. Die Menge der IgG Sekretion war in beiden Kulturen in etwa gleich (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.1 Stimulation mit CpG

In PBMC Mono- und Ko-Kultur reduzierte CBG [25µM] allein oder in Kombination mit A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$; $p = 0.013$, $p = 0.03$) und zu A967079 allein ($p < 0.001$, $p = 0.001$) (Abb. 17A/B). Der TRPA1 Antagonist A967079 allein erhöhte nur in PBMC-Monokultur die IgG Sekretion signifikant zur Kontrolle ($p < 0.001$) (Abb. 17B).

Während CBG [2.5µM] allein in beiden Kulturen keinen Effekt auf die IgG Sekretion zeigte, bewirkte die Kombination aus CBG [2.5µM] und A967079 eine Erhöhung der IgG Sekretion in Ko-Kultur im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0.005$) und zu CBG [2.5µM] allein ($p < 0.001$) (Abb.17A).

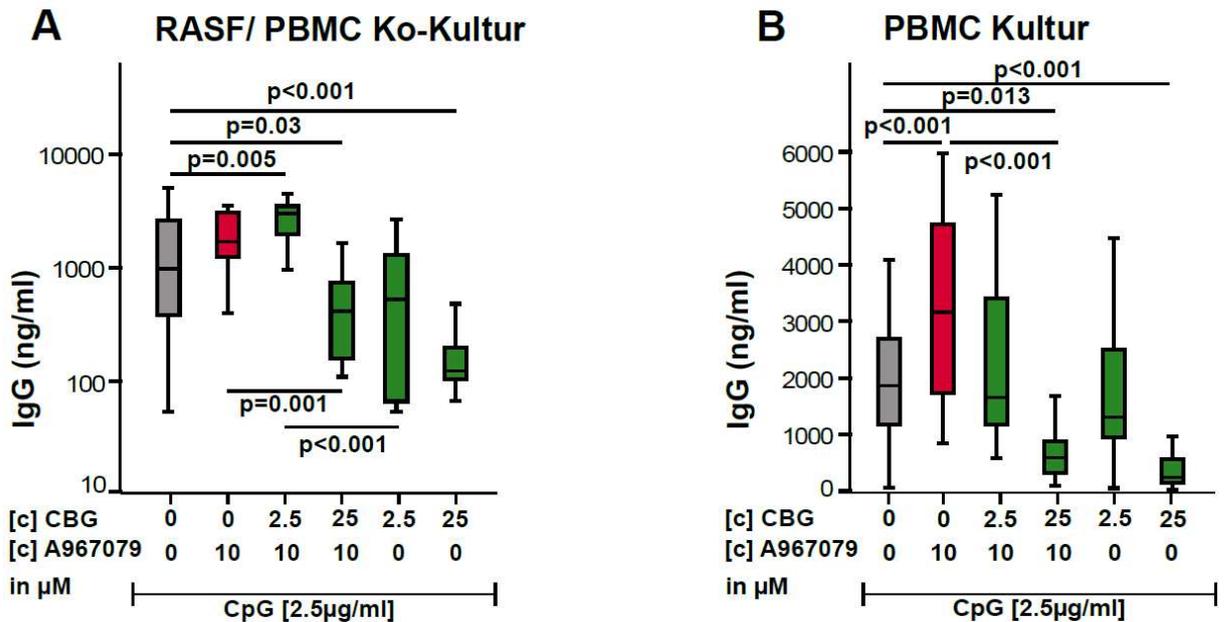


Abb.17: IgG Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-31$; **B** $n=13-31$). Die Werte in Abbildung A sind logarithmisch aufgetragen.

3.5.2.2 Stimulation mit anti-IgM

In Ko-Kultur reduzierte CBG [25µM] in Kombination mit A967079 die IgG Sekretion verglichen zur Kontrolle ($p=0.042$). CBG [25µM] allein zeigte nur eine Tendenz ($p=0.055$) für diesen hemmenden Effekt (Abb. 18A).

In PBMC-Monokultur erhöhte A967079 allein die IgG Sekretion verglichen zur Kontrolle ($p=0.022$), während CBG [25µM] in Kombination mit A967079 diese zur Kontrolle tendenziell ($p=0.061$) und zu A967079 allein signifikant erniedrigte ($p < 0.001$) (Abb.18B).

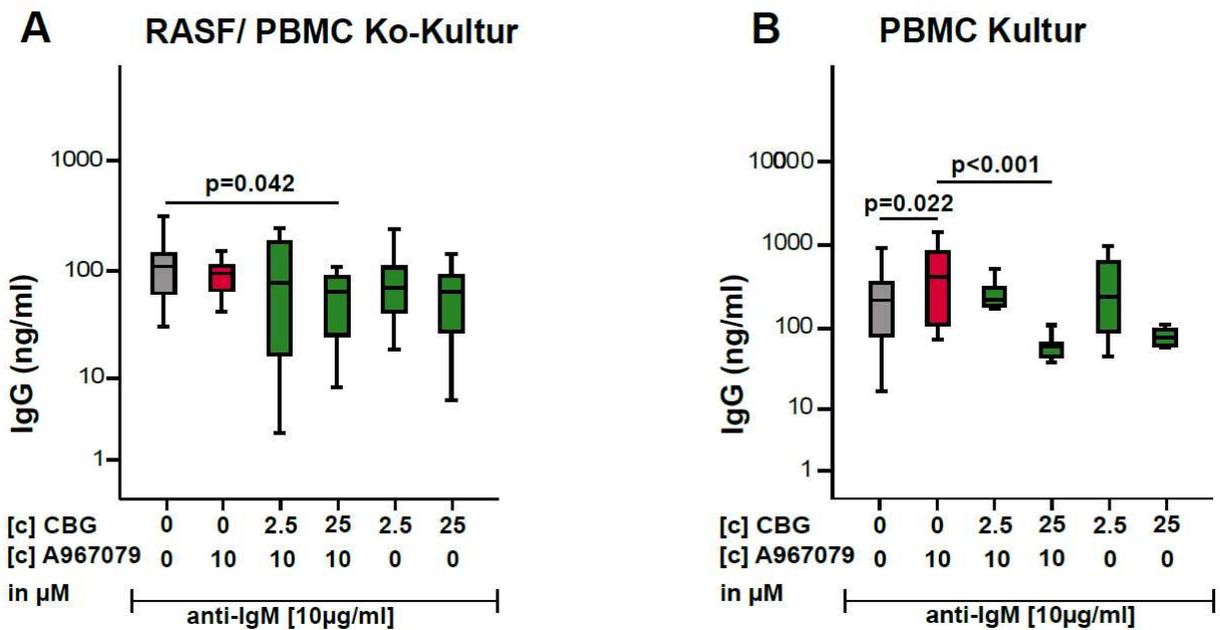


Abb.18: IgG Sekretion nach Stimulation mit anti-IgM und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-30$; **B** $n=12-34$). Die Werte in Abbildung A und B sind logarithmisch aufgetragen.

3.5.2.3 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 erhöhte CBG [2.5µM] zusammen mit A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.005$) und zu CBG [2.5µM] allein ($p < 0.001$) in Ko-Kultur (Abb.19A).

In PBMC-Monokultur reduzierte CBG [25µM] mit und ohne A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.001$; $p < 0.001$) und zu A967079 allein ($p < 0.001$) (Abb. 19B). A967079 allein erhöhte die IgG Sekretion signifikant zur Kontrolle ($p=0.001$) in PBMC-Monokultur nicht jedoch in Ko-Kultur.

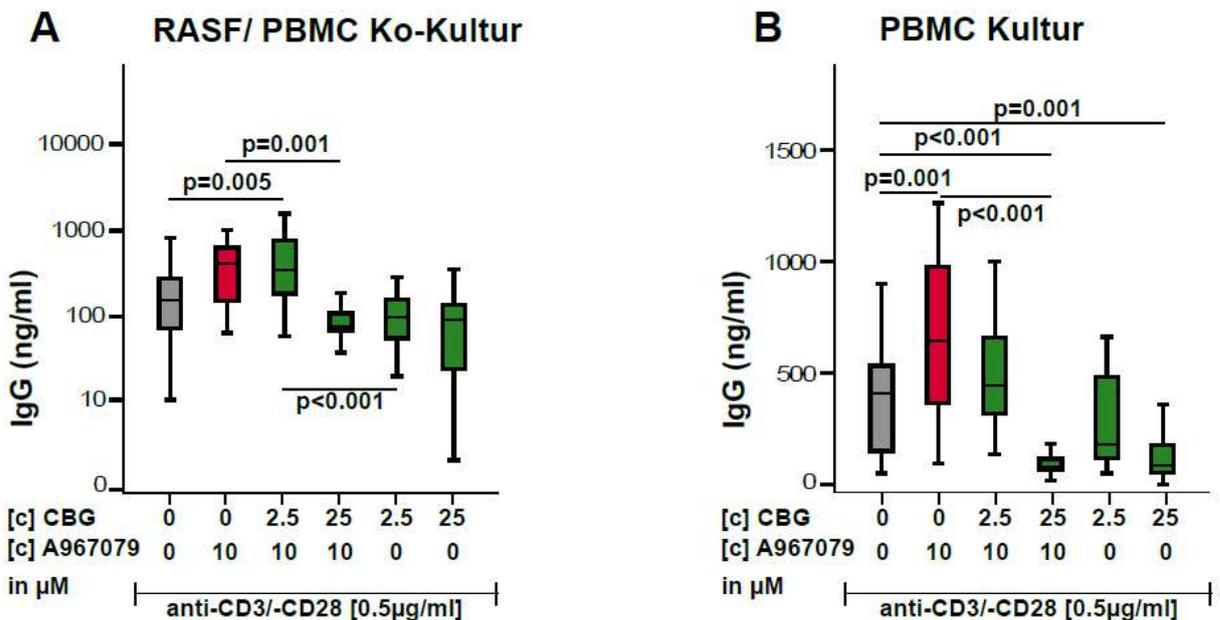


Abb.19: IgG Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und Modulation mit CBG und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (A $n=15-35$; B $n=16-35$). Die Werte in Abbildung A sind logarithmisch aufgetragen.

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM erhöhte A96709 allein und in Kombination mit CBG [$2.5\mu\text{M}$] die IgG Sekretion in Ko-Kultur im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.003$; $p=0.019$), sowie zu CBG [$2.5\mu\text{M}$] ($p=0.003$) und CBG [$25\mu\text{M}$] ($p < 0.001$) allein.

In PBMC-Monokultur inhibierte CBG [$25\mu\text{M}$] mit und ohne Anwesenheit von A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$) und zu A967079 allein ($p < 0.001$) (Daten nicht gezeigt).

3.6 Einfluss von THCA auf die Zytokinproduktion von stimulierten PBMCs und RASfs

3.6.1 Einfluss von THCA auf die $\text{TNF}\alpha$ Sekretion

Auch bei der THCA-Modulation waren entweder keine oder nicht ausreichend Daten vorhanden, um Gruppenvergleiche durchzuführen. Dies betraf die $\text{IFN-}\gamma$ und CpG stimulierten Proben.

Die mit anti-IgM stimulierten Proben ergaben nur für die PBMC-Monokultur ausreichend Daten für eine Varianzanalyse. Hier reduzierte THCA [25µM] die TNFα Sekretion im Vergleich zur nur mit anti-IgM stimulierten Kontrolle (p=0.022) (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in PBMC Mono- oder Ko-Kultur zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

3.6.1.1 Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM reduzierte THCA [25µM] allein und in Kombination mit A967079 die TNFα Sekretion in PBMC-Monokultur im Vergleich zur Kontrolle (p=0.015; p=0.031). Die alleinige Zugabe von A967079 zeigte keinen Effekt auf die TNF-α Sekretion (Abb.20B). Keine Effekte zeigten sich in Ko-Kultur (Abb.20A).

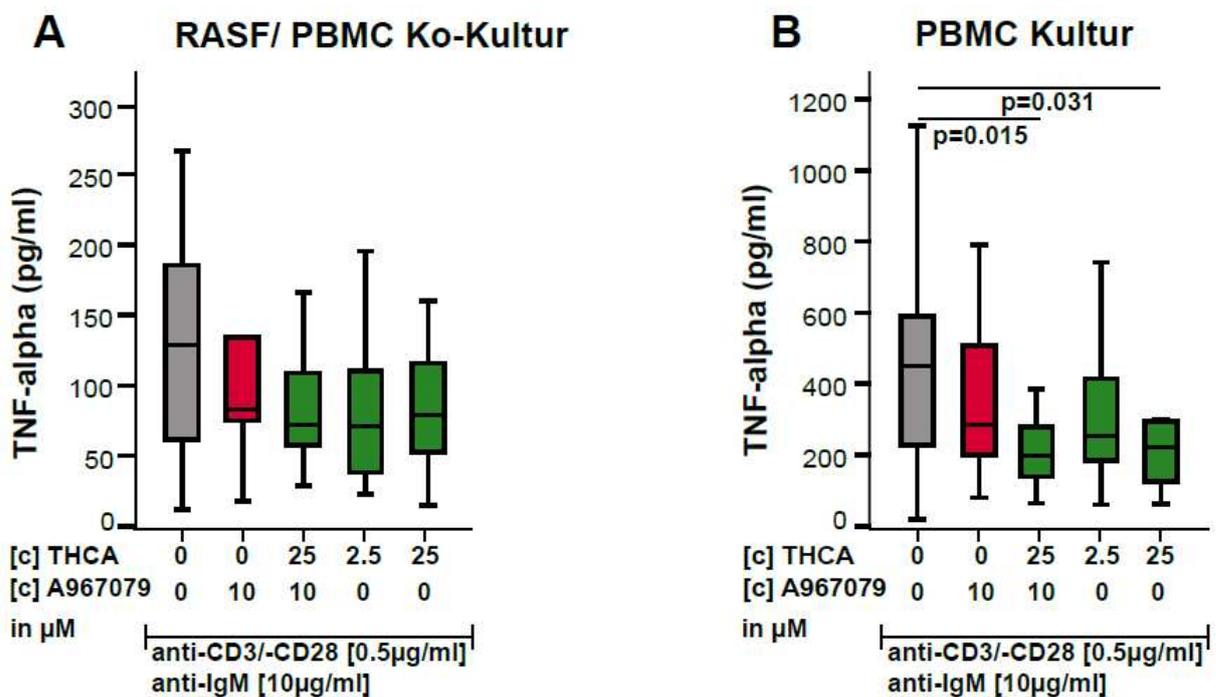


Abb.20: TNF-α Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/anti-IgM und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als p<0.05 definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (A n=10-28; B n=14-32).

3.6.2 Einfluss von THCA auf die IL-6 Sekretion

Insgesamt zeigte die Modulation mit THCA, vor allem in der RASF Ko-Kultur, wenig signifikante Unterschiede zu den jeweiligen stimulierten Kontrollen. Beispielsweise wurde kein signifikanter Effekt in der RASF Ko-Kultur für die Stimulation mit IFN- γ , anti-CD3/-CD28, oder anti-IgM beobachtet (Daten nicht gezeigt).

3.6.2.1 Stimulation mit IFN- γ

In PBMC-Monokultur reduzierte THCA [25 μ M] in Kombination mit A967079 die IL-6 Sekretion signifikant zur alleinigen A967079 Gabe ($p=0.004$), nicht jedoch zur Kontrolle. Keine Effekte zeigten sich in Ko-Kultur (Daten nicht gezeigt).

3.6.2.2 Stimulation mit CpG

In Ko-Kultur reduzierte, nach Stimulation mit CpG, THCA [25 μ M] die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.031$). Diese Reduktion zeigte sich ebenso in PBMC Mono- und Ko-Kultur nach gleichzeitiger Zugabe von A967079, hier jedoch nur verglichen zu A967079 allein ($p=0.001$; $p=0.02$), nicht aber im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21A/B).

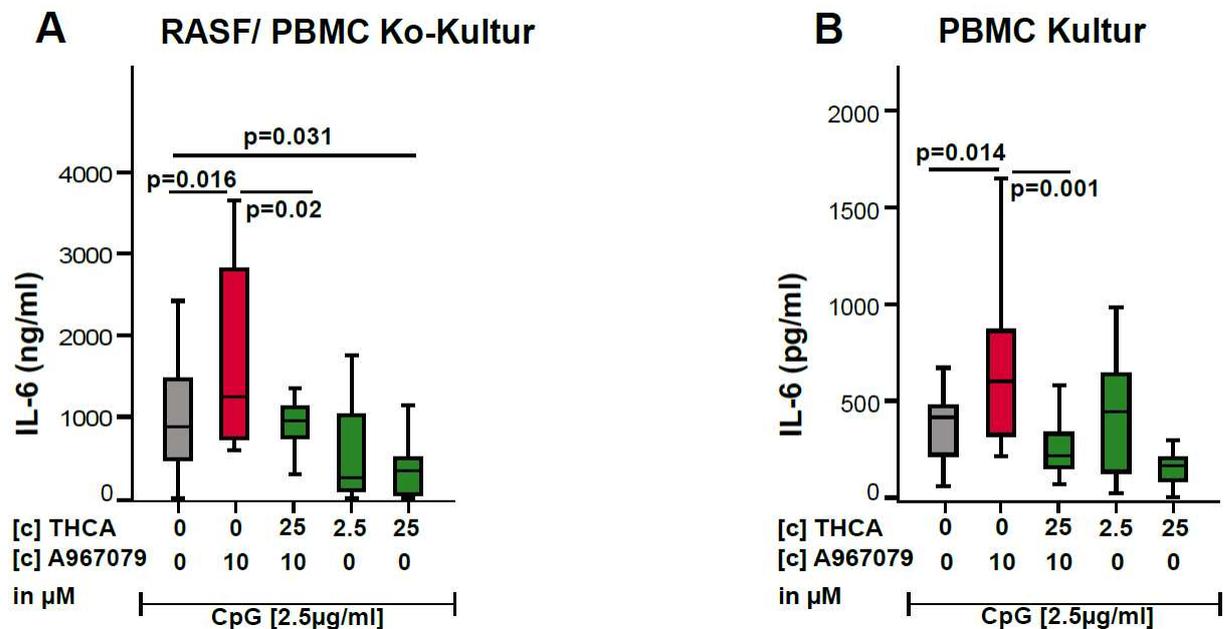


Abb.21: IL-6 Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=15-29$; **B** $n=16-28$).

3.6.2.3 Stimulation mit anti-IgM

Nach Stimulation mit anti-IgM zeigten sich weder in PBMC-Monokultur noch in Ko-Kultur signifikante Effekte (Daten nicht gezeigt).

3.6.2.4 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

Nach T-Zell-Aktivierung mit anti-CD3/-CD28 zeigte sich in PBMC-Monokultur ein gegensätzliches Bild. Während niedrige THCA-Konzentrationen oder A967079 allein keine Effekte zeigten, erhöhte THCA [25 μ M] allein und in Kombination mit A967079 die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.001$; $p=0.002$) (Abb.22B). Keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle, zeigten sich in Ko-Kultur (Abb.22A).

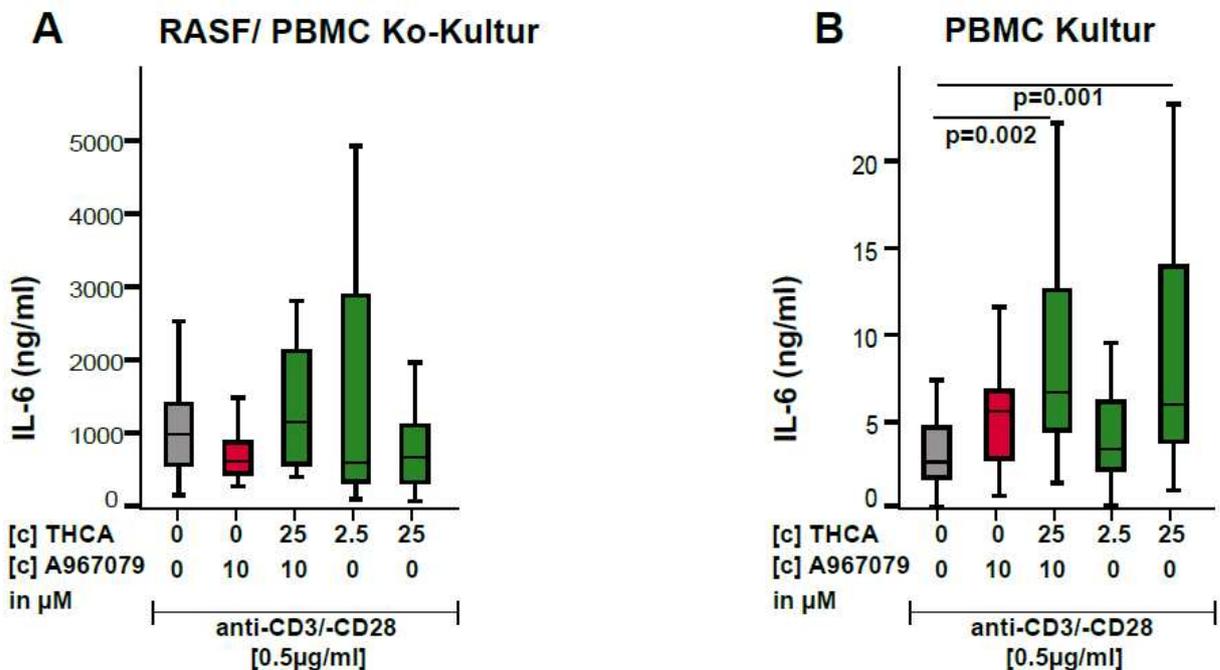


Abb.22: IL-6 Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-29$; **B** $n=15-32$).

Ebenso nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM erhöhte THCA [25 μ M] zusammen mit A967079 tendenziell die IL-6 Sekretion in PBMC-Monokultur verglichen zur Kontrolle ($p=0.083$) (Daten nicht gezeigt).

Letztlich ist festzuhalten, dass analog zur CBG-Modulation auch unter THCA [2.5 μ M] kein signifikanter Einfluss auf die IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen war.

3.6.3 Einfluss von THCA auf die IL-10 Sekretion

Für die Stimulation mit IFN- γ konnte nach Zugabe von THCA und A967079 nur ein einzelner Wert in beiden Kulturen für die IL-10 Konzentration detektiert werden. Die generierten Daten reichten somit nicht aus, um eine Varianzanalyse aller Gruppen durchzuführen.

3.6.3.1 Stimulation mit CpG

Nach Stimulation mit CpG erhöhte THCA [25 μ M] in Ko-Kultur die IL-10 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.011$) (Abb.23A). Die gleichzeitige Zugabe von A967079 inhibierte diesen Effekt und führte zu einer Reduktion der IL-10 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.038$), zu A967079 allein ($p=0.063$) und zu THCA [25 μ M] allein ($p < 0.001$) (Abb.23A). In PBMC-Monokultur zeigten sich keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrolle (Abb.23B).

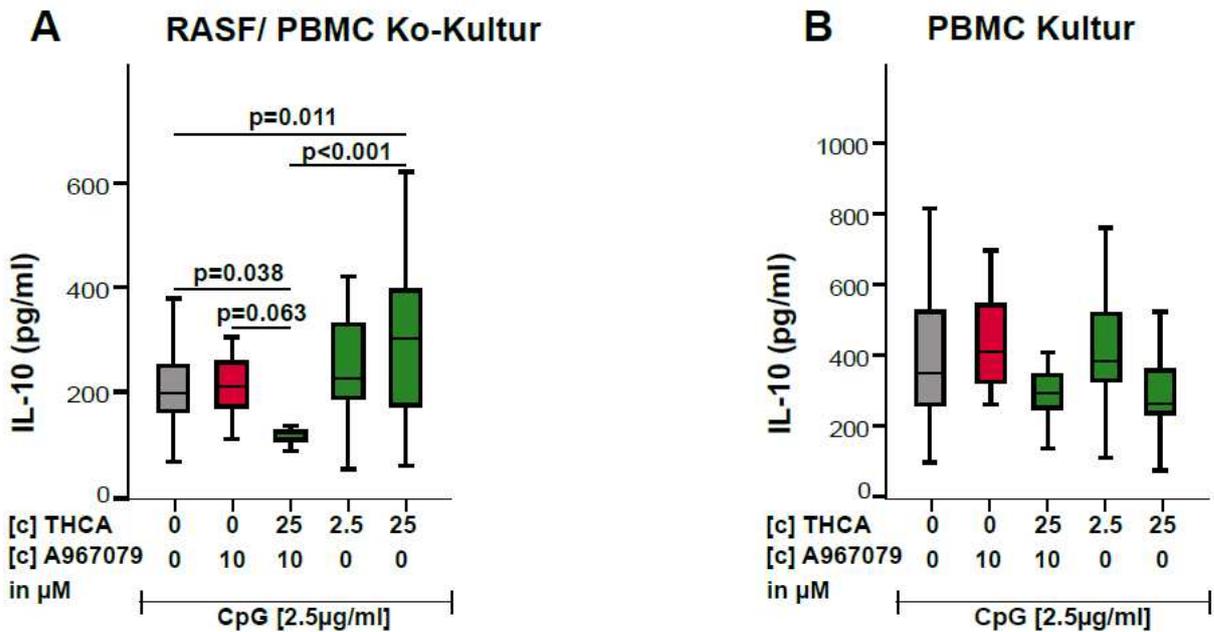


Abb.23: IL-10 Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=14-32$; **B** $n=16-36$).

3.6.3.2 Stimulation mit anti-IgM

In PBMC-Monokultur erhöhte THCA in niedriger [2.5 μM] und in hoher [25 μM] Konzentration die IL-10 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.022$; $p=0.002$). Die Zugabe von A967079 resultierte in keiner signifikanten Veränderung der IL-10 Sekretion. (Abb.24B). Keine signifikanten Effekte zeigten sich nach Stimulation mit anti-IgM in Ko-Kultur (Abb.24A).

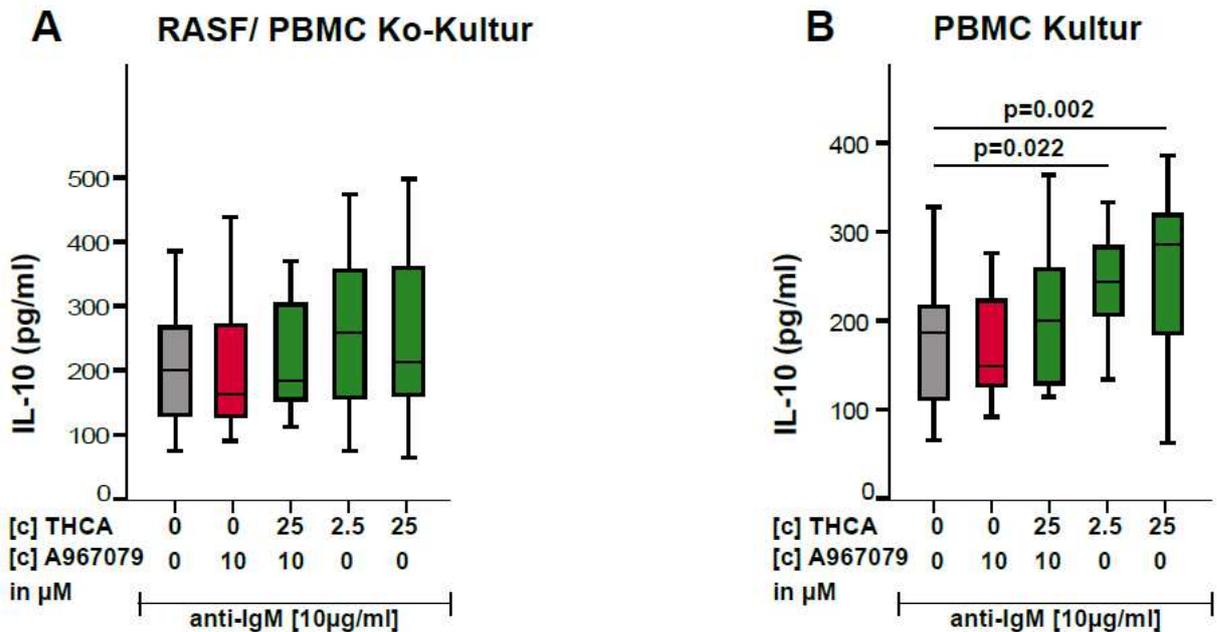


Abb.24: IL-10 Sekretion nach Stimulation mit anti-IgM und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (A $n=16-36$; B $n=16-36$).

Letztlich zeigten sich für die PBMC Mono- und Ko-Kultur nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 oder anti-CD3/-CD28/-IgM keine signifikanten Effekte auf die IL-10 Sekretion (Daten nicht gezeigt).

3.7 Einfluss von THCA auf die Antikörpersekretion von stimulierten PBMCs

3.7.1 Wirkung von THCA auf die IgM Sekretion

Unter der THCA-Modulation konnten ähnliche Effekte wie für die CBG Modulation festgestellt werden.

3.7.1.1 Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$

In PBMC Mono- und Ko-Kultur reduzierte THCA [25 μM] allein ($p=0.009$; $p=0.049$) und in Kombination mit A967079 ($p < 0.001$; $p=0.002$) die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle und in PBMC-Monokultur auch im Vergleich zu A967079 allein ($p=0.001$) (Abb.25A/B). Niedrige THCA-Konzentrationen oder A967079 allein resultierten in keiner Veränderung der IgM Sekretion (Abb. 25A/B).

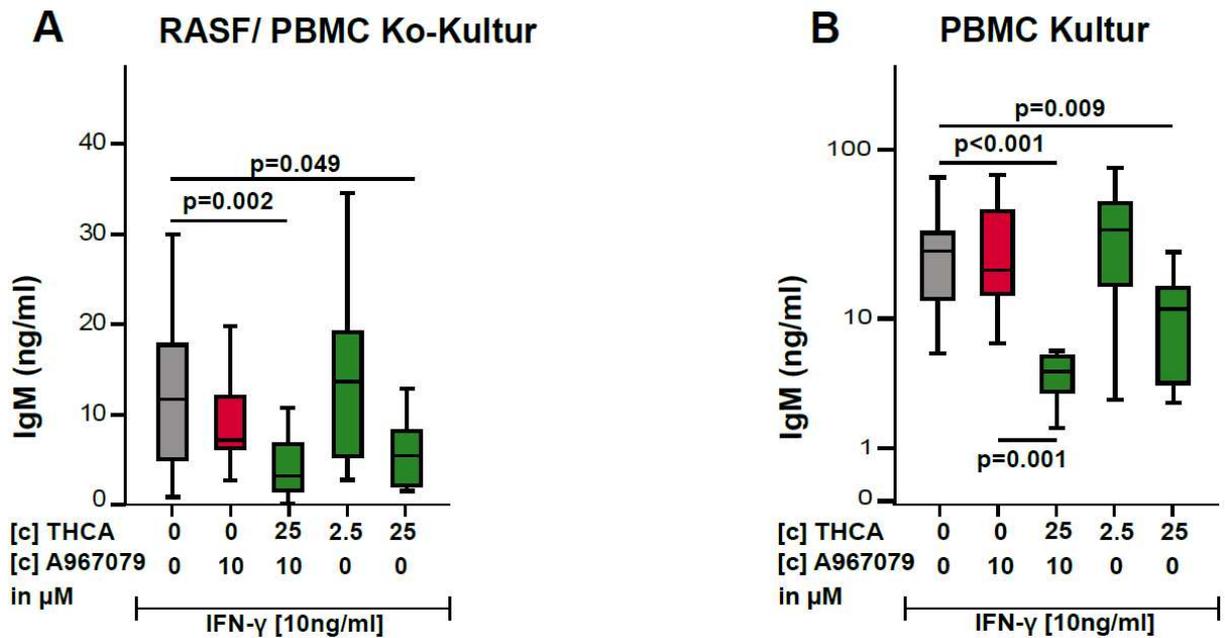


Abb.25: IgM Sekretion nach Stimulation mit Interferon-gamma und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=15-32$; **B** $n=14-34$). Die Werte in Abbildung B sind logarithmisch aufgetragen.

3.7.1.2 Stimulation mit CpG

In Ko Kultur zeigte sich kein Effekt durch THCA allein, jedoch erhöhte THCA [25 μ M] in Kombination mit A967079 die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$) und zu THCA [25 μ M] allein ($p < 0.001$) (Abb.26A).

In PBMC-Monokultur reduzierte THCA allein [2.5 μ M] [25 μ M] die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.003$) (Abb.26B). Diese Reduktion wurde durch zeitgleiche Zugabe von A967079 zu THCA [25 μ M] im Vergleich zu A967079 allein ($p < 0.001$) und THCA [25 μ M] allein ($p=0.019$) inhibiert (Abb.26B).

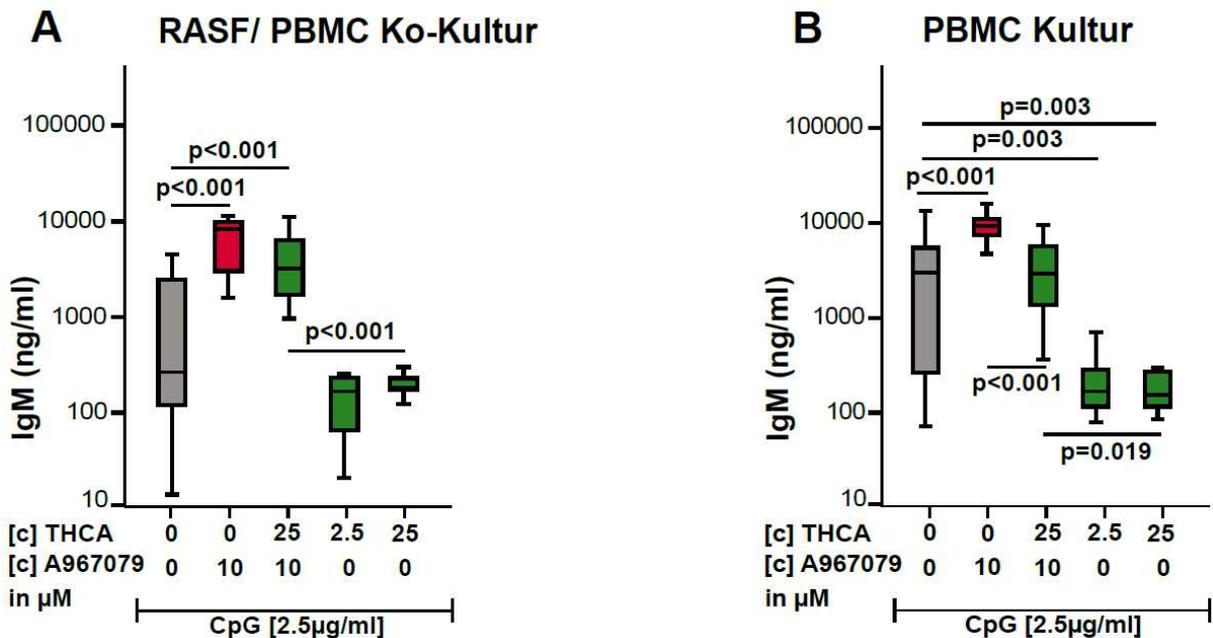


Abb.26: IgM Sekretion nach Stimulation mit CpG und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=11-30$; **B** $n=13-35$). Die Werte in Abbildung A und B sind logarithmisch aufgetragen.

3.7.1.3 Stimulation mit anti-IgM

In Ko-Kultur reduzierte THCA [25 μM] allein die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.018$). Solch eine Reduktion zeigte sich in PBMC-Monokultur nur bei kombinierter Gabe aus THCA [25 μM] und A967079 im Vergleich zu A967079 allein ($p < 0.001$) nicht jedoch zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

3.7.1.4 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

In Ko-Kultur zeigte anti-CD3/-CD28 mit THCA im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die IgM Sekretion (Abb.27A). In der PBMC-Monokultur reduzierte THCA in niedriger [2.5 μM] und hoher [25 μM] Konzentration die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$; $p=0.007$) (Abb.27B). Dieser hemmende Effekt zeigte sich auch nach gleichzeitiger Zugabe von A967079 zu THCA [25 μM] im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.001$) in PBMC-Monokultur und zu A967079 allein ($p < 0.001$) in beiden Kulturen (Abb.27B).

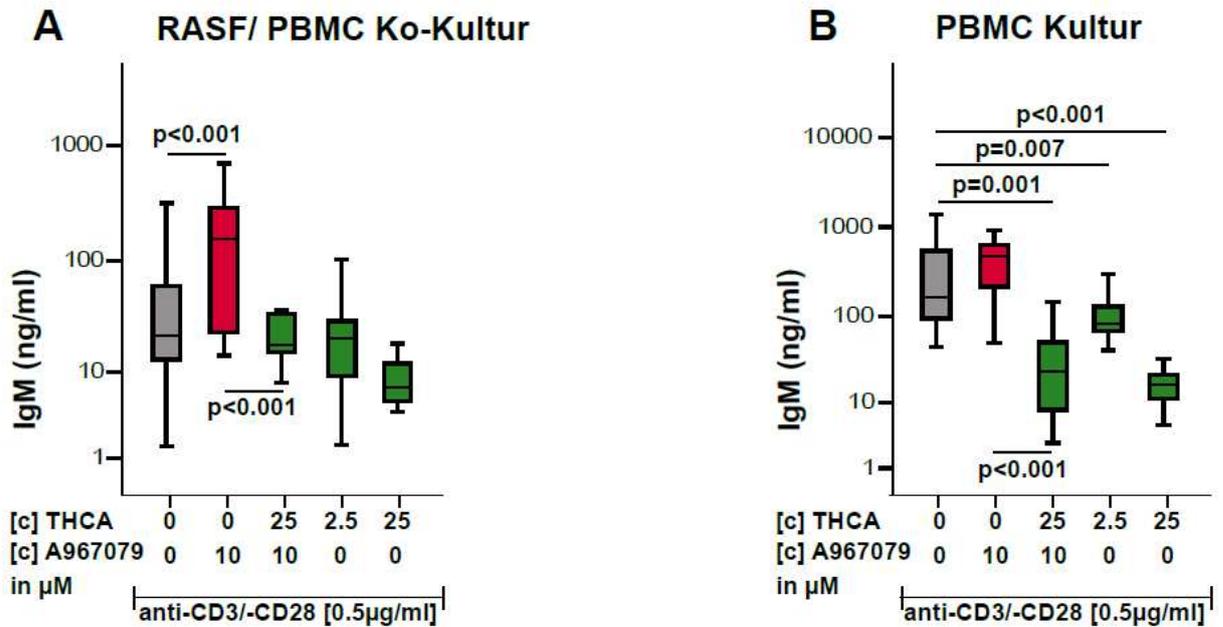


Abb.27: IgM Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASf (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als $p < 0.05$ definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. n ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** $n=13-33$; **B** $n=15-36$). Die Werte in Abbildung A und B sind logarithmisch aufgetragen.

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/-IgM reduzierte THCA [25 μM] kombiniert mit A967079 die IgM Sekretion lediglich signifikant zu A967079 allein ($p < 0.001$) nicht jedoch zur Kontrolle. THCA allein zeigte keinen Einfluss auf die IgM Sekretion in Ko-Kultur. In PBMC-Monokultur reduzierte THCA [25 μM] allein oder kombiniert mit A967079 die IgM Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.001$; $p=0.018$) und zu A967079 allein ($p < 0.001$) (Daten nicht gezeigt).

3.7.2 Wirkung von THCA auf die IgG Sekretion

Weder in Ko-Kultur noch in PBMC-Monokultur ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, nach Stimulation mit IFN- γ und THCA (Daten nicht gezeigt).

Ebenso zeigten sich keine Effekte nach Stimulation mit CpG und THCA in Ko-Kultur. In PBMC-Monokultur senkte THCA [25 μM] die IgG Sekretion im Vergleich zur nur mit CpG stimulierten Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

3.7.2.1 Stimulation mit anti-IgM

In Ko-Kultur reduzierte THCA [25µM] zusammen mit A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (p= 0.06) (Abb.28A) und in PBMC-Monokultur im Vergleich zu A967079 (p<0.001) allein, nicht jedoch zur Kontrolle (Abb.28B). THCA allein zeigte keine signifikante Veränderung der IgG Sekretion zur Kontrolle in beiden Kulturen (Abb.28A/B).

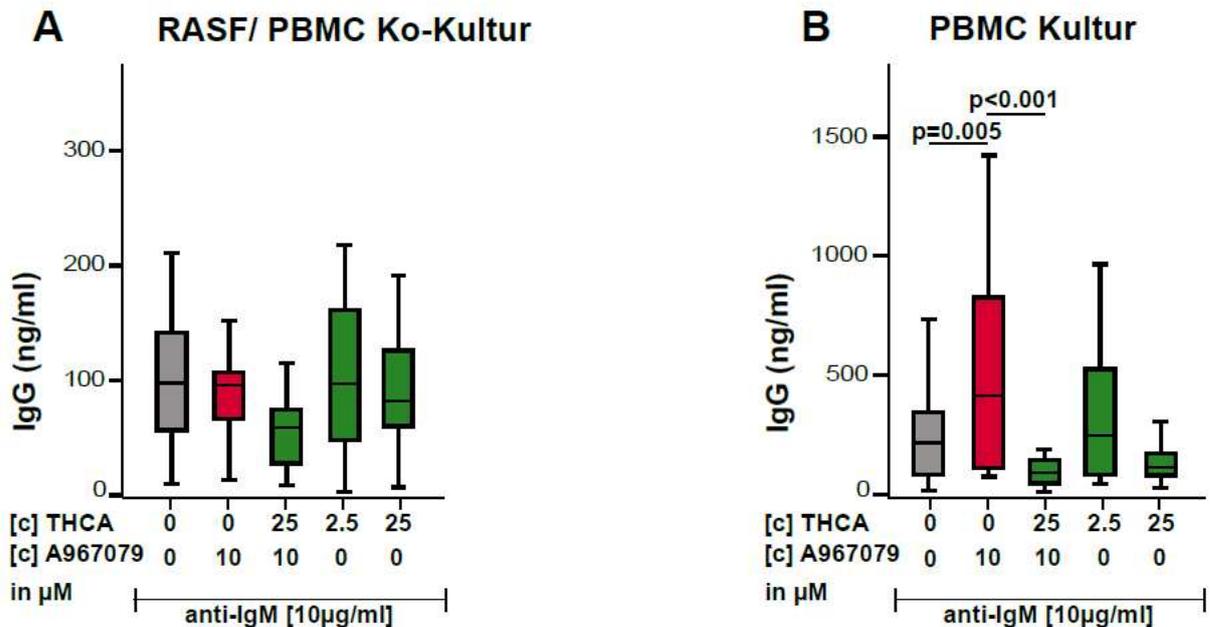


Abb.28: IgG Sekretion nach Stimulation mit anti-IgM und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als p<0.05 definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. *n* ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** n=13-28 **B** n=16-33).

3.7.2.2 Stimulation mit anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM

Nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28 reduzierte THCA [25µM] allein und in Kombination mit A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (p<0.001) und zu A967079 allein (p<0.001) in PBMC Monokultur. In Ko-Kultur reduzierte THCA [25µM] die IgG Sekretion nur im Vergleich zu A967079 allein (p<0.001) (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation der Ko-Kultur mit anti-CD3/-CD28/-IgM reduzierte THCA [25µM] tendenziell die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (p=0.06) und kombiniert mit A967079 zu A967079 allein (p<0.001) (Abb.29A). Ebenso reduzierte THCA [25µM] allein und zusammen mit A967079 die IgG Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (p<0.001) und A967079 allein (p<0.001) in PBMC-Monokultur (Abb. 29B). Zudem reduzierte auch THCA in niedriger Konzentration [2.5µM] die IgG Sekretion verglichen zur Kontrolle (p=0.08) in PBMC-Monokultur (Abb.29B).

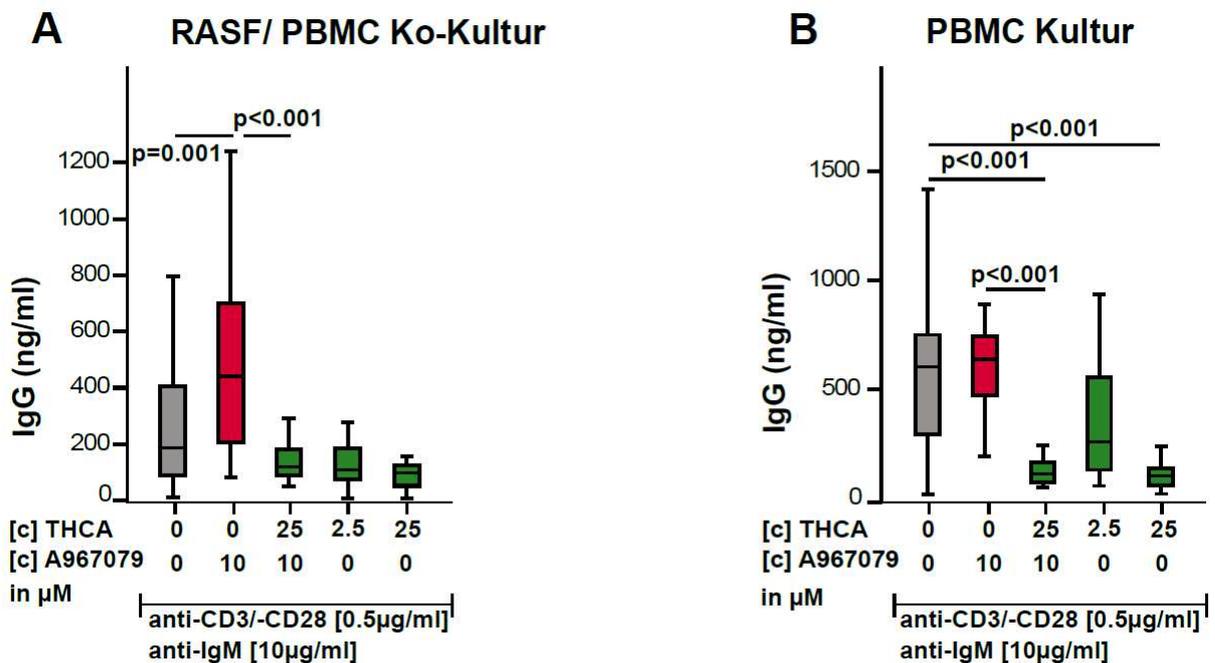


Abb.29: IgG Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3/-CD28/anti-IgM und Modulation mit THCA und A967079 in PBMC-Monokultur (B) und Ko-Kultur mit RASF (A)

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als p<0.05 definiert. Die Analyse aller Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test. *n* ist die Anzahl der Replikate von 8-18 unterschiedlichen Spender-Proben (**A** n=16-35 **B** n=14-35).

Zusammenfassend hatte THCA [25µM] einen hemmenden Einfluss auf die IgG Sekretion vor allem in PBMC Monokultur. In Ko-Kultur zeigten sich Tendenzen für diese inhibitorische Wirkung. Die zeitgleiche Zugabe von A967079 inhibierte diesen Effekt nicht.

3.8 Ergebnisse der Zelltodfärbung mittels Durchflusszytometrie

Die zur Darstellung von Zelltod an drei Proben durchgeführte FACS (*fluorescent-activated cell sorter*) Analyse mittels Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) Färbung ergab keine verwertbaren Ergebnisse.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine fehlerhafte Kompensation bei hoher Autofluoreszenz einiger Zellen in den Bereichen der verwendeten Fluorochrome (VioBlue® und FITC) gewesen sein. Aus zeitlichen Gründen konnte allerdings keine erneute Kompensation mit allen Parametern erfolgen. Die Frage nach einem möglichen zytotoxischen Effekt durch die hier eingesetzten Phytocannabinoide ließ sich folglich nicht abschließend klären. Ein solcher Effekt kann jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, da nicht bei allen Stimulationen eine Hemmung der Zytokinproduktion zu beobachten ist. Wären CBG und THCA in einer Konzentration von [25µM] zytotoxisch, sollte sich dies in allen Ergebnissen widerspiegeln.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nicht-psychotropen Cannabinoide CBG und THCA *in vitro* anti-inflammatorische Wirkungen auf RASFs und PBMCs haben können. TRPA1-Kanal vermittelte Effekte konnten für einzelne Stimulationen, hier jedoch nur inkonsistent nachgewiesen werden.

Beide Phytocannabinoide reduzierten die Sekretion der hier untersuchten Immunglobuline. Insbesondere THCA zeigte anti-inflammatorische Effekte auf die Zytokinproduktion, während Cannabigerol stimulationsabhängig pro- oder anti-inflammatorische Einflüsse zeigte.

Für niedrige Konzentrationen an CBG oder THCA konnten in dieser Arbeit größtenteils keine zur Kontrolle signifikanten Effekte nachgewiesen werden.

Monokultur versus Ko-Kultur

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden in den Überständen der RASF/PBMC Ko-Kultur höhere basale IL-6 Konzentrationen nachgewiesen als in der PBMC Monokultur. Dies war zu erwarten, da RASFs die Hauptproduzenten für IL-6 in der Synovia darstellen und zudem IL-6 auch spontan sezernieren (Bartok & Firestein, 2010). Darüber hinaus bewirken auch die von PBMCs (hier vor allem von Monozyten) sezernierten Zytokine IL-1 und TNF- α über einen NF- κ B abhängigen Signalweg eine Zunahme der IL-6 Produktion in den Synovialfibroblasten, sodass allein durch die Interaktion von aktivierten Immunzellen und RASFs eine vermehrte IL-6 Produktion resultieren kann (Harigai et al., 1991). Eine mögliche Erklärung für die hier nachgewiesenen stark erhöhten IL-6 Werte, sind die in der Einleitung erwähnten epigenetischen Veränderungen (Karouzakis et al., 2009). Beispielsweise kann eine Hyperacetylierung von Histon H3 im IL-6 Promoter für eine vermehrte IL-6 Produktion durch RASFs verantwortlich sein (Wada et al., 2014).

Überraschenderweise zeigte die Anwesenheit von RASFs einen stimulationsabhängigen, hemmenden Effekt auf die TNF- α , IgM und IgG-Sekretion von PBMCs. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Störch et al., die einen negativen Feedbackmechanismus von SFBs auf B-Zellen feststellen konnten. So zeigen aktivierte humane B-Zellen in Ko-Kultur mit SFBs eine Herunterregulierung der Zytokin- (TNF α und IL-1 β) und IgM Produktion, sowie der Proliferation im Vergleich zur B-Zell-Monokultur. Während die Hemmung der Proliferation u.a. TGF-beta

vermittelt ist, bleiben andere inhibitorische Signalstoffe, welche von SFBs sekretiert werden unbekannt (Störch et al., 2016).

Auch wenn die reduzierte Sekretion von Zytokinen und Antikörpern durch eine Induktion apoptotischer Prozesse denkbar wäre, scheint dies wenig wahrscheinlich, da gerade RASFs größtenteils resistent gegen den programmierten Zelltod sind und zudem auch das Überleben der sie umgebenden Immunzellen verlängern können (Korb et al., 2009).

Einfluss des TRPA1-Inhibitors A967079

In der hier vorliegenden Arbeit bewirkte die Antagonisierung des TRPA1 Kanals, unter alleiniger Gabe von A967079, sowie die Kombination aus A967079 und CBG in niedriger Konzentration (die Kombination aus A967079 und THCA in niedriger Konzentration wurde nicht untersucht), eine gesteigerte Sekretion von IL-6 und besonders von IgM bzw. IgG.

Dieser proinflammatorische Effekt der TRPA1-Blockade steht in Analogie zu Ergebnissen von Bertin et. al., die einen erhöhten T-Zellrezeptor (TCR)-vermittelten Ca²⁺ Einstrom in CD4⁺ T-Zellen und eine vermehrte Differenzierung in Th-1 Zellen mit konsekutiver proinflammatorischer Zytokinproduktion bei TRPA1 Knockdown in Mäusen zeigten. Bertin et al. zeigten zudem, dass eine Hyperaktivierung des koexprimierten TRPV1 Kanals ursächlich für den proinflammatorischen Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen ist und schlossen hieraus, dass der TRPA1 Kanal die Aktivität des TRPV1 Kanals hemmt und somit anti-inflammatorisch wirkt (Bertin et al., 2017).

Andererseits finden sich in der Literatur meist Hinweise auf eine entzündungsfördernde Rolle von TRPA1. So zeigten Untersuchungen an humanen, naiven T-Zellen, dass die Inhibition des oberflächlich exprimierten TRPA1 Kanals durch A967079 den intrazellulären Ca²⁺ Spiegel und den TCR-vermittelten Kalziumeinstrom in die Zelle reduziert. Als Folge zeigten sich eine verminderte Sekretion TH-1 typischer, proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ , TNF, IL-2) (Sahoo et al., 2019).

Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen von Sahoo et al. könnte sein, dass wir in unseren Versuchen eine zehnfach geringere A967079 Konzentration (10 μ M statt 100 μ M) verwendet haben. Folglich könnte es sein, dass die in dieser Arbeit verwendete Konzentration teilweise nicht für eine vollständige

Inhibition der TRPA1 Kanäle ausreichend war. Eine andere Ursache könnte eine nachlassende Wirkung (z.B. durch Degradation) von A967079 am TRPA1 Kanal im Laufe der siebentägigen Inkubationszeit sein. In der von Sahoo et al. durchgeführten Studie wurden die untersuchten T-Zellen stattdessen nur 36 Stunden inkubiert.

Zusammenfassend beruht der in der hier vorliegenden Arbeit beobachtete proinflammatorische Effekt nach der Gabe von A967079 vermutlich auf einer kompensatorischen Aktivierung des TRPV1 Kanals oder anderer Ca²⁺ sensitiver Kanäle. Letztlich ist zu erwähnen, dass die hier gezeigten proinflammatorischen Effekte von A967079 nicht nur nach T-Zell Stimulation, sondern auch nach Stimulation von B-Zellen nachgewiesen wurden. Der TRAPA1 Kanal wird zwar auf T-Zellen und B-Zellen exprimiert, doch zur Funktion des Kanals auf B-Zellen liegen in der Literatur noch keine Untersuchungen vor (Naert et al., 2021).

Einfluss von CBG und THCA auf die Zytokin- und Antikörpersekretion

TNF:

Die basale TNF- α Produktion von PBMCs allein oder in Ko-Kultur war nah oder unterhalb des Detektionslimits. Eine Erhöhung dieses Zytokins war nur nach B-Zell- oder T Zell- spezifischer Stimulation mit anti-IgM und oder anti-CD3/-CD28 detektierbar.

Bei alleiniger T Zell Stimulation (ohne anti-IgM) erhöhte CBG die TNF-Produktion in Ko-Kultur, jedoch nicht in Monokultur. Der TRPA1 Antagonist A967079 reduzierte den CBG-induzierten Anstieg von TNF in Ko-Kultur und Monokultur. Synoviale Fibroblasten sind selbst nicht in der Lage, TNF zu produzieren. Der Anstieg von TNF nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 bestätigt daher die Rolle aktivierter T Zellen bei der TNF-Produktion. Dies konnte in Studien von Andersson & Matsuda, sowie in einer Übersichtsarbeit von Mehta et al. bestätigt werden (Andersson & Matsuda, 1989; Mehta et al., 2018) . Die TNF Produktion ist eng an die Aktivierung gekoppelt und dieser Vorgang wird in T Zellen auch von TRPA1 beeinflusst (Sahoo et al., 2019; Szabó et al., 2022) .

Sahoo et al konnten zeigen, dass eine TRPA1 Inhibition die anti-CD3/-CD28 induzierte Produktion von TNF in T Zellen reduziert (s.o.). Vorliegende Ergebnisse unterstützen diesen Befund und zeigen im Umkehrschluss, dass eine Aktivierung von TRPA1 mit CBG die TNF- α Synthese steigert.

Wurde jedoch anti-CD3/-CD28 mit anti-IgM kombiniert, konnte der THCA oder CBG vermittelte Effekt auf die TNF-Produktion nicht durch eine Inhibition des TRPA1-Kanals aufgehoben werden. Dies könnte auf Aktivierung der B Zellen zurückzuführen sein.

In der hier vorliegenden Arbeit bewirkte THCA, anders als CBG, eine Reduktion der TNF- α Sekretion in PBMC Monokultur, wenn B-Zellen mit anti-IgM stimuliert wurden.

Analog hierzu zeigte eine erste immunmodulatorische Untersuchungen zu THCA einen dosisabhängigen, hemmenden Effekt durch THCA auf die TNF- α Produktion. Die Studie untersuchte die TNF- α Produktion von peripheren Blutmakrophagen nach Stimulation mit LPS (Verhoeckx et al., 2006).

Im Gegensatz zu den weiter oben aufgeführten, hier vorliegenden Ergebnissen, zeigte eine Studie von Kogan et al. einen CBG vermittelten hemmenden Effekt auf die TNF- α Konzentration in murinen Blutseren (Kogan et al., 2021). Ebenso zeigten Lipopolysaccharid (LPS) -stimulierte murine Makrophagen *in vitro* eine signifikant reduzierte TNF- α Expression nach Vorbehandlung mit CBG ([2,5 μ M] und [5 μ M]) (Mammana et al., 2019).

Allerdings ist zu beachten, dass es sich bei der hier vorliegenden Arbeit um humane periphere mononukleäre Zellen handelt und somit keine Makrophagen untersucht wurden. Zudem wurden verschiedene Stimulanzen (IFN- γ , CpG, anti-IgM, anti-CD3/-CD28) verwendet, welche jeweils bestimmte Immunzell-Subpopulationen aktivieren.

IL-6:

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich je nach Stimulation gegensätzliche Effekte auf die IL-6 Sekretion nach Modulation mit CBG oder THCA.

Eine gesteigerte IL-6 Sekretion zeigte sich nach Stimulation naiver B-Zellen (CBG-Modulation) oder nach T-Zell Stimulation (THCA-Modulation) in PBMC Monokultur. Die zeitgleiche Zugabe von A967079 vermochte es jedoch in beiden Fällen nicht diesen Effekt zu inhibieren.

Gleichwohl Nummenmaa et al. eine TRPA1 vermittelte Hochregulation der IL-6 Expression u.a. in Chondrozyten von Patienten mit Osteoarthritis zeigten, ließ sich diese im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen durch eine Antagonisierung des TRPA1 Rezeptors mittels selektiver Antagonisten (TCS 5861528 und HC-030031) wieder herunterregulieren (Nummenmaa et al., 2020).

Im Gegensatz hierzu zeigte sich in dieser Studie eine Reduktion der IL-6 Sekretion nach Stimulation der B-Zellen (mit CpG) und Modulation mit THCA in RASF Ko-Kultur. Ebenso reduzierte CBG nach Stimulation von T- und B-Zellen (mit IFN- γ oder anti-CD3/-CD28/-IgM) die IL-6 Sekretion in PBMC Mono-bzw. Ko-Kultur.

In Übereinstimmung mit der hier beobachteten THCA-induzierten IL-6 Reduktion in der RASF/PBMC Ko-Kultur, reduzierte THCA in einer Studie von Palomares et al. u.a. die messenger RNA (mRNA) -Spiegel und die Konzentration von IL-6 im Kniegelenk von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis (Palomares et al., 2020).

Ursächlich für die oftmals fehlenden Effekte der pharmakologischen Antagonisierung des TRPA1 Rezeptors könnte das Bindungsverhalten von A967079 sein.

Versuche mit Piperidincarboxamiden, potenten nicht-kovalenten Agonisten am humanen TRPA1 Rezeptor, zeigten, dass sich die Bindungsstelle dieser Agonisten mit derjenigen von A967079 überschneidet (Chernov-Rogan et al., 2019).

Somit könnte A967079 leichter durch andere Liganden verdrängt werden.

Es ist jedoch ebenso möglich, dass THCA und CBG die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte nicht über den TRPA1 Kanal vermitteln und somit keine antagonistische Wirkung durch A967079 beobachtet werden konnte.

IL-10:

In PBMC Mono- und Ko-Kultur zeigte CBG nach Stimulation mit CpG oder anti-CD3/-CD28/-IgM eine Reduktion der IL-10 Sekretion. Diese Hemmung zeigte sich unabhängig von der zusätzlichen A967079 Gabe.

Analog hierzu zeigte sich in einem Mausmodell mit Zimtaldehyd (ein natürlicher TRPA1 Agonist) in LPS-injizierten Mäusen eine Reduktion der Plasma- und Peritonealen IL-10 Konzentration. Dieser Effekt konnte jedoch, anders als in den hier vorliegenden Ergebnissen, durch TRPA1-Antagonismus (mittels HC-030031) umgekehrt werden (Mendes et al., 2016).

Wurden in der hier vorliegenden Arbeit hingegen naive B-Zellen (mit anti-IgM) stimuliert, erhöhten CBG oder THCA die IL-10 Sekretion vor allem in PBMC Monokultur. Die Erhöhung der IL-10 Sekretion konnte nur nach B-Zell-Stimulation (mit

CpG oder anti-IgM) durch A967079 inhibiert werden. Bezogen auf B-Zellen ließ sich somit ein TRPA1 vermittelter Effekt nachweisen.

Bei diesem Effekt könnte es sich jedoch um eine reaktive IL-10 Sekretion vitaler B-Zellen aufgrund apoptotischer oder nekrotischer Prozesse handeln.

So konnte in vitro gezeigt werden, dass eine Aktivierung des TRPA1 Rezeptors (durch die Agonisten Polygodial und Allylisothiocyanate) die Nekrose von zuvor mit TNF-alpha stimulierten RASFs induzieren kann. Ein inflammatorisches Milieu scheint somit den Zelltod von proinflammatorischen RASFs durch TRPA1 Agonisten zu begünstigen (Lowin et al., 2018).

IgM/IgG:

In der hier vorliegenden Arbeit induzierten CBG oder THCA unabhängig von der Stimulation eine Hemmung der IgM und IgG Sekretion.

Nur in einem Fall konnte eine TRPA1 vermittelte Inhibition der Immunglobulinsynthese nachgewiesen werden. Nach B-Zell-Stimulation mit CpG und Modulation mit THCA konnte durch die Gabe von A967079 eine Reduktion der IgM Konzentration in PBMC-Monokultur blockiert werden.

Eine TRPA1 vermittelte Hemmung der Immunglobulinsynthese (IgM und IgG) wurde ebenso in einer Arbeit zu Piperin, einem TRPV1 und TRPA1 Aktivator, vermutet. Hier zeigte Piperin immunsuppressive Effekte auf B-Zellen von TRPV1-defizienten Mäusen. Die verwendeten Piperin Konzentrationen waren nicht zytotoxisch (Soutar et al., 2017).

In allen anderen Fällen zeigte die zeitgleiche Zugabe von A967079 zu hohen Konzentrationen von CBG oder THCA in der hier vorliegenden Arbeit keine Wirkungsaufhebung.

Der hemmende Effekt niedriger CBG-Konzentration auf die IgM Sekretion ließ sich dagegen durch A967079 aufheben. Allerdings beruht dieser Anstieg der Sekretion vermutlich rein auf dem A967079 vermittelten Effekt, da bereits die alleinige TRPA1-Inhibition eine gesteigerte IgM Sekretion zeigte und die alleinige CBG-Gabe (in niedriger Konzentration) keinen, oder wenn dann einen hemmenden Effekt auf die Immunglobulin-Sekretion gezeigt hatte (siehe oben).

Diese Beobachtung führt zu der Hypothese, dass nicht der TRPA1-Kanal, sondern andere Rezeptoren für den hier erwähnten hemmenden Effekt auf die Immunglobulin-Sekretion verantwortlich sind.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist bereits bekannt, dass THCA nur eine geringe Affinität zum CB1 und CB2 Rezeptor besitzt. Dennoch scheint THCA auch als positiver allosterischer Modulator am CB1-Rezeptor zu agieren und hier vor allem die Wirkung von vollen CB1-Agonisten(z.B. 2-AG) zu verstärken (Palomares et al., 2020). Zudem ist THCA ein potenter Agonist am Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors-gamma (PPAR γ), mit einer höheren Affinität als andere Phytocannabinoide (Nadal et al., 2017). PPAR γ ist ein nukleärer Rezeptor, der den Glucose- und Lipidstoffwechsel, sowie Entzündungsprozesse reguliert. Seine Aktivierung in Immunzellen bewirkt vor allem eine Unterdrückung der Expression proinflammatorischer Gene. Als Heterodimer bindet PPAR γ zusammen mit dem *retinoid X receptor* (RXR) an die Promoterregion bestimmter Zielgene und reguliert so die Transkription dieser Gene (Fahmi et al., 2011).

Bei PPAR γ haplo-insuffizienten Mäusen zeigte sich, nach Stimulation mit LPS oder anti-IgM, eine verstärkte B-Zell-Proliferation, sowie eine gesteigerte IgG und IgM Antikörper-Sekretion im Vergleich zu Wildtypmäusen. Umgekehrt konnte die Gabe endogener und synthetischer PPAR γ Liganden die induzierte B-Zell-Proliferation hemmen (Setoguchi et al., 2001).

Analog hierzu könnten die in dieser Arbeit beobachteten hemmenden Effekte von THCA auf die IgM und IgG Sekretion von humanen B-Zellen, aufgrund der Aktivierung des PPAR γ -Signalweges zu erklären sein. Allerdings ist zu bedenken, dass PPAR γ -Agonisten dosisabhängig zytotoxisch wirken können. So zeigten Padilla et. al , dass PPAR γ Agonisten die Apoptose in humanen, normalen B-Zellen und in Lymphomzellen induzieren können (Padilla et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Reduktion in der gemessenen Antikörper-Sekretion könnte also auf proapoptische Effekte zurückzuführen sein.

Möglich wäre auch, dass hier die Antikörper-produzierenden Plasmazellen bzw. Plasmablasten, den TRPA1 Kanal kaum auf ihrer Oberfläche exprimieren. Auch wenn Kun et al. TRPA1 auf infiltrierenden Plasmazellen im entzündeten humanen Colon

mittels immunhistochemischer Analyse nachweisen konnten, bleibt die generelle Funktion des TRPA1 Kanals auf B-Zellen unklar (Kun et al., 2014).

4.1 Limitationen

Die Generalisierbarkeit der vorliegenden Arbeit ist aus drei Gründen eingeschränkt. Erstens lag die Nachweisgrenze des ELISA-Kits von BD zum Teil oberhalb der TNF- α Konzentration im Überstand, da in der vorliegenden Arbeit TNF- α nur nach Stimulation mit anti-IgM, anti-CD3/-CD28 und anti-CD3/-CD28/-IgM detektiert werden konnte.

Zweitens könnte die geringe Altersvariabilität, der für diese Studie eingeschlossenen Probanden, die Aussagekraft unserer Ergebnisse einschränken. Wie schon im Methoden-Kapitel erwähnt, wurden für die PBMC Isolation EDTA- Blutproben von gesunden Probanden entnommen, die zwischen 23 und 35 Jahre alt waren.

Folgende Einschränkungen sollten bedacht werden, bevor von den hier vorliegenden Ergebnissen Rückschlüsse auf andere Alterspopulationen geschlossen werden: Wie in der Einleitung bereits beschrieben, liegt der Erkrankungsgipfel bei der rheumatoiden Arthritis im Alter von 55-75 Jahren. Im Rahmen der Immunseneszenz, der Alterung des Immunsystems, kommt es vor allem zu molekularen und zelltypischen Veränderungen der adaptiven Immunantwort (Djukic et al., 2014). So ist die Anzahl der naiven T-Zellen, vor allem CD8⁺ naiver T-Zellen, bei älteren Individuen reduziert. Weiterhin ist die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 auf CD8⁺T-Zellen reduziert und folglich auch die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen (Fagnoni et al., 2000). Zudem ist die Expression des CD40 Liganden auf T-Zellen von älteren Menschen vermindert. Dies führt zu einer eingeschränkten T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung und damit zur verminderten Proliferation und Antikörperproduktion dieser Zellen (Fernández-Gutiérrez et al., 1999).

Drittens sollte in künftigen Studien ein direkter Nachweis der TRPA1 Expression, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse könnte nachgewiesen werden, in welchem Umfang und vor allem welcher Subtyp der PBMCs den TRPA1 Kanal exprimiert.

Ausblick

Die Aktivierung des TRPA1 Kanals durch die hier eingesetzten Cannabinoide konnte nicht in allen Fällen durch den Antagonisten A967079 aufgehoben werden.

Der non-kovalente Bindungscharakter von A967079 könnte hierfür ursächlich sein oder aber auch mögliche *off-target* Effekte durch die hier eingesetzten Phytocannabinoide und Stimulanzen.

Somit könnten eine Verdrängung vom TRPA1 Rezeptor durch andere Liganden oder ein Wirkverlust von A967079 bei zunehmender Inkubationszeit mögliche Ursachen für die partiell fehlende Inhibition des TRPA1-Rezeptors sein. Die genaue Rolle und Funktion des TRPA1 Rezeptors im Rahmen der induzierten Immunantwort bei PBMCs und RASFs, sollte also in weiteren Studien untersucht werden.

Letztlich sollte auch der inhibitorische Effekt von RASFs auf PBMCs weiter untersucht werden, da er für das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der rheumatoiden Arthritis relevant sein könnte.

5. Quellenverzeichnis

- Abhishek, A., Nakafero, G., Kuo, C.-F., Mallen, C., Zhang, W., Grainge, M. J. & Doherty, M. (2018) „Rheumatoid arthritis and excess mortality: down but not out. A primary care cohort study using data from Clinical Practice Research Datalink“, *Rheumatology (Oxford, England)*, Vol. 57, No. 6, S. 977–981.
- Adhikary, S., Kocieda, V. P., Yen, J.-H., Tuma, R. F. & Ganea, D. (2012) „Signaling through cannabinoid receptor 2 suppresses murine dendritic cell migration by inhibiting matrix metalloproteinase 9 expression“, *Blood*, Vol. 120, No. 18, S. 3741–3749.
- Aletaha, D. & Smolen, J. S. (2002) „The rheumatoid arthritis patient in the clinic: comparing more than 1,300 consecutive DMARD courses“, *Rheumatology (Oxford, England)*, Vol. 41, No. 12, S. 1367–1374.
- Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S. & Bevan, S. (2008) „Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress“, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 28, No. 10, S. 2485–2494.
- Andersson, U. & Matsuda, T. (1989) „Human interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha production studied at a single-cell level“, *European journal of immunology*, Vol. 19, No. 6, S. 1157–1160.
- Araki, Y. & Mimura, T. (2017) „Matrix Metalloproteinase Gene Activation Resulting from Disordred Epigenetic Mechanisms in Rheumatoid Arthritis“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 18, No. 5.
- Baroja, M. L., Lorre, K., van Vaeck, F. & Ceuppens, J. L. (1989) „The anti-T cell monoclonal antibody 9.3 (Anti-CD28) provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in T Cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens“, *Cellular Immunology*, Vol. 120, No. 1, S. 205–217.
- Bartok, B. & Firestein, G. S. (2010) „Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis“, *Immunological reviews*, Vol. 233, No. 1, S. 233–255.
- Bertin, S., Aoki-Nonaka, Y., Lee, J., Jong, P. R. de, Kim, P., Han, T., Yu, T., To, K., Takahashi, N., Boland, B. S., Chang, J. T., Ho, S. B., Herdman, S., Corr, M., Franco, A., Sharma, S., Dong, H., Akopian, A. N. & Raz, E. (2017) „The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1“, *Gut*, Vol. 66, No. 9, S. 1584–1596.
- Boots, A. M., Wimmers-Bertens, A. J. & Rijnders, A. W. (1994) „Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts“, *Immunology*, Vol. 82, No. 2, S. 268–274.
- Carter, N. A., Vasconcellos, R., Rosser, E. C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M. R., Flavell, R. A. & Mauri, C. (2011) „Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Vol. 186, No. 10, S. 5569–5579.
- Chernov-Rogan, T., Gianti, E., Liu, C., Villemure, E., Cridland, A. P., Hu, X., Ballini, E., Lange, W., Deisemann, H., Li, T., Ward, S. I., Hackos, D. H., Magnuson, S.,

- Safina, B., Klein, M. L., Volgraf, M., Carnevale, V. & Chen, J. (2019) „TRPA1 modulation by piperidine carboxamides suggests an evolutionarily conserved binding site and gating mechanism“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 116, No. 51, S. 26008–26019.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G. & Levi, B. Z. (1996) „Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 271, No. 2, S. 736–741.
- Daien, C. I., Gailhac, S., Mura, T., Audo, R., Combe, B., Hahne, M. & Morel, J. (2014) „Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity“, *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, Vol. 66, No. 8, S. 2037–2046.
- Derksen, V. F. A. M., Huizinga, T. W. J. & van der Woude, D. (2017) „The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis“, *Seminars in immunopathology*, Vol. 39, No. 4, S. 437–446.
- Di Marzo, V. & Piscitelli, F. (2015) „The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids“, *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, Vol. 12, No. 4, S. 692–698.
- Djukic, M., Nau, R. & Sieber, C. (2014) „Das alternde Immunsystem“, *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, Vol. 139, No. 40, S. 1987–1990.
- Dotsey, E., Ushach, I., Pone, E., Nakajima, R., Jasinskas, A., Argueta, D. A., Dillon, A., DiPatrizio, N., Davies, H., Zlotnik, A., Crompton, P. D. & Felgner, P. L. (2017) „Transient Cannabinoid Receptor 2 Blockade during Immunization Heightens Intensity and Breadth of Antigen-specific Antibody Responses in Young and Aged mice“, *Scientific reports*, Vol. 7, S. 42584.
- England, B. R. & Hershberger, D. (2020) „Management issues in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease“, *Current opinion in rheumatology*, Vol. 32, No. 3, S. 255–263.
- England, B. R., Thiele, G. M., Anderson, D. R. & Mikuls, T. R. (2018) „Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications“, *BMJ (Clinical research ed.)*, Vol. 361, k1036.
- Fagnoni, F. F., Vescovini, R., Passeri, G., Bologna, G., Pedrazzoni, M., Lavagetto, G., Casti, A., Franceschi, C., Passeri, M. & Sansoni, P. (2000) „Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging“, *Blood*, Vol. 95, No. 9, S. 2860–2868.
- Fahmi, H., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P. & Kapoor, M. (2011) „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in osteoarthritis“, *Modern rheumatology*, Vol. 21, No. 1, S. 1–9.
- Felson, D. T., Smolen, J. S., Wells, G., Zhang, B., van Tuyl, L. H. D., Funovits, J., Aletaha, D., Allaart, C. F., Bathon, J., Bombardieri, S., Brooks, P., Brown, A., Matucci-Cerinic, M., Choi, H., Combe, B., Wit, M. de, Dougados, M., Emery, P., Furst, D., Gomez-Reino, J., Hawker, G., Keystone, E., Khanna, D., Kirwan, J., Kvien, T. K., Landewé, R., Listing, J., Michaud, K., Martin-Mola, E., Montie, P., Pincus, T., Richards, P., Siegel, J. N., Simon, L. S., Sokka, T., Strand, V., Tugwell, P., Tyndall, A., van der Heijde, D., Verstappen, S., White, B., Wolfe, F., Zink, A. & Boers, M. (2011) „American College of Rheumatology/European

- League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials“, *Arthritis and rheumatism*, Vol. 63, No. 3, S. 573–586.
- Fernández-Gutiérrez, B., Jovera, J. A., Miguela, S. de, Hernández-García, C., Vidán, M. T., Riberab, J. M., Bañaresa, A. & Serra, J. A. (1999) „Early lymphocyte activation in elderly humans: impaired T and T-dependent B cell responses“, *Experimental Gerontology*, Vol. 34, No. 2, S. 217–229.
- Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. (2002) „Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation“, *The Journal of clinical investigation*, Vol. 109, No. 3, S. 295–299.
- Giorgi, V., Marotto, D., Batticciotto, A., Atzeni, F., Bongiovanni, S. & Sarzi-Puttini, P. (2021) „Cannabis and Autoimmunity: Possible Mechanisms of Action“, *ImmunoTargets and therapy*, Vol. 10, S. 261–271.
- Hafström, I., Ajeganova, S., Le Andersson, M., Bala, S.-V., Bergman, S., Bremander, A., Forslind, K., Malm, K. & Svensson, B. (2019) „A Swedish register-based, long-term inception cohort study of patients with rheumatoid arthritis - results of clinical relevance“, *Open access rheumatology : research and reviews*, Vol. 11, S. 207–217.
- Harigai, M., Hara, M., Kitani, A., Norioka, K., Hirose, T., Hirose, W., Suzuki, K., Kawakami, M., Masuda, K. & Shinmei, M. (1991) „Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically increase the production of interleukin 6 in human synovial fibroblast“, *Journal of clinical & laboratory immunology*, Vol. 34, No. 3, S. 107–113.
- Harrington, R., Al Nokhatha, S. A. & Conway, R. (2020) „JAK Inhibitors in Rheumatoid Arthritis: An Evidence-Based Review on the Emerging Clinical Data“, *Journal of inflammation research*, Vol. 13, S. 519–531.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. (2000) „A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA“, *Nature*, Vol. 408, No. 6813, S. 740–745.
- Israelsson, P., Dehlin, E., Nagaev, I., Lundin, E., Ottander, U. & Mincheva-Nilsson, L. (2020) „Cytokine mRNA and protein expression by cell cultures of epithelial ovarian cancer-Methodological considerations on the choice of analytical method for cytokine analyses“, *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, Vol. 84, No. 1, e13249.
- Jang, D.-I., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R. & Yang, S.-H. (2021) „The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 22, No. 5.
- Karouzakis, E., Gay, R. E., Gay, S. & Neidhart, M. (2009) „Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts“, *Nature reviews. Rheumatology*, Vol. 5, No. 5, S. 266–272.
- Karst, M. (2018) „Cannabinoide in der Schmerzmedizin“, *Schmerz (Berlin, Germany)*, Vol. 32, No. 5, S. 381–396.
- Kearsley-Fleet, L., Davies, R., Cock, D. de, Watson, K. D., Lunt, M., Buch, M. H., Isaacs, J. D. & Hyrich, K. L. (2018) „Biologic refractory disease in rheumatoid

- arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis“, *Annals of the rheumatic diseases*, Vol. 77, No. 10, S. 1405–1412.
- Kochukov, M. Y., McNearney, T. A., Fu, Y. & Westlund, K. N. (2006) „Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes“, *American journal of physiology. Cell physiology*, Vol. 291, No. 3, C424-32.
- Kogan, N. M., Lavi, Y., Topping, L. M., Williams, R. O., McCann, F. E., Yekhtin, Z., Feldmann, M., Gallily, R. & Mechoulam, R. (2021) „Novel CBG Derivatives Can Reduce Inflammation, Pain and Obesity“, *Molecules (Basel, Switzerland)*, Vol. 26, No. 18.
- Korb, A., Pavenstädt, H. & Pap, T. (2009) „Cell death in rheumatoid arthritis“, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, Vol. 14, No. 4, S. 447–454.
- Krcevski-Skvarc, N., Wells, C. & Häuser, W. (2018) „Availability and approval of cannabis-based medicines for chronic pain management and palliative/supportive care in Europe: A survey of the status in the chapters of the European Pain Federation“, *European journal of pain (London, England)*, Vol. 22, No. 3, S. 440–454.
- Krüger, K. (2018) „Medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis und ihrer Komorbiditäten“, *Der Internist*, Vol. 59, No. 4, S. 341–351.
- Kun, J., Szitter, I., Kemény, A., Perkecz, A., Kereskai, L., Pohóczky, K., Vincze, A., Gódi, S., Szabó, I., Szolcsányi, J., Pintér, E. & Helyes, Z. (2014) „Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles“, *PloS one*, Vol. 9, No. 9, e108164.
- Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnäker, E.-M., Tarner, I. H., Robbins, P. D., Evans, C. H., Stürz, H., Steinmeyer, J., Gay, S., Schölmerich, J., Pap, T., Müller-Ladner, U. & Neumann, E. (2009) „Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints“, *Nature medicine*, Vol. 15, No. 12, S. 1414–1420.
- Lin, Y.-J., Anzaghe, M. & Schülke, S. (2020) „Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis“, *Cells*, Vol. 9, No. 4.
- Liu, Z. & Davidson, A. (2011) „BAFF and selection of autoreactive B cells“, *Trends in immunology*, Vol. 32, No. 8, S. 388–394.
- Lowin, T., Bleck, J., Schneider, M. & Pongratz, G. (2018) „Selective killing of proinflammatory synovial fibroblasts via activation of transient receptor potential ankyrin (TRPA1)“, *Biochemical pharmacology*, Vol. 154, S. 293–302.
- Lowin, T., Tingting, R., Zurmahr, J., Classen, T., Schneider, M. & Pongratz, G. (2020) „Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts“, *Cell death & disease*, Vol. 11, No. 8, S. 714.
- Mammana, S., Cavalli, E., Gugliandolo, A., Silvestro, S., Pollastro, F., Bramanti, P. & Mazzon, E. (2019) „Could the Combination of Two Non-Psychotropic Cannabinoids Counteract Neuroinflammation? Effectiveness of Cannabidiol Associated with Cannabigerol“, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, Vol. 55, No. 11.

- Manoury-Schwartz, B., Chiocchia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S., Boissier, M. C. & Fournier, C. (1997) „High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Vol. 158, No. 11, S. 5501–5506.
- Meents, J. E., Ciotu, C. I. & Fischer, M. J. M. (2019) „TRPA1: a molecular view“, *Journal of neurophysiology*, Vol. 121, No. 2, S. 427–443.
- Mehta, A. K., Gracias, D. T. & Croft, M. (2018) „TNF activity and T cells“, *Cytokine*, Vol. 101, S. 14–18.
- Mendes, S. J. F., Sousa, F. I. A. B., Pereira, D. M. S., Ferro, T. A. F., Pereira, I. C. P., Silva, B. L. R., Pinheiro, A. J. M. C. R., Mouchrek, A. Q. S., Monteiro-Neto, V., Costa, S. K. P., Nascimento, J. L. M., Grisotto, M. A. G., Da Costa, R. & Fernandes, E. S. (2016) „Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms“, *International immunopharmacology*, Vol. 34, S. 60–70.
- Möller, B., Paulukat, J., Nold, M., Behrens, M., Kukoc-Zivojnov, N., Kaltwasser, J. P., Pfeilschifter, J. & Mühl, H. (2003) „Interferon-gamma induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes“, *Rheumatology (Oxford, England)*, Vol. 42, No. 3, S. 442–445.
- Mond, J. J. & Brunswick, M. (2003) „Proliferative assays for B cell function“, *Current protocols in immunology*, Chapter 3, Unit 3.10.
- Morales, P., Hurst, D. P. & Reggio, P. H. (2017) „Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture“, *Progress in the chemistry of organic natural products*, Vol. 103, S. 103–131.
- Mosser, D. M. & Zhang, X. (2008) „Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine“, *Immunological reviews*, Vol. 226, S. 205–218.
- Muller, C., Morales, P. & Reggio, P. H. (2018) „Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels“, *Frontiers in molecular neuroscience*, Vol. 11, S. 487.
- Nachnani, R., Raup-Konsavage, W. M. & Vrana, K. E. (2021) „The Pharmacological Case for Cannabigerol“, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 376, No. 2, S. 204–212.
- Nadal, X., Del Río, C., Casano, S., Palomares, B., Ferreiro-Vera, C., Navarrete, C., Sánchez-Carnerero, C., Cantarero, I., Bellido, M. L., Meyer, S., Morello, G., Appendino, G. & Muñoz, E. (2017) „Tetrahydrocannabinolic acid is a potent PPAR γ agonist with neuroprotective activity“, *British journal of pharmacology*, Vol. 174, No. 23, S. 4263–4276.
- Naert, R., López-Requena, A. & Talavera, K. (2021) „TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 22, No. 21.
- Nagy, G., Roodenrijs, N. M., Welsing, P. M., Kedves, M., Hamar, A., van der Goes, M. C., Kent, A., Bakkers, M., Blaas, E., Senolt, L., Szekanecz, Z., Choy, E., Dougados, M., Jacobs, J. W., Geenen, R., Bijlsma, H. W., Zink, A., Aletaha, D., Schoneveld, L., van Riel, P., Gutermann, L., Prior, Y., Nikiphorou, E., Ferraccioli, G., Schett, G., Hyrich, K. L., Mueller-Ladner, U., Buch, M. H., McInnes, I. B., van

- der Heijde, D. & van Laar, J. M. (2021) „EULAR definition of difficult-to-treat rheumatoid arthritis“, *Annals of the rheumatic diseases*, Vol. 80, No. 1, S. 31–35.
- Nilius, B. & Flockerzi, V. (2014) *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Nummenmaa, E., Hämäläinen, M., Pemmari, A., Moilanen, L. J., Tuure, L., Nieminen, R. M., Moilanen, T., Vuolteenaho, K. & Moilanen, E. (2020) „Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Is Involved in Upregulating Interleukin-6 Expression in Osteoarthritic Chondrocyte Models“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 22, No. 1.
- Nygaard, G. & Firestein, G. S. (2020) „Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes“, *Nature reviews. Rheumatology*, Vol. 16, No. 6, S. 316–333.
- Ohata, J., Zvaifler, N. J., Nishio, M., Boyle, D. L., Kalled, S. L., Carson, D. A. & Kipps, T. J. (2005) „Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines“, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Vol. 174, No. 2, S. 864–870.
- Padilla, J., Leung, E. & Phipps, R. P. (2002) „Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists“, *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, Vol. 103, No. 1, S. 22–33.
- Page, C. E., Smale, S., Carty, S. M., Amos, N., Lauder, S. N., Goodfellow, R. M., Richards, P. J., Jones, S. A., Topley, N. & Williams, A. S. (2010) „Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis“, *Arthritis research & therapy*, Vol. 12, No. 2, R49.
- Palomares, B., Garrido-Rodriguez, M., Gonzalo-Consuegra, C., Gómez-Cañas, M., Saen-Oon, S., Soliva, R., Collado, J. A., Fernández-Ruiz, J., Morello, G., Calzado, M. A., Appendino, G. & Muñoz, E. (2020) „Δ9 -Tetrahydrocannabinolic acid alleviates collagen-induced arthritis: Role of PPARγ and CB1 receptors“, *British journal of pharmacology*, Vol. 177, No. 17, S. 4034–4054.
- Pandolfi, F., Franza, L., Carusi, V., Altamura, S., Andriollo, G. & Nucera, E. (2020) „Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 21, No. 15.
- Pereira, I., Mendes, S. J. F., Pereira, D. M. S., Muniz, T. F., Colares, V. L. P., Monteiro, C. R. A. V., Martins, M. M. R. d. S., Grisotto, M. A. G., Monteiro-Neto, V., Monteiro, S. G., Calixto, J. B., Brain, S. D. & Fernandes, E. S. (2017) „Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability“, *Frontiers in pharmacology*, Vol. 8, S. 53.
- Proost, P., Verpoest, S., van de Borne, K., Schutyser, E., Struyf, S., Put, W., Ronsse, I., Grillet, B., Opdenakker, G. & van Damme, J. (2004) „Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon-gamma in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids“, *Journal of leukocyte biology*, Vol. 75, No. 5, S. 777–784.

- Sahoo, S. S., Majhi, R. K., Tiwari, A., Acharya, T., Kumar, P. S., Saha, S., Kumar, A., Goswami, C. & Chattopadhyay, S. (2019) „Transient receptor potential ankyrin1 channel is endogenously expressed in T cells and is involved in immune functions“, *Bioscience reports*, Vol. 39, No. 9.
- Schneider, M., Baseler, G., Funken, O., Heberger, S., Kiltz, U., Klose, P., Krüger, K., Langhorst, J., Mau, W., Oltman, R., Richter, B., Seitz, S., Sewerin, P., Tholen, R., Weseloh, C., Witthöft, M. & Specker, C. (2020) „Management der frühen rheumatoiden Arthritis : Interdisziplinäre Leitlinie“, *Zeitschrift für Rheumatologie*, Vol. 79, Suppl 1, S. 1–38.
- Setoguchi, K., Misaki, Y., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kawahata, K., Kadowaki, T. & Yamamoto, K. (2001) „Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis“, *The Journal of clinical investigation*, Vol. 108, No. 11, S. 1667–1675.
- Shea, B., Swinden, M. V., Tanjong Ghogomu, E., Ortiz, Z., Katchamart, W., Rader, T., Bombardier, C., Wells, G. A. & Tugwell, P. (2013) „Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis“, *The Cochrane database of systematic reviews*, No. 5, CD000951.
- Singh, J. A., Cameron, C., Noorbaloochi, S., Cullis, T., Tucker, M., Christensen, R., Ghogomu, E. T., Coyle, D., Clifford, T., Tugwell, P. & Wells, G. A. (2015) „Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis“, *The Lancet*, Vol. 386, No. 9990, S. 258–265.
- Śledziński, P., Nowak-Terpiłowska, A. & Zeyland, J. (2020) „Cannabinoids in Medicine: Cancer, Immunity, and Microbial Diseases“, *International journal of molecular sciences*, Vol. 22, No. 1.
- Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. (2016) „Rheumatoid arthritis“, *The Lancet*, Vol. 388, No. 10055, S. 2023–2038.
- Smolen, J. S., Landewé, R. B. M., Bijlsma, J. W. J., Burmester, G. R., Dougados, M., Kerschbaumer, A., McInnes, I. B., Sepriano, A., van Vollenhoven, R. F., Wit, M. de, Aletaha, D., Aringer, M., Askling, J., Balsa, A., Boers, M., Broeder, A. A. den, Buch, M. H., Buttgereit, F., Caporali, R., Cardiel, M. H., Cock, D. de, Codreanu, C., Cutolo, M., Edwards, C. J., van Eijk-Hustings, Y., Emery, P., Finckh, A., Gossec, L., Gottenberg, J.-E., Hetland, M. L., Huizinga, T. W. J., Koloumas, M., Li, Z., Mariette, X., Müller-Ladner, U., Mysler, E. F., Da Silva, J. A. P., Poór, G., Pope, J. E., Rubbert-Roth, A., Ruysse-Witrand, A., Saag, K. G., Strangfeld, A., Takeuchi, T., Voshaar, M., Westhovens, R. & van der Heijde, D. (2020) „EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update“, *Annals of the rheumatic diseases*, Vol. 79, No. 6, S. 685–699.
- Soutar, D. A., Doucette, C. D., Liwski, R. S. & Hoskin, D. W. (2017) „Piperine, a Pungent Alkaloid from Black Pepper, Inhibits B Lymphocyte Activation and Effector Functions“, *Phytotherapy research : PTR*, Vol. 31, No. 3, S. 466–474.
- Störch, H., Zimmermann, B., Resch, B., Tykocinski, L.-O., Moradi, B., Horn, P., Kaya, Z., Blank, N., Rehart, S., Thomsen, M., Lorenz, H.-M., Neumann, E. & Tretter, T. (2016) „Activated human B cells induce inflammatory fibroblasts with cartilage-

- destructive properties and become functionally suppressed in return“, *Annals of the rheumatic diseases*, Vol. 75, No. 5, S. 924–932.
- Szabó, K., Kemény, Á., Balázs, N., Khanfar, E., Sándor, Z., Boldizsár, F., Gyulai, R., Najbauer, J., Pintér, E. & Berki, T. (2022) „Presence of TRPA1 Modifies CD4+/CD8+ T Lymphocyte Ratio and Activation“, *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, Vol. 15, No. 1.
- Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. (2018) „Interleukin (IL-6) Immunotherapy“, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Vol. 10, No. 8.
- Thomas, S., Fisher, K. H., Snowden, J. A., Danson, S. J., Brown, S. & Zeidler, M. P. (2015) „Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor“, *PloS one*, Vol. 10, No. 7, e0130078.
- Verhoeckx, K. C. M., Korthout, H. A. A. J., van Meeteren-Kreikamp, A. P., Ehlert, K. A., Wang, M., van der Greef, J., Rodenburg, R. J. T. & Witkamp, R. F. (2006) „Unheated Cannabis sativa extracts and its major compound THCAcid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways“, *International immunopharmacology*, Vol. 6, No. 4, S. 656–665.
- Volkov, M., van Schie, K. A. & van der Woude, D. (2020) „Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology“, *Immunological reviews*, Vol. 294, No. 1, S. 148–163.
- Wada, T. T., Araki, Y., Sato, K., Aizaki, Y., Yokota, K., Kim, Y. T., Oda, H., Kurokawa, R. & Mimura, T. (2014) „Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts“, *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 444, No. 4, S. 682–686.
- Yellen-Shaw, A. & Monroe, J. G. (1992) „Differential responsiveness of immature- and mature-stage murine B cells to anti-IgM reflects both FcR-dependent and -independent mechanisms“, *Cellular Immunology*, Vol. 145, No. 2, S. 339–350.
- Zink, A. (2014) „Versorgungsforschung in der Rheumatologie. Aktueller Stand“, *Zeitschrift für Rheumatologie*, Vol. 73, No. 2, S. 115–122.
- Zink, A. & Albrecht, K. (2016) „Wie häufig sind muskuloskeletale Erkrankungen in Deutschland?“, *Zeitschrift für Rheumatologie*, Vol. 75, No. 4, S. 346–353.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Professor Georg Pongratz, Herrn Professor Hans Neubauer und Herrn Doktor Torsten Lowin für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung im Labor und bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Ellen und Birgit für den Rat und die technische Unterstützung bei der Arbeit im Labor bedanken. Auch meinen Kolleginnen Eva, Sarah und Thandiwe danke ich für die produktiven Gesprächen und lieben Worte.

Zuletzt danke ich meiner Familie sowie meinen Freunden, allen voran Clara de Angelis, Federica Artmann, Isabel Syben, Theresa Tenge, Nils Domröse und Matteo Luca, für ihre Geduld, Ermutigungen und ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und bei der Arbeit an dieser Dissertation.