

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

**Rolle des Ghrelin-Systems in Fibroblasten von Patienten mit
Rheumatoider Arthritis:
Fokus auf Zytokinproduktion und Ghrelin-
Rezeptorexpression**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa Yi Zhang

2024

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

gez.: Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter/in: Prof. Hans Neubauer

Widmung

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) kommt es zu einer autoimmunvermittelten Entzündung von kleinen Gelenken. Die Erkrankung verläuft progredient und kann zur irreversiblen Destruktion und Funktionsverlust betroffener Gelenken führen. Die Therapie zielt auf eine Immunmodulation und daraus folgend eine verringerte Entzündungsreaktion.

Ghrelin ist ein Verdauungshormon, welches v.a. in der Magenmukosa von endokrinen Zellen produziert wird. Neben seiner Funktion im Energiehaushalt ist auch die antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin Gegenstand aktueller Forschung. Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung des Ghrelin-Systems auf die Zytokinproduktion von Fibroblasten von PatientInnen mit RA zu untersuchen. Hierfür wurden die Fibroblasten mit den Entzündungsmediatoren $\text{TNF-}\alpha$ sowie Interferon- γ stimuliert und mit Antagonisten und Agonisten des GHS-R Liganden inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6, VEGF und BAFF mittels ELISA in den Zellkulturen. Zudem wurde der Einfluss von proinflammatorischen Signalen auf die Expression des GHS-R sowie der Einfluss von den Agonisten und Antagonisten des GHS-R auf die GLUT1- und GLUT4-Expression der Fibroblasten untersucht. Die Quantifizierung der Rezeptorexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Stimulation der Fibroblasten mit $\text{TNF-}\alpha$ und IFN- γ zu einer signifikant erhöhten Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche führte. Diese Ergebnisse wurden in die Versuchsreihe zur Zytokinproduktion implementiert. Die Fibroblasten wurden mit der Kombination aus $\text{TNF-}\alpha$ und IFN- γ vorstimuliert. Daraufhin zeigte sich, dass die getesteten Liganden zu einer veränderten Zytokinproduktion in den Fibroblasten von RA-PatientInnen führten. Zytokine spielen in dem Krankheitsprogress der RA eine zentrale Rolle. Die immunmodulatorische Wirkung von Ghrelin könnte demnach potenziell zur Therapie der RA und anderen autoinflammatorischen Erkrankungen genutzt werden.

Summary

Rheumatoid arthritis (RA) leads to an autoimmune-mediated inflammation of small joints. The disease is progressive and can lead to an irreversible destruction and loss of function of the affected joints. The aim of therapy is an immunomodulation and therefore a decreased inflammatory response.

Ghrelin is a digestive hormone which is mainly produced by endocrine cells in the gastric mucosa. Besides its function in energy balance, the antiinflammatory effect of ghrelin is subject of current research. The aim of this work is to investigate the effect of the ghrelin system on the cytokine production of fibroblasts from patients with RA. To do this, the fibroblasts were stimulated with the inflammatory mediators TNF- α and Interferon- γ and incubated with agonists and antagonists of the GHS-R. Afterwards, the concentration of the proinflammatory cytokines IL-6, VEGF and BAFF were measured via ELISA in the cell culture. In addition, the effect of proinflammatory signals on the expression of the GHS-R as well as the effect of the GHS-R-ligands on the GLUT1 and GLUT 4 expression of fibroblasts were investigated. The receptor expression was quantified via flow cytometry.

These experiments demonstrated that combined stimulation of the fibroblasts with TNF- α and Interferon- γ lead to a significantly increased expression of the GHS-R on the cell surface. These results were implemented into the experiments regarding the cytokineproduction. The fibroblasts were pre-stimulated with a combination of TNF- α and Interferon- γ . As a result, a modified cytokineproduction in the fibroblasts of RA-patients could be detected. Cytokines play a central role in the disease progress in RA. Thus, the immunomodulatory effect of Ghrelin could potentially be used in the therapy of RA and other autoinflammatory diseases.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	<i>Agouti-related Peptid</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCP	Zyklisches citrulliniertes Peptid
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
COX	Cyclooxygenase-Hemmer
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAG	Diacylglycerin
DMARD	<i>Disease-Modifying-Drug</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Endothelial Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immuno absorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
GHRH	<i>Growth Hormone Releasing Hormone</i>
GHRP	<i>Growth Hormone Releasing Peptide</i>
GHS-R	<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i>
GOAT	Ghrelin-O-Acyl-Transferase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPER	<i>G protein-coupled estrogen receptor</i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HVL	Hypophysenvorderlappen
IFN- γ	Interferon-gamma
IgM	Immunglobulin M

IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
MTX	Methotrexat
Npy	Neuropeptid Y
NSAID	Nicht-steroidale Antirheumatika
OR	Opioidrezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
RA	Rheumatoide Arthritis
RASF	<i>Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrose-Faktor alpha
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Facto</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1	Ätiologie	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Klinik	2
1.1.4	Diagnostik	3
1.1.5	Therapie	3
1.2	Zytokine	5
1.2.1	Interleukin-6 (IL-6)	5
1.2.2	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	5
1.2.3	B-cell activating factor (BAFF)	6
1.2.4	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)	6
1.2.5	IFN- γ	7
1.2.6	Interleukin 1-beta (IL-1 β)	7
1.3	Ghrelin	8
1.3.1	Zusammensetzung und Synthese	8
1.3.2	Funktion	8
1.3.3	Der Ghrelin-Rezeptor	9
1.3.4	Einfluss auf immunologische Prozesse	10
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterial	13
2.1.3	Chemikalien	14
2.1.4	Reagenzien	15
2.1.5	Rezeptor-Antikörper für die Durchflusszytometrie	15
2.1.6	ELISA-Kits	16
2.1.7	Zusammensetzung der Puffer für Versuche und Zellkulturmedien	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Probenentnahme und Gewinnung synovialer Fibroblasten	17
2.2.2	Zellkultur	18
2.2.3	Durchflusszytometrie	18
2.2.4	Zellstimulation	21

2.2.5	ELISA	24
2.3	Statistische Auswertung	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Ergebnisse Rezeptorexpression.....	27
3.1.1	GHS-R-Expression	27
3.1.2	GLUT1 und GLUT4 Expression	28
3.2	Ergebnisse Zytokinproduktion	33
3.2.1	Ergebnisse ELISA Schema 1	33
3.2.2	Ergebnisse ELISA Schema 2	35
3.2.3	Ergebnisse ELISA Schema 3	37
4	Diskussion.....	44
4.1	GHS-R-Expression.....	44
4.2	GLUT1 und GLUT4 Expression.....	46
4.3	Zytokinproduktion.....	47
4.3.1	YIL-781 verringert BAFF-Produktion.....	47
4.3.2	Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ macht den Effekt des GHS-R auf VEGF-Produktion sichtbar	48
4.4	GHS-R als therapeutische Zielstruktur: Systemische Wirkung von Ghrelin und GHS-R-Liganden	52
4.5	Limitationen	54
4.6	Ghrelin als potenzieller Wirkstoff in der Behandlung von RA.....	55
4.6.1	Behandlung krankheitsassoziierter Kachexie	55
4.6.2	Kardioprotektive Wirkung.....	56
4.6.3	Antidepressive Wirkung	56
4.7	Ausblick	57
5	Literaturverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, entzündliche Erkrankung, welche die Synovialis von Gelenken befällt und so zu einer Polyarthritis sowie Morgensteifigkeit führt (Arnett et al., 1988). Durch den progredienten Verlauf der Erkrankung kommt es zur fortschreitenden Destruktion der Gelenke, welche sich in einem ausgeprägten Krankheitsbild präsentieren kann. Die Schmerzen und Entzündungen in den kleinen Gelenken können die PatientInnen im Alltag stark einschränken.

Die RA ist mit hohen sozioökonomischen Kosten verbunden. Die direkten Kosten der Behandlung von RA in Deutschland liegen bei durchschnittlich 8206€ jährlich pro PatientIn. Durch Krankheitstage und krankheitsbedingter Arbeitsunfähigkeit entstehen zusätzlich indirekte Kosten von ca. 9754€, wodurch sich die Ausgaben auf ca. 18.000€ in einem Jahr pro PatientIn summieren (Huscher et al., 2015).

Eine frühe Diagnose sowie gezielte Behandlung sind notwendig, um den Verlauf der Erkrankung positiv zu beeinflussen. Trotz effektiver Medikamente und gezielter Therapie kann nur bei 30 - 40% der PatientInnen eine Remission erreicht werden (Storage et al., 2010).

1.1.1 Ätiologie

Die genaue Ätiologie der RA ist Bestandteil aktueller Forschung und noch nicht grundlegend geklärt. Es wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen, wobei genetische und epigenetische Faktoren sowie Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Giannini et al., 2020). Prinzipiell handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, wobei unter anderem das körpereigene Knorpelgewebe von Immunzellen angegriffen wird und so eine Entzündung in dem jeweiligen Gelenk entsteht. (Klareskog et al., 2009).

Es wurden verschiedene genetische Faktoren nachgewiesen, welche mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einer RA assoziiert sind. Insbesondere das HLA DR-4 sowie das HLA DR-B1 Allel führen zu einer erhöhten Prädisposition, an einer RA zu erkranken. (McDermott and McDevitt, 1988; Wordsworth et al., 1992). Neben einer erhöhten Suszeptibilität scheinen diese Allele ebenfalls mit der Schwere des Krankheitsverlaufs

sowie extraartikulären Manifestationen der RA zusammenzuhängen (Calin et al., 1989; Weyand et al., 1992).

Als einer der wichtigsten exogenen Risikofaktoren für die RA gilt das Rauchen. Dieses steigert signifikant das Risiko, an einer seropositiven RA zu erkranken. Dieser Effekt ließ sich auch in Populationen nachweisen, in denen Confounder wie sozioökonomische Hintergründe berücksichtigt wurden (Heliövaara et al., 1993; Hutchinson et al., 2001; Symmons et al., 1997; Uhlig et al., 1999).

Auf zellulärer Ebene ist eine gestörte Immunreaktion ursächlich für die Entzündungsprozesse. Es konnte nachgewiesen werden, dass CD4+CD25+ T-Zellen in PatientInnen mit RA eine eingeschränkte regulierende Funktion aufweisen und somit die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Effektor-T-Zellen und Monozyten nicht mehr inhibieren können (Ehrenstein et al., 2004). Diese Imbalance zwischen regulierenden und proinflammatorischen Signalen führt zu einer überschießenden Entzündungsreaktion. Zu den weiteren Zelltypen, welche an der Pathogenese der RA beteiligt sind, gehören unter anderem B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen (Panayi, 1993).

1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der RA liegt bei ca. 0,5-1% der Bevölkerung. Je nach ethnischer Herkunft variiert diese Angabe. Durchschnittlich sind Frauen drei Mal häufiger betroffen als Männer. Häufig manifestiert sich die Erkrankung zwischen dem 55. Bis 65. Lebensjahr (Scott et al. 2010). Die altersstandardisierte Inzidenz und Prävalenz steigen global gesehen seit 1990 an (Safiri et al., 2019). Dieses Phänomen ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Lebenserwartung der Bevölkerung steigt.

Eine Studie aus dem Jahr 2011 zeigte, dass das Lebenszeitrisko, an einer RA zu erkranken, in den USA für Frauen bei 3,6% liegt und für Männer bei 1,7% lag (Crowson et al., 2011).

1.1.3 Klinik

Das klinische Bild der RA ist sowohl zu Krankheitsbeginn als auch im weiteren Verlauf individuell variabel. Im Vordergrund des klinischen Erscheinungsbildes stehen Schmerzen, Schwellung und Steifheit von kleinen peripheren Gelenken. Dazu zählen vor allem die Hand-, Finger und Zehengrundgelenke. Typisch ist ein polytopter und

symmetrischer Gelenkbefall, bei dem mindestens drei Gelenke betroffen sind. Des Weiteren können Grippe-ähnliche Begleitsymptome wie Abgeschlagenheit und Fieber vor allem zu Krankheitsbeginn auftreten.

PatientInnen mit RA haben ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Avina-Zubieta et al., 2012; Jacobsson et al., 1993; Maradit-Kremers et al., 2005b). Dies trägt unter anderem zu der erhöhten Mortalität bei Patienten mit RA bei (Myllykangas-Luosujärvi et al., 1995). Pathophysiologisch gesehen begünstigt die systemische Entzündung bei PatientInnen mit RA die Bildung von artherosklerotischen Plaques (Libby, 2006; Manzi et al., 2000, p.).

Weitere Komorbiditäten sind pulmonale, dermatologische und gastrointestinale Erkrankungen (Norton et al., 2013). Auch psychische Erkrankungen wie Depression, Angst- und Panikstörungen sind mit der RA assoziiert (Joyce et al., 2009; Matcham et al., 2013)

1.1.4 Diagnostik

Basis der Diagnostik einer RA sind eine ausführliche Anamnese sowie eine körperliche Untersuchung. Zusätzlich können bildgebende und serologische Diagnostikverfahren genutzt werden, um die Verdachtsdiagnose einer RA zu erhärten. (Ngian, 2010). In Röntgenaufnahmen von Gelenken, vor allem den kleinen Gelenken in Händen und Füßen, können radiologische Zeichen der Gelenkserosion zeigen und den Krankheitsprogress im Verlauf darstellen.

Als diagnostisches Mittel haben sich die ACR/EULAR Klassifikationskriterien etabliert, welche von der American College of Rheumatology (ACR) und der European League Against Rheumatism (EULAR) entwickelt wurden (Kay and Upchurch, 2012). Diese Diagnosekriterien berücksichtigen den Gelenkbefall, serologische Marker sowie die Symptombdauer.

1.1.5 Therapie

Als vordergründiges Ziel der Therapie wird die klinische Remission und die damit verbundene verbesserte Lebensqualität angesehen. Falls eine klinische Remission nicht erreicht werden kann, sollte die Krankheitsprogredienz möglichst verlangsamt werden, um strukturelle Schäden an den Gelenken und Komorbiditäten zu minimieren. (Smolen et al., 2016)

Aufgrund des entzündlichen Krankheitsgeschehen bei der RA zielen medikamentöse Therapieansätze auf eine Immunmodulation. Die Basistherapie besteht aus Glukokortikoiden, Analgetika, Nichts-steroidalen Antirheumatika (NSAIDs) sowie Disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs).

NSAIDs und COX-2-Inhibitoren werden zur symptomatischen Therapie der RA genutzt. Sie wirken antiinflammatorisch und antiphlogistisch und verbessern dadurch das klinische Bild der Gelenkentzündungen (American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, 2002). Da sie jedoch nicht prognoseverbessernd wirken, sollten sie nicht als Monotherapie bei einer RA genutzt werden.

Nach Diagnosestellung sollte frühzeitig eine Therapie mit DMARDs begonnen werden. Darunter werden verschiedene Gruppen von Medikamenten gefasst, die zur Behandlung der RA genutzt werden und Auswirkungen auf die Prognose der Erkrankung haben. Zu diesen Gruppen gehören die synthetischen DMARD (sDMARD), welche Medikamente wie Methotrexat (MTX), Hydroxychloroquin, Leflunomid und Sulfasalazin beinhalten, sowie die biologischen DMARD (bDMARD), zu denen Biologika wie Abatacept, Rituximab oder Tocilizumab gehören (Smolen et al., 2014).

Basismedikament zur Behandlung der RA ist MTX, welches ggf. mit niedrig dosiertem Cortison kombiniert wird (Krüger et al., 2012). Die Therapie mit MTX führt bei PatientInnen mit RA vor allem durch Reduktion der kardiovaskulären Mortalität zu einem Überlebensvorteil (Choi et al., 2002). Aufgrund seiner Effektivität, Kosteneffizienz und Reliabilität gilt es deswegen immer noch als ein Standardpräparat zur medikamentösen Therapie der RA. Jedoch erreichen viele RA-PatientInnen unter einer MTX-Monotherapie nicht die gewünschte Symptomreduktion bzw. klinische Remission (Klareskog et al., 2004).

Studien haben gezeigt, dass ein früher Einsatz von DMARD in Kombination mit Glucocorticoiden für die Therapie der RA prognoseverbessernd sind und den Progress der RA effektiv verlangsamen können (Singh et al., 2012).

Nicht-medikamentöse Therapieansätze beinhalten die physikalische Therapie sowie Physiotherapie. Durch angeleitete Übungen zur Stärkung der Muskulatur und Mobilität können unter anderem die Gelenkfunktionalität verbessert und Symptome wie Morgensteifigkeit gemindert werden (Bell et al., 1998; Komatireddy et al., 1997).

1.2 Zytokine

Zytokine spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der RA. Die gestörte Homöostase zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zugunsten proinflammatorischen Signalen führt zu einer erhöhten Entzündungsaktivität bei PatientInnen mit RA, welche für den Krankheitsprogress und die systemische Beteiligung weiterer Organe verantwortlich ist. Die Modulation der Zytokinproduktion stellt deswegen einen wichtigen Therapieansatz dar (Alam et al., 2017; Brzustewicz and Bryl, 2015; Feldmann et al., 1996).

1.2.1 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein proinflammatorisches Interleukin, welches pleiotrope Effekte auf Entzündungsreaktionen und Autoimmunprozesse im menschlichen Körper hat. Es aktiviert unter anderem Akute Phase Reaktionen und die Differenzierung von B- und T-Zellen (Tanaka et al., 2014). IL-6-Konzentrationen sind in der Synovialflüssigkeit von PatientInnen mit RA im Vergleich zu nicht erkrankten Menschen erhöht (Bertazzolo et al., 1994; Houssiau et al., 1988).

IL-6 ist aufgrund seiner maßgeblichen Position in Entzündungskaskaden und Autoimmunprozesse ein interessantes Target für die Entwicklung von immunmodulatorischen Medikamenten. Auch in der Pathogenese der RA ist IL-6 neben anderen Zytokinen wie das TNF- α entscheidend involviert, indem es unter anderem T- und B-Zellen sowie Synoviozyten und Osteoklasten stimuliert (Nishimoto et al., 2007). Tocilizumab und Sarilumab sind zwei Biologika, welche zur Therapie der RA verwendet werden. Dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper, die entweder an IL-6 selbst oder dessen Rezeptor binden, um die proinflammatorische Signalkaskade zu inhibieren (Raimondo et al., 2017).

1.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Bei VEGF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, welcher die Proliferation und Formation von Kapillaren fördert. Diese Prozesse werden durch Hypoxie induziert. (Folkman, 1995).

VEGF nimmt in der Pathogenese der RA eine Schlüsselrolle ein. Es aktiviert die Angiogenese und sorgt für eine erhöhte vaskuläre Permeabilität sowie Hyperplasie der Synovialzellen (Fava et al., 1994).

Studien haben gezeigt, dass die VEGF-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von PatientInnen mit RA signifikant erhöht ist (Dai et al., 2019). Dabei führen Hypoxie sowie erhöhte Konzentrationen von IL-1, welche im entzündlichen Milieu von arthritischen Gelenken vorliegen, zu einer vermehrten Sekretion von VEGF in Typ B Synoviozyten. Das VEGF bewirkt wiederum eine gesteigerte Angiogenese (Jackson et al., 1997).

Die Serumkonzentration von VEGF von PatientInnen mit RA korrelieren zudem mit dem Krankheitsverlauf. So haben neu diagnostizierte PatientInnen mit RA höhere VEGF-Serumkonzentrationen als PatientInnen in Remission (Ballara et al., 2001).

1.2.3 B-cell activating factor (BAFF)

BAFF ist ein Zytokin, welches zur TNF-Familie gehört. Es stimuliert die Aktivierung und Differenzierung von B- sowie T-Lymphozyten und hemmt deren Apoptose (Schiemann et al., 2001; Schneider et al., 1999). Auch bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie der RA fördert BAFF die Entzündungsreaktion (Seyler et al., 2005).

PatientInnen mit RA haben erhöhte BAFF-Level im Serum und der Synovialflüssigkeit sowie eine erhöhte Dichte des BAFF-Rezeptors auf der Oberfläche der Synoviozyten (Nakajima et al., 2007; Samy et al., 2017; Woo et al., 2011). Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen erhöhten BAFF-Levels und Rheumafaktoren des IgM-Typs sowie Antikörper gegen das zyklische citrullinierte Peptid (CCP) in PatientInnen mit RA festgestellt. Dabei handelt es sich um laborchemische Marker, die zur Diagnostik der RA verwendet werden (Bosello et al., 2008).

Tabalumab, ein humaner monoklonaler IgG4 Antikörper, welche an den membrangebundenen sowie freien BAFF-Rezeptor bindet, konnte die Symptome und das klinische Outcome bei Biologika-nativen RA-PatientInnen signifikant verbessern (Genovese et al., 2013).

1.2.4 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)

Bereits in den 1980er Jahren wurde die zentrale Rolle von TNF- α in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie die RA oder Diabetes mellitus Typ I etabliert. (Pujol-Borrell et al., 1987). TNF- α stimuliert die Produktion von Prostaglandin E2 und Kollagenasen in synovialen Fibroblasten, was pathogenetisch zur Autodestruktion von Gelenkgewebe führt (Dayer et al., 1985). Zudem wurde in-vitro gezeigt, dass TNF- α bei

gleichzeitiger Präsentation von Osteoblasten und Osteoklasten die Produktion von osteoklastischen Faktoren begünstigt und so die Knochenresorption in PatientInnen mit RA fördert (Thomson et al., 1987).

Der Antikörper Infliximab bindet TNF- α und erhöht die Konzentration von regulatorische T-Zellen, welche die Immunantwort herunterregulieren (Ehrenstein et al., 2004)

1.2.5 IFN- γ

IFN- γ zeigt in Bezug auf chronisch entzündliche Erkrankungen wie die RA sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen. Es fördert die Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche von synovialen Fibroblasten in RA-PatientInnen (Boots et al., 1994) sowie die Produktion von Chemokinen (Proost et al., 2004). IFN- γ wird von T_H1 und T_H2-Zellen produziert, welche wiederum selbst durch IFN- γ aktiviert werden. Diese Zelltypen sind mit der Pathogenese von autoimmunvermittelten inflammatorischen Erkrankungen assoziiert. (Hirahara and Nakayama, 2016; Szabo et al., 2003). Auf der anderen Seite zeigt IFN- γ auch antiinflammatorische Wirkungen. So inhibiert IFN- γ die Produktion der Matrix-Metalloproteasen 1 und 3 und wirkt dadurch in frühen Stadien der RA protektiv auf den Gelenkknorpel (Page et al., 2010). Es konnte zudem gezeigt werden, dass IFN- γ die TNF- α -vermittelte Produktion von IL-6 und IL-8 in RASF herunterreguliert (Lowin et al., 2020). Insgesamt besitzt IFN- γ eine duale Rolle in der RA, wobei es sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zeigt.

1.2.6 Interleukin 1-beta (IL-1 β)

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Konzentration im Serum von PatientInnen mit RA stark mit der Krankheitsaktivität sowie anderen Biomarkern wie Rheumafaktoren oder anti-CCP-Antikörper korreliert (Meyer et al., 2010). Auch in der Synovialflüssigkeit von RA-PatientInnen sind erhöhte Spiegel an IL-1 β messbar (Bertazzolo et al., 1994).

IL-1 β wird in Gelenken vor allem von aktivierten Makrophagen produziert (Lopez-Castejon and Brough, 2011). RASF exprimieren den IL-1-Rezeptor. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch seinen Liganden führt zu einer Aktivierung des NF κ B und MAPK-Signalweges, welches wiederum die Produktion von weiteren proinflammatorischen Zytokinen triggert und so eine Entzündungsreaktion aufrechterhält (Singh et al., 2019). IL-1 β aktiviert zudem T- und B-Zellen und führt zu einer vermehrten Produktion von Prostaglandin E2 (Brzustewicz and Bryl, 2015; Dayer and Fenner, 1992).

Es spielt somit in der Pathogenese der Entzündungsreaktion und Gelenkdestruktion in RA eine zentrale Rolle.

Studien zur Behandlung der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis konnten zeigen, dass die Verwendung von Cananikumab eine Verbesserung der Symptome sowie Dosisreduktion von Glucocorticoiden bewirkt (Nishimura et al., 2021; Ruperto et al., 2012). Dabei handelt es sich um einen humanen monoklonalen Antikörper, der selektiv an IL-1 β bindet und so die durch dieses Zytokin ausgelöste Signalkaskade blockiert.

1.3 Ghrelin

1.3.1 Zusammensetzung und Synthese

Ghrelin ist ein Verdauungshormon, welches hauptsächlich in endokrinen Zellen der Magenmukosa, den sogenannten X/A-type-Zellen, produziert wird (Date et al., 2000). Es handelt sich um ein Aminopeptidhormon, welches aus 28 Aminosäuren besteht (Kojima et al., 1999). Bei der Synthese wird zunächst das Prohormon Preproghrelin synthetisiert, welches enzymatisch zum biologisch aktiven Ghrelin gespalten wird. Um seine Wirkung zu entfalten, wird Ghrelin posttranslational durch das Enzym Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) modifiziert (Yang et al., 2008). Dabei wird an das Serin auf Position 3 des Hormons ein Octansäurerest angehängt. Das acylierte Ghrelin gilt als die aktive Form, wobei zentral appliziertes nicht-acyliertes Ghrelin ebenfalls die Nahrungsaufnahme stimuliert (Toshinai et al., 2006).

1.3.2 Funktion

Ghrelin ist wesentlich an der Regulation des Energiemetabolismus beteiligt. Es ist das einzige bekannte Verdauungshormon, welches eine orexigene Wirkung besitzt (Wren et al., 2001). Der Ghrelin-Plasmaspiegel steigt präprandial sowie während Fastenperioden an und sinkt nach der Nahrungsaufnahme (Cummings et al., 2001).

Ghrelin wirkt zentral auf Strukturen, die der Regulation der Nahrungsaufnahme dienen. Besonders hervorzuheben sind dabei Neuronen im Nucleus Arcuatus, welche den Ghrelin-Rezeptor exprimieren. Neuropeptid Y (Npy) und Agouti-related peptide (AgRP) positive Neuronen vermitteln eine anabole Stoffwechsellaage und werden direkt von Ghrelin stimuliert (Kamegai et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Willesen et al., 1999). Gleichzeitig hemmt Ghrelin Neuronen, die das anorexigen wirkende Proopiomelanocortin (POMC) produzieren (Cowley et al., 2003). Des Weiteren stimuliert Ghrelin die Lipogenese durch Steigerung der Genexpression von Enzymen,

welche an der Lipogenese beteiligt sind. Dazu zählen z.B. die Lipoproteinlipase, Acetyl-CoA-Carboxylase und die Fettsäurensynthase. So wirkt Ghrelin auch peripher auf den Energiemetabolismus (Müller and Tschöp, 2013; Thompson et al., 2004).

Eine weitere Schlüsselfunktion von Ghrelin ist die Freisetzung von Growth Hormone (GH) (Peino et al., 2000; Takaya et al., 2000). GH wird von somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) produziert. Diese Zellen unterliegen einer hormonell vermittelten Regulation. Die GH-Sekretion wird vor allem durch das Growth-Hormone-Releasing-Hormone (GHRH) sowie Ghrelin stimuliert, wobei hier ein synergistischer Effekt vorzuliegen scheint (Date et al., 2000b). Die Signalwege innerhalb der Zelle unterscheiden sich jedoch. Ghrelin aktiviert die Phospholipase C (PLC), welche das membrangebundene Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG wiederum aktiviert die Protein Kinase C, welche Kaliumkanäle inhibiert. Dies führt zur Depolarisierung und Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum der somatotropen Zellen, wodurch es zur eine Sekretion von GH kommt (Carreira et al., 2013; Mau et al., 1995). Ghrelin führt außerdem zu einer vermehrten Sekretion von Adrenocorticotropen Homon (ACTH) und Cortisol. (Benso et al., 2013)

1.3.3 Der Ghrelin-Rezeptor

Der Ghrelin-Rezeptor wird auch als Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHS-R) bezeichnet, da einer der ersten erforschten Wirkungen von Ghrelin die Freisetzung von GH war. Es handelt sich hierbei um ein G-Protein gekoppelten Rezeptor (Howard et al., 1996).

Durch Bindung des endogenen Liganden Ghrelin werden zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche zu den Effekten in der Zielzelle führen. Dazu zählen die Freisetzung von Ca²⁺ und Aktivierung bzw. Inhibition des AMPK-, PI3/AKT/mTOR- und MAP-Kinase-Signalpfads (Yin et al 2014, Kojima *et al.*, 2001).

Die Expression des GHS-R unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Durch Sequenzierung des für den GHS-R codierenden Genabschnittes konnte man zahlreiche Transkriptionsfaktor-bindende Stellen in der Promotorregion ermitteln. Unter anderem führen Hormone wie Östrogen oder Schilddrüsenhormone, aber auch Glucocorticoide zu einer veränderten Expression des GHS-R (Kaji et al., 2001). GH selbst führt im Sinne

eines negativen Feedbackmechanismus zu einer verminderten Expression des GHS-R (Bennett et al., 1997; Nass et al., 2000).

1.3.4 Einfluss auf immunologische Prozesse

Die regulatorische Funktion von Ghrelin auf den Energiemetabolismus ist bereits gut erforscht. Es zeigte sich jedoch, dass Ghrelin nicht nur im Energiehaushalt eine wichtige Rolle spielt, sondern auch eng mit immunologischen Prozessen im menschlichen Körper, wie z.B. chronischer Inflammation, verbunden ist. So wird der GHS-R von verschiedenen Immunzellen wie T- und B-Zellen exprimiert (Dixit et al., 2004; Hattori et al., 2001).

Die antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin wurde bereits an dem Krankheitsbild der Sepsis untersucht. Bei der Sepsis kommt es zu einer überschießenden, nicht adäquaten systemischen Inflammation. Ghrelin führte in septischen Mausmodellen durch eine Vagus-Aktivierung zu einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 (Wu et al., 2007). Mäuse im septischen Schock, welche mit Ghrelin behandelt wurden, hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen höheren systolischen Blutdruck, erniedrigte Laktatserumspiegel und zeigten ein höheres Überleben (Chang et al., 2003).

In Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass Versuchstiere, in denen eine Arthritis induziert wurde, signifikant erniedrigte Ghrelin-Konzentrationen im Serum haben. Dies trifft auch auf PatientInnen mit RA zu (Otero et al., 2004). Dies legt nahe, dass die Ghrelin-Produktion von inflammatorischen Signalen, wie z.B. Leptin oder TNF- α , reguliert wird.

Des Weiteren konnte in Mausmodellen mit induzierter Osteoarthritis gezeigt werden, dass Ghrelin den Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α senkt (Qu et al., 2018). Dies führt wiederum zu einer verminderten Destruktion des Gelenkgewebes. Die o.g. Zytokine vermitteln die Aktivierung von Metalloproteinkinasen, welche zu einer Destruktion des Gelenkgewebes führen.

Ferner wurde festgestellt, dass Ghrelin bzw. dessen Analogon GHRP-2 in Mausmodellen mit induzierter Arthritis die Lipopolysaccharid-vermittelte Freisetzung von IL-6 vermindert (Granado et al., 2005).

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Ghrelin-Systems auf die Zytokinproduktion in Fibroblasten von PatientInnen mit RA zu untersuchen. Des Weiteren wurde der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche der Fibroblasten von RA-PatientInnen untersucht, um den Regulationsmechanismus der Zellen auf entzündliche Prozesse genauer zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte-Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer bzw. Bezeichnung
Inkubator /Brutschrank)	Binder	9140-0132
MACS-Quant® Analyzer Flow Cytometer	Miltenyi Biotec	130-096-343
Gefrierschrank	Liebherr	LGPv 6520 Index 41C/001
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Rotina 420R
LSE Microplate Shaker	Corning	6781-4
Microplate Reader	BioRad	iMark
Mikroskop	Zeiss	Axio Vert. 1
Minizentrifuge	NIPPON Genetics	NG002B
Pipetten 0,1-2,5 µl 0,5-10 µl 10-100 µl 200-1000µl	Eppendorf	
Sterilbank	Kendro Laboratory Products	HS 18
Tecan Reader	Tecan	Inifinite M200Pro
Tischzentrifuge	VWR	521-3601
Vornado Mini Vortexer	Benchmark	BV 101-B
Zählkammer	BioRad	1450016

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer bzw. Bezeichnung
Eppendorf-Tubes 1,5ml 2 ml	VWR	211-2164 211-2165
Zellkulturschale 145/20mm	Greiner	639160
Cell Culture Microplate, 96 Well, F-Bottom, (Chimney- Well), White	Greiner	655088
Cell Culture Microplate, 96 Well, F-Bottom, (Chimney- Well), Black	Greiner	655090
Zählkammern für Cellcounter TC20	BioRad	1450016
96-Well Platte U-Bottom	Greiner	650185
96-Well Platte F-Bottom	ThermoScience	
Zellkulturplatte, 6-Well, transparent	Greiner	657160
Adhesive Film for Microplates	VWR	391-1250
50 ml Tubes	Greiner	210261
15 ml Tubes	Greiner	188271
Stepper-Aufsatz Combitips Advanced 5 ml 0.1 ml	Eppendorf	0030089456 0030089766
Bacillol AF Tissues Bode	Bode	9813112
Pasteurpipette	Brand	7477 20
Glaspipette 5 ml 10 ml 25 ml	Corning	4487 4488 4489

Parafilm	Witeg	PM996
----------	-------	-------

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer bzw. Bezeichnung
Trypsin-EDTA Solution	Sigma	59418C
Accutase	Life- Technologies/Thermo EBP	A11105-01
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega	G8081
PBS 10x	VWR	J75889.K2
PBS 1x	Sigma	D8537
RPMI	Sigma	R7509 – 6x500ml
FBS	Gibco	10500-064
Sodium pyruvate solution	Sigma-Aldrich	S8636
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma	P4333-100ML
EGF	Sigma-Aldrich	E9644
FGF	Peprtech	100-18C
Hepes-Puffer	Sigma-Aldrich	H0887-100ml
Glutamax	Thermo Fisher	25050-038
MACSQuant® Running Buffer	Miltenyi Biotec	130-092-747
MACSQuant® Calibration Beads	Miltenyi Biotec	130-098-462
MACSQuant® Washing + Storage	Miltenyi Biotec	130-092-801
PBS Casein ELISA Reagent	Abcam	Ab171532

1-Step™ Ultra TMB-Elisa Substrat Solution	Thermo Fisher™	34029
Tween 20	Sigma	P9416
Red Blood Cell Lysis Solution	Miltenyi Biotec	130-094-183

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 4: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer bzw. Bezeichnung
MK 0677	Tocris	5272
PF 04628935	Tocris	6347
YIL 781 hydrochloride	Tocris	3959
TNF- α Recombinant Human	Peprtech	300-01A
IFN- γ	Peprtech	300-02
Hydrocortison	Sigma	H4001
IL-1-beta Recombinant Human	Peprtech	200-01B
BAY 876 (GLUT1 Inhibitor)	Tocris	6199
Insulin solution human	Sigma-Aldrich	I9278-5ML

2.1.5 Rezeptor-Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 5: Rezeptor-Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer bzw. Bezeichnung
Human GHSR Alexa Fluor 647-conjugated Antibody	R&D Systems®	FAB370R-100UG

Mouse IgG1 Alexa Fluor 647-conjugated Antibody	R&D Systems®	IC002R
Human GLUT1 PE- conjugated Antibody	R&D Systems®	FAB1418P
Human GLUT4 Alexa Fluor 405-conjugated Antibody	R&D Systems®	FAB86541V-100UG

2.1.6 ELISA-Kits

Tabelle 5: ELISA-Kits

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer bzw. Bezeichnung
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems ®	DY206
Human VEGF DuoSet ELISA, 5 Plate	BioTeche	DY293B-05
Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Antibody	R&D Systems ®	AF124

2.1.7 Zusammensetzung der Puffer für Versuche und Zellkulturmedien

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer für ELISA	PBS Tween 20
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	1 Kapsel Carbonat-Bicarbonat-Puffer (Sigma) 100 ml deionisiertes Wasser
Blockpuffer	Casein 1:5 Deionisiertes Wasser

Medium zur Zellentnahme	RPMI 1640 25mM Hepespuffer 5% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 30µM Mercaptoethanol 0,57 mM absorbic acid
Zellkulturmedium 10%	500ml RPMI 10% FCS (50ml) 12,5 ml Hepespuffer 5 ml Glutamax 5 ml Natrium-Pyruvat 5 ml Penicillin-Streptomycinlösung 5 µl EGF (1ng/ml) 5µl FGF (1ng/ml)
Zellkulturmedium 2%	500ml RPMI 2% FCS (10ml) 12,5 ml Hepespuffer 5 ml Glutamax 5 ml Natrium-Pyruvat 5 ml Penicillin-Streptomycinlösung 5 µl EGF (Endkonzentration 1ng/ml) 5µl FGF (Endkonzentration 1ng/ml)
RB-Puffer für Durchflusszytometrie	PBS 1% BSA

2.2 Methoden

2.2.1 Probenentnahme und Gewinnung synovialer Fibroblasten

Die für die Versuche verwendete Fibroblasten stammten von RA-PatientInnen, welche eine elektive Kniegelenkpunktion erhielten. Die PatientInnen wurden vor Entnahme der Probe über das Forschungsvorhaben aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Das Forschungsvorhaben wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer 2018-87-KfogU).

Bei dem Eingriff wurde nach dem Eröffnen der Kniegelenkshöhle Synovialgewebe entnommen. Das Synovialgewebe wurde gesäubert und in einem Nährmedium gewaschen (Zusammensetzung s. Materialien). Daraufhin wurde das Synovialgewebe zerkleinert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C mit dem Enzym Liberase inkubiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde gefiltert (79µm) und für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Zu dem Zellpellet wurde dann für 5 Minuten ein Erythrozyten-Lyse-Puffer (Miltenyi Biotec) zugegeben. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten. Das Zellpellet wurde dann in RPMI-1640 mit 10% FCS resuspendiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden die RASF gewaschen und neues Medium hinzugegeben, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen.

2.2.2 Zellkultur

Die RASF wurden in einer Zellkulturschale mit 145mm Durchmesser in Nährmedium (Zusammensetzung s. Materialien) angezüchtet. Das Wachstum der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die RASF für weitere Versuche genutzt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

2.2.3.1 Funktionsweise

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellpopulationen qualitativ und quantitativ analysiert werden können. Dazu werden die Zellen einzeln durch eine Messkammer geleitet und mit einem Laser bestrahlt. Durch das spezifische Streuungsmuster dieser Laserstrahlen können die Zellen kategorisiert werden. Zudem lassen sich mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper Strukturen auf der Zelloberfläche sowie intrazelluläre Proteine nachweisen.

In den folgenden Versuchsreihen wurde die Expression des GHS-R sowie die Expression der Glukose-Transporter GLUT 1 und GLUT 4 unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

2.2.3.2 GHS-R-Expression

In dieser Versuchsreihe wurde die Expression des GHS-R unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dazu wurden RASF trypsiniert und mit 150.000 Zellen pro

Well (50.000 Zellen/ml) in zwei 6-Well-Platten ausgesät. Danach wurden RASF für 1-5 Tage im Brutschrank bei 37°C angezüchtet, bis der Zellrasen zu 80-90% konfluent war. Die Dichte des Zellrasens wurde regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft. Sobald die gewünschte Dichte erreicht war, wurden die Zellen stimuliert. Pro Platte gab es eine Negativkontrolle (Zugabe von Nährmedium). Die restlichen fünf Wells wurden wie folgt stimuliert:

1. TNF- α (10ng/ml)
2. IFN- γ (10ng/ml)
3. TNF- α + IFN- γ (10ng/ml)
4. Cortisol (1 μ M)
5. IL-1-beta (1ng/ml)

Die Inkubation erfolgte für 72h, wobei eine Platte unter hypoxischen und eine Platte unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurde. Nach der erfolgten Behandlung wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des GHS-R bestimmt. Dazu wurde der Human GHS-R Alexa Fluor 647-conjugated Antibody (R&D Systems®) genutzt. Für jede Patientenprobe wurde außerdem eine Isotyp-Kontrolle mit einem Mouse IgG1 Alexa-Fluor 647-conjugated Antibody (R&D Systems®) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Negativkontrolle, die das Ausmaß an Hintergrundsignalen des Primärantikörpers aufzeigt.

Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden das Nährmedium in den Wells zunächst abgesaugt und die RASF mit 500 μ l Accutase pro Well behandelt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 37°C, bis sich die Zellen gelöst hatten. Daraufhin wurden 500 μ l PBS pro Well hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in 1,5ml Tubes transferiert und für 10 Minuten bei 350g zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und das Zellpellet in 150 μ l RB-Puffer resuspendiert. Die Zusammensetzung des RB-Puffers ist in der Materialliste vermerkt.

Die resuspendierten Zellen wurden in eine 96-Well U-Bottom Platte transferiert und dann für 10 Minuten zentrifugiert, bis sich an dem Boden der Platte ein Zellpellet gebildet hatte. Die Überstände des Mediums wurden daraufhin abgekippt und je 50 μ l der hGHSR-Antikörperlösung (1:20 Verdünnung des Human GHSR Alexa Fluor 647-conjugated

Antibody in RB-Puffer) bzw. der Isotypkontrolle, (1:4 Verdünnung des Mouse IgG1 Alexa Fluor 647-conjugated Antibody in RB-Puffer) auf die Zellen gegeben. Diese Antikörper inkubierten dann für 30 Minuten an einem lichtgeschützten Ort.

Nach der Inkubationszeit wurden die Wells mit 150 µl RB-Puffer aufgefüllt, sodass pro Well ein Gesamtvolumen von 200 µl vorlag. Mittels des MACS-Quant-Analyzer® wurde dann die Expression des Ghrelin-Rezeptors gemessen. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit FlowLogic™.

2.2.3.3 GLUT1- und GLUT4-Expression

In dieser Versuchsreihe wurde die Expression der Glukose-Transporter (GLUT) GLUT1 und GLUT4 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dazu wurden RASF wie im vorangegangenen Teil zur Untersuchung der GHS-R-Expression in 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert, bis der Zellrasen zu 80-90% konfluent war. Das Wachstum wurde im Lichtmikroskop regelmäßig überprüft. Die RASF wurden anschließend mit folgenden Substanzen behandelt:

1. PF04 (10^{-6} M) für 24h
2. MK0677 (10^{-6} M) für 24h
3. PF04 + MK0677 (10^{-6} M) für 24h
4. YIL-781 von (10^{-6} M) für 24h
5. Kontrolle
6. PF04 (10^{-6} M) für 1h
7. MK0677 (10^{-6} M) für 1h
8. PF04 + MK0677 (10^{-6} M) für 1h
9. YIL-781 (10^{-6} M) für 1h

Nach der Behandlung wurde für 30 Minuten eine Insulinlösung (Konz. 20µg/ml) in die Wells gegeben. Das Insulin bewirkt eine Translokation des GLUT4 an die Zelloberfläche. Nach der halbstündigen Inkubation mit Insulin werden die RASF wie im vorangegangenen Teil zur GHS-R-Expression beschrieben gelöst, resuspendiert und in eine 96-Well U-Bottom Platte transferiert.

Anschließend erfolgte eine Durchflusszytometrie mit dem Human GLUT1 PE-conjugated Antibody (R&D Systems©) sowie dem Human GLUT4-Alexa Fluor 405-conjugated Antibody (R&D Systems©). Um die spektrale Überlappung der

Emissionsspektren auszurechnen, wurde eine Kompensation durchgeführt, sodass die Antikörper zeitgleich verwendet werden konnten. Pro Well wurden 50µl RB-Pufferlösung gegeben, in denen jeweils 2,5µl des GLUT1-Antikörpers (Konz. 25µg/ml) und 10µl des GLUT4-Antikörpers (Konz. 0,2mg/ml) gelöst waren. Es erfolgte eine Inkubation über 30 Minuten in einer lichtgeschützten Umgebung. Danach wurden die Wells mit je 150µl RB-Puffer aufgefüllt, sodass pro Well ein Gesamtvolumen von 200µl vorlag. Mittels des MACS-Quant-Analyzer® wurde dann die Expression des GLUT1 und GLUT4 auf der Zelloberfläche der RASF gemessen. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit FlowLogic™.

2.2.4 Zellstimulation

Die Stimulation der RASF erfolgte nach drei verschiedenen Schemata und wurde in 96-Well-Platten mit 5000 Zellen pro Well (25.000 Zellen/ml) durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Zellmedium aus der Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls abgesaugt, dann wurde 5ml Trypsin-EDTA-Lösung in die Zellkulturschale hinzugegeben und die Schale für 5 Minuten in den Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen gelöst hatten. Anschließend wurde 5ml des Nährmediums hinzugegeben, um die Trypsinierung zu stoppen. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Tube gegeben und bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Gemisch aus Trypsin-EDTA-Lösung und Nährmedium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Nährmedium resuspendiert. Mittels eines Zellzählautomaten wurde die Zellanzahl in der Zellsuspension bestimmt und auf die gewünschte Konzentration von 25.000 Zellen/ml in Nährmedium verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte Zelllösung in die 96-Well Platte ausgesäht. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37°C für 1-3 Tage kultiviert, bis ein Zellrasen entstand. Daraufhin folgte die Zellstimulation.

2.2.4.1 Eingesetzte Liganden

Zur Untersuchung der Wirkung des GHS-R auf die Zytokinproduktion in RASF wurden drei Liganden des GHS-R untersucht.

MK0677, ein oral verfügbarer, non-peptiderger Agonist des GHS-R führt bei Ratten durch Bindung an den GHS-R zu einer erhöhten Sekretion von Growth Hormon aus der Hypophyse. (Patchett et al., 1995).

Der zweite untersuchte Ligand war der inverse GHS-R-Agonist PF04. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass PF04 die Blut-Hirn-Schranke von Ratten überwinden kann und zentral am GHS-R wirkt (Kung et al., 2012)

Der dritte untersuchte Ligand YIL-781 wurde ursprünglich als kompetitiver Antagonist des GHS-R beschrieben, allerdings zeigten sich in jüngeren Ergebnissen, dass es sich bei diesem Liganden um einen *biased agonist* handelt (Buckinx et al., 2019; Mende et al., 2018). Dieses Phänomen ist auch als funktionelle Selektivität bekannt und beschreibt, dass ein Ligand nach Bindung an einem Rezeptor bevorzugt einen von mehreren möglichen Signalwegen aktiviert (Urban et al., 2007). Bei YIL-781 zeigte sich, dass dieses bevorzugt den Galphaq/11 und Galpha12 aktiviert und antagonistisch auf andere Signalwege wirkt, welche durch den GHS-R aktiviert werden (Mende et al., 2018) YIL-781 ist bisher vor allem in der Forschung zur Behandlung von Adipositas interessant, da es die bekanntermaßen orexigene und antiinsulinerge Wirkung von Ghrelin antagonisiert. Dies wurde bisher in Rattenmodellen erfolgreich untersucht, bei der unter Anwendung von YIL-781 eine erhöhte Glukose-abhängige Insulinfreisetzung und eine Reduktion der Körperfettmasse erzielt werden konnte (Esler et al., 2007, p.).

Diese drei Liganden wurden in absteigenden Konzentrationen von 10^{-5}M bis 10^{-9}M mit RASF inkubiert. Für die statistische Auswertung wurde die Stimulation in Triplikaten durchgeführt.

2.2.4.2 Schema 1

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Auswirkung von GHS-R-Liganden auf die Zytokinproduktion von RASF nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen sowie Hypoxie untersucht. Dazu wurden für das erste Schema pro ProbandIn wie in Abschnitt 2.2.4. beschrieben vier (je 2 unter Normoxie und Hypoxie) 96-Well-Platten über 72h mit RASF kultiviert. Danach erfolgte die Vorinkubation mit den GHS-R-Liganden analog zu Abschnitt 2.2.4.1. Nach der fünfstündigen Inkubationszeit erfolgte die Stimulation der RASF entweder mit $\text{TNF-}\alpha$ (10ng/ml) oder $\text{IFN-}\gamma$ (10ng/ml). Nach 24h wurden die Zellkulturüberstände der mit $\text{TNF-}\alpha$ stimulierten Platten abgenommen, nach 72h die der mit $\text{IFN-}\gamma$ stimulierten Platten. Die Überstände wurden in eine 96-Well-Platte transferiert und bei -20°C eingefroren oder es erfolgte direkt die Bestimmung der Konzentration von IL-6, VEGF und BAFF mittels ELISA.

2.2.4.3 Schema 2

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern sich eine Vorstimulation der Zellen mit IFN- γ mit anschließender GHS-R Aktivierung bzw. Inhibition auf die Zytokinproduktion der RASF auswirkt. Dazu wurden RASF wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben in 96-Well-Platten ausgesät und im Brutschrank 1-3 Tage unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel auf 2%-Nährmedium (Zusammensetzung s. Materialteil). Pro Well wurde IFN- γ mit einer Endkonzentration von 10ng/ml hinzugegeben. Die Platten wurden dann unter Hypoxie für 72h inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Stimulation mit MK0677, PF04 und YIL-781 analog zu Abschnitt 2.2.4.1. Nach einer fünfstündigen Inkubationszeit wurden die RASF mit TNF- α stimuliert (10ng/ml). Nach einer 72-stündigen Stimulationszeit wurden die Überstände abgenommen und in eine 96-Well-Platte transferiert. Diese wurden bei -20°C eingefroren oder es erfolgte direkt die Bestimmung der Konzentration von IL-6 oder VEGF mittels ELISA.

2.2.4.4 Schema 3

Im dritten Schema wurden Ergebnisse aus den Versuchen zur GHS-R-Expression in den Versuchsaufbau integriert. Dort zeigte sich, dass RASF nach einer Stimulation mit TNF- α und IFN- γ eine erhöhte Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche aufweisen. Dieser Effekt wurde nun zu Nutze gemacht, da durch die erhöhte Anzahl von GHS-R auf den RASF die Wirkung der GHS-R-Liganden auf die Zytokinproduktion sichtbar gemacht werden sollte. Dafür wurden die RASF wie unter 2.2.4. beschrieben in 96-Well-Platten ausgesät und 1-3 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die 72-stündige Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ (beides in einer Endkonzentration von 10ng/ml). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und es wurden analog zu Abschnitt 2.2.4.1. die GHS-R-Liganden MK0677, PF04 und YIL-781 in absteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Überstände abgenommen. Anschließend wurden diese bei -20°C eingefroren oder es erfolgte direkt die Bestimmung der Konzentration von IL-6 oder VEGF mittels ELISA.

2.2.5 ELISA

2.2.5.1 Funktionsweise

Mittels ELISA wurde die Konzentrationen von IL-6, BAFF und VEGF in den Überständen der Zellkultur bestimmt. Das ELISA-Verfahren ist ein Immunassay-Verfahren, bei dem mittels einer enzymatischen Farbreaktion spezifische Antigene nachgewiesen werden können. In dieser Studie wurde ein sog. Sandwich-ELISA verwendet. Bei diesem Verfahren wird die Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt, um die Konzentration eines Antigens zu bestimmen. Dazu werden Mikrotiterplatten mit einem Capture-Antikörper beschichtet. An diesen bindet nach Zugabe der Probe das nachzuweisende Antigen. Anschließend werden die Platten gewaschen, um die ungebundenen Antigene zu entfernen. Daraufhin wird ein Detektionsantikörper auf die Platten gegeben, der an den Capture-Antikörper-Antigen-Komplex bindet. Der Detektionsantikörper ist biotinyliert und enthält damit eine Bindungsstelle für das Enzym Streptavidin, welches die Farbreaktion auslöst. Diese lässt sich fotometrisch messen und quantifizieren, indem sie mit einer standardisierten Verdünnungsreihe (s. Abbildung 1) abgeglichen wird.

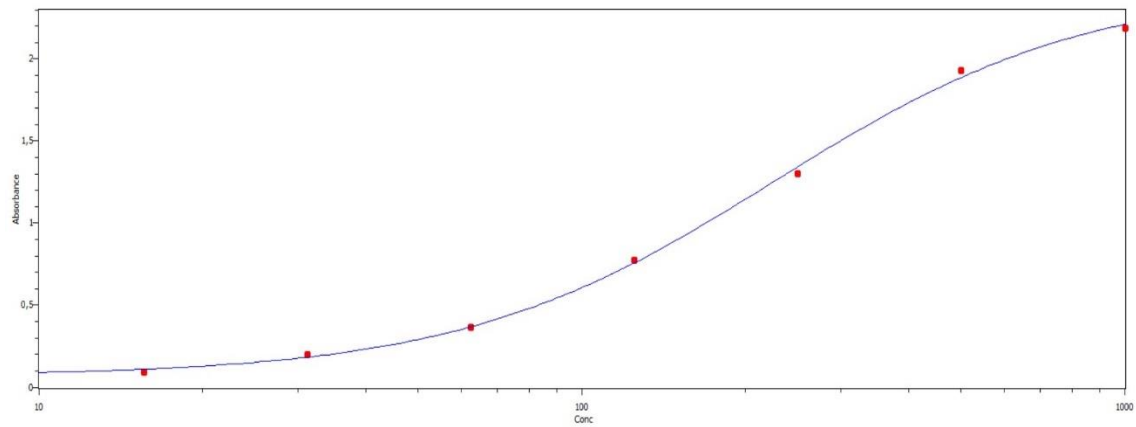


Abbildung 1: Standardkurve für IL-6 ELISA.

Die Standardreihen wurden aus einer Kontrolllösung mit bekannter Konzentration des nachzuweisenden Antigens hergestellt. Auf der X-Achse ist die Konzentration aufgetragen, auf der Y-Achse die entsprechende Wellenlänge der Probe.

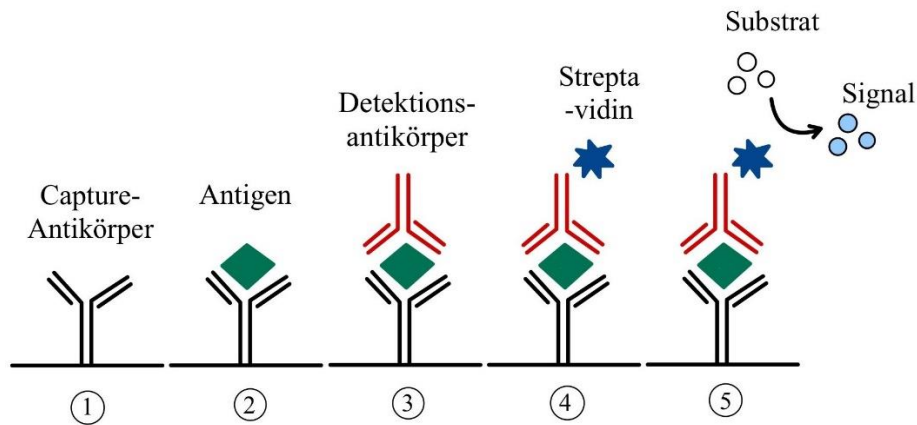


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.

Die Mikrotitrierplatten werden mit einem Capture-Antikörper gecoatet (1). Diese enthalten eine spezifische Bindungsstelle für das nachzuweisende Antigen (2). Ein sekundärer Detektionsantikörper bindet dann an das Antigen (3). Dieser Detektionsantikörper enthält eine Bindungsstelle für Streptavidin (5). Bei Zugabe des Reaktionssubstrates katalysiert dieses Enzym eine Farbreaktion (5). Dieses Farbsignal kann dann im Anschluss fotometrisch gemessen und quantifiziert werden.

2.2.5.2 IL-6 ELISA (kommerziell)

Zur Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde das Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (Duo Set, BD Biosciences, San Jose, USA) genutzt. Die Arbeitsschritte erfolgten laut der Herstellerangaben.

2.2.5.3 VEGF-ELISA (kommerziell)

Die VEGF-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurden mittels des Human VEGF DuoSet ELISA (R&D Systems®) bestimmt. Die Arbeitsschritte erfolgten laut der Herstellerangaben.

2.2.5.4 BAFF-ELISA (Laborinternes Protokoll)

Zur Bestimmung der BAFF-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde ein selbstgecoateter Sandwich-ELISA benutzt. Dazu wurden Mikrotitrierplatten mit 100µl/Well Belimumab (Konz. 1µg/ml) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Belimumab ist ein Antikörper, welcher das humane BAFF bindet. Nach dem *Coating* wurde 250µl/Well eines Blockpuffers (Zusammensetzung s. Materialteil) auf die Platten gegeben und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die geblockten Platten wurden anschließend mit einem Waschpuffer gewaschen (Zusammensetzung s. Materialteil). Danach wurden 50µl/Well der Zellkulturüberstände auf die Platten

gegeben. Des Weiteren wurde eine standardisierte Konzentrationsreihe (human BAFF/BLYS standard, R&D Systems®, Minneapolis, USA) hergestellt und auf die Platte gegeben. Es erfolgte eine Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Platten wurden daraufhin vier Mal gewaschen und mit 100µl/Well des Detektionsantikörper (50ng/ml, anti-hBAFF/BLYS detection antibody, R&D Systems®, Minneapolis, USA) für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurden die Platten erneut vier Mal gewaschen und das 100µl/Well der Streptavidin-Lösung (Konz. 50ng/ml) dazugegeben. Nach einer zwanzigminütigen Inkubationszeit wurden die Platten vier Mal gewaschen und die 100µl/Well der Entwicklerlösung Ultra TMB (1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) auf die Platten gegeben. Für die Farbreaktion wurden die Platten an einem lichtgeschützten Ort gelagert. Die Farbreaktion wurde dann mit 100µl 1M Schwefelsäure gestoppt. Die Platten wurden in einem Microplate-Reader ausgelesen, wobei die Wellenlänge für die Exzitation 450nm und die Referenzwellenlänge 595nm betrug.

2.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche sowie zur Erstellung der Grafiken wurde die Software IBM® SPSS® Statistics 27 genutzt. Die Stimulation der Zellen für die ELISA-Versuchsreihen erfolgte in Triplikaten. Der Stichprobenumfang liegt bei $n = 5$ pro Versuchsreihe. Zur Auswertung der Zytokinproduktion wurde als nicht-parametrischer Primärtest der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Als post-hoc Analyse wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet, wobei die gemessene Zytokinkonzentrationen in einem multivariaten linearen Modell mit der Negativkontrolle verglichen wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ festgelegt. Ergebnisse ab einem p -Wert von $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Zur Auswertung der GHS-R- und GLUT1- bzw. GLUT4-Expression wurde als deskriptive Statistik mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend erfolgte die Prüfstatistik mittels einer ANOVA. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ festgelegt. Ergebnisse ab einem p -Wert von $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als vertikale Box- Plots. Die Box entspricht dabei dem Interquartilsabstand der oberen und unteren Quartils, der Strich innerhalb der Box steht für den Median. Die Antennen stellen das 10. Bzw. das 90. Perzentil dar.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse Rezeptorexpression

3.1.1 GHS-R-Expression

In diesen Versuchen wurde der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf die Expression des GHS-R in RASF untersucht. Dazu wurden RASF mit Zytokinen stimuliert, welche wesentlich an den zellulären Regulationsmechanismen der Entzündungskaskade bei RA beteiligt sind. Zum anderen wurde Kortisol als wichtiges antiinflammatorisches Steroid eingesetzt, da bereits ein Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von GHS-R nachgewiesen wurde (Kaji et al., 2001).

Die Stimulation der RASF mit Cortisol führte sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen nicht zu einer signifikant veränderten Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche der RASF. Dies trifft auch auf die alleinige Stimulation der RASF mit TNF- α oder IFN- γ zu.

Die RASF, welche mit einer Kombination aus TNF- α und IFN- γ stimuliert wurden, zeigten unter normoxischen Bedingungen eine signifikant erhöhte Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche ($p < 0,001$), ebenso die RASF, welche mit IL-1 β stimuliert wurden ($p = 0,038$) (Abb.3).

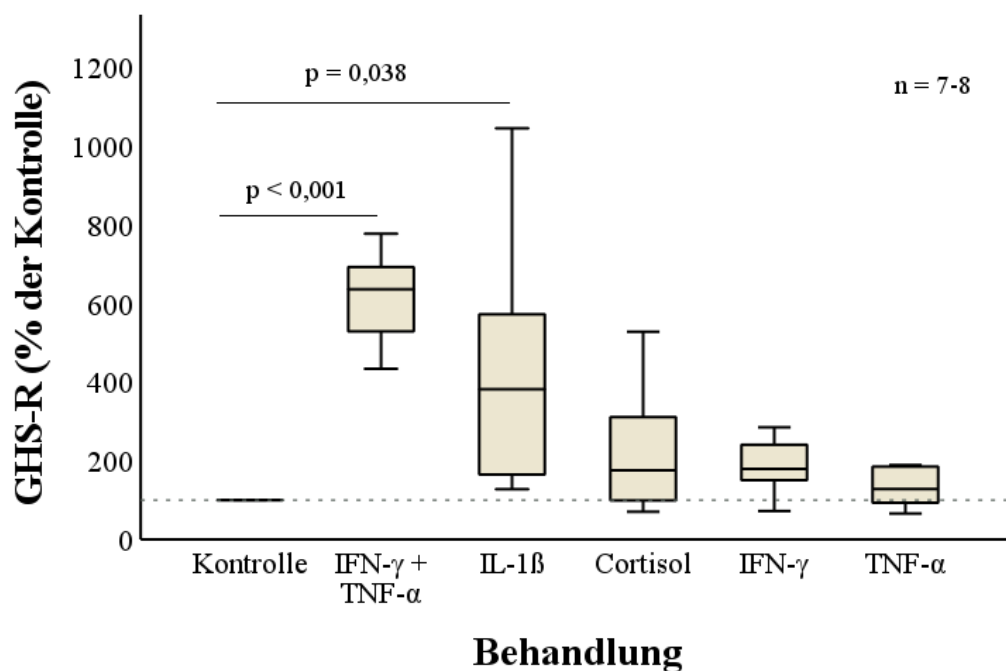


Abbildung 3: GHS-R-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Entzündungsmediatoren unter normoxischen Bedingungen

RASF wurden über 72h mit TNF (10ng/ml), IFN- γ (10ng/ml), IL-1 β (1ng/ml) oder Cortisol (1 μ M) behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die GHS-R-Expression der Kontrolle. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Analyse der Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Dunnett's post-hoc-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression des GHS-R bei den RASF, welche mit einer Kombination aus TNF- α und IFN- γ stimuliert wurden ($p=0,009$) (Abb. 4).

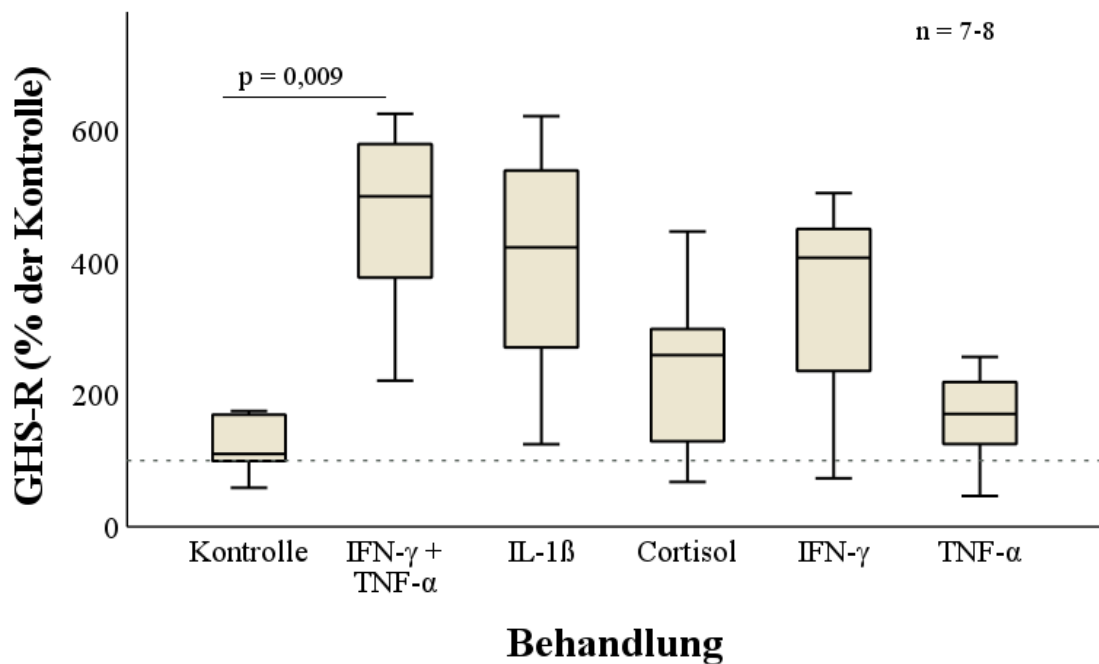


Abbildung 4: GHS-R-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Entzündungsmediatoren unter hypoxischen Bedingungen

RASF wurden über 72h mit TNF (10ng/ml), IFN- γ (10ng/ml), IL-1 β (1ng/ml) oder Cortisol (1 μ M) behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die GHS-R-Expression der Kontrolle. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Analyse der Mittelwertvergleiche erfolgte mittels ANOVA mit Dunnett's post-hoc-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.1.2 GLUT1 und GLUT4 Expression

Als orexigen wirkendes Verdauungshormon ist die Hauptfunktion von Ghrelin die Aufrechterhaltung einer adäquaten Versorgung mit Glukose. Dies trifft nicht nur auf den systemischen Glukosehaushalt zu, sondern auch auf den Glukosehaushalt auf zellulärer Ebene. Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen Ghrelin produzieren und dieses im Sinne eines auto- bzw. parakrinen Regulationsmechanismus die Translokation von GLUT1 in

den Tumorzellen fördert (Kraus et al., 2016). Daher wurde in dieser Studie untersucht, ob die GHS-R-Liganden auch einen Einfluss auf die GLUT1- und GLUT4-Expression bzw. Translokation in RASF haben.

Die Wirkung der GHS-R-Liganden MK0677, PF04 und YIL781 auf die Oberflächenexpression von GLUT1 und GLUT4 wurde nach einstündiger bzw. 24-stündiger Inkubation untersucht. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde Insulinlösung zu den RASF gegeben, um eine Translokation des GLUT4 an die Zelloberfläche zu induzieren. Die RASF zeigten unter Stimulation mit MK06, PF04 und YIL781 nach einer bzw. 24 Stunden keine veränderte Menge der Glukose-Transporter GLUT1 und GLUT4 auf der Zelloberfläche (Abb. 5-8).

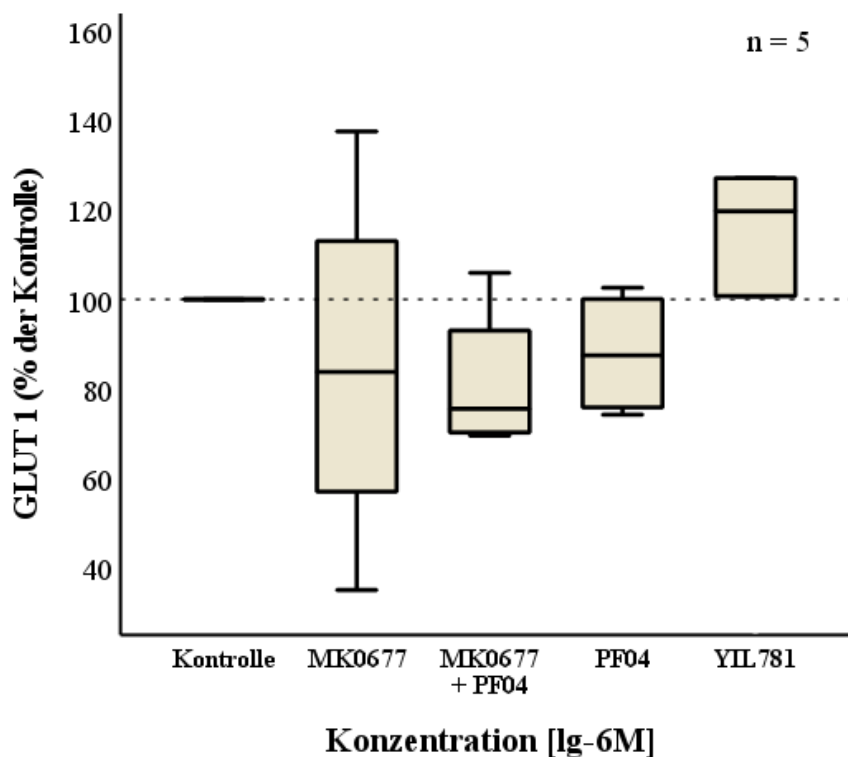


Abbildung 5: GLUT1-Expression in Prozent der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 1h

RASF wurden über 1h mit MK0677, PF04, eine Kombination dieser beiden Liganden und YIL781 in einer Konzentration von 10^{-6} M behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die GLUT1-Expression der Kontrolle. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Mittelwertvergleiche erfolgten mittels ANOVA. Als *post-hoc*-Test wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

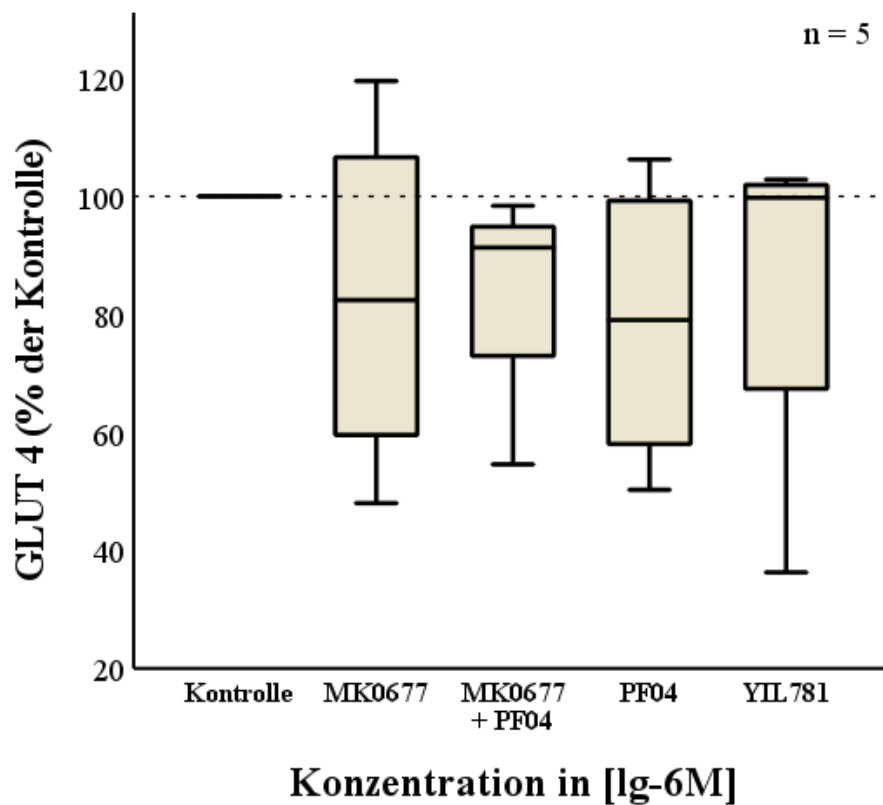


Abbildung 6: GLUT4-Expression in Prozent der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 1h

RASF wurden über 1h mit MK0677, PF04, eine Kombination dieser beiden Liganden und YIL718 in einer Konzentration von 10^{-6} M behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die GLUT4-Expression der Kontrolle. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Mittelwertvergleiche erfolgten mittels ANOVA. Als *post-hoc*-Test wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

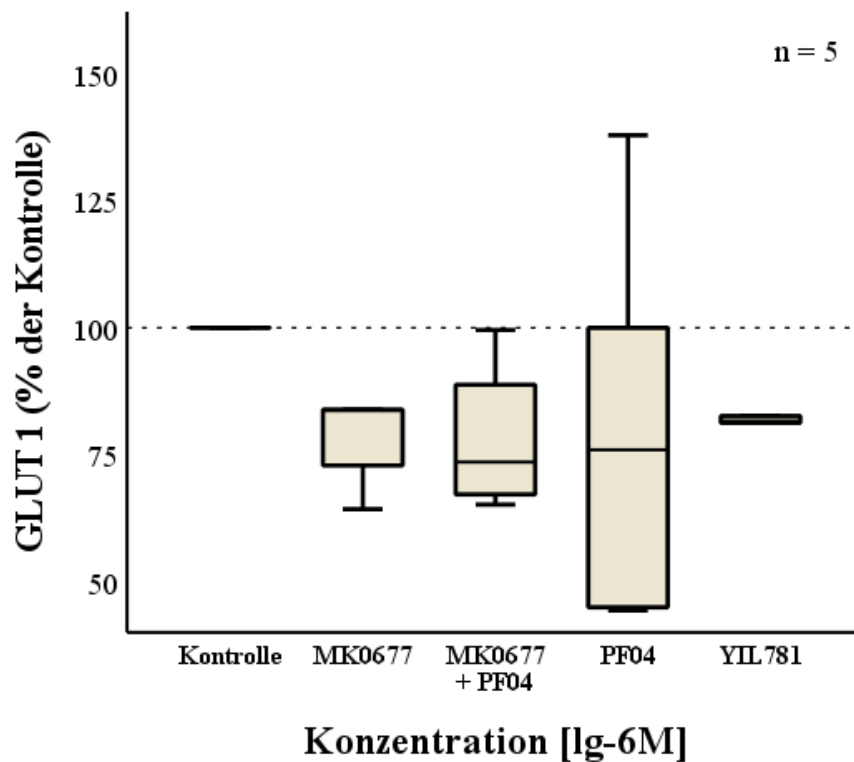


Abbildung 7: GLUT1-Expression in Prozent der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 24h

RASF wurden über 24h mit MK0677, PF04, eine Kombination dieser beiden Liganden und YIL781 in einer Konzentration von 10^{-6} M behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die GLUT1-Expression der Kontrolle. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Mittelwertvergleiche erfolgten mittels ANOVA. Als *post-hoc*-Test wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

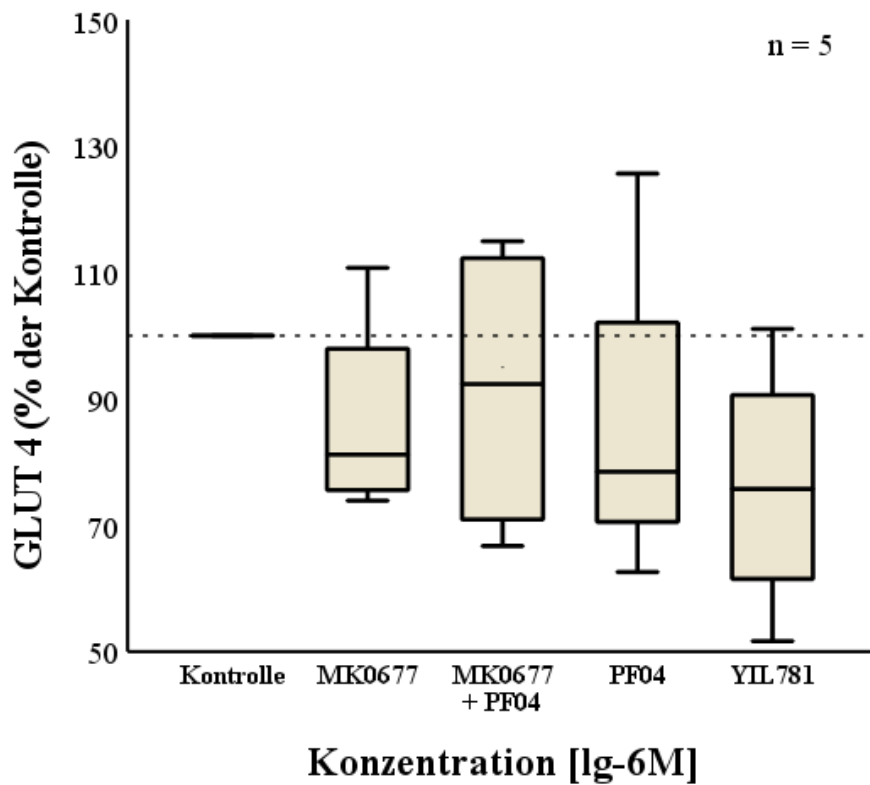


Abbildung 8: GLUT4-Expression in Prozent der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 24h

RASF wurden über 24h mit MK0677, PF04, eine Kombination dieser beiden Liganden und YIL781 in einer Konzentration von 10^{-6} M behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die GLUT4-Expression der Kontrolle. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Mittelwertvergleiche erfolgten mittels ANOVA. Als *post-hoc*-Test wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.2 Ergebnisse Zytokinproduktion

Es ist bekannt, dass Ghrelin neben seiner Funktion als Verdauungshormon auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Dixit et al. untersuchten die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in PBMCs von gesunden männlichen Probanden, welche mit Phytohämagglutinin stimuliert wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass PBMCs, welche mit Ghrelin inkubiert wurden, signifikant geringere Mengen IL-1 β , IL-6 und TNF- α produzierten. (Dixit et al., 2004).

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von GHS-R-Liganden auf die Zytokinproduktion in RASF untersucht, welche mit Entzündungsmediatoren stimuliert wurden. Insbesondere wurde dabei die Produktion von IL-6, VEGF und BAFF in den RASF untersucht.

3.2.1 Ergebnisse ELISA Schema 1

In der ersten Versuchsreihe zur Zytokinproduktion wurden RASF nach fünfstündiger Prä-Inkubation mit MK0677, PF04 oder YIL-781 entweder mit TNF- α oder IFN- γ stimuliert. Dabei konnte keine signifikant veränderte Produktion von IL-6 und VEGF festgestellt werden, weder unter hypoxischen noch unter normoxischen Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

YIL-781 bewirkte nach 5h in der höchsten untersuchten Konzentration von 10^{-5} M eine signifikant verringerte BAFF-Produktion in den RASF, welche mit IFN- γ vorstimuliert wurden (Abb.9-10). Dieser Effekt zeigte sich sowohl unter hypoxischen ($p<0,001$) als auch normoxischen ($p<0,001$) Bedingungen. Dabei war die Mittelwertdifferenz unter Hypoxie größer als unter Normoxie (Abb.9-10).

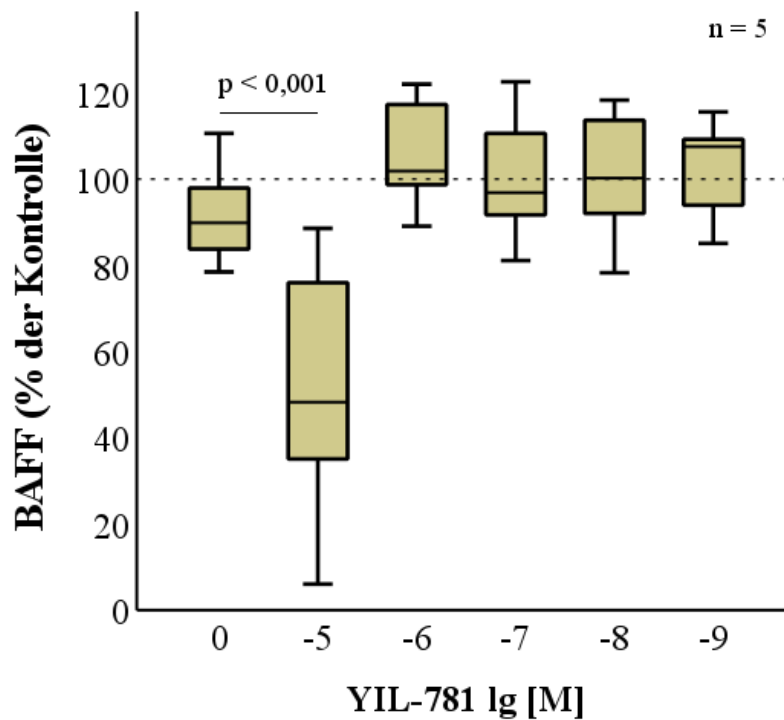


Abbildung 9: BAFF-Produktion nach Vorstimulation der Fibroblasten mit IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit YIL781 unter normoxischen Bedingungen.

RASF wurden unter normoxischen Bedingungen für 5h mit YIL-781 behandelt und anschließend mit IFN- γ (10ng/ml) für 72h stimuliert. Die gestrichelte Linie bei 100% stellt die BAFF-Konzentration der Kontrolle dar ($M=119,89\text{pg/ml}$, $SD=24,12\text{pg/ml}$). Als nicht-parametrischer Primärtest wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für die post-hoc Analyse wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

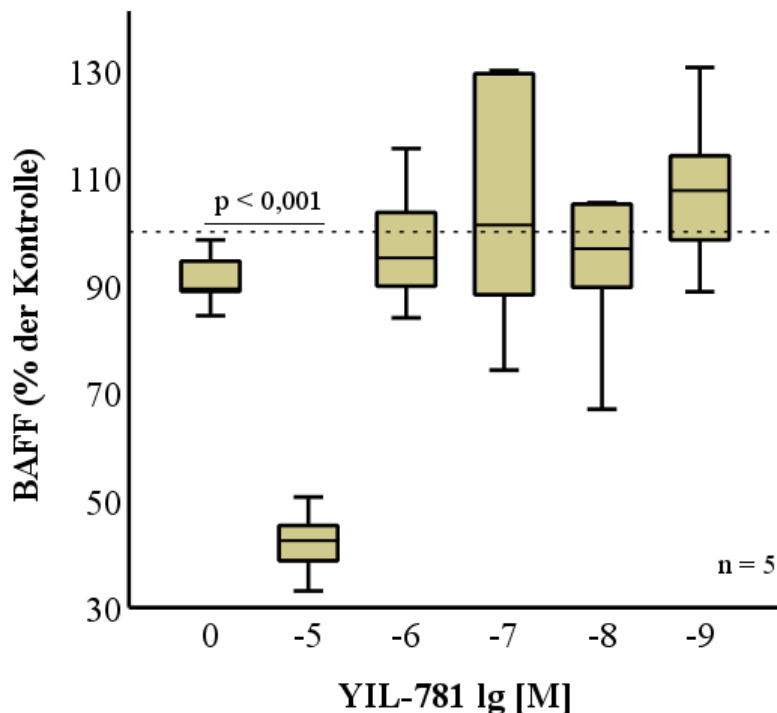


Abbildung 10: BAFF-Produktion nach Vorstimulation der Fibroblasten mit IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit YIL-781 unter hypoxischen Bedingungen

RASF wurden unter hypoxischen Bedingungen für 5h mit YIL-781 behandelt und anschließend mit IFN- γ (10ng/ml) für 72h stimuliert. Die gestrichelte Linie bei 100% stellt die BAFF-Konzentration der Kontrolle dar ($M=103,91\text{pg/ml}$, $SD=43,75\text{pg/ml}$). Als nicht-parametrischer Primärtest wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für die post-hoc Analyse wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.2.2 Ergebnisse ELISA Schema 2

In der zweiten Versuchsreihe zur Zytokinproduktion erfolgte eine Vorstimulation der RASF mit IFN- γ unter hypoxischen Bedingungen und eine anschließende Inkubation mit MK0677, PF04 und YIL-781 für 5h. Nach der Inkubation wurde eine der beiden Gruppen zusätzlich mit TNF- α stimuliert. Nach 72h erfolgte die Quantifizierung der Konzentration von IL-6 und VEGF in den Überständen der Zellkultur mittels ELISA.

Es zeigten sich keine signifikant veränderte Produktion von IL-6, weder bei den mit TNF- α stimulierten Zellen noch bei denen, welche nicht mittels TNF- α stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt).

PF04 bewirkte eine signifikant erhöhte Produktion von VEGF in RASF, welche mit TNF- α stimuliert wurden ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein signifikanter Effekt bei den RASF, welche keine zusätzliche Stimulation mit TNF- α erhielten (Abb.11).

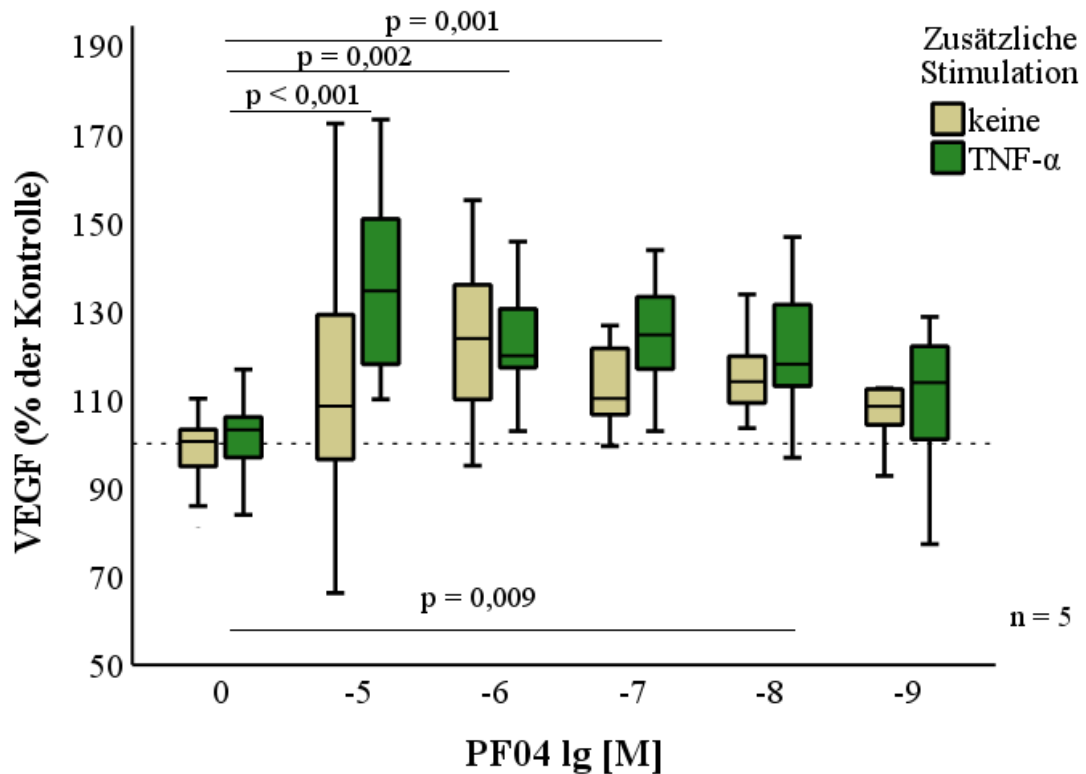


Abbildung 11: VEGF-Produktion nach Vorstimulation der RASF mit IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit PF04

RASF wurden 72h mit IFN- γ inkubiert und anschließend mit PF04 behandelt. Eine Gruppe erhielt zusätzlich eine Stimulation mit TNF- α (grün). Die gestrichelte Linie bei 100% stellt die VEGF-Konzentration der Kontrolle dar (keine zusätzliche Stimulation: $M=1101,61\text{pg/ml}$, $SD=472,31\text{pg/ml}$; zusätzliche Stimulation mit TNF- α : $M=1028,19\text{pg/ml}$, $SD=407,88\text{pg/ml}$). Als nicht-parametrischer Primärtest wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für die post-hoc Analyse wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

YIL-781 bewirkte sowohl in RASF, welche mit TNF- α stimuliert wurden, als auch in RASF ohne zusätzliche Stimulation eine signifikant erhöhte VEGF-Produktion ($p < 0,001$; $p = 0,001$) (Abb.12).

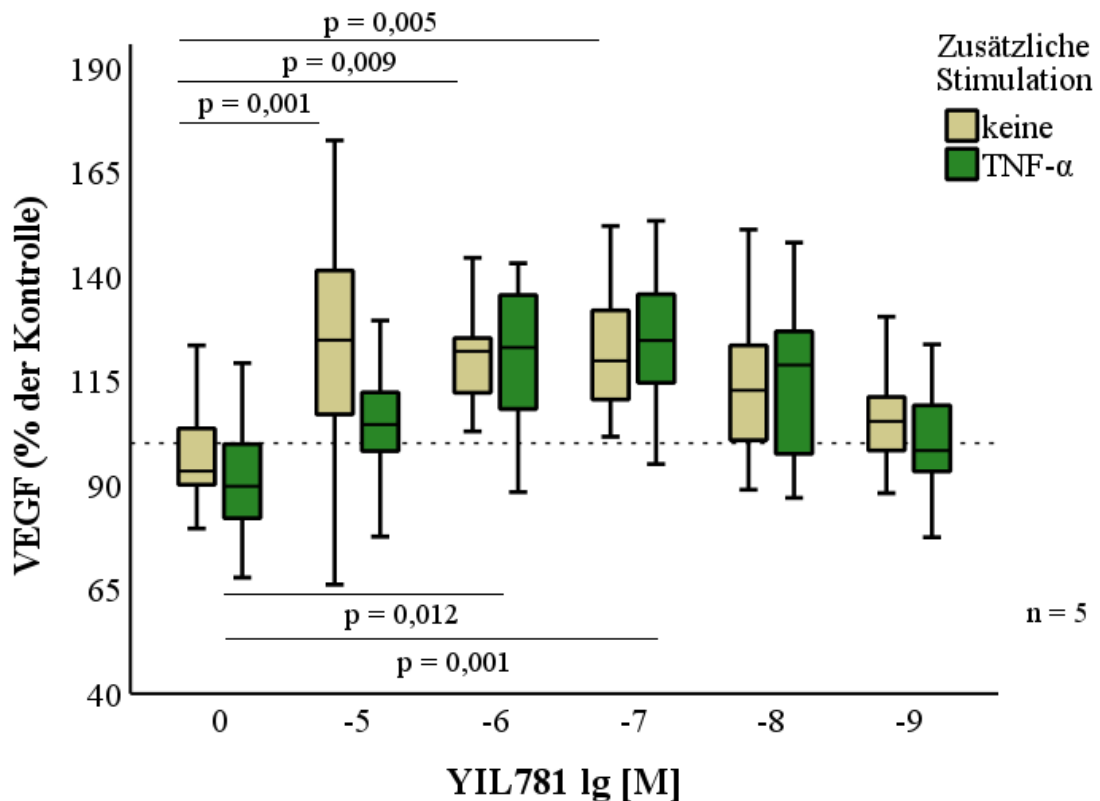


Abbildung 12: VEGF-Produktion nach Vorstimulation der RASF mit IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit YIL781

RASF wurden 72h mit IFN- γ inkubiert und anschließend mit YIL781 behandelt. Eine Gruppe erhielt zusätzlich eine Stimulation mit TNF- α (grün). Die gestrichelte Linie bei 100% stellt die VEGF-Konzentration der Kontrolle dar (keine zusätzliche Stimulation: $M=1106,44\text{pg/ml}$, $SD=470,54\text{pg/ml}$; zusätzliche Stimulation mit TNF- α : $M=935,68\text{pg/ml}$, $SD=426,54\text{pg/ml}$). Als nicht-parametrischer Primärttest wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für die post-hoc Analyse wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.2.3 Ergebnisse ELISA Schema 3

Im dritten Schema wurden Ergebnisse in den Versuchsaufbau implementiert, welche in den Versuchen zur Expression des GHS-R erlangt wurden. Es zeigte sich, dass durch eine Ko-Stimulation der RASF mit TNF- α und IFN- γ die Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche der RASF signifikant ansteigt. Diese Erkenntnis wurde in den Versuchsaufbau eingeführt, indem RASF für 72h mit TNF- α und IFN- γ vorstimuliert wurden.

Es zeigte sich, dass MK0677 ($p < 0,001$), PF04 ($p = 0,014$) und YIL-781 ($p < 0,001$) zu einer signifikant veränderten Produktion von VEGF führten (Abb.13-15).

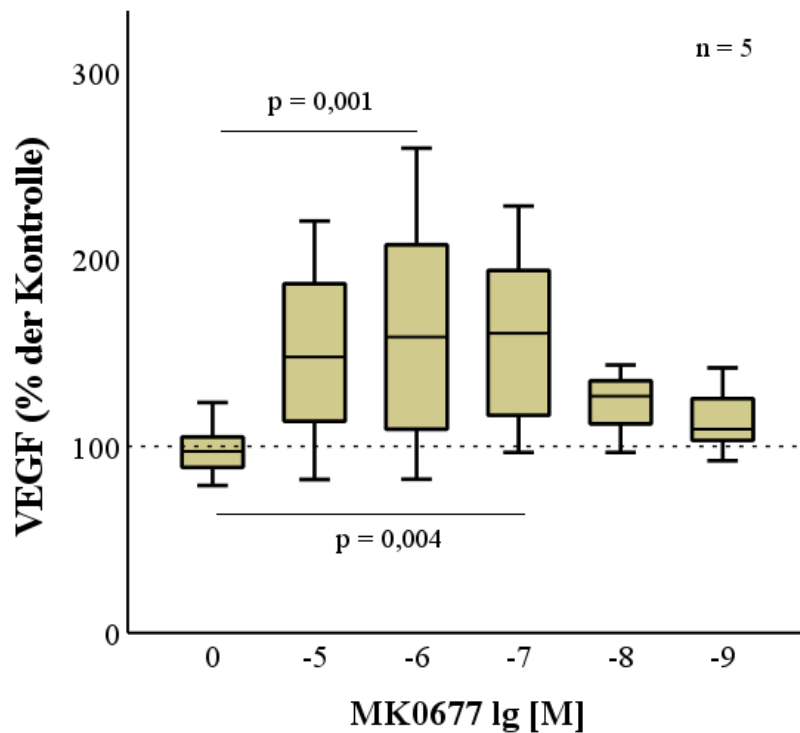


Abbildung 13: VEGF-Produktion nach Vorstimulation der Zellen mit TNF- α und IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit MK0677

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ und wurden anschließend mit MK0677 behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die VEGF-Konzentration der Kontrolle ($M=235,42\text{pg/ml}$, $SD=108,95\text{pg/ml}$). Die Signifikanz wurde mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie der Bonferri-Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

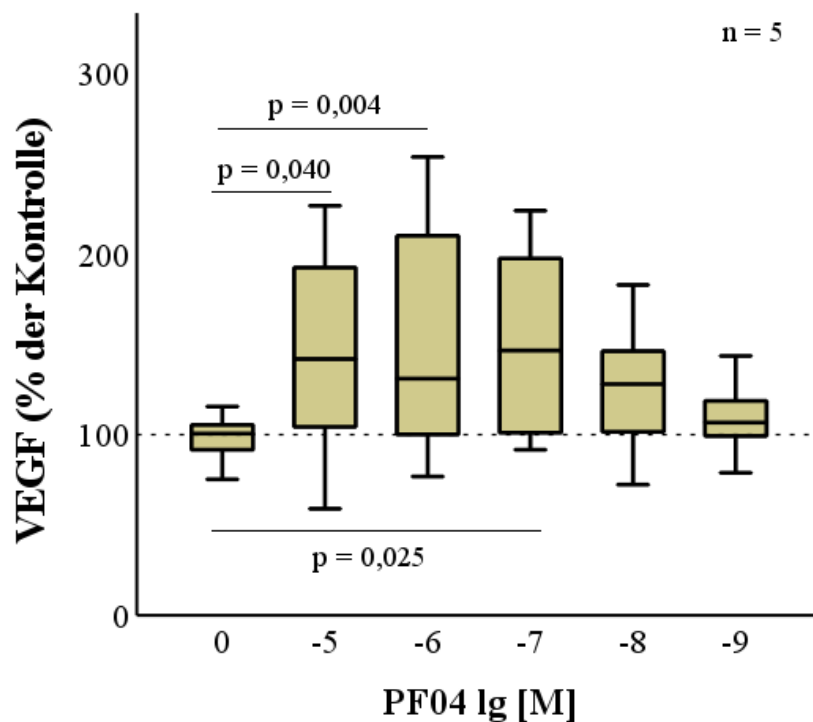


Abbildung 14: VEGF-Produktion nach Vorstimulation der Zellen mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ sowie anschließende Inkubation mit PF04

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ und wurden anschließend mit PF04 behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die VEGF-Konzentration der Kontrolle ($M=247,35\text{pg/ml}$, $SD=112,97\text{pg/ml}$). Die Signifikanz wurde mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie der Bonferri-Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

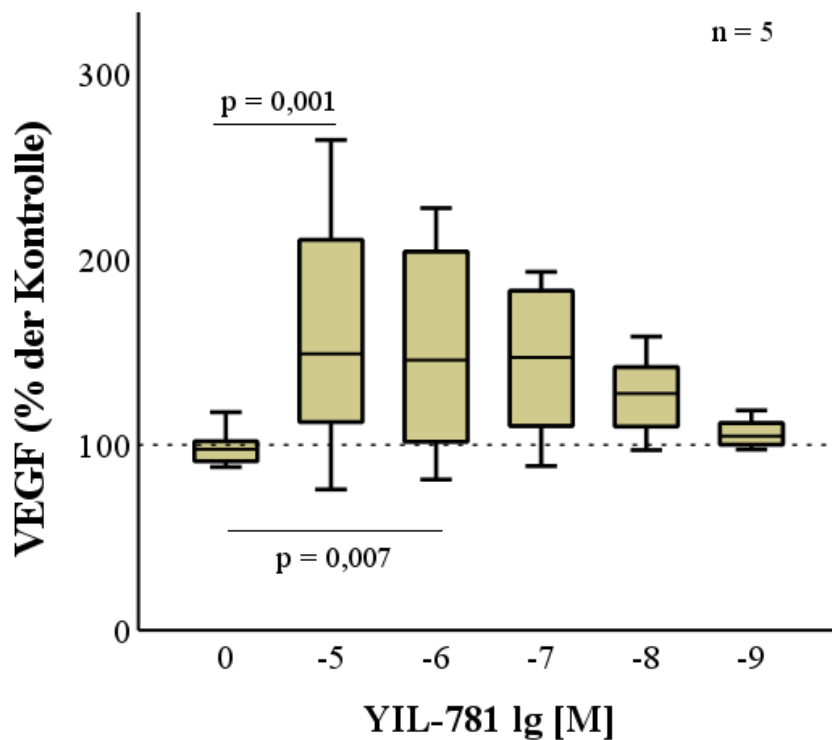


Abbildung 15 VEGF-Produktion nach Vorstimulation der Zellen mit TNF- α und IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit YIL-781

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ und wurden anschließend mit YIL-781 behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die VEGF-Konzentration der Kontrolle ($M=246,09\text{pg/ml}$, $SD=111,60\text{pg/ml}$). Die Signifikanz wurde mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie der Bonferri-Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

MK0677, PF04 und YIL-781 zeigten keinen signifikanten Effekt auf die IL-6-Produktion (Abb. 16-18)

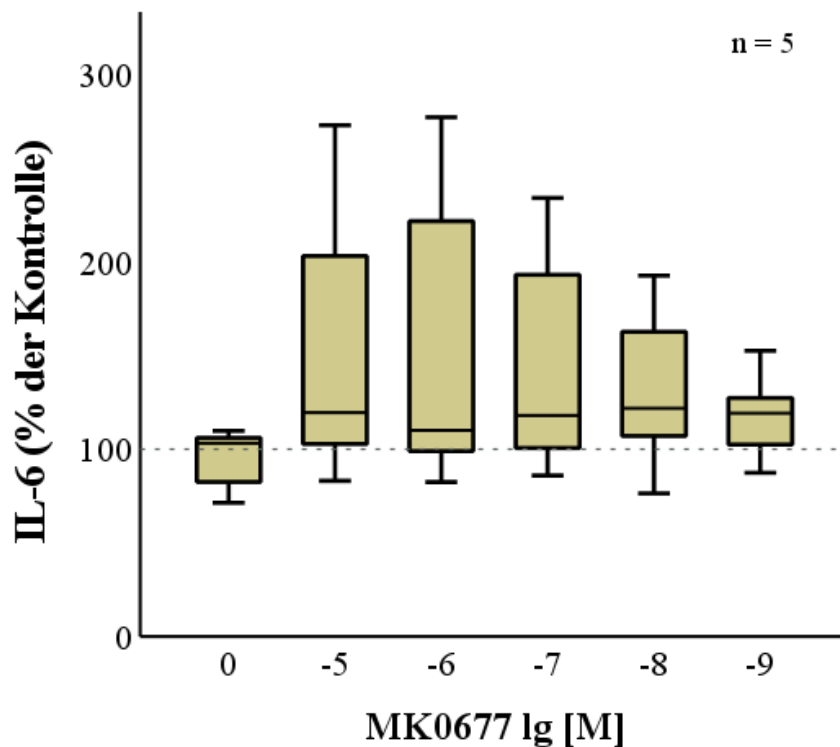


Abbildung 16: IL-6-Produktion nach Vorstimulation der Zellen mit TNF- α und IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit MK0677

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ und wurden anschließend mit MK0677 behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die IL6-Konzentration der Kontrolle ($M=2898,35\text{pg/ml}$, $SD=1189,35\text{pg/ml}$). Die Signifikanz wurde mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie der Bonferri-Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

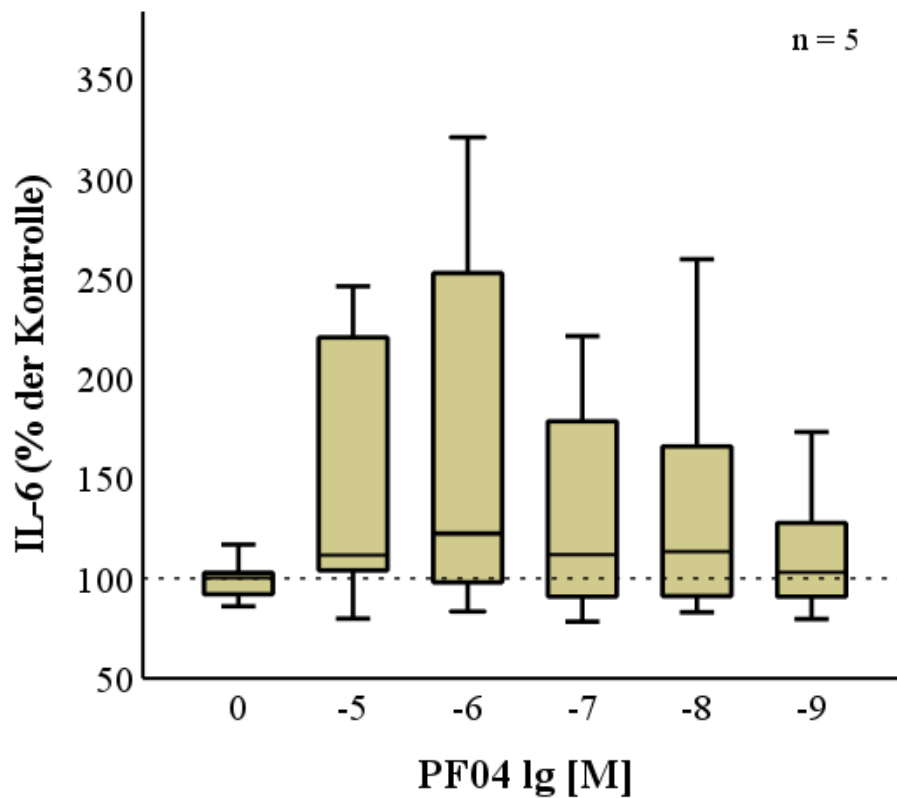


Abbildung 17: IL-6-Produktion nach Vorstimulation der Zellen mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ sowie anschließende Inkubation mit PF04

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ und wurden anschließend mit PF04 behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die IL6-Konzentration der Kontrolle ($M=2995,22\text{pg/ml}$, $SD=1155,98\text{pg/ml}$). Die Signifikanz wurde mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie der Bonferri-Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

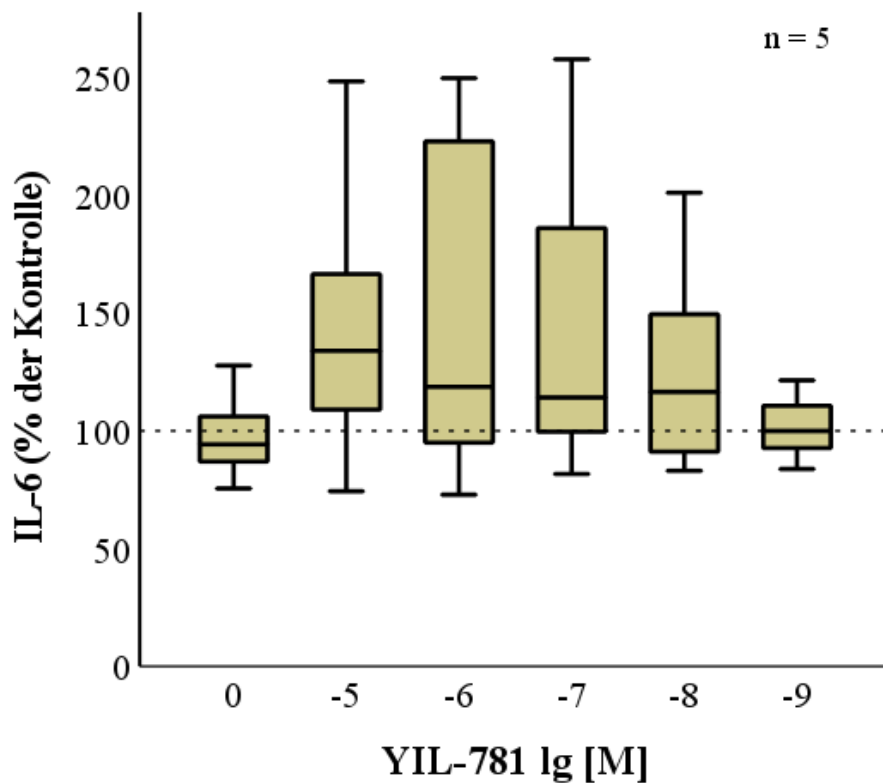


Abbildung 18: IL-6-Produktion nach Vorstimulation der Zellen mit TNF- α und IFN- γ sowie anschließende Inkubation mit YIL-781

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ und wurden anschließend mit YIL-781 behandelt. Die gestrichelte Linie bei 100% repräsentiert die IL6-Konzentration der Kontrolle ($M=2887,45\text{pg/ml}$, $SD=1287,44\text{pg/ml}$). Die Signifikanz wurde mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests sowie der Bonferri-Korrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

4 Diskussion

4.1 GHS-R-Expression

Die veränderte Expression von Oberflächenmolekülen wie Rezeptoren ist ein wichtiger Mechanismus von Zellen, um auf Signale in ihrem Milieu zu reagieren. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Stimulation der RASF mit TNF- α und IFN- γ zu einer signifikant gesteigerten Expression des GHS-R auf der Zelloberfläche führt. Wie bereits beschrieben sind TNF- α und IFN- γ zwei wesentliche Entzündungsmediatoren, die nicht nur in der Pathogenese der RA, sondern auch bei zahlreichen anderen inflammatorischen Prozessen im Organismus eine zentrale Rolle spielen (Ehrenstein et al., 2004; Hirahara and Nakayama, 2016; Szabo et al., 2003; Thomson et al., 1987; Vandooren et al., 2009). Die Hochregulation der GHS-R-Expression durch TNF- α und IFN- γ legt nahe, dass das Ghrelin-System durch inflammatorische Prozesse beeinflusst wird und selbst auch regulatorische Funktionen innehaben könnte.

Es sind bereits einige Faktoren bekannt, welche zu einer veränderten Expression des GHS-R führen. Gut erforscht ist die Wirkung von endogenen oder exogenen Agonisten, die im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus zu einer verminderten Expression des GHS-R führen (Luque et al., 2004; Yin et al., 2014). Ein bekanntes Signal, welches zu einer Hochregulation des GHS-R führt, ist z.B. das Fasten, wobei es zu einer signifikant erhöhten Expression des GHS-R in Neuronen des Nucleus arcuatus kommt (Yasrebi et al., 2016). Auch verschiedene Hormone wie β -Estradiol oder Triiodthyronin bewirken eine vermehrte Expression des GHS-R (Kamegai et al., 2001; Petersenn et al., 2001). Dies deutet auf die zentrale regulatorische Funktion des Ghrelin-Systems hin, welche über seine Funktion als Verdauungshormon im Energiehaushalt hinausführt.

Studien weisen darauf hin, dass ein Teil der antiinflammatorischen Wirkung von Ghrelin auf eine Inhibition der Translokation von NF κ B in den Nukleus zurückzuführen ist (Mao et al., 2015; Zhou and Xue, 2009). NF κ B ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, welcher nach einer Translokation in den Zellkern zu einer gesteigerten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt, u.a. auch von TNF- α (Day, 2006; Hayden and Ghosh, 2014). Es wäre somit denkbar, dass TNF- α selbst eine erhöhte Expression des

GHS-R bewirkt und so im Sinne eines Autoregulationsmechanismus eine Inhibition seiner eigenen Expression.

In dieser Arbeit wurde zudem der Einfluss einer hypoxischen Umgebung auf die GHS-R-Expression untersucht. Auf zellulärer Ebene ist die Hypoxie ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese der RA. Die autoimmunvermittelte Entzündungsreaktion der Synovia führt zu einer Migration von zahlreichen Immunzellen wie Makrophagen, B- und T-Zellen in die betroffenen Gelenke (Koch, 1998). In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Expression des GHS-R unter normoxischen Bedingungen höher war als unter hypoxischen. Dies erscheint zunächst im Widerspruch zu der bestehenden Erkenntnis, dass Ghrelin die Angiogenese fördert (Wang et al., 2023). Es wäre somit zu erwarten, dass eine hypoxische Umgebung die GHS-R-Expression induzieren könnte. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass die Hypoxie einen zellulären Stress für die RASF darstellt und nicht nur die Expression des GHS-R, sondern auch die Expression anderer Oberflächenrezeptoren herunterreguliert wird. In zukünftigen Studien könnte die Auswirkung einer hypoxischen Umgebung auf die GHS-R-Expression in RASF insbesondere im Vergleich zu anderen Oberflächenrezeptoren untersucht werden. Bekannt ist z.B., dass durch Hypoxie Transkriptionsfaktoren wie der Hypoxia-Induced-Factor-1 (HIF-1) aktiviert werden, welcher zu einer vermehrten Produktion von VEGF und somit zu einer Neovaskularisation der betroffenen Gelenke führt (Koch et al., 1994; Semenza et al., 1991; Shweiki et al., 1992).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die gewählten Versuchsbedingungen nicht ideal waren, um den Effekt einer hypoxischen Umgebung auf die GHS-R-Expression zu zeigen. Für diesen Versuch wurden RASF für 72 Stunden bei einem Sauerstofflevel von 1% kultiviert. In zukünftigen Versuchen könnte der Effekt einer mäßigeren, aber länger andauernden Hypoxie untersucht werden. So zeigte sich in Studien, dass die Expression von bestimmten GPCR in dauerhaft hypoxischen Milieus hochreguliert werden (Lappano et al., 2016). Dieser Effekt ist z.B. in Tumorzellen wie Mammakarzinomen oder Osteosarkomen sichtbar, in denen die Expression von GPCR wie den G-protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) oder CXCR4 durch Transkriptionsfaktoren, insbesondere dem Hypoxia-induced-factor 1 α (HIF-1 α), hochreguliert werden (Guo et al., 2014; Recchia et al., 2011).

Eine weitere Hypothese ist, dass der Effekt einer Hypoxie auf die GHS-R-Umgebung erst sichtbar wird, wenn gleichzeitig auch ein Glukose- bzw. Nährstoffmangel besteht.

Ghrelin ist ein orexigen wirkendes Verdauungshormon und beeinflusst auch den Glukosehaushalt auf zellulärer Ebene. Ein Glukose- bzw. Nährstoffmangel als zusätzlicher Reiz neben der Hypoxie könnte eine veränderte Expression des GHS-R bewirken.

Zuletzt sollte auch in Betracht gezogen werden, dass sich die konstitutive Aktivität des GHS-R geändert haben könnte. In dem Fall wäre es möglich, dass Hypoxie zwar keine veränderte Expression des GHS-R bewirkt, jedoch durch eine Modulation der Rezeptoraktivität auf die RASF wirkt.

4.2 GLUT1 und GLUT4 Expression

Ghrelin beeinflusst den Glukosehaushalt nicht nur auf makroskopischer, sondern auch auf zellulärer Ebene. In dieser Studie wurde die Wirkung der GHS-R-Liganden auf die Expression des insulinunabhängigen GLUT1 und den insulinabhängigen GLUT4 auf RASF untersucht. Dabei konnte nach der Inkubation der RASF mit MK0677, PF04 und YIL781 keine signifikant veränderte Expression des GLUT1 oder GLUT4 festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu der Erkenntnis, dass Ghrelin in anderen Zelltypen, z.B. in Tumorzellen und Myoblasten, eine modulatorische Funktion auf die GLUT-Expression besitzt und die intrazelluläre Aufnahme von Glukose fördert (Han et al., 2015; Kraus et al., 2016).

Ghrelin besitzt einen maßgeblichen Einfluss auf den Glukosehaushalt. Dabei verhält sich der Plasmaghrelinspiegel gegenläufig zu dem von Insulin mit einem präprandialen Anstieg und einem postprandialen Abfall (Cummings et al., 2001). Zudem zeigt der Plasmaghrelinspiegel eine ähnliche zirkadiane Rhythmik wie die von Leptin, ein Hormon, welches ebenfalls eine Schlüsselfunktion im Energiehaushalt besitzt (Qian et al., 2019; Tsujino and Sakurai, 2012).

In Versuchen, welche den Einfluss von Ghrelin auf die GLUT-Expression von Zellen des ZNS untersucht haben, konnte gezeigt werden, dass acyliertes Ghrelin zu einer verminderten GLUT3-Expression in hypothalamischen Neuronen führt (Fuente-Martín et al., 2016). Ghrelin könnte somit als orexigen wirkendes Hormon einen verminderten Plasmaglukosespiegel an zentralnervöse Systeme vermitteln, um somit als Signal für die Initiierung von Nahrungsaufnahme zu fungieren

Fuente-Martín et al. haben in ihren Experimenten zur GLUT-Expression auf Astrozyten gezeigt, dass Ghrelin einen unterschiedlichen Effekt auf die verschiedenen Subtypen der GLUT hat. So zeigte sich der Effekt vor allem bei GLUT2 und GLUT3, weniger jedoch in diversen Isoformen des GLUT1 (Fuente-Martín et al., 2016). Eine Untersuchung der Expression weiterer Isoformen des GLUT auf RASF wäre ebenfalls interessant und könnte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Des Weiteren wurde in den o.g. Versuchen nicht die Wirkung von GHS-R-Liganden wie in unserem Versuchsaufbau auf die Zielzellen untersucht, sondern die Wirkung durch direkte Gabe von acylierten und deacylierten Ghrelin. Dieses Vorgehen könnte man auch bei RASF anwenden, um zu sehen, ob durch die direkte Zugabe von Ghrelin ein Effekt auf die GLUT-Expression erzielt werden kann.

Eine weitere mögliche Ursache für das Fehlen eines signifikanten Effektes auf die GLUT1- und GLUT4-Expression könnte eine zu geringe Konzentration bzw. Inkubationszeit der untersuchten GHS-R-Liganden sein. Diese Modifikationen konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr getestet werden, stellen aber einen Ansatzpunkt für zukünftige Experimente dar.

Wie oben erwähnt könnte auch hier ein Glukose- bzw. Nährstoffmangel als zusätzlicher Stimulus untersucht werden. Niedrige Glukosespiegel können insbesondere die Expression von GLUT1 induzieren (Tal et al., 1992). Es ist denkbar, dass die Wirkung von GHS-R-Liganden auf die GLUT-Expression durch dieses zusätzliche Signal sichtbar gemacht werden könnte.

4.3 Zytokinproduktion

4.3.1 YIL-781 verringert BAFF-Produktion

In der ersten Versuchsreihe zur Zytokinproduktion zeigte sich, dass YIL-781 in der höchsten untersuchten Konzentration nach einer Vorstimulation mit IFN- γ zu einer signifikant verringerten Produktion von BAFF in den Fibroblasten führte. Dieser Effekt war sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen zu beobachten.

Der Einfluss des ghrelinergen Systems auf BAFF ist noch wenig untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass BAFF neben seiner Funktion in immunologischen Prozessen auch eine regulatorische Funktion im Energiehaushalt besitzt. BAFF-Rezeptoren werden von braunen und weißen Adipozyten exprimiert (Chan et al., 2021; Zonca et al., 2012).

Versuche in BAFF-*knock-out*-Mäusen haben gezeigt, dass durch das Ausschalten des BAFF-Systems die Glukosetoleranz in Mäusen mit induziertem Diabetes mellitus verbessert werden konnte (Kim et al., 2015; Kim and Hyun, 2016). Ghrelin ist ein Hormon, das wesentlich an der Energiehomöostase und dem Glukosehaushalt beteiligt ist. Es wäre somit denkbar, dass das ghrelinerge System mit BAFF interagiert und so eine Wirkung im Energiehaushalt erzielt.

Es ist zudem anzumerken, dass BAFF zur gleichen Superfamilie wie TNF- α gehört und ebenfalls eine Translokation von NF κ B in den Nukleus bewirkt (Daridon et al., 2008). Ghrelin inhibiert die Translokation von NF κ B in den Nukleus (Karin and Ben-Neriah, 2000; Mao et al., 2015). Dieser Zusammenhang legt nahe, dass Ghrelin auch Einfluss auf die BAFF-Produktion in RASF haben könnte.

4.3.2 Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ macht den Effekt des GHS-R auf VEGF-Produktion sichtbar

In der dritten Versuchsreihe zur Zytokinproduktion wurden die Erkenntnisse aus den Versuchen bezüglich der GHS-R-Expression implementiert. Bei diesen zeigte sich, dass eine Kostimulation der RASF mit TNF- α und IFN- γ zu einer signifikant erhöhten GHS-R-Expression führen. Der GHS-R besitzt im Vergleich zu anderen GPCR eine hohe konstitutive Aktivität (Mear et al., 2013). Eine erhöhte Rezeptorexpression sollte somit auch einen stärkeren Einfluss auf RASF ausüben. Die RASF wurden deshalb mit TNF- α und IFN- γ vorstimuliert, um so die Wirkung der GHS-R-Liganden auf die Zytokinproduktion sichtbar zu machen.

Im Vergleich zur alleinigen Vorstimulation mit IFN- γ konnte nach Vorstimulation mit IFN- γ und TNF- α ein verstärkter und signifikanter Effekt der getesteten GHS-R-Liganden MK0677, YIL-781 und PF04 auf die VEGF-Produktion der RASF festgestellt werden.

Bemerkenswert war, dass in der dritten Versuchsreihe sowohl die Agonisten als auch Antagonisten des GHS-R zu einer erhöhten Produktion von VEGF führten. Für dieses Phänomen lassen sich verschiedene Erklärungsansätze nennen.

Als erstes sollte der komplexe Signalmechanismus des GHS-R aufgeführt werden, der zu der Gruppe der GPCR gehört. Bei dem klassischen Aktivierungsweg in GPCR kommt es durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor zu einer Aktivierung des G-Proteins. Dabei handelt es sich um heterotrimere Proteine, welche durch den Austausch von GDP

zu GTP aktiviert werden. Die aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins führt wiederum als Effektormolekül zu einer intrazellulären Signaltransduktion. Die häufigste und am besten erforschte Wirkung beim GHS-R ist dabei die α_q -vermittelte intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} , welche entweder durch den PLC-Inositol-Signalweg oder den PKA-cAMP-Signalweg induziert wird (Kohno et al., 2003; Yin et al., 2014). Neben diesem klassischen Aktivierungsweg gibt es jedoch auch alternative Signaltransduktionswege, welche durch die verschiedenen $G\alpha$ -Proteine hervorgerufen werden. Dabei lassen sich die $G\alpha$ -Untereinheiten in vier übergreifende Gruppen aufteilen: $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_{12}$ (Syrovatkina et al., 2016). Insbesondere ist hier das $G\alpha_i$ -Protein hervorzuheben, welches im Gegensatz zum $G\alpha_q$ -Protein zu einer verringerten Aktivität der Adenylatcyclase führt und damit zu einer Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration (Kurose and Kim, 2022). Es ist möglich, dass die getesteten GHS-R-Liganden nicht selektiv das $G\alpha_q$ -Protein aktivieren, sondern auch zu einer Aktivierung des $G\alpha_i$ -Proteins führen und somit zu einer veränderten intrazellulären Signaltransduktion. So konnte in pankreatischen β -Zellen gezeigt werden, dass Ghrelin die Ausschüttung von Insulin durch eine Aktivierung von $G\alpha_{i2}$ inhibiert (Dezaki, 2013). Ebenso wäre denkbar, dass in den GHS-R in den RASF vermehrt einzelne $G\alpha$ -Proteine, wie z.B. das $G\alpha_i$ -Protein, gebildet werden.

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) sind Proteinkinasen, welche GPCR, die durch ihre jeweiligen Liganden aktiviert wurden, phosphorylieren und somit eine veränderte Signaltransduktion oder Desensibilisierung bewirken (Pitcher et al., 1998). Studien haben gezeigt, dass GRK in Versuchstieren mit adjuvanter Arthritis oder CIA herunterreguliert sind (Honke et al., 2022; Lombardi et al., 2001). Dies kann zu einer veränderten Signaltransduktion führen oder die Ligandenbindung beeinflussen. Demnach kann es sein, dass die Wirkung, welcher durch den GHS-R vermittelt wird, durch das verminderte Vorkommen von GRK in den RASF verändert wird. Ebenso wäre es denkbar, dass die getesteten GHS-R-Liganden in RASF durch eine veränderte Ligandenbindung eine andere Wirkung erzielen als z.B. in Fibroblasten von ProbandInnen, welche nicht an RA erkrankt sind.

Proinflammatorische Zytokine selbst können ebenfalls die Signaltransduktion von GPCR beeinflussen (Mohan et al., 2017). So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ zu einer verminderten Aktivität des β -adrenergen GPCR in Kardiomyozyten von Ratten führt (Chung et al., 1990; Gulick et al., 1989). $\text{TNF-}\alpha$ bewirkt zudem eine Akkumulation von $G\alpha_i$ -Proteinen in Kardiomyozyten und aktiviert GRK, welche

wiederum durch Phosphorylierung des β -adrenergen GPCR zu einer Heruntersetzung der rezeptorvermittelten Signaltransduktion führen (Vasudevan et al., 2013). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schlussfolgern, dass proinflammatorische Zytokine auch die Signaltransduktion des GHS-R durch die oben genannten Mechanismen beeinflussen könnte und so z.B. die Produktion von weiteren proinflammatorischen Zytokinen stimuliert.

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Stimulation von RASF mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ zu einer vermehrten Expression des GHS-R an der Zelloberfläche der RASF führt. Diese Erkenntnis wurde in den Versuchsaufbau zur Zytokinproduktion integriert. Dabei kann dieser Effekt ebenfalls zu einer veränderten Signaltransduktion beitragen. Es zeigte sich z.B., dass Opiodrezeptoren (OR) intrazellulär am Golgiapparat andere Signalwege induzieren als OR, welche an der Zelloberfläche exprimiert werden (Radoux-Mergault et al., 2023). Demzufolge kann man ableiten, dass die vermehrte Aktivierung von GHS-R an der Zelloberfläche eine andere Signaltransduktion bewirken könnte als GHS-R, welche intrazellulär aktiviert werden.

Azzi et al. haben in einer Studie zu *GPCR-Signaling* den β 2-adrenergen Rezeptor untersucht, um alternative Signalwege, welche durch seine Liganden aktiviert werden, zu detektieren. Insbesondere wurde die Wirkung von Propanolol und ICI118551 untersucht, wobei es sich bei diesen Liganden um inverse Agonisten handelt, welche die konstitutionelle Aktivität des $\text{G}\alpha\text{s}$ -Signalweges verringern. Es zeigte sich, dass diese Liganden jedoch eine agonistische Wirkung auf die MAPK-Kaskade zeigten. Dieser Effekt scheint bei ICI118551 G-Protein-unabhängig durch β -Arrestin vermittelt zu werden (Azzi et al., 2003). Es wäre somit denkbar, dass durch die Bindung der getesteten GHS-R-Liganden neben den klassischen und in der Literatur beschriebenen Signalwege alternative Signalwege intrazellulär aktiviert werden, welche zu der veränderten Zytokinproduktion der Fibroblasten führten. So zeigte sich, dass β -Arrestin neben seiner modulatorischen Funktion in GPCR auch direkt Einfluss auf intrazelluläre Signalwege nehmen kann. β -Arrestin inhibiert z.B. die Aktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ durch Interaktion mit dem Faktor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Witherow et al., 2004). Dabei handelt es sich um ein Protein, welches die Kernlokalisierungssignale von $\text{NF}\kappa\text{B}$ maskiert und dieses somit den Transport von $\text{NF}\kappa\text{B}$ in den Zellkern inhibiert (Jacobs and Harrison, 1998). $\text{NF}\kappa\text{B}$ ist in der RA ein zentraler Mediator von inflammatorischen Signalen und vermehrt im synovialen Gewebe von RA-PatientInnen aktiviert (Asahara et al., 1995). Es führt nach seiner Translokation in den

Zellkern unter anderem zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL6 (Davignon et al., 2013). Somit könnte es sein, dass β -Arrestin durch die getesteten Liganden aktiviert wird und unabhängig vom GPCR-Signaling zu einer veränderten Zytokinproduktion in RASF führt.

Eine weitere Hypothese wäre, dass die beobachteten Effekte der GHS-R-Liganden durch eine Dimerisierung des GHS-R hervorgerufen werden. Es ist bekannt, dass der GHS-R mit verschiedenen Rezeptoren Oligomere bilden kann. Dazu gehören z.B. die Dopaminrezeptoren D1-R und D2-R, der Serotoninrezeptor 5-HT_{2c} oder der Melanocortin-3-Rezeptor (Kern et al., 2012; Schellekens et al., 2013; Vucetic and Reyes, 2010). Dabei kann sich die Rezeptorfunktion und das intrazelluläre *Signaling* ändern, je nachdem, mit welchem Rezeptor der GHS-R oligomerisiert. Die komplexen Signalwege, welche durch GHS-R-Dimere vermittelt werden, sollten in weiteren Studien aufgeschlüsselt werden. Durch das spezifische Targeting eines Signalweges können so unerwünschte Arzneimittelwirkungen in potenziellen Pharmaka reduziert werden, welche GHS-R-Liganden als Wirkstoff nutzen. (Wellman and Abizaid, 2015).

Die Desensibilisierung von GPCR ist ein weiteres bekanntes Phänomen, welches zur Erklärung dieser Ergebnisse in Betracht gezogen werden sollte. Die dauerhafte Aktivierung eines Rezeptors durch einen entsprechenden Liganden kann zu einer Modulation der Rezeptorantwort oder auch zu einer Desensibilisierung des Rezeptors führen. Dadurch kann die vermittelte Rezeptorwirkung differieren. Dies ist häufig in GPCR zu beobachten, wozu der GHS-R ebenfalls gehört (Gainetdinov et al., 2004; Hausdorff et al., 1990). Bekannte Mechanismen, welche zu einer verminderten Rezeptorantwort führen, sind z.B. die Phosphorylierung des GPCR durch *second-messenger*-Kinasen oder die Internalisierung von GPCR von der Zelloberfläche (Böhm et al., 1997). Es wäre somit denkbar, dass die dauerhafte Stimulation des GHS-R durch den Agonisten MK0677 nicht zu einer agonistischen, sondern durch die Rezeptordesensibilisierung zu einer funktionell antagonistischen Wirkung geführt hat. Modulationen des Versuchsaufbau, die untersucht werden sollten, betreffen deshalb die Konzentration und Inkubationsdauer der verwendeten Liganden. In zukünftigen Kontrollversuchen sollten zudem GHS-R-*knock-outs* untersucht werden, da so tatsächlich alle Effekte des GHS-R ausgeschaltet werden. Als Methoden können dabei siRNA oder CRISPR genutzt werden.

4.4 GHS-R als therapeutische Zielstruktur: Systemische Wirkung von Ghrelin und GHS-R-Liganden

Die antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin konnte bereits in vielen Versuchen nachgewiesen werden. Diese Wirkung wird unter anderem durch den inhibitorischen Effekt von Ghrelin auf die Produktion von proinflammatorischen Signalen in T-Zellen, Monozyten und Endothelzellen vermittelt (Gonzalez-Rey et al., 2006; Granado et al., 2005; Li et al., 2004). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass T-Zellen selbst Ghrelin produzieren. Dabei bewirkt acyliertes Ghrelin in T-Zellen eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und IL-2 (Dixit et al., 2009). Besonders interessant ist dabei auch der Effekt, den Ghrelin auf altersassoziierte inflammatorische Erkrankungen hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Ghrelin-Produktion durch T-Zellen im Alter abnimmt, insbesondere auch im Thymus. Dieser Effekt konnte in alternden Mäusen demonstriert werden, wobei Ghrelin-*knock-out*-Mäuse eine schnellere Thymusinvolution zeigten, die Gabe von Ghrelin jedoch die Thymopoese förderte (Dixit et al., 2007). Somit stellt das ghrelinerge System einen interessanten Angriffspunkt für altersassoziierte inflammatorische Erkrankungen dar, insbesondere auch bei solchen Erkrankungen, in denen eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion Teil der Pathogenese darstellt. Zu diesen Erkrankungen zählt auch die RA.

MK0677 wird auch als „Ghrelin-Mimetic“ bezeichnet, da es die Ausschüttung von GH sowie IGF-1 erhöht (Campbell et al., 2018; Chapman et al., 1996; Nass et al., 2008). Die agonistische Wirkung bezieht sich vor allem auf die GH-Ausschüttung. So konnte gezeigt werden, dass durch die orale Aufnahme von MK0677 die pulsatile Ausschüttung von GH erhöht wird. Dieser Effekt scheint durch eine synergistische Wirkung mit Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) vermittelt zu sein, sodass MK0677 als funktioneller Antagonist von Somatostatin wirkt (Smith et al., 1996). Es wäre denkbar, dass eine antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin durch die Beeinflussung der GH-Sekretion vermittelt sein könnte. Es hat sich gezeigt, dass verschiedene Immunzellen, wie z.B. B-Zellen, Monozyten sowie zum kleineren Teil auch T-Zellen den Growth Hormone Rezeptor (GHR) exprimieren (Badolato et al., 1994; Bresson et al., 1999; Hattori et al., 2001; Rapaport et al., 1995). Es gibt bereits verschiedene Experimente, die einen möglichen Zusammenhang zwischen GH und immunologischen Prozessen zeigen. GH beeinflusst unter anderem die B-Zell-Antwort und moduliert die Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie Makrophagen (Bidingmaier et al., 1997; Lu

et al., 2010; Soler Palacios et al., 2020). Verschiedene Autoimmunerkrankungen, z.B. der Diabetes mellitus Typ I, werden durch eine Aktivierung von antiinflammatorisch wirkenden Makrophagen, regulatorischen T-Zellen und eine Beeinflussung des Zytokinmilieus positiv von GH beeinflusst (Villares et al., 2013). In Mausmodellen mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) zeigte GH einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf (Villares et al., 2018). Die CIA ist ein etabliertes Verfahren zur Erforschung der RA in Mausmodellen. Weitere Versuche könnten demnach den Einfluss von GHS-R-Antagonisten bzw. -Agonisten systemisch untersuchen, insbesondere in Hinblick auf eine veränderte GH-Sekretion und eine ggf. damit korrelierende antiinflammatorische Wirkung bei RA-PatientInnen.

Ein häufig untersuchtes Krankheitsbild, welches die antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin unterstreicht, ist die Sepsis, eine überschießende, inflammatorische Systemreaktion auf eine Infektion. In einer o.g. Studie konnten Forscher nachweisen, dass durch Gabe von Ghrelin die Produktion von IL-6 und TNF- α in septischen Mäusen signifikant gesenkt werden konnte (Wu et al., 2007). Dieser Effekt scheint u.a. auf eine Vagusaktivierung zurückzuführen sein, da die Downregulation der Zytokinproduktion nicht in Mäusen nachgewiesen konnte, bei denen zuvor eine Vagotomie durchgeführt wurde. Somit wäre es ebenfalls interessant zu sehen, ob eine vagusvermittelte antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin auch Einfluss auf die Zytokinproduktion von RA-PatientInnen hätte. Dazu könnte man die systemische Wirkung von Ghrelin auf die Zytokinproduktion in Mäusen mit induzierter Arthritis testen und untersuchen, ob ein beobachtbarer Effekt durch eine Vagotomie ebenfalls ausgeschaltet werden kann.

Granado et al. haben die Wirkung von Ghrelin in arthritischen Mäusen untersucht. Dazu haben sie mittels eines Freudschen Adjuvanz in Versuchstieren eine Arthritis induziert und anschließend Growth-hormone-releasing-peptide-2 (GHRP-2), ein Ghrelin-Analogon, systemisch verabreicht (Granado et al., 2005). Des Weiteren wurde die Wirkung von GHRP-2 und Ghrelin auch *in vitro* auf peritoneale Makrophagen getestet, um die direkte Wirkung von Ghrelin bzw. seinem Analogon auf Immunzellen zu testen. GHRP-2 führte bei den arthritischen Mäusen zu einer Zunahme des Körpergewichts im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Es zeigte sich zudem, dass die Versuchstiere durch die Gabe von GHRP-2 einen verbesserten Arthritis-Score und ein geringeres Pfotenvolumen (paw edema) hatten, was für eine antiinflammatorische Wirkung von GHRP-2 spricht. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass GHRP-2 und Ghrelin die LPS-induzierte

Ausschüttung von IL-6 in peritonealen Makrophagen verringern konnte. Daraus lässt sich schließen, dass der beschriebene antiinflammatorische Effekt durch eine direkte Wirkung von Ghrelin bzw. seinem Analogon auf Immunzellen ausgelöst werden könnte. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass der GHS-R u.a. von T-Zellen, B-Zellen und Neutrophilen exprimiert wird (Dixit et al., 2004; Hattori et al., 2001).

4.5 Limitationen

Bei den untersuchten Fibroblasten handelte es sich um Zellen von RA-PatientInnen in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium, die eine elektive Kniegelenkspunktion erhalten haben. Signalwege, welche vor allem zu Beginn der Erkrankung aktiver sind, könnten dadurch unberücksichtigt bleiben. Für weitere Versuche wäre es deswegen interessant zu sehen, wie Ghrelin die Zytokinproduktion von Fibroblasten in früheren Erkrankungsstadien der RA beeinflusst. Daraus könnte man ableiten, ob eine Modulation des Ghrelinsystems zu Beginn einer RA-Erkrankung ein möglicher Therapieansatz wäre.

Wie bei allen Versuchen *in vitro* ist zu beachten, dass sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf Bedingungen *in vivo* übertragen lassen. Andere Faktoren, die die GHS-R-Expression oder die Zytokinproduktion der Fibroblasten beeinträchtigen könnten, werden dabei außer Acht gelassen. Insbesondere ist hierbei die Wirkung von Hormonen zu nennen, welche systemisch ausgeschüttet werden und die Zytokinproduktion sowie die GHS-R-Expression der RASF beeinflussen könnte. So zeigte sich z.B., dass β -Estradiol und Triiodthyronin das Level an GHS-R-mRNA erhöht, Hydrocortison hingegen die Transkription reduziert (Kaji et al., 2001; Petersenn et al., 2001).

In diesen Versuchsreihen wurde die Wirkung von Agonisten und Antagonisten des GHS-R auf die Zytokinproduktion in Monokulturen mit RASF untersucht. Dieses Vorgehen unterscheidet sich von anderen Versuchen, bei denen die antiinflammatorische Wirkung von Ghrelin systemisch bzw. in Zellkulturen mit Immunzellen nachgewiesen werden konnte. Es wäre demnach interessant zu sehen, wie sich die untersuchten Substanzen auf andere Zelltypen auswirken. Insbesondere wäre dabei die Beobachtung von Immunzellen, z.B. in Form von PBMC von RA-PatientInnen, interessant, um eine genauere Wirkung auf immunologische Prozesse zu untersuchen.

4.6 Ghrelin als potenzieller Wirkstoff in der Behandlung von RA

Die RA ist mit vielen Ko-Morbiditäten assoziiert. Im Folgenden wird Ghrelin als potenzieller Wirkstoff in Bezug auf die Behandlung von einer RA-assoziierten Kachexie, dem erhöhten kardiovaskulären Risiko sowie der erhöhten Inzidenz an Depression in RA-Patienten näher beleuchtet. Dabei handelt es sich um Ko-Morbiditäten, welche für die betroffenen PatientInnen oft eine hohe Krankheitsbürde bedeuten und insbesondere im Fall des erhöhten kardiovaskulären Risikos zu einer erhöhten Mortalität im Vergleich zur restlichen Bevölkerung führen (Avina-Zubieta et al., 2012; Joyce et al., 2009; Myllykangas-Luosujärvi et al., 1995).

4.6.1 Behandlung krankheitsassoziierter Kachexie

Als orexigen wirkendes Verdauungshormon könnte Ghrelin einen positiven Einfluss auf eine krankheitsbedingte Kachexie haben. Otero et al. konnten zeigen, dass PatientInnen mit RA einen signifikant erniedrigten Ghrelin-Serumspiegel haben (Otero et al., 2004). Chronisch inflammatorische Erkrankungen wie die RA können durch den erhöhten Stoffwechsel eine Kachexie mitbedingen. PatientInnen mit RA haben aufgrund des krankheitsbedingten Hypermetabolismus einen erhöhten Ruheumsatz und durchschnittlich eine niedrigere Body Cell Mass (BCM) (Arshad et al., 2007; Roubenoff et al., 1994). Der Abbau an BCM wird durch die krankheitsbedingte verminderte körperliche Aktivität verstärkt. Die durch die RA bedingte Kachexie ist zudem mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden (Elkan et al., 2009). Das Auftreten der RA-assoziierten Kachexie korreliert mit der Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β (Roubenoff et al., 1994; Targońska-Stepniak and Majdan, 2011). Zudem verstärkt die Suppression der GH/ insulin-like growth factor (IGF)-Hormonachse den Abbau an Muskelzellen. (Morley et al., 2006). An diesem Punkt wäre eine Therapie der RA mittels Beeinflussung des Ghrelin-Systems interessant, da man neben der antiinflammatorischen Wirkung von Ghrelin sich zudem zu Nutze machen könnte, dass es als orexigen wirkendes Verdauungshormon auch die GH-Sekretion fördert und somit dem Muskelabbau bei langer Krankheitsaktivität entgegenwirken könnte.

MK0677 wurde bereits in Bezug auf seine Wirkung auf die GH-Sekretion sowie den Erhalt von Muskelmasse in gesunden älteren ProbandInnen getestet. Es zeigte sich, dass die Einnahme des Ghrelin-Agonisten MK0677 über den beobachteten Zeitraum zu einer

erhöhten pulsatilen Ausschüttung von GH führt. Zudem hatten die ProbandInnen eine signifikant erhöhte Muskelmasse (Nass et al., 2008). Dieser Effekt könnte sich positiv auf den Krankheitsverlauf der RA und die mit der Erkrankung assoziierten Kachexie auswirken und als supportives therapeutisches Ziel neben der Immunregulation durch Ghrelin wirken.

Auch in anderen Tiermodellen, welche krankheitsinduzierte Kachexie untersuchten, konnte eine positive Wirkung von Ghrelin auf die Erhaltung und Zunahme von Muskelmasse sowie auch eine verringerte krankheitsbedingte Zytokinproduktion festgestellt werden (DeBoer et al., 2008; Hanada et al., 2003).

4.6.2 Kardioprotektive Wirkung

PatientInnen mit RA haben im Vergleich zur restlichen Population ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, chronische Herzinsuffizienz sowie Myokardinfarkte und damit verbunden eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Maradit-Kremers et al., 2005a; Mutru et al., 1989; Nicola et al., 2005). Eine bestehende Hypothese für dieses Phänomen sind die erhöhten Serumspiegel an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α , welche bei RA-PatientInnen nachweisbar sind (Koukkunen et al., 2001; Vasan et al., 2003).

Ghrelin zeigte in verschiedenen Versuchen eine kardioprotektive Wirkung. Nagaya et. al konnten in einer nicht verblindeten Studie zeigen, dass eine regelmäßige Gabe von Ghrelin bei PatientInnen mit einer chronischen Herzinsuffizienz zu einer verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion und somit besserer Leistungsfähigkeit führten. Gleichzeitig zeigten die Probanden/innen einen geringeren Gewichtsverlust zur Kontrollgruppe (Nagaya et al., 2004). Dabei ist die Kachexie, welche mit einer chronischen Herzinsuffizienz assoziiert ist, ein starker unabhängiger Mortalitätsrisikofaktor (Anker et al., 1997). RA-PatientInnen könnten bei einer Therapie mit Ghrelin zusätzlich von dessen kardioprotektiven Wirkung profitieren. Ob das kardiovaskuläre Risiko von RA-PatientInnen tatsächlich durch die Gabe von Ghrelin gesenkt werden kann, sollte Bestandteil zukünftiger Forschung sein.

4.6.3 Antidepressive Wirkung

Depression ist eine weitere Komorbidität, welche mit der RA assoziiert ist. Die genauen Angaben zur Prävalenz schwanken dabei einerseits aufgrund statistischer Probleme, da Symptome der RA wie Fatigue oder Gewichtsverlust als Confounder einer Depression

vorliegen können, andererseits auch, da international verschiedene Scores zur Diagnose einer depressiven Erkrankung vorliegen. Eine systemische Metaanalyse aus dem Jahr 2013 zeigte dabei eine geschätzte Prävalenz von 16,8% aller RA-PatientInnen, die nach den Diagnostikkriterien der Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) an einer schweren Depression leiden (Matcham et al., 2013). Dabei führt die Depression als Komorbidität der RA zu signifikant erhöhten jährlichen Behandlungskosten (Joyce et al., 2009).

Der GHS-R wird von verschiedenen Zellen des ZNS exprimiert. Neben den Hirnregionen, welche an der Ausschüttung von GH beteiligt sind, wie z.B. der Hypophysenvorderlappen (HVL), exprimieren auch zahlreiche weitere Hirnregionen den GHS-R. Dazu gehören z.B. verschiedene hypothalamische Kerngebiete, periventrikuläre Hirnregionen, der Hippocampus und Thalamus (Guan et al., 1997). Dies legt nahe, dass Ghrelin zentral nicht allein die GH-Sekretion stimuliert, sondern auch andere Effekte auf zentrale Regulationsmechanismen hat.

Tierversuche haben gezeigt, dass chronischer Stress bei Mäusen zu erhöhten Ghrelinserumspiegeln führt (Kristensson et al., 2006; Ochi et al., 2008). Auch bei Menschen, welche an Depression erkrankt sind, konnten erhöhte Ghrelinserumspiegel festgestellt werden (Ozsoy et al., 2014). Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass Ghrelin antidepressive bzw. anxiolytische Wirkungen haben könnte, welche den Symptomen einer Depression bzw. chronischen Stress entgegenwirken könnte. Eines dieser Symptome ist z.B. die Appetitlosigkeit und damit verbunden eine verminderte Nahrungsaufnahme, welche Ghrelin als orexigenes Hormon entgegenwirken könnte. Tatsächlich haben einige Studien diese antidepressive und anxiolytische Wirkung von Ghrelin in Mäusen gezeigt (Kanehisa et al., 2006; Lutter et al., 2008). Insgesamt ist die Studienlage zu der antidepressiven Wirkung von Ghrelin jedoch noch gering, sie stellt aber ein interessantes Feld für weitere Untersuchungen dar.

4.7 Ausblick

Die genaue Wirkungsweise von Ghrelin auf die Zytokinproduktion von Fibroblasten von RA-PatientInnen ist noch nicht bekannt. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die getesteten Agonisten bzw. Antagonisten des GHS-R die Zytokinproduktion nach Stimulation mit proinflammatorischen Signalen beeinflusst. Allerdings zeigten sich dabei zunächst widersprüchlich erscheinende Ergebnisse, da sich die Wirkung der getesteten Agonisten

und Antagonisten auf die Zytokinproduktion nicht unterschied. Erklärung hierfür wäre die Aktivierung von alternativen Signalwegen, welche durch den GHS-R vermittelt werden. Die genauen zellulären Mechanismen des GHS-R und insbesondere seine Wirkung auf die Zytokinproduktion sollten somit Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Neben seiner Wirkung auf immunologische Prozesse zeigt Ghrelin in zahlreichen weiteren Studien zudem Effekte, welche sich positiv auf den Krankheitsverlauf einer RA auswirken können. Dazu zählen z.B. die orexigene, kardioprotektive sowie antidepressive und anxiolytische Wirkung. Das Ghrelin-System stellt eine Schnittstelle zwischen neuroendokrinen Regulationsmechanismen des Metabolismus und immunologischen Prozessen im menschlichen Körper dar. Insgesamt ist es als interessantes Target für die Entwicklung medikamentöser Therapieansätze der RA zu werten.

5 Literaturverzeichnis

- Alam, J., Jantan, I., Bukhari, S.N.A., 2017. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* Biomedecine Pharmacother. 92, 615–633.
- American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, 2002. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum.* 46, 328–346.
- Anker, S.D., Ponikowski, P., Varney, S., Chua, T.P., Clark, A.L., Webb-Peploe, K.M., Harrington, D., Kox, W.J., Poole-Wilson, P.A., Coats, A.J., 1997. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet Lond. Engl.* 349, 1050–1053.
- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 315–324.
- Arshad, A., Rashid, R., Benjamin, K., 2007. The effect of disease activity on fat-free mass and resting energy expenditure in patients with rheumatoid arthritis versus noninflammatory arthropathies/soft tissue rheumatism. *Mod. Rheumatol.* 17, 470–475.
- Asahara, H., Asanuma, M., Ogawa, N., Nishibayashi, S., Inoue, H., 1995. High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37, 827–832.
- Avina-Zubietta, J.A., Thomas, J., Sadatsafavi, M., Lehman, A.J., Lacaille, D., 2012. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1524–1529.
- Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., Piñeyro, G., 2003. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11406–11411.
- Badolato, R., Bond, H.M., Valerio, G., Petrella, A., Morrone, G., Waters, M.J., Venuta, S., Tenore, A., 1994. Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 984–990.
- Ballara, S., Taylor, P.C., Reusch, P., Marmé, D., Feldmann, M., Maini, R.N., Paleolog, E.M., 2001. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 2055–2064.
- Bell, M.J., Lineker, S.C., Wilkins, A.L., Goldsmith, C.H., Badley, E.M., 1998. A randomized controlled trial to evaluate the efficacy of community based physical therapy in the treatment of people with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 25, 231–237.
- Bennett, P.A., Thomas, G.B., Howard, A.D., Feighner, S.D., van der Ploeg, L.H., Smith, R.G., Robinson, I.C., 1997. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138, 4552–4557.
- Benso, Andrea, Calvi, E., Gramaglia, E., Olivetti, I., Tomellini, M., Ghigo, Ezio, Broglio, F., 2013. Other than Growth Hormone Neuroendocrine Actions of Ghrelin, in: Benso, A., Casanueva, F.F., Ghigo, E., Granata, R. (Eds.), *Endocrine Development*. S. KARGER AG, Basel, pp. 59–68.

- Bertazzolo, N., Punzi, L., Stefani, M.P., Cesaro, G., Pianon, M., Finco, B., Todesco, S., 1994. Interrelationships between interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 in synovial fluid of various arthropathies. *Agents Actions* 41, 90–92.
- Bidlingmaier, M., Auernhammer, C.J., Feldmeier, H., Strasburger, C.J., 1997. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I binding to natural killer cells. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 Suppl. 423, 80–81.
- Böhm, S.K., Grady, E.F., Bunnett, N.W., 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 322, 1–18.
- Boots, A.M., Wimmers-Bertens, A.J., Rijnders, A.W., 1994. Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology* 82, 268–274.
- Bosello, S., Youinou, P., Daridon, C., Tolusso, B., Bendaoud, B., Pietrapertosa, D., Morelli, A., Ferraccioli, G., 2008. Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 35, 1256–1264.
- Bresson, J.L., Jeay, S., Gagnerault, M.C., Kayser, C., Beressi, N., Wu, Z., Kinet, S., Dardenne, M., Postel-Vinay, M.C., 1999. Growth hormone (GH) and prolactin receptors in human peripheral blood mononuclear cells: relation with age and GH-binding protein. *Endocrinology* 140, 3203–3209.
- Brzustewicz, E., Bryl, E., 2015. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis--Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine* 76, 527–536.
- Buckinx, A., Van Den Herrewegen, Y., Pierre, A., Cottone, E., Ben Haj Salah, K., Fehrentz, J.-A., Kooijman, R., De Bundel, D., Smolders, I., 2019. Differential Effects of a Full and Biased Ghrelin Receptor Agonist in a Mouse Kindling Model. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2480.
- Calin, A., Elswood, J., Klouda, P.T., 1989. Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4. Susceptibility versus severity, a case-control study. *Arthritis Rheum.* 32, 1221–1225.
- Campbell, G.A., Patrie, J.T., Gaylinn, B.D., Thorner, M.O., Bolton, W.K., 2018. Oral ghrelin receptor agonist MK-0677 increases serum insulin-like growth factor 1 in hemodialysis patients: a randomized blinded study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 33, 523–530.
- Carreira, M.C., Crujeiras, A.B., Andrade, S., Monteiro, M.P., Casanueva, F.F., 2013. Ghrelin as a GH-Releasing Factor, in: Benso, A., Casanueva, F.F., Ghigo, E., Granata, R. (Eds.), *Endocrine Development*. S. KARGER AG, Basel, pp. 49–58.
- Chan, C.C., Harley, I.T.W., Pfluger, P.T., Trompette, A., Stankiewicz, T.E., Allen, J.L., Moreno-Fernandez, M.E., Damen, M.S.M.A., Oates, J.R., Alarcon, P.C., Doll, J.R., Flick, M.J., Flick, L.M., Sanchez-Gurmaches, J., Mukherjee, R., Karns, R., Helmrath, M., Inge, T.H., Weisberg, S.P., Pamp, S.J., Relman, D.A., Seeley, R.J., Tschöp, M.H., Karp, C.L., Divanovic, S., 2021. A BAFF/APRIL axis regulates obesogenic diet-driven weight gain. *Nat. Commun.* 12, 2911.
- Chang, L., Du, J.-B., Gao, L.-R., Pang, Y.-Z., Tang, C.-S., 2003. Effect of ghrelin on septic shock in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 45–49.
- Chapman, I.M., Bach, M.A., Van Cauter, E., Farmer, M., Krupa, D., Taylor, A.M., Schilling, L.M., Cole, K.Y., Skiles, E.H., Pezzoli, S.S., Hartman, M.L., Veldhuis, J.D., Gormley, G.J., Thorner, M.O., 1996. Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 4249–4257.

- Choi, H.K., Hernán, M.A., Seeger, J.D., Robins, J.M., Wolfe, F., 2002. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet Lond. Engl.* 359, 1173–1177.
- Chung, M.K., Gulick, T.S., Rotondo, R.E., Schreiner, G.F., Lange, L.G., 1990. Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. *Circ. Res.* 67, 753–763.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661.
- Crowson, C.S., Matteson, E.L., Myasoedova, E., Michet, C.J., Ernste, F.C., Warrington, K.J., Davis, J.M., Hunder, G.G., Therneau, T.M., Gabriel, S.E., 2011. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 63, 633–639.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S., 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.
- Dai, C., Kuo, S.-J., Hu, S.-L., Tsai, C.-H., Huang, Y.-L., Huang, C.-C., Wang, L., Xu, G., Su, C.-M., Tang, C.-H., 2019. VEGF-C Gene Polymorphisms Increase Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Med. Sci.* 16, 1397–1403.
- Daridon, C., Youinou, P., Pers, J.-O., 2008. BAFF, APRIL, TWE-PRIL: Who's who? *Autoimmun. Rev.* 7, 267–271.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M., 2000a. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 4255–4261.
- Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kuroiwa, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M., 2000b. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 477–480.
- Davignon, J.-L., Hayder, M., Baron, M., Boyer, J.-F., Constantin, A., Apparailly, F., Poupot, R., Cantagrel, A., 2013. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 590–598.
- Day, C.P., 2006. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 130, 207–210.
- Dayer, J.M., Beutler, B., Cerami, A., 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 162, 2163–2168.
- Dayer, J.M., Fenner, H., 1992. The role of cytokines and their inhibitors in arthritis. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 6, 485–516.
- DeBoer, M.D., Zhu, X., Levasseur, P.R., Inui, A., Hu, Z., Han, G., Mitch, W.E., Taylor, J.E., Halem, H.A., Dong, J.Z., Datta, R., Culler, M.D., Marks, D.L., 2008. Ghrelin Treatment of Chronic Kidney Disease: Improvements in Lean Body Mass and Cytokine Profile. *Endocrinology* 149, 827–835.
- Dezaki, K., 2013. Ghrelin Function in Insulin Release and Glucose Metabolism, in: Benso, A., Casanueva, F.F., Ghigo, E., Granata, R. (Eds.), *Endocrine Development*. S. KARGER AG, Basel, pp. 135–143.
- Dixit, V.D., Schaffer, E.M., Pyle, R.S., Collins, G.D., Sakthivel, S.K., Palaniappan, R., Lillard, J.W., Taub, D.D., 2004. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced

- proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J. Clin. Invest.* 114, 57–66.
- Dixit, V.D., Yang, H., Cooper-Jenkins, A., Giri, B.B., Patel, K., Taub, D.D., 2009. Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: implications for age-associated increases in inflammation. *Blood* 113, 5202–5205.
- Dixit, V.D., Yang, H., Sun, Y., Weeraratna, A.T., Youm, Y.-H., Smith, R.G., Taub, D.D., 2007. Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *J. Clin. Invest.* 117, 2778–2790.
- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., Mauri, C., 2004. Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy. *J. Exp. Med.* 200, 277–285.
- Elkan, A.-C., Håkansson, N., Frostegård, J., Cederholm, T., Hafström, I., 2009. Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res. Ther.* 11, R37.
- Esler, W.P., Rudolph, J., Claus, T.H., Tang, W., Barucci, N., Brown, S.-E., Bullock, W., Daly, M., Decarr, L., Li, Y., Milardo, L., Molstad, D., Zhu, J., Gardell, S.J., Livingston, J.N., Sweet, L.J., 2007. Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148, 5175–5185.
- Fava, R.A., Olsen, N.J., Spencer-Green, G., Yeo, K.T., Yeo, T.K., Berse, B., Jackman, R.W., Senger, D.R., Dvorak, H.F., Brown, L.F., 1994. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J. Exp. Med.* 180, 341–346.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N., 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 397–440.
- Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27–31.
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Granado, M., Freire-Regatillo, A., Castro-González, D., Ceballos, M.L., Frago, L.M., Dickson, S.L., Argente, J., Chowen, J.A., 2016. Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Sci. Rep.* 6, 23673.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 107–144.
- Genovese, M.C., Bojin, S., Biagini, I.M., Mociran, E., Cristei, D., Mirea, G., Georgescu, L., Sloan-Lancaster, J., 2013. Tabalumab in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate and naive to biologic therapy: a phase II, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 65, 880–889.
- Giannini, D., Antonucci, M., Petrelli, F., Bilia, S., Alunno, A., Puxeddu, I., 2020. One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 38, 387–397.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Delgado, M., 2006. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology* 130, 1707–1720.
- Granado, M., Priego, T., Martín, A.I., Villanúa, M.A., López-Calderón, A., 2005. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E486–492.

- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., 1997. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48, 23–29.
- Gulick, T., Chung, M.K., Pieper, S.J., Lange, L.G., Schreiner, G.F., 1989. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6753–6757.
- Guo, M., Cai, C., Zhao, G., Qiu, X., Zhao, H., Ma, Q., Tian, L., Li, X., Hu, Y., Liao, B., Ma, B., Fan, Q., 2014. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1 α activation in human osteosarcoma. *PloS One* 9, e90518.
- Han, L., Li, J., Chen, Y., Wang, W., Zhang, D., Liu, G., 2015. Effects of Ghrelin on Triglyceride Accumulation and Glucose Uptake in Primary Cultured Rat Myoblasts under Palmitic Acid-Induced High Fat Conditions. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 635863.
- Hanada, T., Toshinai, K., Kajimura, N., Nara-Ashizawa, N., Tsukada, T., Hayashi, Y., Osuye, K., Kangawa, K., Matsukura, S., Nakazato, M., 2003. Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 275–279.
- Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., Jiang, B.H., Kitagawa, K., Inagaki, C., 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4284–4291.
- Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1990. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 2881–2889.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2014. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin. Immunol.* 26, 253–266.
- Heliövaara, M., Aho, K., Aromaa, A., Knekt, P., Reunanen, A., 1993. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 20, 1830–1835.
- Hirahara, K., Nakayama, T., 2016. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int. Immunol.* 28, 163–171.
- Honke, N., Wiest, C.J., Pongratz, G., 2022. β 2-Adrenergic Receptor Expression and Intracellular Signaling in B Cells Are Highly Dynamic during Collagen-Induced Arthritis. *Biomedicines* 10, 1950.
- Houssiau, F.A., Devogelaer, J.-P., Damme, J.V., Deuxchaisnes, C.N.D., Snick, J.V., 1988. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* 31, 784–788.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.S., Chaung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., DeMartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., 1996. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273, 974–977.
- Huscher, D., Mittendorf, T., von Hinüber, U., Kötter, I., Hoese, G., Pfäfflin, A., Bischoff, S., Zink, A., German Collaborative Arthritis Centres, 2015. Evolution of cost structures in rheumatoid arthritis over the past decade. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 738–745.
- Hutchinson, D., Shepstone, L., Moots, R., Lear, J.T., Lynch, M.P., 2001. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 223–227.

- Jackson, J.R., Minton, J.A., Ho, M.L., Wei, N., Winkler, J.D., 1997. Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1 β . *J. Rheumatol.* 24, 1253–1259.
- Jacobs, M.D., Harrison, S.C., 1998. Structure of an IkappaB α /NF-kappaB complex. *Cell* 95, 749–758.
- Jacobsson, L.T., Knowler, W.C., Pillemer, S., Hanson, R.L., Pettitt, D.J., Nelson, R.G., del Puente, A., McCance, D.R., Charles, M.A., Bennett, P.H., 1993. Rheumatoid arthritis and mortality. A longitudinal study in Pima Indians. *Arthritis Rheum.* 36, 1045–1053.
- Joyce, A.T., Smith, P., Khandker, R., Melin, J.M., Singh, A., 2009. Hidden cost of rheumatoid arthritis (RA): estimating cost of comorbid cardiovascular disease and depression among patients with RA. *J. Rheumatol.* 36, 743–752.
- Jung, Y.O., Kim, H.A., 2012. Recent Paradigm Shifts in the Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Korean J. Intern. Med.* 27, 378–387.
- Kaji, H., Kishimoto, M., Kirimura, T., Iguchi, G., Murata, M., Yoshioka, S., Iida, K., Okimura, Y., Yoshimoto, Y., Chihara, K., 2001. Hormonal regulation of the human ghrelin receptor gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 660–666.
- Kamegai, J., Tamura, H., Ishii, S., Sugihara, H., Wakabayashi, I., 2001. Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J. Neuroendocrinol.* 13, 275–278.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., Wakabayashi, I., 2000. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141, 4797–4800.
- Kanehisa, M., Akiyoshi, J., Kitaichi, T., Matsushita, H., Tanaka, E., Kodama, K., Hanada, H., Isogawa, K., 2006. Administration of antisense DNA for ghrelin causes an antidepressant and anxiolytic response in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1403–1407.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621–663.
- Kay, J., Upchurch, K.S., 2012. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 51 Suppl 6, vi5-9.
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E., Smith, R.G., 2012. Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73, 317–332.
- Kim, B., Do, M.-S., Hyun, C.-K., 2015. B-cell-activating factor deficiency attenuates high-fat diet-induced glucose intolerance by potentiating adipose tissue function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 1171–1177.
- Kim, B., Hyun, C.-K., 2016. Gender-Specific Mechanisms Underlying the Amelioration of High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance in B-Cell-Activating Factor Deficient Mice. *PloS One* 11, e0166225.
- Klareskog, L., Catrina, A.I., Paget, S., 2009. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 373, 659–672.
- Klareskog, L., van der Heijde, D., de Jager, J.P., Gough, A., Kalden, J., Malaise, M., Martín Mola, E., Pavelka, K., Sany, J., Settas, L., Wajdula, J., Pedersen, R., Fatenejad, S., Sanda, M., TEMPO (Trial of Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators, 2004. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 363, 675–681.

- Koch, A.E., 1998. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 951–962.
- Koch, A.E., Harlow, L.A., Haines, G.K., Amento, E.P., Unemori, E.N., Wong, W.L., Pope, R.M., Ferrara, N., 1994. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 4149–4156.
- Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S., Yada, T., 2003. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52, 948–956.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K., 2001. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 12, 118–122.
- Komatireddy, G.R., Leitch, R.W., Cella, K., Browning, G., Minor, M., 1997. Efficacy of low load resistive muscle training in patients with rheumatoid arthritis functional class II and III. *J. Rheumatol.* 24, 1531–1539.
- Koukkunen, H., Penttilä, K., Kemppainen, A., Halinen, M., Penttilä, I., Rantanen, T., Pyörälä, K., 2001. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann. Med.* 33, 37–47.
- Kraus, D., Reckenbeil, J., Wenghoefer, M., Stark, H., Frentzen, M., Allam, J.-P., Novak, N., Frede, S., Götz, W., Probstmeier, R., Meyer, R., Winter, J., 2016. Ghrelin promotes oral tumor cell proliferation by modifying GLUT1 expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1287–1299.
- Kristensson, E., Sundqvist, M., Astin, M., Kjerling, M., Mattsson, H., Dornonville de la Cour, C., Håkanson, R., Lindström, E., 2006. Acute psychological stress raises plasma ghrelin in the rat. *Regul. Pept.* 134, 114–117.
- Krüger, K., Wollenhaupt, J., Albrecht, K., Alten, R., Backhaus, M., Baerwald, C., Bolten, W., Braun, J., Burkhardt, H., Burmester, G., Gaubitz, M., Gause, A., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Kuipers, J., Krause, A., Lorenz, H.-M., Manger, B., Nüßlein, H., Pott, H.-G., Rubbert-Roth, A., Schneider, M., Specker, C., Schulze-Koops, H., Tony, H.-P., Wassenberg, S., Müller-Ladner, U., 2012. S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012: Adaptierte EULAR-Empfehlungen und aktualisierter Therapiealgorithmus. *Z. Für Rheumatol.* 71, 592–603.
- Kung, D.W., Coffey, S.B., Jones, R.M., Cabral, S., Jiao, W., Fichtner, M., Carpino, P.A., Rose, C.R., Hank, R.F., Lopaze, M.G., Swartz, R., Chen, H.T., Hendsch, Z., Posner, B., Wielis, C.F., Manning, B., Dubins, J., Stock, I.A., Varma, S., Campbell, M., DeBartola, D., Kosa-Maines, R., Steyn, S.J., McClure, K.F., 2012. Identification of spirocyclic piperidine-azetidine inverse agonists of the ghrelin receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 4281–4287.
- Kurose, H., Kim, S.G., 2022. Pharmacology of Antagonism of GPCR. *Biol. Pharm. Bull.* 45, 669–674.
- Lappano, R., Rigiracciolo, D., De Marco, P., Avino, S., Cappello, A.R., Rosano, C., Maggiolini, M., De Francesco, E.M., 2016. Recent Advances on the Role of G Protein-Coupled Receptors in Hypoxia-Mediated Signaling. *AAPS J.* 18, 305–310.

- Li, W.G., Gavrilu, D., Liu, X., Wang, L., Gunnlaugsson, S., Stoll, L.L., McCormick, M.L., Sigmund, C.D., Tang, C., Weintraub, N.L., 2004. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 109, 2221–2226.
- Libby, P., 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 456S–460S.
- Lombardi, M.S., Kavelaars, A., Cobelens, P.M., Schmidt, R.E., Schedlowski, M., Heijnen, C.J., 2001. Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 1635–1640.
- Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195.
- Lowin, T., Anssar, T.M., Bäuml, M., Classen, T., Schneider, M., Pongratz, G., 2020. Positive and negative cooperativity of TNF and Interferon- γ in regulating synovial fibroblast function and B cell survival in fibroblast/B cell co-cultures. *Sci. Rep.* 10, 780.
- Lu, C., Kumar, P.A., Fan, Y., Sperling, M.A., Menon, R.K., 2010. A novel effect of growth hormone on macrophage modulates macrophage-dependent adipocyte differentiation. *Endocrinology* 151, 2189–2199.
- Luque, R.M., Kineman, R.D., Park, S., Peng, X.-D., Gracia-Navarro, F., Castaño, J.P., Malagon, M.M., 2004. Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 145, 3182–3189.
- Lutter, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Anderson, J.G., Jung, S., Birnbaum, S., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., Nestler, E.J., Zigman, J.M., 2008. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat. Neurosci.* 11, 752–753.
- Manzi, S., Wasko, M.C.M., Manzi, S., 2000. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 321–325.
- Mao, Y., Cheng, J., Yu, F., Li, H., Guo, C., Fan, X., 2015. Ghrelin Attenuated Lipotoxicity via Autophagy Induction and Nuclear Factor- κ B Inhibition. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 37, 563–576.
- Maradit-Kremers, H., Crowson, C.S., Nicola, P.J., Ballman, K.V., Roger, V.L., Jacobsen, S.J., Gabriel, S.E., 2005a. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum.* 52, 402–411.
- Maradit-Kremers, H., Nicola, P.J., Crowson, C.S., Ballman, K.V., Gabriel, S.E., 2005b. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 52, 722–732.
- Matcham, F., Rayner, L., Steer, S., Hotopf, M., 2013. The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 2136–2148.
- Mau, S.E., Witt, M.R., Bjerrum, O.J., Saermark, T., Vilhardt, H., 1995. Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 15, 311–323.
- McDermott, M., McDevitt, H., 1988. The immunogenetics of rheumatic diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 38, 1–10.
- Mear, Y., Enjalbert, A., Thirion, S., 2013. GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance. *Front. Neurosci.* 7, 87.

- Mende, F., Hundahl, C., Plouffe, B., Skov, L.J., Sivertsen, B., Madsen, A.N., Lückmann, M., Diep, T.A., Offermanns, S., Frimurer, T.M., Bouvier, M., Holst, B., 2018. Translating biased signaling in the ghrelin receptor system into differential in vivo functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E10255–E10264.
- Meyer, P.W.A., Hodkinson, B., Ally, M., Musenge, E., Wadee, A.A., Fickl, H., Tikly, M., Anderson, R., 2010. Circulating cytokine profiles and their relationships with autoantibodies, acute phase reactants, and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2010, 158514.
- Mohan, M.L., Vasudevan, N.T., Naga Prasad, S.V., 2017. Proinflammatory Cytokines Mediate GPCR Dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 70, 61–73.
- Morley, J.E., Thomas, D.R., Wilson, M.-M.G., 2006. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 735–743.
- Müller, T.D., Tschöp, M.H., 2013. Ghrelin - A Key Pleiotropic Hormone-Regulating Systemic Energy Metabolism, in: Benso, A., Casanueva, F.F., Ghigo, E., Granata, R. (Eds.), *Endocrine Development*. S. KARGER AG, Basel, pp. 91–100.
- Mutru, O., Laakso, M., Isomäki, H., Koota, K., 1989. Cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Cardiology* 76, 71–77.
- Myllykangas-Luosujärvi, R., Aho, K., Kautiainen, H., Isomäki, H., 1995. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 22, 1065–1067.
- Nagaya, N., Moriya, J., Yasumura, Y., Uematsu, M., Ono, F., Shimizu, W., Ueno, K., Kitakaze, M., Miyatake, K., Kangawa, K., 2004. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 110, 3674–3679.
- Nakajima, K., Itoh, K., Nagatani, K., Okawa-Takatsuji, M., Fujii, T., Kuroki, H., Katsuragawa, Y., Aotsuka, S., Mimori, A., 2007. Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 36, 365–372.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S., 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194–198.
- Nass, R., Gilrain, J., Anderson, S., Gaylinn, B., Dalkin, A., Day, R., Peruggia, M., Thorner, M.O., 2000. High plasma growth hormone (GH) levels inhibit expression of GH secretagogue receptor messenger ribonucleic acid levels in the rat pituitary. *Endocrinology* 141, 2084–2089.
- Nass, R., Pezzoli, S.S., Oliveri, M.C., Patrie, J.T., Harrell, F.E., Clasey, J.L., Heymsfield, S.B., Bach, M.A., Vance, M.L., Thorner, M.O., 2008. Effects of an oral ghrelin mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 149, 601–611.
- Ngian, G.-S., 2010. Rheumatoid arthritis. *Aust. Fam. Physician* 39, 626–628.
- Nicola, P.J., Maradit-Kremers, H., Roger, V.L., Jacobsen, S.J., Crowson, C.S., Ballman, K.V., Gabriel, S.E., 2005. The risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a population-based study over 46 years. *Arthritis Rheum.* 52, 412–420.
- Nishimoto, N., Hashimoto, J., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Murata, N., van der Heijde, D., Kishimoto, T., 2007. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 1162–1167.
- Nishimura, K., Hara, R., Umebayashi, H., Takei, S., Iwata, N., Imagawa, T., Shimizu, M., Tomiita, M., Seko, N., Kitawaki, T., Yokota, S., 2021. Efficacy and safety of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis: 48-week results from an open-label phase III study in Japanese patients. *Mod. Rheumatol.* 31, 226–234.

- Norton, S., Koduri, G., Nikiphorou, E., Dixey, J., Williams, P., Young, A., 2013. A study of baseline prevalence and cumulative incidence of comorbidity and extra-articular manifestations in RA and their impact on outcome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 99–110.
- Ochi, M., Tominaga, K., Tanaka, F., Tanigawa, T., Shiba, M., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Arakawa, T., 2008. Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. *Life Sci.* 82, 862–868.
- Otero, M., Nogueiras, R., Lago, F., Dieguez, C., Gomez-Reino, J.J., Gualillo, O., 2004. Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats. *Rheumatology* 43, 306–310.
- Ozsoy, S., Besirli, A., Abdulrezzak, U., Basturk, M., 2014. Serum ghrelin and leptin levels in patients with depression and the effects of treatment. *Psychiatry Investig.* 11, 167–172.
- 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 Res. Ther.* 12, R49.
- Panayi, G.S., 1993. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 32 Suppl 1, 4–14.
- Patchett, A.A., Nargund, R.P., Tata, J.R., Chen, M.H., Barakat, K.J., Johnston, D.B., Cheng, K., Chan, W.W., Butler, B., Hickey, G., 1995. Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7001–7005.
- Peino, R., Baldelli, R., Rodriguez-Garcia, J., Rodriguez-Segade, S., Kojima, M., Kangawa, K., Arvat, E., Ghigo, E., Dieguez, C., Casanueva, F.F., 2000. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 143, R11–14.
- Petersenn, S., Rasch, A.C., Penshorn, M., Beil, F.U., Schulte, H.M., 2001. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 142, 2649–2659.
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J., 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653–692.
- 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. *J. Leukoc. Biol.* 75, 777–784.
- Pujol-Borrell, R., Todd, I., Doshi, M., Bottazzo, G.F., Sutton, R., Gray, D., Adolf, G.R., Feldmann, M., 1987. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 326, 304–306.
- Qian, J., Morris, C.J., Caputo, R., Garaulet, M., Scheer, F.A., 2019. Ghrelin is Impacted by the Endogenous Circadian System and by Circadian Misalignment in Humans. *Int. J. Obes.* 2005 43, 1644–1649.
- Qu, R., Chen, X., Wang, W., Qiu, C., Ban, M., Guo, L., Vasilev, K., Chen, J., Li, W., Zhao, Y., 2018. Ghrelin protects against osteoarthritis through interplay with Akt and NF- κ B signaling pathways. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 1044–1058.
- Radoux-Mergault, A., Oberhauser, L., Aureli, S., Gervasio, F.L., Stoeber, M., 2023. Subcellular location defines GPCR signal transduction. *Sci. Adv.* 9, eadf6059.

- Raimondo, M.G., Biggioggero, M., Crotti, C., Becciolini, A., Favalli, E.G., 2017. Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 1593–1603.
- Rapaport, R., Sills, I.N., Green, L., Barrett, P., Labus, J., Skuza, K.A., Chartoff, A., Goode, L., Stene, M., Petersen, B.H., 1995. Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone-binding protein levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2612–2619.
- Recchia, A.G., De Francesco, E.M., Vivacqua, A., Sisci, D., Panno, M.L., Andò, S., Maggiolini, M., 2011. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 10773–10782.
- Roubenoff, R., Roubenoff, R.A., Cannon, J.G., Kehayias, J.J., Zhuang, H., Dawson-Hughes, B., Dinarello, C.A., Rosenberg, I.H., 1994. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J. Clin. Invest.* 93, 2379–2386.
- Ruperto, N., Brunner, H.I., Quartier, P., Constantin, T., Wulffraat, N., Horneff, G., Brik, R., McCann, L., Kasapcopur, O., Rutkowska-Sak, L., Schneider, R., Berkun, Y., Calvo, I., Erguven, M., Goffin, L., Hofer, M., Kallinich, T., Oliveira, S.K., Uziel, Y., Viola, S., Nistala, K., Wouters, C., Cimaz, R., Ferrandiz, M.A., Flato, B., Gamir, M.L., Kone-Paut, I., Grom, A., Magnusson, B., Ozen, S., Sztajnbock, F., Lheritier, K., Abrams, K., Kim, D., Martini, A., Lovell, D.J., PRINTO, PRCSG, 2012. Two randomized trials of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 367, 2396–2406.
- Safiri, S., Kolahi, A.A., Hoy, D., Smith, E., Bettampadi, D., Mansournia, M.A., Almasi-Hashiani, A., Ashrafi-Asgarabad, A., Moradi-Lakeh, M., Qorbani, M., Collins, G., Woolf, A.D., March, L., Cross, M., 2019. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann. Rheum. Dis.* 78, 1463–1471.
- Samy, E., Wax, S., Huard, B., Hess, H., Schneider, P., 2017. Targeting BAFF and APRIL in systemic lupus erythematosus and other antibody-associated diseases. *Int. Rev. Immunol.* 36, 3–19.
- Schellekens, H., van Oeffelen, W.E.P.A., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2013. Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 181–191.
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., Scott, M.L., 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111–2114.
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.-L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R.H., Browning, J.L., Tschopp, J., 1999. BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth. *J. Exp. Med.* 189, 1747–1756.
- Semenza, G.L., Neufeldt, M.K., Chi, S.M., Antonarakis, S.E., 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5680–5684.
- Seyler, T.M., Park, Y.W., Takemura, S., Bram, R.J., Kurtin, P.J., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2005. BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 115, 3083–3092.

- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E., 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843–845.
- Singh, A.K., Fechtner, S., Chourasia, M., Sicalo, J., Ahmed, S., 2019. Critical role of IL-1 α in IL-1 β -induced inflammatory responses: cooperation with NF- κ Bp65 in transcriptional regulation. *FASEB J.* 33, 2526–2536.
- Singh, J.A., Furst, D.E., Bharat, A., Curtis, J.R., Kavanaugh, A.F., Kremer, J.M., Moreland, L.W., O'Dell, J., Winthrop, K.L., Beukelman, T., Bridges, S.L., Chatham, W.W., Paulus, H.E., Suarez-almazor, M., Bombardier, C., Dougados, M., Khanna, D., King, C.M., Leong, A.L., Matteson, E.L., Schousboe, J.T., Moynihan, E., Kolba, K.S., Jain, A., Volkmann, E.R., Agrawal, H., Bae, S., Mudano, A.S., Patkar, N.M., Saag, K.G., 2012. 2012 Update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis: 2012 ACR RA Treatment Recommendations. *Arthritis Care Res.* 64, 625–639.
- Smith, R.G., Pong, S.S., Hickey, G., Jacks, T., Cheng, K., Leonard, R., Cohen, C.J., Arena, J.P., Chang, C.H., Drisko, J., Wyvratt, M., Fisher, M., Nargund, R., Patchett, A., 1996. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent Prog. Horm. Res.* 51, 261–285; discussion 285–286.
- Smolen, J.S., Breedveld, F.C., Burmester, G.R., Bykerk, V., Dougados, M., Emery, P., Kvien, T.K., Navarro-Compán, M.V., Oliver, S., Schoels, M., Scholte-Voshaar, M., Stamm, T., Stoffer, M., Takeuchi, T., Aletaha, D., Andreu, J.L., Aringer, M., Bergman, M., Betteridge, N., Bijlsma, H., Burkhardt, H., Cardiel, M., Combe, B., Durez, P., Fonseca, J.E., Gibofsky, A., Gomez-Reino, J.J., Graninger, W., Hannonen, P., Haraoui, B., Kouloumas, M., Landewe, R., Martin-Mola, E., Nash, P., Ostergaard, M., Östör, A., Richards, P., Sokka-Isler, T., Thorne, C., Tzioufas, A.G., van Vollenhoven, R., de Wit, M., van der Heijde, D., 2016. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 3–15.
- Smolen, J.S., van der Heijde, D., Machold, K.P., Aletaha, D., Landewé, R., 2014. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 3–5.
- Soler Palacios, B., Nieto, C., Fajardo, P., González de la Aleja, A., Andrés, N., Dominguez-Soto, Á., Lucas, P., Cuenda, A., Rodríguez-Frade, J.M., Martínez-A, C., Villares, R., Corbí, Á.L., Mellado, M., 2020. Growth Hormone Reprograms Macrophages toward an Anti-Inflammatory and Reparative Profile in an MAFB-Dependent Manner. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 205, 776–788.
- Storage, S.S., Agrawal, H., Furst, D.E., 2010. Description of the Efficacy and Safety of Three New Biologics in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Korean J. Intern. Med.* 25, 1–17.
- Symmons, D.P., Bankhead, C.R., Harrison, B.J., Brennan, P., Barrett, E.M., Scott, D.G., Silman, A.J., 1997. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.* 40, 1955–1961.
- Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., Huang, X.-Y., 2016. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* 428, 3850–3868.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., Glimcher, L.H., 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 713–758.

- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K., 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4908–4911.
- Tal, M., Liang, Y., Najafi, H., Lodish, H.F., Matschinsky, F.M., 1992. Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 267, 17241–17247.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295.
- Targońska-Śtepiak, B., Majdan, M., 2011. Associations between parameters of nutritional status and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 121, 122–128.
- Thompson, N.M., Gill, D.A.S., Davies, R., Loveridge, N., Houston, P.A., Robinson, I.C.A.F., Wells, T., 2004. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145, 234–242.
- Thomson, B.M., Mundy, G.R., Chambers, T.J., 1987. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 138, 775–779.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R.G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M.S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Nakazato, M., 2006. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147, 2306–2314.
- Tsujino, N., Sakurai, T., 2012. [Circadian rhythm of leptin, orexin and ghrelin]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* 70, 1121–1125.
- Uhlig, T., Hagen, K.B., Kvien, T.K., 1999. Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26, 47–54.
- Urban, J.D., Clarke, W.P., von Zastrow, M., Nichols, D.E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J.A., Roth, B.L., Christopoulos, A., Sexton, P.M., Miller, K.J., Spedding, M., Mailman, R.B., 2007. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 1–13.
- Vandooren, B., Noordenbos, T., Ambarus, C., Krausz, S., Cantaert, T., Yeremenko, N., Boumans, M., Lutter, R., Tak, P.P., Baeten, D., 2009. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 966–975.
- Vasan, R.S., Sullivan, L.M., Roubenoff, R., Dinarello, C.A., Harris, T., Benjamin, E.J., Sawyer, D.B., Levy, D., Wilson, P.W.F., D'Agostino, R.B., Framingham Heart Study, 2003. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 107, 1486–1491.
- Vasudevan, N.T., Mohan, M.L., Gupta, M.K., Martelli, E.E., Hussain, A.K., Qin, Y., Chandrasekharan, U.M., Young, D., Feldman, A.M., Sen, S., Dorn, G.W., Dicorleto, P.E., Naga Prasad, S.V., 2013. Gβγ-independent recruitment of G-protein coupled receptor kinase 2 drives tumor necrosis factor α-induced cardiac β-adrenergic receptor dysfunction. *Circulation* 128, 377–387.
- Villares, R., Criado, G., Juarranz, Y., Lopez-Santalla, M., García-Cuesta, E.M., Rodríguez-Frade, J.M., Leceta, J., Lucas, P., Pablos, J.L., Martínez-A, C., Garin, M.I., Gomariz, R.P., Mellado, M., 2018. Inhibitory Role of Growth Hormone in the Induction and Progression Phases of Collagen-Induced Arthritis. *Front. Immunol.* 9, 1165.

- Villares, R., Kakabadse, D., Juarranz, Y., Gomariz, R.P., Martínez-A, C., Mellado, M., 2013. Growth hormone prevents the development of autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4619-4627.
- Vucetic, Z., Reyes, T.M., 2010. Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 577–593.
- Wang, L., Chen, Q., Pang, J., 2023. The effects and mechanisms of ghrelin upon angiogenesis in human coronary artery endothelial cells under hypoxia. *Peptides* 160, 170921.
- Wellman, M., Abizaid, A., 2015. Growth Hormone Secretagogue Receptor Dimers: A New Pharmacological Target. *eneuro* 2, ENEURO.0053-14.2015.
- Weyand, C.M., Xie, C., Goronzy, J.J., 1992. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 89, 2033–2039.
- Willesen, M.G., Kristensen, P., Rømer, J., 1999. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70, 306–316.
- Witherow, D.S., Garrison, T.R., Miller, W.E., Lefkowitz, R.J., 2004. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8603–8607.
- Woo, Y.-J., Yoon, B.-Y., Jhun, J.-Y., Oh, H.-J., Min, S., Cho, M.-L., Park, S.-H., Kim, H.-Y., Min, J.-K., 2011. Regulation of B cell activating factor (BAFF) receptor expression by NF-κB signaling in rheumatoid arthritis B cells. *Exp. Mol. Med.* 43, 350–357.
- Wordsworth, P., Pile, K.D., Buckely, J.D., Lanchbury, J.S., Ollier, B., Lathrop, M., Bell, J.I., 1992. HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 585–591.
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillon, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5992.
- Wu, R., Dong, W., Cui, X., Zhou, M., Simms, H.H., Ravikumar, T.S., Wang, P., 2007. Ghrelin Down-regulates Proinflammatory Cytokines in Sepsis Through Activation of the Vagus Nerve. *Ann. Surg.* 245, 480–486.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132, 387–396.
- Yasrebi, A., Hsieh, A., Mamounis, K.J., Krumm, E.A., Yang, J.A., Magby, J., Hu, P., Roepke, T.A., 2016. Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17β-estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 422, 42–56.
- Yin, Y., Li, Y., Zhang, W., 2014a. The Growth Hormone Secretagogue Receptor: Its Intracellular Signaling and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 4837–4855.
- Yin, Y., Li, Y., Zhang, W., 2014b. The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 4837–4855.
- Zhou, X., Xue, C., 2009. Ghrelin inhibits the development of acute pancreatitis and nuclear factor kappaB activation in pancreas and liver. *Pancreas* 38, 752–757.
- Zonca, M., Mancheño-Corvo, P., DelaRosa, O., Mañes, S., Büscher, D., Lombardo, E., Planelles, L., 2012. APRIL and BAFF proteins increase proliferation of human adipose-derived stem cells through activation of Erk1/2 MAP kinase. *Tissue Eng. Part A* 18, 852–859.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Doktor Georg Pongratz, meinem Co-Betreuer Herrn Professor Hans Neubauer und Herrn Doktor Torsten Lowin für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung.

Ellen Bleck danke ich herzlich für die Einarbeitung und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

Zudem danke ich dem Hiller Forschungsinstitut für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Mittel für die Durchführung der Versuche.

An dieser Stelle ein herzliches Danke an meine Freunde Nele Gondorf, Tobias Hofebauer, Max Karschnia, Hannah Lagarden, Hannah Mammen, Niklas Ophoff und Titus Watrin, die mich durch das gesamte Studium begleitet haben und auf dessen Unterstützung ich immer zählen konnte.

Zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Schwester und meinen Eltern, für ihre bedingungslose Unterstützung.