

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

Charakterisierung des ghrelinergen Systems im Kontext der Rheumatoiden Arthritis

Dissertation

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

vorgelegt von

Hellen Lesmann

2025

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Stefan Krüger

Meiner Familie

Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie und der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie 2019 präsentiert und als Abstract veröffentlicht:

T. Lowin, H. Lesmann, B. Oebels, M. Schneider, G. Pongratz, The ghrelin system is regulated by nutrient availability and pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Brain, Behavior, and Immunity*, Volume 81, Supplement, Page 17, 2019

Zusammenfassung

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die durch Gelenkentzündungen und -destruktion gekennzeichnet ist. Ghrelin ist ein orexigenes Neuropeptid, welches über Bindung des *Growth hormone secretagogue receptor* (GHS-R) die Sekretion von *Growth Hormone* (GH) bewirkt. Aktiviert wird es durch posttranslationale Octanylierung des Serin-3-Rest durch das Enzym Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT). Über seine orexigene und GH-sekretorische Wirkung hinaus sind zahlreiche weitere Funktionen des Ghrelins beschrieben. So ist auch eine immunmodulatorische Funktion nachgewiesen worden.

Synoviale Fibroblasten (SF) spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der RA (*rheumatoid arthritis synovial fibroblasts* [RASF]), indem sie proinflammatorische Zytokine produzieren und zur Gelenkzerstörung beitragen. Bisher ist unklar, ob humane SF Ghrelin, GOAT und den GHS-R exprimieren und ob das ghrelinerge System einen Einfluss auf die Entzündungsreaktion in RA hat. Des Weiteren ist nicht bekannt, ob proinflammatorische Zytokine die Expression des ghrelinergen Systems in SF beeinflussen könnten.

In dieser Arbeit wurde daher zunächst mittels Immunfluoreszenzverfahren und Western Blot (WB) untersucht, ob Ghrelin, GOAT und der GHS-R in Synovialgewebe und RASF exprimiert werden. Zusätzlich wurde mittels WB analysiert, ob die Expression von GOAT und des GHS-R in RASF durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen moduliert wird. Des Weiteren wurde geprüft, ob GHS-R-Liganden die Produktion von IL-6, IL-8 und MMP-3 in RASF beeinflussen. Zudem wurde als Ausblick untersucht, ob Hypoxie, das Nährmedium und dessen Glukosekonzentration einen Einfluss auf die Expression des ghrelinergen Systems in RASF haben. SF von Patientinnen und Patienten mit Osteoarthritis (OASF) dienten als nicht chronisch-entzündliche Kontrolle.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass RASF Ghrelin, GOAT und den GHS-R exprimieren. Zudem wurde die Expression von GOAT in RASF durch Stimulation mit TNF- α und einer Kombination aus TNF- α und IFN- γ signifikant reduziert. Die Expression des GHS-R wurde in dieser Arbeit nicht durch proinflammatorische Zytokine reguliert. Es konnte zudem kein signifikanter Einfluss der GHS-R Liganden auf die IL-6- und IL-8-Produktion in RASF festgestellt werden. Es wurde aber eine nicht-signifikante dosisabhängige Steigerung der IL-6- und IL-8-Konzentration bei einer Stimulation mit dem GHS-R Antagonist/*biased* Ligand YIL-781 beobachtet. Antagonismus am GHS-R führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der MMP-3 Konzentration mit einer signifikanten Steigerung bei einer Stimulation mit 10 μ M YIL-781 zusammen mit 10 μ M des GHS-R-Agonisten L-692,585. Es zeigten sich zudem ein Einfluss des Nährmediums auf die GHS-R- und GOAT-Expression.

Diese Beobachtungen unterstreichen die mögliche regulatorische Funktion des ghrelinergen Systems bei der Pathogenese der RA und dienen als Grundlage für ein tiefergehendes Verständnis der Wirkungen des ghrelinergen Systems in SF.

Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by joint inflammation and destruction. Ghrelin is an orexigenic neuropeptide that mediates the secretion of growth hormone by binding to the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). It is activated by post-translational octanylation of the serine 3 residue by the enzyme ghrelin *O*-acyltransferase (GOAT). In addition to its orexigenic and GH-secretory effects, numerous other functions of ghrelin have been described, e.g. an immunomodulatory function has been demonstrated.

Synovial fibroblasts (SF) play a central role in the pathogenesis of RA (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [RASf]) by producing proinflammatory cytokines and contributing to joint destruction. To date, it is unclear whether human SF express ghrelin, GOAT and the GHS-R and if the ghrelinergic system has an impact on the inflammatory response in RA. Furthermore, it is not known whether proinflammatory cytokines could influence the expression of the ghrelinergic system in SF.

In this study, immunofluorescence methods and Western blotting (WB) were used to investigate if ghrelin, GOAT and the GHS-R are expressed in synovial tissue and RASf. In addition, WB was used to investigate whether the expression of GOAT and the GHS-R in RASf is modulated by proinflammatory cytokines. Furthermore, the influence of GHS-R ligands on the production of IL-6, IL-8 and MMP-3 in RASf was investigated. In addition, the influence of hypoxia, the culture medium and its glucose concentration on the expression of the ghrelinergic system in RASf was assessed as a prospect for further studies. SF from patients with osteoarthritis (OASf) served as a non-chronic inflammatory control.

The investigations showed that RASf express ghrelin, GOAT and the GHS-R. In addition, the expression of GOAT in RASf was significantly reduced by stimulation with TNF- α and a combination of TNF- α and IFN- γ . The expression of GHS-R was not regulated by proinflammatory cytokines. No significant influence of the GHS-R ligands on IL-6 and IL-8 production in RASf could be detected. However, a non-significant dose-dependent increase in IL-6 and IL-8 levels was observed upon stimulation with the GHS-R antagonist/biased ligand YIL-781. Antagonism at GHS-R also led to a concentration-dependent increase in MMP-3 concentration with a significant increase upon stimulation with 10 μ M YIL-781 together with 10 μ M of the GHS-R agonist L-692,585. Additionally, an influence of the culture medium on GHS-R and GOAT expression was detected.

These observations emphasize the possible regulatory function of the ghrelinergic system in the pathogenesis of RA and serve as a basis for a deeper understanding of the effects of the ghrelinergic system in SF.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb	Abbildung
ACR-EULAR	American College of Rheumatology, European League Against Rheumatism
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammonium Persulfat
bDMARDs	Biologische DMARDs
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Zenti
CCP	Zyklisches citrulliniertes Peptid
CD	Cluster of Differentiation
CDAI	Clinical Disease Activity Index
CRP	C-Reaktives Protein
csDMARDs	Konventionelle synthetische DMARDs
d	Dezi
DAG	Des-Acyl-Ghrelin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAS28	Disease Activity Score 28
DC	Dendritische Zellen
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DMARDs	Disease-modifying antirheumatic drugs
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymimmunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
FLS	Fibroblast-like synoviocytes
g	Gramm
g	g-Kraft
GH	Growth hormone
GHRH	Growth hormone-releasing hormone
GHRHR	Growth-hormone-releasing hormone receptor
GHS	Growth hormone secretagogues
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
GOAT	Ghrelin O-Acyltransferase
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
H	Hypoxie
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
ICC	Immunzytochemie
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IU	International Unit
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton

L	Liter
LEAP2	Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli, Meter
M	Mittelwert
M	Mol
m ²	Quadratmeter
MBOAT	Membran-gebundene O-Acyltransferase
MeOH	Methanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP-3	Matrixmetalloproteinase 3
MPM 6	Microplate Manager 6
MTX	Methotrexat
n	Nano, Anzahl
N	Normoxie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NK	Natürliche Killerzellen
OA	Osteoarthritis
OASF	Osteoarthritis synovial fibroblasts
PAD	Peptidyl-arginin-Deiminase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RASF	Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts
RF	Rheumafaktor
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RPM	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime- Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard error of the mean
SF	Synoviale Fibroblasten
SPSS	Statistical Package für Social Sciences
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS-T	Tris-buffered Saline-Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris/Glycine/SDS
TNF	Tumornekrosefaktor
tsDMARDs	Zielgerichtete synthetische DMARDs
U	Units
USA	United States of America
WB	Western Blot
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Darstellung des Ablaufs eines Western Blots	23
Abb. 2	Immunfluoreszente Färbungen von Ghrelin in RA-Synovialgewebe	31
Abb. 3	Immunfluoreszente Färbungen von Ghrelin in OA-Synovialgewebe	32
Abb. 4	Immunfluoreszente Färbungen isolierter RASF mit verschiedenen Anti-Ghrelin-AK	33
Abb. 5	Immunfluoreszente Färbungen von Ghrelin in isolierten RASF unter basalen und IFN- γ stimulierten Bedingungen	34
Abb. 6	Fehlender Nachweis des Ghrelins im Western Blot.....	34
Abb. 7	Immunfluoreszente Färbung des GHS-R in RA-Synovialgewebe.....	35
Abb. 8	Immunfluoreszente Färbung des GHS-R in OA-Synovialgewebe.....	36
Abb. 9	Immunfluoreszente Färbung des GHS-R in isolierten RASF	37
Abb. 10	Nachweis des GHS-R (ab85104) in RASF mittels Western Blot	38
Abb. 11	Nachweis des GHS-R (AGR-031) in OASF- und RASF mittels Western Blot.....	39
Abb. 12	Immunfluoreszente Färbungen der GOAT in RA-Synovialgewebe	40
Abb. 13	Immunfluoreszente Färbungen der GOAT in OA-Synovialgewebe	41
Abb. 14	Immunfluoreszente Färbungen von GOAT in isolierten RASF.....	42
Abb. 15	Nachweis der GOAT in OASF und RASF mittels Western Blot.....	43
Abb. 16	Regulation der GHS-R-Expression durch TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und Hypoxie.....	44
Abb. 17	Regulation der GOAT-Expression durch TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und Hypoxie.....	45
Abb. 18	Vergleich der IL-6 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen.....	46
Abb. 19	Einfluss der GHS-R Liganden L-692,585 und YIL-781 auf die IL-6 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen.....	47
Abb. 20	Vergleich der IL-8 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen.....	48
Abb. 21	Einfluss der GHS-R Liganden L-692,585 und YIL-781 auf die IL-8 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen.....	49
Abb. 22	Vergleich der MMP-3 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen.....	50
Abb. 23	Einfluss der GHS-R Liganden L-692,585 und YIL-781 auf die MMP-3 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen.....	51
Abb. 24	Regulation der GHS-R- und GOAT-Expression durch serumfreies Medium und Hypoxie.	52
Abb. 25	Regulation der GHS-R- und GOAT-Expression durch unterschiedliche Glukosebedingungen in RASF.	53
Abb. 26	Bekannte Isoformen der GOAT	58
Abb. 27	Anfärbemuster des Housekeepers Cyclophilin B im Western Blot	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die häufigsten extraartikulären Manifestationen und Komorbiditäten der Rheumatoiden Arthritis nach Figus et al. [9].	2
Tabelle 2: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien nach Aletaha et al. 2010 [10].	3
Tabelle 3: Charakterisierung der eingeschlossenen Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer.	14
Tabelle 4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz (Gewebe)	18
Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz (Zellen)	19
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele für den Western Blot	21
Tabelle 7: Zusammensetzung der Sammelgele für den Western Blot	21
Tabelle 8: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot.	25
Tabelle 9: Verwendete Referenzproteine für den Western Blot	25
Tabelle 10: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den zellbasierten ELISA	29

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Klinisches Krankheitsbild	1
1.1.4	Diagnosestellung	2
1.1.5	Therapie	3
1.1.6	Ätiologie	4
1.1.7	Pathogenese	4
1.1.8	Bedeutung von TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 und MMP-3 bei der Rheumatoiden Arthritis	6
1.1.9	Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis	7
1.2	Das ghrelinerge System	7
1.2.1	Entdeckungsgeschichte	7
1.2.2	Wichtige Komponenten des ghrelinergen Systems	8
1.2.3	Ghrelin und seine physiologischen Funktionen	10
1.2.4	Die Wirkung von Ghrelin auf das Immunsystem und Inflammation	11
1.2.5	Ghrelin und Rheumatoide Arthritis	12
1.3	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Patientinnen und Patienten	14
2.2	Präparation des Synovialgewebes und der Fibroblasten	14
2.2.1	Medien und Lösungen	14
2.2.2	Präparation von Gewebe für Kryoschnitte und Fibroblastenisolation	15
2.3	Zellkultur	15
2.3.1	Medien und Lösungen	15
2.3.2	Zellkultur	15
2.4	Immunfluoreszenz	16
2.4.1	Grundlagen	16
2.4.2	Herstellung von Gefrierschnitten	16
2.4.3	Durchführung der fluoreszenten Immunhistochemie	16
2.4.4	Fluoreszente Immunzytochemie	18
2.4.5	Fotodokumentation	19
2.5	Probenvorbereitung und Gelelektrophorese für den Western Blot	19
2.5.1	Stimulation der Synovialen Fibroblasten	19
2.5.2	Proteinextraktion	19
2.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	20
2.5.4	Gießen der Gele	20
2.5.5	Vorbereitung der Proben	21

2.5.6	Gelelektrophorese	22
2.6	Western Blot	22
2.6.1	Grundlagen	22
2.6.2	Blotting und Antikörper-Bindung	22
2.6.3	Auswertung des Western Blots	25
2.7	Enzyme-linked immunosorbent assay	26
2.7.1	Grundlagen	26
2.7.2	Stimulation der Synovialen Fibroblasten	26
2.7.3	Durchführung des IL-6, IL-8 und MMP-3 ELISA	26
2.7.4	Zellbasierter-ELISA	27
2.8	Statistische Analyse	29
2.9	Einsatz von Künstlicher Intelligenz	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Nachweis der Ghrelin Expression in OA- und RA-Synovialgewebe	30
3.2	Nachweis von Ghrelin in isolierten RASF	32
3.2.1	Nachweis von Ghrelin mittels Immunfluoreszenz	32
3.2.2	Nachweis von Ghrelin mittels Western Blot	34
3.3	Nachweis der GHS-R-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe	35
3.4	Nachweis der GHS-R-Expression in isolierten RASF	36
3.4.1	Nachweis des GHS-R mittels Immunfluoreszenz	36
3.4.2	Nachweis des GHS-R mittels Western Blot	38
3.5	Nachweis der GOAT-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe	39
3.6	Nachweis der GOAT-Expression in isolierten RASF	42
3.6.1	Nachweis der GOAT mittels Immunfluoreszenz	42
3.6.2	Nachweis der GOAT mittels Western Blot	42
3.7	Regulation des ghrelinergen Systems durch proinflammatorische Zytokine	43
3.7.1	Regulation des GHS-R durch proinflammatorische Zytokine und Hypoxie	43
3.7.2	Regulation der GOAT durch proinflammatorische Zytokine und Hypoxie	44
3.8	Regulation der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion durch das ghrelinerge System	45
3.8.1	Regulation der IL-6 Produktion	45
3.8.2	Regulation der IL-8 Produktion	47
3.8.3	Regulation der MMP-3 Produktion	49
3.9	Ausblick auf weiterführende Experimente	51
3.9.1	Einfluss des Nährmediums und von Hypoxie auf die Expression des GHS-R und GOAT	51
3.9.2	Einfluss der Glukosekonzentration	52
3.9.3	Zell-ELISA	53

4	Diskussion	54
4.1	Nachweis des ghrelinergen Systems in Synovialgewebe und Synovialen Fibroblasten	54
4.1.1	Nachweis der Ghrelin-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe und isolierten RASF	54
4.1.2	GHS-R-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe und isolierten RASF	56
4.1.3	GOAT-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe und isolierten RASF	57
4.2	Regulation des ghrelinergen Systems im Kontext der Rheumatoiden Arthritis	58
4.2.1	Regulation des GHS-R durch proinflammatorische Zytokine	59
4.2.2	Regulation der GOAT durch proinflammatorische Zytokine	59
4.2.3	Regulation der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion durch das ghrelinerge System	61
4.2.4	Ausblick auf weiterführende Experimente	63
4.3	Limitationen	65
4.4	Schlussfolgerung	66
5	Literaturverzeichnis	67
6	Anhang	78

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Definition

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die sich vor allem an den Gelenken manifestiert, aber auch extraartikuläre Organe betreffen kann. Die schubartig und progredient verlaufende Erkrankung kann zu Behinderungen durch fortschreitende Gelenkdestruktion und zu erhöhter Mortalität führen. So sinkt die Lebenserwartung bei Patientinnen und Patienten mit RA um drei bis zehn Jahre. Die häufigsten Todesursachen sind kardiovaskuläre, infektiöse, hämatologische, gastrointestinale und pulmonale Komplikationen [1]. Darüber hinaus hat die RA soziale Folgen für die Patientinnen und Patienten sowie ökonomische Folgen für das Gesundheitssystem. So führt die RA in Europa bei 40 % der Betroffenen zu einer Berufsunfähigkeit [2].

1.1.2 Epidemiologie

Die meisten epidemiologischen Studien zur RA wurden in westlichen Ländern durchgeführt und zeigen eine Prävalenz von 0,5 % bis 1 % in der weißen Bevölkerung [1, 3]. Die Prävalenz unterscheidet sich von Ethnie zu Ethnie. Beispielsweise zeigt sich bei amerikanischen Ureinwohnerinnen und -einwohnern eine deutlich höhere Prävalenz von 5 % bis 6 % [4].

Die Wahrscheinlichkeit an RA zu erkranken ist bei Frauen dreimal so hoch wie bei Männern [5]. Dies wird vielfach auf die stimulierende Wirkung von Östrogenen auf das Immunsystem zurückgeführt. Die Rolle hormoneller Faktoren bei der Entwicklung der RA ist aber umstritten [6]. Die Symptome der RA bei Frauen treten allerdings meist in der fünften Lebensdekade, in einer Zeit des hormonellen Umschwungs, auf [1]. Bei Männern setzen die Symptome in der Regel zu einem späteren Zeitpunkt ein. Sie sind häufiger Rheumafaktor (RF) positiv und weisen höhere Titer von Antikörpern (AK) gegen citrullinierte Proteine (Anti-CCP) auf [7].

1.1.3 Klinisches Krankheitsbild

Die RA manifestiert sich zu Beginn meist als oligoartikuläre Gelenkentzündung, die die Gelenke zunächst eher asymmetrisch befällt. Im Verlauf kommt es zu einer symmetrischen Polyarthritis vor allem der Metacarpophalangeal- und proximalen Interphalangealgelenke. Allerdings können selten auch mittelgroße und große Gelenke betroffen sein. Klassischerweise leiden die Patientinnen und Patienten unter Schwellungen der entsprechenden Gelenke, Bewegungsschmerz, sowie Schmerzen in Ruhe und Morgensteifigkeit. Nach einiger Zeit kommt es zum Funktionsverlust und zu Fehlstellungen in den betroffenen Gelenken. Nicht selten bilden sich sogenannte Schwanenhals- und Knopflochdeformitäten an den Händen der Betroffenen. Begleitend treten häufig unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Nachtschweiß, subfebrile Temperaturen und Myalgien auf. Bei einigen Betroffenen kommt es zur Bildung von Rheumaknoten, die sich subkutan oder in Sehnen bilden und vor allem an den Streckseiten der Gelenke lokalisiert sind. Durch die Entzündung und Gewebeschädigung bei der RA verbraucht der Körper vermehrt Energie, es kommt zur Fettmobilisierung, verstärkter Glukoneogenese, Proteinkatabolismus, einer negativen Stickstoffbilanz und damit letztlich zu einem deutlichen Muskel- und Gewichtsverlust, der auch als rheumatoide Kachexie bezeichnet wird [8]. Hauptsächlich verantwortlich für die erhöhte Morbidität und Mortalität sind die extraartikulären Manifestationen und Komorbiditäten. So sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die

häufigste Todesursache bei Patientinnen und Patienten mit RA [9]. Die häufigsten extraartikulären Manifestationen und Komorbiditäten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Manifestationsort	Extraartikuläre Manifestationen und Komorbiditäten
Kardiovaskuläre Manifestationen	Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz
Pulmonale Manifestationen	Primäre und sekundäre interstitielle Lungenerkrankung
Gastrointestinale Manifestationen	Erhöhte Leberenzyme, intrahepatische Hämorrhagien, Hepatosplenomegalie, Zirrhose, nekrotisierende Pankreatitis, Amyloidose, Beeinträchtigungen des Kauens, Ösophagusmotilitätsstörungen
Neurologische Manifestationen	Zervikale Myelopathie, Meningitis, autoimmune Polyneuropathien, Angststörungen, Depressionen und Schlafstörungen
Renale Manifestationen	Glomerulonephritiden, medikamenten- und Amyloidose-induzierte Nephropathien,
Maligne Erkrankungen	Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphome, Lungenkrebs

Tabelle 1: Die häufigsten extraartikulären Manifestationen und Komorbiditäten der Rheumatoiden Arthritis nach Figus et al. [9].

1.1.4 Diagnosestellung

Um einer Destruktion der Gelenke und extraartikulären Manifestationen entgegenzuwirken, ist eine rechtzeitige Therapieeinleitung entscheidend. Die ACR/EULAR-(*American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism*)-Klassifikationskriterien 2010 [10] sollen der früheren Diagnosestellung der RA dienen und damit einen schnelleren Therapieeinstieg ermöglichen.

Nach diesen Kriterien basiert die Diagnose auf dem bestätigten Vorhandensein einer Synovitis in mindestens einem Gelenk, dem Fehlen einer alternativen Diagnose und dem Erreichen einer Gesamtpunktzahl von 6 oder mehr Punkten aus den folgenden Bereichen: Anzahl und Ort der betroffenen Gelenke, serologische Auffälligkeiten, Entzündungsparameter im Blut und Symptombdauer. Die genaue Zusammensetzung der Punktevergabe kann Tabelle 2 entnommen werden.

Kriterien	Punkte
Gelenkbeteiligung	
▪ 1 großes Gelenk	0
▪ 2-10 große Gelenke	1
▪ 1-3 kleine Gelenke	2
▪ 4-10 kleine Gelenke	3
▪ >10 Gelenke, davon mindestens 1 kleines Gelenk	4
Serologie	
▪ Negativer RF und negative Anti-CCP-AK	0
▪ Niedrig-positiver RF oder niedrig-positive Anti-CCP-AK	1
▪ Hoch-positiver RF oder hoch-positive Anti-CCP-AK (mehr als 3x höher als der Normwert)	2
Entzündungsparameter	
▪ CRP und BSG normal	0

▪ CRP oder BSG erhöht	1
Symptomdauer	
▪ Unter 6 Wochen	0
▪ Mindestens 6 Wochen	1

Tabelle 2: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien nach Aletaha et al. 2010 [10].

Die Tabelle zeigt die Diagnosekriterien des *American College of Rheumatology* und der *European League Against Rheumatism* von 2010 für die Rheumatoide Arthritis. Eine Diagnose kann bei einer Punktzahl von mindestens 6 Punkten gestellt werden.

Abkürzungen: ACR/EULAR: *American College of Rheumatology*, *European League Against Rheumatism*, AK: Antikörper, BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit, CCP: zyklisches citrulliniertes Peptid, CRP: C-Reaktives Protein, RF: Rheumafaktor

1.1.5 Therapie

Im Anschluss an die Diagnosestellung sollte die Therapie nach dem „*hit hard and early*“ – Prinzip möglichst schnell begonnen werden. Im späteren Verlauf kann die Therapie bei gutem Ansprechen deeskaliert werden. Durch die frühzeitige Behandlung kann das Fortschreiten der Gelenkschäden bei 90 % der Patientinnen und Patienten mit früher RA verhindert werden [11]. Bewertungsinstrumente wie beispielsweise der *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) oder der *Disease Activity Score 28* (DAS28) dienen der Therapieüberwachung nach dem „*treat to target*“-Ansatz [12, 13]. Nach diesem Ansatz wird die Therapie laufend bei Bedarf angepasst, um innerhalb von drei Monaten eine Verminderung der Krankheitsaktivität um mindestens 50 % zu erreichen. Therapeutisches Ziel der frühen Arthritis ist die klinische Remission bzw. eine Verminderung der Krankheitsaktivität, insbesondere bei etablierter RA [14].

Auch wenn die RA nicht heilbar ist, kann mittlerweile eine exzellente Krankheitskontrolle mit modernen Therapieansätzen erreicht werden. Zu diesen Therapieansätzen zählen die *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs). Diese Medikamente zeichnen sich durch eine Beeinflussung der Krankheitsaktivität aus und können der progredienten Gelenkdestruktion entgegenwirken [15].

Sie werden eingeteilt in konventionelle synthetische DMARDs (csDMARDs), zielgerichtete synthetische DMARDs (tsDMARDs) und biologische DMARDs (bDMARDs) [16]. CsDMARDs werden zwar am längsten in der Behandlung der RA benutzt, die molekularen Zielstrukturen der meisten Medikamente sind allerdings noch unbekannt [15]. CsDMARDs werden meist als Erstlinientherapie bei Neudiagnosen eingesetzt. Am häufigsten kommt hier Methotrexat (MTX) zum Einsatz. bDMARDs und tsDMARDs werden empfohlen, wenn die Erstlinientherapie nicht erfolgreich oder nicht gut verträglich ist [16]. bDMARDs sind neuere Behandlungsoptionen, die an bestimmten Strukturen des Immunsystems gezielt eingreifen [17]. Je nach Mechanismus unterscheidet man: Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Inhibitoren, B-Zell-Depletoren, B-Zell-Rezeptor-Inhibitoren, *Cluster of Differentiation* (CD)28-Antagonisten, Interleukin (IL)-1-Inhibitoren, IL-6-Inhibitoren, IL-12/23-Inhibitoren, IL-17-Inhibitoren, *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL)-Inhibitoren oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF)-Inhibitoren [16]. TsDMARDs greifen hingegen im JAK-STAT (*Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) Pathway ein und hemmen verschiedene Januskinasen [18].

Neben den DMARDs existieren nicht-pharmakologische Interventionen sowie symptomatisch wirksame Medikamente, wie Nichtsteroidale Antirheumatika und Glukokortikoide, die keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf haben, aber im akuten Krankheitsschub zur Linderung der Symptome und der Entzündung beitragen [19]. Sie werden daher meist temporär bis zum Wirkungseintritt der Basistherapeutika eingesetzt [18].

1.1.6 Ätiologie

Die Ätiologie der RA ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass ein komplexes Zusammenspiel aus Umwelteinflüssen und Risikofaktoren bei Vorliegen einer genetischen Prädisposition zur Krankheitsentstehung beitragen [20]. Wie genau die Risikofaktoren zur Krankheitsentstehung beitragen, ist noch nicht genau verstanden. Einige Stressoren führen aber zu posttranslationalen Modifikationen von Eigenpeptiden in der Mukosa von Mund, Lunge und Magen [21]. Ein Mechanismus dieser Modifikationen ist beispielsweise die Citrullinierung, bei der die Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD) Arginin zu Citrullin konvertiert [22]. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einem Verlust der Toleranz gegenüber dieser modifizierten Eigenproteine und damit vermehrt zur Bildung von AK gegen Immunglobulin G (IgG), welches dem RF entspricht, sowie von Anti-CCP-AK [18, 21].

Die RA hat eine ausgeprägte genetische Komponente. So haben Zwillingsstudien bei Anti-CCP-AK positiven Patientinnen und Patienten eine Heritabilität von etwa 60 % gezeigt [23]. Eine positive Familienanamnese erhöht das Risiko, an einer RA zu erkranken, um das Drei- bis Fünffache [24]. Eineiige Zwillinge zeigen allerdings nur eine Konkordanz von 12-15 %, was auf die wichtige Rolle nicht-kodierender Faktoren hindeutet [25, 26]. Mittels genomweiter-Assoziationsstudien konnten mittlerweile über 100 Loci identifiziert werden, die mit der Entstehung einer RA assoziiert sind [24, 27]. Der *Human leukocyte antigen* (HLA)-DRB1-*Locus* gilt als stärkster genetischer Risikofaktor [28]. So sind die HLA-DRB1-Allele (DRB1*01 und DRB1*04; DQ8) für etwa 50 % der beobachteten genetischen Anfälligkeit verantwortlich [18].

Als weitere Umwelteinflüsse gelten vor allem bakterielle oder virale Infektionen, die durch molekulare Mimikry zu einer Aktivierung der autoreaktiven Lymphozyten führen können [18]. So ist beispielsweise ein Einfluss von viralen Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus oder bakteriellen Infektionen mit *Proteus mirabilis* oder *Escherichia coli* festgestellt worden [29, 30]. Außerdem ist bereits seit langem ein Zusammenhang zwischen Parodontitis und RA bekannt [31]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Infektionen mit dem Bakterium *Porphyromonas gingivalis* durch eine Exprimierung von PAD zur Citrullinierung von Eigenproteinen und damit zur Induktion einer Autoimmunreaktion führen können [32, 33]. Auch andere Faktoren wie die bereits erwähnte Zugehörigkeit zum weiblichen Geschlecht sowie zahlreiche weitere Umweltfaktoren spielen ebenfalls eine große Rolle. So ist Rauchen einer der größten *lifestyle*-assoziierten Risikofaktoren eine seropositive RA zu entwickeln [34]. Aber auch Quarzbelastung, ultraviolette Strahlungs-Exposition, Sexualhormone, Veränderungen im Mikrobiom und auch ein erhöhter *Body-Mass-Index* (BMI) können zur Krankheitsentstehung beitragen [21, 24, 35-38]. Ein niedriger sozioökonomischer Status, einschließlich eines niedrigen Bildungsniveaus scheinen mit einem schwereren Verlauf der RA in Verbindung zu stehen [39].

1.1.7 Pathogenese

Präklinische Phase

Die präklinische Phase der RA ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein der oben beschriebenen genetischen und nicht-genetischen Risikofaktoren. Doch sie allein führen noch nicht zu einer Symptomentwicklung. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Immunantwort spielen Dendritische Zellen (DC). DCs fungieren als Antigenpräsentierende Zellen (APCs), indem sie die veränderten Eigenpeptide aufnehmen, diese prozessieren und sie anschließend gegenüber naiven T-Zellen mittels Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex* [MHC])-Protein-Heterodimeren an ihrer Zelloberfläche

präsentieren, sodass sich anschließend antigenspezifische T-Effektorzellen bilden und in verschiedene Subtypen differenzieren [40]. Im lymphatischen Gewebe führt die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen zur Bildung von CD4 positiven T-Helfer-Zellen. Autoreaktive T-Zellen regen wiederum B-Zellen zur Synthese einer Reihe von gegen Eigenproteine gerichtete AK an, z. B. RF und ACPAs [21]. Es kommt damit in dieser präklinischen Phase zur Initiation der Autoimmunität, in der es damit schon lange vor dem Einsetzen der klinischen Symptome zum Nachweis von zirkulierenden Auto-AK und weiteren Entzündungsparametern kommen kann.

Frühe RA und etablierte RA

Durch die Entzündungsreaktion kommt es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Die AK migrieren über den Blutkreislauf in die Gelenke und es kommt zur Immunkomplexbildung oder Aktivierung des Komplementsystems und damit zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion [41]. Zudem binden die AK an die Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und aktivieren diese [42], wodurch es zur weiteren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt.

Die frühe RA ist gekennzeichnet durch eine progrediente Entzündung der synovialen Gelenke. Synovialgelenke sind von einer Gelenkkapsel umgeben, deren innere Schicht als Synovialmembran (auch Synovialis oder Synovium) bezeichnet wird. Sie ist für die Produktion von Synovialflüssigkeit zuständig, die als „Gelenkschmiere“ der Lubrikation des Gelenkes sowie der Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen dient [43]. Als die zwei Hauptzellen der Synovialis konnten die Typ A und Typ B Synoviozyten identifiziert werden. Bei den Typ A Synoviozyten handelt es sich um synoviale Makrophagen, wohingegen die Typ B Synoviozyten Fibroblasten sind [43]. Sie werden auch als Synoviale Fibroblasten (SF) oder *fibroblast-like synoviocytes* bezeichnet (FLS) [44]. Ihnen kommt in der Pathogenese der RA eine besondere Rolle zu Teil [45].

Zur Synovitis kommt es durch die Infiltration der Leukozyten in die Synovialis. Die in die Synovialis eingewanderten aktivierten T-Zellen interagieren mit Makrophagen, dendritischen Zellen, Synoviozyten und Osteoklasten [46]. Sie sezernieren unter anderem TNF, IL-2, IL-17, Interferon (IFN)- γ und RANKL, aktivieren weitere Immunzellen und halten damit die Entzündungsreaktion im Gelenk weiter aufrecht [18, 21]. Die Synovialzellen werden durch das entstandene entzündungsfördernde Milieu der entzündeten Synovialis aktiviert [18]. Die aktivierten synovialen Makrophagen produzieren hierbei unter anderem TNF, IL-1, IL-6 und IL-8, sowie weitere Chemokine. Aktivierte SF produzieren unter anderem IL-6, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Prostaglandine, Leukotriene, miRNAs und RANKL [21]. Die aktivierten SF zeigen sich als aggressive, invasive Phänotypen [47]. Durch die gesteigerte Proliferation der SF verdickt sich die Synovialmembran. Diese invasive Verdickung wird auch als Pannus bezeichnet und ist kennzeichnend für die Entwicklung der etablierten RA [21]. Es kommt zur Invasion in anliegende Gelenkstrukturen und damit zur Knorpel- und Knochenerosion [42]. Auch die Freisetzung von MMPs und Zytokinen durch die aktivierten SF trägt zur Zerstörung des Gelenks bei. Die aktivierten T-Zellen und SF sorgen zusätzlich zu einer vermehrten Produktion von RANKL, was wiederum zur vermehrten Osteoklastenaktivierung führt. Die reifen Osteoklasten bauen dann ebenfalls vermehrt Knochengewebe ab [48].

1.1.8 Bedeutung von TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 und MMP-3 bei der Rheumatoiden Arthritis

TNF- α

TNF- α ist ein Zytokin, dessen primäre Rolle die Regulation von Immunzellen darstellt. Es ist in der Lage, Entzündungen auszulösen, aber auch die Apoptose einzuleiten, sowie Tumorentstehung und Virusvermehrung zu hemmen [49]. TNF- α spielt eine besondere Rolle bei der Pathogenese der RA. Es fördert die Aktivität von Osteoklasten, Chondrozyten und SF und bewirkt die Produktion und Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine durch die SF und trägt so direkt zu der Hypertrophie und Schädigung der Synovialis bei [50]. Die zentrale Rolle von TNF- α bei der RA führte zur Entwicklung von TNF- α -Inhibitoren als therapeutische Strategie. Diese bDMARDs, zu denen Infliximab, Etanercept und Adalimumab gehören, binden an TNF- α und verhindern dessen Interaktion mit seinen Rezeptoren, wodurch die Entzündung gehemmt wird [51].

IL-6

Auch bei IL-6 handelt es sich um ein zentrales Zytokin in der Pathogenese der RA. Es fördert unter anderem die Aktivierung und Proliferation von SF, die Osteoklastendifferenzierung, T-Zell-Proliferation und -Überleben, Th17-Zell-Differenzierung sowie das B-Zell-Überleben und deren AK-Produktion [50]. Die Erkenntnis der zentralen Rolle von IL-6 bei der RA führte zur Entwicklung von IL-6-Inhibitoren. Tocilizumab ist beispielsweise ein monoklonaler AK, der spezifisch den IL-6-Rezeptor inhibiert und somit die IL-6-vermittelte Signaltransduktion hemmt. Klinische Studien haben gezeigt, dass Tocilizumab die Krankheitsaktivität signifikant reduziert und die strukturelle Schädigung der Gelenke verlangsamt [52].

IFN- γ

IFN- γ gehört zu den Typ II Interferonen und wird als proinflammatorisch bzw. immunmodulatorisch angesehen [53]. In der RA-Synovialis wird es vor allem von Natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen und CD8+ T-Zellen freigesetzt [54, 55]. IFN- γ spielt in der RA eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Entzündung, da die aktivierten T-Zellen durch IFN- γ die SF aktivieren [18, 21]. Außerdem bewirkt es die Erhöhung der Präsentation von Antigenen durch Induktion von MHC-Klasse II-Molekülen in SF und eine Förderung der Chemokinproduktion [56]. Es konnten hohe IFN- γ -Konzentrationen in Plasma, Synovialgewebe und Synovialflüssigkeit von RA Patientinnen und Patienten nachgewiesen werden [18]. Auf der anderen Seite wird auch eine gewebesetzende Wirkung von IFN- γ vermutet, da es der Produktion von MMPs durch IL-1 β entgegenwirkt und die Produktion von IL-18-bindendem Protein in SF erhöht [56]. In späteren Krankheitsstadien hemmt es zudem die Osteoklastenbildung, den Neutrophileneinstrom, die TNF-abhängige Synoviozytenproliferation, die Produktion von Abbauenzymen sowie die Freisetzung von Prostaglandin E2 und GM-CSF [18]. In der Vergangenheit gab es Versuche rekombinantes IFN- γ als Anti-Arthrose-Mittel zu nutzen. In der klinischen Medikamentenstudienphase konnten die Endpunkte jedoch nicht erreicht werden [55]. Die heute viel eingesetzten JAK-Inhibitoren hemmen jedoch unter anderem auch IFN- γ [55].

IL-1 β

Auch IL-1 β hat eine Wirkung auf die Aktivierung von Osteoklasten und die Th17-Differenzierung [50]. Zudem fördert es die Vasodilatation am Endothel, was zu der weiteren Freisetzung von Chemokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren führt [50]. Außerdem stimuliert es die Freisetzung von MMPs und anderen Proteinasen von SF und

Chondrozyten, die zu einer Zerstörung des Knorpels führen [57]. In klinischen Studien haben sich IL-1-Blocker, wie der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) Anakinra, als wirksam bei der Reduktion der klinischen Zeichen und Symptome von RA erwiesen. Anakinra blockiert die Bindung von IL-1 an den IL-1 Typ I Rezeptor (IL-1RI) und reduziert somit die entzündlichen und destruktiven Prozesse im Gelenk [58].

IL-8

Bei IL-8 (CXC8) handelt es sich um ein Chemokin, welches eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Infiltration der Synovialis durch Leukozyten spielt und mit der Krankheitsaktivität der RA korreliert [59]. IL-8 fördert auch die Angiogenese, die das Wachstum neuer Blutgefäße im entzündeten Synovialgewebe unterstützt [59]. IL-8 scheint durch eine Beteiligung an der Osteoklastenaktivierung auch eine Rolle beim Abbau des Knochens und der Entstehung von Arthralgien zu spielen [50].

MMP-3

Auch MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der RA. Durch den Abbau der extrazellulären Matrix zerstören sie die Integrität von Synovial-, Knorpel- und Knochengewebe [60]. Durch unter anderem MMP-3, auch bekannt als Strimelysin-1, erhalten die SF ihre invasiven Eigenschaften und es ist mitverantwortlich für den Abbau der endothelialen Basalmembran und die Freisetzung angiogener Faktoren [60].

1.1.9 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis

Auch die Osteoarthritis (OA) ist eine entzündliche Gelenkerkrankung, die ähnliche Symptome wie die RA verursacht. Bei der OA handelt es sich aber anders als bei der RA um eine degenerative Gelenkerkrankung, die auf Verschleiß und Abnutzung der Gelenke zurückzuführen ist und nicht mit Autoimmunität in Zusammenhang steht. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ätiologie manifestiert sich die OA häufig sehr viel später als die RA und stellt in der Regel eine Alterserscheinung dar. Auch die Klinik der Entzündung unterscheidet sich in einigen Faktoren. So ist die OA eher lokalisiert und auf wenige Gelenke beschränkt, die im Laufe des Lebens mechanisch besonders beansprucht wurden, wohingegen die RA als systemische Erkrankung eine Polyarthritis auslöst und darüber hinaus auch weitere Organe befallen kann [61]. Zudem ist die Entzündung bei der RA in der Regel sehr viel ausgeprägter als bei der OA [62]. Bei der RA finden sich deutlich höhere Spiegel von proinflammatorischen Markern [63]. In dieser Arbeit dienen SF von Patientinnen und Patienten mit OA daher als nicht-chronische Entzündungskontrolle.

1.2 Das ghrelinerge System

1.2.1 Entdeckungsgeschichte

Das Wachstumshormon, Somatotropin, oder auch *growth hormone* (GH) ist ein im Hypophysenvorderlappen gebildetes Peptidhormon. Seine Synthese und Sekretion wird durch das Somatoliberin bzw. *growth hormone-releasing hormone* (GHRH) stimuliert und nimmt eine zentrale Rolle in Wachstum und Stoffwechsel ein. In den späten 1970er Jahren führten die Arbeiten von Cyril Bowers und Frank Momany zur Entwicklung einer Gruppe von synthetischen Opioidpeptidderivaten, die die Freisetzung von GH aus dem Hypophysenvorderlappen förderten - die Wachstumshormon-Sekretagoga (*Growth hormone secretagogues* [GHS]) [64, 65]. Zu den GHS gehören Agonisten des Wachstumshormon-

Sekretagoga-Rezeptors (*growth hormone secretagogue receptor* [GHS-R]) und Agonisten des Wachstumshormon-Releasing-Hormon-Rezeptor (*growth-hormone-releasing hormone receptor* [GHRHR]). Sie wurden mit dem Ziel entwickelt, einen GH-Mangel zu diagnostizieren oder zu behandeln [66]. Bereits 1996 wurde der GHS-R als G-protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) entdeckt, der bei einer Aktivierung durch die synthetischen Liganden eine episodische GH-Freisetzung bewirkt [67]. Doch ein endogener Ligand für diesen Rezeptor war zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt. Erst drei Jahre später im Jahre 1999 wurde das Hormon Ghrelin von Kojima et al. als endogener Ligand identifiziert [68]. Sie wählten die Bezeichnung Ghrelin, da *Ghre* die proto-indoeuropäische Wurzel des Wortes „wachsen“ ist [68].

Seit dieser Entdeckung gibt es zahlreiche Studien und Reviews zum ghrelinergen System und seinen Funktionen. Aufgrund der Komplexität und der multiplen Funktionen des ghrelinergen Systems ist es noch immer nicht in seiner Gänze verstanden und viele Forschungsfragen sind derzeit noch offen.

1.2.2 Wichtige Komponenten des ghrelinergen Systems

Ghrelin

Ghrelin ist ein Peptid, welches aus 28 Aminosäuren (AS) besteht und bei dem der Serin-3-Rest n-octanyliert ist [69]. Es wird hauptsächlich in den X/A-Zellen der oxyntischen Drüsen der Schleimhautschicht des Magenfundus synthetisiert und in zwei Hauptformen in den Blutkreislauf sezerniert: acyliertes Ghrelin (ca. 5 % des Gesamtghrelins) und Des-Acyl-Ghrelin (DAG, ca. 95 % des Gesamtghrelins) [70].

Das Ghrelin-Gen liegt auf Chromosom 3 (3p25-26) und codiert für das 117 AS lange Preproghrelin [69]. Es enthält ein Signalpeptid (23 AS) und ein 94-AS-Segment, das Proghrelin genannt wird. Nach Proteolyse kommt es zur Bildung des nativen Ghrelin-Peptids und eines zusätzlichen C-terminalen Peptids namens C-Ghrelin. Dieses wird nach weiteren proteolytischen Prozessen zu Obestatin, dem anfänglich antagonistische Wirkungen zum Ghrelin zugesagt wurden. Mittlerweile wird jedoch davon ausgegangen, dass die Funktionen deutlich komplexer sind [71].

Bei dem DAG handelt es sich um die nicht-acylierte Form des Ghrelins, welche ebenfalls in hohen Konzentrationen in Magen und Blut zu finden ist (Hosoda et al. 2000a). Es kann entweder sezerniert, oder durch den Abbau von Ghrelin gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich seine Wirkung von der des acylierten Ghrelins unterscheidet [72]. Seine genauen Wirkungen sind noch nicht bekannt. Sicher ist jedoch, dass es keine GH-Freisetzung bewirkt [69], da es nicht an den GHS-R binden kann. Es werden Funktionen vermutet, wie Wirkungen auf den Energie- und Glukosestoffwechsel sowie muskel- und kardioprotektive Effekte [73] und die Regulation der GH-IGF-I-Achse [74]. Außerdem wird vermutet, dass DAG *in vivo* reacyliert werden kann [75]. Bisher konnte jedoch noch kein Rezeptor für DAG identifiziert werden, weshalb in der Vergangenheit einige Autorinnen bzw. Autoren auch die Möglichkeit in Betracht zogen, dass es sich beim DAG nur um ein Artefakt handelt [76].

Ghrelin O-Acyltransferase

Die Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) wurde erstmals 2008 zeitgleich von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben [75, 77]. Es ist das bisher einzige bekannte Enzym, das die Acylierung von Ghrelin durch die Übertragung von n-Octansäure auf den Ghrelin Serin-3-Rest katalysiert [78]. So konnte gezeigt werden, dass im Blutkreislauf von GOAT-*Knockout*-Mäusen kein acyliertes Ghrelin vorhanden ist [77]. In GOAT-*Knockout*-Mäusen konnte außerdem

demonstriert werden, dass Acyl-Ghrelin essenziell für die Prävention von durch Kalorienrestriktion ausgelöste, lebensbedrohliche Hypoglykämien ist [73]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass in Zellen, die normalerweise kein Ghrelin exprimieren, die Zugabe von GOAT und DAG ausreichend war, um eine Acyl-Ghrelin Produktion zu erreichen [73].

GOAT gehört zur Familie der Membran-gebundenen *O*-Acyltransferasen (MBOAT), die Fettsäuren an Lipide und Proteine binden [79]. Das menschliche Gen, das für GOAT kodiert (*MBOAT4*) befindet sich auf Chromosom 8p12 und seine Sequenz ist bei Wirbeltieren hoch konserviert [80]. GOAT ist ein integrales Membranprotein und lokalisiert in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie der Plasmamembran [81]. Es besteht aus elf Transmembran-Helices und einem *reentrant loop*, wobei sich der C-Terminus im Zytosol und der N-Terminus im ER-Lumen befindet [82]. Das Expressionsmuster von GOAT ist ähnlich zu dem von Ghrelin vornehmlich im Magen [78]. Fettsäuresubstrate für GOAT sind von mittelkettigen Triglyceriden abgeleitet und werden teilweise direkt aus den mit der Nahrung aufgenommenen Lipiden rekrutiert [73].

GHS-R

Das *GHSR1*-Gen liegt auf Chromosom 3 (3q26.2) und kodiert beim Menschen für einen GPCR [69, 73]. Es sind zwei unterschiedliche Isoformen des GHS-R bekannt: GHS-R1a und GHS-R1b [83].

Der humane GHS-R1a besteht aus 366 AS mit einer Molekularmasse von ca. 41 kDa [83] und ist in der Lage, an verschiedene sekundäre Botenproteine zu koppeln (Gq, Gi, G α 12/13 und β -Arrestin) [72]. Die Pharmakologie des GHS-R1a ist komplex (G-Protein-abhängige und unabhängige *downstream signaling pathways*) und es konnte gezeigt werden, dass einige der Signalwege an der Vermittlung verschiedener physiologischer Reaktionen von Ghrelin beteiligt sind (*biased signaling*) [76]. So wird die Appetitregulation hauptsächlich durch die Aktivierung von G α q/11 vermittelt, während andere nachgeschaltete Signalwege wie G α i/o, G α 13 oder β -Arrestin, für die Förderung des Magenentleerungseffekts verantwortlich sein könnten [76]. Außerdem weist der Rezeptor eine hohe basale konstitutive Aktivität auf [84] und kann Homodimere und mit anderen GPCRs Heterodimere bilden [76]. Exprimiert wird er vorwiegend im Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen sowie weiteren Hirnregionen, wurde aber in geringeren Konzentrationen auch in vielen weiteren Geweben des Körpers nachgewiesen [73].

In der Vergangenheit sind zahlreiche GHS-R1a Agonisten und Antagonisten synthetisiert worden, unter anderem auch die in dieser Arbeit verwendeten Liganden L-692,585 und YIL-781. Der Signalweg von L-692,585 ist sehr ähnlich zu dem des endogenen Liganden Ghrelin [84]. L-692,585 wirkt als sehr starker GHS-R-Agonist und wird aufgrund seiner 50 % höheren Wirksamkeit als Ghrelin auch als Superagonist bezeichnet [85]. Für den *biased ligand*/Antagonist YIL-781 hat sich gezeigt, dass er bevorzugt die Signalwege G α q/11 und G α 12 aktiviert, ohne die Beteiligung anderer G-Protein-Kopplungen zu beeinflussen, und dass dies in Mäusen ausreicht, um die Nahrungsaufnahme zu verringern [76]. 2018 wurde erstmals das in der Leber exprimierte antimikrobielle Peptid 2 (*Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2* [LEAP2]) als erster endogener GHS-R1a Ligand mit inversen Agonist/Antagonist-Eigenschaften identifiziert [86]. LEAP2 blockiert die Ghrelin-vermittelten Wirkungen, einschließlich der GHS-R1a-Aktivierung, der GH-Freisetzung, der Nahrungsaufnahme und der Aufrechterhaltung des Glukosespiegels bei chronischer Kalorienrestriktion [86]. Darüber hinaus sind die zirkulierenden LEAP2-Spiegel im Gegensatz zu den Ghrelin-Spiegeln bei erhöhtem Blutzucker und BMI erhöht und beim Fasten reduziert [87].

Bei GHS-R1b handelt es sich um eine C-terminal trunkierte Form des GHS-R1a, die Ghrelin nicht bindet und als pharmakologisch inaktiv gilt [88]. Es ist mittlerweile aber bekannt, dass GHS-R1b über Heterodimerisierung mit GHS-R1a die Aktivität von GHS-R1a modellieren kann und eventuell Einfluss auf die Dimerisierung und Komplexbildung mit anderen GPCRs nimmt und damit möglicherweise die Ghrelin-induzierte Signalübertragung beeinflussen kann [73, 76].

1.2.3 Ghrelin und seine physiologischen Funktionen

Freisetzung von GH

Der erste beschriebene Effekt des Ghrelins war die Freisetzung von GH aus der Hypophyse oder dem Nucleus arcuatus hypothalami [69]. Es konnte gezeigt werden, dass es durch intravenöse Injektion und kontinuierliche Gabe von Ghrelin über 24h zu einer GH-Freisetzung und zu einem Anstieg der pulsatischen GH-Sekretion kam [73]. Klinische Studien zeigten immer wieder einen Einfluss von Ghrelin auf die Regulation von Größe und Gewicht, andererseits war das Wachstum von GHS-R-, Ghrelin- und GOAT- *Knockout*-Mäusen nicht eingeschränkt [73]. In einem Fallbericht wird allerdings ein familiärer Kleinwuchs berichtet, der mit einer Missense-Mutation im *GHSRI*-Gen in Verbindung gebracht wurde (Pantel et al. 2006).

Ghrelin als Hungerhormon

Nachdem bereits die appetitsteigernde Wirkung einiger GHS beschrieben wurde, wurde kurze Zeit nach der Entdeckung des Ghrelins auch seine gewichtssteigernde und appetitanregende Wirkung entdeckt [89]. Ghrelin ist ein orexigenes Hormon, das zirkadian hauptsächlich als Reaktion auf eine geringe Nährstoffverfügbarkeit im Magen synthetisiert wird [90]. So konnte beobachtet werden, dass in Fastensituationen das zirkulierende Ghrelin ansteigt, nach Nahrungsaufnahme wieder abfällt und bei schlanken Personen höhere Ghrelinspiegel nachweisbar sind als bei Übergewichtigen [69, 91]. Eine exogene Ghrelin-Gabe führt nach einer Stunde zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und eine kontinuierliche Gabe zu einem anhaltenden Effekt, der zu einer Gewichtszunahme und Adipositas führt [74]. In Kontrast dazu weisen aber Ghrelin-, GHS-R-, oder GOAT-defiziente Mäuse, oder Mäuse, die Ghrelin und/oder GOAT überexprimieren, im Vergleich zu Kontrollen keine Veränderungen in der Nahrungsaufnahme auf [73]. Dieser Fakt führte zu der Annahme, dass Ghrelin nicht die Nahrungsaufnahme selbst kontrolliert, sondern Hypoglykämien verhindert, was auch durch ausgeprägte Hypoglykämien in hungernden, Ghrelin-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte [76]. Bei Mangelernährung und Kachexie wurden erhöhte Serum-Ghrelin-Level nachgewiesen [92]. In adipösen Patientinnen und Patienten wurden jedoch ebenfalls erhöhte zirkulierende Spiegel von acyliertem Ghrelin und erniedrigte zirkulierende DAG-Spiegel im Vergleich zu schlanken Personen festgestellt [70].

Die Rolle im Glukosestoffwechsel

Ghrelin spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Glukosestoffwechsels und der Insulinsekretion. Untersuchungen zeigen, dass niedrige Plasma-Ghrelin-Spiegel mit erhöhten Nüchtern-Insulin-Konzentrationen, Insulinresistenz und Adipositas korrelieren [93]. Ghrelin hemmt spezifisch die durch Glukose induzierte Insulinfreisetzung aus den pankreatischen Beta-Zellen, was durch $G\alpha_i$ -abhängige GHS-R1a-Signalwege und Interaktionen mit dem Somatostatin-Rezeptor Subtyp-5 vermittelt wird. Dies trägt zur Modulation der Glykämie bei, indem es direkt in die mikrovaskuläre Zirkulation der Pankreasinseln eingreift und somit die Insulinfreisetzung beeinflusst [94].

Bei chronischer Kalorienrestriktion hält Ghrelin die Blutglukosespiegel aufrecht. Es stimuliert die Freisetzung von GH, was wiederum die Glukoneogenese fördert und somit die Glukosehomöostase unterstützt [86]. Bei Typ-1-Diabetes zeigt Ghrelin trotz eines generellen Abfalls seiner Spiegel schützende Effekte auf die Beta-Zellen, was die Komplexität seiner Wirkungsweise unterstreicht [94]. Die pharmakologische Hemmung der Ghrelin-Wirkung könnte potenziell therapeutische Vorteile bei der Behandlung von Typ-2-Diabetes bieten. In experimentellen Modellen führte die Antagonisierung von GHS-R1a zu Gewichtsverlust und verbesserte die Glukosetoleranz, möglicherweise durch die Stimulation der glukoseabhängigen Insulinsekretion [94].

Wirkung auf Knochen

Ghrelin stimuliert die Knochenbildung durch Induktion der Zellproliferation und Differenzierung von Osteoblasten und fördert die Mineralisierung der Knochenmatrix [95]. Zudem wurde nachgewiesen, dass Ghrelin die Apoptose von Chondrozyten hemmt, die Expression von MMPs und entzündlichen Zytokinen herunterreguliert und die Expression von Matrixkomponenten aufrechterhält, wodurch die Knorpeldegeneration über die Interaktion mit GHS-R1a gehemmt wird [96]. Insgesamt deuten diese Daten auf die schützende Rolle von Ghrelin in Knochen und Knorpel hin [97]. Eine verminderte Knochendichte ist bei RA bekannt und mit der Schwere der Erkrankung assoziiert [98].

Weitere Effekte

Über die genannten Effekte hinaus sind noch zahlreiche weitere Einflüsse des ghrelinergen Systems bekannt oder werden diskutiert. So ist einer der früh beobachteten Effekte eine Stimulation der Magenmotilität und Magensäuresekretion in Ratten [99], was später auch im Menschen gezeigt werden konnte [100]. Es konnte außerdem ein zusätzlicher Einfluss auf weitere Hormone des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse festgestellt werden [69]. Des Weiteren wird es auch in der Plazenta synthetisiert und könnte eine Rolle beim foetalen Wachstum spielen [69]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ghrelin positive Effekte auf die Herzfunktion bei Erkrankungen des Herzens hat [69]. Zudem hat Ghrelin Effekte auf das autonome Nervensystem, wirkt schlaffördernd, angstlösend, spielt eine Rolle beim Lernen, Stress und Depressionen, bei der Thymopoese, der Alterung, greift in neuronale Belohnungsschaltkreise ein und spielt bei neurodegenerativen Erkrankungen eine neuroprotektive Rolle [69, 73].

1.2.4 Die Wirkung von Ghrelin auf das Immunsystem und Inflammation

Das ghrelinerge System und das Immunsystem

Das ghrelinerge System wurde bereits in immun- und entzündungsrelevanten Geweben und Zellen nachgewiesen. So wird Ghrelin in einer Vielzahl von Immunzellen und -geweben wie T- und B-Lymphozyten, Neutrophilen, Lymphknoten und Milz exprimiert [101]. Zudem konnte gezeigt werden, dass acyliertes Ghrelin die Thymopoese beeinflussen kann, was auf eine Rolle des Ghrelins bei der Reifung des Thymus hindeutet [102]. In Ghrelin *Knockout*-Mäusen wurde sogar eine beschleunigte Thymusrückbildung beobachtet, die durch eine Verabreichung von acyliertem Ghrelin teilweise rückgängig gemacht werden konnte [102]. Dixit et al. wiesen außerdem nach, dass eine Aktivierung von T-Lymphozyten durch Bindung des T-Zell-Rezeptors zu einer Hochregulation des GHS-R auf Protein- und mRNA-Ebene führt [103]. Der GHS-R könnte daher eine regulierende Rolle bei der Aktivierung und Zellentwicklung bzw. -differenzierung von T-Zellen und anderen Immunzellen spielen [74].

Das ghrelinerge System und Inflammation

Der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) ist ein Schlüsseltranskriptionsfaktor bei der Regulation der Inflammation. Bei einem Ghrelin-*Knockdown* mit siRNA in humanen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass I κ B verstärkt phosphoryliert wird und eine Ghrelin Supplementation pI κ B inhibiert. Dies deutet darauf hin, dass Ghrelin dort eine Rolle bei der Regulation der Aktivierung von NF- κ B spielt [104].

In verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie der Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Spondylitis Ankylosans oder Pankreatitis lassen sich erhöhte Serum- oder Plasmaghrelinspiegel nachweisen [74]. Diese Spiegel korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung. So werden in den frühen klinischen Stadien häufig erhöhte Ghrelinspiegel nachgewiesen, die sich in Remission der Erkrankung wieder neutralisieren [74, 105]. Auch bei unkomplizierten postoperativen Reaktionen und intraabdominaler Sepsis sind sowohl die Ghrelin- als auch die Leptin-Plasmaspiegel nachweislich erhöht und korrelieren positiv mit dem C-Reaktiven Protein (CRP) [106]. Zusätzlich wurde aber auch eine Korrelation der Ghrelinspiegel mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere TNF- α , IL-6 und IL-1 festgestellt, weshalb von einer Rolle des Ghrelins bei der Regulation der Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen ausgegangen wird. Dies wurde bereits in mehreren tier- und human-experimentellen Modellen gezeigt [74, 101, 107, 108]. Darüber hinaus haben mehrere Studien den Einfluss einer Ghrelin-Verabreichung auf die Expression verschiedener Zytokine untersucht. Die meisten dieser Studien zeigen, dass die Verabreichung von Ghrelin die Expression und/oder die Produktion dieser Zytokine unterdrücken kann [74]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Ghrelin über die Hemmung der Differenzierung von Th17-Zellen anti-entzündlich wirkt [109]. Außerdem reduziert ein Ghrelin-*Knockdown* die Produktion von IL-17 in primären menschlichen T-Lymphozyten [104]. Zudem scheint Ghrelin die Entzündungsreaktion über eine Verringerung von oxidativem Stress regulieren zu können [110]. Ghrelin antagonisiert außerdem über die Aktivierung des hypothalamischen Neuropeptid-Y/Y1-Rezeptorweges Leptin, welches wiederum über die Produktion von Stickstoffmonoxid eine Entzündungsreaktion fördern kann [111]. Es wurde auch berichtet, dass die Behandlung von menschlichen mononukleären Zellen und T-Zellen mit acyliertem Ghrelin die proinflammatorische Leptin-induzierte Antwort und die Th1-Antwort deutlich abschwächt [103]. Ghrelin unterdrückt in einigen Organen bei induzierter Sepsis die Entzündungsreaktion zudem durch Inhibition der Sympathikusaktivität [112], wobei die Wirkung von Ghrelin auf die Modulation der Sympathikusaktivität komplex und organspezifisch zu sein scheint [113]. Ghrelin verbessert außerdem die Gewebedurchblutung und -funktion bei schwerer Sepsis durch die Herunterregulierung von Endothelin-1 und die Beeinflussung der CD4-T-Zellen. Es gilt daher als vielversprechender therapeutischer Wirkstoff bei Sepsis [114].

1.2.5 Ghrelin und Rheumatoide Arthritis

In verschiedenen Arbeiten wurden im Serum von Patientinnen und Patienten mit etablierter RA veränderte Ghrelinspiegel nachgewiesen. So berichteten Otero et al., dass Ghrelinspiegel im Serum von RA-Patientinnen und Patienten sowie in Ratten mit induzierter RA im Vergleich zu gesunden Kontrollen verringert sind [111]. Diese Ratten hatten nach der Induktion der Arthritis zudem weniger an Gewicht zugenommen, weshalb die Autorinnen bzw. Autoren vermuteten, dass die verringerten Ghrelin-Plasmaspiegel zu der Gewichtsabnahme beigetragen haben. Andere Arbeiten berichten jedoch über erhöhte oder unveränderte Ghrelinspiegel bei RA-Patientinnen und Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [105, 115].

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ghrelinspiegel nach Therapie der RA mit TNF- α -Inhibitoren ansteigen [116]. Durch die Therapie wurde ebenfalls eine Verbesserung der Insulinresistenz und endothelialen Funktion und ein positiver Einfluss auf das Lipidprofil der Patientinnen und Patienten nachgewiesen [117-119], was mit den veränderten Ghrelinspiegeln in Zusammenhang stehen könnte. So konnten bei Patienten mit Juveniler idiopathischer Arthritis erniedrigte Ghrelin-Serum-Werte nachgewiesen werden, die nach einer Therapie mit TNF- α -Inhibitoren wieder ähnliche Werte wie bei Kontrollpersonen aufwiesen [120]. Aus diesem Grund könnte die systemische Produktion von Ghrelin durch proinflammatorische Zytokine inhibiert werden. Im Gegensatz dazu wurden aber auch gesteigerte Serum-Ghrelinspiegel bei RA-Patientinnen im Vergleich zu Kontrollen festgestellt, die unter TNF- α -Inhibitor Therapie wieder sanken [121]. Zudem sind die Anti-Ghrelin-IgG-AK bei RA unter Biologika-Therapie vermindert und Immunkomplexbildung tritt vermehrt auf [122]. In arthritischen Ratten konnte zudem gezeigt werden, dass Ghrelin die Freisetzung von IL-6 und Stickstoffmonoxid von aktivierten peritonealen Makrophagen *in vitro* hemmt und dass Ghrelin die Arthritis im Rattenmodell abschwächen kann [115, 123]. Außerdem konnten positive Auswirkungen von Ghrelin auf Muskelkraft und Energiestoffwechsel beobachtet werden. So kann Ghrelin Muskelschwund und Kachexie verhindern [124], die auch bei der RA eine Rolle spielen.

1.3 Ziele der Arbeit

Bei der RA führt die chronische Entzündung zu einer Proliferation der SF und zu einer Zerstörung von Knorpel und Knochen. In zahlreichen Studien konnte eine immunmodulatorische Wirkung des Hormons Ghrelin festgestellt werden. Ghrelin und der GHS-R werden in vielen Geweben und Zellen des Immunsystems exprimiert [125, 126]. Ghrelin reguliert Entzündungsreaktionen *in vitro* und *in vivo*, hat Einfluss auf die T-Zell-Entwicklung und unterdrückt die Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch T-Zellen und Monozyten [103]. Es gibt auch einige wenige Studien zu dem Einfluss von Ghrelin auf die RA, die darauf hinweisen, dass die systemische Produktion von Ghrelin durch die von SF freigesetzten proinflammatorischen Zytokine inhibiert werden könnte [115]. Bisher ist wenig über die Regulation des ghrelinergen Systems außerhalb des Magens bekannt. So ist bisher unklar, ob humane SF Teile des ghrelinergen Systems exprimieren und welchen Einfluss dies auf die Funktion der Zellen hat. Des Weiteren gibt es keine Daten über den Einfluss von Zytokinen und des Immunsystems auf das ghrelinerge System im Kontext der RA. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob SF von Patientinnen und Patienten mit RA (*rheumatoid arthritis synovial fibroblasts* [RASf]) Ghrelin, GOAT und den GHS-R exprimieren. In einem weiteren Schritt soll die Regulation des ghrelinergen Systems durch proinflammatorische Zytokine in RASf analysiert werden, sowie der Einfluss der GHS-R Stimulation auf die Expression bzw. Produktion von IL-6, IL-8 und MMP-3. Zudem gibt diese Arbeit einen Ausblick auf weitere mögliche Einflüsse des ghrelinergen Systems bei der RA. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist eine Vertiefung des Verständnisses der immunmodulatorischen Wirkungen des Ghrelins in RA, die in Zukunft möglicherweise neue therapeutische Optionen bei der Entzündungskontrolle der RA eröffnen können.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnen und Patienten

Die verwendeten humanen Zellen und synovialen Gewebe wurden aus einem operativen Eingriff zum Kniegelenkersatz gewonnen und stammen ausschließlich von Patientinnen und Patienten mit diagnostizierter OA und RA. Die Diagnose erfolgte gemäß den überarbeiteten ACR/EULAR-Kriterien [10]. Alle Patientinnen und Patienten wurden über den Zweck der Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer: 2018-87-KFogU).

In diese Studie wurden 18 Patientinnen und Patienten mit OA und 23 Patientinnen und Patienten mit RA eingeschlossen. Die Geschlechter- und Altersverteilung innerhalb der beiden Gruppen sowie Laborparameter (CRP, Leukozytenzahl und Rheumafaktor) können Tabelle 3 entnommen werden. Angaben zur Medikation liegen nur bei wenigen Patientinnen und Patienten mit RA vor (MTX: 6; Kortison: 4; Sulfasalazin: 1; Biologicals: 2).

	Osteoarthrose (N = 18)	Rheumatoide Arthritis (N = 23)
Geschlecht (Männer/Frauen)	2/13 (3 unbekannt)	3/15 (5 unbekannt)
Alter ($M \pm SD$)	74,7 \pm 5,2 (3 unbekannt)	66,5 \pm 10 (6 unbekannt)
C-Reaktives Protein (mg/dl) ($M \pm SD$)	2,1 \pm 2,3 (2 unbekannt)	60,1 \pm 237,4 (5 unbekannt)
Leukozytenzahl (Leukozyten/ μ l) ($M \pm SD$)	8,1 \pm 1,7 (2 unbekannt)	8,0 \pm 1,9 (5 unbekannt)
Rheumafaktor (IU/ml) ($M \pm SD$)	10,8 \pm 2,5 (4 unbekannt)	161,7 \pm 325,5 (7 unbekannt)

Tabelle 3: **Charakterisierung der eingeschlossenen Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer.**

In der Tabelle ist die Verteilung und Charakterisierung (Geschlecht, Alter, Höhe des C-reaktiven Proteins, Leukozytenzahl pro Mikroliter, Rheumafaktorkonzentration), jeweils mit Mittelwert (M) und der Standardabweichung (SD), der in die Versuche eingeschlossenen Patientinnen und Patienten dargestellt.

2.2 Präparation des Synovialgewebes und der Fibroblasten

2.2.1 Medien und Lösungen

- Kulturmedium:
 - RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma-Aldrich, St. Louis, United States of America [USA])
 - 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 5 % bzw. 10 % fetales Kälberserum (FCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 1 % GlutaMax
 - 1 % Natriumpyruvat
 - 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Eindeckmedium: Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
- Liberase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Erythrozytenlysepuffer
 - 20,7 mg NH_4Cl (Ammoniumchlorid)
 - 1,97 mg NH_4HCO_3 (Ammoniumhydrogencarbonat)

- 0,09 mg EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
- 1 L H₂O

2.2.2 Präparation von Gewebe für Kryoschnitte und Fibroblastenisolation

Zur Gewinnung von Synovialgewebeproben von Patientinnen und Patienten mit OA und RA wurde das Gewebe direkt nach Eröffnung der Kniegelenkscapsel gewonnen. Nach einer Säuberung der Proben wurden sie in Medium gegeben. Die exzidierten Gewebestücke waren bis zu 9 cm² groß. Fettgewebe sowie stark gefäßhaltiges Gewebe wurden entfernt. Anschließend wurden Teile des Gewebes geschnitten und mit Gefriermedium versetzt. Bis zur weiteren Verwendung für Gefrierschnitte wurde das Gewebe bei -80 °C gelagert. Der Rest des Gewebes wurde zerkleinert und in einer Liberase über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entstandene Suspension wurde am nächsten Tag durch eine Porengröße von 70 µm filtriert und anschließend 10 min bei 300g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde für 5 min mit einem Erythrozytenlysepuffer versetzt. Es folgte eine weitere 10-minütige Zentrifugation bei 300g. Anschließend wurde das Zellpellet in mit FCS versetztem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen nach Herstellerangaben ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Medien und Lösungen

- Kulturmedium:
 - RPMI16-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 2,5 % HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 - 1 % Glutamax (Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)
 - 1 % Penicillin/Streptomycin 10,000 U/ml (Gibco, Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)
 - FCS 0 % Serumfrei, 2 % oder 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Sterile Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) Dulbecco's PBS 1x (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA))
- Trypsin-EDTA Solution 10x (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 1:10 verdünnt in PBS)

2.3.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen fanden unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank statt. Die SF wurden je nach Zellzahl in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) mit Wachstumsflächen von 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² in oben angegebenem Kulturmedium kultiviert und in einem Brutschrank (Heraeus Instruments, Function Line, Hanau, Deutschland) in Normoxie (20 % O₂-Gehalt) oder unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) (Binder, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert. Das Kulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen jeden 2. - 3. Tag gewechselt. Die Konfluenz der Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und verworfen. Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und abhängig vom Füllvolumen der Kulturflasche mit einer 1x Trypsin/EDTA Lösung versetzt. Anschließend wurden die Zellen für ca. 10 min im Brutschrank inkubiert und die vollständige Ablösung der Zellen vom Flaschenboden lichtmikroskopisch überprüft. Die Trypsinisierung wurde mittels Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und die zellhaltige Lösung in *Falcon-Tubes* (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich, 15 ml bzw. 50 ml) überführt. Dann wurden die Zellen bei 18 °C und 350 RPM (*revolutions per minute*) für 10 min zentrifugiert und der

Überstand abgesaugt. Die SF wurden nachfolgend in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt.

2.4 Immunfluoreszenz

2.4.1 Grundlagen

Bei der Immunhistochemie (IHC) handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine in einem Gewebe mittels AK detektiert werden können. Werden hierzu fluoreszierende AK verwendet, handelt es sich um ein Immunfluoreszenzverfahren (IF). Es existieren direkte Methoden, bei denen der primäre AK bereits mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Bei indirekten Methoden wird ein primärer AK verwendet, der spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet, welcher dann von einem fluoreszierenden sekundären AK gebunden wird. Die spezifische Fluoreszenz kann dann mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Bei der fluoreszenten Immunzytochemie (ICC) handelt es sich analog dazu um ein Verfahren, für welches Zellen statt Gewebe untersucht werden.

2.4.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zum Erstellen der Gewebeschnitte wurde ein Kryostat (CM3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Hierfür wurde das auf -80 °C gelagerte, in Gefriermedium eingebettete Synovialgewebe zunächst im Kryostaten angetaut und anschließend in dünne Scheiben geschnitten. Dies geschah unter konstanten Temperaturbedingungen (Objekttemperatur: -20 °C und Kühltemperatur im Innenraum -25 °C). Die fertigen Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, getrocknet und maximal eine Woche bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert, oder direkt im Anschluss fixiert (15 min mittels 3 %iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung).

2.4.3 Durchführung der fluoreszenten Immunhistochemie

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 3 % PFA: 7,5 g PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,65 µl 5 M Natriumhydroxid (NaOH) in 250 ml PBS, pH 7,0 eingestellt mit Chlorwasserstoff (HCl)
- PBS/0,3 % Triton X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- PBS/2 % Goat Serum (Normal Goat Serum, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)
- PBS/0,3 % Triton X 100/2 % Goat Serum (Normal Goat Serum, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)

Zunächst wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und die Gewebe mit einem Wachsstift (Super Pap Pen, Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA) umrandet. Nach 10-minütiger Rehydrierung mit PBS folgte eine 60-minütige Inkubation in der feuchten Kammer mit PBS/0,3 % Triton/2 % Goat Serum bei 4 °C zur Blockierung unspezifischer Bindestellen. Die verwendeten primären AK wurden in PBS/0,3 % Triton/2 % Goat Serum verdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen, zusammen mit einer entsprechenden Isotyp-Kontrolle, auf die Gewebe gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen können Tabelle 4 entnommen werden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte mit PBS/0,3 % Triton à 10 min, um nicht gebundene Primär-AK zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte mit einem fluoreszierenden sekundären AK (verdünnt in PBS/2 % Goat Serum) versetzt und für 2h im Dunkeln bei RT inkubiert. Hiernach wurde erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ein

Einbettungsmittel (Prolong Gold, Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA) auf die Objektträger gegeben. Dieses enthält chemische Komponenten zum Schutz gegen das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe und zudem den DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Ein Deckglas wurde luftblasenfrei auf die Objektträger aufgelegt und über Nacht bei RT getrocknet.

Primär-antikörper	Artikel-nummer, Hersteller	Verdünnungen	Sekundärer Antikörper	Artikel-nummer, Hersteller
Anti-Ghrelin , rabbit monoclonal	Ab209790 (0,433 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:43,3 1:50 1:86,6 1:100 1:173,2 1:200 1:400	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
Anti-Ghrelin , rabbit polyclonal	Ab129383 (1 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:100 1:200 1:400 1:1000 1:2000 1:4000	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
Anti-Ghrelin-Rezeptor , rabbit polyclonal	Ab85104 (0,5 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:50 1:100 1:200 1:400	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
Anti-Ghrelin-Rezeptor , rabbit polyclonal	AGR-031 (1 mg/ml), Alomone Labs, Jerusalem, Israel	1:50 1:100 1:200 1:400 1:500 1:1000	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
Anti-Ghrelin-Rezeptor , rabbit polyclonal	Ab95250 (1 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:100 1:200 1.400 1:500 1:1000	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
Anti-GOAT , rabbit polyclonal	Ab170690 (1 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:25 1:50 1:100 1:200 1:400	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
CD55 , mouse monoclonal	9661-01 (0,1 mg/ml), Southern Biotechnology	1:100	Goat Anti Mouse IgG, (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11001 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA

Isotype Control, rabbit IgG, polyclonal	Ab37415 (5 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Entsprechend der nachzuweisenden Antikörper	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA
Isotype Control, rabbit IgG, monoclonal	Ab172730 (1,646 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Entsprechend der nachzuweisenden Antikörper	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/The rmo Fisher, Waltham, USA

Tabelle 4: **Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz (Gewebe)**

In der Tabelle sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit Herstellerangaben für die Immunhistochemie in den verwendeten Dilutionen dargestellt.

2.4.4 Fluoreszente Immunzytochemie

Verwendeter Puffer und Lösungen:

- Waschpuffer: PBS/0,1 % Triton X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Blockpuffer: PBS Casein ELISA Reagent 5x (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, 1:5 verdünnt in demineralisiertem Wasser) mit 0,1 % Triton X 100

Für die ICC wurden die SF mit 5000 Zellen pro Kammer auf Kammerobjektträger (Nunc Chamber-Slides, Thermo-Fisher, Waltham, USA) ausgesät. Anschließend wurden die Kammerobjektträger über Nacht im Brutschrank inkubiert, um die Zelladhäsion an den Objektträgerböden zu gewährleisten. Für die Stimulation einiger Kammern wurde zudem IFN- γ (10ng/ml, #400-20, PeproTech, Hamburg, Deutschland) verwendet und dann über 48h inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst lichtmikroskopisch die Adhäsion der Zellen untersucht und anschließend das Kulturmedium abgesaugt. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Formalin (3,7 % in PBS) für 20 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen vollständig getrocknet und dann bei -20°C eingefroren. Für die Färbung wurden die SF aufgetaut und anschließend zweimal zur Permeabilisierung mit Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermindern, folgte eine Inkubation mit Blockpuffer für 1h bei RT. Im Anschluss wurden die primären AK und entsprechende Isotypen nach den Angaben in Tabelle 5 mit PBS verdünnt in die Kammern gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer. Anschließend wurde der sekundäre AK für 1,5h inkubiert. Hiernach wurden die Kammern von den Objektträgern entfernt und drei weitere Waschgänge angeschlossen. Hierfür wurden die Objektträger in Küvetten gegeben und einmal auf dem *Shaker* (Corning, LSE Digital Microplate Shaker, New York, USA) mit Waschpuffer gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Anschließend folgte das Eindecken mit Einbettungsmittel analog zur IHC.

Primär-antikörper	Artikel-nummer, Hersteller	Verdünnungen	Sekundärer Antikörper	Artikel-nummer, Hersteller
Anti-GOAT, rabbit polyclonal	Ab170690 (1 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:200 1:500	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA

Anti-Ghrelin-Rezeptor , rabbit polyclonal	Ab95250 (1 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:500 1:1000	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA
Anti-Ghrelin , rabbit monoclonal	Ab209790 (0,433 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:2000 1:4000	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA
Anti-Ghrelin , rabbit polyclonal	Ab129383 (1 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:1000 1:2000	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA
Isotype Control IgG , rabbit polyclonal	Ab37415 (5 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Entsprechend der nachzuweisenden Antikörper	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA
Isotype Control IgG , rabbit monoclonal	Ab172730 (1,646 mg/ml) Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Entsprechend der nachzuweisenden Antikörper	Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 , 1:1500 in PBS + 1 % GOAT Serum	A-11037 , Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA

Tabelle 5: **Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz (Zellen)**

In der Tabelle sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit Herstellerangaben für die Immunzytochemie in den verwendeten Dilutionen dargestellt.

2.4.5 Fotodokumentation

Die fotografische Dokumentation der immunfluoreszenten Färbungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Deutschland). Zur Bearbeitung und Erstellung der übereinandergelegten Bilder wurde das Programm Image J verwendet.

2.5 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese für den Western Blot

2.5.1 Stimulation der Synovialen Fibroblasten

Verwendete Substanzen:

- TNF- α (300-01A, Peprotech, Hamburg, Deutschland)
- IFN- γ (300-02, Peprotech, Hamburg, Deutschland)
- IL-1 β (200-01B, Peprotech, Hamburg, Deutschland)

2.5.2 Proteinextraktion

Verwendeter Puffer:

- Lysepuffer: *Radio-Immunoprecipitation Assay* (RIPA) Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Alle Schritte der Proteinextraktion wurden zum Schutz der Proteine auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmalig mit PBS gewaschen.

Anschließend wurde Accutase (Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA) im Verhältnis 1:1 mit PBS auf die Zellen gegeben und 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Überführen des Zellgemisches in *Falcon-Tubes* wurde 10 min bei 300g (4 °C) zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit PBS versetzt und darin kurz resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das PBS abgesaugt und anschließend jedes *Falcon-Tube* erneut jeweils mit 1 ml PBS versetzt. Das Zellpellet wurde vorsichtig resuspendiert und in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Nun wurde erneut bei 300g für 10 min (4 °C) zentrifugiert. Hiernach wurde erneut vorsichtig der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 250 µl des Lysepuffers versetzt. Anschließend wurde das Pellet durch behutsames Resuspendieren gelöst. Es folgte ein Schockgefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff mit anschließendem Auftauen auf Eis. Dann wurden die Zellen bei 10.000g für 10 min (4 °C) zentrifugiert und der Überstand mit dem gewonnenen Proteinlysate abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Das Zellpellet wurde verworfen. Die resultierenden Lysate wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate erfolgte mittels kolorimetrischer Analyse mit Roti®Quant universal (Roth, Karlsruhe, Deutschland) anhand eines Vergleichs mit einer Verdünnungsreihe eines Protein-Standards. Hierbei handelt es sich um ein Bicinchoninsäure-Protein-Assay ähnliches Verfahren, welches auf einer Biuret-Reaktion in Kombination mit einer hochspezifischen kolorimetrischen Enhancer-Reaktion basiert. Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Zusätzlich zu den im Kit enthaltenen Reagenzien wurden folgende Materialien verwendet:

- Bovines Serumalbumin (BSA) (Standardstocklösung (2 mg/ml): Bio-Rad, Hercules, USA)
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Für die Messung wurden 96-Well-Platten (96 Maxisorp NUNC-Immuno Plate, Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA) zusammen mit Mikroplatten-Versiegelungsfolien verwendet. Die Standards und Proben wurden als Duplikate in die Vertiefungen pipettiert. Für die Inkubation wurde der NeoLab (NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C und 200 RPM verwendet. Die Messung erfolgte in einem Mikroplatten-Reader (Bio-Rad, iMark Microplate Reader, Hercules, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm. Die Auswertung wurde mittels MPM 6 Software durchgeführt.

2.5.4 Gießen der Gele

Verwendete Materialien:

- Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung 30 % im Verhältnis 37,5:1 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris-HCl (1,5 M), pH 8,8 und pH 6,8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ammonium Persulfat (APS)(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Isopropanolol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurde das Elektrophoresesystem Mini-

Protean®Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils ein Trenn- und ein Sammelgel hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele ist in Tabelle 6 und die des Sammelgels in Tabelle 7 beschrieben. Die Konzentration des Acrylamids im Trenngel wurde abhängig von dem Molekulargewicht der Zielproteine gewählt. Für ein geringes Molekulargewicht wurde beispielsweise ein Gel mit einem hohen Acrylamidanteil verwendet, da durch die kleineren Poren die Auftrennung verbessert wird.

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und die angegebenen Bestandteile nacheinander in ein *Falcon-Tube* gegeben. Nachdem alle Bestandteile in das *Falcon-Tube* gegeben wurden, wurde das Trenngel kurz gevortext und dann in die Glasplatten des Elektrophoresesystems gegeben. Sodann wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Rand des Trenngels zu erzeugen und Evaporation zu vermeiden. Das Trenngel benötigte dann 20-30 min zum Auspolymerisieren. Währenddessen wurde das Sammelgel nach den unten genannten Angaben gegossen, zum Schluss mit TEMED versetzt und behutsam mit dem Vortexer gemischt. Das Isopropanol wurde vom Trenngel entfernt. Dann wurde das Sammelgel auf das Trenngel zwischen die Glasplatten gegeben. Ein Kamm mit 10 Slots wurde eingeführt, um die Taschen für den Probenauftrag zu erzeugen. Anschließend benötigte das Sammelgel ebenfalls 20-30 min zum Auspolymerisieren.

Trenngel	Acrylamidgehalt		
	12,5 %	15 %	20 %
Acrylamid (30 %)	8,3	10	13,33
Tris (1,5 M), pH 8,8	5	5	5
SDS (10 %)	0,2	0,2	0,2
Destilliertes Wasser	6,22	4,52	1,19
TEMED (10 %)	0,08	0,08	0,08
APS (100 mg/ml)	0,2	0,2	0,2

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele für den Western Blot

Dargestellt sind die einzelnen Bestandteile der jeweils verwendeten Trenngele (12,5 %, 15 % und 20 % Acrylamidgehalt). Alle Angaben sind in ml.

Sammelgel	5 % Acrylamidgehalt
Acrylamid (30 %)	1,0
Tris (1,5 M), pH 6,8	1,3
SDS (10 %)	0,16
Destilliertes Wasser	5,38
TEMED (10 %)	0,08
APS (100 mg/ml)	0,08

Tabelle 7: Zusammensetzung der Sammelgele für den Western Blot

Dargestellt sind die einzelnen Bestandteile der Sammelgele mit 5 % Acrylamidgehalt. Alle Angaben sind in ml.

2.5.5 Vorbereitung der Proben

Bevor die Proben in die Taschen gegeben wurden, wurde zu jeder Probe zunächst ein nach Lämmli modifizierter Protein-Gelladepuffer (ROTI®Load 1 (reduzierend), Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Dieser stabilisiert Peptidbindungen und schützt somit die Proteine während des Erhitzens vor Abbau [127, 128]. Der Gelladepuffer enthält β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken reduziert. Das zudem enthaltene SDS denaturiert und linearisiert als Detergens die Proteine und gibt damit jedem Protein eine negative Gesamtladung. Somit können die Proteine abhängig von der Molekulargröße getrennt werden, ohne dass die Eigenladung der Proteine einen Einfluss hat. Durch Glycerin wird die Dichte der Probe erhöht,

was ein Absinken der Proben in die Geltaschen bewirkt. Um die Sichtbarkeit der Proben zu gewährleisten, wird außerdem Bromphenolblau im Puffer verwendet.

Für diese Arbeit wurden Probenvolumen von 20 µl bzw. 30 µl gewählt, mit einer einheitlichen Gesamtproteinmenge von 5 µg. Die Konzentration des Protein-Probenauftragspuffers betrug jeweils ein Viertel dieses Probenvolumens. Nachdem die entsprechende Menge des Puffers hinzugefügt wurde, wurden die Proben abhängig von der Proteinkonzentration, wenn nötig mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der Standard (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad, Hercules, USA) wurde nach dem gleichen Verfahren behandelt. Die Proben und der Standard wurden dann kurz gemischt und anschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt.

2.5.6 Gelelektrophorese

Verwendete Puffer:

- Laufpuffer: 10x Tris/Glycine/SDS (TGS) Puffer (Bio-Rad, Hercules, USA, 1:10 verdünnt in demineralisiertem Wasser)
- Waschpuffer: Tris-buffered Saline-Tween20 (TBS-T, 0,5 M Trizma® base, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 1,5 M Natriumchlorid (NaCl), Merck Millipore, Billeroca, USA; 0,1 % Tween-20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; pH 7,6)

Die Gele wurden zusammen mit dem Laufpuffer in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben und der Standard wurden dann langsam in die Taschen des Sammelgels eingebracht. Für die Einlaufphase wurde eine Stromstärke von 15 mA pro Gel über 10-15 min gewählt. Anschließend wurde eine Stromstärke von 30 mA pro Gel eingestellt. Durch den verwendeten Marker wurde die Lauffront der Proteine sichtbar und sobald eine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht war, wurde die Elektrophorese beendet. Dies dauerte je nach Acrylamidgehalt des Gels und Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins ca. 40-80 min.

2.6 Western Blot

2.6.1 Grundlagen

Der Western Blot (WB) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Darstellung und Quantifizierung von Proteinen. Hierfür werden diese zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (*Blotting*). Da die Detektion des Zielproteins mittels AK-Antigen-Reaktion erfolgt, wird der WB auch Immunoblot genannt. Diese Reaktion kann schließlich mittels Lumineszenz sichtbar gemacht werden.

2.6.2 Blotting und Antikörper-Bindung

Verwendeter Puffer und Lösungen:

- Blotting-Puffer (10x): Tris-Base (0,25 M Trizma® base, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Glycin (1,92 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst in 1 Liter demineralisiertem Wasser (ddH₂O)
- Blotting-Puffer (1x): Blotting-Puffer (10x) 1:10 verdünnt in ddH₂O mit 20 % Methanol (MeOH, Merck Millipore, Billeroca, USA)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 5 % Milch/TBS-T: 2,5 g Magermilchpulver gelöst in 50 ml TBS-T (Skim Milk Powder, Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)

- 1 % BSA/TBS-T: 0,5 g BSA-Pulver gelöst in 50 ml TBS-T (Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)
- 5 % BSA/TBS-T: 2,5 g BSA-Pulver gelöst in 50 ml TBS-T (Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Bio-Rad, Hercules, USA) wurde das *Wet/Tank* Blotting System (Mini Trans-blot Cell, Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet. Zunächst wurden alle Materialien in Blottingpuffer equilibriert. Gel und Membran wurden zwischen *Whatman* Papier gelegt (Sandwich-Aufbau) und danach in der Blottingvorrichtung fixiert. Anschließend wurde der Blottingpuffer in den Blottingtank gegeben. Für den Transfer der Proteine wurde eine Stromstärke von 300 mA für 1,5h angelegt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit einem Bisazofarbstoff reversibel eingefärbt (Ponceau S, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Wenn die Proteinbanden durch die Färbung sichtbar gemacht werden konnten, wurde die Membran mit Waschlösung versetzt und dreimal für 5 min auf dem *Shaker* gewaschen (Abb. 1 [1]). Anschließend wurde die Membran für 1h bei RT in 5 % Milch, 1 % BSA oder 5 % BSA (abhängig vom primären AK und Herstellerangaben) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren (Abb. 1 [2]). Hiernach wurde die Membran erneut dreimal mit Waschlösung auf dem *Shaker* gewaschen (Abb. 1 [3]). Um das Zielprotein zu detektieren, wurde im nächsten Schritt der primäre AK auf die Membranen gegeben (Abb. 1 [4]). Hierzu wurde der AK zuvor nach Herstellerangaben verdünnt, oder verschiedene Verdünnungen getestet und dann bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die verwendeten AK mit den eingesetzten Dilutionen können Tabelle 8 entnommen werden. Am nächsten Tag wurden die primären AK verworfen und die Membranen erneut dreimal mit Waschlösung gewaschen (Abb. 1 [5]). Anschließend wurden die Membranen mit den ebenfalls in Tabelle 8 angegebenen sekundären AK versetzt und 2h bei RT unter Schütteln inkubiert (Abb. 1 [6]). Hierfür wurde der Sekundär-AK zuvor in 5 %iger Milch/TBS-T 1:2000 verdünnt. Dieser war mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Danach wurden die Membranen erneut dreimal gewaschen (Abb. 1 [7]). Für die Entwicklung des WB wurden die Membranen mit *enhanced chemiluminescence* (ECL)- Substrat (Clarity Max Western ECL Substrate, Bio-Rad, Hercules, USA) versetzt. Die beiden im Set enthaltenen Komponenten wurden 1:1 miteinander vermischt, auf die Membranen gegeben und für 5 min lichtgeschützt auf dem *Shaker* inkubiert (Abb. 1 [8]). Durch die Zugabe dieses Reagenzes wird die Oxidation von Luminol durch die HRP katalysiert und das hierdurch freiwerdende Lichtsignal kann mittels eines ChemiDoc-Detektionsgeräts (Bio-Rad, Hercules, USA) sichtbar gemacht werden (Abb. 1 [9]).

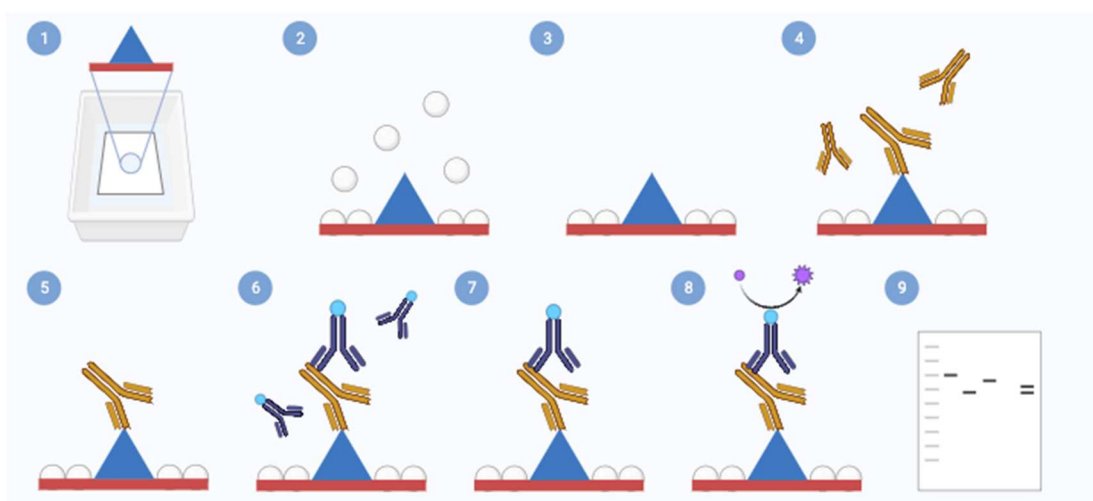


Abb. 1 Darstellung des Ablaufs eines Western Blots

Dargestellt sind die einzelnen Schritte des Western Blots

- 1) Waschen
- 2) Blocken unspezifischer Bindungsstellen
- 3) Waschen
- 4) Primärer Antikörper
- 5) Waschen
- 6) Sekundärer Antikörper
- 7) Waschen
- 8) Signalentwicklung durch Zugabe des Luminol Substrats
- 9) Darstellung mittels *Imager*

Eigene Abb. angelehnt an Protein Blotting Guide, Bio-Rad Bulletin 2895 Ver C, erstellt mit Biorender.com.

Primäre Antikörper	Artikelnummer, Hersteller	Verdünnungen	Zielprotein bei (kDa)	Sekundärer Antikörper	Artikelnummer, Hersteller
Anti-Ghrelin-Rezeptor , rabbit polyclonal	ab85104 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:300 in TBS-T 1:500 in 5 %Milch/1 % BSA 1:1000 in 5 % Milch/1 % BSA 1:1000 in 5 % Milch	40	peroxidase-conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Ghrelin-Rezeptor , rabbit polyclonal	AGR-031 , Alomone Labs, Jerusalem, Israel	1:2000 in 5 % Milch/TBS-T 1:500 in 5 % Milch/TBS-T	50	peroxidase-conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Ghrelin , rabbit monoclonal	ab209790 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:2500 in TBS-T 1:2000 in 5 % Milch/TBS-T 1:1000 in 5 % Milch/TBS-T	13	peroxidase-conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Ghrelin , mouse monoclonal	ab117620 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:500 in 5 % Milch/TBS-T 1:1000 in 5 % Milch/TBS-T	13	peroxidase-conjugates Goat Anti-Mouse	P 0447 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Ghrelin , rabbit polyclonal	ab129383 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:500 in 5 % Milch/TBS-T	13	peroxidase-conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Ghrelin , mouse monoclonal	ab57222 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:1000 in 5 % Milch/TBS-T	11	peroxidase-conjugates Goat Anti-Mouse	P 0447 , Dako, Jena, Deutschland

Anti-GOAT , rabbit polyclonal	ab178893 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:1000 in TBS-T 1:2000 in 5 % Milch/TBS-T 1:500 in TBS-T	37	peroxidase- conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
--	--	---	----	--	---

Tabelle 8: **Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot**

In der Tabelle sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit Herstellerangaben für den Western Blot in den verwendeten Dilutionen und dem Molekulargewicht des Zielproteins dargestellt.

Für die Auswertung des WB wurden neben den zu untersuchenden Zielproteinen auch Referenzproteine (*Housekeeper*) detektiert, um eine genauere Quantifizierung durchzuführen. Die Referenzproteine wurden durch Stimulation nicht beeinflusst und wurden nach ihrem Molekulargewicht, passend zum Zielprotein und verwendetem Gel, ausgewählt und sind in Tabelle 9 mit ihren entsprechenden Dilutionen dargestellt. Sie wurden analog zu den primären AK nach gleichem Vorgehen auf die Membranen aufgebracht und detektiert.

Referenz- antikörper (Housekeeper)	Artikel- nummer, Hersteller	Verdünnungen	Zielprotein bei (kDa)	Sekundärer Antikörper	Artikel- nummer, Hersteller
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) , rabbit monoclonal	cell sign. #2118 , Danvers, USA	1:1000 in 5 % BSA/TBS-T	37	peroxidase- conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-TATA binding Protein , rabbit monoclonal	ab125009 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:2000 in 5 % Milch/TBS-T	36	peroxidase- conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Cyclophilin B antibody , rabbit monoclonal	ab178397 , Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:5000 in 5 % Milch/TBS-T	18	peroxidase- conjugated Goat Anti Rabbit , polyklonal, HRP gekoppelt, anti-rabbit	P 0448 , Dako, Jena, Deutschland

Tabelle 9: **Verwendete Referenzproteine für den Western Blot**

In der Tabelle sind die Referenzproteine mit Herstellerangaben für den Western Blot in den verwendeten Dilutionen und dem Molekulargewicht des Zielproteins dargestellt.

2.6.3 Auswertung des Western Blots

Zur quantitativen Auswertung der detektierten Proteine wurde das Programm Image Lab (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet. Hierfür wurden die Banden markiert und mit dem erhaltenen Dichtewert ein Messwert generiert, der mit der Proteinmenge korreliert. Die Messwerte wurden

dann auf die Messwerte des Referenz-Proteins (*Housekeeper*) und auf die Messwerte der Kontrolle bezogen.

2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay

2.7.1 Grundlagen

Ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dient dem Nachweis und der Quantifizierung eines Antigens durch spezifische AK-Antigen-Interaktion. Er beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion, wobei das hierbei entstandene Reaktionsprodukt durch Farbumschlag nachgewiesen werden kann. Im Folgenden wird das Vorgehen zur Bestimmung von IL-6-, IL-8- und MMP-3-Konzentrationen aus den Überständen stimulierter SF mittels ELISA beschrieben.

2.7.2 Stimulation der Synovialen Fibroblasten

Alle zur Stimulation der SF benötigten Substanzen wurden nach Herstellerangaben gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Sie wurden unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank verwendet und in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

- YIL-781, GHS-R Antagonist bzw. *biased* Ligand (Tocris, Bristol, Vereinigtes Königreich) in Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M
- L-692,585, GHS-R Agonist (Tocris, Bristol, Vereinigtes Königreich) in Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M
- TNF- α *Recombinant Human* (TNF- α , PeproTech, Hamburg, Deutschland) in der Konzentration 10 ng/ml

Für die Versuche wurden die Fibroblasten zunächst maschinell gezählt (*Scepter Handheld Automated Cell Counter*, Merck Millipore, Billerica, USA). Anschließend wurden sie mit einer Zellzahl von 5.000 Zellen pro Well in 96-Well *Flat Bottom* Zellkulturplatten ausgesät (Greiner, Bio-One, Kremsmünster, Österreich) und für 72h im Brutschrank inkubiert. Für die Stimulation wurde das Kulturmedium durch ein serumreduziertes Medium (2 % FCS) ersetzt und mit YIL-781 und L-692,585 in den oben genannten Konzentrationen (Triplets pro Patientin/Patient) versetzt. Pro Patientin bzw. Patient wurde zusätzlich jeweils eine Zellkulturplatte nach 6h Inkubation mit TNF- α stimuliert und über Nacht inkubiert. Für die Bestimmung der MMP-3 Konzentration aus den Überständen mit TNF- α wurde eine Inkubationszeit von 48h gewählt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, analog auf 96-Well Platten überführt und für den ELISA verwendet, oder bei -20 °C eingefroren. Die Überstände der nicht mit TNF- α behandelten Zellen wurden nach 72h abgenommen und ebenso entsprechend weiterverarbeitet.

2.7.3 Durchführung des IL-6, IL-8 und MMP-3 ELISA

Im Rahmen dieses Versuches wurden kommerzielle humane IL-6, IL-8 (BD OptEIA, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und MMP-3 ELISA Kits (Human Total MMP-3 DuoSet ELISA, R&D Systems/Bio Techne, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) verwendet. Die Lösung der beinhalteten Substanzen erfolgte nach Herstellerangaben. Zusätzlich zu den im Set enthaltenen Substanzen wurden folgende Materialien und Lösungen eingesetzt:

- Beschichtungspuffer (*Coating Buffer*): 1 Kapsel *Carbonate-Bicarbonate Buffer* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst in 100 ml demineralisiertem Wasser, pH 9,5
- Waschpuffer: PBS + 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Blockpuffer: PBS Casein ELISA *Reagent* 5x (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, 1:5 verdünnt in demineralisiertem Wasser)

- Substratlösung: 1-Step Ultra TMB-Elisa *Substrat Solution* (Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)
- Stopplösung: 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Zunächst wurde der Fang-AK (*capture antibody*) in dem Beschichtungspuffer 1:300 verdünnt (für MMP-3: 1:180 in PBS) und auf 96-Well-Platten (96 Maxisorp NUNC-Immuno Plate, Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA) aufgebracht (100 µl/Well). Diese wurden anschließend mit Mikroplatten-Versiegelungsfolien (Sealplatte 146x79 mm 50 µm, VWR, Radnor, USA) verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Beschichtungspuffer verworfen und 1h mit dem Blockpuffer (250 µl/Well) bei RT geblockt. Danach wurde mit dem oben genannten Waschpuffer zweimal gewaschen und die Platten anschließend auf Zellstoff ausgeklopft. Im nächsten Schritt folgte die Vorbereitung der Proben. Für die mit TNF-α stimulierten Platten wurden die Überstände 1:20 in PBS und für die ohne Stimulation mit TNF-α 1:5 in PBS verdünnt. Von den Proben und dem Standard wurden dann jeweils 100 µl in die Vertiefungen gegeben und 2h bei RT inkubiert. Für den MMP-3 ELISA wurden die Proben unverdünnt auf die Platten gegeben und ebenfalls 2h bei RT inkubiert. Hiernach erfolgten 4 weitere Waschgänge. Im Anschluss wurden 100 µl des Arbeitsdetektors, bestehend aus Detektions-AK und Streptavidin-HRP Reagenz (jeweils 1:300 in PBS), in jedes Well gegeben und danach für 1,5h bei RT inkubiert (für MMP-3 1:180 in PBS). Daraufhin wurde erneut viermal gewaschen (für MMP-3 nur 2 Waschgänge). Nach diesem finalen Waschvorgang wurden zu den Proben für den IL-6 und IL-8 ELISA 50 µl der Substratlösung hinzugefügt. Diese wurde lichtgeschützt bei RT inkubiert, bis ein türkiser Farbumschlag sichtbar wurde. Sodann wurde die Reaktion mittels 50 µl der Stopplösung unterbrochen. Zu den Proben für den MMP-3 ELISA wurde hingegen zunächst das Streptavidin-HRP Reagenz (1:200 in PBS) hinzugefügt und anschließend bei RT für 20 min inkubiert. Nach einem finalen Waschvorgang mit 4 Waschgängen wurden Substratlösung und Stopplösung analog zum IL-6 und IL-8 ELISA eingesetzt. Anschließend fand die Messung mittels *Microplate Reader* (Bio-Rad, IMark *Microplate Reader*, Hercules, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm statt. Es wurde die *Microplate Manager 6* (MPM 6) Software verwendet.

2.7.4 Zellbasierter-ELISA

Verwendeter Puffer und Lösungen:

- Fixierung: wässrige Formalinlösung (37 %) 1:10 in PBS
- Waschpuffer: PBS + 0,1 % Triton-X 100
- Blockpuffer: PBS Casein ELISA *Reagent 5x* (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, 1:5 verdünnt in demineralisiertem Wasser) + Triton 0,1 %
- Substratlösung: 1-Step Ultra TMB-Elisa *Substrat Solution* (Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA)
- Stopplösung: 2 N H₂SO₄ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Für den zellbasierten ELISA wurden Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen (Zellzahlen: 0, 1250, 2500, 5000, 10000, 15000/Well) in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7 %igem Formalin fixiert (20 min bei RT) und mit 0,1 % Triton X in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit ELISA *Blocking Reagent* (1:5 verdünnt in vollentsalzenem Wasser (VE) mit 0,1 % Triton-X) 1h bei RT blockiert und anschließend über Nacht bei 4 °C mit den primären AK inkubiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen nach dreimaligem Waschen mit den entsprechenden sekundären AK versetzt und für 1h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden die Proben analog zu den

oben beschriebenen ELISA-Tests entwickelt (s. 2.7.3). Die eingesetzten primären und sekundären AK inklusiv der eingesetzten Konzentrationen können Tabelle 10 entnommen werden. Im Rahmen des Etablierungsprozesses wurden außerdem folgende Inkubationszeiten getestet: Blocken für 1,5h, Primär-AK für 2h und Sekundär-AK für 30 min bzw. 1,5h.

Primärantikörper	Artikelnummer, Hersteller	Eingesetzte Konzentrationen (µg/ml)	Sekundärantikörper	Artikelnummer, Hersteller
Biotin Anti-Ghrelin , rabbit polyclonal	Ab48285 (1,13 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1,5 0,75 05 0,25 0,125 0,0625	Pierce™ Streptavidin Poly- HRP , 1:5000	#21140 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA
Isotype Control ,	(0,5 mg/ml)	Entsprechend der eingesetzten Konzentrationen des Primärantikörpers	Pierce™ Streptavidin Poly- HRP , 1:5000	#21140 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA
Anti-Ghrelin , rabbit polyclonal	Ab129383 (1 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	2 1 0,5 0,25 0,125 0,0625 0,03125	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Poly- HRP , 1:500	#32260 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA
Isotype Control IgG , rabbit polyclonal	Ab37415 (5 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Entsprechend der eingesetzten Konzentrationen des Primärantikörpers	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Poly- HRP , 1:500	#32260 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA
Isotype Control	56256935 (5 mg/ml), Invitrogen/Thermo Fisher, Waltham, USA	Entsprechend der eingesetzten Konzentrationen des Primärantikörpers	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Poly- HRP , 1:500	#32260 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA
Anti-Ghrelin , mouse monoclonal	Ab57222 (0,5 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	2 1 05 0,25 0,125 0,125 0,0625	peroxidase- conjugates Goat Anti-Mouse , 1:5000	P 0447 , Dako, Jena, Deutschland
Isotype Control IgG2a , mouse monoclonal	MAB0031 , (1 mg/ml), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	Entsprechend der eingesetzten Konzentrationen des Primärantikörpers	peroxidase- conjugates Goat Anti-Mouse , 1:5000	P 0447 , Dako, Jena, Deutschland
Anti-Ghrelin , rabbit monoclonal	Ab209790 (0,433 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1 0,5 0,25 0,125 0,0625	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Poly- HRP , 1:500	#32260 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA
Isotype Control IgG , rabbit monoclonal	Ab172730 (1,646 mg/ml), Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Entsprechend der eingesetzten Konzentrationen des Primärantikörpers	Goat anti-rabbit IgG (H+L) Poly- HRP , 1:500	#32260 , Thermo Fisher/Life Sc., Waltham, USA

Tabelle 10: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den zellbasierten ELISA

In der Tabelle sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit Herstellerangaben für den zellbasierten ELISA in den verwendeten Konzentrationen dargestellt.

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit *Statistical Package für Social Sciences (SPSS) 29* (IBM, Armonk, New York, USA) durchgeführt. Die verwendeten statistischen Tests sind in den Abbildungslegenden angegeben. Das Signifikanzniveau war $p < .05$. Aus Übersichtsgründen wurden Ausreißer aus den Abbildungen entfernt, sind aber in die statistische Auswertung miteinbezogen worden. Eine statistische Beratung erfolgte an der Universität Bonn.

2.9 Einsatz von Künstlicher Intelligenz

Als zusätzliche Hilfsmittel wurden zu Recherchezwecken Webapplikationen mit künstlicher Intelligenz verwendet:

- Litmaps: Zur Erstellung von interaktiven „Literatur-Karten“, welche die wichtigste Literatur eines Wissenschaftsbereichs und ihre Verbindungen visualisieren können, um die für diese Arbeit relevante Veröffentlichungen zu identifizieren.
- SciteAI, Consensus, SciSpace und Perplexity: Zur Auffindung von Literatur zu spezifischen Fragestellungen.
- ChatGPT: Zur Klärung von Verständnisfragen und Hintergrundinformationen und zur Kürzung einzelner Textpassagen.

Es wurde keine Künstliche Intelligenz zur Generierung von Textpassagen verwendet. Alle Texte wurden eigenständig verfasst.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Ghrelin Expression in OA- und RA-Synovialgewebe

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung war der Nachweis des ghrelinergen Systems in SF noch nicht in der Literatur beschrieben, weshalb zunächst ein Nachweis der Komponenten des ghrelinergen Systems mittels WB und IF erfolgte. Um das Hormon Ghrelin nachzuweisen und die Verteilung des Ghrelins im synovialen Gewebe von Patientinnen und Patienten mit RA und OA zu untersuchen, wurden insgesamt 15 Gefrierschnitte von Synovialgewebe aus sechs Patientinnen und Patienten mit RA und zwölf Schnitte von vier Patientinnen und Patienten mit OA angefertigt, mit verschiedenen Konzentrationen des Anti-Ghrelin-AK (ab129383, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) oder eines entsprechenden Isotypen inkubiert und anschließend mit einem fluoreszierenden sekundären AK versetzt. Hierbei zeigte sich in allen Proben ein Fluoreszenzsignal für Ghrelin. Auch der verwendete Isotyp zeigte ein Signal, welches aber im Vergleich zum Ghrelin deutlich geringer ausfiel. Das Signal zeigte sich im Synovialgewebe der Patientinnen und Patienten mit RA stärker als bei den Patientinnen und Patienten mit OA (Vgl. Abb. 2 und Abb. 3). Des Weiteren wurde auch ein monoklonaler Anti-Ghrelin-AK getestet (ab209790). Mit diesem gelang der Nachweis jedoch nicht. Exemplarisch werden Färbungen von Gewebe von Patientinnen und Patienten mit RA in Abb. 2 und von OA in Abb. 3 gezeigt. Mittels IF konnte somit gezeigt werden, dass Ghrelin im gesamten synovialen Gewebe verteilt vorliegt.

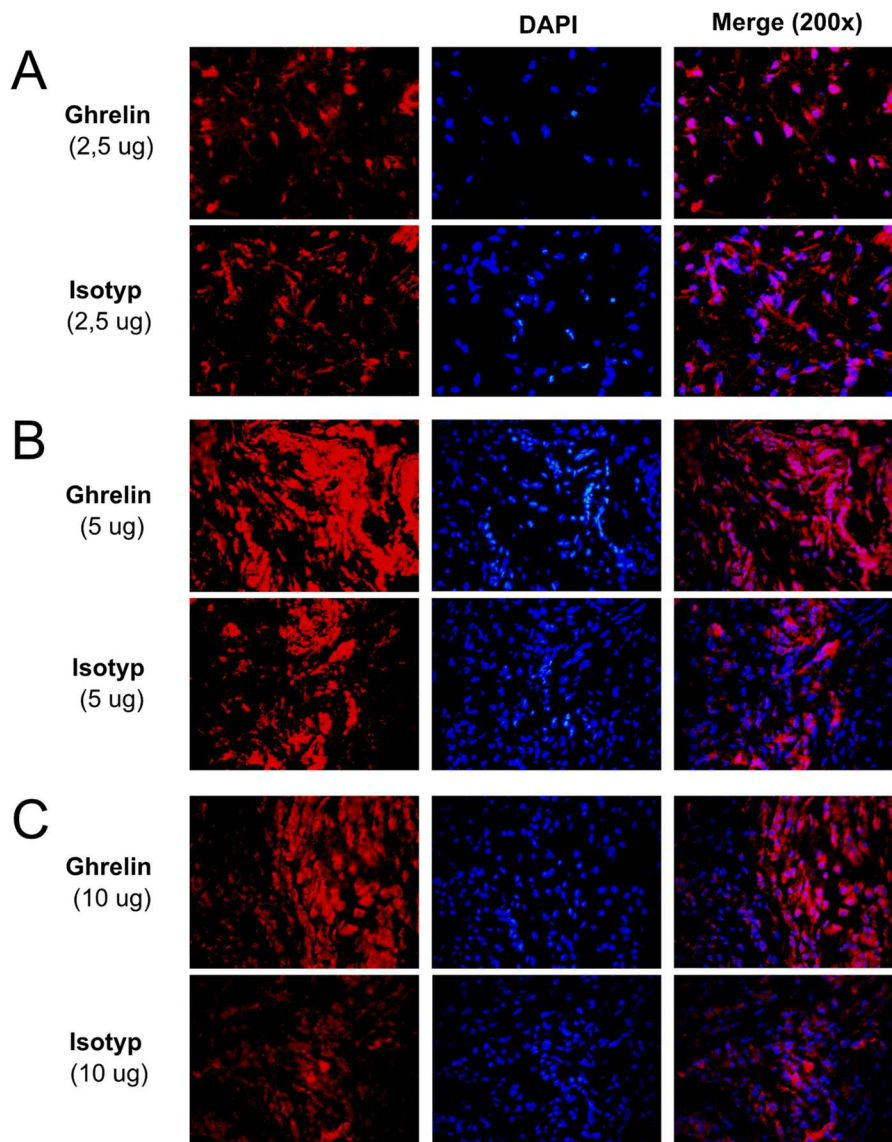


Abb. 2 Immunfluoreszente Färbungen von Ghrelin in RA-Synovialgewebe

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen in RA-Synovialgewebe mit dem Anti-Ghrelin-AK ab129383.

Ghrelin-Nachweis mit **A)** 2.5 µg des primären Anti-Ghrelin-AKs, mit **B)** 5 µg des primären AKs (ab129383) oder mit **C)** 10 µg des primären AKs sowie der entsprechenden Isotyp-AK.

In der Mitte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts die entsprechenden verbundenen Bilder.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, RA = Rheumatoide Arthritis

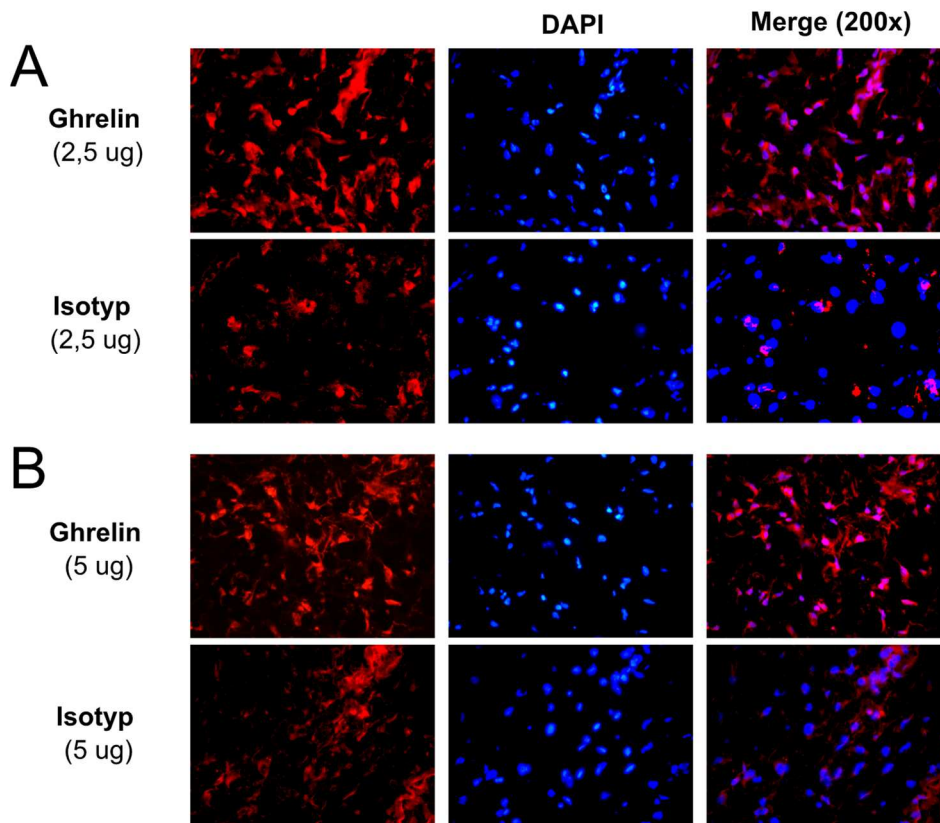


Abb. 3 Immunfluoreszente Färbungen von Ghrelin in OA-Synovialgewebe

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen in OA-Synovialgewebe mit dem Anti-Ghrelin-AK ab129383.

Ghrelin-Nachweis mit **A**) 2,5 µg des primären Anti-Ghrelin-AKs, oder mit **B**) 5 µg des primären AKs sowie der entsprechenden Isotyp-AK. In der Mitte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts die entsprechenden verbundenen Bilder.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, OA = Osteoarthritis

3.2 Nachweis von Ghrelin in isolierten RASF

3.2.1 Nachweis von Ghrelin mittels Immunfluoreszenz

Um einen definitiven Nachweis der Ghrelin-Expression in SF zu erbringen, wurden zusätzlich fluoreszente immunzytochemische Färbungen an isolierten RASF durchgeführt. Es wurde ein polyklonaler (ab129383) und ein monoklonaler AK (ab209790) eingesetzt (s. Tabelle 5). Für die Färbungen mit dem polyklonalen AK wurden insgesamt vier und mit dem monoklonalen AK drei RASF aus verschiedenen Spendern verwendet.

Mit dem monoklonalen AK gelang der Nachweis des Ghrelins bei eingesetzten Mengen unter 0,2165 µg nicht. Der Nachweis des Ghrelins mit dem monoklonalen AK bei 0,2165 µg ist exemplarisch in Abb. 4 A dargestellt. Es zeigte sich in allen anderen untersuchten Proben im Vergleich zum Isotyp ein deutliches Signal im Zytoplasma der SF. Mit dem polyklonalen AK konnte das Ghrelin bei Mengen des AK unter 0,5 µg nicht nachgewiesen werden. In Abb. 4 B wird beispielhaft der Nachweis des Ghrelins bei einer AK-Menge von 0,5 µg gezeigt. Auch hier zeigte sich in allen anderen untersuchten Proben im Vergleich zum Isotyp ein deutliches Signal im Zytoplasma der SF.

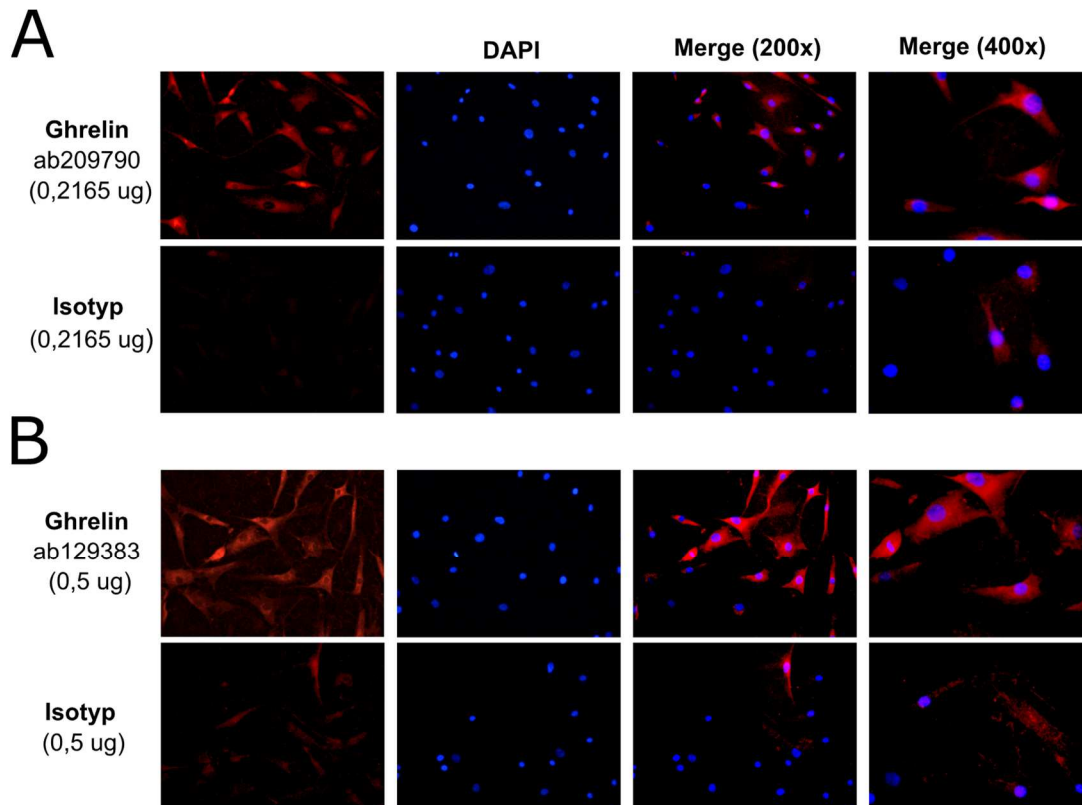


Abb. 4 Immunfluoreszente Färbungen isolierter RASF mit verschiedenen Anti-Ghrelin-AK
 Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen von isolierten RASF mit zwei unterschiedlichen Anti-Ghrelin-AK.
 Ghrelin-Nachweis mit dem **A**) Anti-Ghrelin-AK ab209790 (0,2165 µg) oder **B**) Anti-Ghrelin-AK ab129383 (0,5 µg) sowie der entsprechenden Isotyp-AK.
 In der zweiten Spalte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts daneben die entsprechenden verbundenen Bilder in 200x Vergrößerung und ganz rechts in 400x Vergrößerung.
 Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, RASF = rheumatoide arthritis synovial fibroblasts

Zusätzlich sollte auch der Einfluss von IFN- γ auf die Expression des Ghrelins untersucht werden. Dafür wurden für jeden der beiden AK jeweils eine isolierte RASF-Kultur zusätzlich zunächst 48h mit IFN- γ inkubiert und anschließend mit den Anti-Ghrelin-AK und entsprechendem Isotyp (jeweils in den Mengen 1 µg und 2 µg) versetzt. Als Kontrolle wurde eine jeweils unstimulierte Kultur verwendet. Im letzten Schritt folgte die Zugabe eines mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, sekundären Antikörpers. Hierbei führte die Stimulation mit IFN- γ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu keiner veränderten Ghrelin-Expression (Abb. 5).

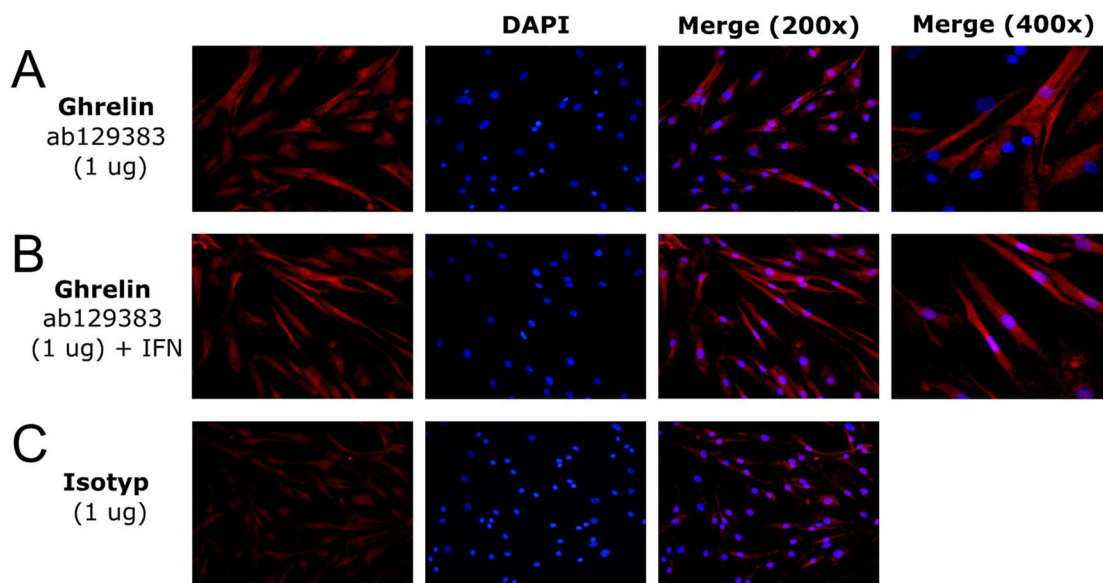


Abb. 5 Immunfluoreszente Färbungen von Ghrelin in isolierten RASF unter basalen und IFN- γ stimulierten Bedingungen

Dargestellt sind fluoreszente Färbungen isolierter RASF zur Untersuchung der Expression des Ghrelins mit dem verwendeten Anti-Ghrelin-AK (ab129383) unter basalen (A) und IFN- γ (10ng/ml) stimulierten Bedingungen (B) auf den RASF. Die Isotypfärbung (Kontrolle) ist in C dargestellt.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, IFN = Interferon, RASF = rheumatoide arthritide synovial fibroblasts

3.2.2 Nachweis von Ghrelin mittels Western Blot

Zur Bestätigung und Quantifizierung der Ghrelin-Expression in SF wurden zusätzlich WBs durchgeführt. Dazu wurden verschiedenen mono- und polyklonale Anti-Ghrelin-AK in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (s. Tabelle 8). Der Nachweis von Ghrelin mittels WB gelang in keinem der insgesamt zehn Ansätze. Exemplarisch wird in Abb. 6 das Ergebnis eines WB gezeigt, welcher mit dem Anti-Ghrelin-AK ab209790 (13 kDa; 1:2000) inkubiert wurde. Ghrelin konnte nicht nachgewiesen werden, wohingegen der Nachweis des *Housekeepers* Cyclophilin B (ab178397, 18 kDa, 1:5000) gelang.

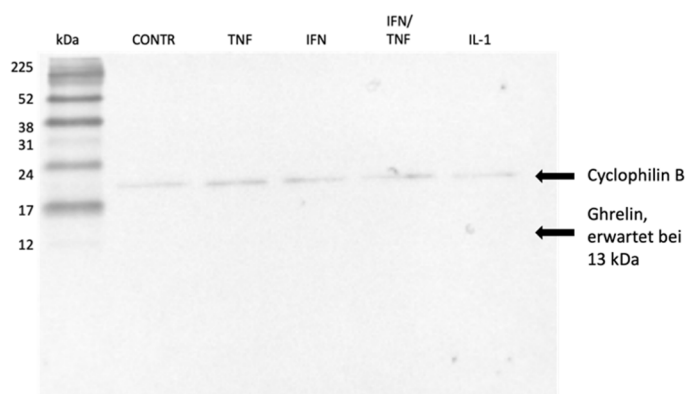


Abb. 6 Fehlender Nachweis des Ghrelins im Western Blot

Die Abbildung zeigt, dass der Nachweis des Ghrelins mit dem Anti-Ghrelin-Antikörper ab209790 (1:2000) nicht gelang. Beim erwarteten Molekulargewicht von 13 kDa sind keine Banden sichtbar. Vergleichend wurde der *Housekeeper* Cyclophilin B (ab178397, 1:5000) auf die Membran gegeben. Dieser konnte bei einem Molekulargewicht von 18 kDa nachgewiesen werden.

3.3 Nachweis der GHS-R-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe

Neben Ghrelin sollte in dieser Arbeit auch sein Rezeptor GHS-R in synovialen Gewebe von Patientinnen und Patienten mit RA und OA nachgewiesen werden. Hierzu wurden 13 Gefrierschnitte von fünf Patientinnen und Patienten mit RA und 12 Gefrierschnitte von fünf Patientinnen und Patienten mit OA angefertigt und gefärbt. Im Rahmen der Etablierung wurde zunächst der Anti-Ghrelin-Rezeptor-AK ab85104 (2,5 µg, 5 µg und 10 µg) eingesetzt. In sechs untersuchten Gewebeschnitten zeigte sich eine unspezifische Färbung, welche auch der Isotyp aufwies (nicht dargestellt).

Für den Alomone AK AGR-031 zeigte sich in RA- und OA-Synovialgewebe eine spezifische Färbung sowohl mit 2,5 µg als auch 5 µg. Die jeweiligen Isotypkontrollen waren sichtbar schwächer gefärbt, was für eine spezifische Anfärbung des GHS-R spricht (Abb. 7 und Abb. 8).

In 6/13 RA und 5/12 OA-Gewebeschnitten konnte der GHS-R nachgewiesen werden. Die restlichen Schnitte wiesen eine verminderte Qualität auf (brüchige Gewebsblöcke, keine DAPI-Färbung, Zellen aufgelöst) und konnten daher nicht für den Nachweis des GHS-R verwendet werden.

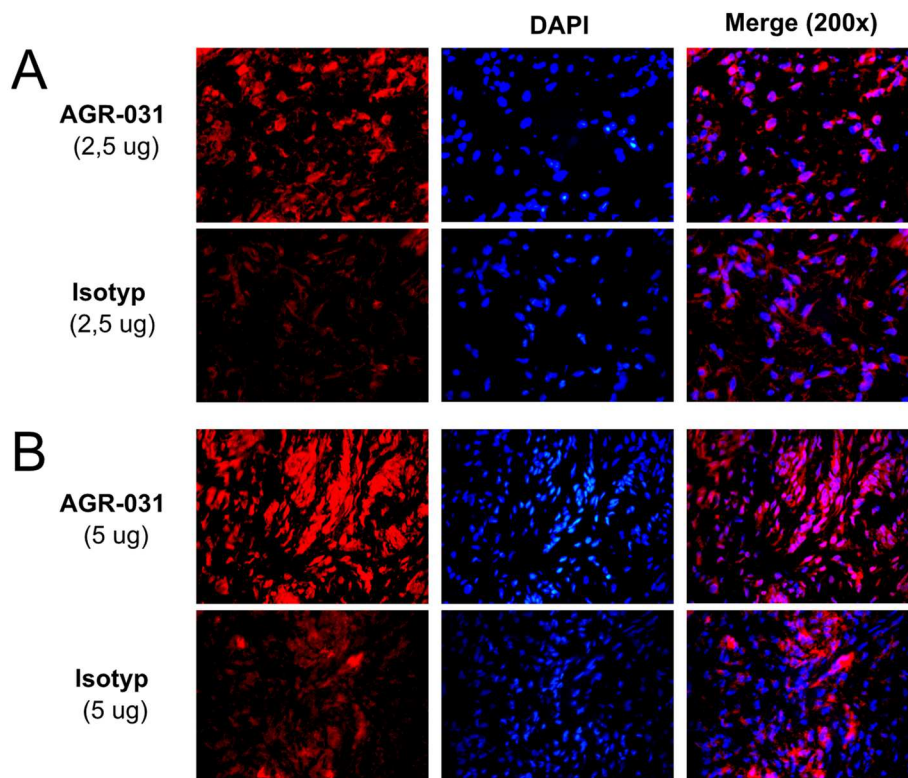


Abb. 7 Immunfluoreszenz-Färbung des GHS-R in RA-Synovialgewebe

Dargestellt sind immunfluoreszenz-Färbungen in RA-Synovialgewebe mit dem Alomone Anti-GHS-R-AK AGR-031.

GHS-R-Nachweis mit **A**) 2,5 µg des primären Antikörpers oder mit **B**) 5 µg des primären Antikörpers sowie der entsprechenden Isotyp-Antikörper. In der Mitte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts die entsprechenden verbundenen Bilder.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, RA = Rheumatoide Arthritis

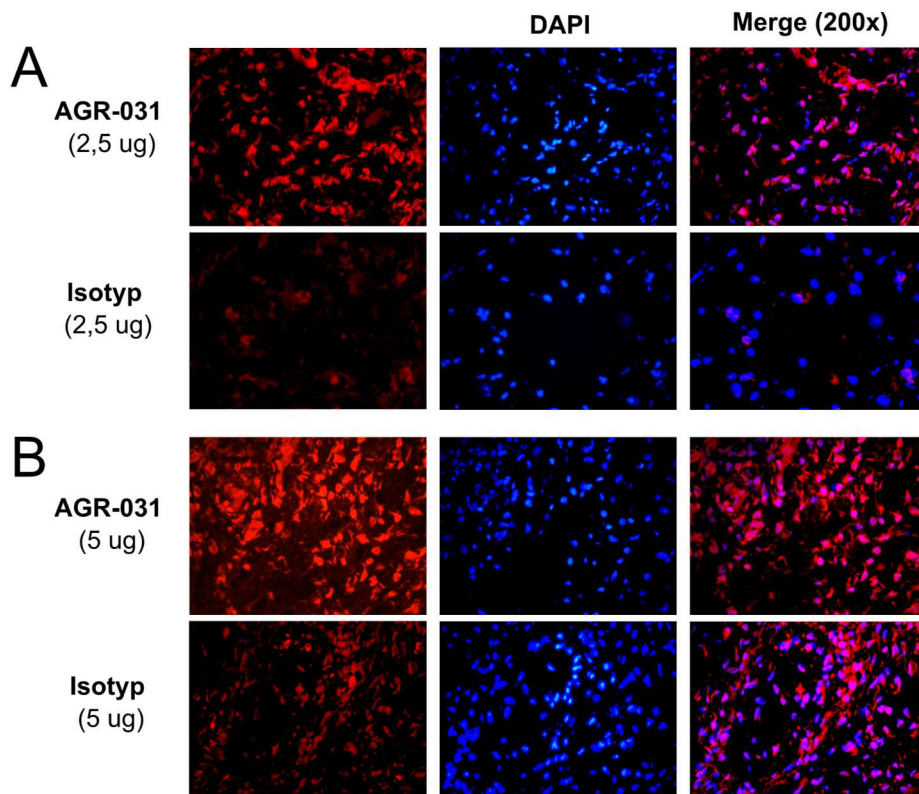


Abb. 8 **Immunfluoreszente Färbung des GHS-R in OA-Synovialgewebe**

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbung in OA-Synovialgewebe mit dem Alomone Anti-GHS-R-AK AGR-031.

GHS-R-Nachweis mit **A**) 2,5 µg des primären Antikörpers, oder mit **B**) 5 µg des primären Antikörpers sowie der entsprechenden Isotyp-Antikörper. In der Mitte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Färbstoff DAPI dargestellt, rechts die entsprechenden verbundenen Bilder.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, OA = Osteoarthritis

3.4 Nachweis der GHS-R-Expression in isolierten RASF

3.4.1 Nachweis des GHS-R mittels Immunfluoreszenz

Analog zum Nachweis des Ghrelins in SF wurden, auch zum spezifischeren Nachweis des GHS-R in SF, zusätzlich immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen an isolierten RASF mit zwei verschiedenen GHS-R-AK durchgeführt.

In RASF wurden zunächst zwei unterschiedliche Mengen (2 µg und 4 µg) des Anti-GHS-R-AKs AGR-031 getestet. Hierbei zeigten beide Mengen eine schwache, aber spezifische Färbung, deren Intensität die der Isotypfärbung überstieg (Abb. 9 A). Aufgrund der schwachen Signalintensität wurde ein weiterer GHS-R-AK (Abcam, ab95250) in RASF aus fünf verschiedenen Spendern in drei unterschiedlichen Mengen (1 µg, 2 µg, 3 µg) getestet. Der Nachweis gelang hier in allen Ansätzen (s. exemplarisch Abb. 9 B). Bei 3 µg zeigte sich ein deutliches Hintergrundsignal.

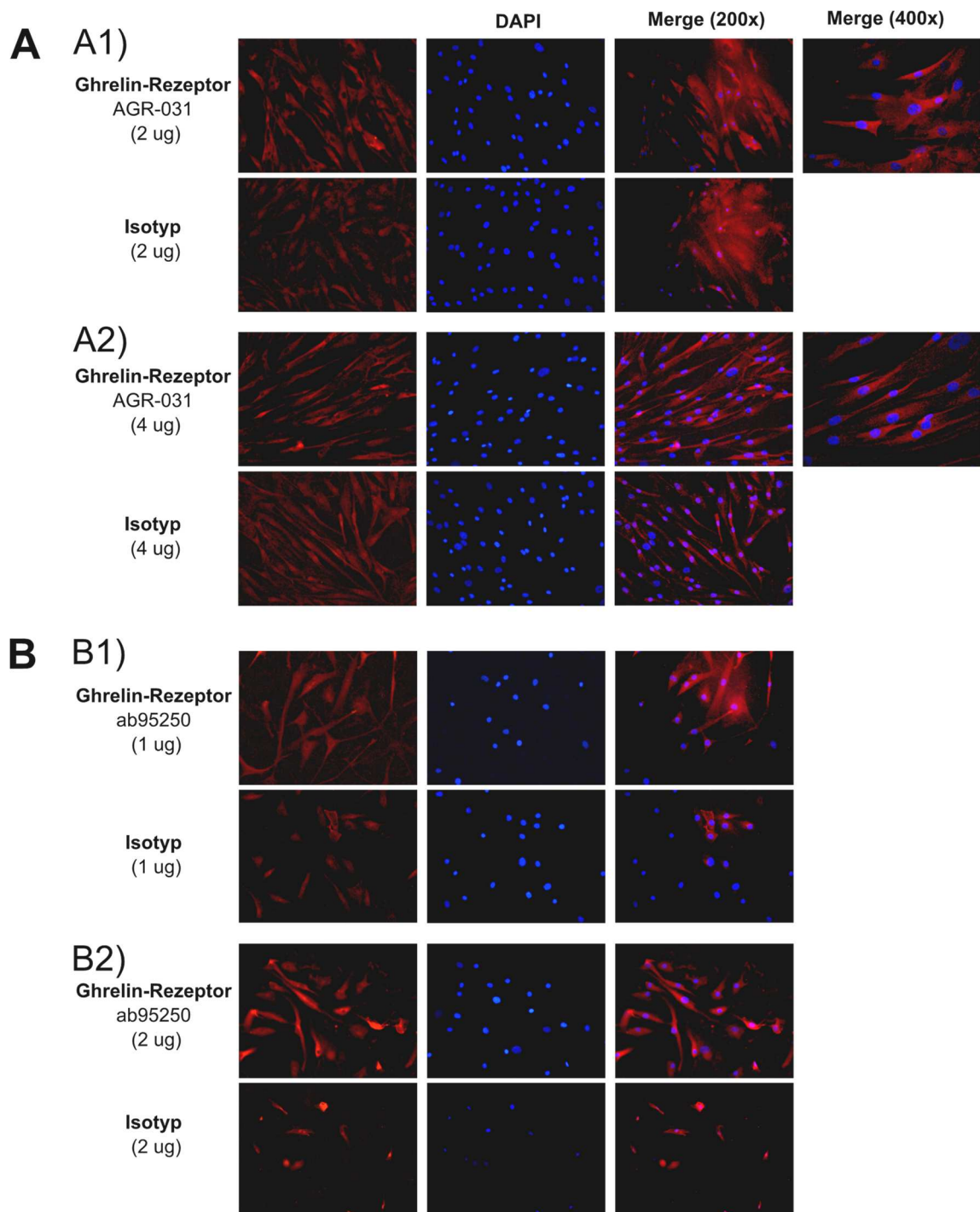


Abb. 9 Immunfluoreszente Färbung des GHS-R in isolierten RASF

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen isolierter RASF mit **A)** dem Alomone AK AGR-031 und **B)** dem Abcam AK ab95250. Färbungen mit A1) 2 µg des primären GHS-R-AKs (AGR-031) und 2 µg Isotyp-Antikörper, A2) 4 µg des primären Antikörpers (AGR-031) und 4 µg Isotyp-Antikörper. Färbungen mit B1) 1 µg des primären GHS-R-AKs (ab95250) und 1 µg Isotyp-Antikörper, B2) 2 µg des primären Antikörpers (ab95250) und 2 µg Isotyp-Antikörper. In der zweiten Spalte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts davon die entsprechenden verbundenen Bilder in 200x und 400x Vergrößerung).

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, RASF = rheumatoide arthritis synovial fibroblasts

3.4.2 Nachweis des GHS-R mittels Western Blot

Um den Nachweis des GHS-R in SF zu bestätigen und quantitativ auszuwerten, wurden Lysate von RASF und *osteoarthritis synovial fibroblasts* (OASF) angefertigt und mittels WB-Verfahren analysiert. Um die Regulation der GHS-R-Expression (AGR-031) in SF zu untersuchen, wurden einige der RASF zuvor unter hypoxischen Bedingungen inkubiert, was die Veränderungen des O₂-Partialdrucks während einer chronischen Synovialentzündung widerspiegelt [129]. WB-Analysen zeigten, dass GHS-R sowohl auf OASF als auch auf RASF exprimiert wird.

Während der Etablierung des WB wurden zwei verschiedene Anti-Ghrelin-Rezeptor-AK in unterschiedlichen Mengen getestet (s. Tabelle 8). Für den ab85104 AK gelang der Nachweis nicht zuverlässig. Bei einer Verdünnung des AK von 1:300 zeigten sich unspezifische Banden (Abb. 10). Bei höheren Verdünnungen war kein Signal mehr nachweisbar oder es zeigten sich Banden an anderer Stelle als bei dem erwarteten Molekulargewicht von 50 kDa.

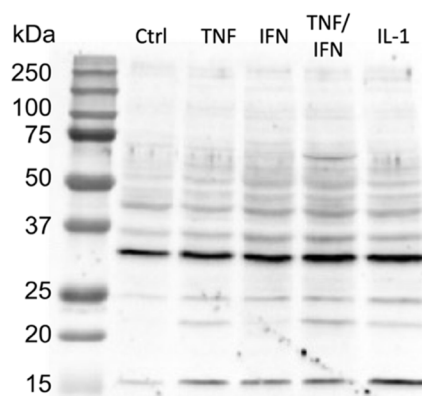


Abb. 10 Nachweis des GHS-R (ab85104) in RASF mittels Western Blot

Dargestellt ist eine Western Blot Membran, die mit dem Anti-Ghrelin Rezeptor-AK ab85104 (eingesetzte Verdünnung 1:300 in TBS-T) inkubiert wurde. Das erwartete Molekulargewicht des AK liegt bei 50 kDa. Es zeigten sich unspezifische Banden.

Abkürzungen: AK = Antikörper, Ctrl = Kontrolle, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, IFN = Interferon, IL = Interleukin, RASF = rheumatoide arthritis synovial fibroblasts, TBS-T = Tris-buffered saline-Tween20, TNF = Tumornekrosefaktor

Der Alomone AK AGR-031 detektierte bei OASF eine Doppelbande bei 50 kDa und 60 kDa. Bei RASF zeigte sich in 10 von 14 der analysierten WBs (71,4 %) eine Doppelbande bei 50 kDa und 60 kDa und in 4 von 14 eine Einzelbande bei 50 kDa (Abb. 11 A, gesamte Blots s. Anhang: Ergänzende Abb. 1, Ergänzende Abb. 2, Ergänzende Abb. 3). Die quantitative WB-Analyse zeigte bei RASF keinen signifikanten Unterschied in der Expression des GHS-R zwischen Normoxie und Hypoxie ($p = .831$). Beim Vergleich der GHS-R-Expression von OASF mit RASF konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied, jedoch ein Trend zu geringerer Expression bei RA festgestellt werden ($p = .088$) (Abb. 11 B).

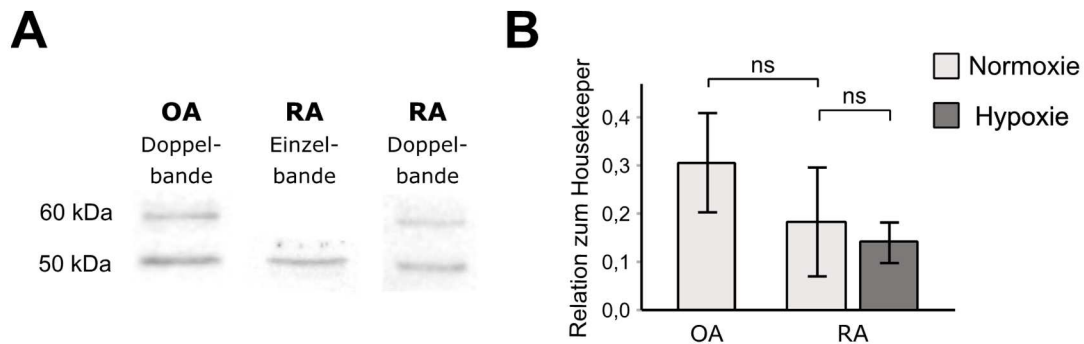


Abb. 11 Nachweis des GHS-R (AGR-031) in OASF- und RASF mittels Western Blot

A Nachweis des GHS-R in OASF und RASF.

B Quantitative Auswertung der GHS-R-Expression in 4 OASF und 10 RASF (RASF in Hypoxie (n = 4) und Normoxie (n = 6)) im Verhältnis zum *Housekeeper* GAPDH. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. Das Signifikanzniveau lag bei *p = .05 Mann-Whitney-Test

Abkürzungen: GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, SEM = standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)

3.5 Nachweis der GOAT-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe

Es sollte auch der Nachweis des Enzyms GOAT in OA- und RA-Synovialgewebe erfolgen. Hierzu wurden aus Synovialgewebe insgesamt 15 Gefrierschnitte von fünf Patientinnen und Patienten mit RA und 15 Gefrierschnitte von vier Patientinnen und Patienten mit OA angefertigt und Immunfluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Konzentrationen des Anti-GOAT-AK (ab170690) durchgeführt.

Bei den RA-Synovialgeweben konnte ein spezifisches Signal für GOAT in den Zellkernen in allen Gewebeschnitten (exemplarisch dargestellt in Abb. 12) und bei OA in acht der 15 Gewebeschnitte (Abb. 13) nachgewiesen werden. Die restlichen OA-Schnitte wiesen eine verminderte Qualität auf (brüchige Gewebsblöcke, Zellen aufgelöst) und konnten daher nicht für den Nachweis der GOAT verwendet werden.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den fluoreszierenden Zellen tatsächlich um SF handelt, wurde auf vier Gewebeschnitten zusätzlich das fibroblastenspezifische Protein CD55 gefärbt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es sich beim Großteil der gefärbten Zellen um SF handelt, aber auch andere Zellen ein positives Signal für GOAT aufweisen.

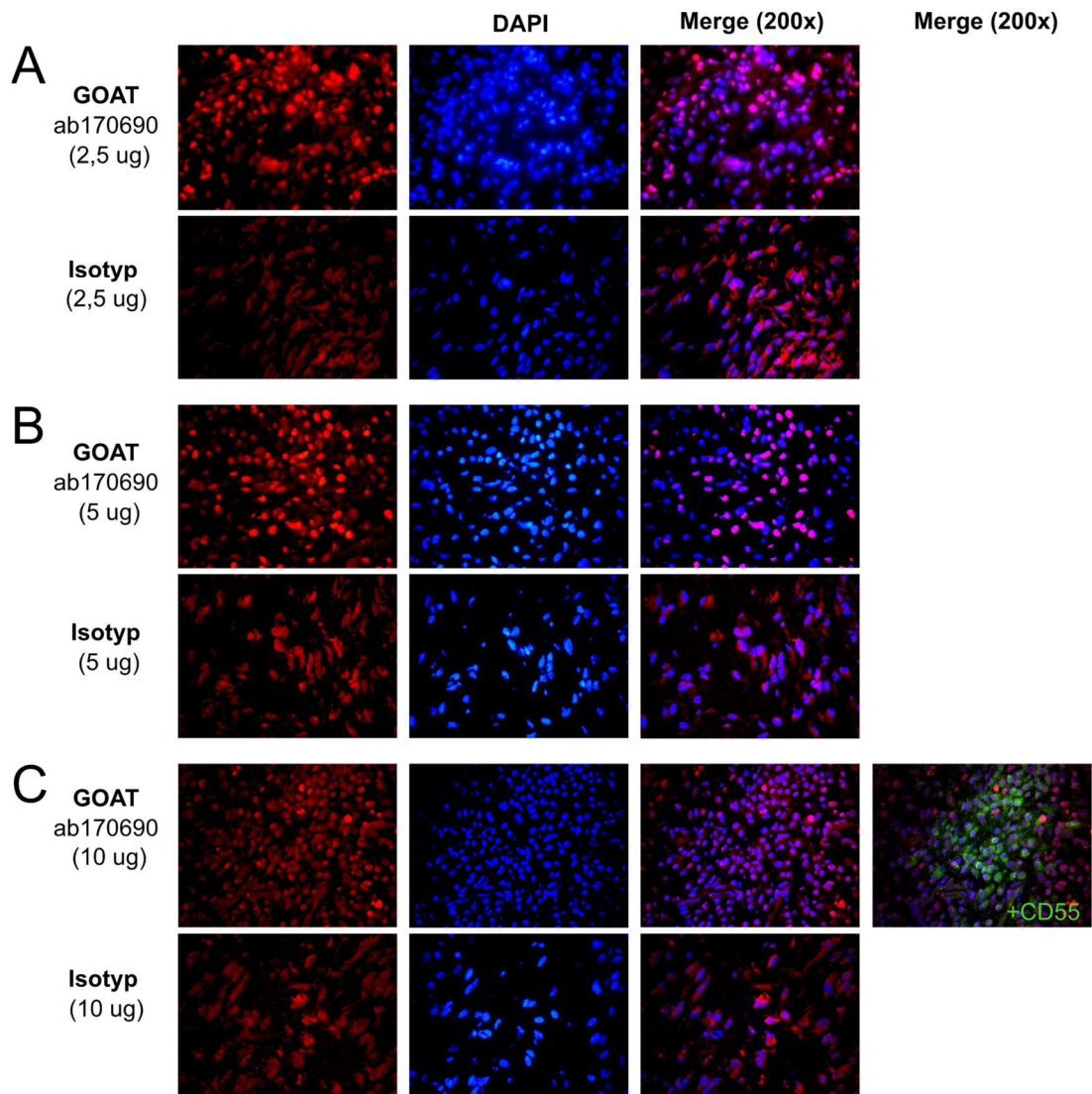


Abb. 12 Immunfluoreszente Färbungen der GOAT in RA-Synovialgewebe

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen in RA-Synovialgewebe mit dem Anti-GOAT-AK ab170690.

GOAT-Nachweis mit **A)** 2,5 µg des primären Anti-GOAT Antikörpers, mit **B)** 5 µg des primären Antikörpers, oder mit **C)** 10 µg des primären AKs sowie der entsprechenden Isotyp-AK. In der zweiten Spalte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts davon die entsprechenden verbundenen Bilder und ganz rechts eine zusätzliche Färbung mit dem fibroblastenspezifischen Marker CD55.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, RA = Rheumatoide Arthritis

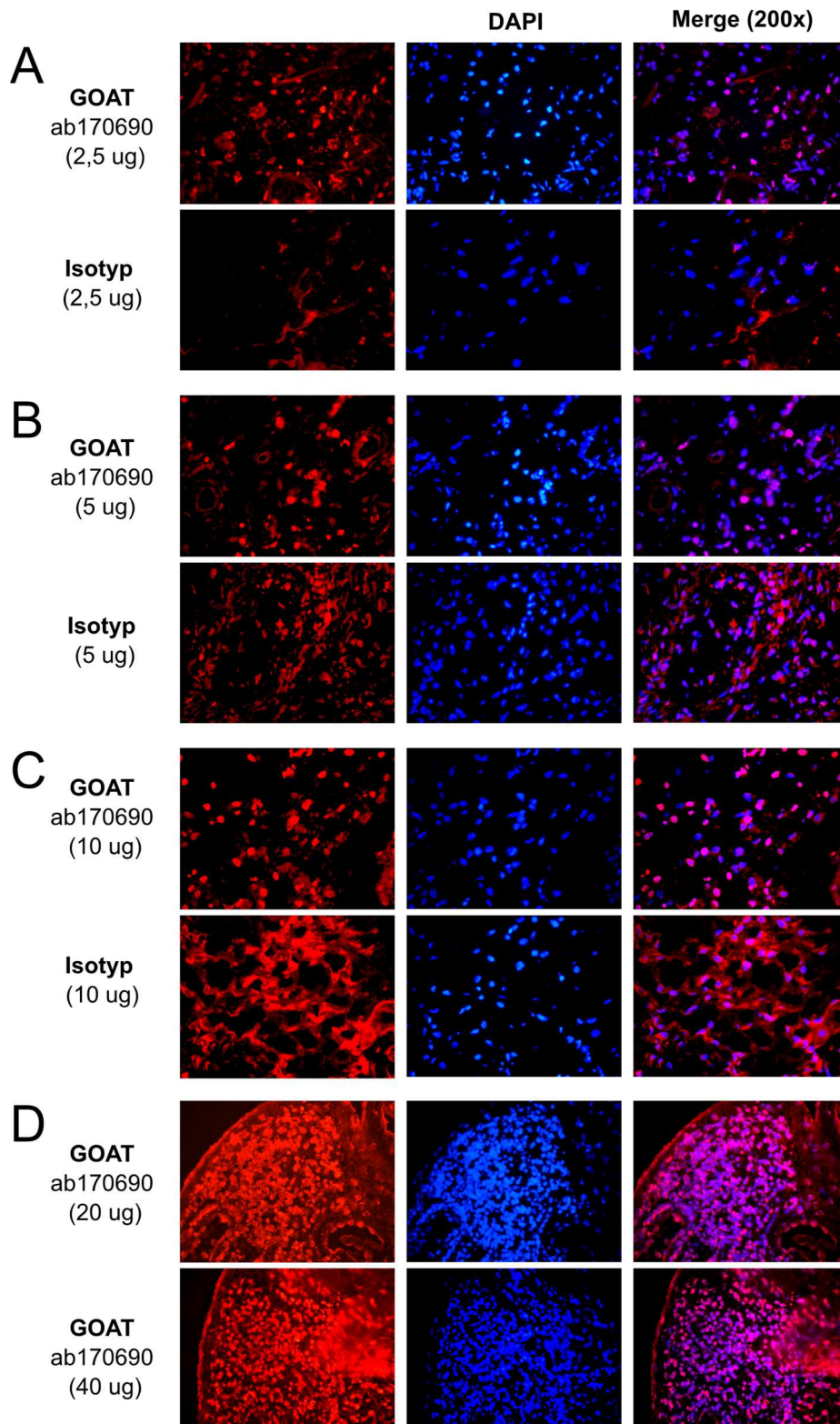


Abb. 13 **Immunfluoreszente Färbungen der GOAT in OA-Synovialgewebe**

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen in OA-Synovialgewebe mit dem Anti-GOAT-AK ab170690.

GOAT-Nachweis mit **A**) 2,5 µg des primären Anti-GOAT-AK, mit **B**) 5 µg des primären AK, mit **C**) 10 µg des primären AKs, oder mit **D**) 20 µg und 40 µg des primären AKs (100x Vergrößerung) sowie der entsprechenden Isotyp-AK. In der Mitte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts die entsprechenden verbundenen Bilder.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, OA = Osteoarthritis

3.6 Nachweis der GOAT-Expression in isolierten RASF

3.6.1 Nachweis der GOAT mittels Immunfluoreszenz

Analog zum Nachweis des Ghrelins und von GHS-R in SF, wurden auch zum definitiven Nachweis von GOAT in SF zusätzlich Fluoreszenzfärbungen an isolierten RASF durchgeführt (Anti-GOAT-AK ab170690).

Zunächst wurden drei RASF aus verschiedenen Spendern mit drei unterschiedlichen Mengen (2 µg, 3 µg und 5 µg) des Anti-GOAT-AK versetzt. Der Nachweis gelang in allen Ansätzen (s. exemplarisch Abb. 14). Diese Färbungen bestätigten die Beobachtung der Immunhistochemie, dass GOAT vor allem im Zellkern bzw. der Kernmembran von RASF exprimiert wird.

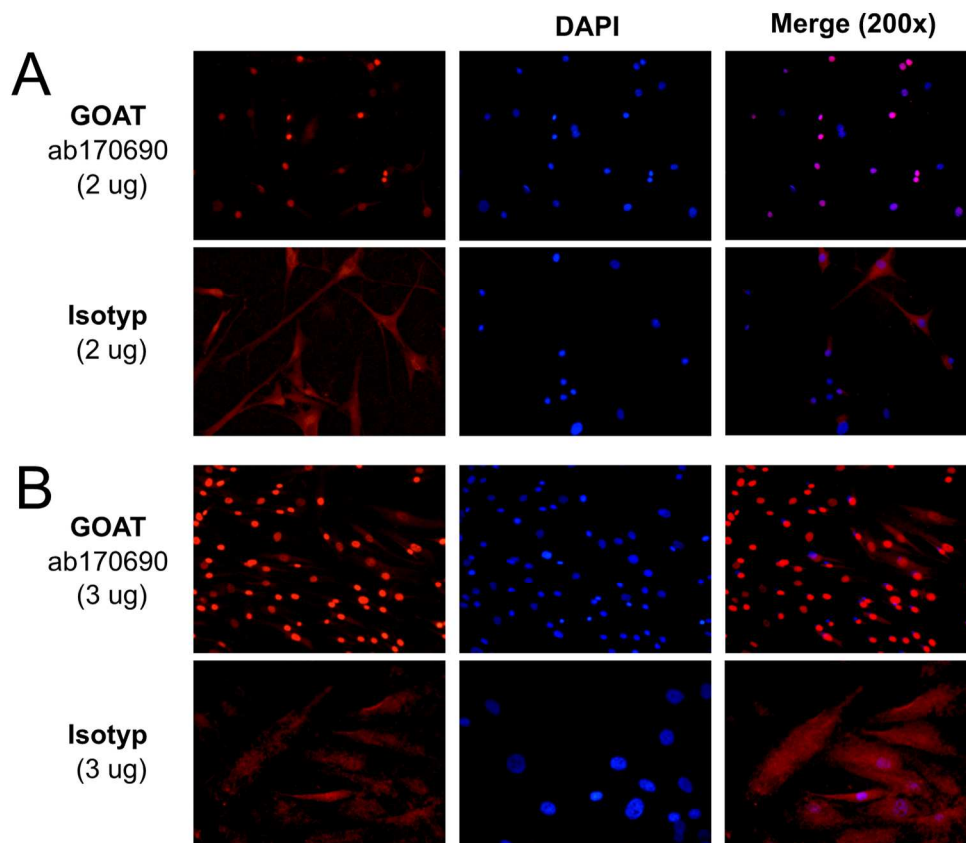


Abb. 14 **Immunfluoreszente Färbungen von GOAT in isolierten RASF**

Dargestellt sind immunfluoreszente Färbungen isolierter RASF mit dem Anti-GOAT-AK ab170690.

GOAT-Nachweis mit **A**) 2 µg des primären Anti-GOAT-AK, oder mit **B**) 3 µg des primären AK sowie der entsprechenden Isotyp-AK. In der Mitte ist jeweils die Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI dargestellt, rechts die entsprechenden verbundenen Bilder.

Abkürzungen: AK = Antikörper, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

3.6.2 Nachweis der GOAT mittels Western Blot

Um auch den Nachweis von GOAT in SF zu bestätigen und quantitativ auszuwerten, wurden Lysate von RASF und OASF angefertigt und mittels WB-Verfahren analysiert. Um den Einfluss von an die Inflammation im Gewebe angepasstem Sauerstoffgehalt auf die Regulation der GOAT-Expression (ab178893) in SF zu untersuchen, wurden einige der RASF zuvor unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. WB-Analysen zeigten, dass GOAT sowohl in OASF als auch in RASF exprimiert wird. Es zeigte sich im WB eine Doppelbande für die GOAT bei dem

vorhergesagten Molekulargewicht von 37 kDa und bei ca. 50 kDa (Abb. 15 A, gesamte Blots siehe Anhang: Ergänzende Abb. 4, Ergänzende Abb. 5). Die quantitative Western Blot Analyse zeigte bei RASF keinen signifikanten Unterschied in der Expression von GOAT zwischen Normoxie und Hypoxie ($p = .297$). Beim Vergleich der GOAT-Expression von OASF mit RASF konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = .881$) (Abb. 15 B).

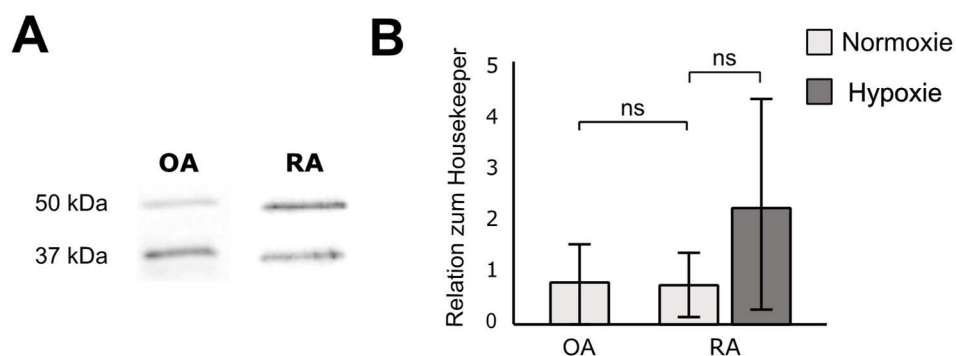


Abb. 15 Nachweis der GOAT in OASF und RASF mittels Western Blot

A Nachweis der GOAT in OASF und RASF mittels Western Blot.

B Quantitative Auswertung der GOAT-Expression in 3 OASF und 8 RASF (RASF in Hypoxie ($n = 3$) und Normoxie ($n = 5$)) im Verhältnis zum *Housekeeper* Cyclophilin B. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM. Das Signifikanzniveau lag bei $*p = .05$ Mann-Whitney-Test

Abkürzungen: GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, SEM = standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)

3.7 Regulation des ghrelinergen Systems durch proinflammatorische Zytokine

Mit den zuvor beschriebenen Methoden konnte das Vorhandensein des ghrelinergen Systems in Synoviozyten bestätigt werden. RASF sind in Gelenken *in vivo* jedoch in der Regel vielen proinflammatorischen Mediatoren ausgesetzt [130]. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Wirkung einer längeren Exposition gegenüber der pathomechanisch zentralen Zytokine auf die Expression des ghrelinergen Systems bei RA untersucht werden.

3.7.1 Regulation des GHS-R durch proinflammatorische Zytokine und Hypoxie

Um den Einfluss von Zytokinen auf die Expression des GHS-R zu untersuchen, wurden RASF mit verschiedenen Zytokinen stimuliert ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IFN/TNF , $\text{IL-1}\beta$) und jeweils sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen inkubiert und anschließend analysiert. In Abb. 16 A sind die detektierten Doppel- und Einzelbanden bei 50 kDa und 60 kDa sowie der verwendetet *Housekeeper* bei 37 kDa dargestellt (Vgl. Abb. 11). In der quantitativen Auswertung der WB-Analyse konnte weder ein signifikanter Unterschied der unterschiedlichen Stimulationen gegenüber der unbehandelten Kontrolle, noch ein Einfluss von Hypoxie auf die GHS-R-Expression festgestellt werden (Abb. 16 B).

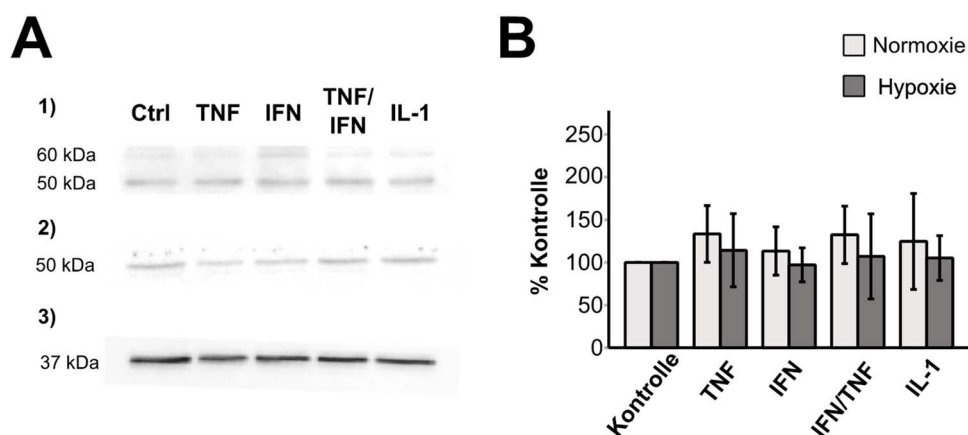


Abb. 16 **Regulation der GHS-R-Expression durch TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und Hypoxie**

A (A1) Exemplarisch ist der Nachweis des GHS-R (AGR-031) in RASF als Doppelbande bei 50 kDa und 60 kDa und (A2) als Einzelbande bei dem vorhergesagten Molekulargewicht von 50 kDa dargestellt. (A3) Nachweis des *Housekeepers* GAPDH bei 37 kDa. (TNF- α 10 ng/ml; IFN- γ 10 ng/ml; IL-1 β 1 ng/ml, Inkubationszeit: 24h)

B Quantitative Auswertung der GHS-R-Expression nach Stimulation mit TNF- α , IFN- γ , IL-1 β unter norm- und hypoxischen Bedingungen. Die Proteinlevel von GHS-R wurden zunächst auf den *Housekeeper* GAPDH normiert und anschließend im prozentualen Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle betrachtet (N: n = 4, H: n = 4, außer IFN/TNF N: n = 3). Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert \pm SEM. Signifikanzniveau *p = .05, Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur

Abkürzungen: GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, H = Hypoxie, IFN = Interferon- γ , IL-1 β = Interleukin-1 β , kDa = Kilodalton, N = Normoxie, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, SEM = standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes), TNF = Tumornekrosefaktor

3.7.2 Regulation der GOAT durch proinflammatorische Zytokine und Hypoxie

In RASF wurde neben dem GHS-R auch das Ghrelin-aktivierende Enzym GOAT (ab178893) nachgewiesen. Hier zeigte sich unter allen Bedingungen eine Doppelbande bei 37 kDa und 45 kDa im WB (Abb. 17 A1). In der quantitativen Auswertung der WBs konnte kein signifikanter Unterschied der Stimulation mit Zytokinen oder Inkubation unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 17 B). Auch zwischen den unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubierten RASF fand sich kein signifikanter Unterschied. Unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck konnte insgesamt eine signifikante Reduktion der GOAT-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden (p = .009) (Abb. 17 C). So fiel die Konzentration bei einer Stimulation mit TNF und TNF/IFN jeweils um ca. 60 % (TNF: p = .025; TNF/IFN: p = .022). Die IL-1-Konzentration fiel ebenfalls um ca. 60 %, es zeigte sich aber nur ein Trend zur Signifikanz (p = .051). IFN allein ohne Ko-Stimulation mit TNF zeigte den geringsten Abfall (40 %) (p = .577).

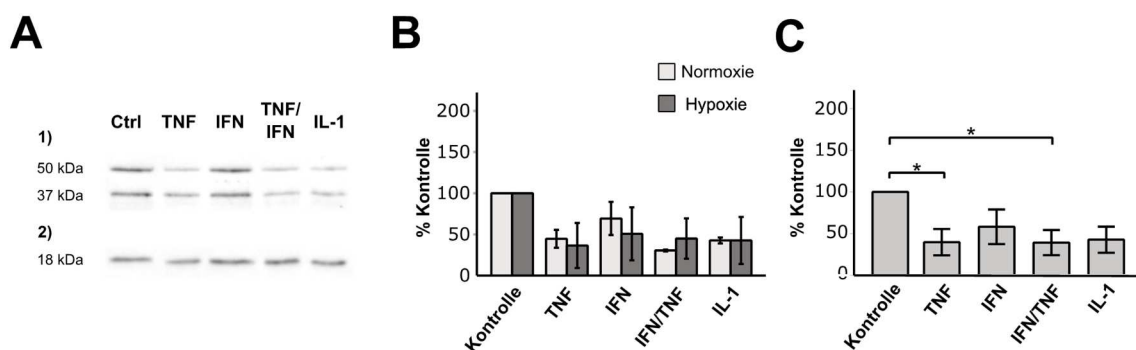


Abb. 17 **Regulation der GOAT-Expression durch TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und Hypoxie**

A (A1) Exemplarischer Nachweis der GOAT (ab178893) in RASF als Doppelbande bei 37 kDa und 50 kDa und (A2) dem *Housekeeper* Cyclophilin B bei 18 kDa.

B Quantitative Auswertung der GOAT-Expression nach Stimulation mit TNF- α , IFN- γ , IL-1 β unter norm- und hypoxischen Bedingungen. Alle Werte wurden zunächst auf den *Housekeeper* Cyclophilin B bezogen und anschließend im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle betrachtet (N: n = 2, H: n = 3). In den auf die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen aufgeteilten Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

C Da es zwischen Hypoxie und Normoxie keinen signifikanten Unterschied gab, wurden die normoxischen und hypoxischen Proben zusammen analysiert, um die Power zu erhöhen. Die dargestellten Signifikanzen zeigen demnach den Unterschied zwischen den einzelnen Zytokinstimulationen insgesamt (n = 5).

Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert \pm SEM. Signifikanzniveau *p = .05, Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur.

Abkürzungen: GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, H = Hypoxie, IFN = Interferon- γ , IL-1 β = Interleukin-1 β , kDa = Kilodalton, N = Normoxie, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, SEM = standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes), TNF = Tumornekrosefaktor

3.8 Regulation der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion durch das ghrelinerge System

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob IL-6, IL-8 und MMP-3 als proinflammatorische Mediatoren der RA in SF durch das ghrelinerge System reguliert werden. Dabei wurde der Einfluss von GHS-R Liganden alleine und unter proinflammatorischen Bedingungen, simuliert durch eine TNF-Stimulation, untersucht. Proben ohne TNF wurden 72h, Proben mit TNF 48h mit GHS-R Liganden inkubiert.

3.8.1 Regulation der IL-6 Produktion

Grundsätzlich zeigte sich eine höhere IL-6 Produktion, wenn OASF oder RASF mit TNF inkubiert wurden (p < .001) (Abb. 18). Die IL-6 Produktion in RASF war dabei signifikant höher als in OASF (p < .001) (Abb. 18).

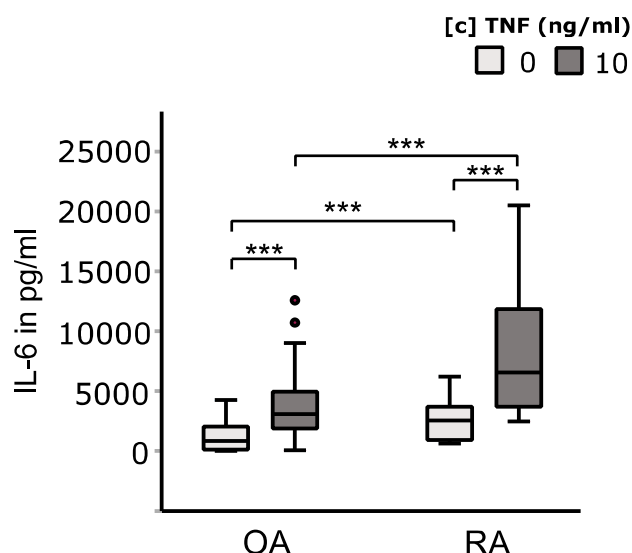


Abb. 18 Vergleich der IL-6 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen

Alle erhobenen Messpunkte wurden zusammengefasst und OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen verglichen (OA ohne TNF: n = 215; OA mit TNF: n = 288; RA ohne TNF: n = 144; RA mit TNF: n = 144). Signifikanzniveau $p = .05$; (***) $p < .001$ (***) $p < .005$; * $p < .05$), Mann-Whitney-U-Test

Abkürzungen: IL-6 = Interleukin-6, OA = Osteoarthritis, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RA = Rheumatoide Arthritis, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, TNF = Tumornekrosefaktor

Der GHS-R Agonist L-692,585 und der Antagonist/*biased* Ligand YIL-781 zeigten alleine keinen Einfluss auf die basale und die TNF-stimulierte IL-6 Produktion in RASF und OASF (Abb. 20 A, B, D, E). Dies galt bei OASF auch für die Kombination aus YIL-781 (10 μ M) mit aufsteigenden Konzentrationen von L-692,585 (Abb. 20 C). Bei RASF zeigte sich unter der Kombination aus L-692,585 und YIL-781 ebenfalls kein signifikanter Effekt. Es konnte aber eine dosisabhängige Steigerung der IL-6 Konzentration beobachtet werden (Abb. 18 F).

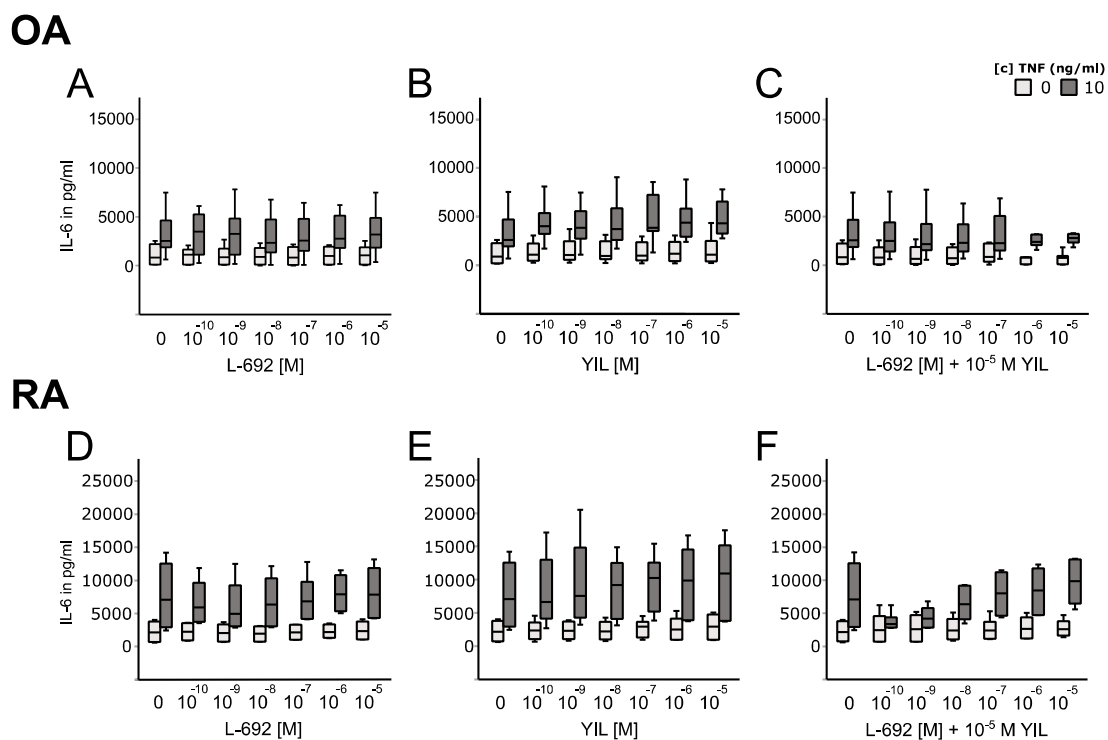


Abb. 19 Einfluss der GHS-R Liganden L-692,585 und YIL-781 auf die IL-6 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen

Die SF wurden mit GHS-R Liganden 24h vorinkubiert. Anschließend wurde TNF (10ng/ml Endkonzentration) für 48h zugegeben. SF ohne TNF wurden über 72h inkubiert.

IL-6 Konzentrationen nach Stimulation von OASF (A, B, C) und RASF (D, E, F) mit aufsteigenden Konzentrationen von L-692,585 (A, D), YIL-781 (B, E) oder in Kombination (C, F) (OASF ohne TNF: n = 9; OASF mit TNF: n = 12; RASF ohne TNF: n = 6; RASF mit TNF: n = 6; jeweils Triplikate pro Patient). Signifikanzniveau $p = .05$; Kruskal-Wallis mit Bonferroni-Korrektur.

Abkürzungen: GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, IL-6 = Interleukin-6, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, SF = Synoviale Fibroblasten, TNF = Tumornekrosefaktor

3.8.2 Regulation der IL-8 Produktion

Insgesamt bewirkte eine Stimulation mit TNF sowohl in RASF als auch in OASF eine signifikante Steigerung der IL-8-Spiegel ($p < .001$) (Abb. 20). In den mit TNF stimulierten RASF wurden ebenfalls insgesamt höhere Konzentrationen von IL-8 nachgewiesen als in OASF ($p < .001$) (Abb. 20).

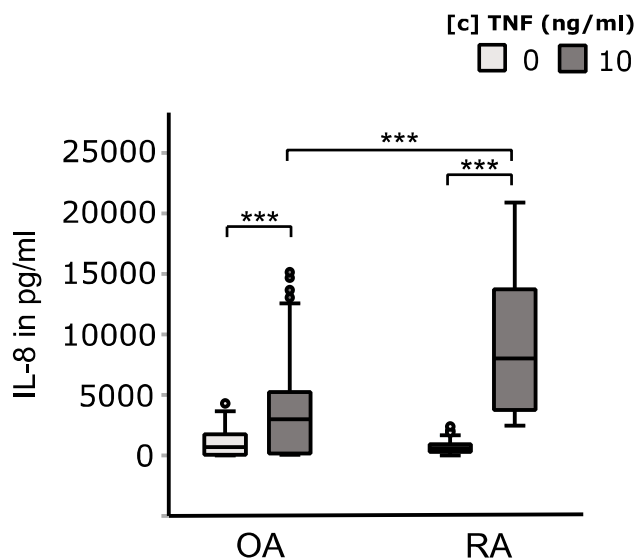


Abb. 20 Vergleich der IL-8 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen

Alle erhobenen Messpunkte wurden zusammengefasst und OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen verglichen (OA ohne TNF: n = 273; OA mit TNF: n = 288; RA ohne TNF: n = 144, RA mit TNF: n = 144). Signifikanzniveau $p = .05$; *** $p < .001$, ** $p < .005$; * $p < .05$), Mann-Whitney-U-Test

Abkürzungen: IL-8 = Interleukin-8, OA = Osteoarthritis, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RA = Rheumatoide Arthritis, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, TNF = Tumornekrosefaktor

Auch für die basale und die TNF-stimulierte IL-8 Produktion in RASF und OASF zeigten der GHS-R Agonist L-692,585 und der Antagonist/*biased* Ligand YIL-781 alleine keinen signifikanten Einfluss (Abb. 21 A, B, D, E). Dies galt auch für die Kombination aus YIL-781 (10 μ M) mit aufsteigenden Konzentrationen von L-692,585 (Abb. 21 C, F). Bei RASF zeigte sich unter der Kombination aus L-692,585 und YIL-781 aber eine dosisabhängige Steigerung der IL-8 Konzentration (Abb. 21 F).

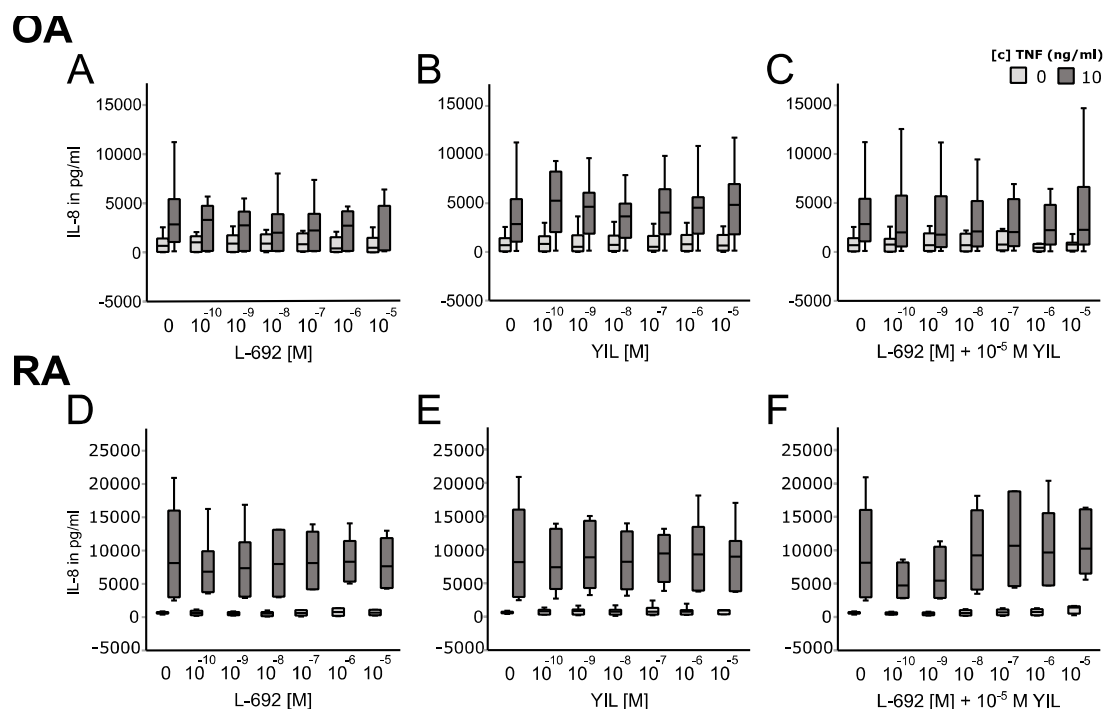


Abb. 21 Einfluss der GHS-R Liganden L-692,585 und YIL-781 auf die IL-8 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen

SF wurden mit GHS-R Liganden 24h vorinkubiert. Anschließend wurde TNF (10ng/ml Endkonzentration) für 48h zugegeben. SF ohne TNF wurden über 72h inkubiert.

IL-8 Konzentrationen nach Stimulation von OASF (A, B, C) und RASF (D, E, F) mit aufsteigenden Konzentrationen von L-692,585 (A, D), YIL-781 (B, E) oder in Kombination (C, F) (OASF ohne TNF: n = 12; OASF mit TNF: n = 12; RASF ohne TNF: n = 6; RASF mit TNF: n = 6; jeweils Triplets pro Patient). Signifikanzniveau $p = .05$; Kruskal-Wallis mit Bonferroni-Korrektur

Abkürzungen: GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, IL-8 = Interleukin-8, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, TNF = Tumornekrosefaktor

3.8.3 Regulation der MMP-3 Produktion

Zusammengefasst zeigte sich eine höhere MMP-3 Produktion, wenn OASF oder RASF mit TNF inkubiert wurden ($p < .001$) (Abb. 22). Die MMP-3 Produktion in RASF war dabei unter TNF-stimulierten Bedingungen signifikant höher als in OASF ($p < .001$) (Abb. 22). Basal war die MMP-3 Konzentration in RASF niedriger als in OASF ($p < .001$) (Abb. 22).

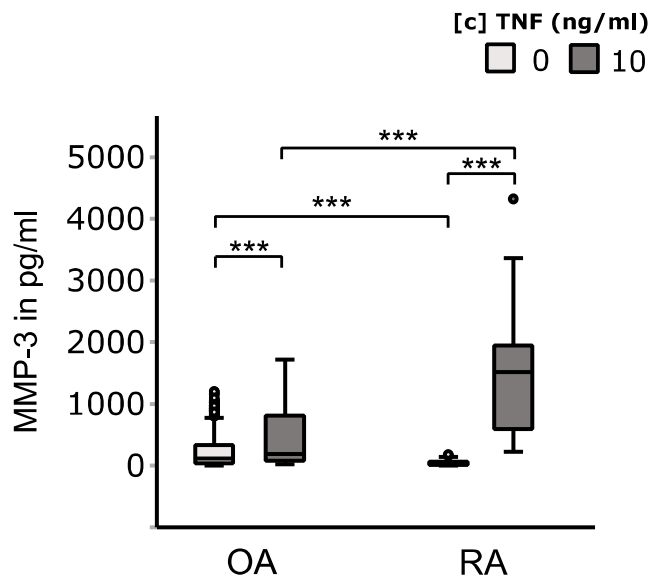


Abb. 22 Vergleich der MMP-3 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen

Alle erhobenen Messpunkte wurden zusammengefasst und OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen verglichen (OA kein TNF: n=286; OA mit TNF: n=216; RA kein TNF: n=136; RA mit TNF: n=144). Signifikanzniveau $p = .05$; *** $p < .001$, ** $p < .005$; * $p < .05$), Mann-Whitney-U-Test
 Abkürzungen: MMP-3 = Matrix-Metalloproteinase-3, OA = Osteoarthritis, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RA = Rheumatoide Arthritis, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, TNF = Tumornekrosefaktor

Auf die basale und TNF-stimulierte MMP-3 Produktion zeigten der GHS-R Agonist L-692,585 und der Antagonist/*biased* Ligand YIL-781 alleine ebenfalls keinen Einfluss in RASF und OASF (Abb. 23 A, B, D, E). Für RASF konnte bei Stimulation mit dem Antagonisten/*biased* Ligand YIL-781 ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden. Unter TNF-stimulierten Bedingungen zeigte sich bei einer Konzentration von 10 μ M YIL-781 eine Erhöhung der MMP-3 Produktion um 145 % im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mit Trend zur Signifikanz (+1494,05 pg/ml \pm 7 (SEM); $p = .097$) (Abb. 23 E). Bei RASF zeigte sich zudem ein dosisabhängiger Effekt und eine signifikant um 125,47 % gesteigerte MMP-3 Produktion bei der Kombination aus der höchsten Konzentration von L-692,585 (10 μ M) mit YIL-781 (10 μ M) (+1293,47 pg/ml \pm 7 (SEM); $p = .029$) (Abb. 23 F).

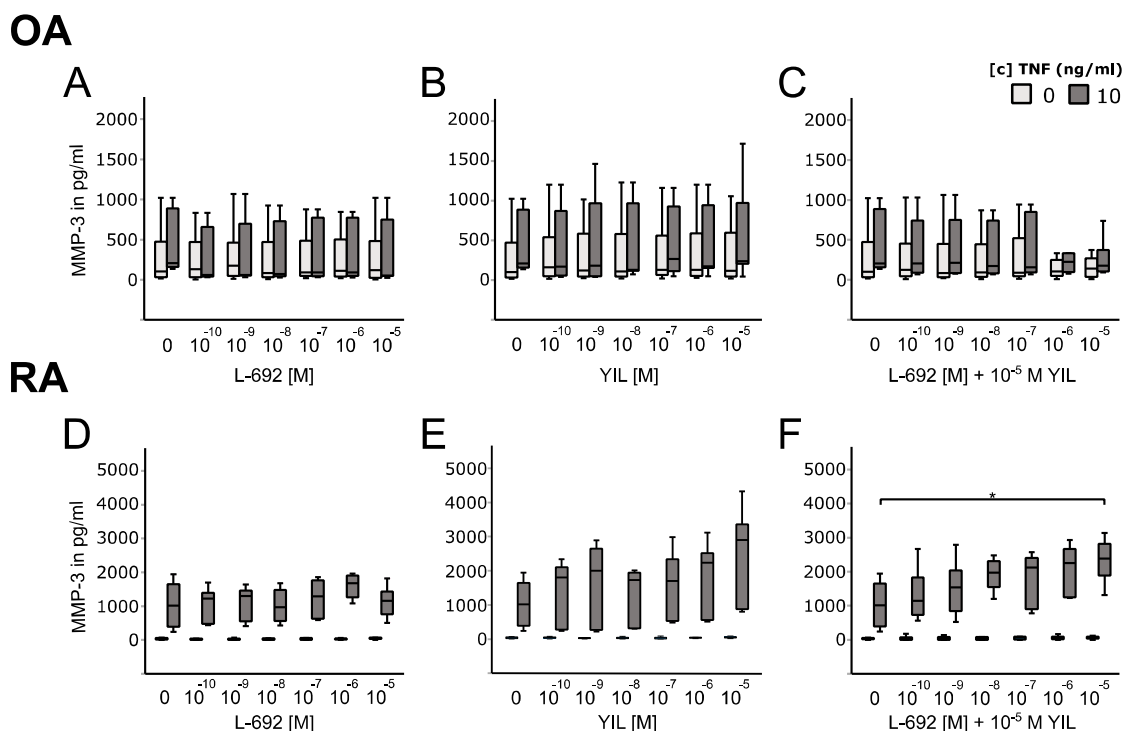


Abb. 23 Einfluss der GHS-R Liganden L-692,585 und YIL-781 auf die MMP-3 Produktion von OASF und RASF unter basalen und TNF-stimulierten Bedingungen

Die SF wurden mit GHS-R Liganden 24h vorinkubiert. Anschließend wurde TNF (10ng/ml Endkonzentration) für 48h zugegeben. SF ohne TNF wurden über 72h inkubiert.

MMP-3 Konzentrationen nach Stimulation von OASF (A, B, C) und RASF (D, E, F) mit aufsteigenden Konzentrationen von L-692,585 (A, D), YIL-781 (B, E) oder in Kombination (C, F) (OASF ohne TNF: n = 12; OASF mit TNF: n = 9; RASF ohne TNF: n = 6; RASF mit TNF: n = 6; jeweils Triplets pro Patient). Signifikanzniveau $p = .05$; Kruskal-Wallis mit Bonferroni-Korrektur

Abkürzungen: GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, MMP-3 = Matrix-Metalloproteinase-3, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, TNF = Tumornekrosefaktor

3.9 Ausblick auf weiterführende Experimente

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Komponenten des ghrelinergen Systems in primären SF beschrieben. Erste Versuche untersuchten die Regulation des Systems unter inflammatorischen Bedingungen, allerdings zeigten die Ergebnisse hier nur einen kleinen Einfluss. Physiologisch wird das ghrelinerge System vom Ernährungsstatus und der Nährstoffverfügbarkeit reguliert. Daher wurden zum Abschluss der Arbeit erste Versuche durchgeführt, mögliche Bedingungen zu identifizieren, die das ghrelinerge System regulieren.

3.9.1 Einfluss des Nährmediums und von Hypoxie auf die Expression des GHS-R und GOAT

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss des FCS-Gehalts auf die Expression des GHS-R sowie der GOAT unter Normoxie und Hypoxie mittels quantitativer WB-Analyse überprüft (Abb. 24). Insgesamt wurde die Expression des GHS-R durch die Verwendung eines serumfreien Nährmediums reduziert. Unter normoxischen Bedingungen zeigten sich hierbei weder für OASF noch für RASF signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle mit FCS-haltigem Nährmedium. Unter hypoxischen Bedingungen sank die GHS-R-Expression in OASF signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Normoxie und FCS-haltiges Medium) um ca. die Hälfte ($p = .014$) (Abb. 24 A).

Die Expression von GOAT wurde durch die Verwendung eines serumfreien Mediums hingegen erhöht (Abb. 24 B). Signifikante Steigerungen der GOAT-Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich bei OASF und RASF sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen (jeweils $p = .037$). Zwischen Normoxie und Hypoxie und RASF und OASF konnte kein signifikanter Unterschied für die GHS-R und GOAT-Expression festgestellt werden.

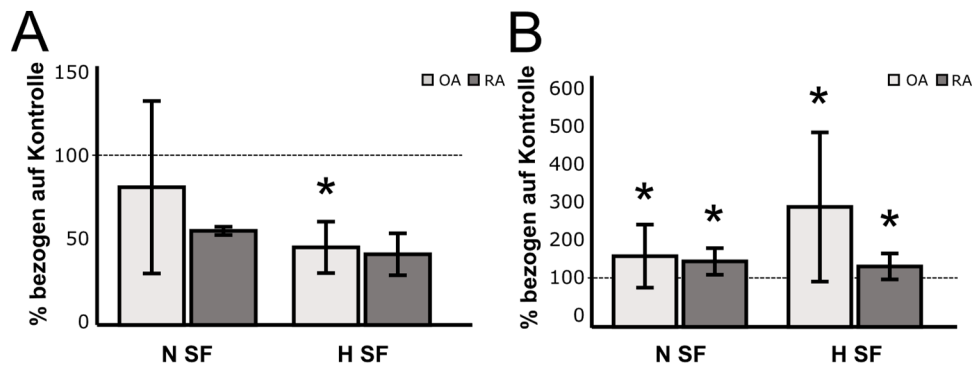


Abb. 24 **Regulation der GHS-R- und GOAT-Expression durch serumfreies Medium und Hypoxie.**
A) GHS-R-Expression in OASF und RASF unter Normoxie, Hypoxie sowie serumfreiem Medium. Die Proteinlevel von GHS-R wurden zunächst auf den *Housekeeper* GAPDH bezogen und anschließend im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle (100 %; Normoxie und FCS-haltiges Serum) betrachtet (RA: n = 2; OA: n = 3).

B) GOAT-Expression in OASF und RASF unter Normoxie, Hypoxie sowie serumfreiem Medium. Die Proteinlevel der GOAT wurden zunächst auf den *Housekeeper* Cyclophilin B bezogen und anschließend im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle (100 %; Normoxie und FCS-haltiges Serum) betrachtet (RA: n = 3; OA: n = 3).

Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert \pm SEM. Signifikanzniveau * $p = .05$, Mann-Whitney-Test

Abkürzungen: FCS = fetales Kälberserum, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, H = Hypoxie, N = Normoxie, OA = Osteoarthritis, OASF = osteoarthritis synovial fibroblasts, RA = Rheumatoide Arthritis, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, SEM = standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes), SF = Serumfrei

3.9.2 Einfluss der Glukosekonzentration

In dieser Arbeit sollte außerdem experimentell überprüft werden, ob die Expression des GHS-R und der GOAT in SF durch Veränderungen der Glukosekonzentrationen im Medium moduliert wird. Das in dieser Arbeit verwendete Kulturmedium hat eine Glukose Konzentration von 2 g/l. Daher wurden niedrigere Glukosekonzentrationen (0, 0,25, 0,5 und 1 g/l) in serumfreiem Medium alleine oder zusammen mit TNF oder IFN auf ihren Einfluss auf die GHS-R- (Abb. 25 A) und GOAT- (Abb. 25 B) Expression in RASF (n=1) getestet. Es zeigte sich ein Einfluss der Glukose-Konzentration auf die Expression des GHS-R, allerdings scheint hier nur das komplette Fehlen von Glukose die Expression negativ zu beeinflussen (Abb. 25 A). Bei der GOAT scheint die Glukose Konzentration keinen Einfluss auf die Expression zu haben, denn die Steigerungen bei 0 und 0,5 g/l wirken zufälliger Natur. Aufgrund der geringen Fallzahl (n = 1) wurden keine statistischen Tests durchgeführt und zur Erhärtung der Ergebnisse sollten noch weitere Patientenproben untersucht werden.

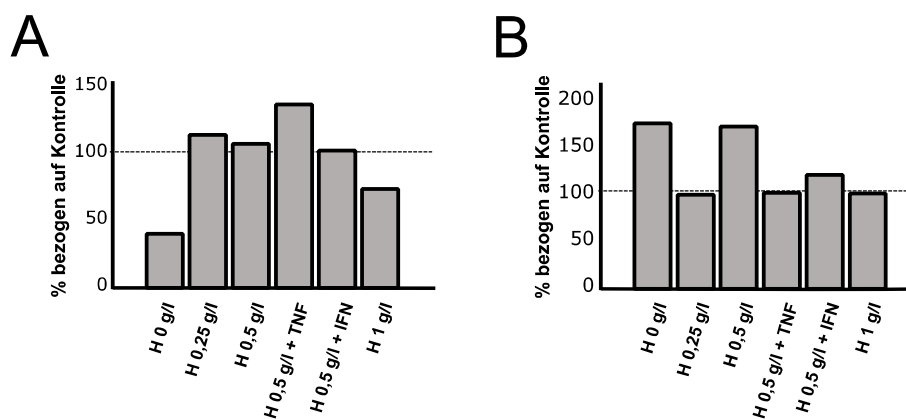


Abb. 25 Regulation der GHS-R- und GOAT-Expression durch unterschiedliche Glukosebedingungen in RASF.

A Die Proteinlevel von GHS-R (AGR-031) wurden zunächst auf den *Housekeeper* GAPDH bezogen und anschließend im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (Normoxie, FCS-haltiges Serum) betrachtet (n = 1).

B Die Proteinlevel von GOAT (ab178893) wurden zunächst auf den *Housekeeper* Cyclophilin B bezogen und anschließend im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (Normoxie, FCS-haltiges Serum) betrachtet (n = 1)).

Abkürzungen: FCS = fetales Kälberserum, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase, H = Hypoxie, N = Normoxie, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

3.9.3 Zell-ELISA

Da im Zellkulturüberstand kein Ghrelin mittels ELISA detektiert werden konnte, sollte zum Nachweis und Quantifizierung dieses Peptids ein Zell-ELISA etabliert werden. Dieser hat den Vorteil das Ghrelin nicht sezerniert werden muss und der Abbau aufgrund seiner intrazellulären Lokalisation minimiert wird. In einem ersten Testlauf sollten dafür nun die optimalen Bedingungen etabliert werden. Hierzu wurden RASF in verschiedenen Zellzahlen/Well (0, 1250, 2500, 5000, 10000, 15000/Well) in 96-Well-Platten ausgesät und fixiert, mit verschiedenen Anti-Ghrelin-AK in unterschiedlichen Konzentrationen oder entsprechenden Isotypen versetzt und inkubiert (s. Tabelle 10). Erste Ergebnisse zeigten einen starken Hintergrund in der Isotypfärbung und sind daher in dieser Arbeit nicht dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Nachweis des ghrelinergen Systems in Synovialgewebe und Synovialen Fibroblasten

4.1.1 Nachweis der Ghrelin-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe und isolierten RASF

In dieser Arbeit sollte zunächst der Nachweis von Ghrelin in Synovialgewebe von RA- und OA-Patientinnen und Patienten mittels immunfluoreszenter Färbung erfolgen. Ghrelin konnte hierbei erstmalig in humanem Synovium nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang jedoch nur mit dem polyklonalen Abcam AK ab129383 und nicht mit dem monoklonalen Abcam AK ab209790. Es ist bekannt, dass Ghrelin vor allem von X/A-ähnlichen Zellen im Magen produziert wird und ubiquitär im Körper vorkommt [125]. Auch im krankhaft veränderten Gelenk wurde Ghrelin bereits nachgewiesen. In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Ghrelin im Zytoplasma von Chondrozyten im Knorpelgewebe von OA-Patientinnen und Patienten exprimiert wird und dort im Vergleich zu Kontrollen vermindert vorliegt [96]. In Experimenten mit Ratten fand sich für Ghrelin mehrheitlich ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei IGF-I in der Proliferations- und Maturationszone des Knorpels und es wird daher angenommen, dass es eine Rolle als Wachstumsfaktor für Chondrozyten spielen könnte [131]. Auch Osteoblasten exprimieren Ghrelin und es soll dort durch Induktion der Zellproliferation und -differenzierung die Knochenbildung und Mineralisierung der Knochenmatrix fördern [95]. Es konnte also bereits eine protektive Rolle von Ghrelin auf Knorpel und Knochen nachgewiesen werden.

In den immunfluoreszenten, mikroskopischen Bildern zeigte sich insgesamt eine etwas verminderte Färbung in OA- im Vergleich zum RA-Gewebe. Zahlreiche Zellen wie z. B. T-Zellen, B-Zellen und Monozyten treten durch die Immunreaktion in RA im Vergleich zu OA vermehrt auf. So könnte es sein, dass es sich bei einigen der gefärbten Zellen um T-Zellen handelt, welche nachweislich acyliertes Ghrelin exprimieren [103] und in RA Gewebe reichlich vorhanden sind [132]. Es ist bereits bekannt, dass menschliche Monozyten, T- und B-Zellen Ghrelin exprimieren und aktiv sezernieren [101, 103]. Auch die Anzahl an Makrophagen steigt bei RA-Patientinnen und Patienten deutlich an. Sie machen die Mehrzahl der Zellen in der Deckschicht des Synovialgewebes aus [43] und auch sie exprimieren Ghrelin [103]. Insgesamt wurden mittlerweile rund 20 verschiedene Zelltypen in RA Synovium nachgewiesen [133], die alle potentiell Ghrelin exprimieren könnten. Aufgrund der Hyperproliferation der SF bei der RA enthält RA Gewebe außerdem mehr SF als OA Gewebe [63]. In RA liegt aber auch eine stärkere inflammatorische Komponente mit höherer Expression von inflammatorischen Marken vor als in OA [63]. Zudem wurde berichtet, dass in OA-Synovialflüssigkeit erniedrigte Ghrelinspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert wurden und diese mit der Krankheitsaktivität korrelieren [134]. Auch in OA-Knorpelgewebe wurden verminderte Ghrelinlevel im Vergleich zu gesunden Kontrollen identifiziert [96]. In einigen Arbeiten konnten erhöhte Ghrelinspiegel in entzündlichen Erkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Ankylosierender Spondylitis, Vaskulitis und Sepsis festgestellt werden [105, 126], was auch die vermehrte Expression in RA erklären würde. Die erhöhte Ghrelin-Expression bei chronisch entzündlichen Erkrankungen könnte ein kompensatorischer Mechanismus zur Eindämmung der Entzündung darstellen. Dem entgegen steht jedoch die Beobachtung, dass in RA auch erniedrigte Ghrelin Level beobachtet wurden [111], die aber in weiteren Studien nicht bestätigt wurde. Koca et al. konnten keinen Unterschied der Ghrelin

Level zwischen RA und Gesunden feststellen [105]. In Arthritis-induzierten Ratten wurden sowohl erhöhte als auch verringerte Ghrelin Konzentrationen berichtet [105]. Einschränkend ist zu erwähnen, dass aufgrund der geringen Fallzahl keine quantitative Analyse des Ghrelin Nachweises mittels IF durchgeführt wurde, was für eine Objektivierung dieser Beobachtung notwendig wäre. Ein quantitativer Vergleich zwischen RA und OA sollte wie für GHS-R und GOAT mittels WB erfolgen, leider gelang der Nachweis des Ghrelins mittels WB nicht (s. u.).

Das Verteilungsmuster der Ghrelin-Färbung, welches eine positive Färbung im gesamten Gewebe zeigt, deutet darauf hin, dass verschiedene Zelltypen im Synovium Ghrelin exprimieren. Es sollte daher mittels immunfluoreszenter Färbung von isolierten SF ein spezifischer Nachweis von Ghrelin in SF erbracht werden. Ghrelin konnte mit beiden Anti-Ghrelin-AK erfolgreich nachgewiesen werden. Dieser Effekt war jedoch konzentrationsabhängig und gelang erst bei höheren Konzentrationen des primären AK (monoklonal > 0,22 µg; polyklonal > 0,5 µg). Da es sich bei Ghrelin um ein sezerniertes Peptidhormon ohne Membranbindedomäne handelt, liegt es wie viele Zytokine zytoplasmatisch vor, was sich so auch in der immunzytologischen Färbung darstellte. Damit bestätigt sich die Beobachtung von Ma et al., die Ghrelin bereits in MH7A-Zelllinien nachweisen konnten, nun auch in primären Synoviozyten [135].

Einfluss von IFN- γ auf die Ghrelin-Expression

Zusätzlich wurde der Einfluss einer IFN- γ Stimulation auf die SF untersucht. Hierbei ließ sich kein gravierender Unterschied zwischen der Expression von Ghrelin mit oder ohne IFN- γ feststellen. Der Einfluss von IFN- γ auf die Ghrelin-Expression ist bisher wenig untersucht, in einigen Arbeiten konnte jedoch ein gegenseitiger Einfluss festgestellt werden. So konnten Strickertsson et al. in einem Mausmodell einen inhibierenden Einfluss von IFN- γ auf die Ghrelin-Expression im Magen nachweisen [136]. Es ist beschrieben, dass Ghrelin die mRNA-Expression von IFN- γ in murinen T-Zellen der Milz inhibiert [137]. Dies konnte auch in einem murinen Asthma Model beobachtet werden, in dem die IFN- γ Spiegel in der Flüssigkeit aus einer bronchoalveolären Lavage durch Ghrelin signifikant gesenkt wurden [138]. In aktivierten T-Zellen zeigte sich nach Stimulation mit IFN- γ eine Änderung des Verteilungsmusters des Ghrelins durch Organisation in *lipid rafts* [104]. Eine solche Veränderung durch die Aktivierung konnte in dieser Arbeit in den untersuchten SF nicht festgestellt werden. In zukünftigen Arbeiten sollte bei genügend vorliegenden Proben auch eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzfärbung durchgeführt werden, um den Einfluss der IFN- γ Stimulation auf die Ghrelin-Expression zu objektivieren.

Nachweis der Ghrelin-Expression mittels Western Blot

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus der IF und zur quantitativen Auswertung sollte ein zusätzlicher Nachweis mittels WB erfolgen. Dieser gelang mit den verwendeten kommerziellen Anti-Ghrelin-AK nicht. Dies könnte auf eine verminderte AK-Qualität hindeuten (Verkauf wurde mittlerweile eingestellt) oder auf mangelnde Spezifität im WB, da diese Methode mittlerweile nicht mehr auf aktuellen Datasheets als validierte Methode aufgeführt wird (ab209790, ab117620, ab129383, ab57222). Lediglich der ab129383 wurde in der Literatur erfolgreich für WB-Verfahren in Nagetieren eingesetzt [139]. Probleme bei der Verwendung von kommerziellen Anti-Ghrelin-AK wurden bereits berichtet [140]. Beispielsweise kam es im zentralen Nervensystem von Nagetieren immer wieder zu widersprüchlichen Ergebnissen, was auf eine unspezifische Bindung der AK zurückgeführt wurde, da es z. B. bei Ghrelin *Knockout*-Mäusen vorkam, dass die Immunreaktivität von Ghrelin im Hypothalamus durch den Ghrelin-

Knockout nur teilweise reduziert war [140]. Des Weiteren könnte eine geringe Konzentration von Ghrelin und dessen Instabilität den Nachweis im WB erschweren.

Bei Ghrelin handelt es sich um ein sehr kleines und in Serum bei Inkubation instabiles Molekül mit einer kurzen Halbwertszeit [141]. Bei der Durchführung der Experimente wurden die von Xiang et al. publizierten Empfehlungen zur WB Analyse von kleinen Molekülen unter 20 kDa eingehalten (Nitrocellulosemembran statt PVDF, Porengröße 0,2 µm) [142]. Möglicherweise wurde aber eine zu hohe Konzentration des SDS im Lauf- und Probenpuffer verwendet, da dies bereits zu Problemen beim Nachweis von kleinen Peptidhormonen geführt hat (beschrieben z. B. beim Insulin) [143]. Zudem liegt Ghrelin in anderen Geweben außer dem Magen nur in sehr geringen Konzentrationen vor und könnte aus diesem Grund nicht mittels WB nachweisbar sein, da die Konzentration vom Protein in Zelllysaten zusätzlich verdünnt ist. Ghrelin könnte außerdem durch die Entzündungsreaktion im Gelenk noch weiter inhibiert werden. Da die IF auf den Zellen direkt durchgeführt wurde handelt es sich hierbei um das sensitivere Verfahren. Für weitere WB-Untersuchungen wäre in Zukunft auch zusätzlich eine Positivkontrolle sinnvoll. Ggf. kann auch eine Fixierung von Ghrelin auf der Membran mit 0,2 %igen Glutaraldehyd die Darstellung verbessern [143].

Ein weiterer Grund für den fehlenden Nachweis könnte die Präsenz verschiedener Isoformen wie z. B. DAG sein, die durch die verwendeten AK möglicherweise nicht erfasst werden. Darüber hinaus sind mittlerweile weitere verschiedene posttranslationale Modifikationen oder Ghrelin-Spleißvarianten, wie z. B. das 'Minighrelin', welches octanyliert ähnliche Funktionen wie Ghrelin ausübt, beschrieben [144].

4.1.2 GHS-R-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe und isolierten RASF

Als weitere Komponente des ghrelinergen Systems sollte auch ein Nachweis des GHS-R in Synovialgewebe von RA und OA und in isolierten RASF erfolgen. Insgesamt zeigte sich wie beim Ghrelin auch für den GHS-R eine stärkere Färbung des RA-Gewebes im Vergleich zu OA-Gewebe. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression von GHS-R eingeschränkter ist als die von Ghrelin, mit der höchsten Expression in der Hypophyse und im Hypothalamus und vergleichsweise geringerer Expression in der Peripherie [145]. Ein Nachweis des GHS-R und seiner trunkierten Isoform erfolgte ebenfalls in verschiedenen Immunzellen und -geweben [74, 125, 126], ein Nachweis im Synovium wurde bisher jedoch noch nicht erbracht. Ähnlich wie beim Ghrelin konnte in aktivierten T-Zellen auch hier eine Organisation in *lipid rafts* beobachtet werden [103]. Erhöhte Expressionswerte von GHS-R in Makrophagen und T-Zellen werden in entzündlichen Krankheitsmodellen nachgewiesen; dies deutet darauf hin, dass Ghrelin/GHS-R an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen beteiligt sein könnte [145].

Um einen RASF spezifischen Nachweis von GHS-R zu erbringen, wurde zusätzlich eine immunfluoreszente Färbung an isolierten humanen RASF durchgeführt. Ma et al. wiesen den GHS-R bereits in der Membran und Zytoplasma einer MH7A-Zelllinie mittels IF nach [135]. Montero-Melendez et al. konnten den GHS-R hingegen mittels *Realtime*- Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nicht in SF nachweisen [146]. Auch in Chondrozyten gelang der Nachweis mittels RT-PCR nicht, obwohl Bindungsanalysen mit 125I-Ghrelin auf ein Vorhandensein eines Rezeptors für Ghrelin hindeuten [131]. In späteren Arbeiten konnte der GHS-R dann in Chondrozyten mittels WB nachgewiesen werden [147]. Es ist allgemein bekannt, das mRNA Level und Proteinlevel nicht gut miteinander korrelieren [148] und dies ist auch bei Ghrelin und dem GHS-R beschrieben [149]. Grund für ein Nicht-Erkennen mittels RT-

PCR könnten unterschiedliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen oder eine verminderte RNA-Konzentration im Vergleich zur Proteinkonzentration sein.

Nachweis der GHS-R-Expression mittels Western Blot

Zur Bestätigung des Nachweises und zur quantitativen Auswertung wurden zusätzlich WB-Analysen durchgeführt. Zunächst gelang der Nachweis mittels des ab85104 AK aufgrund eines unspezifischen Bindeverhaltens des AK nicht. Auf der Website des Herstellers wurde später von Anwendern angemerkt, dass es bei einer Inkubation mit BSA zu Extrabanden kommt. In diesen Versuchen gelang für den ab85104 AK aber auch mit TBS-T oder Milch kein spezifisches Signal. Mit dem Alomone AK gelang der Nachweis schließlich und es zeigten sich bei einigen Proben Doppelbanden bei 50 und 60 kDa, was bereits in der Literatur beschrieben ist [150]. Zudem kann häufiges Passagieren der Zellen zu veränderten Expressionsprofilen führen. So detektierten Maccarinelli et al. in einer Osteoblastenzelllinie aus Ratten bei dem GHS-R1a ab Passage 10 eine zusätzliche Bande im WB [151]. In dieser Arbeit wurde jedoch maximal Passage 9 verwendet. Des Weiteren können posttranslationale Modifikationen und andere Isoformen durch alternatives *Splicing* eine Ursache für Doppelbanden sein. So sind bereits unterschiedliche Glykosylierungen für den GHS-R1a beschrieben (siehe www.uniprot.org/uniprotkb/Q92847). Außerdem könnte die weitere Bande auch auf die Bildung eines Heterodimers hindeuten, was für den GHS-R bereits umfassend beschrieben ist [76].

Bei der Untersuchung der Expression von GHS-R in RASF im Vergleich zu OASF konnte ein Trend zur geringeren Expression in OASF beobachtet werden, was zu der subjektiven Beobachtung der Färbung in Synovialgewebe passt.

4.1.3 GOAT-Expression in OA- und RA-Synovialgewebe und isolierten RASF

Es konnte gezeigt werden, dass die GOAT sowohl in RA- als auch in OA-Synovialgewebe exprimiert wird. Dies ist kongruent mit der Beobachtung, dass die relative Verteilung von GOAT und Ghrelin in Geweben in der Regel korreliert [75]. Wie Ghrelin und der GHS-R wird auch die GOAT in Chondrozyten exprimiert [95]. Bisher wurde die GOAT aber noch nicht in Synovialgewebe oder SF nachgewiesen.

Um einen spezifischen Nachweis der GOAT in RASF zu erbringen, wurde ebenfalls eine immunzytochemische Färbung von RASF durchgeführt. Hier konnte die GOAT vor allem in der Kernmembran, aber auch im Zellkern von RASF nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die GOAT vor allem in der Membran des ERs lokalisiert ist, sie wurde aber auch in Lipid-Transportvesikeln und der Plasma-Membran nachgewiesen [81, 152]. So konnte bereits in unterschiedlichen Zellen ein zur Lokalisation in der ER-Membran passendes, den Nucleus umgebendes, Anfärbe-Muster in IF festgestellt werden [70, 153]. Eine komplette Färbung des Nucleus, wie hier in RASF, ist bisher aber noch nicht beschrieben. Dies könnte auf eine bisher unbekannte Rolle von GOAT im Zellkern hindeuten, wie z. B. die Regulation der Genexpression von Ghrelin, GHS-R oder GOAT selbst, oder auf eine Rolle bei DNA-Reparaturprozessen, worüber GOAT z. B. die Proliferation von SF in RA beeinflussen könnte. Zudem ist für den verwendeten AK im Datasheet beschrieben, dass er auch eine bekannte Isoform (Q96T53-2) von GOAT bindet, die möglicherweise zu dem veränderten Anfärbemuster beigetragen haben könnte.

Ein optischer Unterschied in der Färbeintensität zwischen RA und OA, wie bei Ghrelin und dem GHS-R konnte nicht festgestellt werden, wurde aber quantitativ nicht überprüft.

Nachweis der GOAT-Expression mittels Western Blot

Beim Nachweis der GOAT-Expression mittels WB konnte kein Unterschied zwischen RASF und OASF festgestellt werden, auch ließ sich kein Einfluss durch Inkubation unter Hypoxie feststellen. Es zeigte sich im WB eine Doppelbande bei 37 und 50 kDa. Wie oben beschrieben handelt es sich hierbei vermutlich um die bekannte Isoform Q96T53-2. Diese zeigt eine hohe Homologie zur kanonischen Sequenz und beinhaltet die beiden vermuteten katalytischen Zentren Asn-307 (N-307) und His-336 (H-336) (Abb. 26a) [154]. Die mit Protter [155] vorhergesagte Proteinstruktur und das mittels SWISS-Model [156] vorhergesagte Proteinstrukturmodell deuten darauf hin, dass auch die trunkierte Isoform funktionsfähig ist, da die katalytischen Zentren jeweils entsprechend lokalisiert sind und eine stabile Transmembranstruktur entsteht (Abb. 26b). Auch in der Maus wurden zwei Banden für GOAT nachgewiesen, was auf eine stabile Isoform von GOAT zurückgeführt wird, deren Startcodon bei M-54 beginnt, was bedeutet, dass die ersten beiden Transmembransegmente fehlen [82]. Es wäre jedoch auch denkbar, dass es sich bei der Doppelbande um ein Gelartefakt handelt, da GOAT wie viele andere integrale Membranproteine beim Erhitzen in SDS aggregiert und daher möglicherweise nicht vollständig denaturiert ist [82].

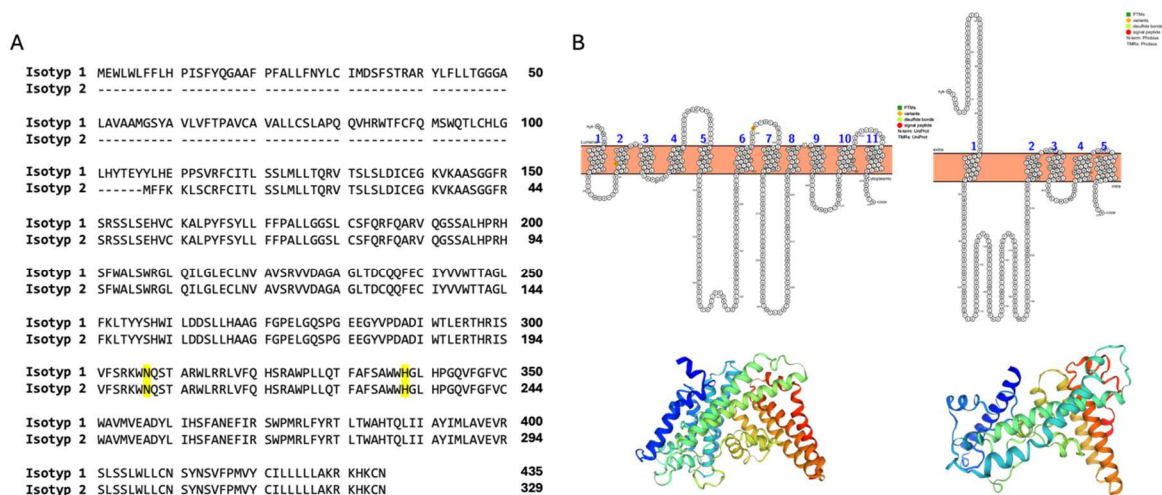


Abb. 26 **Bekannte Isoformen der GOAT**

A Alignment der Sequenzen der beiden in Uniprot beschriebenen Isoformen der GOAT. In Gelb sind die beiden Zentren mit katalytischer Aktivität markiert.

B Auf der linken Seite sind die vorhergesagten 2- (oben) und 3-dimensionalen (unten) Proteinstrukturen der kanonischen GOAT-Isoform. Auf der rechten Seite finden sich die entsprechenden Strukturen für die trunkierte Isoform.

Abkürzungen: GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase

4.2 Regulation des ghrelinergen Systems im Kontext der Rheumatoiden Arthritis

Bisher ist wenig über die Regulation des ghrelinergen Systems im Kontext der RA bekannt. Es wird eine antiinflammatorische Wirkung des Ghrelins postuliert. In RA-Patientinnen und Patienten wurden erniedrigte Ghrelinspiegel nachgewiesen, die nach einer Anti-TNF-Therapie mit Infliximab wieder anstiegen [111, 116]. Auch in Arthritis-induzierten Ratten war das Ghrelin zunächst vermindert, stieg aber nach einiger Zeit wieder an [111]. Demnach könnte also die systemische Produktion von Ghrelin durch proinflammatorische Zytokine oder Prozesse inhibiert werden. In menschlichen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine verminderte

Ghrelin-Expression zu einer Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen führte, während eine Zugabe von acyliertem Ghrelin nach 48h zu einer Inhibition führte [104]. In Chondrozyten von OA-Patientinnen und Patienten konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die Protein- und mRNA-Expressionslevel von Ghrelin signifikant reduziert [96]. Die Regulation des ghrelinergen Systems in SF und dessen Bedeutung für chronisch inflammatorische Gelenkerkrankungen wurde jedoch noch nicht untersucht.

4.2.1 Regulation des GHS-R durch proinflammatorische Zytokine

Es ist bekannt, dass der GHS-R als Rezeptor für das Ghrelin an der antiinflammatorischen Reaktion des Ghrelins beteiligt ist [157] und in diesem Zusammenhang wurde bereits in einigen Arbeiten untersucht, wie sich seine Modulation auf die Zytokinlevel auswirkt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der GHS-R in die Modulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α in T-Zellen und Monozyten involviert ist [103]. Bisher wurde hauptsächlich der Einfluss von Zytokinen auf Ghrelin untersucht. Ob die Expression des GHS-R durch proinflammatorische Zytokine moduliert wird, ist bisher noch unklar.

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, welchen Einfluss die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-1 β sowie die Kombination von TNF- α und IFN- γ auf die Expression der Proteinlevel des GHS-R in RASF haben. Mittels WB konnte hierbei kein signifikanter Einfluss auf die GHS-R Level in RASF festgestellt werden. Auch eine Inkubation unter hypoxischen Bedingungen zeigte keinen Einfluss im Vergleich zu normoxischen Bedingungen. Bisher ist über die Regulation des GHS-R nicht viel bekannt. Er wird hochreguliert bei GH-Defizienz, durch GHRH-Agonisten, Glukokortikoide, Östrogene und Schilddrüsenhormone. Herunterreguliert wird er durch eine Behandlung mit GH oder GHS [69]. Da der GHS-R an der Modulation der Zytokine von Ghrelin beteiligt ist, war eine Hypothese dieser Arbeit, dass auch der GHS-R durch proinflammatorische Prozesse reguliert werden könnte.

In T-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die GHS-R-Genexpression durch eine Aktivierung der T-Zellen gesteigert wird [103]. Die hier untersuchten Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 spielen bei der Aktivierung der SF eine wichtige Rolle [21, 45]. In diesem Experiment zeigte sich in humanen SF jedoch kein Einfluss auf die GHS-R-Expression durch diese Zytokine. Es könnten *in vivo* aber noch andere Faktoren eine Rolle spielen. So sind Ghrelin und Leptin bekannte Gegenspieler und Leptin führte in T-Zellen zu einem Anstieg von IL-1 β , IL-6 und TNF- α [103]. Otero et al. beschrieben in Ratten einen biphasischen Prozess der Veränderung der Ghrelinlevel mit zunächst einem Abfall nach Arthritis-Induktion und einer Erholung der Ghrelinlevel nach 15 Tagen [111]. Die Autorinnen bzw. Autoren vermuten einen Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α und des Leptins. Interessanterweise konnten Nogueiras et al. in Ratten nachweisen, dass eine Leptininfusion über 24h die Expression von GHS-R im Gehirn verringerte, wohingegen eine Ghrelininfusion die Expression GH-abhängig signifikant erhöhte [158]. SF exprimieren den Leptin-Rezeptor ObR, dessen Level an der Zelloberfläche durch eine Ko-Stimulation von TNF und IFN- γ erhöht wurden [56]. Aufgrund der hohen konstitutiven Aktivität des GHS-R postulieren Nogueiras et al., dass Rezeptorexpression-beeinflussende Faktoren eine höhere Bedeutung für die Funktion haben als die Stimulation des GHS-R durch Agonisten [158]. Um die Regulation des GHS-R in SF zu elaborieren sind also weitere Experimente *in vitro* und *in vivo* notwendig.

4.2.2 Regulation der GOAT durch proinflammatorische Zytokine

Unabhängig von dem Sauerstoffpartialdruck zeigte sich insgesamt ein signifikanter Einfluss der Zytokinstimulation auf die GOAT-Proteinlevel. GOAT wurde in SF signifikant durch TNF- α und die Ko-Stimulation von TNF- α und IFN- γ inhibiert. Auch die IL-1 β Stimulation führte zu

einer Abnahme der GOAT-Proteinlevel, diese zeigte jedoch nur einen Trend zur Signifikanz. Dies passt zu der Beobachtung von Gómez et al., die eine Runterregulation der GOAT mRNA-Expression in Chondrozyten nach Inflammationsinduktion mit Lipopolysacchariden (LPS) beobachteten [95], da LPS-induzierte Zellen über den NF- κ B-Signalweg die Transkription von Zytokinen, vor allem TNF, aber auch IL-1 erhöhen [159]. Auch zu diesem Ergebnis passt, dass Leptin, als Gegenspieler von Ghrelin und proinflammatorischer Stimulus, einen stimulierenden Einfluss auf die GOAT mRNA Level hat [160]. Generell wird GOAT durch die Verfügbarkeit von mittelkettigen Fettsäuren reguliert [73, 161]. Außerdem ist die Expression von GOAT im Magen beim Fasten vermindert [162]. Rodriguez et al. konnten außerdem zeigen, dass GOAT mRNA Level in viszeralen humanen Adipozyten durch Insulin und Ghrelin reguliert werden, von TNF- α ging hier allerdings kein signifikanter Effekt auf GOAT aus [70].

In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss einer Ko-Stimulation von IFN und TNF auf die Proteinlevel der GOAT untersucht. In früheren Arbeiten von Lowin et al. konnte gezeigt werden, dass diese Kombination neben der Oberflächenexpression von ObR auch die Oberflächenexpression einiger Zytokinrezeptoren in SF stärker hochreguliert, als wenn diese alleine eingesetzt werden [56]. In dieser Arbeit zeigte sich allerdings kein synergischer Effekt der beiden Zytokine TNF und IFN- γ . Die inhibitorische Wirkung der Kombination war ähnlich zu der alleinigen TNF-Stimulation, während IFN alleine keine signifikante Wirkung zeigte.

Limitierend ist zu erwähnen, dass sich in einigen wenigen WBs ein auffälliges Färbemuster für den *Housekeeper* Cyclophilin B zeigte (Abb. 27). Dies könnte darauf hindeuten, dass der *Housekeeper* durch die Zytokine oder die Inkubationsbedingungen reguliert wird und der signifikante Einfluss der Zytokine auf eine Steigerung der Proteinlevel des *Housekeepers* zurückzuführen sein könnte und nicht auf eine Verminderung der GOAT-Proteinlevel. Tatsächlich ist für Cyclophilin B beschrieben, dass es durch Hypoxie reguliert werden kann [163], in dieser Arbeit kann das Färbemuster aber keiner Bedingung eindeutig zugeordnet werden, da es sich zwar in Hypoxie zeigte, allerdings nicht in allen WBs und auch in einem WB unter normoxischen Bedingungen. Möglicherweise spielen hier Faktoren, die auf die einzelnen Patientinnen bzw. Patienten zurückzuführen sind, eine Rolle (z. B. Medikation, Entzündungswerte, ...). Dieser Versuch sollte daher mit einem anderen *Housekeeper* wiederholt werden.

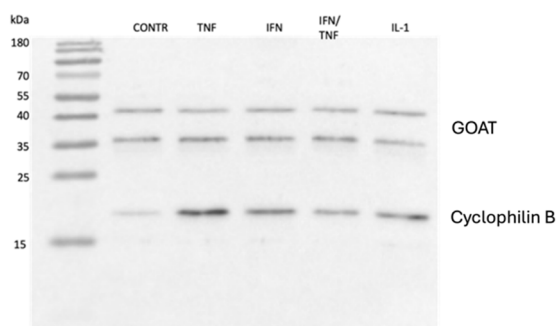


Abb. 27 Anfärbemuster des *Housekeepers* Cyclophilin B im Western Blot

Dargestellt ist eine Western Blot-Membran, die mit dem Anti-GOAT-Antikörper (ab178893) und dem *Housekeeper* Cyclophilin B inkubiert wurde. Es zeigt sich eine geringere Färbung der Kontrolle für Cyclophilin B, was die Ergebnisse der Untersuchung der Regulation von GOAT durch proinflammatorische Zytokine beeinflussen könnte.

Abkürzungen: GOAT = Ghrelin O-Acyltransferase

4.2.3 Regulation der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion durch das ghrelinerge System

Einfluss der TNF- α Stimulation

Um proinflammatorische Bedingungen zu schaffen, wurden die OASF und RASF zuvor mit TNF- α inkubiert. Es ist bekannt, dass TNF- α in RA für die Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten sorgt und die weitere Produktion proinflammatorischer Zytokine von SF bedingt [50]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit TNF- α in OASF und RASF zu einer Steigerung der IL-6, IL-8 und MMP-3 Konzentrationen führt. Hierbei konnte in RASF jeweils eine größere Steigerung beobachtet werden. Huang et al. beschrieben, dass eine Behandlung mit TNF- α in einer signifikanten Proliferation von OASF und RASF resultierte und der induktive Effekt in RASF ebenfalls größer war [63]. *In vivo* liegen so hohe Konzentrationen von TNF- α jedoch nur bei RA nicht jedoch bei OA vor [164, 165], weshalb die beobachtete Hochregulation der Zytokine und MMP-3 *in vivo* wahrscheinlich nur in RASF stattfindet.

Regulation der IL-6 Produktion in RASF

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Einfluss der GHS-R Liganden auf die IL-6-Produktion in RASF festgestellt werden. Auch eine Simulation einer Entzündungsreaktion durch TNF- α Stimulation führte zu keinem signifikanten Effekt. Dies könnte auf eine zu kurze Inkubationszeit oder zu geringe Konzentration der Liganden zurückzuführen sein. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass es zu einer dosisabhängigen (nicht signifikanten) Steigerung der IL-6 Produktion der RASF nach Stimulation mit dem Antagonisten/*biased* Ligand YIL-781 kommt. In der Literatur ist jedoch ein Einfluss der GHS-R1a Modulation auf die IL-6 Spiegel in Immunzellen beschrieben. So zeigten Granada et al., dass Ghrelin und der synthetische GHS-R1-Agonist *Growth Hormone Releasing Peptide-2* die LPS-induzierte Freisetzung von IL-6 aus aktivierten peritonealen Makrophagen *in vitro* signifikant hemmen, was auf eine antiinflammatorische Wirkung von Agonisten am GHS-R1a hindeutet [115]. Die spezifische Hemmung der Zytokinproduktion durch Ghrelin wurde in aktivierten peripheren mononukleären Blutzellen und T-Zellen beobachtet, wobei Ghrelin-Konzentrationen von 1 bis 100 ng/ml eine signifikante Hemmung der IL-1 β -, IL-6- und TNF- α -Produktion bewirkten [103]. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe eines GHS-R-Antagonisten abgeschwächt, was die Spezifität der GHS-R-vermittelten Hemmung bestätigt. Zudem wurde im Serum von RA-Patientinnen und Patienten erhöhte Spiegel des Ghrelin-antagonistischen Peptids LEAP2 festgestellt, das positiv mit IL-6 korreliert [97]. Für Leptin, den Gegenspieler des Ghrelins, wurde gezeigt, dass er die IL-6 Level in SF nicht signifikant erhöht [56].

Andererseits zeigten Untersuchungen an gealterten Mäusen, dass ein *Knockdown* des GHS-R die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 und MCP-1) sowie proinflammatorischer Makrophagenmarker (CD11c) in Makrophagen in weißem und braunem Fettgewebe reduzierte [166, 167], weshalb Lin et al. eine Rolle des Ghrelins bei der Entzündung des Fettgewebes während des Alterns postulieren und GHS-R-Antagonisten als therapeutische Option für altersbedingte Entzündungen des Fettgewebes und Insulinresistenz vorschlagen [167].

Die Abwesenheit von signifikanten Effekten in RASF könnte auf zellspezifische Unterschiede in der Signalübertragung oder Rezeptorexpression hinweisen und unterstreicht die Komplexität der GHS-R1a-vermittelten Signalwege in verschiedenen Zelltypen. Möglich ist auch ein abweichender Effekt aufgrund des *biased signaling* der verwendeten Liganden [76].

Regulation der IL-8 Produktion in RASF

Auch für die IL-8-Konzentration konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss der GHS-R-Liganden in RASF beobachtet werden. Die Konzentration bleibt unter den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen mit L-692,585 und YIL-781 relativ konstant und ähnlich zur Kontrolle. Dies könnte an zu kurzen Inkubationszeiten oder an zu geringer Konzentration der Liganden liegen, da sich wie bei IL-6 eine nicht signifikante dosisabhängige Steigerung der IL-8 Konzentration bei einer Stimulation mit der Kombination aus sich steigernden L-692,585 Konzentrationen zusammen mit 10^{-5} M YIL-781 zeigte. Andere Studien konnten bereits einen Einfluss des ghrelinergen Systems auf die chemotaktische Zytokinproduktion zeigen. Li et al. konnten nachweisen, dass die TNF-induzierte, LPS-induzierte und H_2O_2 -induzierte Freisetzung von IL-8 in Endothelzellen durch Ghrelin unterdrückt wird und dass diese Effekte GHS-R abhängig waren [168]. Hou et al. zeigten, dass Ghrelin die H_2O_2 -induzierte IL-8 Freisetzung auch in menschlichen Lungenepithelzellen auf mRNA- und auf Proteinebene konzentrationsabhängig hemmt [169]. Diese Ergebnisse deuten neben der antiinflammatorischen auch auf antioxidative Eigenschaften des Ghrelins hin. Dies spielt für die RA eine besondere Rolle, da bekannt ist, dass hier der Gehalt an Antioxidantien verringert ist [170]. Wie für IL-6 konnten Francisco et al. zeigen, dass das im Serum von RA-Patientinnen und Patienten erhöhte Ghrelin-antagonistische Peptid LEAP2 auch mit IL-8 positiv korreliert [97]. In der humanen Dickdarmschleimhaut-Epithelzelllinie NCM46 zeigten sich interessanterweise proinflammatorische Effekte des Ghrelins, dessen Exposition über eine Aktivierung des NF- κ B-Systems zu einer erhöhten Sekretion von IL-8 führte [171]. In SF wurde der Einfluss des ghrelinergen Systems auf die IL-8 Produktion bisher nicht untersucht. Lowin et al. untersuchten in SF den Einfluss von Leptin auf die IL-8 Level und beobachteten keinen signifikanten Effekt [56]. Wie oben beschrieben kann die Abwesenheit von signifikanten Effekten in RASF auf zellspezifische Unterschiede, *biased signaling*, oder konzentrationsbedingte bzw. inkubationszeitbedingte Einflüsse zurückzuführen sein.

Regulation der MMP-3 Produktion in RASF

In RASF konnte ein Einfluss der GHS-R-Stimulation mit dem Antagonisten/*biased* Ligand YIL-781 festgestellt werden. Antagonismus am GHS-R führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der MMP-3 Konzentration im Überstand der RASF. Eine signifikante Steigerung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich allerdings nur bei der Stimulation mit 10μ M YIL-781 zusammen mit 10μ M L-692,585. Durch den Agonismus am GHS-R konnte kein Einfluss festgestellt werden. Dies steht im Kontrast zu einigen Arbeiten, die eine Supprimierung von MMP-3 durch Ghrelin in anderen Zellsystemen zeigen. So konnte in einem Kontaktdermatitis-induziertem Mausmodell gezeigt werden, dass Ghrelin die durch die Induktion ausgelöste Sekretion von MMP-3 drastisch senkt [172]. Moon et al. beschreiben in einem Parkinson-Tiermodell einen neuroprotektiven Effekt durch Ghrelin, das durch Aktivierung des GHS-R die MMP-3-Expression und die anschließende Mikroglia-Aktivierung unterdrückt [173]. Ähnlich dazu konnten auch Lee et al. zeigen, dass Ghrelin die MMP-3-Expression und -Aktivität nach Rückenmarksverletzung über GHS-R1a hemmt und damit die Aktivierung der Mikroglia verhindert [174]. Darüber hinaus ist ein Einfluss von Ghrelin auf die MMP-3 Level in OA bekannt (s. u.).

Beobachtungen in OASF

Zusätzlich zu RASF wurden auch OASF als nicht chronisch-entzündliche Kontrolle analysiert. Insgesamt waren die IL-6 Konzentrationen (auch basal) in RA- signifikant höher als in OA-Patientinnen und Patienten. Dies ist wahrscheinlich auf die in RASF deutlich höheren

Expressionslevel von proinflammatorischen Zytokinen zurückzuführen [63]. In OASF zeigte eine Stimulation am GHS-R für IL-6 keine beobachtbaren Effekte. Dies steht im Kontrast zu Beobachtungen unter anderem von Qu et al., die beschrieben haben, dass eine Behandlung mit Ghrelin die IL-6 Level in einem posttraumatisch induzierten OA-Modell in Mäusen vermindert hat. Eine Stimulation mit TNF führte zur Induktion von IL-6, was wiederum durch Ghrelin-Gabe vermindert wurde [96]. Außerdem stehen die Ghrelinspiegel in der Synovialflüssigkeit in Zusammenhang mit dem Schweregrad der Erkrankung und korrelieren negativ mit IL-6 [134].

Die TNF- α -stimulierten IL-8 Spiegel waren in dieser Arbeit in RASF signifikant höher als in OASF, die basalen IL-8 Level unterschieden sich nicht zwischen OASF und RASF. In OA sind erhöhte IL-8 Spiegel in der Synovialflüssigkeit mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert, im Blut konnte diese Assoziation aber nicht gezeigt werden [175]. In Synovialflüssigkeit werden höhere IL-8 Spiegel in RA detektiert als in OA [164].

Für MMP-3 zeigten sich in dieser Arbeit höhere basale Level in OASF als in RASF, wobei die Stimulation mit TNF- α zu einer signifikant stärkeren Erhöhung der MMP-3 Konzentration in RASF als in OASF führte. Es ist bereits beschrieben, dass in OA-Synovialgewebe erhöhte MMP-3 Konzentrationen vorliegen, die positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren [176]. In Chondrozyten konnte Ghrelin die Apoptose hemmen, die IL-1 β -induzierte Expression von MMP-3 in einer konzentrationsabhängigen Weise reduzieren und die Unterdrückung des Akt-Signalwegs und die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs während der OA-Entwicklung bekämpfen [96, 177]. Insgesamt spielt Ghrelin in OA eine Rolle bei der Hemmung des Abbaus von Typ-II-Kollagen und Aggrecan [177]. Außerdem hat es einen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* und in Kombination mit TGF- β auch auf die Knorpelregeneration *in vivo* [178]. Zudem steigert Leptin die Produktion von MMP-3 in menschlichem OA-Knorpel und korreliert positiv mit den MMP-3-Konzentrationen in Synovialflüssigkeit von OA-Patientinnen und Patienten [179].

4.2.4 Ausblick auf weiterführende Experimente

Einfluss des Nährmediums und von Hypoxie auf die Expression des GHS-R und GOAT

SF erhöhen ihre Autophagie unter serumreduzierten Bedingungen [180] und Ghrelin kann seinerseits Autophagie fördern [181]. Daher könnte eine Reduktion des FCS zu einer verstärkten Aktivität des ghrelinergen Systems mit erhöhter Autophagie als Konsequenz führen. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Versuch der Einfluss des FCS-Gehalts auf die Expression des GHS-R sowie der GOAT unter Normoxie und Hypoxie mittels quantitativer WB-Analyse überprüft. Hierbei zeigte sich insgesamt eine Reduktion der GHS-R-Expression durch Verwenden eines serumfreien Nährmediums, was durch hypoxische Bedingungen noch weiter verstärkt wurde, jedoch nur in OASF unter Hypoxie signifikant war. Im Gegensatz dazu wurde die GOAT-Expression durch serumfreies Medium in OASF und RASF signifikant erhöht. Im Gegensatz zu den o. g. Effekten von Ghrelin auf die Autophagie konnten Rodríguez et al. zeigen, dass Autophagie in menschlichem viszeralem Fettgewebe von Patientinnen und Patienten mit Typ-2-Diabetes hochreguliert ist und Ghrelin die Autophagie in viszeralen Adipozyten reduziert [70]. Außerdem führt eine Inhibition von GOAT zu einer Abschwächung der Lipotoxizität durch Stimulation der Autophagie bei Nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung, also eine Hemmung von GOAT konnte die Hepatosteatose mindern [182], wobei Ghrelin die TNF- α -induzierte Hepatozyten-Autophagie supprimiert [183]. Insgesamt scheint das ghrelinerge System also die Autophagie in verschiedenen Zellsystemen zu regulieren. Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte durch die Verwendung des serumfreien

Mediums erlauben damit jedoch keine Aussage darüber, ob durch die gesteigerten GOAT-Spiegel tatsächlich die Autophagie gefördert wird. Hierfür sind weitere Experimente notwendig. Zum Beispiel könnte untersucht werden, ob eine Behandlung mit GOAT die Autophagie-Marker oder die mRNA-Expression von Autophagie-assoziierten Genen beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde in mehreren Versuchen außerdem der Einfluss von einer Inkubation der SF unter hypoxischen Bedingungen auf die GHS-R- und die GOAT-Expression untersucht. Hierbei konnte in keinem der Versuche ein Einfluss der Hypoxie beobachtet werden, es zeigte sich kein Unterschied zur Inkubation unter normoxischen Bedingungen. Der Einfluss der Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β auf die GOAT-Expression scheint also unabhängig von den bei RA vorliegenden Sauerstoff-Partialdruck-Bedingungen im Synovium aufzutreten, bei der es durch unzureichende Vaskularisierung in der Regel zu einer Hypoxie kommt, die den Entzündungsprozess und den Knochenabbau noch weiter vorantreibt [184]. In Bezug auf das ghrelinerge System wurde der Einfluss von Hypoxie bisher an Mäusen untersucht. Yang et al. konnten zeigen, dass eine hypobare Hypoxie das Ghrelin/GHS-R1a/MAPK-Signaling in Mäusen aktiviert [185]. Die Expression von acyliertem Ghrelin und die Serum Ghrelin-Spiegel waren in Ratten nach hypobarer hypoxischer Behandlung und bei Männern nach Höhenexpedition erhöht [185-187]. Interessanterweise beeinflusst eine hypobare Hypoxie auch den Appetit und das Gewicht bei Mäusen und bei gesunden Menschen [185, 188]. In RASF scheint dies aber keinen Einfluss auf die Expression des ghrelinergen Systems zu haben.

Einfluss der Glukosekonzentration

Die physiologische Aufgabe des ghrelinergen Systems ist die Aufrechterhaltung konstanter Blutzuckerspiegel auch unter Hungerbedingungen [189]. Dementsprechend sinkt die Aktivität des ghrelinergen Systems nach einer Mahlzeit und bei hohen Blutzuckerspiegeln [190]. Daher sollte experimentell überprüft werden, ob die Expression des GHS-R und der GOAT in SF durch Veränderungen der Glukosekonzentrationen im Medium moduliert wird. In einem ersten vorläufigen Versuch zeigte sich, dass das komplette Fehlen von Glukose im Medium die GHS-R-Expression negativ beeinflusst. Es ist bekannt, dass der GHS-R die Ghrelin-induzierte Hemmung der Insulinsekretion vermittelt [191]. In Ghrelin oder GHS-R-*Knockout*-Mäusen ist der Blutzuckerspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen typischerweise verringert [192]. Aber auch eine Insulininfusion bei fastenden Personen führt zu einem Absinken der Ghrelinspiegel [193]. Die pharmakologische Hemmung von GOAT verbessert die glykämische Kontrolle und stimuliert die Freisetzung von Insulin [94]. Das GOAT-Ghrelin-System scheint auch für die Verhinderung von Hypoglykämien während extremer Episoden der Kalorienrestriktion wesentlich verantwortlich zu sein [94]. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass die RASF erhebliche Unterschiede im Protein-, Glukose- und Lipidstoffwechsel gegenüber normalen SF bei Gesunden aufweisen [194]. So findet in RASF eine vermehrte Glykolyse statt [195]. Ein gezielter Eingriff in den Stoffwechsel der SF durch Hemmung der Glykolyse reduziert die Zytokinproduktion und hemmt die Proliferation und Migration der RASF [194]. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Glukoseentzug die Produktion von u. a. IL-6 sowie die Proliferations- und Migrationsrate von RASF verringerte [196]. Ob die Glukosekonzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die GHS-R-Expression in RASF haben, soll daher in Zukunft untersucht werden. Es wurden bereits erste Untersuchungen der Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 mittels Western Blot und *Fluorescence-activated Cell Sorting* durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahl sind sie in dieser Arbeit nicht dargestellt.

Zell-ELISA

Der Zell-basierte ELISA konnte für einen Nachweis des Ghrelins nicht etabliert werden. Es zeigte sich ein starker Hintergrund in allen Ansätzen, was für eine unspezifische Bindung des der AK oder eine zu hohe AK-Konzentration spricht. Es kann aber auch unzureichende Waschschrte oder unzureichende Blockierung der Bindungsstellen ursächlich sein oder ein unspezifischer Sekundär-AK. Möglicherweise beeinflussen auch die Fixierungsschritte das Signal. Daher sind künftig weitere Optimierungen der AK-Konzentrationen und ggf. Puffer nötig, um ein spezifisches Signal zu generieren.

4.3 Limitationen

Diese Arbeit weist einige Limitationen auf. Unter anderem handelt es sich um ein sehr kleines, heterogenes und unzureichend charakterisiertes Patientenkollektiv. Es konnten nur wenige Fallzahlen untersucht werden, sodass die statistischen Analysen nur eine geringe Power aufweisen. Zudem ist bekannt, dass Ghrelinspiegel und die Inflammationsreaktion durch Faktoren wie das Geschlecht, das Alter, den Ernährungszustand, die Krankheitsaktivität und die Medikamenteneinnahme beeinflusst werden [166, 197-199]. Diese Parameter wurde gar nicht oder nicht vollständig zu dem Patientenkollektiv erhoben und die statistische Auswertung wurde daher nicht für diese *Confounder* bereinigt.

Zudem handelt es sich bei dem ghrelinergen System um ein komplexes System, dass stark mit anderen hormonellen und immunologischen Systemen interagiert. Die *in vitro* Untersuchungen können die komplexen Interaktionen und Einflüsse in lebenden Organismen nicht ausreichend widerspiegeln. So wird in dieser Arbeit nicht auf den Einfluss des Lipidsystems auf das ghrelinerge System und die RA eingegangen, dabei ist bekannt, dass GOAT stark durch die Verfügbarkeit von Lipiden reguliert wird [162] und in RA nicht nur Veränderungen des Glukosestoffwechsels, sondern auch des Fettstoffwechsels festgestellt wurden [200]. Es gibt auch noch zahlreiche weitere Hormone, die einen Einfluss auf das ghrelinerge System und Inflammation haben, wie zum Beispiel Leptin und Cortisol [103, 201].

Diese Komplexität des ghrelinergen Systems wird noch verstärkt durch seine unterschiedlichen biologischen Funktionen und unterschiedlichen Zellsystem-spezifischen Reaktionen auf verschiedene Einflussfaktoren. Auch ist die Dauer der Exposition eines Zellsystems mit dem ghrelinergen System ein Einflussfaktor für die Wirkweise.

Nicht zuletzt sind auch die molekularen Mechanismen, durch die der GHS-R seine biologischen Funktionen vermittelt sehr komplex. Intrazelluläre Signalwege werden durch *biased signaling* Gewebe- und Liganden-spezifisch beeinflusst, der GHS-R weist eine hohe konstitutive Aktivität auf und Hetero- und Homodimerbildung haben einen zusätzlichen noch nicht vollständig geklärten Einfluss [76].

Zusätzlich wurden kürzlich weitere Eigenschaften des Ghrelins entdeckt, die eine Bedeutung bei der RA haben könnten. Es konnte gezeigt werden, dass Ghrelin Wirkung auf die Apoptose von Zellen hat. In normalen Geweben vermittelt es in der Regel eine anti-apoptotische Wirkung und stimuliert die Zellproliferation. In Tumorzellen und SF konnte aber gezeigt werden, dass es die Apoptose von veränderten Zellen induzieren kann und in RA somit die Hyperproliferation der SF hemmen könnte [135]. Zudem gibt es auch Hinweise darauf, dass der GHS-R durch Bindung des Melanocortin 1 Rezeptor-Agonisten BMS-470539 an der seneszenten Wirkung an SF beteiligt ist und eine Modulation des GHS-R die Proliferation von SF in RA aufhalten könnte [146].

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnten erstmals Ghrelin, GOAT und der GHS-R als die zentralen Bestandteile des ghrelinergen Systems in RA-Synovialgewebe und humanen primären RASF nachgewiesen werden. Die Expression von GOAT scheint in RASF durch TNF- α und die Kombination aus TNF- α und IFN- γ herunterreguliert zu werden. Eine Stimulation der RASF mit dem GHS-R-Antagonisten YIL-781 und dem Agonisten L-692,585 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die IL-6- und IL-8-Produktion, wobei bei einer Stimulation mit YIL-781 eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-6- und IL-8-Produktion beobachtet werden konnte. Antagonismus am GHS-R führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der MMP-3 Konzentration mit einer signifikanten Steigerung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei der Stimulation mit der Kombination der jeweils höchsten Konzentration von YIL-781 und L-692,585. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das ghrelinerge System eine Rolle in der Modulation der entzündlichen Prozesse bei RA spielen könnte. Dennoch bleibt die Rolle des ghrelinergen Systems im Kontext der RA weiterhin unklar, da die Regulation, die Funktion und beeinflussende Faktoren des ghrelinergen Systems komplex sind und *in vivo* anders als in dieser Arbeit dargestellt ablaufen könnten. Dennoch können diese Ergebnisse als Basis für weitere Untersuchungen der physiologischen und pathologischen Wirkung des ghrelinergen Systems dienen und bilden damit auch eine Grundlage für die Entwicklung von antikachektischen und antiinflammatorischen Therapien. Hierfür sind in Zukunft aber noch weitere Untersuchungen notwendig.

5 Literaturverzeichnis

1. Tobón, G.J., P. Youinou, and A. Saraux, *The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis*. J Autoimmun, 2010. **35**(1): p. 10-4.
2. Kłak, A., F. Raciborski, and P. Samel-Kowalik, *Social implications of rheumatic diseases*. Reumatologia, 2016. **54**(2): p. 73-78.
3. Myasoedova, E., et al., *Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(6): p. 1576-82.
4. Peschken, C.A. and J.M. Esdaile, *Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples*. Semin Arthritis Rheum, 1999. **28**(6): p. 368-91.
5. Crowson, C.S., et al., *The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases*. Arthritis and rheumatism, 2011. **63**(3): p. 633-639.
6. Alpízar-Rodríguez, D., et al., *The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(8): p. 1254-1263.
7. Jawaheer, D., et al., *Influence of male sex on disease phenotype in familial rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(10): p. 3087-3094.
8. Masuko, K., *Rheumatoid cachexia revisited: a metabolic co-morbidity in rheumatoid arthritis*. Front Nutr, 2014. **1**: p. 20.
9. Figus, F.A., et al., *Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities*. Autoimmunity Reviews, 2021. **20**(4): p. 102776.
10. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
11. Goekoop-Ruiterman, Y.P.M., et al., *Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial*. Arthritis & Rheumatism, 2005. **52**(11): p. 3381-3390.
12. Aletaha, D., et al., *Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score*. Arthritis Research & Therapy, 2005. **7**(4): p. R796.
13. Smolen, J.S., et al., *Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2016. **75**(1): p. 3.
14. Aletaha, D., F. Alasti, and J.S. Smolen, *Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2016. **75**(8): p. 1479.
15. Aletaha, D. and J.S. Smolen, *Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review*. Jama, 2018. **320**(13): p. 1360-1372.
16. Radu, A.F. and S.G. Bungau, *Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview*. Cells, 2021. **10**(11).
17. Guo, Q., et al., *Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies*. Bone Res, 2018. **6**: p. 15.
18. Lin, Y.J., M. Anzaghe, and S. Schülke, *Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis*. Cells, 2020. **9**(4).

19. Del Grossi Moura, M., et al., *Use of steroid and nonsteroidal anti-inflammatories in the treatment of rheumatoid arthritis: Systematic review protocol*. *Medicine*, 2018. **97**(41).
20. Deane, K.D., et al., *Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis*. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2017. **31**(1): p. 3-18.
21. Smolen, J.S., et al., *Rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2018. **4**: p. 18001.
22. György, B., et al., *Citrullination: a posttranslational modification in health and disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. **38**(10): p. 1662-77.
23. MacGregor, A.J., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. *Arthritis & Rheumatism*, 2000. **43**(1): p. 30-37.
24. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, *Rheumatoid arthritis*. *The Lancet*, 2016. **388**(10055): p. 2023-2038.
25. Silman, A.J., et al., *Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study*. *Br J Rheumatol*, 1993. **32**(10): p. 903-7.
26. Aho, K., et al., *Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins*. *J Rheumatol*, 1986. **13**(5): p. 899-902.
27. McAllister, K., S. Eyre, and G. Orozco, *Genetics of rheumatoid arthritis: GWAS and beyond*. *Open Access Rheumatol*, 2011. **3**: p. 31-46.
28. Raychaudhuri, S., et al., *Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis*. *Nat Genet*, 2012. **44**(3): p. 291-6.
29. Wilson, C., H. Tiwana, and A. Ebringer, *Molecular mimicry between HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis and *Proteus mirabilis* as the aetiological basis for autoimmunity*. *Microbes and Infection*, 2000. **2**(12): p. 1489-1496.
30. Li, S., et al., *Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis*. *J Clin Cell Immunol*, 2013. **4**(6).
31. Easlick, K.A., *An evaluation of the effect of dental foci of infection on health*. *J Am Dent Assoc*, 1951. **42**(6): p. 615-97.
32. Littlejohn, E.A. and S.U. Monrad, *Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis*. *Prim Care*, 2018. **45**(2): p. 237-255.
33. Burns, D.L., et al., *Purification, Characterization, and Sequence Analysis of a Potential Virulence Factor from *Porphyromonas gingivalis*, Peptidylarginine Deiminase*. *Infection and Immunity*, 1999. **67**(7): p. 3248-3256.
34. Sugiyama, D., et al., *Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(1): p. 70-81.
35. Sparks, J.A., *Rheumatoid Arthritis*. *Ann Intern Med*, 2019. **170**(1): p. Itc1-itc16.
36. Lee, D.M. and M.E. Weinblatt, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2001. **358**(9285): p. 903-11.
37. Neumann, E., et al., *Rheumatoide Arthritis*. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 2018. **77**(9): p. 769-775.
38. Scott, D.L., F. Wolfe, and T.W. Huizinga, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
39. Camacho, E.M., S.M. Verstappen, and D.P. Symmons, *Association between socioeconomic status, learned helplessness, and disease outcome in patients*

- with inflammatory polyarthritis*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012. **64**(8): p. 1225-32.
40. Coutant, F. and P. Miossec, *Altered dendritic cell functions in autoimmune diseases: distinct and overlapping profiles*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016. **12**(12): p. 703-715.
 41. Arend, W.P. and G.S. Firestein, *Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(10): p. 573-86.
 42. McInnes, I.B. and G. Schett, *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. *New England Journal of Medicine*, 2011. **365**(23): p. 2205-2219.
 43. Smith, M.D., *The normal synovium*. *Open Rheumatol J*, 2011. **5**: p. 100-6.
 44. Li, F., et al., *Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019. **10**(1): p. 260.
 45. Lowin, T. and R.H. Straub, *Synovial fibroblasts integrate inflammatory and neuroendocrine stimuli to drive rheumatoid arthritis*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. **11**(10): p. 1069-71.
 46. Chemin, K., C. Gerstner, and V. Malmström, *Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation-Lessons From Rheumatoid Arthritis*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 353.
 47. Müller-Ladner, U., et al., *Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice*. *Am J Pathol*, 1996. **149**(5): p. 1607-15.
 48. Schett, G. and E. Gravallese, *Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(11): p. 656-64.
 49. Himmerich, H. and A.J. Sheldrick, *TNF-alpha and ghrelin: opposite effects on immune system, metabolism and mental health*. *Protein Pept Lett*, 2010. **17**(2): p. 186-96.
 50. Ridgley, L.A., A.E. Anderson, and A.G. Pratt, *What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis?* *Curr Opin Rheumatol*, 2018. **30**(2): p. 207-214.
 51. Smolen, J.S., et al., *New therapies for treatment of rheumatoid arthritis*. *The Lancet*, 2007. **370**(9602): p. 1861-1874.
 52. Emery, P., et al., *IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(11): p. 1516-23.
 53. Irmeler, I. and R. Bräuer, *[Paradoxical role of interferon-gamma in arthritis]*. *Z Rheumatol*, 2007. **66**(7): p. 591-2, 594.
 54. Zhao, S., et al., *Effect of JAK Inhibition on the Induction of Proinflammatory HLA-DR+CD90+ Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts by Interferon-γ*. *Arthritis Rheumatol*, 2022. **74**(3): p. 441-452.
 55. Kato, M., *New insights into IFN-γ in rheumatoid arthritis: role in the era of JAK inhibitors*. *Immunological Medicine*, 2020. **43**(2): p. 72-78.
 56. Lowin, T., et al., *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*, 2020. **10**(1): p. 780.
 57. Kay, J. and L. Calabrese, *The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. **43 Suppl 3**: p. iii2-iii9.
 58. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. *Blood*, 2011. **117**(14): p. 3720-3732.
 59. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. *Science*, 1992. **258**(5089): p. 1798-801.

60. Bian, Y., et al., *Immunomodulatory roles of metalloproteinases in rheumatoid arthritis*. Front Pharmacol, 2023. **14**: p. 1285455.
61. Hunter, D.J. and S. Bierma-Zeinstra, *Osteoarthritis*. The Lancet, 2019. **393**(10182): p. 1745-1759.
62. Wasserman, A.M., *Diagnosis and management of rheumatoid arthritis*. Am Fam Physician, 2011. **84**(11): p. 1245-52.
63. Huang, W., et al., *Parallel comparison of fibroblast-like synoviocytes from the surgically removed hyperplastic synovial tissues of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients*. BMC Musculoskeletal Disorders, 2019. **20**(1): p. 591.
64. Bowers, C.Y., et al., *Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro*. Endocrinology, 1980. **106**(3): p. 663-7.
65. Momany, F.A., et al., *Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro*. Endocrinology, 1981. **108**(1): p. 31-9.
66. Isidro, M.L. and F. Cordido, *Growth hormone secretagogues*. Comb Chem High Throughput Screen, 2006. **9**(3): p. 175-80.
67. Smith, R.G., et al., *A New Orphan Receptor Involved in Pulsatile Growth Hormone Release*. Trends Endocrinol Metab, 1999. **10**(4): p. 128-135.
68. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
69. Korbonits, M., et al., *Ghrelin--a hormone with multiple functions*. Front Neuroendocrinol, 2004. **25**(1): p. 27-68.
70. Rodríguez, A., et al., *The ghrelin O-acyltransferase–ghrelin system reduces TNF- α -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes*. Diabetologia, 2012. **55**(11): p. 3038-3050.
71. Villarreal, D., et al., *Diverse and Complementary Effects of Ghrelin and Obestatin*. Biomolecules, 2022. **12**(4).
72. Deschaine, S.L. and L. Leggio, *From “Hunger Hormone” to “It’s Complicated” : Ghrelin Beyond Feeding Control*. Physiology, 2022. **37**(1): p. 5-15.
73. Müller, T.D., et al., *Ghrelin*. Mol Metab, 2015. **4**(6): p. 437-60.
74. Baatar, D., K. Patel, and D.D. Taub, *The effects of ghrelin on inflammation and the immune system*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **340**(1): p. 44-58.
75. Yang, J., et al., *Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone*. Cell, 2008. **132**(3): p. 387-96.
76. Nagi, K. and A.M. Habib, *Biased signaling: A viable strategy to drug ghrelin receptors for the treatment of obesity*. Cellular Signalling, 2021. **83**: p. 109976.
77. Gutierrez, J.A., et al., *Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6320-5.
78. Kojima, M., A. Hamamoto, and T. Sato, *Ghrelin O -acyltransferase (GOAT), a specific enzyme that modifies ghrelin with a medium-chain fatty acid*. The Journal of Biochemistry, 2016. **160**(4): p. 189-194.
79. Hofmann, K., *A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 111-2.
80. Gahete, M.D., et al., *Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight*. Journal of Endocrinology, 2014. **220**(1): p. R1-R24.
81. Campaña, M.B., et al., *Cellular Uptake of a Fluorescent Ligand Reveals Ghrelin O-Acyltransferase Interacts with Extracellular Peptides and Exhibits*

- Unexpected Localization for a Secretory Pathway Enzyme.* ACS Chem Biol, 2023. **18**(8): p. 1880-1890.
82. Taylor, M.S., et al., *Architectural organization of the metabolic regulatory enzyme ghrelin O-acyltransferase.* J Biol Chem, 2013. **288**(45): p. 32211-32228.
83. Howard, A.D., et al., *A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release.* Science, 1996. **273**(5277): p. 974-7.
84. Ramirez, V.T., et al., *Differential functional selectivity and downstream signaling bias of ghrelin receptor antagonists and inverse agonists.* FASEB J, 2019. **33**(1): p. 518-531.
85. Callaghan, B. and J.B. Furness, *Novel and Conventional Receptors for Ghrelin, Desacyl-Ghrelin, and Pharmacologically Related Compounds.* Pharmacological Reviews, 2014. **66**(4): p. 984-1001.
86. Ge, X., et al., *LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor.* Cell Metabolism, 2018. **27**(2): p. 461-469.e6.
87. Mani, B.K., et al., *LEAP2 changes with body mass and food intake in humans and mice.* J Clin Invest, 2019. **129**(9): p. 3909-3923.
88. Kojima, M. and K. Kangawa, *Structure and function of ghrelin.* Results Probl Cell Differ, 2008. **46**: p. 89-115.
89. Tschöp, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents.* Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-913.
90. Cummings, D.E., et al., *Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(2): p. E297-304.
91. Tschöp, M., et al., *Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity.* Diabetes, 2001. **50**(4): p. 707-9.
92. Nagaya, N., et al., *Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors.* Circulation, 2001. **104**(17): p. 2034-8.
93. Laviano, A., et al., *The Growth Hormone Secretagogue Receptor (Ghs-R).* Current Pharmaceutical Design, 2012. **18**(31): p. 4749-4754.
94. Poher, A.L., M.H. Tschöp, and T.D. Müller, *Ghrelin regulation of glucose metabolism.* Peptides, 2018. **100**: p. 236-242.
95. Gómez, R., et al., *Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes.* Arthritis & Rheumatism, 2009. **60**(6): p. 1704-1709.
96. Qu, R., et al., *Ghrelin protects against osteoarthritis through interplay with Akt and NF- κ B signaling pathways.* The FASEB Journal, 2018. **32**(2): p. 1044-1058.
97. Francisco, V., et al., *Levels of the Novel Endogenous Antagonist of Ghrelin Receptor, Liver-Enriched Antimicrobial Peptide-2, in Patients with Rheumatoid Arthritis.* Nutrients, 2020. **12**(4): p. 1006.
98. Lodder, M.C., et al., *Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis: relation between disease severity and low bone mineral density.* Ann Rheum Dis, 2004. **63**(12): p. 1576-80.
99. Masuda, Y., et al., *Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 905-8.
100. Tack, J., et al., *Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans.* Gut, 2006. **55**(3): p. 327-33.
101. Hattori, N., et al., *GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(9): p. 4284-91.

102. Dixit, V.D., et al., *Ghrelin promotes thymopoiesis during aging*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2778-90.
103. Dixit, V.D., et al., *Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(1): p. 57-66.
104. Dixit, V.D., et al., *Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: implications for age-associated increases in inflammation*. Blood, 2009. **113**(21): p. 5202-5.
105. Koca, S.S., et al., *Ghrelin and Obestatin Levels in Rheumatoid Arthritis*. Inflammation, 2008. **31**(5): p. 329-335.
106. Maruna, P., et al., *Ghrelin and leptin elevation in postoperative intra-abdominal sepsis*. Eur Surg Res, 2005. **37**(6): p. 354-9.
107. Hosomi, S., et al., *Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(9): p. 1205-13.
108. Smith, R.G., H. Jiang, and Y. Sun, *Developments in ghrelin biology and potential clinical relevance*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(9): p. 436-42.
109. Xu, Y., et al., *Ghrelin Inhibits the Differentiation of T Helper 17 Cells through mTOR/STAT3 Signaling Pathway*. PLOS ONE, 2015. **10**(2): p. e0117081.
110. Mahdi Nazoury, S.-M.H.-Z., Mohammad Soukhtanloo, Baratali Mashkani, Seyed Isaac Hashemy, *Determination of in vitro and in vivo protective effects of Ghrelin against oxidative stress: Experimental Study*. Vol. Volume: 4. 2014: ssue: 12. 008-013.
111. Otero, M., et al., *Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(3): p. 306-10.
112. Cheyuo, C., A. Jacob, and P. Wang, *Ghrelin-mediated sympathoinhibition and suppression of inflammation in sepsis*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2012. **302**(3): p. E265-E272.
113. Balivada, S., et al., *Effect of ghrelin on regulation of splenic sympathetic nerve discharge*. Autonomic Neuroscience, 2016. **201**: p. 68-71.
114. Akalu, Y., et al., *Physiological Effect of Ghrelin on Body Systems*. Int J Endocrinol, 2020. **2020**: p. 1385138.
115. Granado, M., et al., *Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(3): p. E486-92.
116. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Anti-tumour necrosis factor alpha therapy modulates ghrelin in patients with severe rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(11): p. 1644-6.
117. Tam, L.S., et al., *Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(9): p. 1495-8.
118. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(1): p. 83-6.
119. Serio, B., et al., *Effects of etanercept or infliximab treatment on lipid profile and insulin resistance in patients with refractory rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(10): p. 1799-800.
120. Karagiozoglou-Lampoudi, T., et al., *Ghrelin levels in patients with juvenile idiopathic arthritis: relation to anti-tumor necrosis factor treatment and disease activity*. Metabolism, 2011. **60**(10): p. 1359-1362.

121. Magiera, M., et al., *Serum ghrelin in female patients with rheumatoid arthritis during treatment with infliximab*. *Rheumatology International*, 2013. **33**(6): p. 1611-1613.
122. Porchas-Quijada, M., et al., *IgG Anti-ghrelin Immune Complexes Are Increased in Rheumatoid Arthritis Patients Under Biologic Therapy and Are Related to Clinical and Metabolic Markers*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019. **10**: p. 252.
123. Granado, M., et al., *Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **289**(6): p. E1007-14.
124. Nagaya, N., et al., *Treatment of Cachexia With Ghrelin in Patients With COPD*. *CHEST*, 2005. **128**(3): p. 1187-1193.
125. Gnanapavan, S., et al., *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(6): p. 2988.
126. Hattori, N., *Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system*. *Growth Hormone & IGF Research*, 2009. **19**(3): p. 187-197.
127. Cannon-Carlson, S. and J. Tang, *Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels*. *Anal Biochem*, 1997. **246**(1): p. 146-8.
128. Kowit, J.D. and J. Maloney, *Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis*. *Anal Biochem*, 1982. **123**(1): p. 86-93.
129. Ng, C.T., et al., *Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010. **69**(7): p. 1389.
130. Bottini, N. and G.S. Firestein, *Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors*. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. **9**(1): p. 24-33.
131. Caminos, J.E., et al., *The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes*. *Endocrinology*, 2005. **146**(3): p. 1285-92.
132. Jonsson, A.H., *Synovial Tissue Insights into Heterogeneity of Rheumatoid Arthritis*. *Current Rheumatology Reports*, 2024. **26**(3): p. 81-88.
133. Shanaj, S. and L.T. Donlin, *Synovial Tissue: Cellular and Molecular Phenotyping*. *Current Rheumatology Reports*, 2019. **21**(10): p. 52.
134. Zou, Y.-C., et al., *Decreased synovial fluid ghrelin levels are linked with disease severity in primary knee osteoarthritis patients and are increased following laser therapy*. *Clinica Chimica Acta*, 2017. **470**: p. 64-69.
135. Ma, J., et al., *Effects of Ghrelin on the Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocyte MH7A Cells*. *Biol Pharm Bull*, 2019. **42**(2): p. 158-163.
136. Strickertsson, J.A., et al., *Interferon- γ inhibits ghrelin expression and secretion via a somatostatin-mediated mechanism*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(26): p. 3117-25.
137. Xia, Q., et al., *Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice*. *Regulatory Peptides*, 2004. **122**(3): p. 173-178.
138. Fu, T., et al., *Ghrelin Ameliorates Asthma by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress*. *Am J Med Sci*, 2017. **354**(6): p. 617-625.
139. Cui, X.-B., et al., *ADAR1 deficiency protects against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2021. **320**(1): p. E131-E138.

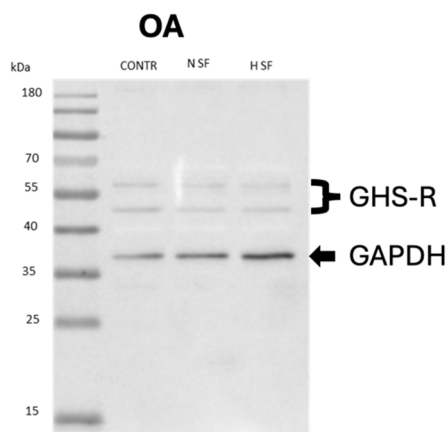
140. Cabral, A., et al., *Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System?* International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(3): p. 638.
141. De Vriese, C., et al., *Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites.* Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 4997-5005.
142. Xiang, Y., et al., *Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes.* Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 12022.
143. Okita, N., et al., *Modified Western blotting for insulin and other diabetes-associated peptide hormones.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6949.
144. Seim, I., et al., *Multi-species sequence comparison reveals conservation of ghrelin gene-derived splice variants encoding a truncated ghrelin peptide.* Endocrine, 2016. **52**(3): p. 609-617.
145. Noh, J.Y., et al., *The expression and function of growth hormone secretagogue receptor in immune cells: A current perspective.* Exp Biol Med (Maywood), 2022. **247**(24): p. 2184-2191.
146. Montero-Melendez, T., et al., *Therapeutic senescence via GPCR activation in synovial fibroblasts facilitates resolution of arthritis.* Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 745.
147. Ceriotti, S., et al., *The ghrelin paradox in the control of equine chondrocyte function: The good and the bad.* Peptides, 2018. **103**: p. 1-9.
148. Maier, T., M. Güell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples.* FEBS Letters, 2009. **583**(24): p. 3966-3973.
149. Ueberberg, B., et al., *Expression of Ghrelin and its Receptor in Human Tissues.* Horm Metab Res, 2009. **41**(11): p. 814-821.
150. Bergmann, R., et al., *Development of a ghrelin receptor inverse agonist for positron emission tomography.* Oncotarget, 2021. **12**(5).
151. Maccarinelli, G., et al., *Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells.* Journal of Endocrinology, 2005. **184**(1): p. 249-256.
152. Hougland, J.L., *Ghrelin octanoylation by ghrelin O-acyltransferase: Unique protein biochemistry underlying metabolic signaling.* Biochemical Society Transactions, 2019. **47**(1): p. 169-178.
153. O'Brien, M., et al., *Ghrelin in the human myometrium.* Reproductive Biology and Endocrinology, 2010. **8**(1): p. 55.
154. Campaña, M.B., et al., *The ghrelin O-acyltransferase structure reveals a catalytic channel for transmembrane hormone acylation.* J Biol Chem, 2019. **294**(39): p. 14166-14174.
155. Omasits, U., et al., *Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data.* Bioinformatics, 2013. **30**(6): p. 884-886.
156. Waterhouse, A., et al., *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes.* Nucleic Acids Research, 2018. **46**(W1): p. W296-W303.
157. Mathur, N., et al., *Ghrelin as an Anti-Sepsis Peptide: Review.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 610363.
158. Nogueiras, R., et al., *Regulation of Growth Hormone Secretagogue Receptor Gene Expression in the Arcuate Nuclei of the Rat by Leptin and Ghrelin.* Diabetes, 2004. **53**(10): p. 2552-2558.
159. Sharif, O., et al., *Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages.* BMC Immunology, 2007. **8**(1): p. 1.
160. Khatib, M.N., et al., *Ghrelin O Acyl Transferase (GOAT) as a Novel Metabolic Regulatory Enzyme.* J Clin Diagn Res, 2015. **9**(2): p. Le01-5.

161. Lim, C.T., et al., *The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues*. *Endocr J*, 2011. **58**(8): p. 707-10.
162. Kirchner, H., et al., *GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance*. *Nature Medicine*, 2009. **15**(7): p. 741-745.
163. Zhong, H. and J.W. Simons, *Direct Comparison of GAPDH, β -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **259**(3): p. 523-526.
164. Schlaak, J.F., et al., *Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies*. *Clin Exp Rheumatol*, 1996. **14**(2): p. 155-62.
165. Altobelli, E., et al., *Synovial Fluid and Serum Concentrations of Inflammatory Markers in Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Osteoarthritis: A Systematic Review*. *Curr Rheumatol Rev*, 2017. **13**(3): p. 170-179.
166. Fang, C., et al., *Ghrelin Signaling in Immunometabolism and Inflamm-Aging*, in *Neural Regulation of Metabolism*, Q. Wu and R. Zheng, Editors. 2018, Springer Singapore: Singapore. p. 165-182.
167. Lin, L., et al., *Ghrelin receptor regulates adipose tissue inflammation in aging*. *Aging (Albany NY)*, 2016. **8**(1): p. 178-91.
168. Li, W.G., et al., *Ghrelin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B Activation in Human Endothelial Cells*. *Circulation*, 2004. **109**(18): p. 2221-2226.
169. Hou, Y., et al., *Ghrelin inhibits interleukin-8 production induced by hydrogen peroxide in A549 cells via NF-kappaB pathway*. *Int Immunopharmacol*, 2009. **9**(1): p. 120-6.
170. Isik, A., et al., *Paraoxonase and arylesterase levels in rheumatoid arthritis*. *Clin Rheumatol*, 2007. **26**(3): p. 342-8.
171. Zhao, D., et al., *Ghrelin stimulates interleukin-8 gene expression through protein kinase C-mediated NF-kappaB pathway in human colonic epithelial cells*. *J Cell Biochem*, 2006. **97**(6): p. 1317-27.
172. Qu, R., et al., *Ghrelin protects against contact dermatitis and psoriasiform skin inflammation by antagonizing TNF- α /NF- κ B signaling pathways*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 1348.
173. Moon, M., et al., *Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation*. *Neurotox Res*, 2009. **15**(4): p. 332-47.
174. Lee, J.Y., H.Y. Choi, and T.Y. Yune, *MMP-3 secreted from endothelial cells of blood vessels after spinal cord injury activates microglia, leading to oligodendrocyte cell death*. *Neurobiology of Disease*, 2015. **82**: p. 141-151.
175. García-Manrique, M., et al., *Synovial fluid but not plasma interleukin-8 is associated with clinical severity and inflammatory markers in knee osteoarthritis women with joint effusion*. *Scientific Reports*, 2021. **11**(1): p. 5258.
176. Chen, J.-J., et al., *Expression and significance of MMP3 in synovium of knee joint at different stage in osteoarthritis patients*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014. **7**(4): p. 297-300.
177. liu, J., et al., *Ghrelin prevents articular cartilage matrix destruction in human chondrocytes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. **98**: p. 651-655.

178. Fan, L., et al., *Enhancement of the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage repair by ghrelin*. Journal of Orthopaedic Research, 2019. **37**(6): p. 1387-1397.
179. Koskinen, A., et al., *Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients*. Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(1): p. 57-64.
180. Relic, B., et al., *Serum starvation raises turnover of phosphorylated p62/SQSTM1 (Serine 349), reveals expression of proteasome and N-glycanase1 interactive protein RAD23B and sensitizes human synovial fibroblasts to BAY 11-7085-induced cell death*. Oncotarget, 2018. **9**(88): p. 35830-35843.
181. Sun, L. and W. Zhang, *Preconditioning of mesenchymal stem cells with ghrelin exerts superior cardioprotection in aged heart through boosting mitochondrial function and autophagy flux*. Eur J Pharmacol, 2021. **903**: p. 174142.
182. Zhang, S., Y. Mao, and X. Fan, *Inhibition of ghrelin o-acyltransferase attenuated lipotoxicity by inducing autophagy via AMPK-mTOR pathway*. Drug Design, Development and Therapy, 2018. **12**(null): p. 873-885.
183. Ezquerro, S., et al., *Ghrelin Reduces TNF- α -Induced Human Hepatocyte Apoptosis, Autophagy, and Pyroptosis: Role in Obesity-Associated NAFLD*. J Clin Endocrinol Metab, 2019. **104**(1): p. 21-37.
184. Straub, R.H., et al., *Energiemetabolismus des Immunsystems*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2023. **82**(6): p. 479-490.
185. Yang, W., et al., *Hypobaric hypoxia induces iron mobilization from liver and spleen and increases serum iron via activation of ghrelin/GHSR1a/MAPK signalling pathway in mice*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 20254.
186. Riedl, S., et al., *Adaptation of ghrelin and the GH/IGF axis to high altitude*. European Journal of Endocrinology, 2012. **166**(6): p. 969-976.
187. Duraisamy, A., et al., *Changes in ghrelin, CCK, GLP-1, and peroxisome proliferator-activated receptors in a hypoxia-induced anorexia rat model*. Endokrynologia Polska, 2015. **66**(4): p. 334-341.
188. Hennigar, S.R., et al., *High-Altitude Acclimatization Suppresses Hepcidin Expression During Severe Energy Deficit*. High Altitude Medicine & Biology, 2020. **21**(3): p. 232-236.
189. Mani, B.K., K. Shankar, and J.M. Zigman, *Ghrelin's relationship to blood glucose*. Endocrinology, 2019.
190. Cummings, D.E., et al., *A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1714-1719.
191. Pradhan, G., et al., *Mechanistic Investigation of GHS-R Mediated Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Pancreatic Islets*. Biomolecules, 2022. **12**(3).
192. Sun, Y., et al., *Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance*. Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 843-50.
193. Saad, M.F., et al., *Insulin regulates plasma ghrelin concentration*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3997-4000.
194. Hu, Z., et al., *Metabolic changes in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: state of the art review*. Front Immunol, 2024. **15**: p. 1250884.
195. Masuko, K., *Glucose as a Potential Key to Fuel Inflammation in Rheumatoid Arthritis*. Nutrients, 2022. **14**(11).
196. de Oliveira, P.G., et al., *Fibroblast-Like Synoviocytes Glucose Metabolism as a Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1743.

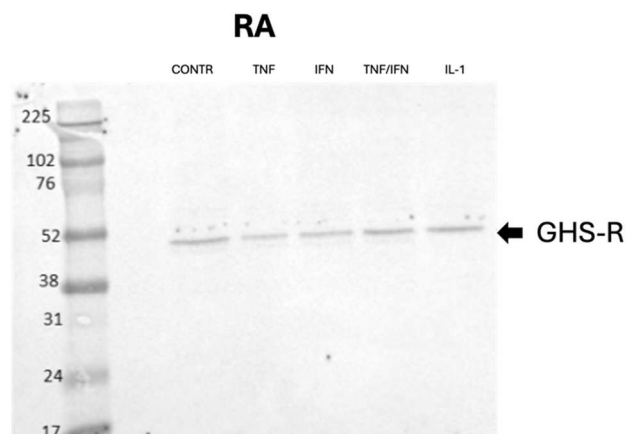
197. Greenman, Y., et al., *Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner*. *Clinical Endocrinology*, 2004. **60**(3): p. 382-388.
198. Ates, Y., et al., *Serum Ghrelin Levels in Inflammatory Bowel Disease with Relation to Disease Activity and Nutritional Status*. *Digestive Diseases and Sciences*, 2008. **53**(8): p. 2215-2221.
199. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Insulin resistance in rheumatoid arthritis: the impact of the anti-TNF-alpha therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1193**: p. 153-9.
200. Lei, Q., et al., *Lipid metabolism and rheumatoid arthritis*. *Frontiers in Immunology*, 2023. **14**.
201. Azzam, I., et al., *Ghrelin stimulation by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation depends on increasing cortisol levels*. *Endocr Connect*, 2017. **6**(8): p. 847-855.

6 Anhang



Ergänzende Abb. 1 **Ganze Western Blot-Membran mit dem Nachweis des GHS-R in OASF**
 Dargestellt ist die ganze Western Blot-Membran aus Abb. 11 A exemplarisch für den Nachweis des GHS-R in OASF, für den eine Doppelbande detektiert wurde.

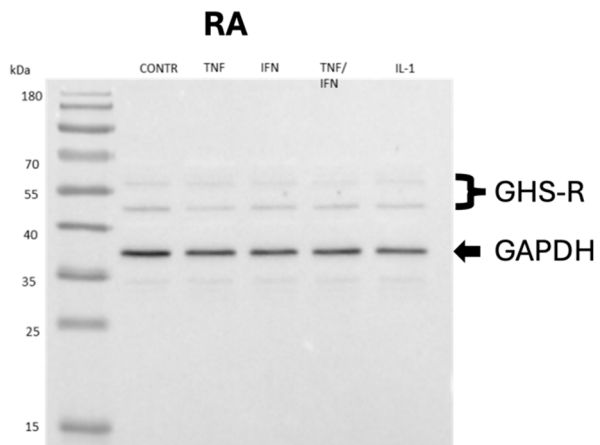
Abkürzungen: *CONTR* = Kontrolle, *GHS-R* = Growth hormone secretagogue receptor, *H* = Hypoxie, *N* = Normoxie, *OA* = osteoarthritis synovial fibroblasts, *SF* = Serumfrei



Ergänzende Abb. 2 **Ganze Western Blot-Membran mit dem Nachweis einer Einzelbande für den GHS-R in RASF**

Dargestellt ist die ganze Western Blot-Membran aus Abb. 11 A exemplarisch für den Nachweis des GHS-R in RASF, für den eine Einzelbande detektiert wurde.

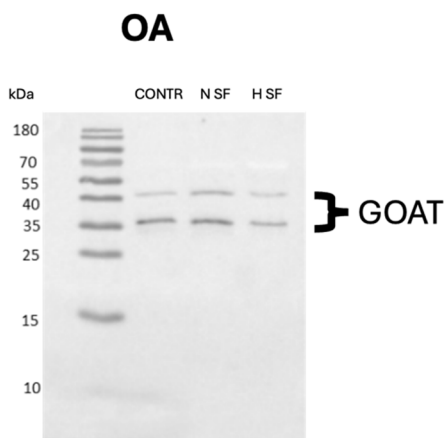
Abkürzungen: *CONTR* = Kontrolle, *GHS-R* = Growth hormone secretagogue receptor, *IFN* = Interferon, *IL* = Interleukin, *RASF* = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *TNF* = Tumornekrosefaktor



Ergänzende Abb. 3 Ganze Western Blot-Membran mit dem Nachweis einer Doppelbande für den GHS-R in RASF

Dargestellt ist die ganze Western Blot-Membran aus Abb. 11 A exemplarisch für den Nachweis des GHS-R in RASF, für den eine Doppelbande detektiert wurde.

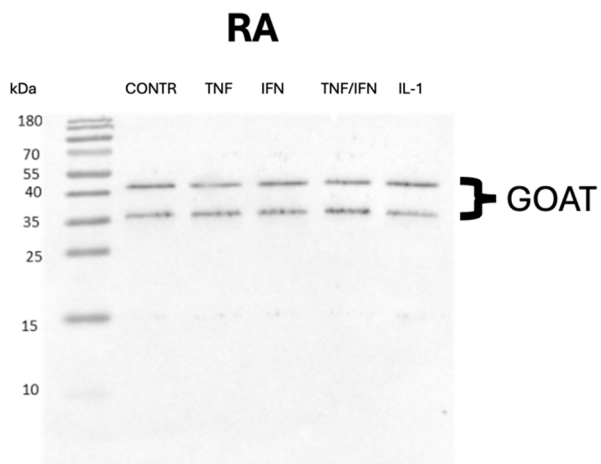
Abkürzungen: CONTR = Kontrolle, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, IFN = Interferon, IL = Interleukin, RASF = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, TNF = Tumornekrosefaktor



Ergänzende Abb. 4 Ganze Western Blot-Membran mit dem Nachweis der GOAT in OASF

Dargestellt ist die ganze Western Blot-Membran aus Abb. 15 A exemplarisch für den Nachweis der GOAT in OASF, für die eine Doppelbande detektiert wurde.

Abkürzungen: CONTR = Kontrolle, GHS-R = Growth hormone secretagogue receptor, H = Hypoxie, N = Normoxie, OA = osteoarthritis synovial fibroblasts, SF = Serumfrei



Ergänzende Abb. 5 Ganze Western Blot-Membran mit dem Nachweis einer Doppelbande für GOAT in RASF

Dargestellt ist die ganze Western Blot-Membran aus Abb. 15 A exemplarisch für den Nachweis der GOAT in RASF, für die eine Doppelbande detektiert wurde.

Abkürzungen: *CONTR* = Kontrolle, *GHS-R* = Growth hormone secretagogue receptor, *IFN* = Interferon, *IL* = Interleukin, *RASF* = rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *TNF* = Tumornekrosefaktor

7 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Georg Pongratz für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Promotion.

Einen besonderen Dank möchte ich Dr. rer. nat. Torsten Lowin aussprechen, für die engmaschige und herzliche Betreuung meiner Laborarbeiten und die zahlreichen hilfreichen Anmerkungen zu meiner Dissertationsschrift. Vielen Dank für Deine Hilfsbereitschaft und das stets offene Ohr, was Du für meine Fragen hattest. Ohne Dich wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Professor Dr. med. Stefan Krüger möchte ich für die Übernahme der Ko-Betreuung meiner Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Labormitarbeiterinnen und -mitarbeitern und (ehemaligen) Doktorandinnen und Doktoranden des Hiller-Forschungszentrums, die mich während meiner Zeit im Labor begleitet haben. Vielen Dank für die vielen schönen Stunden mit Euch. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Birgit Opgenoorth und Ellen Bleck, die mich so geduldig eingearbeitet haben und bei Fragen stets zur Verfügung standen.

Hannah Klinkhammer danke ich für die ausführliche und geduldige Beratung bei statistischen Fragen und Problemen.

Zu guter Letzt möchte ich den Menschen danken, die mir am meisten bedeuten und die alle meine Entscheidungen und Wege unterstützen – Danke Mama, Papa, Ina und Arndt, dass ihr immer für mich da seid. Danke auch an meine Freunde, für Eure Unterstützung und all Eure aufbauenden Worte.

Lieber Christian, Dir möchte ich besonders für Deine stets motivierenden Worte, Deine grenzenlose Geduld, Dein Verständnis und Deinen bedingungslosen Rückhalt danken. Ich bin unendlich dankbar, Dich an meiner Seite zu wissen.