

Anna Marie Lauffer
Dr. med.

Charakterisierung des immunsuppressiven Effekts synovialer Fibroblasten auf CD4-positive T-Zellen *in vitro*

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanns-Martin Lorenz

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, deren zentrales histopathologisches Kennzeichen die persistierende Synovitis ist. Neben immunkompetenten Zellen sind synoviale Fibroblasten aktiv am Entzündungsgeschehen beteiligt. Insbesondere durch ihre Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen begünstigen sie die Aggravation und Aufrechterhaltung des inflammatorischen Prozesses, welcher progressiv zur Destruktion artikulärer und periartikulärer Strukturen führt.

Wie unsere Arbeitsgruppe in Vorversuchen zeigen konnte, schränken synoviale Arthrose-Fibroblasten (OASF) die Proliferation aktivierter T-Zellen ein. Synoviale Fibroblasten von RA-Patienten (RASf) scheinen hingegen nicht über dieses Potenzial zu verfügen. Ziel dieses Projekts ist die genaue Charakterisierung des immunsuppressiven Effekts von OASF auf CD4⁺ T-Lymphozyten *in vitro*.

Fibroblasten wurden aus dem Synovialgewebe von Arthrose-Patienten isoliert und *in vitro* vermehrt. CD4⁺ T-Zellen wurden aus dem peripheren Vollblut gesunder Normalspender aufgereinigt, bevor sie allein oder im Verhältnis 1:5 (Fb:Tc) mit Fibroblasten kultiviert wurden. Die Stimulation der Lymphozyten erfolgte durch PHA und IL-2 oder durch Anti-CD3- und Anti-CD28-AK. Der Einfluss von OASF auf die Teilung aktivierter T-Zellen wurde mithilfe radioaktiver und nicht-radioaktiver Proliferationsassays untersucht. Zur Beurteilung der T-Zell Aktivierung wurde die Expression der Zelloberflächenmarker CD25 und CD69 durchflusszytometrisch analysiert. In den Überständen der Zellkulturen konnten die Zytokine IFN- γ , IL-17 und IL-2 mittels ELISA quantifiziert werden, während die Nitritkonzentration mittels Griess-Assay bestimmt wurde. Die Analyse von T-Zell Proliferation, Aktivierung und Zytokinproduktion erfolgte im Verlauf von fünf oder sechs Tagen. Mittels Transwell-Assays konnte die Bedeutung löslicher Faktoren evaluiert werden. Zuletzt erlaubte der Einsatz des MMP-Inhibitors KB8301 eine Beurteilung des Stellenwertes von Matrixmetalloproteinasen.

OASF üben während der ersten Tage einer Kokultur stimulatorische Effekte auf aktivierte T-Zellen aus. Diese sind zellkontaktabhängig und äußern sich in einem früheren Beginn der lymphozytären Vermehrung, einer prozentual erhöhten und stärkeren Expression beider Aktivierungsmarker (CD25, CD69) auf der T-Zell-Oberfläche sowie einer vermehrten IL-17 und IFN- γ Produktion.

An d6 inhibieren OASF die Proliferation kokultivierter CD4⁺ T-Zellen im Mittel zu 58,78% \pm 24,08%. Dieser suppressierende Effekt ist reversibel, wird direkt auf T-Lymphozyten ausgeübt und kann sowohl bei Stimulation mit PHA und IL-2 als auch bei Aktivierung durch Anti-CD3- und Anti-CD28-AK beobachtet werden. OASF sind auch zur Hemmung voraktivierter T-Zellen fähig. Zeitgleich zur Proliferationsinhibition suppressieren sie die CD25-Expression auf der T-Zell Oberfläche effektiv. Die inhibitorische Wirkung von OASF geht außerdem mit einer erniedrigten IL-2 Produktion durch T-Zellen einher, ist jedoch nicht primär auf diese zurückzuführen.

Offenbar findet während der ersten Tage der T-Zell/Fibroblasten-Kokultur ein Crosstalk zwischen beiden Zelltypen statt, welcher die inhibitorischen Aktivitäten der OASF zu späten Zeitpunkten triggert. Wir mutmaßen, dass das von aktivierten T-Zellen produzierte IFN- γ die OASF zur Produktion von Stickstoffmonoxid veranlasst, welches schließlich die lymphozytäre Proliferation und Zytokinproduktion supprimiert. Hierfür sprechen erhöhte Nitrit-Konzentrationen, die zeitgleich zur T-Zell Proliferationsinhibitor in den Überständen der T-Zell/Fibroblasten-Kokulturen detektiert werden können.

Unseres Wissens sind wir die erste Arbeitsgruppe, die zeigt, dass außerdem Matrixmetalloproteinasen als lösliche Faktoren an der Vermittlung des antiproliferativen Effekts von OASF beteiligt sind. Möglicherweise trennen MMPs die α -Kette des IL-2 Rezeptors von der T-Zell Oberfläche ab und supprimieren so die IL-2 Signalübertragung quantitativ.

Die Tatsache, dass die Synovitis bei der OA durchschnittlich milder verläuft als bei der RA, könnte auf die antiproliferativen Eigenschaften synovialer OA-Fibroblasten zurückzuführen sein. Vorliegendes Projekt trägt zur näheren Charakterisierung dieses Effekts bei. Mithilfe direkter Vergleichsexperimente zwischen OASF und RASF könnten in sich anschließenden Arbeiten weitere Unterschiede zwischen den Fibroblastentypen definiert werden, um die inflammatorischen Prozesse der RA besser verstehen und in Zukunft auch besser behandeln zu können.