

Anna-Maria Bäsig  
Dr.med.

## **Die Bedeutung von Interleukin-6 in der Interaktion von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> und CD127<sup>-</sup>/FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Lymphozyten und mesenchymalen Stammzellen aus Synovialgewebe und Knochenmark von Patienten mit Coxarthrose in einem allogenen Cokulturansatz**

Fach/Einrichtung: Orthopädie  
Doktorvater: Prof. Dr. med Felix Zeifang

Die Arthrose hat aufgrund ihrer Symptomatik und ihrer hohen Prävalenz einen erheblichen medizinischen und volkswirtschaftlichen Stellenwert. Bei dieser ursprünglich als rein degenerativ angesehenen Gelenkerkrankung bildet sich entgegen früherer, rein mechanistischer Vorstellungen im betroffenen Gelenk ein inflammatorisches Milieu, welches unter anderem durch veränderte Macrophagen, die Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1, TNF $\alpha$  und Matrixmetalloproteinasen sezernieren, aufrechterhalten wird.

Sogenannte mesenchymale Stammzellen oder Stromazellen (MSCs) sind bisher hauptsächlich aufgrund Ihrer regenerativen Eigenschaften in den Fokus der Medizin gerückt. Zunehmend werden aber auch die antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften dieser Zellen als möglicher Therapieansatz bei verschiedenen Erkrankungen angesehen. So könnte auch die Regulation der Immunhomöostase des arthrotischen Gelenkes durch MSCs von Bedeutung sein. Eine der möglichen Zellzielgruppen von MSCs, die im Kontext anderer Erkrankungen bereits untersucht wurden, sind die sogenannten regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs). Zur Interaktion von MSCs und Tregs im Kontext der Arthrose existiert bislang keine Literatur.

Eine Möglichkeit der Untersuchung des Zusammenwirkens von regulatorischen T-Zellen und MSCs ist die Cokultivierung dieser Zellen. Bisherige Arbeiten mit Treg/MSC-Cokulturen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigten, dass MSCs hier in der Lage sind, die Treg-Population zu stabilisieren und T-Zellen zur Differenzierung in Tregs anzuregen. Vergleichbare Daten liegen zur Osteoarthrose nicht vor. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, inwiefern MSCs aus Knochenmark und Synovialgewebe in der Lage sind, in einer mit Tregs angereicherte CD4<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation die vorhandenen Tregs zu erhalten. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Rolle Interleukin 6 in diesem Zusammenhang spielt.

hMSCs wurden aus Knochenmark und Synovialgewebe von Patienten mit Coxarthrose isoliert, während CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen mittels magnetischer Separation aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden. Beide Zellpräparationen

wurden anschließend zusammen über fünf Tage kultiviert. Im gleichen Ansatz wurden Tregs und hMSCs als Kontrollen alleine inkubiert.

Nach Tag 2 erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Überstände für Zytokin-Analysen verwendet wurden. An Tag 5 wurden ebenfalls die Überstände abgenommen.

Anschließend erfolgte die Auswertung der alleine kultivierten und der cokultivierten T-Zellen mittels FACS. Zur Bestimmung der Charakteristika der Zellen wurde bei FACS-Untersuchungen auf das Vorliegen von CD4, CD25 und CD127 in einer Dreifachfärbung sowie auf FoxP3 untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin Tregs mit verschiedenen Konzentrationen von IL-6 bzw. mit Überständen aus MSC-Monokulturen inkubiert, wobei der Versuchsansatz mit Ausnahme der Zugabe von MSCs identisch zum ersten war. T-Zellen ohne Zusatz von IL-6 oder MSC-Überständen dienten als Kontrolle. Nach Tag 2 erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die gleichen Mengen Interleukin 6 und Überstände wie an Tag 0 zu den Ansätzen zugegeben wurden. An Tag 5 wurden die T-Zellen mittels FACS analysiert. Auch hier wurden CD4, CD25, CD127 und FoxP3 untersucht.

CBA Analysen der Überstände der Cokulturen zeigten, dass in den Überständen der mit MSCs kultivierten T-Zellen gegenüber den Kontrollen eine deutliche Erhöhung von IL-6 vorzufinden war. Diese Unterschiede waren sowohl an Tag 2 als auch an Tag 5 der Cokultur nachweisbar. Die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-8, IL-1 $\beta$  und IL-1RA waren in ELISA bzw CBA Analysen der Überstände nicht über die Nachweisgrenze hinaus erhöht. Lediglich IL-17A war sporadisch nachweisbar. Im Vergleich zu monokultivierten T-Zellen zeigten sowohl Knochenmark- als auch synoviale MSCs in Cokultur die Fähigkeit zum Erhalt des regulatorischen Phänotyps (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen hMSCs aus Knochenmark und hMSCs aus Synovialgewebe hinsichtlich der beobachteten Treg-Stabilisierung. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit der Literatur hinsichtlich der Tatsache, dass MSCs in der Lage sind, den Anteil der Tregs in einer T-Zell Population zu erhöhen beziehungsweise konstant zu halten. Dies wurde erstmals auch für MSCs aus der Umgebung des arthrotischen Gelenks demonstriert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Interleukin 6 konzentrationsabhängig eine Stabilisierung der Treg Population bedingt. Der vollständige, durch Zugabe von MSCs zu beobachtende Effekt wird allerdings nur durch Zugabe der MSC-Überstände hervorgerufen. Daraus wird ersichtlich, dass Interleukin 6 zwar einen Anteil an der Stabilisierung des regulatorischen Phänotyps trägt, dass andererseits aber auch andere lösliche Mediatoren als die in dieser Arbeit untersuchten eine Rolle spielen.

MSCs scheinen in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen über IL-6 anti-inflammatorisch zu wirken. Die für diese Arbeit durchgeführten in vitro Versuche zeigen zum ersten Mal, dass ein Zusammenspiel von Tregs und MSCs auch bei der

Arthrose in vivo von Bedeutung sein kann. Langfristig müssen diese Ergebnisse mit der Situation in vivo korreliert werden, um gegebenenfalls alternative Therapiemöglichkeiten für die Osteoarthrose zu eröffnen. Die pro- vs. antiinflammatorische Wirkung von IL-6 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine vollständig vergleichbare Versuchsreihe einer anderen Arbeitsgruppe liegt für diese Art von experimentellem Ansatz jedoch noch nicht vor. Weitere Versuche werden die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Pathophysiologie der Arthrose klären müssen.