

Bastian Resch
Dr. med.

Bidirektionale Interaktion zwischen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und B-Lymphozyten im Kontext autoimmuner Erkrankungen

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

Als vielversprechender Therapieansatz für autoimmune Erkrankungen gewann die Therapie mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen immer mehr an Bedeutung. Die überwiegend immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs auf T-Lymphozyten sind vielseitig untersucht und erklärt, dennoch bleibt immer noch vieles unklar. Ebenso ist vergleichsweise sehr viel weniger über die Interaktion zwischen MSCs und B-Lymphozyten bekannt, denen seit einigen Jahren zunehmende Bedeutung im Entzündungsgeschehen zugesprochen wird. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, die Interaktion zwischen B-Lymphozyten und multipotenten mesenchymalen Stromazellen im Hinblick auf ihre Funktion näher zu beleuchten sowie auch ihre potentielle Wirkung auf die zelluläre Umgebung in Form von aktivierten T-Helfer-Zellen.

Dazu wurden MSCs aus verbliebenen Sets einer Knochenmarkspende gespült und mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation sowie ihrer Eigenschaft der Adhärenz an Plastik gewonnen. Daneben wurden B- und T-Lymphozyten, ebenfalls durch Dichtegradienten- zentrifugation sowie magnetischer Zellseparation, aus dem peripheren Blut gesunder Spender separiert. In vitro wurden Zellkulturen angelegt, die sowohl direkte Kokulturen von Lymphozyten mit MSCs beinhalteten, mit direktem Zellkontakt im Well, als auch indirekte Kokulturen, mit räumlicher Trennung der Zellen mittels Transwellmembran. Die Kulturdauer betrug dabei meist 3 bis 6 Tage, bei Langzeitversuchen bis zu 30 Tage. Eine optimale polyklonale Stimulation der B-Zellen wurde durch eine Kreuzvernetzung des B-Zell-Rezeptors mittels SAC und gleichzeitiger Zugabe wachstumsförderndem IL-2 erreicht. Für die Stimulation der T-Zellen wurde PHA verwendet, auch hier wurde gleichzeitig wachstumsförderndes IL-2 zugegeben.

Um die Auswirkungen verschiedener Einflussgrößen auf die Interaktion zu untersuchen, wurde die Konzentration diverser Proteine, wie Zytokine und Metalloproteasen im Zellkultur-Überstand mittels ELISA gemessen. Die Viabilität und das Wachstum der Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch (FACS) bzw. über die Inkorporation von radioaktiv markiertem ³H-Thymidin in sogenannten Proliferations-Assays ermittelt. Für die Quantifizierung der Zelldifferenzierung wurden MSCs fixiert, gefärbt und anschließend licht- und fluoreszenzmikroskopisch photographiert. Die gewonnenen Bilder wurden schließlich mit ImageJ ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden.

In Kokultur induzierten B-Zellen massiv die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 in MSCs sowie die Produktion von MMP-3. Hierbei erwies sich der direkte Zellkontakt mit B-Zellen als deutlich effektiver, dennoch waren auch eindeutige Effekte allein durch soluble Faktoren zu beobachten. In Anwesenheit von MSCs wurde dagegen sowohl im direkten Kontakt, mehr noch aber über soluble Faktoren, die TNF α -Produktion der B-Zellen stark gehemmt. Dabei zeigte sich, dass bereits eine geringe Anzahl von MSCs (1:250) in der Kultur genügte, um die gemessene Konzentration an TNF α um mehr als die Hälfte zu reduzieren. Eine

Immunmodulation durch MSCs konnte neben der Reduktion der B-Zell-spezifischen TNF α -Produktion auch in der Hemmung der Proliferation und der IgM-Produktion nachgewiesen werden. Diese Effekte waren sowohl im direkten Zellkontakt mit MSCs zu beobachten als auch bei Trennung der Zellen mittels Transwellmembran, was darauf schließen lässt, dass vorwiegend soluble Faktoren für diese Effekte verantwortlich sind. Als wichtiger Signalweg, der bei der Proliferationshemmung der B-Zellen durch MSCs eine Rolle spielt, konnte im direkten Zellkontakt TGF- β identifiziert werden. Ähnliches konnte auch für T-Zellen beobachtet werden. Neben einer Hemmung der Proliferation durch MSCs konnte jedoch auch zusätzlich beobachtet werden, dass geprimte MSCs, das heißt MSCs mit vorherigem B-Zell-Kontakt, eine schwächere Hemmung auf die Proliferation von T-Zellen ausübten, als ungeprimte MSCs. Insgesamt zeigten MSCs jedoch keinen Einfluss auf die Viabilität von B- und T-Lymphozyten.

Die Anregung von MSCs zur Produktion proinflammatorischer Zytokine durch B-Zellen zeigte sich in dieser Arbeit als ein überwiegend kurzlebiger und reversibler Prozess. Weitere Langzeiteffekte konnten jedoch hinsichtlich des Einflusses von B-Zellen auf die Differenzierung von MSCs beobachtet werden. Der Überstand von B-Zellen und die dadurch induzierten proinflammatorischen Faktoren zeigten sich dabei als äußerst potent die adipogene Differenzierung zu hemmen, während die osteogene Differenzierung eher gefördert wurde.

Insgesamt zeigte sich in dieser Arbeit, dass aktivierte B-Zellen MSCs zur Produktion inflammatorischer Zytokine und Enzyme anregen können sowie deren Differenzierung in eine bestimmte Richtung beeinflussen können. Gleichzeitig zeigten sich aber auch Regulierungsmechanismen von Seiten der MSCs, da MSCs direkten Einfluss auf die Proliferation und die Zytokin- und Antikörperproduktion von B-Zellen nehmen. Dies ist im Rahmen von Autoimmunerkrankungen besonders wichtig, um eine selbsterhaltende Immunreaktion erfolgreich zu unterdrücken. Der Therapieansatz der Transplantation von

MSCs ist und bleibt damit spannend. Es gilt daher auch in Zukunft die entscheidenden Interaktionsmechanismen weiter zu untersuchen und zu charakterisieren, um letztendlich die Sicherheit und den Erfolg dieses Ansatzes zu gewährleisten.