

Nathalie-Christin Kaul  
Dr. med.

## **Der Einfluss von hypoxischen Kulturbedingungen auf die Interaktion zwischen Synovialfibroblasten und T-Helfer-Zellen im Sinne der Rheumatoiden Arthritis**

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

Die Entstehung der rheumatoiden Arthritis ist eng mit der Infiltration des entzündeten Gelenkes durch Immun-Effektorzellen wie T-Helfer-Zellen und Veränderungen im Phänotyp der ortsständigen Synovialfibroblasten verbunden. Beide Mechanismen führen zur sogenannten Pannusbildung, der Bildung einer tumorähnlichen infiltrativen Masse, die in das umliegende Gewebe invadiert, Knochen und Knorpel erodiert und hierdurch zur Gelenkzerstörung mit nachfolgender Invalidität beiträgt. Unter atmosphärischen Sauerstoffpartialdrücken besitzen Synovialfibroblasten die Fähigkeit, T-Zell-Antworten durch einen durch das zytosolische Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)<sup>1</sup> vermittelten Tryptophankatabolismus zu supprimieren, wobei diesem Mechanismus eine fundamentale Rolle in der Terminierung von Immunreaktionen und der Unterbindung inadäquater T-Zell-Antworten zugesprochen wird. Synovialfibroblasten, welche aus dem Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis gewonnen wurden, zeigen sich in dieser immunmodulatorischen Fähigkeit gegenüber Synovialfibroblasten von degenerativen Gelenkerkrankungen eingeschränkt. Mechanistisch katalysiert IDO1 den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan zu seinen Abbauprodukten, den Kynureninen. Sowohl der Entzug der essentiellen Aminosäure aus dem Mikroumfeld als auch die Produktion der immunsuppressiven Kynurenine tragen zur Inhibierung der T-Zell-Proliferation und zur lokalen Immunregulation im gesunden Gelenk bei.

Seit 1970 wurden zahlreiche in vivo-Studien publiziert, die auf einen ausgeprägten Sauerstoffmangel im Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis aufmerksam machen. Mit einem Sauerstoffvolumenanteil von circa 3%, gerechnet auf atmosphärische Verhältnisse, werden im Vergleich zu gesunden Gelenken tief hypoxische Sauerstoffspiegel im entzündeten Synovialgewebe erreicht. Bislang bleibt jedoch ungeklärt, ob und in welcher Form sich Gewebhypoxie im Gelenk auf die Interaktion zwischen Synovialfibroblasten und T-Helfer-Zellen auswirkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es demnach, zu untersuchen, ob Hypoxie die Interaktion von Synovialfibroblasten und T-Helfer-Zellen, insbesondere im Hinblick auf die durch Synovialfibroblasten vermittelte Inhibition der T-Helfer-Zell-Proliferation, beeinflusst.

In umfangreichen in vitro Co-Kultur-Experimenten konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass hypoxische Kulturbedingungen die T-Helfer-Zell-suppressiven Fähigkeiten von Synovialfibroblasten tiefgreifend beeinflussen: Hypoxie sowohl von 3 als auch von 1,5 % Umgebungssauerstoff reduziert die durch Synovialfibroblasten vermittelte Inhibition der T-Helfer-Zell-Proliferation signifikant, so dass mit Synovialfibroblasten co-kultivierte T-Helferzellen unter hypoxischen Kulturbedingungen nahezu enthemmt zu proliferieren scheinen. Ferner konnte unter hypoxischen Bedingungen eine prolongiert erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 und CD69 auf der Zelloberfläche von mit Synovialfibroblasten co-kultivierten T-Helfer-Zellen nachgewiesen werden. Die Vitalität sowohl der Synovialfibroblasten als auch der T-Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen von 3% O<sub>2</sub> präsentierte sich nicht herabgesetzt, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass die verringerte Synovialfibroblasten-vermittelte T-Helfer-Zell-Suppression unter hypoxischen Kulturbedingungen auf ein vermehrtes Zellsterben der Synovialfibroblasten unter Hypoxie

zurückzuführen ist. Darüber hinaus zeigte sich die Sekretion der potentiell Gewebe-destruktiven Matrix-Metalloprotease 3 und der Zytokine Interleukin-6, Interleukin-10 sowie von Interferon- $\gamma$  unter hypoxischen Kulturbedingungen signifikant reduziert, während die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-17A und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  unter Hypoxie vermehrt sekretiert wurden. Mechanistisch präsentierte sich in Synovialfibroblasten die aktivierte, an Tyrosin 701 phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)1, die an der Regulation der IDO1-Expression durch proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  beteiligt ist, unter hypoxischen Kulturbedingungen reduziert. Ebenfalls unter Hypoxie, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, signifikant verringert, zeigte sich die Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase 1, wobei die Tryptophandegradation entlang des Kynureninstoffwechselweges unmittelbar von der Höhe der Sauerstoffkonzentration abhing. Die Supplementation von Interferon- $\gamma$ , dem bekanntesten Induktor der IDO1-Expression auf molekularer Ebene, dessen Konzentration sich unter hypoxischen Kulturbedingungen reduziert präsentierte, konnte weder die Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 noch die durch Synovialfibroblasten vermittelte T-Helfer-Zell-Suppression unter hypoxischen Kulturbedingungen wiederherstellen.

Die Reduktion der IDO1-Expression unter hypoxischen Kulturbedingungen lässt sich folglich nicht durch einen Mangel an Stimulans erklären und kann ebenfalls nicht vollständig durch die verringerte Phosphorylierung von STAT1 erklärt werden, da es zu keiner signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von STAT1 in monokultivierten Synovialfibroblasten unter hypoxischen Kulturbedingungen kam, während die IDO1-Expression in diesen Experimenten ebenfalls signifikant herunterreguliert wurde. Die verringerte IDO1-Expression unter hypoxischen Kulturbedingungen scheint dementsprechend zusätzlich durch andere Mechanismen wie möglicherweise epigenetischen Veränderungen am IDO1-Promotor getragen zu werden.

Ähnlich-konzipierte Studien anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls die Effekte von Hypoxie auf das Suppressionsverhalten anderer (Stroma-)Zelltypen untersuchten, dokumentierten überwiegend mit dieser Studie übereinstimmende Ergebnisse, wobei abhängig vom jeweiligen Zelltyp entweder eine verringerte IDO1-Expression auf mRNA- und Proteinebene oder eine verringerte IDO1-Enzymaktivität unter Hypoxie für die verminderte T-Zell-suppressive Wirkung unter hypoxischen Kulturbedingungen verantwortlich gemacht wurde. Unabhängig von der Regulierung der IDO1-Expression auf transkriptionaler Ebene, benötigt das Enzym molekularen Sauerstoff als Cosubstrat für die Katalyse des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes im Tryptophanabbau, der Oxidation von L-Tryptophan zu L-Kynurenin.

Summa summarum übt Hypoxie großen Einfluss auf die Interaktion von Synovialfibroblasten und T-Helfer-Zellen aus. Zum einem, verringert Sauerstoffmangel die Effizienz der Synovialfibroblasten, die Proliferation von co-kultivierten T-Helfer-Zellen zu inhibieren und zum anderen steigern hypoxische Kulturbedingungen die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-17A und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ . Beide Effekte könnten die Synovitis im rheumatisch veränderten Gelenk in einer Art Teufelskreis zusätzlich aggravieren: Durch die initiale Infiltration mit anschließender Akkumulation von Immuneffektorzellen wie T-Helfer-Zellen im Synovialgewebe und einer zunehmenden Proliferation der ortständigen Synovialfibroblasten vergrößert sich die Sauerstoffdiffusionsstrecke von den Blutgefäßen zu den Effektorzellen durch Zunahme der Zellmasse. Ferner weisen die aktivierten Zellen einen gesteigerten Zell-Metabolismus mit dadurch konsekutiv erhöhtem Sauerstoffbedarf auf. Es entsteht ein Ungleichgewicht von Sauerstoffbedarf zu Sauerstoffangebot, wodurch Gebiete ausgeprägter Hypoxie im entzündeten Gelenk bei rheumatoider Arthritis entstehen. Der Hypoxie-bedingte Verlust der Fähigkeit ortständiger Synovialfibroblasten, die Proliferation von immigrierten T-Helfer-Zellen zu supprimieren, könnte in vivo zu einer weiteren Zunahme der Zellmasse führen. Ferner könnte die unter Hypoxie erhöhte Produktion von Interleukin-

17A und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  zu einer weiteren Aktivierung der beteiligten Zelltypen und einer gesteigerten Infiltration von Immunzellen ins entzündete Gewebe führen, wodurch der Sauerstoffmangel weiter zunehmen und die suppressiven Fähigkeiten der Synovialfibroblasten im Umkehrschluss abnehmen würden, bis schließlich das gesamte Synovialgewebe als Endresultat tief hypoxisch ist.