

Yanrong Cai  
Dr. med.

## **B-cell Inflammatory Signals Attenuate Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells via Developmental Signaling Pathways**

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

Die Interaktion von aktivierten Immunzellen und mesenchymalen Stromazellen spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und Progression von chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen, wie am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis sehr gut belegt ist. Neuere Daten weisen auch auf einen Beitrag von Entzündungszellen am Fortschreiten der Osteoarthritis hin. Neben T-Zellen und Makrophagen finden sich in der arthritischen Synovialmembran aktivierte B-Zellen, die dort keimzentrumsähnliche Strukturen bilden und Zytokine sowie Chemokine sezernieren. Ihre potentielle Fähigkeit, am Krankheitsgeschehen aktiv teilzunehmen, wurde experimentell bereits dadurch bestätigt, dass sie in der Lage sind, Fibroblasten zu aktivieren und deren Invasion in gesunden Knorpel zu ermöglichen bis hin zu dessen Zerstörung. Bisher war nicht bekannt, ob B-Zell-Faktoren auch an der eingeschränkten Regeneration des Knorpels beteiligt sein könnten. Dessen Produktion wird normalerweise von speziellen Chondrozyten aufrechterhalten, die aus der gerichteten Differenzierung mesenchymaler Stammzellen hervorgehen (Chondrogenese).

Ziel dieses Projektes war es, den Einfluss aktivierter humaner B-Zellen auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen aus Synovia und Knochenmark von Osteoarthritis-Patienten zu untersuchen und potentielle zugrundeliegende Mechanismen zu definieren. Zu diesem Zweck wurde ein 3D-Zellkulturmodell etabliert, das den Verlauf der Chondrogenese in An- oder Abwesenheit von konditioniertem Medium (Zellkulturüberstand) aktivierter B-Lymphozyten erlaubt, um dabei die pathogene zelluläre Umgebung im Synovium nachzubilden.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter optimalen chondrogenen Bedingungen der Überstand der B-Zellkultur die Chondrogenese fast vollständig hemmte, was durch eine starke Unterdrückung der Bildung Knorpelmatrix-spezifischer Glycosaminoglycane sowie Hemmung des Chondrozyten-Linien-spezifischen Transkriptionsfaktors SOX9 und der Knorpelmatrixprotein-codierenden Gene Collagen-2 und Aggrecan belegt wurde. Gleichzeitig wurde durch B-Zell-Faktoren die Expression der gewebeabbauenden Matrix-Metalloprotease-8 und -13 hochreguliert. B-Zellfaktoren störten auch die Signalübertragung über den Transforming Growth Factor- beta, einem für die erfolgreiche Chondrogenese unverzichtbaren Zytokin. Dies konnte anhand der verminderten Phosphorylierung seiner nachgeschalteten Signalkomponente SMAD-2 nachgewiesen werden. Die Neutralisierung der B-Zell-spezifischen Zytokine Tumornekrosefaktor- alpha und Interleukin-1- beta mittels eines blockierenden Antikörpers (Adalimumab) bzw. eines Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (Anakinra) konnte den Proteoglykangehalt und die chondrogene Genexpression teilweise wiederherstellen und den Anstieg proteolytischer Matrix-Metalloproteasen reduzieren. Bemerkenswerterweise war dieser Effekt mit einem Schutz vor der B-Zell-vermittelten Unterdrückung des Transforming Growth Factor- beta-Signals gekoppelt. In mit B-Zell-Überstand behandelten mesenchymalen

Stammzellen konnte unter chondrogenen Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen auch eine erhöhte transkriptionelle Expression von Komponenten des Wnt- Signalwegs, wie z. B. erhöhtes Wnt3a beobachtet werden. Begleitet wurde dies von einer erhöhten Anreicherung von aktivem  $\beta$ -Catenin - Protein, dem zentralen Mediator des kanonischen Wnt-Signalwegs, der im Verlauf der chondrogenen Differenzierung normalerweise herunterreguliert wird. Die Verwendung eines Wnt- Inhibitors IWP-2 hingegen konnte die Chondrozyten-Differenzierung in Gegenwart von B-Zell-Überstand weitgehend aufrechterhalten, einschliesslich der Expression von Glykosaminoglykanen, SOX9, Aggrecan und Collagen-2. Dadurch konnte eine Beteiligung der aberranten Wnt-Signalübertragung an der durch B-Zell-Faktoren unterdrückten Chondrogenese bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Projekts, dass lösliche Faktoren aktivierter B-Zellen, einschliesslich Tumornekrosefaktor- alpha und Interleukin-1- beta die Chondrogenese und somit den Knorpelaufbau negativ beeinflussen. Diese Faktoren behindern die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen über zentrale Entwicklungswege: Hemmung der TGF- $\beta$ /Smad2-Signalübertragung und verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs.

Die Ergebnisse dieser Studie tragen zu einem besseren Verständnis der Vorgänge bei, die sich in einem durch aktivierte Immunzellen infiltrierten Synovium abspielen und können Impulse für zukünftige alternative Behandlungsstrategien liefern.