

Jia Li

Dr.sc.hum

Bidirectional Interaction of Differently Activated and Polarized Monocytes/Macrophages and Stromal Cells in Context of Tissue Remodeling in Chronic Inflammatory Disease

Fach/Einrichtung: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanns-Martin Lorenz

Hintergrund: Aktivierte Makrophagen (Mph) können entsprechend ihrer Polarisierung in mindestens 2 große Untergruppen, klassische pro- (M1-) und anti-inflammatorische (M2-) Makrophagen unterteilt werden. Zusammen mit Fibroblasten gelten sie als Schlüsselmediatoren des Gewebeumbaus bei chronisch-rheumatischen Erkrankungen. Mph besitzen eine hohe Plastizität, und es wird vermutet, dass ein Ungleichgewicht der M1/M2-Mph-Polarisation zu einer pathogenen Aktivierung von Fibroblasten führen könnte, welche beispielsweise die Knorpeldestruktion bei RA oder Fibrose bei systemischer Sklerose vermitteln. Basierend auf dieser Beobachtung diskutieren einige Forscher bereits eine therapeutische Modulation von Mph als interessante Option, um dem pathologischen Gewebeumbau entgegenzuwirken. Die Ursachen für die gestörte M1/M2-Homöostase und die Wechselwirkung mit der entzündlichen Mikroumgebung sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Ziel: Um die Wechselwirkungen zwischen Stromazellen und Monozyten/Makrophagen zu untersuchen, werden in diesem Dissertationsprojekt mehrere Hypothesen formuliert:

- i. Können unterschiedlich aktivierte und polarisierte Makrophagen Fibroblasten auf unterschiedliche Weise aktivieren?
- ii. Können unterschiedlich aktivierte Fibroblasten die Polarisation von Makrophagen beeinflussen?
- iii. Welche Signalwege sind an der Interaktion beteiligt?
- iv. Können Modulatoren der biologischen Reaktion, die bereits bei der Behandlung von Patienten verwendet werden (wie monoklonale Antikörper oder niedermolekulare Inhibitoren), den beobachteten Wirkungen entgegenwirken oder diese verbessern?

Methoden: Makrophagen wurden aus hochgereinigten Monozyten aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert und über mehrere Tage in M1 und M2 Mph polarisiert. CD80 und die Sekretion von TNFa und IL12 wurden als repräsentativ für M1 und die Expression von CD163, CD206 und IL-10 als repräsentativ für M2 gewertet. Fibroblasten (Fib) wurden entweder unstimuliert verwendet oder sie wurden für mehrere Tage durch TNFa/IL1b vorstimuliert, um einen proinflammatorischen RA- ähnlichen Phänotyp zu induzieren (gekennzeichnet durch eine starke Hochregulation von MMP-3, IL-6 und COX-2), oder mit TGFb vorstimuliert, um einen Myofibroblasten-ähnlichen profibrotischen Phänotyp zu generieren, (gekennzeichnet durch die Genexpression von aSMA and COL-1). Sowohl Mph als auch Fib wurden entweder zusammen in Zellkultureinsätzen (Transwell) kokultiviert oder Zellen wurden mit Zellkulturüberständen (SN) inkubiert.

Resultate: M1-SN und M1-Kokultur mit Fib induzierten eine signifikante Hochregulation von IL-6 und MMP-3, insbesondere in TNFa/IL-1b-vorstimulierten Fib. Die M1-Kokultur induzierte eine hohe Expression von COX-2 und eine Herunterregulierung fibrotischer Marker, während der M1-Mph-Überstand auch profibrotische Wirkungen auf synoviale Fibs hatte, wie durch die Hochregulation von aSMA und COL-1 belegt wurde. Diese Wirkungen wurden in Gegenwart eines selektiven JAK-Inhibitors (JAKi) Upadacitinib signifikant unterdrückt. Die Kokultur von M2- SN und M2 mit Fib regulierte COX-2 in fast allen Fibroblasten-Phänotypen herunter und zeigte dadurch entzündungshemmende Wirkungen. JAKi regulierte die COX-2-Expression weiter herunter. Nur bei TNFa/IL-1b-voraktivierten Fib war dieser Effekt sehr schwach ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass eine starke entzündliche Umgebung den immunregulatorischen Wirkungen von M2-Mph entgegenwirkt.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von Fib auf die Polarisierung von Mph untersucht indem Fib-Überstand von TNFa/IL-1b vorstimulierten Fib mit undifferenzierten M0 Mph inkubiert wurde. Als Ergebnis verschob sich der M0- in Richtung des M2-Phänotyps und exprimierte hohe Mengen an CD163, CD206 und IL-10. Die Anwendung eines Anti-IL-6-Rezeptor-Ak (Tocilizumab) und JAKi hemmten beide die Entwicklung dieses anti-inflammatorischen Phänotyps.

Zuletzt wurden die Auswirkungen von M1- auf die M0-Polarisation gemessen. CD163 wurde durch M1-SN signifikant hochreguliert, und die entzündungsfördernden Zytokine –IL-6 und TNFa– wurden offensichtlich durch die Anwesenheit von M1-SN herunterreguliert, was wiederum auf einen M2-polarisierenden Effekt hindeutet wie er bereits bei der Wirkung von M1-SN auf Fib beobachtet worden war. JAKi hemmte wiederum die M2-induzierende Wirkung von M1-SN auf M0 Mphs.

Diese Studie zeigt, dass polarisierte Mph eine starke modulierende Wirkung auf den Fib-Phänotyp hinsichtlich der transkriptionellen Expression charakteristischer Marker haben. Andererseits haben voraktivierte pro-inflammatorische Fib und polarisierte M1 selbst auch einen signifikanten Effekt auf die Mph-Polarisation und unterstützen die M2-Differenzierung. Dies könnte potentiell einen physiologischen negativen Rückkopplungs-mechanismus widerspiegeln und ist zumindest teilweise von IL-6 bzw dem JAK/STAT-Signalweg abhängig. Interessanterweise hemmten JAKi und anti-IL-6, welche erfolgreich proinflammatorische und profibrotische Reaktionen in Fib aufheben, auch die Differenzierung von Mph in regulatorische M2, was auf einen neuen funktionellen Aspekt dieses Immunmodulators hinweist.