

RHEUMA-
FORSCHUNG
START-UP
PROJEKTE
2006–2008

DEUTSCHE GESELLSCHAFT
FÜR RHEUMATOLOGIE

INHALT

- ANDREAS RADBRUCH**
3 Vorwort
- MARVIN PETERS**
4 **Ringens um den Tod**
Welche Rolle spielt SENP7 bei der Aktivierung synovialer Fibroblasten bei RA?
- ELENA NEUMANN**
6 **Von einem Gelenk zum anderen**
Migrationspotential synovialer Fibroblasten von RA-Patienten
- CHIARA ROMAGNANI**
8 **»Live and let die«**
Welche Rolle spielen natürliche Killerzellen bei beginnender oder anhaltender Autoimmunität?
- THOMAS KAMRADT**
10 **Avantgarde-Maus-Modell**
Generierung B-Zell-retrogener Mäuse
- HEDDA WARDEMANN**
12 **Böser Bube B-Zelle?**
Autoantikörper in Patienten mit systemischer Sklerose
- JOCHEN ZWERINA**
14 **Metall in den Gelenken**
Beobachtungsstudie zu Patienten mit erblicher Hämochromatose



PROF. ANDREAS RADBRUCH
Präsident der Deutschen Gesellschaft
für Rheumatologie

VORWORT

Liebe Mitglieder der DGRh,
liebe Interessierte der Rheumatologie,

die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) hat sich gemeinsam mit dem Kompetenznetz Rheuma Anfang 2006 auf ein Experiment eingelassen: Die Idee war, gezielt Projekte mit einem ganz neuen Forschungsansatz zu fördern, die bisher mangels Vorarbeiten keine andere Finanzierung erhielten. Diese »Start-Up«-Förderung der DGRh wollte in gewissem Sinne Katalysator sein, um die Grundlage für eine anschließende Förderung beispielsweise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft zu schaffen. Dafür hat die DGRh 300.000 Euro zur Verfügung gestellt und das Kompetenznetz Rheuma mit dem gesamten Projektmanagement betraut. Das Kompetenznetz bot die optimalen Strukturen für eine reibungslose Forschungskoordination, außerdem repräsentiert es den Forschungsbereich innerhalb der DGRh. Aus 37 erstklassigen Anträgen wählte ein international besetztes Gutachtergremium insgesamt sechs Projekte für die Förderung aus.

Bereits beim 35. Kongress der DGRh im Jahr 2007 in Hamburg wurde der erste vielversprechende Zwischenstand der Start-Up Projekte in einer eigenen Sitzung präsentiert.

Mit dieser Broschüre möchten wir die einzelnen Projekte vorstellen. Die Bilanz dieser Initiative ist eindeutig positiv: Durchweg wurden spannende Forschungsansätze erfolgreich bearbeitet und die Ergebnisse in angesehenen Fachzeitschriften veröffentlicht. Alle Antragsteller haben zudem Gelder einwerben können, um die Arbeiten fortzuführen. Die Ziele, die sich die DGRh Anfang 2006 gesetzt hat, sind erreicht.

Die DGRh setzt dieses Förderprogramm fort. Durch die großzügige Unterstützung der Firma Wyeth ist es möglich, in eine neue Runde der Start-Up Förderung zu gehen. Die Start-Up Initiative 2008 ist in der Zeitschrift für Rheumatologie und unter www.dgrh.de ausgeschrieben. Ich wünsche mir eine starke Beteiligung – Ausdruck der lebendigen Forschungslandschaft in der Rheumatologie.

RINGEN UM DEN TOD

VON MARVIN PETERS

4



DR. MARVIN PETERS (35)
Post-Doktorand im Bereich für Molekulare Medizin des muskuloskelettalen Systems am Universitätskrankenhaus Münster
marvin.peters@uni-muenster.de

HINTERGRUND

Zellen des Bindegewebes (Fibroblasten), die durch bestimmte Botenstoffe (Zytokine) dauerhaft aktiviert worden sind, fördern die Krankheitsentwicklung einer rheumatoiden Arthritis (RA). Im aktiven Zustand haften sie verstärkt an Knorpel und Knochen und produzieren übermäßig viele Enzyme, die Knorpel- und Knochen-substanz abbauen. Zusätzlich weisen Fibroblasten bei einer RA eine übermäßig hohe Lebenserwartung auf. Da der natürliche, programmierte Zelltod (Apoptose), verzögert eintritt, kommt es zu einem unkontrollierten Wachstum in der Gelenkinnenhaut – ein Merkmal der RA.

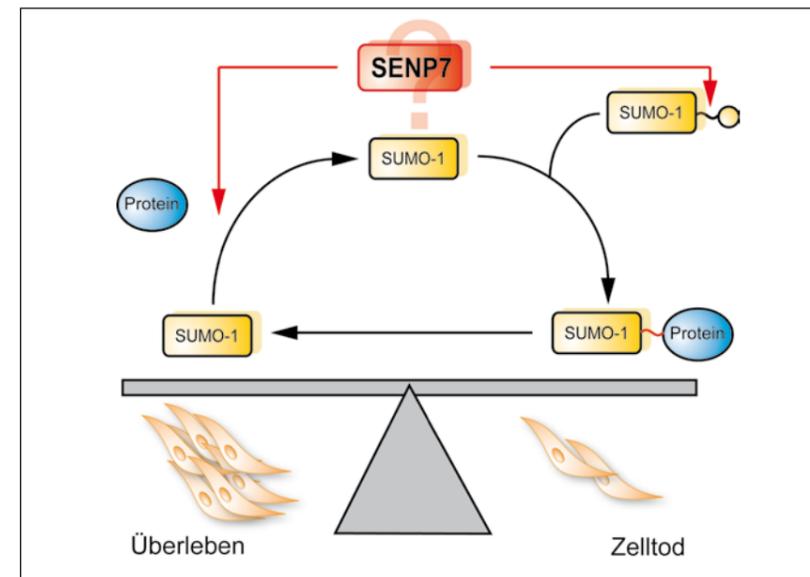
In diesem Projekt wurde nachgewiesen, dass ein besonderes Enzym, die Protease SENP7, eine Rolle dabei spielt, ob der programmierte Zelltod stattfindet oder nicht. In zukünftigen Therapieansätzen könnten Inhibitoren der Protease SENP7 möglicherweise gezielt von außen eingesetzt werden, um aggressive Fibroblasten auszuschalten und damit das Eindämmen der Entzündung zu unterstützen.

WELCHE ROLLE SPIELT SENP7 BEI DER AKTIVIERUNG SYNOVIALER FIBROBLASTEN BEI RA ?

DAS START-UP FORSCHUNGSPROJEKT

Fibroblasten aus der entzündeten Gelenkinnenhaut von Patienten mit RA sind an der Entstehung dieser Erkrankung maßgeblich beteiligt. Bei einer RA sind Fibroblasten aus der entzündeten Gelenkinnenhaut dauerhaft in einem aktivierten Zustand. Ähnlich wie bei einem Tumor bleiben sie aktiviert, selbst wenn entzündungsauslösende Botenstoffe nicht mehr präsent sind. Die Besonderheiten dieser stabil aktivierten Fibroblasten sind neben der verstärkten Haftung an Knorpel, Knochen und einer erhöhten Produktion abbauender Enzyme eine Resistenz gegenüber dem »Selbstmordprogramm« einer Zelle (Apoptose). Ist die Apoptose einer Zelle in Fibroblasten der Gelenkinnenhaut gestört, unterbleibt eine geregelte Erneuerung von Geweben der Gelenkinnenhaut.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Veränderung von Eiweißmolekülen im Zellkern – ausgelöst durch SUMO-1 – an der Aktivierung von Fibroblasten beteiligt ist. Das Eiweißmolekül SUMO-1 (Small Ubiquitin-related MOdifier) bindet vorübergehend an andere Proteine und wirkt dadurch wie ein Schalter in verschiedenen Körperzellen, so auch in den Fibroblasten der Gelenkinnenhaut. Insbesondere spielen SUMO-1 induzierte Veränderungen eine wichtige Rolle dabei, dass der programmierte Zelltod der Fibroblasten nicht mehr in gere-



Das Enzym SENP7 beeinflusst die SUMO-1 »Schalterfunktion« des programmierten Zelltods.

gelter Weise abläuft und unregelmäßiges Wachstum gefördert wird. Allerdings belegen unsere Daten einen komplexen Mechanismus der zellulären Vorgänge, bei denen neben dem SUMO-Anheftungsprozess (»SUMOylierung«), auch die SUMO-Abspaltung vom Zielprotein (De-SUMOylierung) eine zentrale Rolle spielt. Diese De-SUMOylierung wird von Enzymen, den SENPs, vermittelt. In diesem Projekt konnte nachgewiesen werden, dass ein besonderes Eiweißmolekül, das Enzym SENP7, die SUMO-1 »Schalterfunktion« entscheidend beeinflusst und vielleicht in Zukunft gezielt von außen zum Abschalten der aggressiven Fibroblasten genutzt werden könnte.

Erst kürzlich wurde die SUMO-Protease SENP7 identifiziert. Einige bisher unveröffentlichte Daten legen nahe, dass das SENP7-Gen auf einem Genort liegt, der mit der RA assoziiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass SENP7 in Geweben von Patienten mit RA sowie in deren Gelenk-Fibroblasten stärker produziert wird als in Geweben von Patienten mit anderen

degenerativen Gelenkveränderungen (Arthrose). Es wurde auch festgestellt, dass SENP7 im Zellkern (dort in nukleären Punkten) sowie im Zytoplasma lokalisiert ist. Im Zytoplasma konnte eine Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Apparat und dem Zentrosom nachgewiesen werden.

Es wurde SENP7 in Mäusen untersucht, die auf Grund konstitutiv hoher Spiegel an TNF-alpha eine spontane, RA-ähnliche Arthritis entwickeln (hTNFtg Mäuse). Im Einklang mit Daten aus humanen Zellen und Geweben konnte eine erhöhte Expression von SENP7 in Geweben und synovialen Fibroblasten der hTNFtg Mäuse mit RA gezeigt werden. Neueste Daten belegen, dass SENP7 durch TNF-alpha stimuliert werden kann.

Das Start-Up Projekt über die Rolle von SENP7 hat bisher neue Erkenntnisse zur Bedeutung der posttranslationalen Modifikation durch SUMOs und deren De-SUMOylierender Protease SENP7 in der stabilen Aktivierung synovialer Fibroblasten bei RA geliefert. Es konnte auch gezeigt werden, dass SENP7 ein Zielprotein bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze darstellen könnte, die nicht nur auf den Entzündungsaspekt der Erkrankung fokussieren, sondern die Fibroblasten vermittelte Gelenkerstörung einbeziehen.

In direkter Fortführung dieses Start-Up Projektes wurde ein DFG-Antrag gestellt zur Finanzierung einer Doktorandenstelle, um die Rolle von SENP7 weitergehend zu beleuchten. Ein weiterer DFG-Antrag wurde gestellt, um die Beteiligung von SUMO-2/3 und der Protease SENP5 bei der Apoptose synovialer Fibroblasten zu untersuchen.

5

VON EINEM GELENK ZUM ANDEREN

VON ELENA NEUMANN

MIGRATIONS- POTENTIAL SYNOVIALER FIBROBLASTEN VON RA-PATIENTEN

6



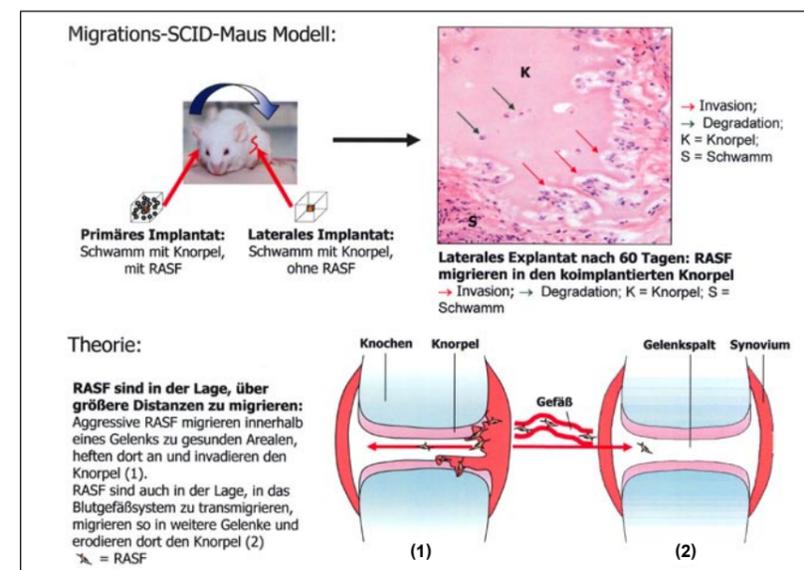
DR. ELENA NEUMANN (36)
Leiterin der rheumatologischen
Grundlagenforschung der
Inneren Medizin mit Schwerpunkt
Rheumatologie an der
Justus-Liebig-Universität, Bad-Nauheim
e.neumann@kerckhoff-klinik.de

HINTERGRUND

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist durch den fortschreitenden Abbau von Knorpel und Knochen sowie durch eine chronische Entzündung gekennzeichnet. Die Zerstörung des Gelenkknorpels wird vor allem von aktivierten, synovialen Fibroblasten hervorgerufen. Diese sind in gesunden Personen für die Reparatur von Läsionen verantwortlich. Hierbei wird z.B. angegriffene Knorpelsubstanz abgebaut und durch neue ersetzt. Synoviale Fibroblasten von Patienten mit RA weisen einen vermehrten Matrixabbau am Knorpel auf, was letztendlich zu dessen Zerstörung führt.

Bisher wurde angenommen, dass sich Fibroblasten nur innerhalb des betroffenen Gewebes fortbewegen. Im sogenannten Migrations-SCID-Maus-Modell der RA wurde gezeigt, dass synoviale Fibroblasten aus entzündeten Gelenken bei RA (RASf) das Potential zur Migration besitzen und entfernten Knorpel angreifen können. Dies kann auch bei Patienten mit RA beobachtet werden: Die Erkrankung beginnt an einem oder wenigen Gelenken, nach und nach werden weitere Gelenke von der Entzündung vereinnahmt.

Dieses Projekt untersuchte, welche Faktoren bei der Migration der RASf über längere Distanzen und der anschließenden Invasion in den Knorpel eine Rolle spielen. Die Ergebnisse tragen dazu bei, Therapien zu entwickeln, die die Bewegung der destrukturierenden Fibroblasten und damit das Ausbreiten der Erkrankung auf gesunde Gelenke verhindern.



Synoviale Fibroblasten aus entzündeten Gelenken einer rheumatoiden Arthritis (RASf) wandern über das Blutgefäßsystem durch den gesamten Körper und durchtreten die Gefäßwände, um in weitere Gelenke einzudringen

DAS START-UP FORSCHUNGSPROJEKT

In diesem Projekt wurden sogenannten SCID-Mäusen (SCID, engl. = severe combined immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt) auf der einen Körperseite humaner Knorpel zusammen mit humanen RASf ko-implantiert. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde humaner Knorpel ohne RASf eingesetzt. Im Verlauf des Experiments wanderten die RASf sowohl in den angrenzenden als auch entfernten Knorpel ein. Es stellte sich heraus, dass die RASf durch das Blutgefäßsystem wanderten. Die Transmigration der RASf durch Endothelzellschichten der Blutgefäßwände wurde in verschiedenen Experimenten bestätigt.

Im Rahmen dieses Projektes konnten bestimmte Moleküle identifiziert werden, die am Prozess der Migration beteiligt sind. Dazu zählen bestimmte Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und Integrine, die auf den Endothelzellen der Blutgefäße bzw. auf den RASf lokalisiert sind. Die in die Blutgefäße eingewanderten Fibroblasten binden daran und können dadurch aus dem Blut zum implantierten Knorpelgewebe übertreten. Für die anschließende Invasion in den Knorpel sind Matrix-abbauende Enzyme notwendig. Diese produzieren sowohl die RASf als auch die durch RASf stimulierten Knorpelzellen selbst. In in-vitro-Versuchen wurde zudem nachgewiesen, dass die freiliegende, exponierte Knorpelmatrix die Anheftung und Invasion der RASf befördert.

In Versuchen mit kultivierten Zellen konnte die Migration der RASf verhindert werden, indem Adhäsionsmoleküle und Matrix-abbauende Enzyme blockiert wurden. Derzeit wird untersucht, ob weitere an der Migration beteiligte Moleküle blockiert werden können. Weiterhin werden die bisher unbekanntenen Mechanismen der Transmigration von RASf in und aus dem Blutgefäßsystem erforscht. Das langfristige Ziel ist, die RASf an der Auswanderung aus den betroffenen Arealen zu hindern und somit das Weitertragen der Entzündung in entfernt liegenden gesunden Knorpel zu unterbinden.

Die beschriebenen Experimente wurden im Rahmen des Start-Up-Stipendiums durchgeführt und waren die Voraussetzung dafür, weitere Fördermittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft einzuwerben. Ein erster Antrag wurde bewilligt, ein weiterer steht kurz bevor.

LITERATUR

Neumann E et al (2007): Migrationspotential synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Z Rheum 66: 25

Lefevre S et al (2007): Migration of RA synovial fibroblasts in the SCID mouse model of RA: Identification of the way of migration. Ann Rheum Dis 66: 114

Lefevre S et al (2007): Long distance migration of RASf: Role of extracellular matrix. Arthritis Rheum 56: S436

7



DR. CHIARA ROMAGNANI (35)

Post-Doktorandin im Arbeitsbereich Klinische Immunologie am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, Berlin
romagnani@drfz.de

HINTERGRUND

Zellen des Immunsystems können normalerweise zwischen »selbst« und »fremd« unterscheiden und greifen daher Gewebe des eigenen Körpers nicht an. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) funktioniert diese Toleranz gegenüber dem körpereigenen Gewebe nicht - mit der Konsequenz, dass Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen aktiviert und lösliche Botenstoffe (Zytokine) ausgeschüttet werden können.

In vielen Studien wurde bisher überwiegend die Rolle der T- und B-Lymphozyten untersucht. Dagegen gibt es nur wenige Daten dazu, wie NK-Zellen zur Entstehung und Aufrechterhaltung der RA-Erkrankung beitragen. Ziel dieses Projekt war herauszufinden, welche Mechanismen zur Aktivität von NK-Zellen beitragen können. Dabei wurde festgestellt, dass Zytokine einen wesentlichen Einfluss auf die Funktionalität von NK-Zellen haben, und dass RA-Patienten hoch funktionale NK-Zellen aufweisen.

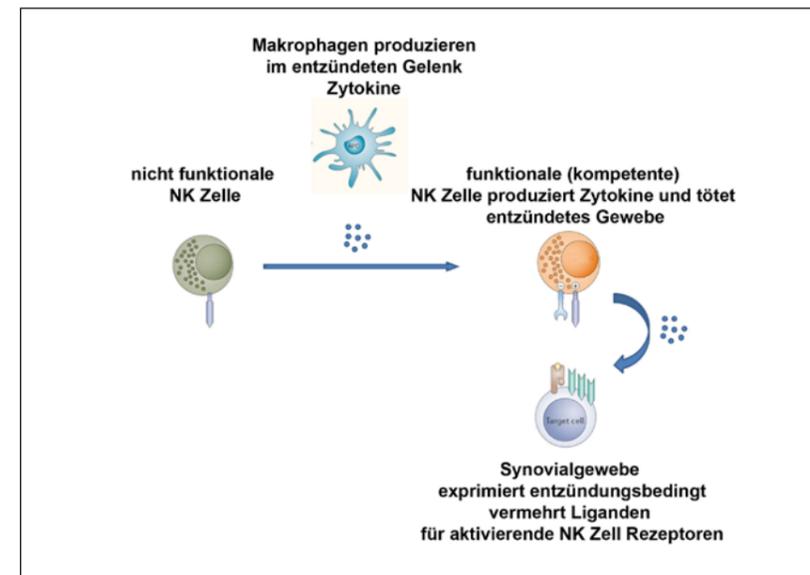
Die Ergebnisse helfen zu verstehen, welche autoreaktiven Prozesse eine RA fördern. Weitere Untersuchungen könnten dazu führen, diese Prozesse in Zukunft gezielt zu unterbrechen und körpereigene Angriffe auf das Immunsystem zu verhindern.

WELCHE ROLLE SPIELEN NATÜRLICHE KILLERZELLEN BEI BEGINNENDER ODER ANHALTENDER AUTOIMMUNITÄT?

DAS START-UP FORSCHUNGSPROJEKT

NK-Zellen exprimieren inhibierende und aktivierende Rezeptoren, über die sie hemmende und stimulierende Signale erhalten. Ein hemmendes Signal wird durch MHC-1-Moleküle ausgelöst, die auf allen körpereigenen Zellen vorhanden sind. Sie stehen für das »selbst« im Selektionsmechanismus des Immunsystems. Gesunde körpereigene Zellen sind somit vor dem Angriff durch NK-Zellen geschützt. Zu den inhibierenden Rezeptoren gehören die Killerzell-Immunglobulin-artigen Rezeptoren (KIRs) sowie ein Rezeptor namens CD92/NKG2A. Aktivierende Signale werden durch Moleküle ausgelöst, die als Antwort auf zellulären Stress z.B. infolge einer Entzündung oder einer bösartigen Veränderung auf Körperzellen hochreguliert werden.

Es existieren auch NK-Zellen, die keinen einzigen bisher bekannten inhibierenden Rezeptor besitzen. In diesem Zustand können sie »selbst« nicht von »fremd« unterscheiden. Dennoch greifen diese potenziell autoreaktiven Zellen körpereigene Zellen nicht an. Die Expression inhibierender Rezeptoren auf NK Zellen ist also Voraussetzung dafür, dass NK-Zellen funktional kompetent sind. Das heißt, sie können andere Zellen töten.



Zytokine aus entzündeten Gelenken können auf nicht funktionalen NK-Zellen die Expression inhibierender Rezeptoren induzieren. Die so aktivierten NK-Zellen werden hoch funktional, produzieren selbst Zytokine und können Gewebe töten, womit sie zur Gelenkerstörung beitragen.

LITERATUR

Raulet, D H et al (2006): Self-tolerance of natural killer cells, *Nat Rev Immunol* 6:520-531

Johansson, S et al (2005): NK cells: elusive players in autoimmunity, *Trends Immunol* 26:613-618

Da Zytokine für das Entzündungsgeschehen im Gelenk von RA-Patienten spezifisch sind, wurde in diesem Projekt die Wirkung von Zytokinen auf NK-Zellen in Zellkulturen beobachtet. Die vergleichende Analyse von NK-Zellen gesunder Spender bestätigte zunächst, dass NK-Zellen, die keine inhibierenden Rezeptoren aufweisen, weniger gut in der Lage sind, andere Zellen zu töten als NK-Zellen mit inhibierendem Rezeptor. Beide Arten von NK-Zellen konnten sich aber nach Stimulation mit Zytokinen vermehren und selbst Zytokine produzieren, die für die Pathogenese der RA von Bedeutung sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zytokine die Expression von inhibierenden Rezeptoren auf dafür negative Zellen veranlassen. Infolgedessen erlangen diese NK-Zellen ihre funktionale Kompetenz und können andere Zellen töten.

Außerdem wurden in diesem Projekt NK-Zellen aus der Gelenkflüssigkeit von Rheumapatienten analysiert. Ziel sollte sein herauszufinden, ob NK-Zellen von RA-Patienten eine fehlende Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen aufweisen, ob sie funktional sind und so zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der RA beitragen können. Es zeigte sich, dass alle NK-Zellen aus der Gelenkflüssigkeit von RA-Patienten mindestens einen

inhibierenden Rezeptor besaßen und hoch zytotoxisch waren. Es ist wahrscheinlich, dass die Zytokine die Expression der inhibierenden Rezeptoren induzieren.

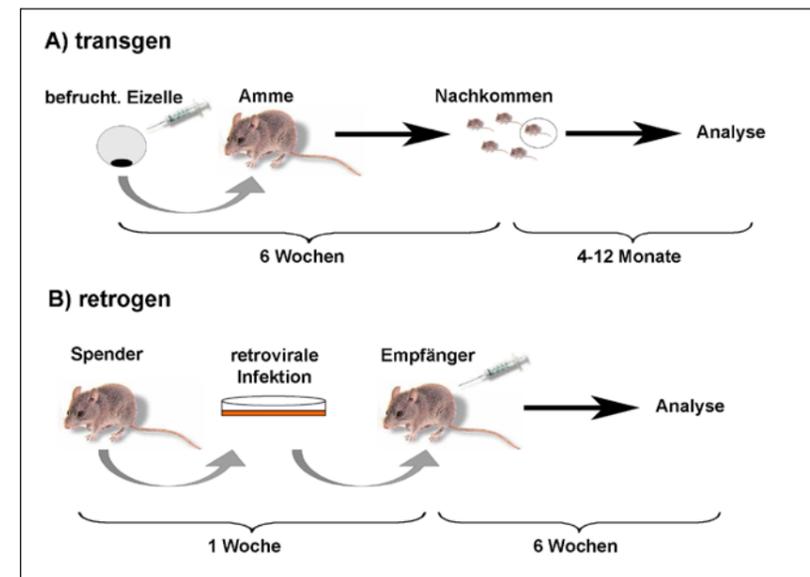
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse: Nicht funktionale NK-Zellen können sich unter Entzündungsbedingungen zu funktionalen NK-Zellen entwickeln. NK-Zellen aus der Gelenkflüssigkeit von Rheumapatienten sind hoch funktional und können somit zum Entzündungsprozess beitragen. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob Synovialgewebe von RA-Patienten vermehrt Liganden produziert, die an den aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle binden. Es besteht noch Forschungsbedarf, um endgültig zu verstehen, weshalb NK-Zellen körpereigene Zellen angreifen und inwiefern sie an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA beteiligt sind.

Aktuell sind keine weiteren Forschungsprojekte zu NK-Zellen bei Autoimmunität geplant. Die Integration eines Projektes zur Rolle von NK-Zellen bei Transplantation in den Sonderforschungsbereich (SFB) 650 ist beantragt.

AVANTGARDE- MAUS-MODELL

VON THOMAS KAMRADT

GENERIERUNG B-ZELL- RETROGENER MÄUSE



Methode zur Erzeugung gentechnisch veränderter Mausstämmen:
Mit dem neuen retrogenen Verfahren sollen erstmals B-Zell-retrogener Mausstämmen entstehen, um mit ihrer Hilfe die Funktion von B-Lymphozyten bei G6PI-induzierter RA aufzuklären

10



PROF. DR. THOMAS KAMRADT (48)
Direktor des Instituts für Immunologie an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
thomas.kamradt@mti.uni-jena.de

HINTERGRUND

Die rheumatoide Arthritis (RA) des Menschen ist wahrscheinlich die Folge einer Attacke des Immunsystems auf körpereigene Eiweiße. Weder die Zielproteine (Autoantigene) noch die genaue Rolle bestimmter Zellpopulationen der weißen Blutkörperchen (der sogenannten Lymphozyten) sind bei dieser Erkrankung bekannt. In diesem Projekt wurde ein Mausmodell entwickelt, bei dem die Auslösung einer systemischen Immunantwort gegen das Eiweiß Glukose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI) zu einer, der RA sehr ähnlichen Gelenkentzündung führt. Es ist bereits bekannt, dass B-Lymphozyten für die Arthritisentstehung in diesem Modell notwendig sind. Wie bei der RA im Menschen ist auch in diesem Mausmodell nicht bekannt, welche Funktion diese Zellen übernehmen. B-Lymphozyten können einerseits Antikörper produzieren und andererseits über die Präsentation von Antigenen an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt sein. Die Aufklärung der Rolle von B-Lymphozyten im Tiermodell kann zur Entwicklung verbesserter B-Zellgerichteter Therapien der RA beitragen.

DAS START-UP FORSCHUNGSPROJEKT

Zur Analyse, welche der Funktionen von B-Lymphozyten tatsächlich für die Entstehung der Arthritis im Tiermodell notwendig sind, benötigt man gentechnisch veränderte Mausstämmen, bei denen ganz gezielt bestimmte Funktionen der B-Zellen aktiviert oder ausgeschaltet sind. Normalerweise wird zur Erzeugung solcher gentechnisch veränderten Mäuse das genetische Material in befruchtete Eizellen eingebracht, die dann in eine scheinträchtige Ammenmutter implantiert werden. Dieses Verfahren ist sehr zeit- und kostenintensiv. Da alle Zellen des Immunsystems aus dem Knochenmark entstehen und nur Zellen des Immunsystems gentechnisch verändert werden sollen, wird das Knochenmark normaler Mäuse durch gentechnisch verändertes Knochenmark ersetzt. Aus diesem transplantierten, gentechnisch veränderten Knochenmark gehen dann die Immunzellen mit den gewünschten Eigenschaften hervor. Dieses Verfahren hat gegenüber den herkömmlichen Methoden den Vorteil, dass es viel schneller und damit zeit- und kostensparend ist. Die Einschleusung des genetischen Materials in das Knochenmark soll über rekombinante (mittels gentechnischer Verfahren in vitro neu zusammengesetzter) Retroviren erfolgen. Daraus leitet sich auch die Bezeichnung (Retroviral transgen = Retrogen) dieser Methode ab.

11

Dieses Verfahren ist bislang noch nicht für die Manipulation von B-Lymphozyten, sondern ausschließlich für die Antigenrezeptoren von T-Lymphozyten verwendet worden. Ziel des Projektes ist es daher, weltweit erstmals diese Methode für die Erstellung B-Zell-retrogener Mäuse zu verwenden. Um den Beweis zu erbringen, dass es prinzipiell möglich ist, B-Zell-retrogener Mäuse zu generieren, werden zur Zeit retrogener Mäuse erzeugt, die gezielt so manipuliert wurden, dass sie Antikörper gegen ein für T-Zellen charakteristisches Oberflächenmolekül (CD4) bilden. Es ist zu erwarten, dass in diesen Mäusen die T-Zellen, welche dieses Oberflächenmolekül tragen, eliminiert oder in verminderter Anzahl vorhanden sind. Im zweiten Schritt werden die B-Zell-retrogener Mäuse mit bereits existierenden B-Zell-transgenen Mäusen verglichen, um Vor- und Nachteile dieser Methode zu evaluieren. Das langfristige Ziel ist die Generierung G6PI-spezifischer B-Zell-retrogener Mäuse, die entweder auf ihren B-Zellen nur einen G6PI-spezifischen B-Zell-Rezeptor tragen oder für dasselbe Antigen charakteristische Immunglobuline produzieren, um so die Funktion von B-Lymphozyten bei der G6PI-induzierten Arthritis detailliert aufzuklären.

Während der Projektlaufzeit konnten die komplexen zellbiologischen Methoden bis hin zur Rekonstitution von Mäusen mit gentechnisch verändertem Knochenmark erfolgreich etabliert werden. Weiterhin wurden die aufwändigen molekularbiologischen Arbeiten zur Herstellung der Konstrukte der B-Zell-Rezeptoren für die oben geschilderten proof-of-principle-Experimente abgeschlossen, so dass bereits mit den ersten Tierexperimenten begonnen werden konnte. Vor Kurzem haben die molekularbiologischen Arbeiten zur Erzeugung G6PI-spezifischer B-Zell-retrogener Mäuse begonnen.

Diese Arbeiten werden im Rahmen des von der DFG geförderten Projektes »Pathogenetische und protektive Funktionen von B-Lymphozyten bei G6PI induzierter Arthritis / KA 755/5-1« weitergeführt. Die Start-Up Förderung hat die Etablierung einer komplett neuen Technologie ermöglicht, ohne die die Beantragung einer DFG Anschlussfinanzierung wenig aussichtsreich gewesen wäre.

Abbildung

A) transgen

Bei der konventionellen Erzeugung gentechnisch veränderter Mäuse wird das gewünschte genetische Material in eine befruchtete Eizelle eingebracht und diese anschließend in eine scheinträchtige Amme implantiert. Die Nachkommen dieser Amme, die nach 21 Tagen geboren werden, werden dann auf das Vorhandensein der veränderten genetischen Information hin überprüft. Ein oder mehrere Tiere (Kreis) werden dann zur Nachzucht eingesetzt und die Folgen der genetischen Veränderung für die Krankheitsausprägung analysiert.

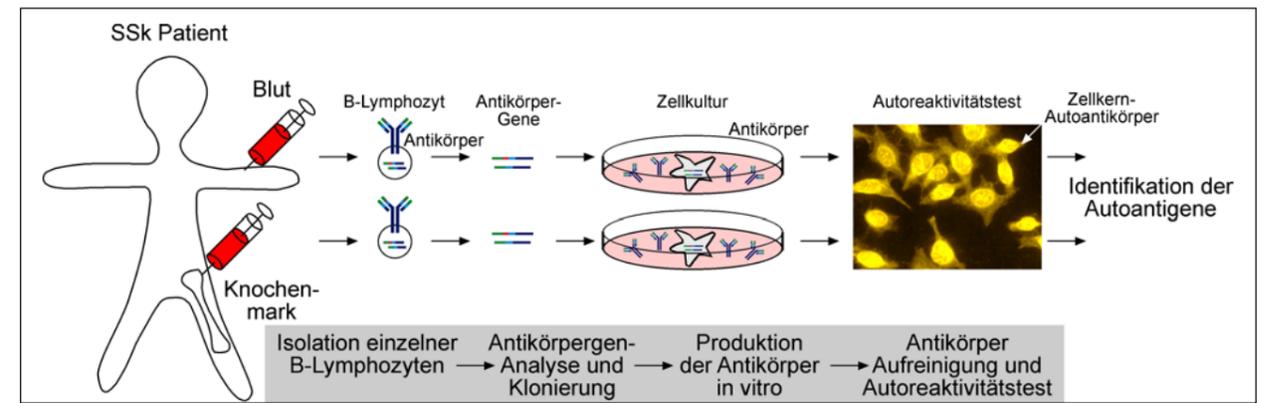
B) retrogen

Beim retroviralen Gentransfer werden normalen Mäusen Knochenmarkszellen entnommen und in der Zellkultur mit Retroviren, die das gewünschte genetische Material enthalten, infiziert. Dieses veränderte Knochenmark wird anschließend in normale Empfängermäuse injiziert und verdrängt deren eigenes Knochenmark. Dieser Prozess nimmt ca. 6 Wochen in Anspruch; nach dieser Zeit können die Tiere analysiert werden.

BÖSER BUBE B-ZELLE?

VON HEDDA WARDEMANN

AUTOANTIKÖRPER IN PATIENTEN MIT SYSTEMISCHER SKLEROSE



In einem gentechnischen Verfahren werden monoklonale Antikörper in vitro hergestellt. Mit Hilfe dieser Antikörper werden Antigene aus einzeln isolierten B-Zellen von Patienten mit Systemischer Sklerose identifiziert.

12



DR. HEDDA WARDEMANN (35)
Post-Doktorandin und Nachwuchsgruppenleiterin im Arbeitsbereich Molekulare Immunologie am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin
wardemann@mpiib-berlin.mpg.de

HINTERGRUND

In diesem Projekt wird nach Autoantikörpern und bisher unbekanntem Autoantigenen bei der systemischen Sklerose (auch Sklerodermie, SSk) gesucht. Antikörper schützen unter normalen Umständen den Körper vor eindringenden Pathogenen (Krankheitserregern). Krankheitserreger weisen Strukturen auf (Antigene), an die sich Antikörper binden können. Autoantikörper greifen körpereigene Strukturen (Autoantigene) an und haben wichtige Funktionen bei der Pathogenese einer Reihe von Autoimmunerkrankungen. Ob sie auch eine Rolle für die Entstehung oder den Verlauf der SSk spielen, ist noch unbekannt. Um herauszufinden, wie viele B-Lymphozyten (B-Zellen) - die einzigen Zellen, die Antikörper bilden können - bei Sklerodermie Autoantikörper herstellen, welche Eigenschaften diese Autoantikörper haben und welche Autoantigene sie binden, werden sie mittels molekularbiologischer Techniken untersucht.

Im Laufe der Beobachtungen wurden mehrere Autoantikörper gefunden. Einer von ihnen konnte mit seinem Antigen identifiziert werden. Zurzeit wird daran gearbeitet, diesen und alle anderen Autoantikörper und ihre Autoantigene zu charakterisieren.

Mit dem Wissen über Zusammenhänge abnormaler B-Zellen und der Autoantikörper, die sie produzieren, besteht die Chance, die Rolle der B-Zellen für die systemische Sklerose besser zu verstehen und langfristig gezielte Therapien zu entwickeln.

DAS START-UP FORSCHUNGSPROJEKT

Die Systemische Sklerodermie (SSk) ist eine seltene entzündlich rheumatische Erkrankung unbekannter Ursache. Sie zählt zu den Kollagenosen und führt bei progressiv systemischem Verlauf zur Verhärtung des Bindegewebes der Haut. In der diffusen Form betrifft sie auch die inneren Organe und Gefäße. Neben verschiedenen klinischen Symptomen ist der Nachweis von spezifischen Autoantikörpern ein wesentlicher Teil der Diagnostik.

Ziel der Forschung ist es, die in Sklerodermie-Patienten entstehenden Autoantikörper zu charakterisieren und zu verstehen, welche Autoantigene in den Organen der Patienten von den Autoantikörpern angegriffen werden. Um eine genaue molekulare und funktionale Charakterisierung der beteiligten Autoantikörper durchzuführen, werden sie im Labor mit Hilfe einer gentechnischen Methode in großen Mengen hergestellt.

Im Rahmen des Projektes wurden bisher über 100 Antikörper aus IgG-positiven B-Gedächtniszellen (IgG = Immunglobulinklasse G) von 3 Patienten mit SSk produziert. Im Vergleich zu Antikörpern, die aus gesunden Kontrollpersonen isoliert wurden, zeigte die molekulare Analyse keine wesentlichen Unterschiede beim genetischen Aufbau der Antikörper-Gene. Daraus folgt, dass das autoreaktive Verhalten der Antikörper bei SSk nicht durch

eine »fehlerhafte« Zusammensetzung ihrer Gene während der frühen Entwicklung der B-Zellen hervorgerufen wird.

Bei der weiteren Untersuchung der Antikörper aus IgG-positiven B-Zellen wurde eine Verschiebung innerhalb der vier IgG-Antikörper-Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) unterschieden, die durch ihre Struktur zu IgG2 gemessen sowie eine erhöhte Anzahl somatischer Mutationen. IgG2 steht im Zusammenhang mit der Aktivierung von B-Zellen durch Polysaccharid-Antigene im Rahmen bakterieller Infektionen. Daraus wird geschlossen, dass das autoreaktive Verhalten der Antikörper bei SSk bei der Aktivierung von B-Zellen durch Antigene beeinflusst ist.

Um Ziel-Autoantigene zu identifizieren, werden die vervielfachten SSk-Antikörper in vitro produziert und jeder Antikörper verschiedenen Autoreaktivitäts-Tests unterzogen. Bisher wurde ein autoreaktiver Antikörper identifiziert, der ein spezifisches Zellkern-Autoantigen erkennt. Dabei handelt es sich nicht um eines der bereits bekannten Autoantigene.

Die weiteren Analysen zielen nun darauf ab, dieses Autoantigen zu identifizieren und die Interaktion des Autoantikörpers mit dem Autoantigen zu untersuchen. Außerdem geht auch die Suche nach neuen Autoantigenen weiter, indem alle Antikörper auf Reaktivität mit verschiedenen Geweben getestet werden. Weiterhin wurde damit begonnen, Antikörper aus Knochenmark-Plasmazellen von SSk-Patienten zu klonieren. Diese langlebigen Zellen sondern Antikörper aktiv ins Blut ab. Sie könnten daher eine besondere Rolle in der SSk-Pathogenese spielen.

Langfristig sollen unsere Untersuchungen dahin führen, die Rolle von B-Zellen und Autoantikörpern in der SSk besser zu verstehen, um darauf aufbauend spezifische und nachhaltige Therapien zu entwickeln. Die vorläufigen Daten zeigen, dass mit Hilfe der gentechnisch produzierten Antikörper Autoantigene aus B-Zellen von SSk-Patienten isoliert werden können.

Die Folgefinanzierung ist derzeit durch Gelder der Max-Planck Gesellschaft gesichert, ein Antrag zur weiteren Finanzierung durch die DFG ist in Arbeit.

13

METALL IN DEN GELENKEN

VON JOCHEN ZWERINA

BEOBSACHTUNGSSTUDIE ZU PATIENTEN MIT ERBLICHER HÄMOCHROMATOSE

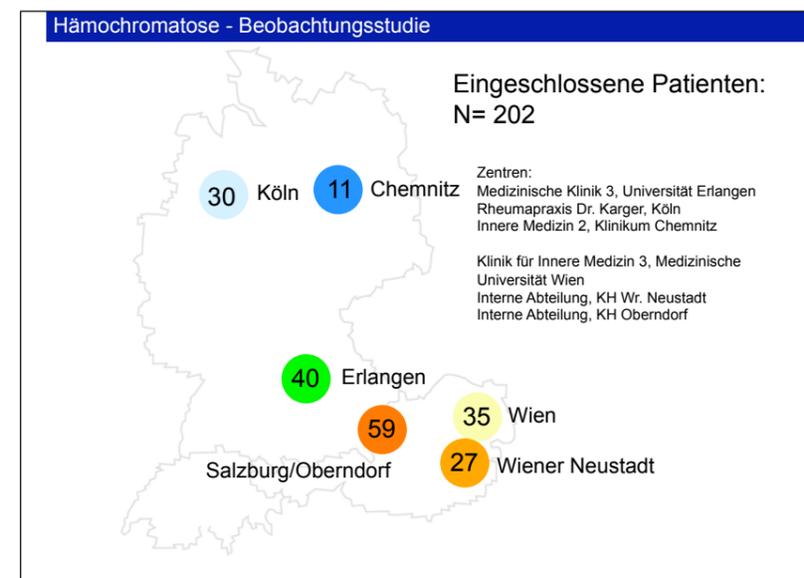
HINTERGRUND



DR. JOCHEN ZWERINA (30)
Assistenzarzt an der 3. Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
jochen.zwerina@med3.imed.uni-erlangen.de

Menschen mit einer Hämochromatose (Eisenspeicherkrankheit, von griech. haima = Blut, chroma = Farbe) können überschüssiges Eisen nicht wieder ausscheiden. Stattdessen wird es in Leber, Pankreas und Herz abgelagert und führt dort zu Organstörungen. Auch die Gelenke können betroffen sein (Arthropathie) und im weiteren Verlauf irreversibel geschädigt werden. Die Hämochromatose ist eine erbliche Stoffwechselerkrankung und meist sind Männer öfter und schwerer betroffen als Frauen. In Deutschland leidet etwa jeder 400. Erwachsene an dieser Erkrankung, die oft erst im 40. bis 50. Lebensjahr in Erscheinung tritt. Eine rechtzeitige Diagnose vor dem Auftreten schwerer Organschäden und das Einleiten einer Therapie normalisiert die Lebenserwartung und verhindert ein Organversagen. Dabei helfen regelmäßige Aderlässe, das überschüssige Eisen über die roten Blutkörperchen aus dem Körper zu schleusen.

Bislang orientiert sich der Arzt bei der Diagnose einer Arthropathie bei Hämochromatose am klinischen und radiologischen Befund einer Gelenkentzündung und zieht zur Differentialdiagnostik bestimmte Blutparameter (Eisenwert) hinzu. Die Arthropathie konzentriert sich häufig auf Gelenke der Hand und Hüfte sowie auf Knie- und Sprunggelenke. Typischerweise weisen die Fingergrundgelenke MCP 2 und 3 leichte, knöcherne Schwellungen auf. Bislang konnte die Diagnose nur über diese Hinweise getroffen werden, genaue Kriterien fehlten.



Beteiligte Studienzentren mit Angabe der jeweiligen Anzahl eingeschlossener Patienten

DAS START-UP FORSCHUNGSPROJEKT

Die 'Hemochromatosis Osteoarthritis Registry' (THOR)-Studie widmet sich in ihren Fragestellungen der Arthropathie bei Hämochromatose und soll herausfinden:

- 1) Welche Kriterien müssen für das Vorliegen einer Arthropathie bei Hämochromatose erfüllt sein und wie unterscheidet sie sich damit von anderen Gelenkerkrankungen?
- 2) Welche Hämochromatose-Patienten entwickeln eine Gelenkbeteiligung?
- 3) Wie ist Schwere und Verlauf der Arthropathie?

Die Studie schließt 202 Patienten mit erblicher Hämochromatose aus sechs Zentren in Deutschland und Österreich ein. Die Rekrutierung erfolgte unabhängig davon, ob die Patienten eine Gelenkbeteiligung vorwiesen.

Neben einer detaillierten klinischen Untersuchung wurden Blutproben genommen sowie Knochendichtemessungen und Röntgenuntersuchungen durchgeführt. In fünf Jahren sollen die Patienten erneut untersucht werden, um den Verlauf der Erkrankung zu dokumentieren. Erwartungsgemäß sind mehr Männer als Frauen (128 Männer gegenüber 74 Frauen) in die Studie eingeschlossen. Im Mittel waren die Studienteilnehmer 55 Jahre alt, die Diagnose Hämochromatose wurde im Mittel im Alter von 49 Jahren gestellt.

Erste Auswertungen zeigen eine hohe Zahl von Patienten mit Gelenkbeschwerden: Etwa zwei Drittel der Studienteilnehmer weisen eine Arthropathie auf. Bei ihnen war das Vorliegen der Gelenkbeteiligung häufig der erste Hinweis für die Diagnose einer Hämochromatose. Momentan werden die umfangreichen Labor- und Röntgenbefunde statistisch ausgewertet und die Daten voraussichtlich Anfang 2009 veröffentlicht.

Durch die Studie werden genauere Aussagen über die Häufigkeit, Schwere und Verlauf der Hämochromatose-Arthropathie möglich sein. Mit Hilfe der erhobenen Daten lassen sich erstmals prädiktive Parameter bestimmen, die eine bessere und frühzeitige Diagnose dieser Erkrankung ermöglichen. Folgeschäden an Gelenken können so vermieden werden.

Die Ergebnisse dieser Start-Up Förderung sind Grundlage für einen weiterführenden Förderantrag bei der DFG.

IMPRESSUM

Deutsche Gesellschaft für
Rheumatologie e.V., Berlin
September 2008
www.dgrh.de

