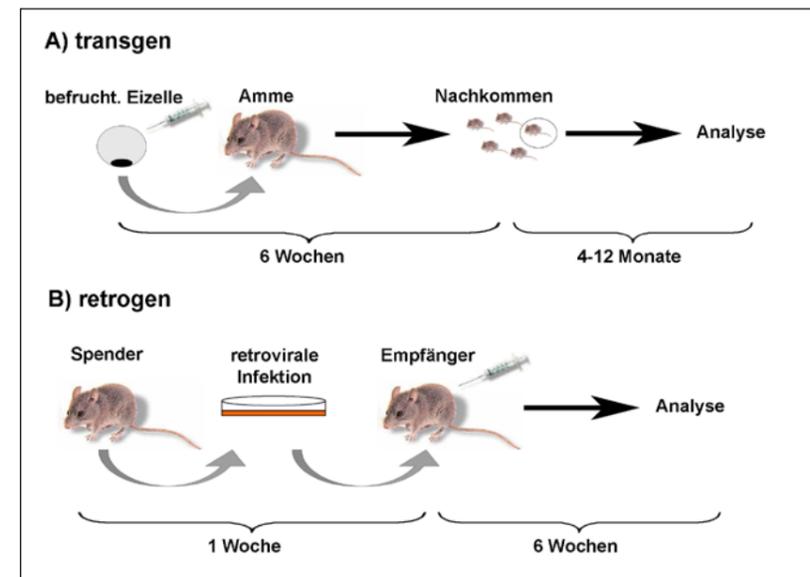


AVANTGARDE- MAUS-MODELL

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.

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.

11