

5 Diskussion

Entsprechend der Zwei-Phasen-Struktur dieser Arbeit fasse ich meine Ergebnisse wie folgt zusammen und beurteile sie im übergeordneten Zusammenhang einer künftig zu entwickelnden IL-4 basierten Gentherapie.

5.1. Entwicklung eines direkten Sandwich-ELISA zur Detektion von caninem IL-4

Um die Expression von IL-4 schnell und in einer großen Anzahl von Proben nachweisen zu können, ist der langwierige T-Zellblasten-Stimulations-Bioassay, der bei den Vorarbeiten zu dieser Untersuchung bisher als einziges Nachweissystem von caninem IL-4 zur Verfügung stand, zu aufwendig, weil mit radioaktivem Material gearbeitet werden muß. Außerdem wird ein Beta-Counter zur Messung der Radioaktivität benötigt. Da aber andererseits ein ELISA für canines IL-4 zum damaligen Zeitpunkt kommerziell noch nicht verfügbar war, mußte er von uns entwickelt werden.

Dazu wurde als erstes die Immunisierung von Kaninchen mit rcIL-4 bei den Sequence Laboratories in Göttingen in Auftrag gegeben, um polyklonale Antikörper gegen rcIL-4 zu gewinnen. Diese wurden Protein A gereinigt und ihre Konzentration wurde mittels der Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Diese gereinigten polyklonalen Antikörper dienen als Fangantikörper für den ELISA.

Wenn der Standard, bzw. die Proben nun auf die ELISA-Platte aufgetragen werden, braucht man einen zweiten Antikörper gegen rcIL-4. Am besten geeignet sind monoklonale Antikörper, da sie monospezifisch sind.

Allerdings bedurfte es mehrerer Versuche und schließlich der Unterstützung durch Dr. A. Hoffmann und seiner Mitarbeiter vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen, die Hybridomazellklone in erforderlichem Umfang anzuzüchten.

Ferner stellte sich das Problem, daß mit beiden Detektionsantikörpern die gewünschte Sensitivität des ELISA im Vergleich mit kommerziell erhältlichen Kits, z.B. der human IL-4-Ready-Set-Co[®] von eBioscience der IL-4-Konzentrationen bis zu 2 pg/ml detektiert, nicht erreicht werden konnte.

Um die Sensitivität des ELISA zu erhöhen, wurden zahlreiche Versuche unternommen. Zuerst wurde der Einfluß der Konzentration an Beschichtungsantikörpern (polyklonale Rb-anti-IL-4)

und verschiedener Beschichtungspuffer (PBS, TBS und Carbonatpuffer) auf die Messergebnisse genauer untersucht. Eine Konzentration von 120 ng/Vertiefung an Fangantikörpern, verdünnt mit dem Carbonatpuffer, zeigte sich am geeignetsten. Die Sensitivität stieg dadurch auf 60 ng/ml = 3 ng Gesamtprotein. Daraufhin wurde das gängige Verstärkersystem Biotin/Streptavidin eingesetzt.

Bei einer Verdünnung von 1:5000 konnten die besten Extinktionen mit dem biotinkoppelten Rb-anti-Maus-Antikörper (SIGMA, Saint Louis) erzielt werden. Das Streptavidin-Peroxidasekonjugat (BD Pharmingen, San Diego) wurde laut Herstellerempfehlung in einer Verdünnung von 1:4000 verwandt.

Die Sensitivität konnte daraufhin von 60 ng/ml = 3 ng Gesamtproteinmenge auf 0,1 ng/ml = 5 pg Gesamtproteinmenge erhöht werden.

Durch die Entwicklung eines solchen ELISA wird es in Zukunft möglich sein, auch geringste Mengen an IL-4 nachzuweisen. Das eröffnet der RA-Forschung neue Perspektiven.

5.2. Transfektion

Ausgangspunkt der zweiten Untersuchungsphase war die Wahl der Zielzellen für eine möglichst effiziente Transfektion.. Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß sich isolierte synoviale Fibroblasten sowohl zur viralen als auch zur nonviralen Transfektion *ex vivo* eignen (BANDARA et al., 1992; MULLER-LADNER et al., 1997). Als ebenso geeignet für einen Gentransfer werden artikuläre Chondrozyten genannt (KANG et al., 1997a; MADRY u. TRIPPEL, 2000). Ebenso wird von der guten Transfektionseffizienz und einer relativ einfachen Inkulturnahme der Chondrozyten berichtet (NIXON et al., 2000). Die Entscheidung fiel für die Knorpelzellen, da es einfacher war, eine größere Menge an Ausgangsmaterial von hyalinem Knorpel zu beschaffen. Zudem war die Möglichkeit gegeben, die einschlägigen Erfahrungen des Kooperationspartners, PD Dr. Michael Sittinger im Umgang mit Knorpelmaterial und Knorpelzellgewinnung zu nutzen.

Die Arbeitsgruppe hat in den letzten Jahren ein *In-vitro*-Modell , das so genannte „*In-vitro*-Pannusmodell“ etabliert (SCHULTZ et al., 1997; SMOLIAN et al., 2001). Dieses Modell besteht aus einer 3D-Matrix, in der eine Co-Kultur aus humanen Chondrozyten und Synovialfibroblasten kultiviert, und somit die physiologisch spezifische Mikroumgebung simuliert wird. Dieses *In-vitro*-Testsystem ermöglicht die Analyse von Wirkungen verschiedener biologischer Substanzen

wie Zytokinen, Anti-Zytokinen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Hemmstoffen proteolytischer Enzyme, z.B. auch bei rheumatoiden Erkrankungen.

Auf diesem Ansatz fußen neuere Überlegungen unseres Institutes, dieses Kulturmodell zu übernehmen, da es zahlreiche Möglichkeiten eröffnet, die Daten aus dem Tiermodell u.a. der RA zu ergänzen und in gentherapeutischer Hinsicht geeignete Vektoren zu erproben (HÄUPTL et al., 2004; SCHULTZ et al., 1997; SMOLIAN et al., 2001).

Bisher war eine canine Knorpelzelllinie kommerziell nicht erhältlich. Daher mußte eine Primärkultur aus caninem hyalinen Knorpel im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden. Mit dem Bioplat aus den Condylen des Kniegelenkes wurde nach obengenanntem Protokoll verfahren, wobei die Knorpelzellen durch enzymatischen Verdau einzeln gewonnen werden konnten. Bei der von mir verwandten Kultivierung der Zellen handelte es sich um eine Monolayerkultur, in der die Zellen nur in einer Zellschicht auf dem Kulturflaschenboden wachsen. Dabei verloren sie allerdings ihren kugeligen Phänotyp, dedifferenzierten, wurden fibroblastenähnlich, was aber für die weitere Kultivierung und Transfektion kein Hindernis darstellte (ELIMA u. VUORIO, 1989; FINER et al., 1985).

Parallel zu allen Versuchen mit den Knorpelzellen mußte zur Kontrolle eine Vergleichskultur mitgeführt werden. Es wurde dazu eine CHO-Zelllinie (CHO-K1) ausgewählt, die schnell wachsend ist, eine gute Transfektionseffizienz aufweist und für die Transfektion mit LipofectAMINE-PLUS™ bereits ein Standard ist.

Als Vehikel für den Gentransfer in die CHO-, bzw. Knorpelzellen wurden zwei Plasmide eingesetzt:

- 1.) pEGFP (Clontech), um die Transfektion fluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können, und
- 2.) pcDNA3.1-cIL-4 (invitrogen, WONDIMU et al., 2001), der mittels Restriktionsklonierung hergestellte Expressionsklon für eukaryotische Zellen.

Gestützt auf diese Arbeitsergebnisse, war es nun erstmals möglich, die verschiedenen Transfektionen caniner Knorpelzellen durch den standardisierten direkten Doppel-Sandwich-ELISA mit Verstärkersystem Biotin/Streptavidin zu vergleichen.

Parallel zu der Messung des exprimierten IL-4 mit dem ELISA wurden die transfizierten Zellen mit dem TriStar-Reagenz lysiert und die mRNA mittels der RT-PCR nachgewiesen.

5.3. Gentherapeutischer Ansatz im Zusammenhang mit der RA

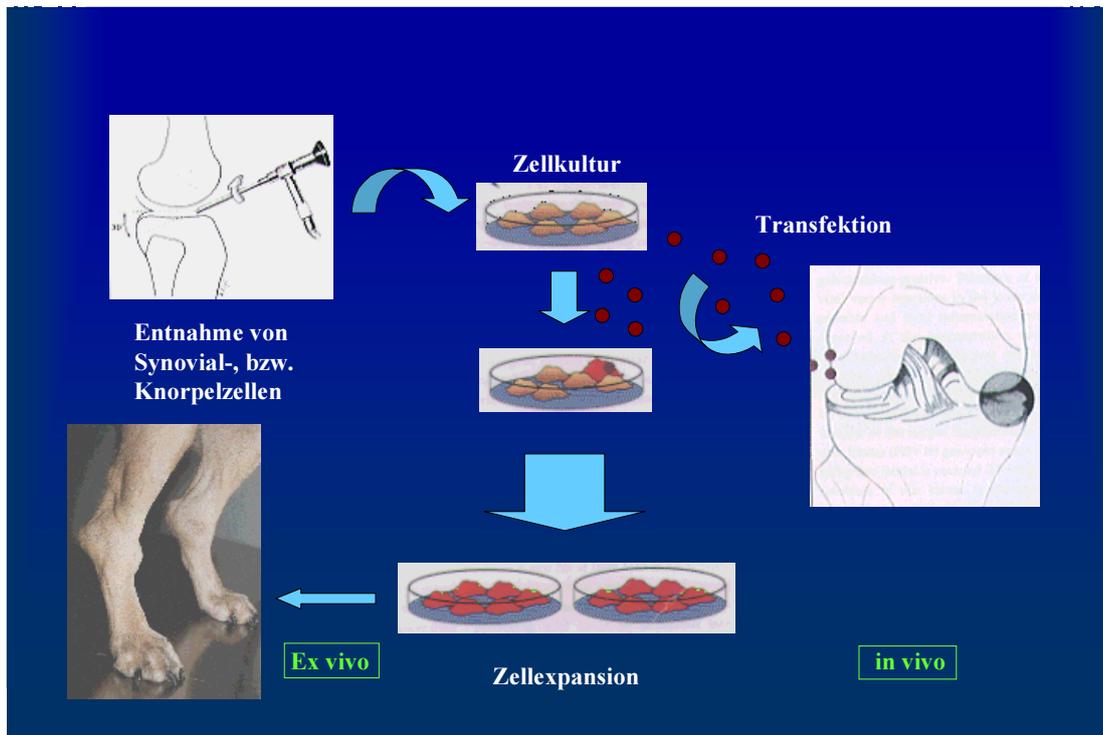


Abb.27: Quelle: Immunology Today, Vol.19, No.9, 1998

Die Idee des therapeutischen Gentransfers und entsprechende wissenschaftliche Bemühung existieren seit nunmehr drei Jahrzehnten (ANDERSON, 1992). Man versteht darunter die Integration exogener DNA, die potentiell therapeutische Gene trägt, in die chromosomale DNA geeigneter Zielzellen.

Erste Therapieveruche konzentrierten sich auf monogenetische Erberkrankungen, aber im Verlauf der grundlagenorientierten Forschung zeigte sich bald, daß sich Gentherapie über die klassischen Erberkrankungen hinaus auch bei der Behandlung von nicht genetischen Erkrankungen einsetzen läßt.

Die Therapie von Gelenkknorpelläsionen entzündlicher Natur ist eine derzeit noch unzureichend bewältigte Herausforderung innerhalb der Orthopädie. Hyaliner Knorpel hat nur eine geringe Potenz zur Regeneration. Die therapeutische Einflußnahme auf die mediatorabhängigen Regelkreisläufe im Gelenk erfordert eine geeignete Bereitstellung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in dem betroffenen Gelenk. Allerdings sind diese Mediatoren Proteine und deshalb auf dem oralen Wege nicht applizierbar. Jedoch unterliegen derartige Proteine auch bei parenteraler Gabe oder direkter Injektion einer kurzen biologischen Halbwertszeit, so daß ein

Transfer von Genen, die für einen bestimmten Mediator, hier IL-4, kodieren, direkt an den Ort des Geschehens eine elegante Alternative bietet (KANG et al., 1997b). Nach der zellulären Aufnahme und Expression der Gene können hohe Spiegel von Mediatorproteinen direkt im Bereich des entzündeten Gelenkes produziert und freigesetzt werden. Gentherapie kann als eine neue pharmakokinetische Form der Medikamentenapplikation verstanden werden.

Der Erfolg dieser gentechnischen Bemühungen hängt von der Effizienz der Genübertragung in die entsprechenden Zielzellen ab. Für diese Zwecke sind spezielle Transportvehikel, die sog. Vektoren, entwickelt worden. Vektoren erlauben die Aufnahme von fremdgenetischem Material in Zellen. Allem Anschein nach sind Viren besonders effektive Vektoren. Trotz gewisser Risiken (THOMAS et al., 2003) konnte in verschiedenen Tiermodellen der RA durch lokale Applikation der IL-4-cDNA die Knorpel- und Knochenzerstörung vermindert werden (VAN DE LOO et al., 2002; WATANABE et al., 2000).

Zur Gentranslokation sind bisher vor allem Retro-, Adeno- und Herpesviren genutzt worden. Der Einsatz dieser Vektoren beschränkt sich neuerdings auf den Gentransfer *ex vivo*, seit bei systemischer Anwendung erhebliche Nebenwirkungen im Organismus beobachtet worden sind, wie z.B. lokale Entzündungsreaktionen bei der Behandlung der RA des Pferdes mit rekombinantem Adenovirus (FRISBIE u. MC ILWRAITH, 1999).

Die Hemmung der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, TNF- α) durch Gentransfer des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-Ra) ist bereits in klinischen Studien angelaufen und hat teilweise positive Ergebnisse erbracht (EVANS u. ROBBINS, 1996; EVANS et al., 1999; EVANS, 2004). Auch die Übertragung des TNF- α -Rezeptors p75r in Mäuse mit kollageninduzierter Arthritis (CIA) brachte Erfolge (MAGEED et al., 1998).

Auf der anderen Seite stehen die anti-inflammatorischen Zytokine, z.B. IL-10 und IL-4, als potentielle genterapeutische Gene bzw. Proteine.

Untersuchungen in „severe combined immunodeficiency disorders“ (SCID)-Maus-Modellen ergaben, daß die Expression von IL-10 in Synovialfibroblasten die Entzündung bei der RA milderten (MULLER-LADNER et al., 1999).

Der erste Versuch, eine direkte Expression von IL-4 in Gelenken von Mäusen mit kollageninduzierter Arthritis durch einen Adenovirusvektor zu bekommen, führte histologisch zur Verringerung des Knorpelzellsterbens und zur Reduzierung der Knorpelerosion in den behandelten Gelenken, denn die Proteoglycansynthese stieg, und es kam zur Reduktion des

stromelysinabhängigen Proteoglycanaufspaltungsepitop VDIPEN; die Produktion von IL-1 β der arthritischen Synovialmembran und die Produktion von TNF- α nahmen ebenfalls signifikant ab (LUBBERTS et al., 1999).

Der bisher eindrucksvollste und vielversprechenste Versuch war die direkte Expression von IL-4 in Gelenken von Mäusen mit kollageninduzierter Arthritis ebenfalls durch einen Adenovirusvektor (Ad-mIL-4). Sie führte nicht nur zu der makroskopisch sichtbaren Reduzierung der Entzündungssymptome und der Knochenerosion, sondern es kam zusätzlich zu dem sogenannten Kollateraleffekt, daß die Schwere der Arthritis auch in den unbehandelten vorderen Gliedmaßengelenken abnahm, wenn der IL-4 tragende Adenovirus in die hinteren Gliedmaßengelenke eingebracht wurde. Eine systemische Gabe von Ad-mIL-4 führte in der Frühphase der Arthritiden ebenfalls zur Reduzierung der Schwere der Erkrankung (KIM et al., 2000).

Alternativ zum viralvektoriellen Gentransfer besteht die Möglichkeit, therapeutische Gene unter Verwendung von nichtviralen Vektorsystemen in die jeweiligen Zellen zu transportieren. Die einfachste Form eines derartigen Vektors ist die Plasmid-DNA-Form des entsprechenden therapeutischen Gens. Um die Membrangängigkeit eines Plasmides zu erhöhen, kann es in Liposomen eingebunden werden (SINGHALA u. HUANG, 1994).

Ein lokal begrenzter Gentransfer im erkrankten Gelenk ist im Sinne der Konzentration der Genprodukte, bei Vermeidung systemischer Nebenwirkungen, vorteilhaft. Zusätzlich könnten sich die Genprodukte über die Synovialflüssigkeit im gesamten Gelenk verteilen und eine effektive Wirksamkeit in allen Kompartements entfalten.

Therapeutische Gene können direkt (*in vivo*) oder indirekt (*ex vivo*) in die jeweiligen Zielzellen eingeschleust werden. Beim direkten Gentransfer werden die Vektoren direkt in den Körper zu den entsprechenden Zielzellen geschleust. Beim indirekten Gentransfer werden die Zielzellen aus dem Gewebeverband herausgelöst und unter Zellkulturbedingungen, *in vitro*, transduziert und anschließend in den Gewebeverband reintegriert.

Der *Ex-vivo*-Gentransfer ist technisch aufwendiger, ermöglicht aber ein höheres Maß an Sicherheit, da Vektoren hierbei nicht in den Körper gelangen. Für diese Möglichkeit haben wir uns entschieden.

5.4. Vorarbeiten im IMB

An unserem Institut wurde unter anderem das Zytokinprofil in der Synovia und im Blut von Hunden untersucht, die an rheumatoider Arthritis erkrankt waren (WONDIMU et al., 2001), und hervorstechendes Ergebnis war, daß unter anderem das antiinflammatorisch wirkende Zytokin Interleukin-4 nur in geringsten Mengen nachweisbar war. Wie aus anderen Studien ersichtlich wird, bewirkt eine direkte Applikation von IL-4 in erkrankte Gelenke eine Linderung der Symptome und einen Stop der Erosionsvorgänge (LUBBERTS et al., 1999; KIM et al., 2000). Da zu diesem Zeitpunkt das Gen von IL-4 aus Hunden noch nicht verfügbar war, wurde es von WONDIMU et al. kloniert (2001).

Um eine Gentherapie gegen die rheumatoide Arthritis des Hundes zu entwickeln, eignete sich das von uns klonierte Zytokin IL-4 als Mediator.

In diesem Zusammenhang soll diese Arbeit einen Beitrag zur Entwicklung spezifischer Behandlungsmöglichkeiten der RA liefern. Die angestrebte Etablierung der Gentherapie gegen RA in der Kleintiermedizin, insbesondere beim Hund, könnte der RA-Forschung ein neues Erprobungsfeld liefern, das die verschiedenen, zunächst noch recht unbefriedigenden Ansätze mit Versuchstieren sinnvoll ergänzen kann. Schumacher verglich in seinen Studien die rheumatoide Arthritis des Hundes mit der des Menschen und stellte fest, dass sich die Erkrankung histologisch und immunologisch bei beiden Spezies fast identisch darstellt. Der angestrebte Erkenntnisgewinn könnte daher auch dazu beitragen, die zielgerechte Behandlung der RA beim Menschen voranzubringen.