

SCHLUSSBERICHT ZU DEM FORTSETZUNGSANTRAG
„ENTSTEHUNG VON AUTOIMMUNKRANKHEIT NACH EXPOSITION
GEGENÜBER QUECKSILBER BZW. GOLDSALZEN: CHARAKTERISIERUNG
DER AN DEN T-ZELLREAKTIONEN BETEILIGTEN SELBSTPROTEINE"
(KENNZEICHEN OI KD 89030)

A.I. Aufgabenstellung

A.I.1. Durch Quecksilber (Hg) induzierbare sklerodermieartige Autoimmunkrankheit bei der Maus

Mit Hilfe von CD4⁺ T-Zellhybridomen sollten folgende Fragen untersucht werden:

- (1) Welche Antigene induzieren und unterhalten die durch Quecksilber induzierbare, T-zellabhängige Autoimmunkrankheit ?*
- (2) Werden die entsprechenden Antigene bereits normalerweise von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert oder erst nach Zellstreß?*
- (3) Welches sind intrazelluläre Primärläsionen unter dem Einfluß von Quecksilber?*
- (4) Welche Epitope des Kernproteins Fibrillarin werden von „Hg-spezifischen“ und welche von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen erkannt?*
- (5) Läßt sich das für die o. g. Frage erforderliche Maus-Fibrillarin rekombinant herstellen, wodurch die mühsame, aufwendige Isolierung dieses Proteins aus Mauszellen überflüssig würde?*
- (6) Reagieren diejenigen Mausstämme, die eine genetische Prädisposition hinsichtlich der durch Quecksilber induzierbaren Autoimmunkrankheit aufweisen, vorzugsweise mit ihren Th2-Zellen, während die resistenten Stämme vorzugsweise mit ihren Th1-Zellen reagieren?*
- (7) Gibt es Unterschiede in der Toxikokinetik des Hg Stämmen, die für die Hg-induzierte Autoimmunkrankheit empfänglich sind, und denen, die hierfür resistent sind?*

A.I.2. Proteinveränderungen durch Gold(III), den reaktiven Metaboliten des Gold(I)

- (8) *Gibt es Unterschiede in der Toxikokinetik von Gold zwischen Stämmen, die für die Gold-induzierte Autoimmunkrankheit empfänglich sind, und den Stämmen, die hierfür resistent sind?*
- (9) *Läßt sich die Bildung von Gold(III) unter dem Einfluß einer Mischung aus Myeloperoxidase und H_2O , nachweisen, aus der bekanntlich das starke Oxidationsmittel Hypochlorit (HOCl) oder Bleiche entsteht.*
- (10) *Läßt sich nachweisen, daß die Biooxidation von Gold(I) zu Gold(III) in Makrophagen stattfindet?*
- (11) *Welches sind die durch Gold(III) veränderten (Selbst-)Proteine bzw. Peptide?*
- (12) *Induziert Gold(III) die Präsentation kryptischer Peptide auf APZ?*
- (13) *Gibt es Kreuzreaktionen „Gold(III)-spezifischen“ T-Zellen mit anderen sensibilisierenden Metallionen?*

A.II. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die im Fortsetzungsantrag beschriebenen Experimente waren während der Förderperiode auch Bestandteil des Forschungsplanes des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, so daß ihrer Durchführung alle Hilfe seitens des Instituts angedeihen konnte.

A.III. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben konnte im großen und ganzen wie geplant durchgeführt werden. In einigen Details jedoch kam es zu Abweichungen: So kam es infolge Ausscheidens (aufgrund des Hochschulrahmengesetzes) der wichtigen Mitarbeiterin, Frau Dr. Kubicka-Muranyi, zu großen Verzögerungen, insbesondere was die Herstellung und Analyse von $CD4^+$ T-Zellhybridomen mit Spezifität für Fibrillarin betrifft. Ferner gelang es uns bisher nicht, $CD4^+$ T-Zellhybridome mit „Spezifität für Gold(III)“ herzustellen.

A.IV. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

In den seltenen Fällen systemischer Autoimmunkrankheiten, wie z.B. des SLE und der Sklerodermie, in denen ein ätiologisches Agens identifiziert werden konnte, war dies immer eine Chemikalie. Die einzigen Tiermodelle, in denen sich eine systemische Autoimmunkrankheit durch Verabreichung eines chemischen Fremdstoffes induzieren läßt, sind die systemischen Autoimmunkrankheiten, die bei genetisch empfänglichen Ratten- und Mäusestämmen nach Gabe von *Quecksilberverbindungen* bzw. *Gold(I)*-Antirheumatika entstehen. Hierzu wurden von der eigenen Gruppe wichtige Vorarbeiten geleistet.

A.IV.1. Vorarbeiten zur experimentellen Induktion einer systemischen Autoimmunkrankheit durch Quecksilber

- Das Kernprotein *Fibrillarin* wurde als herausragendes Ziel der durch Quecksilber induzierbaren Autoimmunkrankheit in H-2^s-Mäusen identifiziert. Sowohl spezifische Autoantikörper als auch CD4⁺ T-Zellen gegen dieses Kernprotein wurden nachgewiesen.

Interessanterweise bilden auch Patienten mit idiopathischer Sklerodermie Autoantikörper gegen Fibrillarin; die Feinspezifität dieser Autoantikörper ist identisch mit der im Quecksilbermodell bei der Maus beobachteten [Lübben et al., 1994].

- Aus den Vorarbeiten war bekannt, daß die für die quecksilberinduzierte Autoimmunkrankheit empfänglichen H-2^s-Mäuse vorzugsweise mit Th2-Zellen auf die Quecksilberbelastung reagierten. Nicht nachgewiesen war die Vermutung, daß die resistenten H-2 - Stämme dagegen mit einer präferenziellen Th1-Antwort reagieren.

- Über intrazelluläre Primärläsionen in der präimmunologischen Phase der quecksilberinduzierten Autoimmunkrankheit war gar nichts bekannt.

A.IV.2. Vorarbeiten zur experimentellen Induktion einer Autoimmunkrankheit durch Gold

- Es ist ein Mausmodell zur Induktion unerwünschter Nebenwirkungen von Gold(I) etabliert worden.
- Dabei wurde entdeckt, daß es unter einer mehrmonatigen Gold(I)-Behandlung im Mausmodell zur *Biooxidation* des Gold(I) zu Gold(III) kommt. Der anatomische Ort, an dem diese Biooxidation stattfindet, war nicht bekannt, aber Makrophagen kamen als Kandidatzellen hierfür in die engere Wahl.
- Es wurde nachgewiesen, daß es in vivo zu spezifischen T-Zellreaktionen gegen den *reaktiven Metaboliten* Gold(III) kommt, nicht aber gegen die nur mäßig proteinreaktive Muttersubstanz Gold(I).
- Es wurden CD4⁺ T-Zellhybridome etabliert, die spezifisch auf Rinder-RNase reagierten, wenn diese mit dem reaktiven Metaboliten *Gold(III) vorbehandelt* worden war. Gegen welche Epitope (Peptide) dieses Proteins die T-Zellen reagierten, war unbekannt.

A.IV.3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Prof. C. Frank *Shaw*, Department of Bioinorganic Chemistry, University of Wisconsin at Milwaukee, USA, der im Jahr 1994 als DFG-Gastprofessor in der Abteilung Immunologie des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene mit an diesem Projekt arbeitete.

- Dr. Kazuo *Takahashi*, Clinic of Dermatology, University of Yokohama, Japan, der im Jahr 1994 als Postdoc an den Experimenten zu Gold(III) mitarbeitete.

- Prof. H. *Kaibacher*, Forschungszentrum der Medizin und Naturwissenschaften an der Universität Tübingen, der sich überlappende Peptide der Rinder-RNase synthetisierte, was es uns ermöglichte, das genaue Peptid (*Epitop*) zu identifizieren, gegen das „Gold(III)-spezifische“ T-Zellen reagieren.

- Dr. P. *Hemmerich*, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena, der in Zusammenarbeit mit Dr. A. von Mikecz, MIU, die cDNA murinen Fibrillarins in Expressionsvektoren klonierte und rekombinantes Fibrillarin in *E. coli* herstellte.

B.I. Darstellung der erzielten Ergebnisse

B.I.1. Zu den unter A.I. aufgeführten Fragen wurden folgende Resultate erzielt:

Quecksilber

- (1) *Welche Antigene induzieren und unterhalten die durch Quecksilber induzierbare, T-zellabhängige Autoimmunkrankheit?* Als herausragendes Zielantigen der Autoimmunantwort wurde das *Fibrillarin* identifiziert, außerdem auch noch, wenngleich in viel geringerem Maße, *Historie*. Ferner wurde gefunden, daß kurz nach Beginn der Quecksilberbelastung eine Vielzahl verschiedener Selbstproteine (*alle*, die untersucht wurden) immunogen gemacht wurden. Diese waren aber nur dann immunogen für die T-Zellen, wenn sie aus quecksilberbelasteten Mäusen präpariert wurden, nicht aus unbelasteten Mäusen. Bei *Fibrillarin* verhielt sich dies anders: Zu Beginn der Quecksilberbelastung war hauptsächlich das mit Quecksilber vorbehandelte *Fibrillarin* immunogen, später dagegen war auch, und zwar besonders, das native *Fibrillarin* Ziel der Autoimmunantwort von T- und B-Zellen.
- (2) *Werden die entsprechenden Antigene bereits normalerweise von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert oder erst nach Zellstreß?* Die Untersuchung dieser Frage mußte dadurch unterbrochen werden, daß Frau Dr. Kubicka-Muranyi das Institut verlassen mußte und außerdem die von ihr hergestellten CD4⁺ T-Zellhybridome mit der Zeit ihre Spezifität verloren. Neue T-Zellhybridome mit Spezifität für *Fibrillarin* sollen hergestellt werden, sobald es gelungen ist, ausreichende Mengen an *rekombinantem Fibrillarin* der Maus zu produzieren.
- (3) *Welches sind intrazelluläre Primärläsionen unter dem Einfluß von Quecksilber?* Ein ganz neuartiger Befund ist, daß es unter Quecksilberbelastung einer humanen Epithelzelllinie (Hep-2) zur *Dislokation* des *Fibrillarins*, das in unbelasteten Zellen ausschließlich im Nukleolus lokalisiert ist, aus dem Nukleolus in das Nukleoplasma kommt. Im Nukleoplasma kolokalisiert das dislozierte *Fibrillarin* mit dem 20S Proteasom (A. von Mikecz et al., unveröffentlichte Ergebnisse), das bekanntlich ein Enzym der Antigenprozessierung für den MHC-Klasse-I Präsentationsweg an T-Zellen darstellt.

- (4) Welche Epitope des Kernproteins Fibrillarin werden von „Hg-spezifischen“ und welche von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen erkannt? Auch diese Frage konnte bis jetzt aus den o.g. Gründen noch nicht beantwortet werden.
- (5) Läßt sich das für die o. g. Frage erforderliche Maus-Fibrillarin rekombinant herstellen, wodurch die mühsame, aufwendige Isolierung dieses Proteins aus Mauszellen überflüssig würde? Die cDNA für Maus-Fibrillarin konnte mittels gerichteter Polymerasekettenreaktion (PCR) in Expressionsvektoren kloniert, rekombinantes Protein in *E. coli* hergestellt und biochemisch reinst aufgereinigt werden (P. Hemmerich, A. von Mikecz, unveröffentlichte Ergebnisse). Zur Zeit wird an der Optimierung der Proteinexpression zwecks Herstellung von rekombinantem Fibrillarin in mg-Mengen gearbeitet.
- (6) Reagieren diejenigen Mausstämme, die eine genetische Prädisposition hinsichtlich der durch Quecksilber induzierbaren Autoimmunkrankheit aufweisen, vorzugsweise mit ihren Th2-Zellen, während die resistenten Stämme vorzugsweise mit ihren Th1-Zellen reagieren? Daß die resistenten H-2^d-Mäuse in der Tat mit einer präferenziellen Th1-Antwort auf eine Quecksilberbelastung reagieren, konnte experimentell bestätigt werden [Doth et al., 1997].
- (7) Gibt es Unterschiede in der Toxikokinetik des Hg zwischen Stämmen, die für die Hg-induzierte Autoimmunkrankheit empfänglich sind, und denen, die hierfür resistent sind? Eine ausführliche Untersuchung der Toxikokinetik von Hg in mehreren Organen verschiedener Maus-Inzuchtstämme wurde durchgeführt. Interessanterweise wurde gefunden, daß die für die quecksilberinduzierte systemische Autoimmunkrankheit prädisponierten H-2^s-Mäuse signifikant viel mehr Hg in ihren Milzen akkumulierten als die resistenten H-2^d-Stämme [Griem et al., 1997].

Gold

- (8) Gibt es Unterschiede in der Toxikokinetik von Gold zwischen Stämmen, die für die Gold-induzierte Autoimmunkrankheit empfänglich sind, und den Stämmen, die hierfür resistent sind? Es wurde eine ausführliche Toxikokinetik von Gold in verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen durchgeführt. Dabei zeigte sich interessanterweise, daß der für die Autoimmunantwort prädisponierte H-2^s-Stamm signifikant viel mehr Gold in seinen Makrophagen akkumulierte als ein resistenter Stamm [Tonn et al., 1994].

- (9) *Läßt sich die Bildung von Gold(III) unter dem Einfluß einer Mischung aus Myeloperoxidase und H_2O_2 nachweisen, aus der bekanntlich das starke Oxidationsmittel Hypochlorit (HOCl) oder Bleiche entsteht?* Dieser Nachweis konnte im zellfreien Milieu erbracht werden [Shaw et al., 1994].
- (10) *Läßt sich nachweisen, daß die Biooxidation von Gold(I) zu Gold(III) in Makrophagen stattfindet?* Auch dieser Nachweis konnte erbracht werden. Und zwar wurden zum Nachweis des sehr reaktiven, kurzlebigen Gold(III) T-Zellen mit „Spezifität für Gold(III)“ eingesetzt; diese Zellen weisen nicht direkt Gold(III) nach, sondern seine „Fußspuren“ auf - bisher unbekannt - Selbstproteinen der Makrophagen [Goebel et al., 1996].
- (11) *Welches sind die durch Gold(III) veränderten (Selbst-)Proteine bzw. Peptide?* Diese konnten bisher nicht identifiziert werden, da es bisher nicht gelang, $CD4^+$ T-Zellhybride mit „Spezifität für Gold(III)“ zu etablieren.
- (12) *Induziert Gold(III) die Präsentation kryptischer Peptide auf APZ?* Aufgrund der mit dem Protein Rinder-RNase durchgeführten Versuche kann diese Frage eindeutig bejaht werden [Griem et al., 1996].
- (13) *Gibt es Kreuzreaktionen der „Gold(III)-spezifischen“ T-Zellen mit anderen sensibilisierenden Metallionen?* In der Tat wurde gefunden, daß diejenigen $CD4^+$ T-Zellhybride, die spezifisch gegen kryptische Peptide der RNase reagierten, wenn diese mit Gold(III) vorbehandelt worden war, auch gegen diese kryptischen Peptide reagierten, wenn diese mit Palladium(IV), Palladium(II) oder Nickel(III) vorbehandelt wurden [Pantel et al., Manuskript in Vorbereitung]. Definitionsgemäß haben die sog. *kryptischen* Peptide das ätiologische Agens (die Chemikalie), welches ihre Präsentation auf APZ veranlaßte, nicht an sich gebunden. Der chemische Fremdstoff *denaturiert* stattdessen das Protein derart, daß es anders prozessiert wird und kryptische Peptide ausgeschnitten und auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Somit sind also die sogenannten „Gold(III)-spezifischen“ T-Zellen gar nicht gegen Gold(III) als Epitop gerichtet, sondern gegen kryptische Peptide, und sie sind deshalb - streng genommen - als *autoimmun* zu betrachten. Mit anderen Worten, bei den durch sensibilisierende Schwermetallionen hervorgerufenen unerwünschten Immunreaktionen braucht kein Unterschied zwischen einer *allergischen* und einer *autoimmunen* T-Zellreaktion zu bestehen [8, 15]. Diese neue Erkenntnis reflektiert auch klinische Beobachtungen, daß es oftmals keinen scharfen Unterschied zwischen allergischen und autoimmunen Reaktionen auf chemische Fremdstoffe gibt.

B.I.2. Darstellung des erzielten Erkenntnisgewinns und des voraussichtlichen Nutzens der Ergebnisse

- Da die Ätiologie von Autoimmunkrankheiten noch weitgehend unbekannt ist und Viren, anders als vielfach vermutet, bisher nur äußerst selten als ätiologische Agenzien nachgewiesen werden konnten, ist die Induktion von Autoimmunkrankheiten durch chemische Fremdstoffe von grundsätzlichem Interesse.

- Gleichfalls von grundsätzlicher Bedeutung ist die Immunisierung gegen *kryptische* (Selbst-)Peptide unter dem Einfluß von Schwermetallionen, wie hier am Beispiel des nuklearen Selbstproteins Fibrillarin (unter dem Einfluß von Quecksilber) und des Modellproteins Rinder-RNase (unter dem Einfluß von verschiedenen Schwermetallionen) nachgewiesen. - Eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf die Entstehung unerwünschter Immunreaktionen gegen chemische Fremdstoffe ist, daß die entsprechenden *Primärläsionen* offenbar in APZ ablaufen oder ablaufen können. Dies betrifft hier die abnormale Präsentation des Kernproteins Fibrillarin auf Makrophagen quecksilberbehandelter Mäuse [Kubicka-Muranyi et al., 1995] und die in Makrophagen stattfindende Biooxidation des nur mäßig proteinreaktiven Gold(I) in das hochreaktive Gold(III) [Goebel et al., 1996]. Auch die unter dem Einfluß von Quecksilber beobachtete abnormale Dislokation des Kernproteins Fibrillarin und bereits im Zellkern stattfindende Kolokalisation mit Enzymen der Antigenprozessierung (Proteasomen) könnte hierher gehören, wenngleich sie bislang nur in einer humanen *Epithel-Zelllinie* beobachtet wurde [von Mikecz et al., in Vorbereitung].

B.I.3. Eigene Veröffentlichungen zum Thema (ab 1994)

Originalarbeiten

1. Tonn, T., C. Goebel, M. Wilhelm, and E. Gleichmann:
Gold kinetics under long-term treatment: a comparison in three different mouse strains.
Br. J. Rheumatol 33: 724-730 (1994).
2. Lübben, B., N. Rottmann, M. Kubicka-Muranyi, E. Gleichmann, and R. Lührmann:
The specificity of disease-associated anti-fibrillarin autoantibodies compared with that of HgCl₂-induced autoantibodies.
Mol. Biol. Reports 20: 63-73 (1994).

3. Shaw III, C.F., S. Schraa, E. Gleichmann, Y.P. Grover, L. Dunemann, and A. Jagarlamudi:
Redox chemistry and $[\text{Au}(\text{CN})_2^-]$ in the formation of gold metabolites.
Metal-Based Drugs 1: 351-362 (1994).
4. Baginski, B., H.-C. Schuppe, P. Kind und E. Gleichmann:
Inter-individuelle Unterschiede gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Gold(I) auf humane polymorphkernige Leukozyten in vitro und deren Veränderungen im oxidativen Metabolismus bei Exposition mit Gold(I) und Gold(III).
Akt. Rheumatol. 19: 27-32 (1994).
5. Goebel, C, M. Kubicka-Muranyi, T. Tonn, J. Gonzalez, and E. Gleichmann: Phagocytes render chemicals immunogenic: oxidation of gold(I) to the T cell sensitizing gold(III) metabolite generated by mononuclear phagocytes.
Arch. Toxicol. 69: 450-459 (1995).
6. Griem, P., K. Takahashi, H. Kalbacher, and E. Gleichmann:
Antirheumatic drug disodium aurothiomalate inhibits CD4^+ T cell recognition of peptides containing two or more cysteine residues.
J. Immunol. 155: 1575-1587 (1995).
7. KubickarMuranyi, M., P. Griem, B. Lübben, N. Rottmann, R. Lührmann and E. Gleichmann:
Mercuric chloride-induced autoimmunity in mice involves upregulated presentation by spleen cells of altered and unaltered nucleolar self antigen.
Int. Arch. Allergy Immunol. 108: 1-10(1995).
8. Griem, P., K. Panthel, H. Kalbacher, and E. Gleichmann:
Alteration of a model antigen by Au(III) leads to T cell sensitization to cryptic peptides.
Eur. J. Immunol. 26:279-287 (1996).
9. Kubicka-Muranyi, M., J. Kremer, N. Rottmann, B. Lübben, R. Albers, N. Bloksma, R. Lührmann, and E. Gleichmann:
Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride: T helper cells reacting to self proteins.
Int. Arch. Allergy Immunol. 109: 11-20 (1996).
10. Doth, M., M. Fricke, F. Nicoletti, G. Garotta, M.L.F. Velthuysen, J.A. Bruijn, and E. Gleichmann:
Genetic differences in immune reactivity to mercuric chloride (HgCl_2): immunosuppression of H-2^d mice is mediated by interferon-gamma (IFN- γ).
Clin. Exp. Immunol. 109: 149-156 (1997).
11. Griem, P., E. Scholz, M. Turfeid, D. Zander, U. Wiesner, L. Dunemann, and E. Gleichmann:
Strain differences in tissue concentration of mercury in inbred mice treated with mercuric chloride.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 163-170 (1997).

12. Takahashi, K., E. Gleichmann, and P. Griem:
The antirheumatic drug aurothiomalate inhibits presentation of bovine insulin (BI) to murine T cells by interference with binding of BI peptide to class II major histocompatibility complex molecules.
In preparation.
13. Panthel, K., S.L. Best, C.F. Shaw III., E. Gleichmann, and P.Griem:
Presentation of the same cryptic peptides of ribonuclease A to T cells is induced by different metal ions.
In preparation.

B. Übersichtsarbeiten

14. Takahashi, K., P. Griem, C. Goebel, J. Gonzalez , and E. Gleichmann:
The antirheumatic drug gold, a coin with two faces: Au(I) and Au(III). Desired and undesired effects on the immune system.
Metal-Based Drugs 1: 483-496 (1994).
15. Griem, P., and E. Gleichmann:
Metal-induced autoimmunity.
Curr. Opin. Immunol. 7: 831-838 (1995).
16. Griem, P. und E. Gleichmann:
Das Antirheumatikum Gold: Erwünschte und unerwünschte Wirkungen von Au(I) und Au(III) auf das Immunsystem.
Z. Rheumatol. 55: 348-358 (1996).
17. Griem, P., C. Goebel, J. Abel, H. Schröder und E. Gleichmann:
In: *Toxikologie und Immunsystem - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner.* Greim, H. und Demi, E. (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim, S. 269-302 (1996).
18. Griem, P., C.F. Shaw III, and E. Gleichmann:
Chemically-induced allergy and autoimmunity: what do T cells react against?
In: *Comprehensive Toxicology*, I.G. Sipes et al. (eds.), Vol. 5: *Immune System Toxicology*, D.A. Lawrence (ed.), Pergamon Press, Oxford, 323-338 (1997).
19. Griem, P., M. Wulferink, B. Sachs, J. Gonzalez, and E. Gleichmann:
Adverse immune reactions to xenobiotics: How do they evolve?
Immunol. Today, submitted.

