



THE UNIVERSITY *of* EDINBURGH

Edinburgh Research Explorer

Analyse von Wirt-Pathogen Interaktionen in Mausmodellen

Citation for published version:

Pasche, B, Frischmann, U, Greweling, M, Mateika, S, Gruber, A, Lengeling, A & Müller, W 2007, 'Analyse von Wirt-Pathogen Interaktionen in Mausmodellen' GenomXPress, Bd 4/07, S. 17-19.

Link:

[Link to publication record in Edinburgh Research Explorer](#)

Document Version:

Preprint (usually an early version)

Published In:

GenomXPress

General rights

Copyright for the publications made accessible via the Edinburgh Research Explorer is retained by the author(s) and / or other copyright owners and it is a condition of accessing these publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

Take down policy

The University of Edinburgh has made every reasonable effort to ensure that Edinburgh Research Explorer content complies with UK legislation. If you believe that the public display of this file breaches copyright please contact openaccess@ed.ac.uk providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Analyse von Wirt-Pathogen Interaktionen in Mausmodellen

Die Infektionschallenge Plattform am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

Bastian Pasche, Ursula Frischmann, Marina Greweling, Silke Mateika, Achim D. Gruber, Andreas Lengeling und Werner Müller

Die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (heute: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) in Braunschweig hat im Jahr 2000 beschlossen, sich in Richtung Infektionsforschung weiterzuentwickeln. Als ein wesentlicher Baustein dieser Neuorientierung wurde eine „Infektionschallenge“ Plattform (ICP) aufgebaut, eine Infrastruktur, die sich nur mit Hilfe des Nationalen Genomforschungsnetzes realisieren ließ und die sowohl strukturell als auch inhaltlich eng mit der German Mouse Clinic (GMC) in München verbunden ist (Gailus-Durner *et al.*, 2005). Im Folgenden wird beschrieben, wie die Infrastruktur der ICP aufgebaut ist und welche wissenschaftlichen Fragestellungen mit Hilfe dieser in Europa einzigartigen Infrastruktur beantwortet werden können.

Infektionskrankheiten haben unsere Welt mehr beeinflusst, als wir auf den ersten Blick wahrnehmen. Durch die Entdeckung neuer Kulturen durch Europäer wurde zum Teil die einheimische Bevölkerung durch die mitgebrachten Infektionskrankheiten regelgerecht ausgerottet. Große Epidemien, wie zum Beispiel Influenza oder die Pest, haben bis zu einem Drittel der Bevölkerung in Europa ausgelöscht. Auch heute beeinflussen Infektionskrankheiten unser Leben und sind für mehr als ein Viertel aller Todesfälle weltweit verantwortlich. Die Interaktion zwischen Erreger und Wirt führt über lange Zeit zur Selektion von genetischen Merkmalen, die noch heute in unseren Genomen nachweisbar sind.

Um Ursachen und Pathogenese von Infektionskrankheiten besser untersuchen zu können, haben sich Tiermodelle bewährt. Insbesondere in der Maus konnten in der Vergangenheit Mechanismen aufgeklärt werden, die in der Folge auch in der Humanmedizin Einzug fanden und so Fortschritte in Diagnostik, Behandlung und Prävention ermöglichten.

Die „Infection Challenge Plattform“ (ICP) in Braunschweig

In der ICP werden gezielt Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt untersucht. Für die Funktionalität der ICP ist es von großer Bedeutung, dass möglichst gleiche Bedingungen von

Experiment zu Experiment sichergestellt werden. Nur so ist es möglich, die Ergebnisse von verschiedenen Experimenten miteinander zu vergleichen. Besonders wichtig für die Analyse von Immunfunktionen ist ein sehr hoher Hygienestatus in der Tierhaltung. Um den Einfluss von nicht erwünschten Erregern zu minimieren, werden alle Tiere in individuell belüfteten Käfigen gehalten, die ausschließlich unter speziellen Sterilbänken geöffnet werden dürfen. Der Hygienestatus wird regelmäßig durch interne und externe Kontrollen gemäß internationalen Vorgaben (Federation of European Laboratory Animal Science Associations; FELASA, <http://www.felasa.eu/>) überprüft. Der Zutritt zur ICP ist streng reglementiert und erfolgt durch eine Luftdusche, in der jede Person durch ein starkes Gebläse von kleinsten Partikeln befreit wird. Anschließend muss noch Schutzklei-

dung inklusive Kopfhaube und Mundschutz angelegt werden. Auf diese Weise konnte der Hygienestatus der Tierhaltung über die letzten fünf Jahre aufrechterhalten werden. Ein ebenso wichtiger Faktor in der ICP ist die native Keimbildung des Wirtes, insbesondere im Darmtrakt. Die Flora des Darms ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Infektionskrankheiten. Wir arbeiten daher mit einer genau definierten Darmflora (der so genannten modifizierten Schaedler-Flora), um den Einfluss von Mikroorganismen auf die Experimente zu reduzieren. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die genaue Festlegung der Durchführung der Experimente. Wir haben sogenannte „Standardized Operating Procedures“ (SOPs) entwickelt und als Validierung Phänotypisierungsdaten von vier häufig verwendeten Maus-Inzuchtlinien aufgenommen (siehe

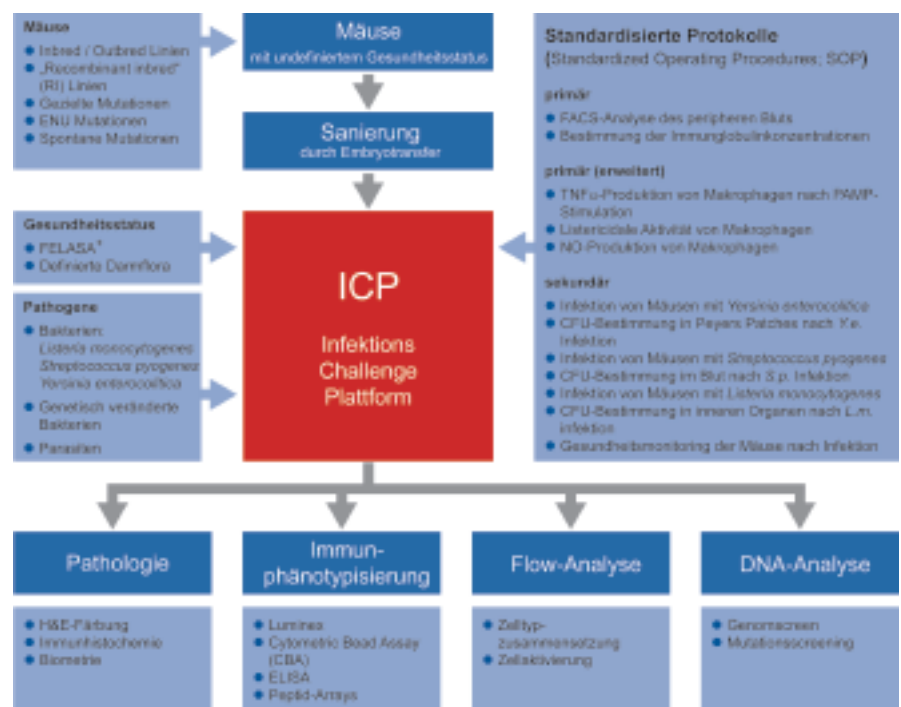


Abb. 1: Schematische Darstellung der Infektions-Challenge Plattform. In der ICP können Mäuse verschiedener Herkunft phänotypisiert werden. Bei der Sanierung per Embryotransfer wird eine definierte Darmflora generiert. Die eigentliche Phänotypisierung findet in drei Stufen statt. Die primären Screens sind blutbasierende Untersuchungen, mit den erweiterten primären Screens kann die Immunreaktion von Makrophagen näher untersucht werden. In den sekundären Screens wird schließlich der Verlauf von *in vivo* Infektionen genauer analysiert. Dazu werden die Tiere mit den verschiedenen Pathogenen infiziert und der Krankheitsverlauf mit verschiedenen Methoden aufgenommen und ausgewertet.

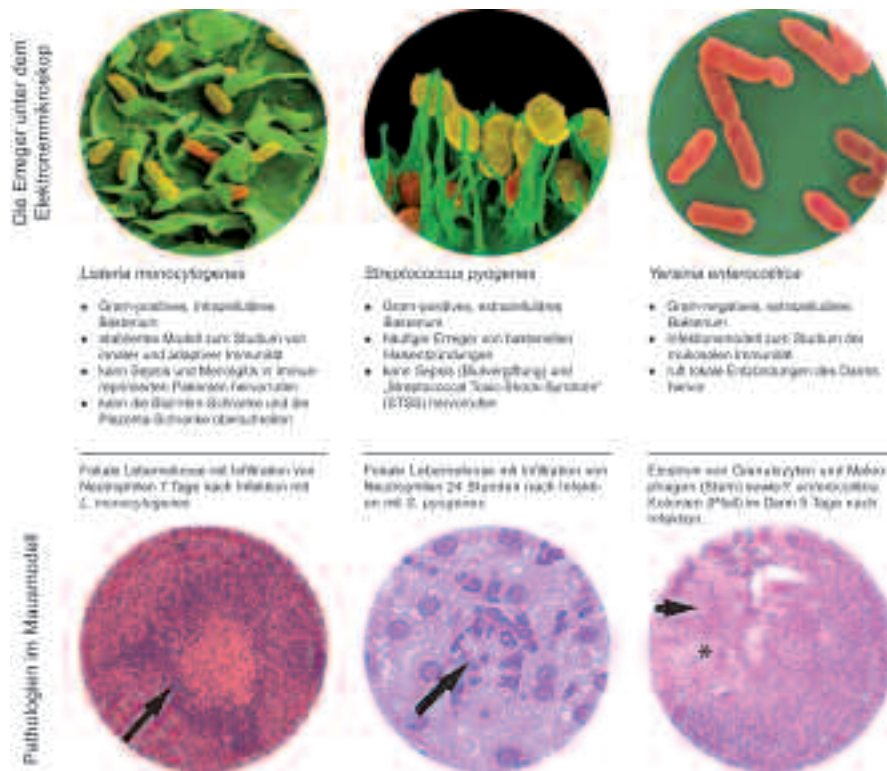


Abb. 2: Charakterisierung der verwendeten bakteriellen Erreger. Die zurzeit in der ICP verwendeten Bakterien unterscheiden sich in verschiedenen Eigenschaften voneinander. Dadurch deckt die Phänotypisierung ein breites Spektrum von Immunreaktionen ab. Jede Kurzbeschreibung eines Erregers wird durch eine elektronen-mikroskopische Aufnahme sowie einen typischen pathologischen Befund nach der entsprechenden Mausinfektion ergänzt.

Infobox). Diese Datenbasis ist unsere Grundlage für die Analyse von Mausmutanten und erlaubt uns, außergewöhnliche Resistenzen oder Empfindlichkeiten gegenüber Infektionserregern sicher zu entdecken.

Um die Verbindung von genetischen Faktoren und der Ausprägung der Immunantwort zu analysieren, gehen wir in der ICP zwei Wege.

Vom Genotyp zum Phänotyp

Die vielfältigen Möglichkeiten, das Genom der Maus zu manipulieren, machen es möglich, die Funktion einzelner Gene aufzuklären. Ein klassischer Weg ist es, gezielt ein bestimmtes Gen in der Maus auszuschalten und die neu erhaltene Mausmutante anschließend genau zu untersuchen (zu phänotypisieren). Diese „Knockout“-Mäuse können beispielsweise in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen verändert sein oder eine abweichende Immunreaktion nach Infektion zeigen. Man kann auf diese Weise feststellen, welche Gene beim Infektionsgeschehen eine wichtige Rolle spielen. Mit Hilfe sogenannter „konditionaler Knockout“-Mäuse können Gene sogar nur in bestimmten Zellen, beispielsweise T-Zellen oder Makrophagen, ausgeschaltet werden,

während andere Körperzellen der Maus genetisch unverändert bleiben. Damit kann nicht nur die Rolle des entsprechenden Gens, sondern darüber hinaus auch der beteiligte Zelltyp näher untersucht werden.

Doch nicht nur die phänotypische Analyse einer gezielt generierten Mausmutante ist möglich, auch der umgekehrte Weg vom Phänotyp zum Genotyp wird in der ICP besprochen.

Vom Phänotyp zum Genotyp

Die Analyse von Inzuchtstämmen zeigt, dass zwischen einzelnen Mausinzuchtstämmen oft große Unterschiede in der Infektionsempfindlichkeit bestehen. Diese Unterschiede kann man nutzen, um die genetische Ursache dafür zu finden. Durch Rückkreuzungen und die damit verbundenen Rekombinationsereignisse, aber auch durch Nutzung von bereits etablierten „Rekombinanten Inzuchtstämmen“ ist es möglich, sogenannte „Quantitative Trait Loci“ (QTL) zu identifizieren. Das sind chromosomale Regionen, die mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit mit einer bestimmten Merkmalsausbildung assoziiert sind.

Mit Hilfe einer Feinkartierung kann man anschließend herausfinden, welche Gene inner-

halb des QTLs für die Merkmalsausbildung verantwortlich sind und beispielsweise die Abwehr von Infektionen steuern können. In der Regel sind mehrere QTL an der Ausprägung einer Infektionsempfindlichkeit beteiligt. Hier bietet die Maus als Tiermodell mit ihrer gut etablierten Genetik viele Möglichkeiten, die Genvarianten zu identifizieren, die diesen QTLs zugrunde liegen. Zum Beispiel können speziell gezüchtete „Rekombinante Inzuchtstämme“ verwendet werden, die in ihrem Genom mosaikartig verstreut kleine Anteile der resistenten und empfindlichen Elternstämme tragen. Die Feinkartierung dieser genetischen Mosaik zusammen mit der Korrelation zum Phänotyp erlaubt es, die Mechanismen komplexer Vererbung aufzuschlüsseln. Diese Arbeiten sind sehr wichtig, da sie nicht so leicht in heterogenen, menschlichen Populationen zu bewerkstelligen sind. Sehr wohl beruhen aber die meisten multifaktoriellen Erkrankungen des Menschen auf der Kombination gerader solcher krankheitsprädisponierender Genvarianten. Dieses gilt insbesondere auch für Infektionserkrankungen, wo durch Interaktion von Umweltfaktoren mit genetischen Faktoren das individuelle Krankheitsrisiko bestimmt oder über die Schwere eines Krankheitsverlaufs entschieden wird.

Männliche und Weibliche Mäuse unterscheiden sich

Bei der Erhebung von Basisdaten in verschiedenen Mausinzuchtstämmen beobachteten wir große Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Interessanterweise sind weibliche Mäuse in Infektionen mit dem intrazellulären Erreger *Listeria monocytogenes* viel stärker betroffen als männliche Mäuse (Pasche *et al.*, 2005). Weibchen verschiedener Mausinzuchtstämme zeigen nach Infektion höhere Keimbelaugungen in betroffenen Organen und stärkere histopathologische Veränderungen im Vergleich zu den Männchen. Dies geht einher mit Veränderungen in der Anzahl und Zusammensetzung von Lymphozyten im peripheren Blut. So entwickeln weibliche Mäuse nach Infektion eine stärkere Lymphopenie (Mangel an Lymphozyten in Blut) als die Männchen. Überraschenderweise zeigen die Weibchen nach Infektion auch höhere Serumkonzentrationen des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-10. Durch seine immunsupprimierende Wirkung scheint dieses Zytokin geschlechtsspezifisch die mit der Infektion einhergehenden Entzündungsreaktionen zu unterdrücken (Pasche *et al.*, 2005). Folglich können die Weibchen den Erreger nicht so gut eliminieren wie die Männchen. Dieser Befund in der Maus kann

auch eine Bedeutung für humane Infektionserkrankungen haben. Auch hier gibt es Beispiele für geschlechtsspezifische Unterschiede in der Prävalenz einiger Infektionserkrankungen.

Infektion in der Maus, möglichst nah an der Infektion beim Menschen

Wir sind zunächst an den grundlegenden Mechanismen der Infektabwehr interessiert und können in der Maus sowohl die Antigenunabhängige Infektabwehr, z. B. durch Makrophagen, Neutrophile oder Granulozyten, als auch die Antigen-abhängige Immunantwort, getragen von B- und T-Lymphozyten, untersuchen. Die von uns gewählten Infektionsmodelle erlauben die Analyse beider Typen der Immunabwehr.

Die Erreger, die für uns Menschen relevant sind, sind in der Regel jedoch andere als die Erreger, die eine Maus natürlicherweise infizieren können. Manche dieser Erreger können auf Grund spezifischer Infektionswege und der dabei verwendeten Adaptermoleküle die Maus nicht infizieren. In der ICP ist uns aber daran gelegen Infektionsmodelle aufzubauen, die auch für den Menschen von Bedeutung sind. Aus diesem Grund verfolgen wir drei verschiedene Strategien: (1) die Verwendung von Mauspathogenen, die in der Maus ein vergleichbares Krankheitsbild hervorrufen wie das entsprechende Humanpathogen beim Menschen, (2) die Maus-Adaption humaner Erreger sowie (3) die Humanisierung von Mäusen, so dass die Verwendung von Humanpathogenen in diesem Tiermodell möglich wird.

So verwenden wir z. B. als parasitären Erreger den mauspathogenen Nematoden *Trichuris muris*. Beim Menschen gibt es eine weit verbreitete Erregergruppe, die in ihrer Biologie diesem Maus-Erreger sehr ähnlich ist. Die Untersuchung des Infektionsverlaufes in der Maus gibt uns somit Hinweise auf die Wirkung der entsprechenden Erreger auf den Menschen. Eine andere Strategie haben wir bei Listerien verfolgt. Eine Infektion der Maus auf der natürlichen Infektionsroute, nämlich oral, ist nicht möglich, da das Adaptermolekül Internalin-A der Listerien nicht an das Zielmolekül der Maus, das E-Cadherin, binden kann. Daher wurde das Internalin-A-Molekül in einer Weise verändert, die eine hochaffine Bindung an das murine E-Cadherin zulässt. Dies ermöglicht es jetzt, den natürlichen Infektionsweg der Listerien in der Maus im Detail zu untersuchen (Wollert et al., 2007).

Schließlich kann die Maus so verändert werden, dass sie empfindlich wird für Erreger des Menschen. Dieser experimentelle Ansatz steht

momentan noch am Anfang seiner Entwicklung. Ziel dieser Humanisierung ist es unter anderem, dass schwer therapierbare virale Infektionen des Menschen in der Maus studiert werden können. Diese Experimente finden am HZI als Teil der von der Bill und Melinda Gates-Stiftung ins Leben gerufenen „Grand Challenge“-Initiative statt (siehe Infobox).

Ausblick

Die ICP ist durch substantielle Unterstützung des Nationalen Genomforschungsnetzes zur zentralen Forschungsstation am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung geworden. Das spezielle Design dieser Phänotypisierungsplattform und die unterschiedlichen, mit der ICP verbundenen Technologien (siehe Abbildung 1) erlauben die detaillierte Analyse von Infektionen in der Maus. Mit Hilfe verschiedener experimenteller Tools wird es in Zukunft möglich werden, Infektionserkrankungen des Menschen noch besser in der Maus nachzubilden. Zurzeit sind in der ICP Experimente bis zur Sicherheitsstufe 2 möglich, es ist aber bereits ein weiteres Tierhaus im Bau, das auch Infektionsexperimente bis zur Sicherheitsstufe 3 zulassen wird. Diese neue Einheit wird in der Zukunft sehr wichtig sein, um auch Erkrankungsmechanismen von kritischen humanen Infektionserregern in geeigneten Mausmodellen zu untersuchen (z.B. hochpathogene Influenza Viren). Mit der bisher geschaffenen speziellen Infrastruktur und den geplanten Erweiterungen ist die ICP zu einer sehr wichtigen Außenstation der German Mouse Clinic geworden. Hier können, in Kooperationen mit Partnern aus dem NGFN, Mechanismen zum Verständnis von Immunität und Erregerabwehr studiert werden.

Danksagung

Unser spezieller Dank gilt Dr. Dave Monner und allen Tierpflegerinnen und Tierpflegern des HZI, ohne die der Betrieb der ICP nicht möglich wäre. Besonderer Dank gebührt auch Dr. Angela Schippers für die Unterstützung bei Mausphänotypisierungen. Dr. Valérie Gailus-Durner und Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis danken wir für die Unterstützung des Projekts im Rahmen des NGFN.

Referenzen

1. Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Brielmeier, M., Calzada-Wack, J., Elvert, R., Ehrhardt, N., Dalke, C., Franz, T.J., Grundner-Culemann, E., Hammelbacher, S., Hölter, S.M., Horsch, M., Javaheri, A., Kalaydjiev, S., Klempt, M., Kunder, S., Lengger, R., Lisse, T., Mijalski, T., Naton, B., Pedersen, V., Pehn, C., Racz, I., Reinhard, C., Reitmeir,

P., Schneider, I., Steinkamp, R., Zybill, C., Adamski, J., Beckers, J., Behrendt, H., Favor, J., Graw, J., Heldmaier, G., Höfler, H., Ivdanic, B., Katus, H., Kirchof, P., Klingenspor, M., Klopstock, T., Lengeling, A., Müller, W., Ohl, F., Ollert, M., Quintanilla-Fend, L., Schmidt, J., Schulz, H., Wolf, E., Wurst, W., Zimmer, A., Busch, D.H. and Hrabé de Angelis, M. (2005): Introducing the German Mouse Clinic: Open access platform for standardized phenotyping. *Nat. Methods* 2: 403-404.

2. Pasche, B., Kalaydjiev, S., Franz, T.J., Kremmer, E., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabé de Angelis, M., Lengeling, A. and Busch, D.H. (2005): Sex dependent susceptibility pattern to *Listeria monocytogenes* infection is mediated by differential IL-10 production. *Infect. Immun.* 73: 5952-5960.

3. Wollert, T., Pasche, B., Rochon, M., Deppenmeier, S., van den Heuvel, J., Gruber, A.D. Heinz, D.W., Lengeling, A. and Schubert, W.-D. (2007): Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* 129: 891-902.

Kontakt:

Dr. Bastian Pasche
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung,
Braunschweig
AG Infektionsgenetik, Abteilung
für Experimentelle Mausgenetik
E-Mail: bastian.pasche@helmholtz-hzi.de

Info-Box mit Internet-Links

Assoziierte Projekte der ICP:

German Mouse Clinic:

www.mouseclinic.de

MUGEN (Network of Excellence in Mouse Immunology):

www.mugen-noe.org/

EUMORPHIA: www.eumorphia.org

EUMODIC: www.eumodic.eu

Phänotyp-Datenbanken & SOPs:

EMPreSS: empres.harc.mrc.ac.uk

Europenome:

www.europhenome.org

Interphenome:

www.interphenome.org

Humanisierungsprojekte:

Grand Challenges in Global Health:

www.gcgh.org/Projects/CreateNewVaccines/TestsForVaccineEvaluation/