

FUGATO-Verbundprojekt: *E. coli*-Chick

Analyse der Wirt-Erreger-Interaktionen während der *E. coli*-Infektion des Geflügels und ihre Anwendung auf Zuchtprogramme

Claudia Laturnus, Lothar H. Wieler, Rudolf Preisinger und Bernd Kaspers

APEC-Infektionen – ein Problem für Tierhalter und Verbraucher

Aviäre pathogene *Escherichia coli* (APEC) verursachen einen unter dem Begriff der aviären Colibakteriose zusammengefassten Krankheitskomplex, der in der Geflügelindustrie für erhebliche wirtschaftliche Verluste in Form von Leistungsminderungen und erhöhten Mortalitätsraten sorgt. Von der Erkrankung, die überwiegend systemisch verläuft und entzündliche Veränderungen nahezu aller inneren Organe bedingt, sind v.a. Hühner und Puten, daneben aber auch Enten und anderes Wassergeflügel betroffen. Obwohl die aviäre Colibakteriose sowohl in der Käfig- als auch in der Alternativ-Haltung für Probleme sorgt, wird erwartet, dass mit dem ab 2012 eintretenden europaweiten Verbot der Käfighaltung für Legehennen die Verlustraten durch *E. coli* und auch andere Infektionserreger ansteigen werden. Dies wird insbesondere auf die in den alternativen Haltungssystemen bestehenden Schwierigkeiten bei der Umsetzung von Hygienemaßnahmen, die erhöhte Staubbelastung und den direkten Kontakt der Tiere mit dem Kot zurückzuführen sein. Um die Verlustraten beim Geflügel zu reduzieren und darüber hinaus die Lebensmittelsicherheit für den Ver-

braucher weiter gewährleisten zu können, besteht ein erheblicher Bedarf zur gezielten Bekämpfung der APEC-Infektionen.

Im FUGATO-Verbundprojekt „*E. coli*-Chick“ haben sich Partner aus der Industrie und aus öffentlichen Forschungseinrichtungen zusammengefunden (Abbildung 1), um gemeinsam die Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion zu analysieren und neue Konzepte für die Kontrolle der aviären Colibakteriose zu erarbeiten. Hierbei können grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien mit additiver Wirkung verfolgt werden: zum einen ist dies die Zucht von resistenteren Hühnern, zum anderen bietet sich eine Schutzimpfung der Tiere gegen die Krankheitserreger an. Beiden Ansätzen ist gemeinsam, dass umfassende Kenntnisse der Resistenz- und Abwehrmechanismen erarbeitet werden müssen. In diesem Verbundprojekt werden daher von den beteiligten Partnern die Fragen der molekularen Virulenz der APEC (Partner 2), der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Partner 3) und der genetischen Resistenz des Wirtes (Partner 4) bearbeitet. Ziel der Arbeiten ist es, aus den gemeinsam gewonnenen Ergebnissen neue Zuchtstrategien abzuleiten, um diese direkt in die praktische Geflügelzucht umzusetzen (Partner 1). Darüber hinaus sollte dieser inte-

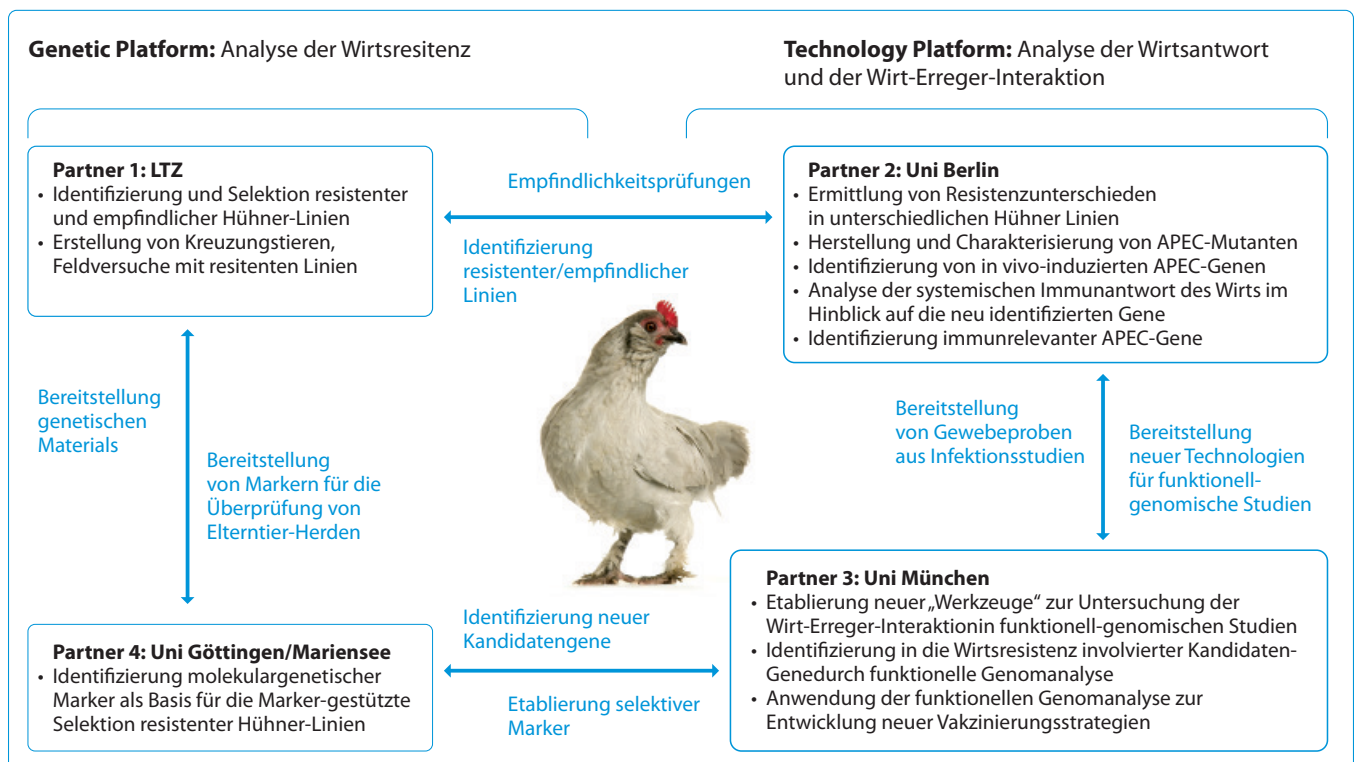


Abb. 1

Grafik: Dirk Biermann, Bildausschnitt Huhn: © Eric Isselée/fotolia.com

Arbeitsmaterial

Modul 2 Lebenssystem Nutztier

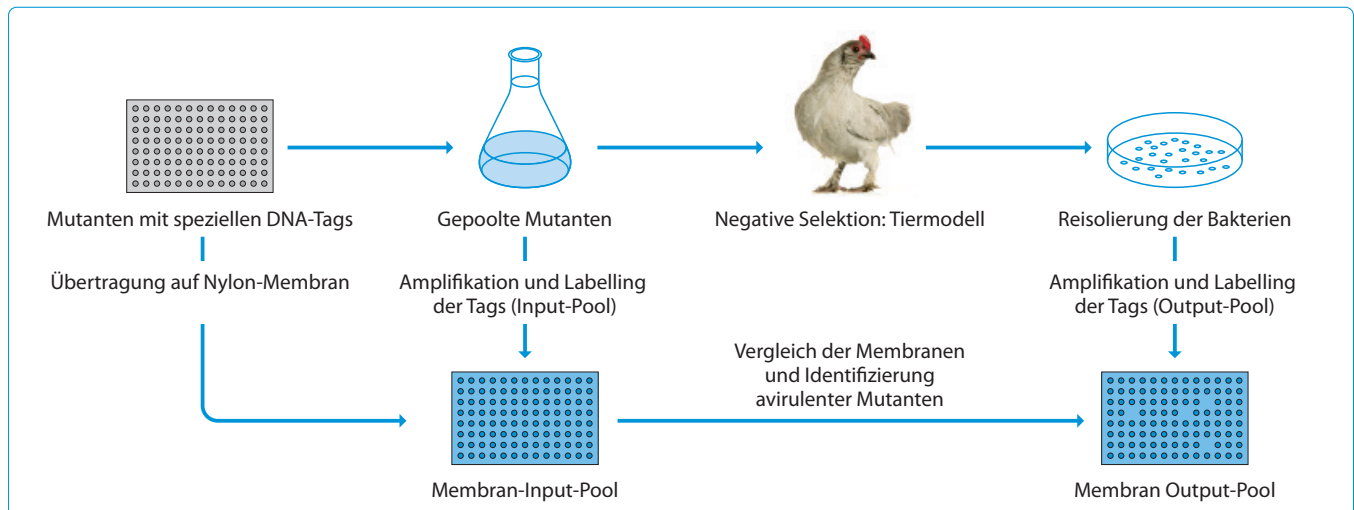


Abb. 2

Grafik: Dirk Biermann, Bildausschnitt Huhn: © Eric Isselée/fotolia.com

grierte Ansatz auch die gezielte Entwicklung eines Impfstoffs erlauben.

Neue Ansätze zur Analyse der molekularen Pathogenese der APEC-Infektion

E. coli gehört zur natürlichen Mikroflora des Darmes des Geflügels und sowohl pathogene als auch apathogene Stämme können aus dem Darm- und Respirationstrakt sowie aus der Umgebung gesunder und erkrankter Tiere isoliert werden. Jedoch sind nur die obligat pathogenen Stämme in der Lage, Erkrankungen aus dem Komplex der aviären Colibakteriose hervorzurufen. Hierbei spielt die Expression spezifischer Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle, wobei bei den APEC bislang mehrere Adhäsine, eisenaquirierende Systeme, Hämolyse, Anti-Wirtsabwehrsysteme sowie verschiedene Toxine identifiziert und näher charakterisiert werden konnten. Die Rolle dieser Virulenzfaktoren in der Pathogenese der APEC-Infektion ist in vielen Fällen allerdings nicht vollständig geklärt. Darüber hinaus können nicht alle Schritte des Infektionsprozesses - insbesondere der Eintritt der Bakterien in die Blutbahn - mit den bisher identifizierten Genen ausreichend erklärt werden. Die mangelnde Kenntnis bezüglich pathogenetisch relevanter Antigene behindert außerdem die Entwicklung eines ausreichend wirksamen Impfstoffes.

Ein vorrangiges Ziel der Berliner Arbeitsgruppe ist es daher, neue Virulenzdeterminanten von APEC zu identifizieren. Dies soll zum einen durch den Einsatz der Signature-tagged Transposon Mutagenese (STM) gelingen (Abb. 2), mit der – im Gegensatz zu traditionellen Mutageneseverfahren – eine Vielzahl von APEC-Mutanten gleichzeitig in einem Tier getestet werden können. Bei der STM wird das zur Mutagenese verwendete Transposon pUTmini-Tn5Km2 mit unterschiedlichen „DNA-Taggen“ ausgestattet, also kurzen Nukleotidsequenzen, die später der eindeutigen Identifizierung der von der Mutagenese betroffenen Gene mittels PCR dienen. Pools mit unterschiedlichen APEC-Mutanten werden im Hühner-Infektionsmodell auf ihre Virulenzabschwächung in vivo hin getestet (Input-Pool). Mutanten, die nach einer dem Infektionsverlauf angepassten Zeitdauer nicht reisolieren können (Output-Pool) und demzufolge zur Vermehrung im Wirt nicht mehr in der Lage sind, gelten als attenuiert. Die der Virulenzabschwächung zugrunde liegenden Gene müssen also eine wichtige Rolle für das Überleben und die Vermehrung des Erregers spielen. Sie werden sequenzanalysiert und weiteren funktionellen Tests unterzogen.

Um neben neuen virulenzassoziierten Faktoren auch diejenigen APEC-Gene identifizieren zu können, die während der natürlichen Infektion im Huhn induziert werden, wird als weitere Methode die In vivo-induced Antigen Technologie (IVIAT) angewendet (Abb. 3). Diese relativ neue Technik hat sich bei der Suche nach geeigneten Kandidaten-Genen für die Vakzineherstellung und die Etablierung neuer diagnostischer Tests als sehr viel versprechend herausgestellt. Die Durchführung erfordert zunächst die Herstellung einer induzierbaren Expressions-Bibliothek eines APEC-Isolates und die Verfügbarkeit entsprechender Serumproben von Hühnern, die zuvor mit dem Erreger konfrontiert waren. Serumproben mehrerer Tiere werden vereinigt und mit ganzen Zellen sowie auch zellulären Extrakten von in vitro-kultivierten APEC-Stämmen absorbiert und dieses absorbierte Serum wiederum zur Überprüfung der Expressions-Bibliothek durch Western Blot eingesetzt. Dabei identifizierte positive Klone enthalten entsprechend ein DNA-Fragment des Erregers, das für ein in vivo-induziertes Antigen kodiert. Sie können mithilfe eines Vektor-spezifischen Primers sequenzanalysiert und im weiteren Verlauf auf ihre Eignung als Vakzine-Kandidaten überprüft werden. Da sich ein potentieller

Beteiligte Forschungseinrichtungen

- Lohmann Tierzucht GmbH (Partner 1)
- Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin (Partner 2)
- Institut für Tierphysiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München (Partner 3)
- Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen und Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Mariensee (Partner 4)

Wirtschaftspartner

- Lohmann Tierzucht GmbH

Arbeitsmaterial

Modul 2 Lebenssystem Nutztier

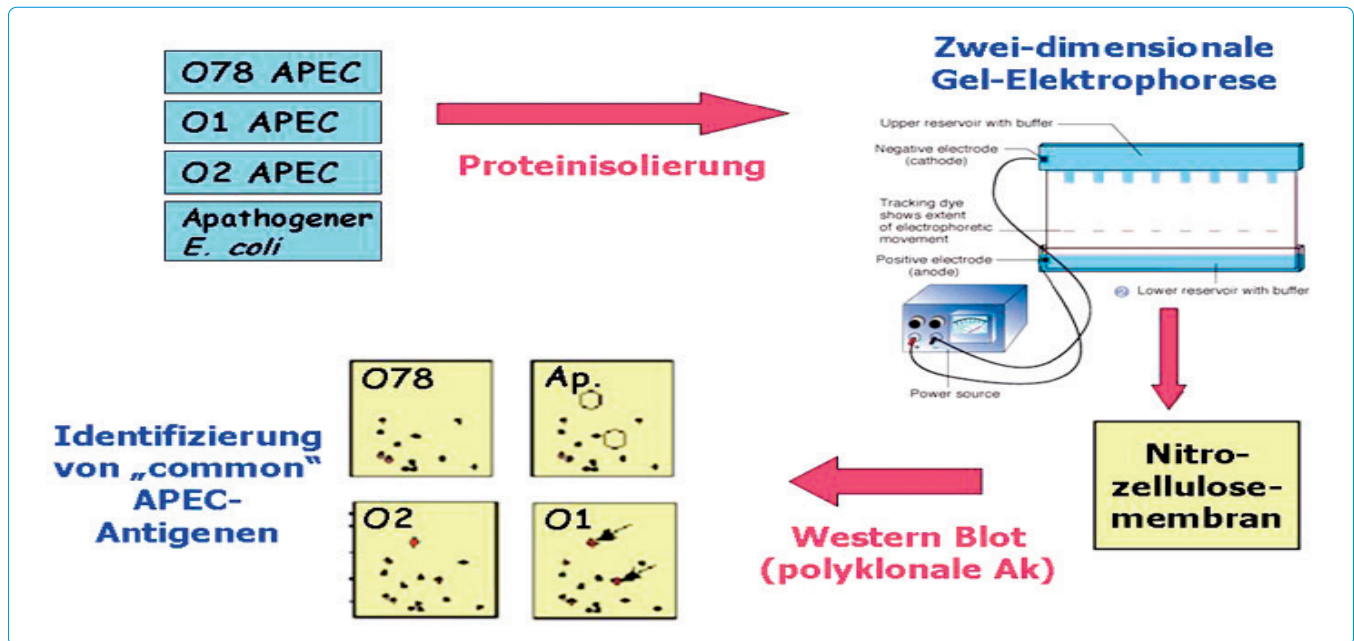


Abb. 3

Impfstoff als protektiv gegenüber möglichst vielen APEC-Stämmen erweisen sollte, werden die weltweit am häufigsten isolierten APEC-Phylotypen in diese Analysen einbezogen und ein apathogener *E. coli*-Stamm als Kontrolle mitgeführt. Darüber hinaus werden Seren unterschiedlicher Hühnerlinien eingesetzt, um immunologische Unterschiede bezüglich der Erkennung bakterieller Antigene aufzuzeigen.

Transkriptomstudien zur Analyse angeborener und erworbener Abwehrmechanismen des Huhnes

Die Veröffentlichung der ersten Sequenz des Hühnergenoms und die Etablierung umfangreicher EST-Datenbanken haben den am Huhn interessierten Wissenschaftlern jene Informationen geliefert, die für die Anwendung moderner Expressionsanalysen und funktioneller Studien dringend benötigt werden. Damit kann nun auch die Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion mit den bereits isolierten pathogenen und apathogenen APEC Stämmen umfassend untersucht werden. Im Fokus stehen dabei jene Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität des Huhnes, die an der lokalen oder systemischen Abwehr der APEC-Infektion beteiligt sind. Da die Lunge als das primäre Eintrittsorgan für APEC gilt, kommt den lokalen Abwehrmechanismen in diesem Organ eine ganz besondere Bedeutung zu. Die Identifizierung wichtiger an der Kontrolle der APEC beteiligter Faktoren soll durch den Vergleich der Reaktionen des Lungenimmunsystems resistenter und empfänglicher Hühnerlinien erreicht werden. Zudem wollen wir analysieren, welche Unterschiede in der Reaktion auf pathogene und apathogene APEC existieren. Diese Reaktionen werden mit Hilfe Hühner-spezifischer Microarrays und neu etablierter quantitativer PCR-Tests analysiert.

Die Münchner Gruppe hat in den letzten Jahren ein detailliertes Bild der Strukturen des Lungenimmunsystems beim Huhn erarbeitet und ist daher in der Lage gezielt Gewebeproben für die Expressionsanalysen zu entnehmen. Die benötigte Microarray-Technologie steht in Form eines 13k cDNA Microarrays des Fred

Hutchinson Cancer Research Centers (USA), eines 13k Oligoarrays am Roslin Institut (England) oder als kommerzieller „Chicken Genome Array“ der Firma Affymetrix zur Verfügung. Die qPCR-Tests haben wir inzwischen für mehr als 30 immunrelevante Gene etabliert, sie werden nun auf die ersten Proben aus den Infektionsversuchen angewandt. Darunter finden sich zahlreiche Zytokingene (u.a. IL-1, IL-6, IL-8, IFN- α), Gene, die spezifisch sind für Makrophagen (z.B. iNOS, NRAMP), B- und T-Lymphozyten sowie für lösliche Komponenten der angeborenen Abwehr (z.B. Defensine, Surfactant). Die Ergebnisse dieser Versuche sollen in die Entwicklung eines spezifischen „Immuno-Arrays“ für das Huhn einfließen, mit dessen Hilfe rasch und fokussiert größere Probenzahlen analysiert werden können. Dieser Array, einmal verfügbar, dürfte sich auch als wertvolles Werkzeug für eine Vielzahl weiterer Fragestellungen zur Wirt-Erreger-Interaktion beim Huhn erweisen.

Von der Expression zur Funktion

Um die Rolle der neu identifizierten Kandidatengene in der APEC-Abwehr funktionell zu überprüfen, werden zwei verschiedene Zellkultursysteme, eine Makrophagenkultur sowie eine aviäre Lungenepithelzellkultur, zum Einsatz kommen. In diesen *in vitro*-Systemen werden die Kandidatengene entweder überexprimiert oder aber mit Hilfe der siRNA-Technologie inaktiviert. In Infektionsstudien kann so die Kontrolle der Bakterien durch die entsprechenden Faktoren untersucht werden.

Da im Rahmen dieses Projekts auch erste Schritte hin zur Entwicklung eines APEC-spezifischen Impfstoffs gemacht werden sollen, werden wir die spezifischen Abwehrmechanismen der Hühnerlunge untersuchen. Basierend auf vorhergehenden Studien nehmen wir an, dass die Produktion APEC-spezifischer Antikörper vom IgA-Typ in der Lunge einen effektiven Abwehrmechanismus gegenüber der Infektion darstellt. Ein Nachweissystem für IgA in der Hühnerlunge wurde bereits etabliert. Dieses soll nun für unsere Fragestellung entsprechend modifiziert und zur Identifizierung potentieller Vakzine-Kandidaten genutzt werden.

Arbeitsmaterial

Modul 2 Lebenssystem Nutztier

Verwendete Abkürzungen

APEC	<i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
IFNα	<i>Interferon alpha</i>
IgA	<i>Immunglobulin A</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IVIAT	<i>In Vivo-Induced Antigen Technology</i>
NRAMP	<i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STM	<i>Signature-tagged Transposon Mutagenesis</i>

Auswertung der Ergebnisse und Anwendung auf Zuchtprogramme

Die durch die zuvor beschriebenen Studien gewonnenen Ergebnisse werden mit Hilfe umfangreicher statistischer Analysen ausgewertet und mit den Daten aus Belastungsprüfungen unterschiedlicher Hühnerlinien abgeglichen. Ausgehend hiervon werden molekulargenetische Marker (SNP-Analyse) als Grundlage für die Selektion innerhalb der Linien etabliert. Aus gezielten Anpaarungen verschiedener Haplotypen werden dann Tiere mit definierter genetischer Struktur erstellt, die im Alter von fünf Wochen bzw. als Eintagsküken mit APEC belastet werden. Die Verlustraten werden wiederum statistisch ausgewertet und zur Beurteilung der Aussagefähigkeit der Marker herangezogen (Partner 4). Darauf aufbauend werden Kreuzungstiere erstellt und im Feld unter Praxisbedingungen getestet, um die Vorteile für die kommerzielle Legehennenhaltung quantifizieren zu können (Partner 1).

Perspektiven

Mit den im Rahmen des FUGATO-Verbundprojekts „*E. coli*-Chick“ generierten Ergebnissen soll ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Infektabwehr bzw. der lokalen und systemischen Immunantwort des Huhnes geleistet werden. Damit ergibt sich nicht nur die Möglichkeit neuer Selektionsstrategien in Geflügel-Zuchtprogrammen, es werden gleichzeitig auch wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung von Impfstoffen und deren Anwendung bzw. Anwendungszeitpunkte gewonnen. Im Hinblick auf die Bekämpfung der aviären Colibakteriose wird der Verfügbarkeit einer wirksamen Vakzine größte Bedeutung zugesprochen, da der Einsatz prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen aufgrund des meist perakuten Verlaufs der Erkrankung, der Leistungsminderungen, den notwendigen Wartezeiten, der Anwendungsdauer und nicht zuletzt wegen der Ausbreitung von Multiresistenzen nur sehr eingeschränkt zu empfehlen ist. Darüber hinaus werden sich aus den gewonnenen Daten auch neue oder verbesserte Impfstrategien gegen andere bakterielle und virale Infektionserreger des Geflügels ableiten lassen.

Die Etablierung resistenterer Hühnerlinien und die Entwicklung eines Impfstoffes, der auch genetisch weniger resistente Tiere

vor einer Erkrankung schützt, können mittel- bis langfristig zur weitgehenden Vermeidung der aviären Colibakteriose und den damit verbundenen wirtschaftlichen Verlusten führen. Durch die Marker-gestützte Selektion der resistenten Linien können außerdem künftige Tierversuche weiter reduziert und damit ein aktiver Beitrag zum Tierschutz geleistet werden.

Das Huhn war das erste landwirtschaftliche Nutztier, dessen Genom komplett sequenzanalysiert vorlag. Aufgrund der relativ einfachen Haltungsbedingungen und kurzen Generationsintervalle wird das Huhn als Modell für andere landwirtschaftliche Nutztiere eingeschätzt, bei denen Infektionen mit *E. coli* ebenfalls eine große Rolle spielen. Lösungsansätze aus diesem Verbundprojekt können demnach auch für andere Nutztiere herangezogen werden, von denen derzeit noch keine vollständige Genomsequenz oder Techniken zur Expressionsanalyse zur Verfügung stehen.

Literatur

1. Burnside et al. (2005) *Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis. BMC Genomics* 6:13. 2. Hang et al. (2003) *Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with Vibrio cholerae. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 8508-8513. 3. Hensel et al. (1995) *Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science* 269: 400-403. 4. Schena et al. (1995) *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science* 270: 467-470. 5. S. Reese, G. Dalamani, B. Kaspers *The avian lung-associated immune system: a review Vet. Res.* 37, 1-14 (2006)

Kontakt

Prof. Dr. Bernd Kaspers
 Institut für Tierphysiologie, München
 E-Mail: kaspers@tiph.vetmed.uni-muenchen.de
 www.vetmed.uni-muenchen.de/tiph_p

Arbeitsaufträge

1. **Formulieren Sie Gründe für die Erforschung der Wirt-Erreger-Interaktionen bei *E. coli*-Infektionen. Stellen Sie in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Zusammenarbeit der verschiedenen Forschungseinrichtungen dar.**
2. **Wiederholen Sie in Gruppen folgende Sachverhalte:**
 - a) **Vorkommen, Bau und Bedeutung von *E. coli***
 - b) **angeborene und erworbene Immunität**
 - c) **Durchführung der PCR**
 - d) **Genexpression**
3. **Erarbeiten Sie ein Kurzreferat zum Thema: „Moderne Methoden bei der Identifizierung neuer Virulenzdeterminaten von APEC“.**
4. **Informieren Sie sich über aktuelle Ergebnisse dieser Forschung.**