

## UNTERSUCHUNG ZUR INDUKTION EINER PROTEKTIVEN IMMUNANTWORT VON FORELLEN NACH ARTIFIZIELLER INFEKTION MIT *AEROMONAS SALMONICIDA SALMONICIDA* (A.S.S.)

Günter Kotterba<sup>1</sup>, Dieter Fichtner<sup>1</sup>, A. Rebl<sup>2</sup>; H. M. Seyfert<sup>2</sup>; Sarah Burr<sup>3</sup>, Bernd Köllner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

<sup>2</sup>Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftliche Nutztiere, Dummerstorf

<sup>3</sup>Universität Bern, Institut für Veterinär bakteriologie

### Zusammenfassung

Die Arbeiten konzentrierten sich auf die Charakterisierung der Immunreaktionen von Forellen, die wesentlich für den Krankheitsverlauf und den Ausgang der experimentellen Infektion mit *Aeromonas salm. salm. (A.s.s.)* sind.

Mittels Analyse der Expression von Molekülen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems auf mRNA - Ebene und durchflusszytometrischer Messung der Kinetik der Leukozytenpopulation im Blut und in den lymphatischen Organen wurde die Immunreaktion klinisch gesunder, moribunder und rekonvaleszenter Forellen nach experimenteller Monoinfektion mit einem A.s.s. -Wildtyp-Stamm und der apathogenen A.s.s.-Mutante JF 2747-  $\Delta$ ascV\* verglichen.

Die Mutante unterscheidet sich gegenüber dem Wildtyp durch eine Deletion der inneren Membranverankerung des Typ-III-Sekretionsapparates, die das Studium der Immunreaktionen ohne Mortalitätsgeschehen vergleichend ermöglicht.

Mit dem A.s.s.-Infektionsmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von

MHC II und TLR mit der Schwere der Klinik korreliert. Die Analyse der Expression von TLR (angeborenes Immunsystem) und MHCII (erworbenes Immunsystem) zeigt, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems über den Ausgang der Infektion entscheidet. Anhand der ab dem 10. Tag nach Belastung mit der A.s.s.-Mutante in Milz, Kopfniere und Darm festgestellten deutlich erhöhten Expression von MHC II ist eine ausgeprägte humorale Immunantwort nachweisbar.

\* Die Mutante erhielten wir von der Universität Bern; Institut für Veterinär bakteriologie

### Summary

We characterized the immune responses in trout, which are essential for the survival after an experimental infection with *Aeromonas salmonicidas salmonicidas (A.s.s.)*.

As a model, a pathogenic wild type A.s.s. and a non-pathogenic mutant ( $\Delta$ ascV\*) were used. The  $\Delta$ ascV mutant has a deletion of the inner membrane anchor part of the Type III secretion complex, causing a dysfunction in the secretion of bacterial toxins into phagocytotically active leukocytes.

The approach used is based on the comparison of mRNA expression of surface molecules and cytokines and the characterisation of leukocyte kinetics in the blood and lymphatic organs by flowcytometry in healthy, moribund and convalescent trout.

A significant correlation between expression level of MHC II and TLR and development of clinical symptoms was found. Moreover, mRNA expression levels of TLR (innate immune system) and MHC II (adaptive immune system) indicated that the activation of the innate immune system is decisive for the clinical outcome after infection with pathogenic A.s.s.

Ten days post infection with the  $\Delta$ ascV mutant, a significant increase in the expression of MHC II in spleen, head kidney and the intestine of the fish revealed a marked humoral immune reaction.

## Einleitung

Unter Verwendung reproduzierbarer Infektionsmodelle mit A.s.s. und dem *Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV)* untersuchen wir die Wechselwirkung dieser beiden Pathogene in Forellen (*Oncorhynchus mykiss*). In Abhängigkeit von der Reihenfolge und dem zeitlichem Abstand des zur Mischinfektion eingesetzten bakteriellen und viralen Infektionsmodells werden unterschiedliche Mortalitäts- und Kontaktinfektionsraten und Persistenzen festgestellt (Kotterba et al., 2004).

Um die Immunreaktionen der Forellen zu charakterisieren, die entscheidend für den Krankheitsverlauf und den Ausgang einer experimentellen Infektion sind, wurden die Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene fortgesetzt. Im Folgenden werden die ersten Ergebnisse der Analyse des Toll like Rezeptors (TLR) und des Haupthistokompatibilitäts-komplexes II (MHC II) auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR nach experimenteller Infektion mit einem A.s.s.-Wildtyp und einer A.s.s.-Mutante vorgestellt.

## Material/Methoden

Die Untersuchungen wurden mit 11 und 16 Monate alten Forellen der Linie Steelhead 2 durchgeführt, die unter konstanten Licht- und Wasserbedingungen (12 h Kunstlicht ca. 30 lux, 10 °C Wassertemperatur) in kreislaufbetriebenen 400 l – Aquarien gehältert wurden. Den Forellen wurde ein pathogener A.s.s. – Wildtypstamm (Eigenisolat, F 61/05) bzw. eine apathogene A.s.s. – Mutante JF 2747- $\Delta$ ascV intraperitoneal (i.p.) mit einer ID von  $1 \times 10^5$  KBE/ml appliziert. Die Mutante unterscheidet sich gegenüber dem Wildtyp durch eine Deletion der inneren Membranverankerung des Typ III-Sekretionsapparates, die dadurch für Forellen apathogen ist. Mit Hilfe dieser Mutante konnten die Immunreaktionen an Forellen ohne Mortalitätsgeschehen vergleichend zum Wildtyp untersucht werden.

Im Folgendem werden die Ergebnisse der relativen Expressionen von Toll Like Rezeptor (TLR) und vom Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) nach A.s.s.-Infektion und nach Applikation einer apathogenen A.s.s.-Mutane vergleichend dargestellt.

Die relative Expression der untersuchten immunrelevanten Moleküle wurde mittels der quantitativen Real Time PCR mit spezifischen Primern aus peripheren Blutleukozyten (PBL), aus Organmaterial von Milz und Kopfnieren und aus intraepithelialen Leukozyten (IEL) bestimmt. Durch Zugabe einer definierten Menge der internen Kontroll-RNA (IC 2) wurden die Expressionswerte normalisiert, der  $\Delta$ ct-Wert berechnet und die relative Expression nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Expressionshöhe} = 2^{(\Delta\text{ct-Wert})} \times 100\%$$

## Ergebnisse

### 1. Mortalität nach Infektion mit einem A.s.s.- Wildtyp

Drei Tage nach der i.p. Infektion verenden die ersten Forellen. In den folgenden Tagen erhöhen sich die Verluste ständig. Ab dem 10. d p.i. hat das Verlustgeschehen die Plateauphase erreicht.

Bei der Auswertung der Versuche wurde der Mortalitätsverlauf durch eine entsprechende Gruppeneinteilung berücksichtigt. Im A.s.s.-Infektionsversuch werden die Daten von mori-

bunden (3. – 9. d p.i.) und von rekonvaleszenten Forellen (ab 10. d p.i.) mit den Werten der Kontrollfische verglichen. Wegen der ausbleibenden Klinik wurde der Mutantenversuch mit den gleichen Zeitfenstern ausgewertet.

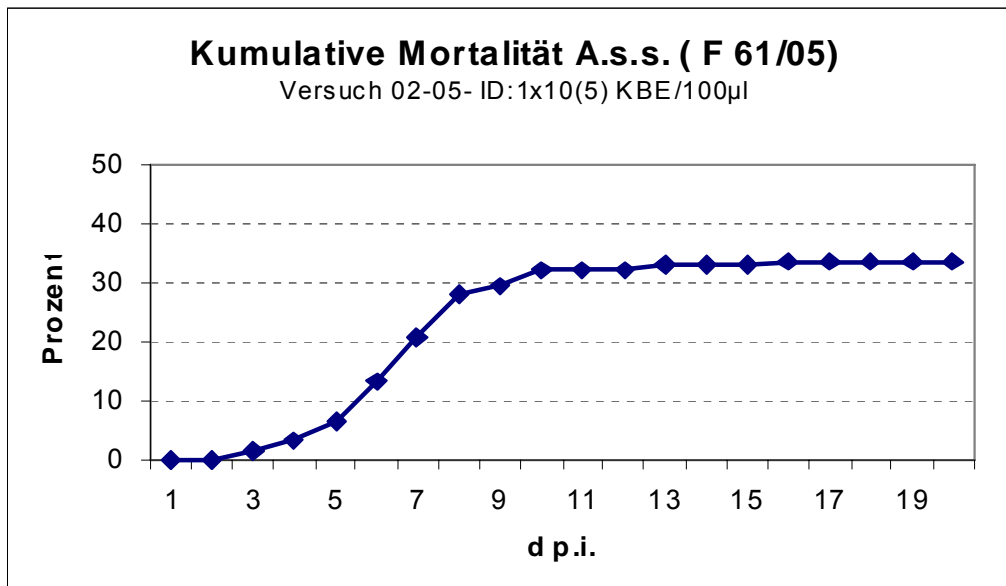


Abb. 1: kumulative Mortalität von 11 Monate alten Steelhead 2 – Forellen nach Infektion mit A.s.s.

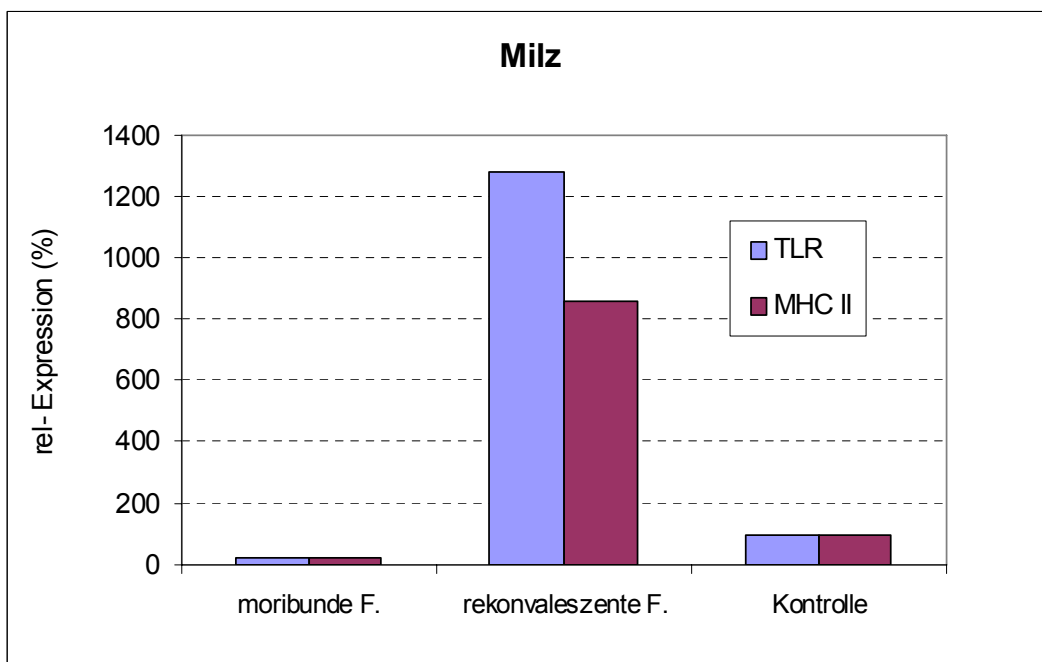


Abb. 2 : MHC II- und TLR – Expression in der Milz nach Infektion mit A.s.s.- WT (moribund: 84 h- 9. d p.i.; rekonvaleszent: an 10. d p.i.)

## 2. Expression von Toll-like-Rezeptor (TLR) und des Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II)

In der Abb.2 ist die relative Expression von MHC II und dem TLR-Rezeptor nach Infektion mit dem A.s.s.-Wildtyp (A.s.s.-WT) dargestellt.

Im Vergleich zu den Kontrollfischen ist bei den rekonvaleszenten Forellen die Expression beider Moleküle in der Milz stark erhöht. Die Werte der moribunden Forellen liegen ca. 70% unter denen der Kontrollen.

Im Versuch mit der A.s.s.-Mutante wurde die Untersuchung der relativen Expression von TLR und MHC II auf die PBL, die Kopfnieren und den IEL ausgedehnt.

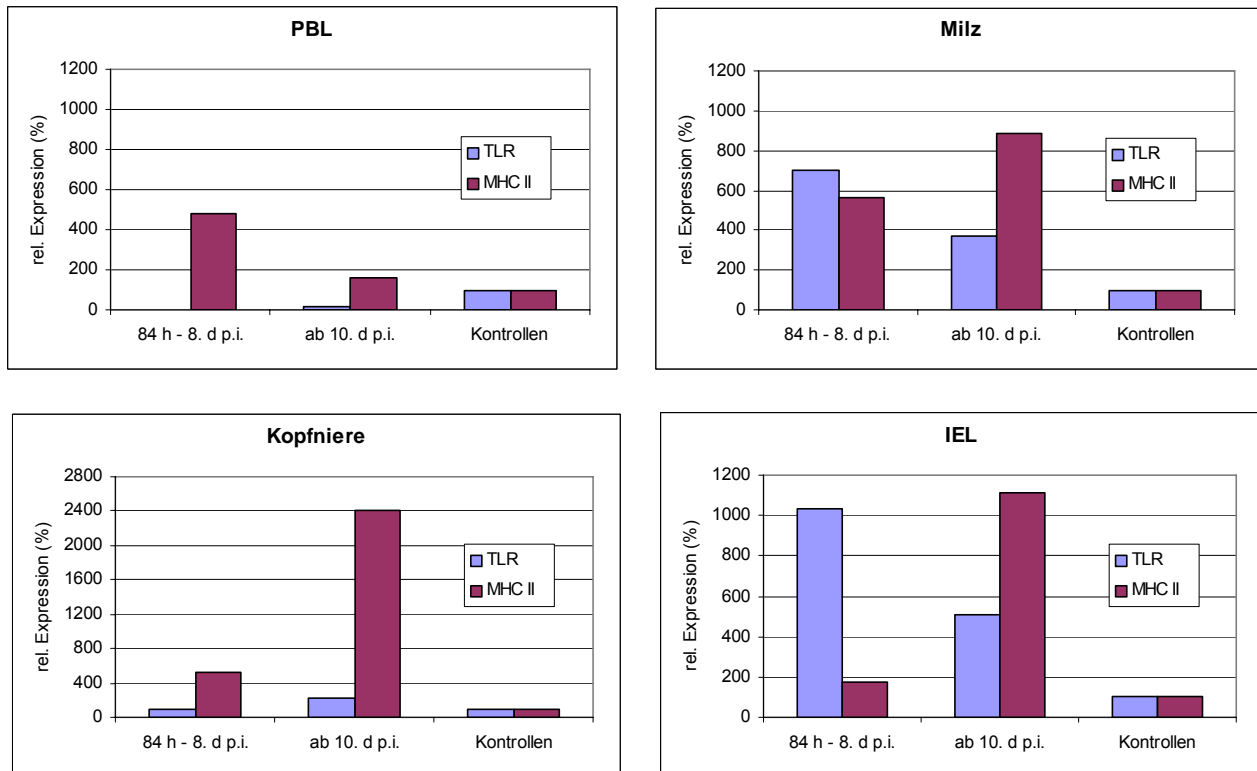


Abb. 3: MHCII - und TLR – Expression nach Applikation mit der A.s.s.- Mutante JF 2747- $\Delta$ ascV

Der Einsatz der apathogenen A.s.s.-Mutante ermöglicht uns kinetische Untersuchungen der relativen Expression von TLR und MHC II als Reaktion von gesunden Forellen auf eine i.p. Applikation von nahezu intakten *Aeromonas* zellen.

Wie in den Diagrammen der Abb. 3 zu sehen ist, wurde über den gesamten Versuchszeit-raum in den PBL und in der Kopfnieren keine bzw. keine erhöhte Expression von TLR nachgewiesen. In der Milz und in den IEL wurde in der Initialphase eine sehr hohe TLR-Expression gefunden, die zum 10. Versuchstag abnimmt. Ein gegensätzlicher Verlauf ist für die Expression von MHC II in Milz, Kopfnieren und in den IEL festzustellen. Im Vergleich zu den Kontrollen sind in diesen Organen bzw. Zellen die MHC II –Expression bereits in der Initialphase mehr oder weniger stark erhöht, verstärkt sich aber ab dem 10. Versuchstag in der Milz und in den IEL auf das 1000 fache, in der Kopfnieren sogar auf das 2000 fache.

### Diskussion:

Beim Vergleich des A.s.s.-Infektionsmodells mit dem Mutantenversuch beschränkten wir uns zunächst auf zwei immunrelevante Proteine, mit denen die Aktivierung des angeborenen und des erworbenen (adaptiven) Immunsystems untersucht werden kann. In der Tabelle 1 sind das Vorkommen und die Funktion der TLR und des MHC II dargestellt.

<b>angeborenes Immunsystem</b>		
Toll Like Rezeptor (TLR)	auf Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Dendritischen Zellen exprimiert	Antigenerkennung über Pathogen-assoziierte molekulare Muster
<b>adaptives Immunsystem</b>		
Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II)	auf Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert	Aktiviert über die CD4+ T-Helferzellen die B-Lymphozyten zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle

Tab. 1: Übersicht über die untersuchten Oberflächenmoleküle TLR und MHC II

Wie in der Abb.2 dargestellt, werden in der Milz von moribunden Forellen für MHC II und TLR Expressionswerte ermittelt, die weit unter denen der Kontrollfische liegen. Für die rekonvaleszenten Forellen wird eine Erhöhung der relativen MHC II - Expression auf das 800 fache festgestellt. Eine Expression von MHC II in gleicher Höhe wird 10 Tage nach der Applikation der A.s.s.-Mutante ermittelt. Es scheint so, als ob beide Versuchsvarianten das adaptive Immunsystem in gleicher Stärke zur Bildung von Antikörper anregen.

Im Gegensatz dazu werden zwischen den Versuchsgruppen unterschiedliche TLR-Expressionen gefunden. Die A.s.s.- Infektion löst in der Milz eine erheblich stärkere TLR-Expression aus, als die Injektion der apathogenen A.s.s.-Mutante. Diese Reaktion ist auf Grund der Funktion der TLR zu erwarten, überrascht allerdings doch, weil sich die Mutante im Zellaufbau vom infektiösen A.s.s.-Stamm nur durch das Fehlen des inneren Membran-ringankers unterscheidet. Die für die moribunden Forellen ermittelten stark reduzierten Expressionswerte für TLR und MHC II sehen wir als einen Grund für den tödlichen Ausgang der Infektion an. Offensichtlich entscheidet die Reaktivität des angeborenen Immunsystems über den Ausgang der Infektion.

Die am Beispiel der Milz dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich beide Infektionsmodelle sehr gut für die Untersuchung der Immunreaktionen der Forellen eignen und der Einsatz der apathogenen A.s.s.-Mutante vergleichende Untersuchungen des Immunsystems ohne Mortalitätsgeschehen ermöglicht.

Bei der Auswertung des Mutantenversuches fällt in der Initialphase eine hohe relative TLR- Expression in der Milz und in den IEL auf. Für die Milz lässt sich dieser TLR-Wert eventuell durch die dort stattfindende Antigenpräsentation erklären, die die TLR tragenden Phagozyten angelockt. Weshalb in der Initialphase für die IEL eine hohe TLR-Expression festgestellt werden kann und im gleichen Zeitraum in den PBL keine TLR-Expression nachgewiesen wird, ist zur Zeit nicht geklärt.

Die in der Milz und in der Kopfniere ermittelten MHC II-Expressionswerte entsprechen der erwarteten Immunreaktionen. In der Milz erfolgt die Antigenpräsentation und mit zeitlicher Verzögerung reifen in der Kopfniere die B-Lymphozyten zur antikörperproduzierenden Plasmazelle aus. Aus diesem Grund erhöhen sich die MHC II - Expressionswerte im Versuchsverlauf. In der Kopfniere wird die höchste relative MHC II - Expression festgestellt.

Wie aus den Diagrammen der Abb. 3 erkennbar ist, wird durch die A.s.s.-Mutante eine ausgeprägte humorale Immunantwort induziert.

Die in den IEL ab dem 10. Tag festgestellte starke MHC II-Expression überrascht und kann zur Zeit noch nicht interpretiert werden.

### **Ausblick:**

Die Untersuchungen werden in gleicher Weise mit dem VHSV – Infektionsmodell fortgesetzt.

### **Dank:**

Joachim Frey

Technische Assistenz: Frau S. Weber, Frau K. Peters

Tierpfleger: Frau B. Berger, Herr J. Spaller

### **Referenz:**

Kotterba G, Bergmann S, Fichtner D; Köllner B. (2004) Untersuchungen zur Wechselwirkung artifizierlicher Mischinfektionen mit *Aeromonas salm. salm.* und dem *Virus der Hämorrhagischen Septikämie* in Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Tagungsband der X. Gemeinschaftstagung der Dtsch., Österreichischen und Schweizer Sektion der EAFP in Stralsund, S. 119-130