

## Wie Säugetiere Infektionen spüren: die zukunftsweisende genetische Analyse der angeborenen Immunität

Meine Damen und Herren, geschätzte Kollegen. Es ist mir ein außerordentliches Vergnügen und eine Ehre, meinen Anteil am diesjährigen Robert-Koch-Preis entgegenzunehmen. Dies ist nicht nur eine Ehrung, von der alle Immunologen träumen, auch die genaue Fragestellung, mit der sich meine Kollegen und ich in unserer Arbeit auseinander gesetzt haben, lässt sich auf Robert Koch selbst zurückführen. Ein kurzer Blick auf die Geschichte wird dies klar machen.

Wie Sie alle wissen, entdeckte Robert Koch, dass Mikroben Krankheiten verursachen. Die Frage, *wie* Mikroben Krankheiten verursachen, folgte unmittelbar darauf und nahm gewiss ständig einen vorderen Platz in seinem Denken ein. Warum verursacht eine Infektion Fieber, Schock und Gewebsschädigung? Warum fühlen wir uns subjektiv krank? Was ist das "Giftige" an Mikroorganismen? Da diese aus Molekülen bestehen, lässt sich daraus ableiten, dass spezifische Moleküle dieser Mikroben alles das auslösen, was uns bei einer Infektion widerfährt. Aber welche sind die Schlüsselmoleküle? Es war ein Schüler Kochs, Richard Pfeiffer, der die frühesten Erkenntnisse dazu lieferte.

Pfeiffer und Koch arbeiteten eng zusammen, und nach Kochs Anweisung begann Pfeiffer mit dem Studium des Erregers der asiatischen Cholera: in der damaligen Zeit in Europa eine furchtbare Todesursache. Um das Jahr 1893 beobachtete Pfeiffer, dass sich der gereinigte Erreger *Vibrio cholerae*, lebend wie abgetötet, außergewöhnlich toxisch auf Meerschweinchen auswirkte – sogar bei Meerschweinchen mit Antikörpern, die sie gegen eine aktive Cholerainfektion schützten. Pfeiffer glaubte, dass ein eng mit dem Bakterium zusammenhängendes, hitzestabiles, giftiges Molekül dafür verantwortlich wäre, und nannte diese Substanz „Endotoxin“.

Während der nächsten fünf Jahrzehnte fand man heraus, dass Endotoxin von praktisch alle gramnegativen Bakterien als Oberflächenmolekül gebildet wird. Man schloss daraus, dass es für viele Auswirkungen einer manifesten Infektion verantwortlich wäre, und rückte es damit in den Mittelpunkt eines intensiven medizinischen Interesses. Die Endotoxin-Effekte waren in einigen Fällen eher „gut“ als schädlich. Beispielsweise erwies sich Endotoxin in den 1950er Jahren als ein Adjuvans, d.h., es zeigte die Fähigkeit, die Bildung von Antikörpern gegen ein gleichzeitig verabreichtes Protein zu fördern. Und es zeigte, dass es zur unspezifischen Resistenz gegen eine Infektion führte. Aber in erster Linie wurde es als Toxin angesehen. Chemische Analysen ergaben, dass Endotoxin aus Fett- und Zuckeranteilen zusammengesetzt war. Aus diesem Grund

wurde es als Lipopolysaccharid oder LPS bezeichnet. Es wurde ebenfalls geklärt, dass viele Moleküle mikrobiellen Ursprungs LPS-ähnliche Effekte aufwiesen. Dazu zählten bakterielle Lipopeptide, Flagellin, doppelsträngige RNA und mikrobielle DNA.

Schließlich fand man heraus, dass die Toxizität des LPS weitgehend vom Typ der Wirtszellen, d.h., der Makrophagen abhängt. Mitte der 1980er Jahre identifizierten, sequenzierten und klonierten meine Kollegen und ich ein Protein aus Mäusemakrophagen, den man heute allgemein als Tumornekrosefaktor oder TNF kennt. Wir zeigten, dass LPS die Bildung von TNF durch Makrophagen induziert und dass TNF wiederum viele der toxischen LPS-Effekte verursachte.

Obwohl LPS in großen Mengen tödlich ist, kommt der Fähigkeit, winzige Mengen davon aufzuspüren, die von einer kleinen Zahl Mikroorganismen gebildet werden, wesentlicher Bedeutung zu, damit der Wirt die Infektion in einem frühen Stadium erfolgreich bekämpfen kann. Wenn LPS nicht „gespürt“ werden können, kann die Infektion außer Kontrolle geraten. Hierin spiegelt sich der zweiseitige Charakter der angeborenen Immunabwehr wider: die ungestüme angeborene Immunreaktion, die sich herausbildete, um mit geringgradigen Infektionen fertig zu werden, kann paradoxerweise den Wirt schädigen, wenn sich die Infektion weiter ausbreitet. Dies ist die Grundlage für die Entwicklung eines septischen Schocks.

In den 1970er und 1980er Jahren wurde die genaue Struktur des LPS-Moleküls aufgeklärt, und der toxische Anteil „Lipid A“ des LPS künstlich synthetisiert. Dabei war man fest davon überzeugt, dass, wenn man verstand, wie LPS aufgespürt wird, es möglich wäre, den Mechanismus zu verstehen, durch den *alle* bakteriellen Auslöser aufgespürt werden.

Da LPS sogar bei einer Verdünnung von unter 1 Milliardstel Gramm pro Milliliter eine Makrophagenreaktion auslöst, glaubte man, dass ein Rezeptor von spezifischer hoher Affinität das Molekül entdeckt. Aber der Rezeptor für LPS entzog sich jeglichen Ansätzen der biochemischen Forschung, sodass zu seiner Identifizierung ein rein genetischer Ansatz erforderlich war.

Der Schlüssel zur Identifizierung des LPS-Rezeptors lieferte uns die Natur. Im Jahr 1965 fand man heraus, dass ein einzelner Stamm der C3H-Maus (C3H/HeJ) gegen die tödliche Wirkung des LPS hochresistent war. Zu rechten Zeit stellten sich bei diesen Tieren alle zellulären Effekte des LPS, auch die von mir erwähnten, als fehlend heraus. Andererseits wiesen die Stämme C3H/HeN, C3H/OuJ und alle anderen C3H-Stämme normale Reaktionen auf LPS auf.

Dies ließ vermuten, dass sich eine Spontanmutation, die den sog. *Lps*-Locus betraf, in den C3H/HeJ-Mäusen aus den frühen 1960er Jahren festgesetzt hatte.

Somit war ein einzelnes Gen für alle LPS-Reaktionen erforderlich. Es wurde weitgehend postuliert, dass es sich hier um ein Gen handelte, das den LPS-Rezeptor kodiert. Das Auffinden des Gens würde zweifellos sehr viel dazu erklären, wie Erreger aufgespürt werden und wie sie Schaden anrichten können. Etwa in den späten 1980er Jahren wurde es möglich, Gene durch einen Ansatz zu finden, der als „Positionsklonierung“ bekannt war, auch wenn man überhaupt nichts über die Proteine wusste, die sie kodierten. Wir beschlossen daher, die Bildung von TNF zu verfolgen, um genetisch den *Lps*-Locus zu kartieren und das *Lps*-Gen zu klonen.

Dies wurde zu einer 5-jährigen Arbeit, die zwischen 1993 und 1998 in meinem Labor geleistet wurde. Wir bewiesen zunächst, dass die *Lps*-Mutation zwischen zwei Punkten auf dem Mäusechromosom 4 lag, zwischen denen sich ca. 2,6 Millionen DNA-Basenpaare erstreckten. Dann klonen wir alle genomische DNA innerhalb dieses Intervalls in einer Reihe sich überlagernder Stücke. Indem wir den größten Teil dieses Bereichs sequenzierten und diesen mit einer Spezialsoftware sorgfältig analysierten waren wir schließlich in der Lage, die darin enthaltenen Gene zu finden und eine einzelne Basenpaarveränderung aufzuzeigen, die die C3H/HeJ-Mäuse von allen anderen Mäusen unterschied.

Wie viele unter Ihnen wissen, kodiert das fragliche Gen ein Protein, das als Toll-like Rezeptor-4 bezeichnet wird. Durch dieses Molekül manifestieren sich alle LPS-Effekte: „gute“ wie „böse“ Effekte. Dieses Molekül initiiert alle Wirkungen, die Pfeiffer und Koch über ein Jahrhundert zuvor beobachtet hatten. Ebenfalls durch dieses Molekül empfinden Säugetiere, dass sie infiziert sind, und beginnen mit der Entwicklung einer Immunreaktion.

Der Befund, dass alle LPS-Signale durch eine einzelne Nukleotidänderung im *Tlr4*-Gen gelöscht werden, war ein Sieg des Minimalismus. Umso bemerkenswerter war es in Anbetracht der Arbeit an *Drosophila*, über die Dr. Hoffmann gerade berichtete. Dieselbe Familie von Molekülen, die Fliegen vor der Infektion schützt, schützt auch Säugetiere vor einer Infektion. Die Mutation der C3H/HeJ-Maus nach 5-jähriger Suche zum ersten Mal zu sehen war sicherlich der aufregendste Moment meiner Karriere, und er bereitete die Bühne für viele weitere Entdeckungen. Bei Mäusen wissen wir jetzt, dass es dort 12 TLRs gibt, beim Menschen sind es 10. Jedes TLR erkennt einen unterschiedlichen Molekül-Typ, der durch eine breite Taxa von Mikroorganismen gebildet wird. Auf diese Weise vermittelt jedes TLR ein bestimmtes Maß an Schutz gegen Infektionskrankheiten. Fehlen jegliche TLR-Signale, sind Mäuse in ihrer Immunabwehr schwer beeinträchtigt und werden selten die Säugezeit überleben.

Natürlich würden wir gern Bilder zeichnen, um unsere Gedanken zu strukturieren, doch es fehlt noch vieles an einem solchen Bild. Es kann sein, dass zahlreiche andere Proteine erforderlich sind, damit der Toll-like Rezeptor korrekt funktioniert, aber wir wissen von solchen Proteinen einfach noch nichts. Das *Lps*-Gen wurde geklont, indem man beim Phänotyp - der Endotoxin-Resistenz – begann und auf diese Weise lässt sich möglicherweise jegliches Gen finden, indem man am Phänotyp ansetzt und die Positionsklonierung der ursächlichen Mutation durchführt. Das Problem der heutigen Biologie besteht darin, dass es nicht genug aussagekräftige Phänotypen gibt und wir uns daher auf den Weg machen, diese zu schaffen. Die generelle Strategie, beim Phänotyp zu beginnen und ihn zu benutzen, um wesentliche Gene zu finden, bezeichnet man als „Forward-Genetik“.

Mein deutscher Freund und Kollege, Professor Rudi Balling, ein Pionier auf diesem Gebiet, brachte mich zuerst darauf, dass die Zeit reif ist, um die zufällige Keimbahn-Mutagenese für die Züchtung von Mäusen mit erblichen Anomalien der angeborenen Immunabwehr zu nutzen. Bis heute haben wir über 50 Mutationen erzeugt, die die angeborene Immunabwehr des Säugetiers betreffen, und eine Reihe von ihnen wurde mittels Positionsklonierung identifiziert.

Wir nannten eine der ersten Mutationen, die wir fanden, *Lps2*, da die Mäuse mit dieser Mutation normalerweise weder auf LPS noch auf doppelsträngige RNA reagieren. Nach der Klonierung stellte sich heraus, dass die Mutation ein neuartiges Adapter-Molekül unterbrach, das mit TLR4 wie mit TLR3 interagiert und für dieses doppelte Defizit verantwortlich war. Dieser Adapter unterstützt den MyD88-unabhängigen Signalweg, ursprünglich von Shizuo Akira definiert, und wirkt an etwa der Hälfte der LPS-Signale mit. Eine weitere Mutation, die wir als *oblivious* bezeichneten, zeigte uns, dass CD36 einen Kofaktor beim „Spüren“ der Mikroorganismen mittels des TLR2/TRL6-Weges darstellt. *Insouciant* erwies sich als Mutation des eigentlichen TLR6, und *pococurante* ist ein spezielles Allel von MyD88, das das Signal über den TLR2/TRL6-Heterodimer ermöglicht, nicht aber über andere MyD88-abhängige TLRs.

Einige der interessantesten Mutationen betreffen Signale, die durch Nukleinsäuren initiiert werden, die normalerweise durch TLR3, -7 und -9 entdeckt werden. Alle diese TLRs sind in den Endosomen lokalisiert: kleine Kompartimente innerhalb der Zelle, die die erste Station für das aufgenommene Bakterium oder Virus darstellen. *3d*, eine Mutation, die wir kürzlich identifizierten, betrifft ein Protein, das für die normale Endosomfunktion bedeutsam ist: ein Protein, das niemals zuvor als solches erkannt wurde. *Feckless* deckte einen neuen Kofaktor des TLR3-Signalwegs auf. Und *Lackadaisical* und *Spacey* beeinträchtigen das TLR7- und TLR9-Signal.

*Heedless* stört den Signalweg über TLR4 und kann erstaunlicherweise zwischen chemischen Varianten von LPS, die man als „Rough“- und „Smooth“- Isoformen (Rau- und Glattform) kennt, unterscheiden. So wurden wir in die Lage versetzt, die Signalwege der angeborenen Immunität mit Hilfe von Mutationen in Stücke aufzubrechen, die zufällig ausgelöst und durch Screening und Positionsklonierung isoliert werden. Aber es gibt noch viele weitere Facetten der angeborenen Immunität, die untersucht werden müssen.

Fast 30 weitere Mutationen betreffen die Anfälligkeit gegenüber der Cytomegalovirus-Infektion der Maus. Nach unserer Schätzung leisten etwa insgesamt 300 Gene oder ca. 1% des Genoms wesentliche Beiträge zur angeborenen Resistenz gegen diesen Erreger. Es stellt sich nun die Aufgabe, diese zu finden. Schauen wir in die Zukunft, so können wir von diesen Genen sprechen als Gesamtheit von einem „Maus-Cytomegalovirus-Resistom“. Es wird eine Zeit kommen, in der alle Bestandteile des Resistoms bekannt sein werden. Vernünftigerweise ist anzunehmen, dass das „globale“ Maus-Resistom, die Sammlung der Gene, die eine Resistenz gegen alle Erreger ermöglichen, nicht viel größer ist als das Maus-Cytomegalovirus-Resistom. Auch ist wahrscheinlich, dass das globale humane Resistom dem globalen Resistom der Maus sehr ähnlich ist - wobei Varianten der menschlichen Anfälligkeit gegenüber Krankheit sicherlich in großem Maße durch Polymorphismen innerhalb des Resistoms bestimmt wird.

Es war ein weiter Weg von Robert Koch bis zu diesem Wissen. Doch eigentlich löste Koch dies alles aus, als er eine fokussierte Suche nach Molekülen empfahl, die Infektionssymptome beim Säugetierwirt verursachen. Und über 100 Jahre später nutzen wir genau diese Moleküle, um die angeborene Immunreaktion des Säugetiers zu verstehen.

Großer Dank gebührt Dr. Alexander Poltorak, einem früheren wissenschaftlichen Mitarbeiter meines Labors, der unermüdlich daran arbeitete, die *Lps*-Mutation zu finden; ebenso meinen Kollegen in La Jolla: Drs. Xin Du, Kasper Hoebe, Zhengfan Jiang, Koichi Tabeta, Karine Crozat und Philippe Georgel, die neue Mutationen bilden und finden, die die angeborenen Immunreaktion bestimmen. Ich möchte auch jene Personen dankbar erwähnen, die meinen Werdegang bestimmten: meinen Vater, Dr. Ernst Beutler, Professor Dan Lindsley und der verstorbene Professor Susumu Ohno, die mich alles über Genetik lehrten und denen ich stets dankbar sein werde.

Noch einmal meinen tief empfundenen Dank für diese große Ehre.