

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. Bernd Kaspers, LMU-München

Förderkennzeichen: 2814ERA01D

Vorhabenbezeichnung: MICHIC – Untersuchungen zum mukosalen Immunsystem beim Huhn und seine Reaktion auf Koinfektionen als Basis zur Entwicklung neuer Impfstoffstrategien

Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2015 – 31.12.2018

Berichtszeitraum: 01.09.2015 – 31.12.2018

Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen.

Ziel des Animal Health and Welfare ERA-Net (ANIHWA) war es, die Tiergesundheit und das Wohlergehen der Nutztiere durch die Umsetzung neuer, forschungsbasierter Erkenntnisse zu verbessern. Auf diesem Weg werden die nachhaltige Produktion gesunder Nahrungsmittel unter Reduktion oder Vermeidung der Verwendung von Antibiotika gefördert und wissenschaftsbasierte Grundlagen geschaffen, um neue Konzepte und präventive Maßnahmen in der Praxis umzusetzen. Im Bereich des Wirtschaftsgeflügels spielen Erkrankungen des Respirationstrakts eine herausragende Rolle. Zahlreiche virale und bakterielle Infektionserreger nutzen den Respirationstrakt als Eintrittspforte. Dabei kommt es oftmals zu gleichzeitigen oder sukzessiven Infektionen mit mehreren Erregern. Ziel des MICHIC Projektes war es, an ausgewählten Infektionen mit großer Relevanz für die Geflügelhaltung Koinfektionen im Atemtrakt zu untersuchen, um die immunologischen Abwehrprozesse besser zu verstehen und neue Ansätze für präventive Impfstrategien zu finden. Der Fokus des Projekts lag auf Koinfektionen mit Aviären Pathogenen Influenza Viren (AIV) bzw. Infektiösen Bronchitis Viren (IBV) und Aviären Pathogenen Escherichia Coli (APEC) Infektionen.

Die vom Konsortium (Prof. Dr. Lonneke Vervelde, University of Edinburgh, The Roslin Institute, UK – (RI); Dr. Catherine Schouler, INRA UMR1282 ISP (Infectiology and Public Health), Tours, FR (INRA) und unserer Arbeitsgruppe (LMU)) erarbeiteten Ergebnisse sind im englischsprachigen Abschlussbericht beschrieben. Die Ziele des Projekts konnten insbesondere durch die sehr gute und intensive Kooperation, den unmittelbaren Austausch von neuen Erkenntnissen und von neuen Reagenzien und Technologien bei allen Projektpartnern erreicht werden. So wurde vom Partner RI ein neues Infektionsmodell für die APEC-Infektion erstellt und neue Techniken zur Isolierung von Immunzellen aus der Hühnerlunge entwickelt. Diese konnten nachfolgend im Labor untersucht werden. Der

Partner INRA hat neue Zellkulturtechniken zur Untersuchung von Koinfektionen von Viren und Bakterien etabliert und eine Methode etabliert, bei der Schnitte von Lungengewebe in der Gewebekultur infiziert werden können. Die Projektförderung hat die regelmäßigen Projektgruppentreffen ermöglicht und bei allen Projektpartnern zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses beigetragen. Auf Seiten der LMU nahmen die Doktorandin (Frau Franziska Rohde; inzwischen promoviert in der Animal Health Industrie tätig), die Post-Doktorandin (Frau Dr. Nina Burkhard; inzwischen als wissenschaftliche Assistentin in der AG Immunologie der Tierärztlichen Fakultät tätig), sowie die Arbeitsgruppenleiterin (Frau PD Dr. Sonja Härtle) an den Treffen in München und an den Skype Meetings teil. Zudem haben wir Frau Aline Wilhelm (inzwischen promoviert und im öffentlichen Veterinärwesen tätig) und Frau Dr. Grammatia Zengerling (wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Tieranatomie) an das Projekt assoziieren können. Auch sie waren an den Treffen in München und den Skype Meetings beteiligt. Die Kooperation der Projektpartner besteht aber über das Ende dieses Projektes hinaus und plant eine Fortführung im Rahmen des ERA-NET ICRAD Aufrufs. In der Arbeitsgruppe des Zuwendungsempfängers wurde eine Dissertation erfolgreich abgeschlossen. Nicht zuletzt aufgrund ihrer wissenschaftlichen Arbeit und der daraus resultierenden Publikation (Tumor Nekrose Faktor - α Publikation; DOI: [10.3389/fimmu.2018.00605](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00605)) hat die Dissertantin unmittelbar im Anschluss eine Tätigkeit in einem internationalen Unternehmen des Tiergesundheitsbereichs aufnehmen können. Eine weitere wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe konnte durch die zweite wissenschaftliche Publikation (Pentraxin 3 Publikation; DOI: [10.3389/fimmu.2019.00124](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00124)) des Projekts die Grundlage für eine erste Antragstellung für ein eigenes Projekt bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft schaffen. Beide Mitarbeiterinnen waren in das Forschungsnetzwerk eingebunden und haben die jeweiligen Projektpartner und Partnerinstitute kennengelernt und so erste eigene Netzwerke etablieren können.

Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen.

Die wissenschaftlichen Ergebnisse des Vorhabens werden entsprechen der im Balkenplan des Antrags aufgeführten Ziele beschrieben.

Arbeitspaket 1: Aufgaben 1-4 des Balkenplans

Die Aufgabe im Konsortium war es, eine umfassende Beschreibung der Struktur und Entwicklung des Lungenimmunsystems beim Huhn zu erarbeiten. Da die Identifizierung der verschiedenen Immunzellen in der Hühnerlunge nur mit Hilfe von spezifischen monoklonalen

Antikörpern möglich ist, mussten zunächst geeignete Verfahren für die Isolierung, den Strukturhalt und die histologische Bearbeitung etabliert werden. Wir konnten ein neues Verfahren entwickeln, welches einen hervorragenden Erhalt der Lungenstruktur erlaubt. Die Technologie ist beschrieben und öffentlich zugänglich ([https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21816/1/Wilhelm Alina.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21816/1/Wilhelm_Alina.pdf)). Dabei werden die Lungen unmittelbar nach der Euthanasie der Tiere *in situ* mit einer speziellen Agaroselösung ausgegossen und nach dem Erstarren der Agarose entnommen. Dieses Verfahren wurde von den Projektpartnern übernommen und auch für die Anfertigung von Organpräparaten mit dem Vibratom erfolgreich genutzt. An immunhistologischen Schnitten solcher Ausgusspräparate konnten wir ein umfangreiches Bildmaterial zur Beschreibung des Lungenimmunsystems des Huhns erstellen (Aufgabe 1). Wir haben zunächst weitreichende immunhistologische Untersuchungen an Lungenmaterial älterer Hühner durchgeführt. Im nächsten Schritt haben wir die Lungen von Tieren im Alter von einer Woche, ca. 3 Wochen, ca. 6 Wochen und 12 Wochen untersucht und das ganze Spektrum etablierter Leukozytenmarker verwendet, um ein möglichst umfassendes Bild der Entwicklung zu erhalten (Aufgabe 3). Die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeiten ist, dass die Reifung des Immunsystems beim Huhn beider Geschlechter wesentlich länger dauert, als bisher angenommen. Ein vollständig entwickeltes Immunsystem konnten wir erst nach ca. 8-10 Wochen beobachten. Diese Daten sind von erheblicher Relevanz, da z.B. Masthähnchen bereits im Alter von 5-6 Wochen geschlachtet werden, also zu einem Zeitpunkt, zu dem das Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist. Diese Ergebnisse werden für eine erste Publikation zum Lungenimmunsystem zusammengestellt, die in 2020 veröffentlicht werden soll.

Im Anschluss an diese Untersuchungen haben wir eine Serie an Versuchen durchgeführt, die weitere Informationen zur Partikelaufnahme und Antigenaufnahme liefern sollte. Wir haben hierzu verschiedene, häufig für immunologische Studien verwendete Partikel genutzt (Kohlepartikel, Dextran-Beads, Fluoreszeinthiozyanat (FITC) und auch Proben aus Infektionsversuchen mit APEC Bakterien ausgewertet (Aufgabe 2). Um qualitativ hochwertige histologische Schnitte zu erhalten, waren umfassende Vorarbeiten notwendig. So musste zunächst eine Methode entwickelt werden, bei der die Lunge unmittelbar nach der Euthanasie des Tieres mit einer niedrig schmelzenden Agarose über die Luftröhre ausgegossen wird. Anschließend verbleibt der Tierkörper für 2 Stunden bei 4°C zum Aushärten der Agarose, bevor er zur Entnahme der Lunge geöffnet wird. Die Etablierung setzte zahlreiche Versuche mit verschiedenen Agarosen, Zeitpunkten und Applikationsmethoden voraus. Letztlich haben diese Untersuchungen zur 1.) Lokalisation und Identifizierung von phagozytierenden Zellen in der Hühnerlunge geführt, 2.) mit Hilfe von FITC-Partikeln gezeigt, dass drei Strukturen in der Lunge in besonderem Maße Partikel aufnehmen. Dies sind einmal die Epithelzellen, die die organisierten lymphoiden Strukturen

im primär Bronchus (BALTBronchus Associated Lymphoid Tissue) überdecken und zweitens die Epithelzellen der Atrien. FITC Partikel konnten wir auch in den Makrophagen im Parenchym unter den Epithelien nachweisen. Wie oben aufgeführt, haben wir von dem Projektpartner RI aus APEC-Infektionsversuchen zudem Lungengewebe erhalten. An Hand dieses Materials konnten wir zeigen, dass die Bakterien pathogener Stämme sehr schnell die Epithelien der Atrien infizieren und von dort in 5-10 Minuten bis zu den Lungenkapillaren vordringen. Wir haben die Methode und die Ergebnisse an die Kollegen am Roslin-Institut (UK) weitergegeben, welche diese für weiterführende Untersuchungen zur Isolierung von Immunzellen aus der Lunge (DOI: [10.3389/fimmu.2019.02495](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02495)) und zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion (DOI: [10.1186/s13567-019-0733-0](https://doi.org/10.1186/s13567-019-0733-0)) genutzt haben.

Die Ergebnisse der Arbeiten wurden auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt. Da wir zunächst die Veröffentlichung der Arbeiten zu PTX3 und TNF- α (siehe unten) priorisiert haben, steht die Publikation dieser morphologischen Studien noch aus. Ein erstes Manuskript ist inzwischen erstellt. Die Dissertation ist veröffentlicht ([https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21816/1/Wilhelm Alina.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21816/1/Wilhelm_Alina.pdf)), das Manuskript ist noch in Bearbeitung.

Zusammenfassend konnten wir die Aufgaben 1-4 unseres Balkenplans abarbeiten und auch die Meilensteine 1-3 erreichen.

Arbeitspaket 2: Aufgaben 5-7 des Balkenplans

Die unter 5-7 beschriebenen Arbeiten hatten zum Ziel, die Bedeutung von B-Lymphozyten und Antikörpern bei der Abwehr von APEC-Infektionen zu untersuchen. Wir wollten dazu genetisch veränderte Hühner nutzen, die 2013 erstmals unter unserer Beteiligung beschrieben wurden und die an unserem Institut zur Verfügung stehen. Es handelt sich dabei um Tiere, die einen Immunglobulin Knockout aufweisen, also nicht mehr in der Lage sind, Antikörper zu bilden. Unsere Aufgabe war es, diese Tiere zu züchten und für die geplanten Infektionsversuche bei den Projektpartnern ausreichend Eier zu gewinnen, sobald die Infektionsmodelle sicher etabliert sind. Diese Aufgabe haben wir in den ersten Monaten des Projekts erfüllt. Wie in den Zwischenberichten ausgeführt, wurden während der Vorbereitungsperiode der Infektionsversuche zwei Arbeiten publiziert, in denen beschrieben wird, wie durch die Entfernung der Bursa Fabricii Hühner erstellt wurden, die keine B-Lymphozyten mehr haben. Diese Tiere können ebenfalls keine Antikörper bilden. Infektionsversuche mit APEC an diesen Tieren ergaben, dass Antikörper nur eine marginale Rolle in der Abwehr der APEC-Infektion in geimpften Tieren spielen.

Aus Sicht des Tierschutzes konnten wir eine Wiederholung der Versuche nicht rechtfertigen und haben daher im Konsortium beschlossen, diese Versuche nicht durchzuführen. Die genannten Publikationen deutet aber auf eine wichtige Rolle der T-Lymphozyten im Abwehrgeschehen hin. In Kooperation mit Prof. Benjamin Schusser (TUM München)

konnten wir im Rahmen eines anderen Projekts (Emmy-Noether-Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft) nun auch genetisch modifizierte Tiere gewinnen, die keine $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mehr haben. Im Konsortium wurde daher beschlossen, an Stelle der bisher geplanten Versuche, die Bedeutung der T-Zellen in der APEC Infektion und Impfung mit Hilfe des neuen Tiermodells zu untersuchen. Die hierfür notwendigen Infektionsversuche werden voraussichtlich erst ab Ende 2020 möglich sein, da bei den Projektpartnern vorher keine Stallungen zur Verfügung stehen. Das bestehende Konsortium hat aber beschlossen, die Arbeiten auch über die Laufzeit dieses Projektes hinaus weiterzuführen und eine entsprechende Finanzierung für die Arbeiten zu gewinnen.

Arbeitspaket 3: Aufgaben 8-11 des Balkenplans

Um die Immunreaktionen auf eine APEC-Infektion verstehen zu können, sollten Proben aus Infektionsversuchen durch umfassende Genexpressionsanalysen untersucht werden. Ziel war es, differentiell regulierte Gene zu identifizieren, die mit dem Infektionsgeschehen in einem Zusammenhang stehen. Zwei solcher Gene sollten von unserer Arbeitsgruppe umfassend untersucht werden. Die Infektionsversuche und die Genexpressionsanalysen wurden vom Projektpartner am Roslin-Institut durchgeführt. Die Auswertung dieser und unserer eigenen Genexpressionsanalysen aus früheren Versuchen (Projekt Funktionelle Genomanalyse Tierischer Organismen (FUGATO) des BMBF) führten zu Identifizierung eines als Pentraxin 3 (PTX3) bezeichneten Gens. PTX3 wurde ursprünglich bei Säugetieren als Akute-Phase-Protein identifiziert, beim Huhn war es bis zu unseren Arbeiten nicht beschrieben, trotz seiner wichtigen Rolle in der Abwehr von *E. coli* Infektionen bei Maus und Mensch. Für PTX3 konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Harnwegsinfektionen durch sogenannte Uropathogene *E. coli* (UPEC) spielt. UPEC Bakterien sind mit den APEC Bakterien sehr verwandt, es liegt also nahe, dass PTX3 auch in der APEC Infektion von Bedeutung ist. Wir haben auf Grundlage dieser Überlegungen und da PTX3 eines der am stärksten induzierten Gene während der Infektion war, beschlossen, PTX3 als erstes Kandidatengen für weitere Untersuchungen auszuwählen.

Wir haben zunächst die Vollständigensequenz von PTX3 gewonnen und umfassende vergleichende Analysen mit den PTX3 Proteinen anderer Wirbeltiere durchgeführt. Wir konnten so zeigen, dass das von uns identifizierte Protein tatsächlich dem PTX3 der Säuger entspricht. Für die nachfolgenden Arbeiten haben wir eine quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) etabliert und zeigen können, dass Makrophagen eine wichtige Quelle für das Protein sind. Eine Aktivierung dieser Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* führt zu einer massiven Hochregulation der Genexpression. Auch *in vivo* kommt es nach der Behandlung von Hühnern mit LPS zu einer starken Induktion der

Genexpression in der Milz. Milzproben aus den von unseren Projektpartnern am Roslin-Institut durchgeführten APEC-Infektionsversuchen wurden ebenfalls mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Eine dosisabhängige und frühe (1 Tag post infectionem), massive Induktion (30- bis 150-fache Steigerung der Genexpression) von PTX3 in zwei Hühnerlinien mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für die APEC-Infektion konnte nachgewiesen werden. Bei den Linien handelt es sich um die Linien 7₂ und 15I des Roslin-Instituts, die unterschiedliche MHC-Haplotypen haben. Es wurden jeweils 5 Milzproben der jeweiligen Hühnerlinie untersucht. Aus den Ergebnissen kann erstmals geschlossen werden, dass das im Menschen an der Bekämpfung einer UPEC-Infektion im Harntrakt beteiligte PTX3 in Hühnern bei der Infektion mit dem eng verwandten Erreger APEC ebenfalls eine Rolle spielt. Die Analyse von öffentlich zugänglichen Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq)-Datensätzen ergab außerdem, dass PTX3 auch bei einer Vielzahl anderer Infektionskrankheiten des Huhnes induziert wird. PTX3 kann möglicherweise auch als diagnostischer Parameter in der Geflügelwirtschaft zur frühen Erkennung von Infektionsgeschehen in Beständen genutzt werden. Die Ergebnisse können somit für Folgeprojekte genutzt werden. Die hier beschriebenen Arbeiten konnten wir 2019 in einer der führenden immunologischen Zeitschriften publizieren (Open Access Frontiers. In Immunology 2019 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00124>), eine Kopie der Arbeit liegt dem Bericht bei. Die Publikation wurde bereits über 1000 x angeschaut und trotz der kurzen Zeit seit ihrem Erscheinen auch schon in einer anderen Arbeit zitiert.

Als zweites Kandidatengen konnten wir ein Zytokin identifizieren, von dem bisher angenommen wurde, dass es beim Huhn nicht existiert. Es handelt sich dabei um den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α). TNF- α ist beim Säuger in vielfältiger Weise an der Abwehr von Infektionserregern beteiligt, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei überschießenden und chronischen Entzündungserkrankungen. Da TNF- α sowohl bei Säugetieren, als auch bei Fischen beschrieben wurde, haben zahlreiche Gruppen seit der Publikation des Hühnergenoms nach diesem Zytokin gesucht, allerdings ohne Erfolg. Wir haben seit langem eine enge Kooperation mit der Akademie der Wissenschaften in Prag und konnten zusammen mit Dr. Elleder TNF- α durch umfangreiche Analysen von Vogelgenomen identifizieren. Die Sequenzanalyse zeigte, dass das Gen extrem Guanin und Cytosin (GC)-reich ist, was ursächlich für die Schwierigkeiten bei der Identifizierung war, da klassische Sequenzieretechniken solche GC-reichen Regionen nicht ablesen können. Wir haben Hühner TNF- α auf genomischer Ebene umfassend mit dem TNF- α der Säuger verglichen, das Protein kloniert und als rekombinantes Protein exprimiert. Wir konnten zeigen, dass Hühner TNF- α biologisch aktiv ist und insbesondere von Makrophagen und CD4⁺ T-Lymphozyten gebildet wird. Makrophagen produzieren TNF- α nach Stimulation mit

Lipopolysaccharid (LPS) von *E.coli* und nach einer Infektion der Zellkulturen mit den Bakterien. Zudem führt eine Injektion von *E.coli* LPS zur Bildung von TNF- α in der Milz der behandelten Hühner. Diese Arbeiten wurden inzwischen in *Frontiers in Immunology* (Open Access; *Front Immunol.* 2018 Apr 17;9:605. doi: 10.3389/fimmu.2018.00605; eine Kopie liegt dem Bericht bei) publiziert. Die Publikation wurde inzwischen über 4000 x angeschaut und in 5 Arbeiten zitiert.

Wir planen derzeit weiterführende Untersuchungen zur Biologie von TNF- α beim Huhn im Zusammenhang mit wichtigen Infektionserkrankungen, wie z.B. der Coccidiose als Folgeprojekte.

Die aus den genomischen Analysen des TNF- α Projekts gewonnenen Kenntnisse und Erfahrungen zur Suche nach bisher nicht gefunden Genen beim Huhn haben wir nutzen können, um weitere sogenannte fehlenden Gene („missing genes“) beim Huhn zu suchen. Wir konnten so einen wichtigen Transkriptionsfaktor (FoxP3) identifizieren, der als Marker für regulatorische T-Zellen gilt. Damit hoffen wir, erstmals solche regulatorischen T-Zellen, die für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase von zentraler Bedeutung sind, beim Huhn analysieren zu können.

Die in Arbeitspaket 3 geplanten Arbeiten konnten wir somit vollumfänglich abschließen und die definierten Meilensteine erreichen. Wir konnten für die Forschung am Huhn wichtige neue Erkenntnisse gewinnen und publizieren. Die hohe Zahl der Aufrufe in öffentlichen Datenbanken (PubMed) und der heruntergeladenen PDF Dateien beider Arbeiten unterstreicht deren Relevanz für die Forschung am Vogel.

Arbeitspaket 4 und 5: Aufgabe 12 des Balkenplans

Wir haben in Formalin fixierte Gewebeproben der Lungen aus den Infektionsversuchen am Roslin-Institut erhalten und diese histologisch untersucht, um den Invasionsweg der APEC Bakterien zu analysieren. Bakterien konnten schon wenige Minuten nach der Infektion im Lungengewebe nachgewiesen werden. Sie fanden sich nicht im Bereich der organisierten lymphatischen Strukturen (BALT), sondern im Parenchym der Lunge, in der frühen Infektionsphase im Bereich der Atrien. Da mit der Lichtmikroskopie nicht sicher geklärt werden konnte, ob die Bakterien intra- oder extrazellulär liegen, haben wir umfangreiche elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Mit dieser Methode konnten wir zeigen, dass APEC Bakterien in der Lage sind, in die Epithelzellen des Atriums einzudringen und von dort weiter zu den Gefäßen zu gelangen. Da unsere Projektpartner am INRA eine Lungenepithelzelllinie vom Huhn etabliert haben, wollen wir über den Abschluss dieses Projekts hinaus weitere Untersuchungen zur Invasion an diesen Zellen *in vitro* durchführen.

Wir haben zudem in Zusammenarbeit mit den Partnern am INRA Untersuchungen zur Rolle von Interferon in der Reaktion von Makrophagen auf eine bakterielle Infektion mit APEC untersucht. Interferon wird als Folge einer viralen Infektion (z.B. mit APMV oder IBV) in großen Mengen produziert und beeinflusst die Funktion zahlreicher Zellen, darunter die der Makrophagen und Epithelzellen. Ob diese Wirkung des Interferons eine Auswirkung auf eine sekundäre bakterielle Infektion hat, wurde bisher beim Huhn nicht untersucht, trotz der oft auftretenden Koinfektionen von Viren und Bakterien. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden gemeinsam mit den Kollegen am INRA publiziert (Dev Comp Immunol. 2018 Sep;86:156-170. doi: 10.1016/j.dci.2018.04.025). Unser Beitrag bestand dem Projektantrag entsprechend darin, technische und methodische Unterstützung bei den Makrophagenkulturen zu leisten und zudem die rekombinanten Zytokine und Antikörper zu generieren und für die Arbeiten zur Verfügung zu stellen.

Darstellung und Erläuterung der Angemessenheit von Aufwand und Zeit

Die von uns durchgeführten Arbeiten entsprechen den zeitlichen Planungen im Balkenplan des Antrags. Wir haben somit die Arbeiten ohne zeitliche Verzögerung abarbeiten und damit den Zeitplan einhalten können. Die ausgabenneutrale Verlängerung wurde nötig, da unsere Projektpartner ihre Projektteile erst sehr viel später begonnen haben, als initial vorgesehen. Daher haben wir einen Teil des Probenmaterials aus Versuchen bei dem Projektpartner auch erst verspätet erhalten, womit sich die Analyse über unser ursprüngliches Projektende hinaus verzögert hat. Wie in der Projektplanung kalkuliert, konnten wir die morphologischen Arbeiten bereits im ersten Jahr erfolgreich durchführen und so den Projektpartnern die für nachfolgende Untersuchungen nötigen Daten liefern. Wir haben im gleichen Zeitraum auch Reagenzien für die Projektpartner hergestellt, sodass diese ihre Arbeiten dem Zeitplan entsprechend durchführen konnten.

Wir konnten noch vor Abschluss des Projekts drei Publikationen veröffentlichen, die eine hohe Wahrnehmung durch die Wissenschaftsgemeinschaft erfahren haben, wie die Zahl der Zugriffe auf die Arbeiten zeigt. Dies war nur möglich, da wir sehr fokussiert und gemeinsam mit den Projektpartnern an den einzelnen Projektteilen gearbeitet haben. Der für die Identifizierung, Charakterisierung und die funktionelle Analyse der Kandidatengene PTX3 und TNF- α notwendige Aufwand rechtfertigt die benötigte Zeit. In beiden Fällen wurden zunächst eingehende Analysen von Vogelgenomen durchgeführt, um die Gene zu identifizieren. Anschließend wurden die Gensequenzen aus vielen Einzelanalysen zu vollständigen Sequenzen zusammengestellt. Mit deren Hilfe konnten nachfolgend die Gene kloniert werden und nach Überprüfung der korrekten Sequenzen für die Gewinnung der rekombinanten Proteine in verschiedenen Systemen exprimiert werden. So gelang es, Proteine für funktionelle Untersuchungen zu gewinnen. Für die Funktionsanalysen wurden

bisher nicht verfügbare Testsysteme aufgebaut, mit deren Hilfe eine erste Beschreibung der Eigenschaften der Proteine möglich wurde.

Aufführung von Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Im Projekt gab es keine Arbeiten, die nicht zu einer Lösung geführt haben.

Wie oben ausgeführt, wurden die in Arbeitspaket 2 geplanten Tierversuche an den von LMU bereit gestellten, genetisch modifizierten Tieren aus Gründen des Tierschutzes nicht durchgeführt. Die von uns in diesen Projektteil einzubringende Arbeit haben wir im ersten Projektjahr erbracht.

Darstellung und Erläuterung der wissenschaftlichen und ggf. Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase

Das Projekt hat vielfältige Grundlagen für ein besseres Verständnis 1.) des Lungenimmunsystems des Huhns und 2.) wichtiger, an der Infektionsabwehr beteiligter Faktoren gelegt. Unsere Arbeiten zum Lungenimmunsystem werden Anwendung bei Untersuchungen zu zahlreichen Infektionserkrankungen des Respirationstrakts finden, da sie die Grundlagen für eine gezielte Probengewinnung und die Isolierung von Zellen aus der Lunge bereitstellen. Zudem werden nun erstmals Untersuchungen zu zwei wichtigen Faktoren in der Infektionsabwehr (PTX3 und TNF- α) auch beim Vogel möglich. Zu den relevanten Infektionen zählen u.a. die Aviäre Influenza, die Infektiöse Bronchitis, die Infektiöse Laryngotracheitis, die Infektion mit dem Marek'schen Virus, die APEC-Infektion und auch Parasiteninfektionen, wie die Cryptosporidiose. Unsere Arbeitsgruppe bringt dieses Wissen in aktuelle Projekte mit Partnern an der Freien Universität Berlin (Marek'sche Krankheit), an der LMU München (Cryptosporidiose) und INRA Frankreich (APEC) ein.

Wesentlich weitreichender dürften die Arbeiten zu den neu identifizierten Genen PTX3 und TNF- α sein. Die Akute-Phase-Reaktion (APR) beim Huhn ist nur unzureichend verstanden. In der Human- und Kleintiermedizin ist die Analyse des APR-Proteins C-Reaktives-Protein (CRP) weit verbreitet und eine Routinemethode, um Entzündungsprozesse im Körper nachzuweisen. Vergleichbare Tests gibt es für die Geflügelmedizin nicht. Interessanter Weise ist CRP, welches auch beim Huhn vorkommt, kein aussagekräftiger Marker für eine Entzündung. PTX3 könnte hier eine gute Alternative sein. Ein entsprechendes Interesse von Seiten der Geflügelwirtschaft ist vorhanden, mögliche Anwendungen wurden bei verschiedenen Symposien mit Vertretern aus der Wirtschaft diskutiert. Wenn es gelingt, einen einfachen und preisgünstigen Test zu entwickeln, dann könnte der Nachweis hoher PTX3 Konzentrationen im Blut ein guter diagnostischer Marker für eine Infektion sein und

damit ggf. die Anwendung einer antibiotischen Therapie rechtfertigen, was für Tierärzte in der Bestandsbetreuung relevant wäre.

Die PTX3 Diagnostik bietet damit gute Möglichkeiten für Anschlussarbeiten mit dem Ziel, ein diagnostisches Werkzeug für die Geflügelwirtschaft zu entwickeln. Wir haben in einem unabhängigen Projekt noch einen weiteren Entzündungsmarker identifiziert, der in einem möglichen Anschlussprojekt parallel zu dem in diesem Projekt identifizierten Kandidat weiter verfolgt werden könnte.

Das mit Abstand größte Interesse in der Wissenschaftsgemeinschaft hat die Arbeit zum TNF- α des Huhns erregt. Die Arbeiten an diesem Zytokin stehen beim Huhn noch ganz am Anfang. Da TNF- α ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin ist, ist zu erwarten, dass in den kommenden Jahren zahlreiche Arbeiten aus ganz unterschiedlichen Bereichen TNF- α als Marker für Entzündungsprozesse nutzen werden, z.B. seitens der Futtermittel- und Futtermittelzusatzstoffindustrie. Auf Basis des Nachweises von TNF- α können dann anti-inflammatorische Produkte entwickelt werden, die z.B. die Darmgesundheit beim Geflügel fördern. Ein entsprechendes Interesse von Seiten der Tierernährung wurde auf zahlreichen Kongressen, zu denen ich in meiner Funktion als Projektleiter weltweit eingeladen wurde, deutlich.

War der Einsatz von Bundesmitteln für die Erreichung des geplanten Vorhabenziels ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden?

Wir hätten ohne die finanzielle Förderung aus Bundesmitteln keine der Arbeiten durchführen können. Die LMU stellt keine Mittel für die Forschung zur Verfügung und verweist auf die Notwendigkeit, Drittmittel einzuwerben. Es wäre auch keine personelle Unterstützung von Seiten der Universität gewährt worden. Aus der Erfahrung mit Industriepartnern werden Mittel nur dann bereitgestellt, wenn die Arbeiten entweder unmittelbar zu einem Produkt führen oder aber Fragen aus dem Bereich des Marketings beantworten. Zwischen diesen beiden Bereichen bleibt nur eine Finanzierung aus Bundes- oder Landesmitteln als initiale Förderung für die Implementierung neuer Ideen.

Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer und Darstellung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die Ergebnisse dieses Projekts wurden bisher in drei Publikationen der Wissenschaftsgemeinschaft und möglichen Nutzern verfügbar gemacht. Die Arbeiten zu TNF- α haben zudem zu einer Anfrage der Zeitschrift Poultry Science für einen eingeladenen Beitrag geführt, den Dr. Elleder (Prag) und ich gerne geschrieben haben, um auf die Problematik

der „missing genes“ beim Geflügel hinzuweisen (Poult Sci. 2019 Oct 1;98(10):4373-4374. doi: 10.3382/ps/pez307).

Wie oben ausgeführt, werden derzeit zwei weitere Arbeiten zur Publikation vorbereitet und sollen noch in 2020 eingereicht werden. Eine weitere Arbeit, die aus diesem Projekt hervorgegangen ist (Charakterisierung von FoxP3 positiven regulatorischen T-Zellen) wird ebenfalls in 2020 geschrieben.

Darüber hinaus wurden die Arbeiten von den beteiligten Doktoranden bzw. Post-Doktoranden auf mehreren nationalen und internationalen Tagungen als Posterbeiträge oder als Vorträge präsentiert. Zielgruppen waren hierbei Forscher im Bereich der aviären Grundlagenforschung und angewandten Forschung. Die Arbeiten wurden auf Einladung auf mehr als 15 Veranstaltungen der Geflügelwirtschaft vorgestellt.

Publikationen

1. After TNF- α , still playing hide-and-seek with chicken genes.
Elleder D, **Kaspers B**.
Poult Sci. 2019 Oct 1;98(10):4373-4374. doi: 10.3382/ps/pez307.
2. The Long Pentraxin PTX3 Is of Major Importance Among Acute Phase Proteins in Chickens.
Burkhardt NB, Röhl S, Staudt A, Elleder D, Härtle S, Costa T, Alber A, Stevens MP, Vervelde L, Schusser B, **Kaspers B**.
Front Immunol. 2019 Feb 1;10:124. doi: 10.3389/fimmu.2019.00124. eCollection 2019.
3. The role of type I interferons (IFNs) in the regulation of chicken macrophage inflammatory response to bacterial challenge.
Garrido D, Alber A, Kut E, Chanteloup NK, Lion A, Trotereau A, Dupont J, Tedin K, **Kaspers B**, Vervelde L, Trapp S, Schouler C, Guabiraba R.
Dev Comp Immunol. 2018 Sep;86:156-170. doi: 10.1016/j.dci.2018.04.025. Epub 2018 May 2.
4. Characterization of Chicken Tumor Necrosis Factor- α , a Long Missed Cytokine in Birds.
Rohde F, Schusser B, Hron T, Farkašová H, Plachý J, Härtle S, Hejnar J, Elleder D, **Kaspers B**.
Front Immunol. 2018 Apr 17;9:605. doi: 10.3389/fimmu.2018.00605. eCollection 2018.

Eingeladene Vorträge

Jahr	Gastgeber	Titel
2017	Elanco Deutschland	Funktion des aviären Immunsystems mit Schwerpunkt auf bakteriellen Infektionen
2017	Merial Frankreich	Development and function of the avian immune system
2017	Merial Saudi Arabian	Development and function of the avian immune system
2017	University of Seoul; Korea	Development and function of the avian immune system
2017	Vaxxinova Deutschland	Immunreaktion und Impfung
2017	Boehringer Deutschland	From basic immunology to application in infectious disease research

2018	AB Vista UK	The immune system of the chicken
2018	Boehringer Cancun, Mexico	The respiratory immune system of the chicken
2018	Boehringer Prague	The immune system of the chicken
2018	Landestierärztekammer Sachsen	Structure and function of the respiratory immune system of the chicken
2018	IDA, Tours FR	Advancing avian immunology: from basic research to application
2018	University of Wageningen, NL	Identifying missing immune genes in the chicken genom
2019	Olmix, FR	Development of the avian immune system
2019	Phibro Zambia	Aspects of the avian immune system
2019	Lohmann Cuxhaven	How birds fight infection
2019	Elanco Deutschland	Lokale Immunität und Impferfolg messen
2019	WHO, FAO, Wien	Research focus poultry immunology
2019	Poultry Science Association, USA , Monteal	Development of the avian immune system