

## Abschlussbericht

**„TRANSCRIPTOVAC – Reaktionen des Wirtes auf MKS-Infektionen, unter besonderer Berücksichtigung genetischer Signaturen von Impfung und persistenter Infektion “**

<b>Zahlungsempfänger:</b>	Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik
<b>Förderkennzeichen:</b>	2814ERA02D
<b>Vorhabenbezeichnung:</b>	TRANSCRIPTOVAC
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b>	01.03.2015 - 31.12.2019
<b>Berichtszeitraum:</b>	01.03.2015 - 31.12.2019

## **1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen**

Die ERA-NET Initiative „Animal Health and Welfare“ (ANIHWA) förderte Projekte aus den Bereichen Tiergesundheit und -schutz von Nutztieren, inklusive Fischen und Bienen. Die förderpolitischen Ziele der ANIHWA ERA-NET Initiative setzten auf eine stärkere Vernetzung der internationalen Forschung im Bereich Tiergesundheit, aber auch der jeweiligen nationalen Förderstellen. Dabei sollte vor allem die Kooperation neuer und bestehender Partner vertieft werden, um Synergieeffekte im Bereich Tiergesundheit zu erzeugen.

TRANSCRIPTOVAC vereinte sechs europäische Partner aus den Bereichen Wissenschaft und Industrie, die zum Teil bereits in der Vergangenheit zusammengearbeitet haben. Zusätzlich wurden auch erste Kontakte zwischen bisher einander unbekanntem Partnern ermöglicht. Die Teilnehmer aus Frankreich, Belgien, Schweden und Deutschland entwickelten im Laufe des Projektes ausgeprägte Partnerschaften, die sich auch in zukünftigen Projekten niederschlagen werden und einen nachhaltigen Stimulus für die europäische Forschung im Bereich Tiergesundheit darstellen.

Des Weiteren stellt die Bekämpfung von Tierseuchenerregern eines der zentralen Ziele nationaler und europäischer Programme zur Förderung von Tiergesundheit dar. Dabei spielen sowohl die Erfassung und Kontrolle von Tierseuchengeschehen als auch die Prävention wesentliche Rollen.

Übereinstimmend mit den förderpolitischen Zielen sind die im Rahmen des Projektes erarbeiteten Ergebnisse geeignet, einen Beitrag zur Detektion als auch zur Prävention einer bedeutenden Tierseuche zu verbessern. Hierzu wurden neue diagnostische Marker-Kandidaten identifiziert und neuartige Impfstoffkandidaten evaluiert (siehe Punkt 2 für Details).

## **2 Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse**

Das Virus der Maul- und Klauenseuche (MKSV) verursacht eine der bedeutendsten Tierseuchen bei Klautieren und damit einhergehende ökonomische Verluste gehen in Milliardenhöhe. Zwar existieren heute wirksame Impfstoffe gegen MKSV, doch diese induzieren nur einen kurzen, durch Antikörper vermittelten Schutz vor generalisierten Erkrankungen, aber keine Schleimhautimmunität. Auch in geimpften Tieren, die nicht sichtbar erkranken, findet daher in der Schleimhaut des Nasenrachens eine lokale Virusvermehrung statt. Virale RNA und infektiöses Virus können auch noch mehr als 28 Tage nach Infektion von

Wiederkäuern mit MKSV in den Kopfschleimhäuten, besonders des weichen Gaumens, nachgewiesen werden. Die Bekämpfung der MKS wird durch diese – kausal weiterhin ungeklärte – Viruspersistenz sehr erschwert.

Die Ziele des Projektes waren 1) die Identifizierung von Genexpressionssignaturen der akuten und persistenten MKSV-Infektion und 2) die Entwicklung von neuartigen Vektorvakzinen, mit denen eine verbesserte Schutzwirkung gegen eine MKSV-Infektion erzielt werden kann. Beides dient dem besseren Verständnis der MKS und ihrer effektiveren Vorbeugung und Bekämpfung.

## **2.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse**

### **2.1.1 WP 2: Proteogenomische Untersuchung der Reaktion von Epithelzellen aus dem weichen Gaumen von Rindern auf eine Infektion mit MKSV**

Dieses Arbeitspaket erfüllt die im Zuweisungsbescheid aufgeführten Ziele zum Arbeitspaket 2: „Identifizierung der Immunantwort, einschließlich der Gensignatur, bei einer MKSV-Infektion und sowie bei MKSV-Persistenz“.

Die Hauptaufgabe des Friedrich-Loeffler-Instituts in diesem Teilprojekt bestand in der Identifizierung von Expressionssignaturen während akuter MKSV-Infektion und MKSV-Persistenz im Gewebe des weichen Gaumens von Rindern mittels geeigneter Methoden. Hierzu wurde ein Verfahren basierend auf massiv-paralleler Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenzierung und die notwendige bioinformatische Auswertungspipeline, bestehend aus einer Verknüpfung spezieller Software zur Analyse von Sequenzdaten, etabliert. Bei diesem Verfahren werden Boten-RNAs gezielt aus einer Probe, z. B. einer infizierten Zellkultur oder einem Organstück, extrahiert und ihre genetische Information anschließend entschlüsselt. Die Zuordnung der ermittelten Sequenz zu bekannten Referenzsequenzen in Datenbanken erlaubt die Identifikation und anschließende Quantifizierung im Gewebe exprimierte Gene. Dieses sequenzbasierte Verfahren weist im Gegensatz zu Microarray-basierten Technologien (s.g. Genchips) eine erhöhte Sensitivität und Spezifität auf. Außerdem können mit Sequenzbasierten Verfahren direkt Rückschlüsse auf eventuelle Mutationen und virale Populationen innerhalb einer Probe gezogen werden. Die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen auf RNA-Ebene sollten innerhalb des Projektes mittels Proteomanalysen aus den gleichen Proben verifiziert werden.

Zur Etablierung und Optimierung der Labormethoden und bioinformatischen Auswertung wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt. Dazu wurden Babyhamster-Nieren (BHK) Zellkulturen mit MKSV infiziert und an verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die

Gesamt-RNA isoliert (virale und zelluläre RNA). Die identifizierten Gensignaturen waren zeit- und infektionsspezifisch, ließen aber aufgrund des artifiziellen Zellkultursystems keine eindeutigen Schlüsse auf zugrundeliegende biologischen Vorgänge, wie der frühen und späten zellulären Immunantwort zu. Allerdings konnte die Effizienz der gewählten Extraktionsmethoden hinsichtlich Quantität und Qualität vorab geklärt werden und die bestmögliche bioinformatische Vorgehensweise getestet werden.

Mittels der etablierten Methoden sollten nun gezielt die Gene und Gruppen von Genen identifiziert werden, die die persistente Infektion mit MKSV und/oder eine langanhaltende Immunität gegen das Virus im Rind beeinflussen können.

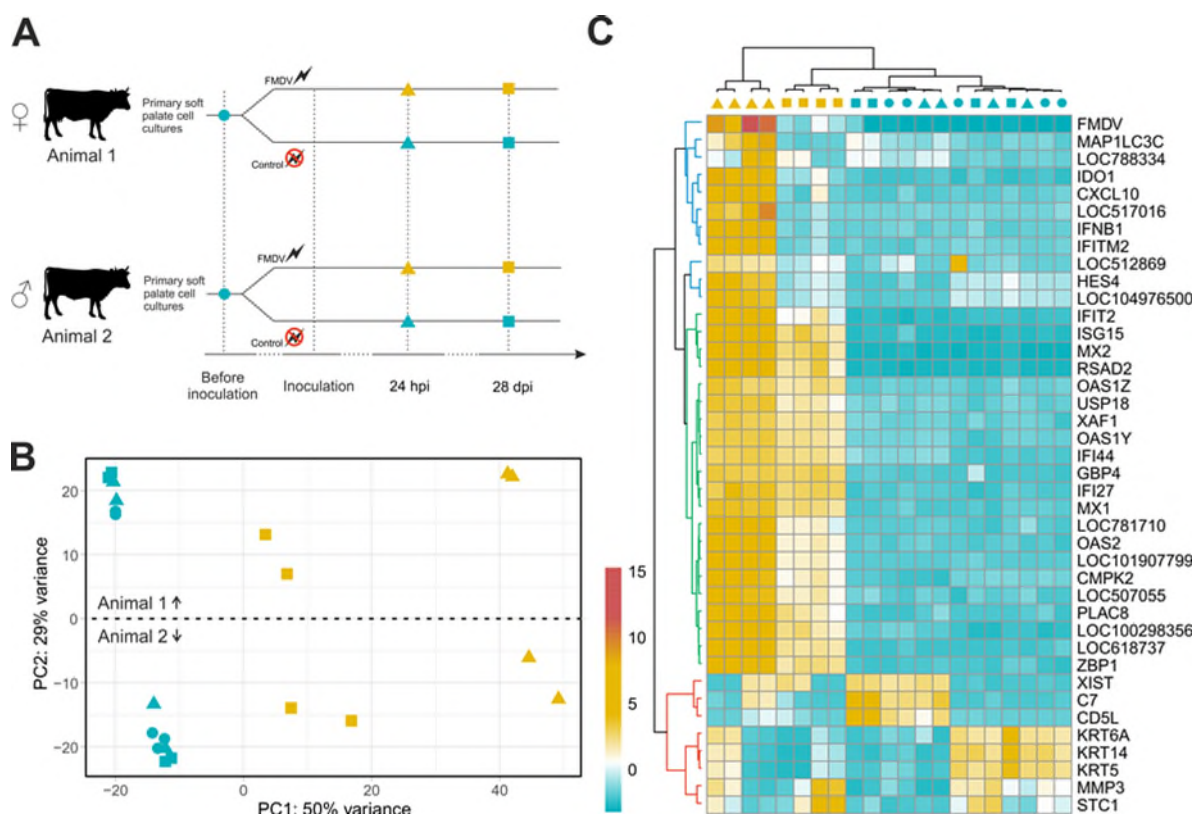


Abb. 1: Versuchsaufbau in WP2 und Ergebnisse der explorativen Datenanalyse.

Hierzu wurden von zwei Tieren primäre Zellkulturen des weichen Gaumens (*soft palate*, SP) hergestellt und auf Membranen in einer Luft/Flüssigkeits-Interphase kultiviert (Projektpartner Schwedische Universität für Agrarwissenschaften; SLU). Diese spezielle Kultivierungsmethode ermöglicht realistische Versuchsbedingungen. Die Zellkulturen wurden mit MKSV infiziert und über mehrere Wochen hinweg beobachtet sowie beprobt (Projektpartner Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail; ANSES). Unmittelbar vor der Inokulation mit MKS-Virus wurden Nullproben für die RNA-Sequenzierung und Proteomanalyse entnommen. Anschließend wurden die Kulturen mit

MKSV infiziert (in Abb. 1A orange dargestellt) oder als nicht infizierte Kontrolle belassen (türkise Symbole). Nach 24 Stunden (Dreiecke) bzw. 28 Tagen (Quadrate) wurden Zellen für die Sequenzierung und Proteomanalyse entnommen, was dem Zeitraum einer akuten bzw. persistenten MKSV-Infektion entspricht.

Zunächst wurde eine rein explorative Analyse der Daten vorgenommen. Basierend auf der normalisierten Transkriptanzahl der 1000 variabelsten Gene wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal components analysis*, PCA) durchgeführt (Abb. 1B). Diese ergab, dass die Proben aus den nicht infizierten Kulturen unabhängig von der Zeit wenig Varianz untereinander aufweisen, während MKSV-infizierte Proben eine klare zeitabhängige Gruppierung zeigten. Dementsprechend nehmen wir an, dass die erste Hauptkomponente (50% der Varianz) die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Proben repräsentiert, die durch die MKSV-Infektion und Inkubationszeit verursacht wurden. Darüber hinaus waren aber auch die Unterschiede zwischen den Tieren deutlich sichtbar und werden durch die Hauptkomponente 2 (29% der Varianz) dargestellt. Die PCA zeigte keine Effekte, die der Probenbearbeitung zuzurechnen sind (s.g. Batch-to-Batch-Effekte) und biologische Replikate vom gleichen Tier lagen eng beieinander (d.h., hatten ähnliche Genexpressionsprofile), was die hohe Qualität der Daten unterstreicht.

Außerdem wurde die Varianz der normalisierten Transkriptanzahl für jedes Gen berechnet. Die 45 Gene mit der höchsten Varianz wurden ausgewählt und visualisiert (Abb. 1C). Die Farbe der Felder in der *Abbildung* zeigt die Abweichung von der mittleren normalisierten Transkriptanzahl des entsprechenden Gens an. Proben und Gene wurden dann anhand dieser Unterschiede in Cluster unterteilt (Baumdiagramme am Rand der *Diagramms*). Das grün markierte Cluster von Transkripten (Genen) wird sowohl durch eine akute als auch durch eine persistente MKSV-Infektion aktiviert, während das blaue Cluster Transkripte enthält, die nur in der akuten Phase der Infektion aktiv sind. Das rote Cluster besteht aus Transkripten, deren Häufigkeit zwischen den Tieren, aber nicht zwischen den Stadien der Infektion unterschiedlich war. So zeigte bereits die explorative Datenanalyse, dass die MKSV-Infektion einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression hat, der deutlich von den tierindividuellen Effekten abgegrenzt werden kann.

Um die Trends aus der explorativen Datenanalyse zu bestätigen und die Transkriptomveränderungen während der akuten und persistenten Infektion genauer zu untersuchen, wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Unterschiede im Transkriptom 24 Stunden nach MKSV-Infektion (hours post infection, hpi) bzw. 28 Tage nach MKSV-Infektion (days post infection, dpi) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen an den gleichen Zeitpunkten untersucht (Abb. 2). Insgesamt 312 bzw. 73 Gene wurden bei 24 hpi bzw. 28 dpi signifikant unterschiedlich exprimiert. Mit 305/312 (97,7%) für

24 hpi und 65/73 (89%) für 28 dpi war die Mehrheit der unterschiedlich exprimierten Gene hochreguliert, während nur 8/312 (2,5%) und 8/73 (11%) herunterreguliert waren (Abb. 2A und B). Von insgesamt 324 unterschiedlich exprimierten Genen zu beiden Zeitpunkten wurden 249 bzw. 10 Gene ausschließlich während der akuten bzw. persistenten Phase reguliert. Die Expression von 63 Genen war in beiden Phasen der Infektion signifikant erhöht (Abb. 2C). Der gegenüber den Kontrollen vom gleichen Zeitpunkt gemessene Unterschied in der Höhe der Expression ( $\log_2$  fold change) dieser Transkripte war bei 28 dpi im Vergleich zu 24 hpi viel geringer (Abb. 2D), wobei die größten Unterschiede zwischen den Phasen für IFIT2, LOC101907799 und CMPK2 beobachtet wurden. Im Gegensatz dazu war der  $\log_2$  fold change für IFI27, PARP9, IFI6 und OAS1Z in beiden Phasen der Infektion vergleichbar oder nahezu gleich. Nur PLAC8 war bei 28 dpi etwas stärker reguliert als bei 24 hpi.

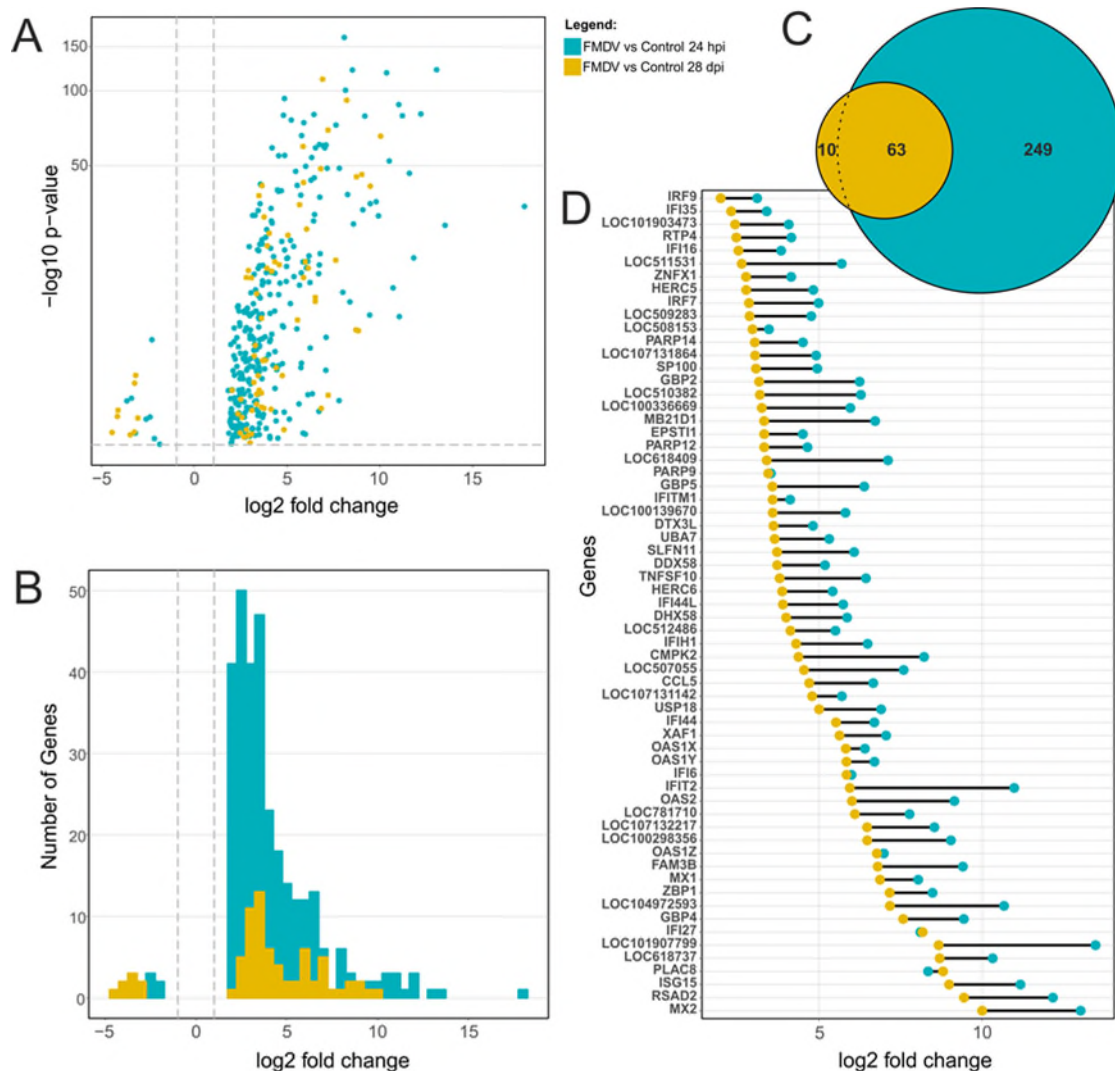


Abb. 2. Differentielle Genexpression in SP-Zellen 24 Stunden bzw. 28 Tage nach MKSV-Infektion.

Die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene während der akuten und persistenten Infektion wurden mit Hilfe der *Reactome*-Datenbank (<https://reactome.org/>) spezifischen Stoffwechsel- und Signalwegen zugeordnet (Abb. 3). Während beider Infektionsstadien stehen die meisten der regulierten Gene in Zusammenhang mit der Interferonantwort, insbesondere den Interferonen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (Abb. 3A). Die Induktion dieser Interferone wird durch den DDX58/IFIH1-Weg vermittelt. Dementsprechend sind eine Reihe von Interferon-stimulierten Genen (ISGs), wie beispielsweise das Ubiquitin-ähnliche ISG15, hochgradig aktiviert. Im Allgemeinen induzieren diese ISGs starke antivirale Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Während der akuten Infektion sind insbesondere Transkripte solcher Gene angereichert, die den Signalwegen Interleukin-1 und -10 sowie dem programmierten Zelltod (Apoptose) zuzuordnen sind. Auch Gene des MHC1-Signalwegs, ein Teil sowohl des angeborenen und als auch des adaptiven Immunsystems, waren bei 24 hpi überdurchschnittlich reguliert.

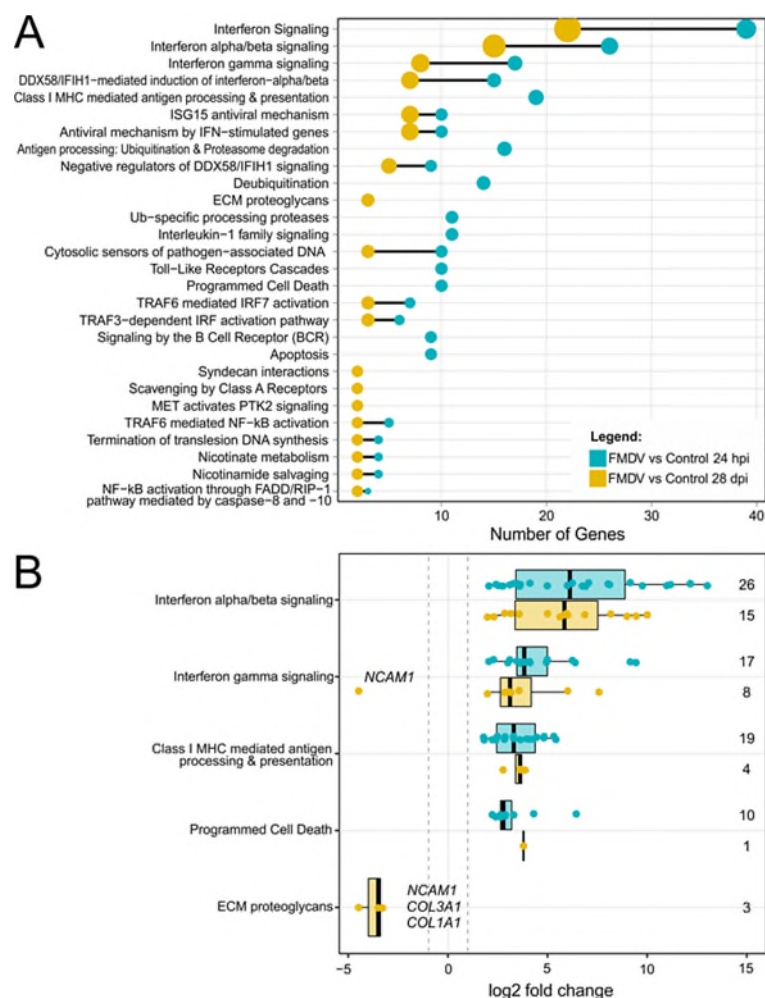


Abb. 3. Analyse der Überrepräsentation einzelner Signalwege (pathway enrichment analysis) unter den signifikant unterschiedlich exprimierten Genen.



Im Gegensatz dazu konnte während der persistenten Infektion (28 dpi) keine überdurchschnittliche und signifikante Anreicherung von Transkripten der Interleukin-1, -10, Apoptose- und MHC1 Signalwege festgestellt werden.

Alle Gene, die in den oben genannten relevanten Signalwegen als signifikant reguliert eingestuft wurden, zeigten immer eine Aktivierung (Hochregulierung) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen vom selben Zeitpunkt. Die einzige Ausnahme hiervon stellte das Gen NCAM1 dar, das u.a. mit der Interferon- $\gamma$ -Antwort in Verbindung steht und während 28 dpi herunterreguliert war (Abb. 3B). Neben NCAM1 wurden auch andere Proteine, die mit der extrazellulären Matrix (ECM) in Zusammenhang stehen, wie z.B. Kollagene vom Typ I und III (COL1A1 und COL3A1), während der MKSV-Persistenz herunterreguliert. Diese Trends wurden auch durch real-time RT-qPCR (Abb. 4) und quantitative Proteomik (ohne Abbildung) bestätigt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass während der akuten Infektion (24 hpi) eine starke Aktivierung der angeborenen Immunantwort festgestellt wurde, die durch die Detektion viraler doppelsträngiger (ds) RNA über die zytosolischen RNA-Sensoren IFIH1/MDA5 und RIG-I/DDX58 ausgelöst zu werden scheint. Die Expression von MDA5 und RIG-I war während der akuten Infektion signifikant erhöht. Während RIG-I Negativstrang-RNA-Viren durch spezifische Bindung an die am 5'-Triphosphat nicht gecappten RNA-Genome erkennt, reagiert MDA5 auf Positivstrang-RNA-Viren, wie z.B. MKSV, durch Bindung an ihre dsRNA-Replikationsintermediate.

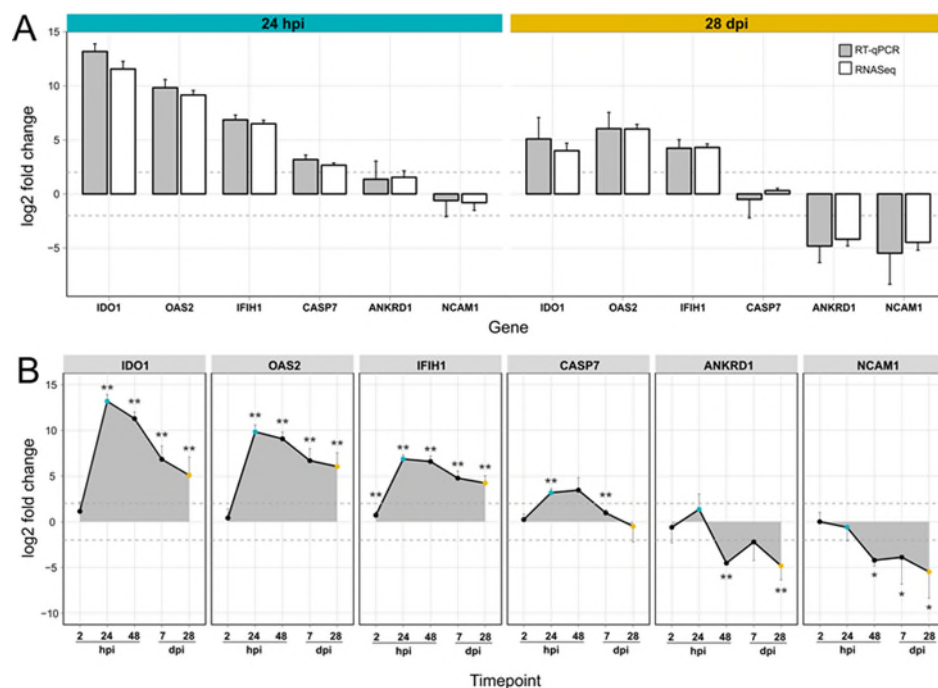


Abb. 4. Überprüfung der Expression ausgewählter Gene durch RT-qPCR zu verschiedenen Zeitpunkten.



Während einer akuten Infektion scheint die interferonvermittelte Induktion von ISGs die Apoptose auszulösen, wie die Analyse der überrepräsentierten Signalwege ergab. Interessanterweise wurden Gene, die mit der Apoptose in Verbindung stehen, wie CASP7, nur während einer akuten Infektion exprimiert und ihre Expression nahm mit zunehmender Zeit nach der Infektion ab (Abb. 3B). Das offenkundige Fehlen apoptotischer Prozesse während einer persistenten Infektion steht im Einklang mit den jüngsten Erkenntnissen anderer Gruppen, die auf eine Hemmung apoptotischer Signalwege in nasopharyngealen Geweben von persistent mit MKSV infizierten Tieren hinweisen. Darüber hinaus beobachteten wir eine spezifische Herunterregulierung von pro-apoptotischen Genen während der Persistenz, wie ALDH1A2, ANKRD1 und SFRP2.

Eine weitere interessante Beobachtung war die Herunterregulation von NCAM1 (CD56), einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, bereits ab 48 hpi und der weitere Rückgang bis 28 dpi. Neben seiner Rolle als Differenzierungsmarker für natürliche Killerzellen ist NCAM1 an der Zellbindung und Migration beteiligt. Die Herunterregulation von NCAM1 ist mit einer verminderten Zelladhäsionsfähigkeit und einer erhöhten Invasivität von Tumorzellen verbunden und wird auch bei anderen Virusinfektionen ausgelöst. Die Expression von HTRA3, einer Serinprotease, die an der Umgestaltung der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt ist, sowie die Expression der ECM-Komponenten COL1A1 und COL3A1 wurden während der anhaltenden Infektion signifikant herunterreguliert. Die Rolle dieser Veränderungen während der Persistenz von MKSV ist derzeit unbekannt, regt aber zu den folgenden Spekulationen an: Die Interaktion von Zellen mit der ECM spielt eine Schlüsselrolle bei der epithelialen Reifung, die wiederum für den Lebenszyklus einiger persistierender Viren wie Papillomaviren entscheidend ist. Auch wenn MKSV und Papillomviren biologisch sehr unterschiedlich sind, ähneln bestimmte Merkmale der MKSV-Persistenz *in vivo* auffallend dem, das auch bei einer Papillomvirusinfektion beobachtet wird - insbesondere der Unterschied zwischen der Verteilung des viralen Genoms, das sich in basalen Schichten anreichert, und dem viralen Antigen, das sich nur in den oberflächlichen Schichten des Epithels darstellen lässt. Diese Segregation hilft Papillomaviren, dem Immunsystem zu entkommen, da ein hohes Maß an Virusvermehrung und Proteinsynthese nur in terminal differenzierten Zellen stattfindet, die keiner Immunüberwachung mehr unterliegen. Ob ein ähnlicher Mechanismus an der Aufrechterhaltung der MKSV-Persistenz beteiligt ist, muss noch untersucht werden. Es ist jedoch schwierig, die komplexe epitheliale Struktur und die ECM-Interaktionen *in vitro* originalgetreu nachzubilden, und die Untersuchungen zur Rolle der ECM bei persistierenden MKSV-Infektionen müssen mit *ex vivo* Gewebeproben durchgeführt werden. Diese Gewebeproben stehen aber, wie im Verlängerungsantrag beschrieben, jetzt zur Verfügung. Nachdem wir im WP2 den großen Nutzen der modernen Proteogenomik für die Analyse transkriptioneller Signaturen von akuten und persistenten MKSV-Infektionen in unserem

naturnahen *in vitro* System zeigen konnten, wurden diese Technologie im Rahmen der Projektverlängerung auf die Gewebeproben aus dem WP3-Tierversuch (siehe 2.2) angewendet, um so zum ersten Mal ein umfassendes Bild der transkriptomischen und proteomischen Veränderungen im Zusammenhang mit der MKSV-Persistenz im natürlichen Wirt zu erhalten (siehe 2.3). Die Aufklärung der zellulären Mechanismen der MKSV-Persistenz wird einen wichtigen Beitrag zur verbesserten Diagnose und Prävention von persistenten Infektionen bei Wiederkäuern leisten.

### **2.1.2 Work Package 3: Tierversuch zur Immunogenität und Schutzwirkung einer rekombinanten CAV-2-MKS-Vakzine im Rind**

Dieses Arbeitspaket erfüllt die im Zuweisungsbescheid aufgeführten Ziele zum Arbeitspaket 3: „Entwicklung einer neuartigen Vektorvakzine“.

Die experimentelle Vakzine basierend auf kaninem Adenovirus (CAV-2) wurde vom Projektpartner ANSES hergestellt und war im Vorfeld erfolgreich an Meerschweinchen getestet worden. Mit dem am FLI durchgeführten Tierversuch sollten zwei Ziele erreicht werden. Einerseits sollte geprüft werden, ob die CAV-2-MKS Vakzine Rinder vor klinischer Erkrankung schützt und die Virusausscheidung nach Infektion mit MKSV reduziert. Darüber hinaus war zu überprüfen, ob CAV-2-MKS bei intranasaler Applikation auch eine lokale Immunantwort hervorruft, durch die die primäre Replikation von MKSV im Nasenrachenepithel verhindert wird und somit keine persistente Infektion entstehen kann. Bei den in den Tierversuch einbezogenen Tieren handelte es sich um circa sechs Monate alte weibliche Holstein-Rinder.

Der Versuch wurde erfolgreich durchgeführt. Es zeigte sich aber, dass die experimentelle Vakzine CAV-2-MKS keine ausreichende Schutzwirkung gegen eine MKS-Erkrankung bietet. Als Positivkontrolle wurden mit einer kommerziell erhältlichen MKS-Vakzine geimpfte Tiere verwendet. Diese erkrankten nicht. Tiere in den anderen Impfgruppen, die die CAV-2-MKS-Vakzine intramuskulär oder intranasal erhalten hatten, zeigten hingegen klinische Anzeichen einer MKS-Erkrankung in ähnlichem Ausmaß wie nicht geimpfte Tieren (siehe Abb. 5 und 6). Die Klassifizierung von Krankheitsbildern erfolgte mithilfe eines Punktesystems (Clinical Scores).

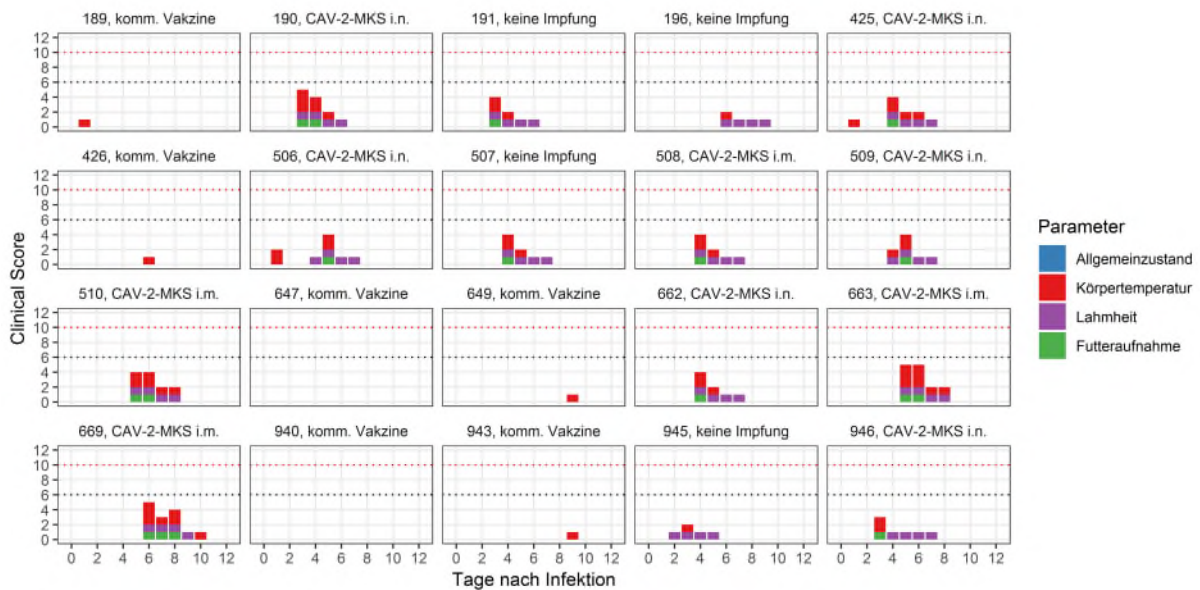


Abb. 5: Klassifizierung von Krankheitsbildern der Tiere im Versuch mithilfe eines Punktesystems.

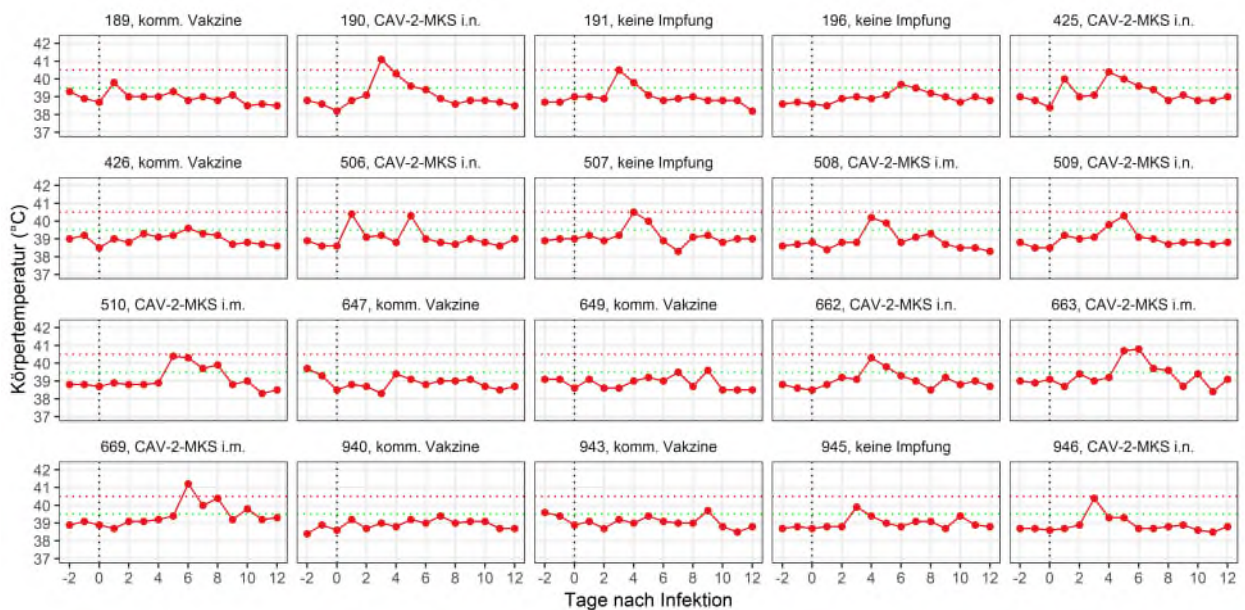


Abb. 6: Körpertemperaturen der Tiere im Versuch

Die virologischen und serologischen Untersuchungen sind abgeschlossen, mögliche Ursachen für das Versagen der experimentellen Vakzine werden aber im Rahmen der Projektverlängerung und darüber hinaus (2020) noch geprüft. Es konnte bereits festgestellt werden, dass 18 der 20 Tiere im Versuch (alle außer Nr. 425 und 662) bei Versuchsende (35 bzw. 37 Tage nach Infektion) eine persistente subklinische MKSV-Infektion aufwiesen. Durch

die hohe Inzidenz persistenter Infektionen lieferte der Versuch einzigartiges und besonders wertvolles Probenmaterial, das auf keine andere Weise hätte gewonnen werden können.

### **2.1.3 Übertragung der gewonnenen *in vitro* Ergebnisse auf das *in vivo* Modell**

Die Proben aus dem MKSV-Impstoffversuch (1.1.2) boten nun die einmalige Gelegenheit, die im WP2 anhand von Zellkulturmodellen erarbeiteten Hypothesen (1.1.1) zur Entstehung der persistenten MKSV-Infektion auch im natürlichen Wirt zu untersuchen.

Mit dem beschriebenen und etablierten Verfahren der RNA-Sequenzierung konnten während des Zeitraums der Projektverlängerung Gewebeproben aus dem Tierversuch eingehend untersucht werden. Hierzu wurden von jedem Rind während der Sektion mehrere Gewebeproben des dorsalen weichen Gaumens (DSP) und des dorsalen Nasopharynx (DNP) gesammelt. DNP und DSP stellen die primären Orte der MKSV-Persistenz dar und bilden zwei Teile eines zusammenhängenden Epithelgewebes im Rachen des Rindes. Mit den etablierten Methoden wurde qualitativ hochwertige RNA aus allen Gewebeproben isoliert. Als Ergebnis der Arbeiten stehen nun insgesamt je 100 DNP/DSP RNA-Präparationen von insgesamt 20 Tieren zur Verfügung. Zusätzlich wurde für jede dieser Organproben eine MKSV-spezifische RT-qPCR (nach 3D-OIE-Verfahren) durchgeführt und die Gewebeproben wurden auf Basis der Untersuchungsergebnisse in „MKSV positiv“ und „MKSV negativ“ eingeteilt. Dieses Vorgehen ermöglichte den direkten Vergleich von fokal persistent infiziertem Gewebe mit MKSV-negativem Nachbargewebe aus dem gleichen Tier. Dieses Vorgehen und Probenmaterial ist nach eigener aktueller Recherche zurzeit weltweit einmalig und von großem wissenschaftlichen Wert.

Als erster Schritt wurde ein ausgewähltes Set von 17 Gewebeproben mittels hochauflösender RNA-Sequenzierung untersucht und pro Probe ca. 10-20 Millionen Reads sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit den bereits im Vorversuch etablierten bioinformatischen Methoden. Die explorative Datenanalyse zeigte deutliche Unterschiede zwischen DNP- und DSP-Gewebe, die sich unabhängig von tierspezifischen Einflüssen darstellen (Abb. 7).

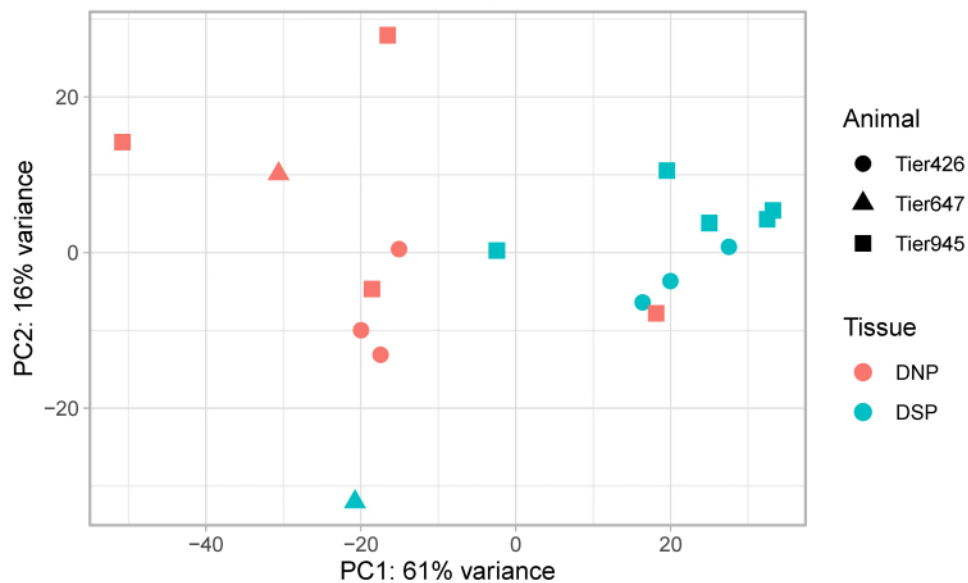


Abb. 7: Hauptkomponentenanalyse von DNP und DSP Proben aus dem *in-vivo* Versuch.

Dieses Ergebnis ist überraschend, da beide Epithelien einen zusammenhängenden Teil der Rachenschleimhaut bilden und sowohl morphologisch als auch funktionell vergleichbar sind. Ob die beobachteten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Geweben zu unterschiedlich verlaufenden MKSV-Infektionen führen oder die Entwicklung der MKSV-Persistenz beeinflussen, ist Gegenstand der weiteren Auswertung und aktuell noch nicht zu beantworten.

Ein Abgleich mit den Persistenz-assoziierten Genmustern, die in dem *in-vitro* Versuch festgestellt wurden, zeigte, dass auch *in-vivo* in einigen Gewebeproben vergleichbare Expressionsmuster identifizierbar sind (Abb. 8). Dies ist allerdings nicht in allen MKSV-PCR positiven Gewebeproben der Fall und scheint auch nicht auf positiv getestete Proben beschränkt zu sein. Im konkreten Fall konnte zumindest in einer Gewebeprobe auch mittels Sequenzierung MKSV RNA nachgewiesen und gleichzeitig eine hohe Expression von Persistenz-assoziierten Genen, die in Verbindung mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems stehen (MX1, OAS2, IFIH1, ISG15,...), festgestellt werden. Diese Probe stammte von einem Tier, das mit dem kommerziellen Impfstoff geimpft und anschließend mit MKSV infiziert wurde und im Verlauf des Tierversuchs keine Anzeichen einer akuten Erkrankung zeigte. Außerdem konnten zwei weitere Proben mit vergleichbaren Persistenz-assoziierten Gensignaturen identifiziert werden, die aber in der MKSV-PCR negativ waren und bei denen auch in der Sequenzierung keine MKSV-RNA gefunden wurde.

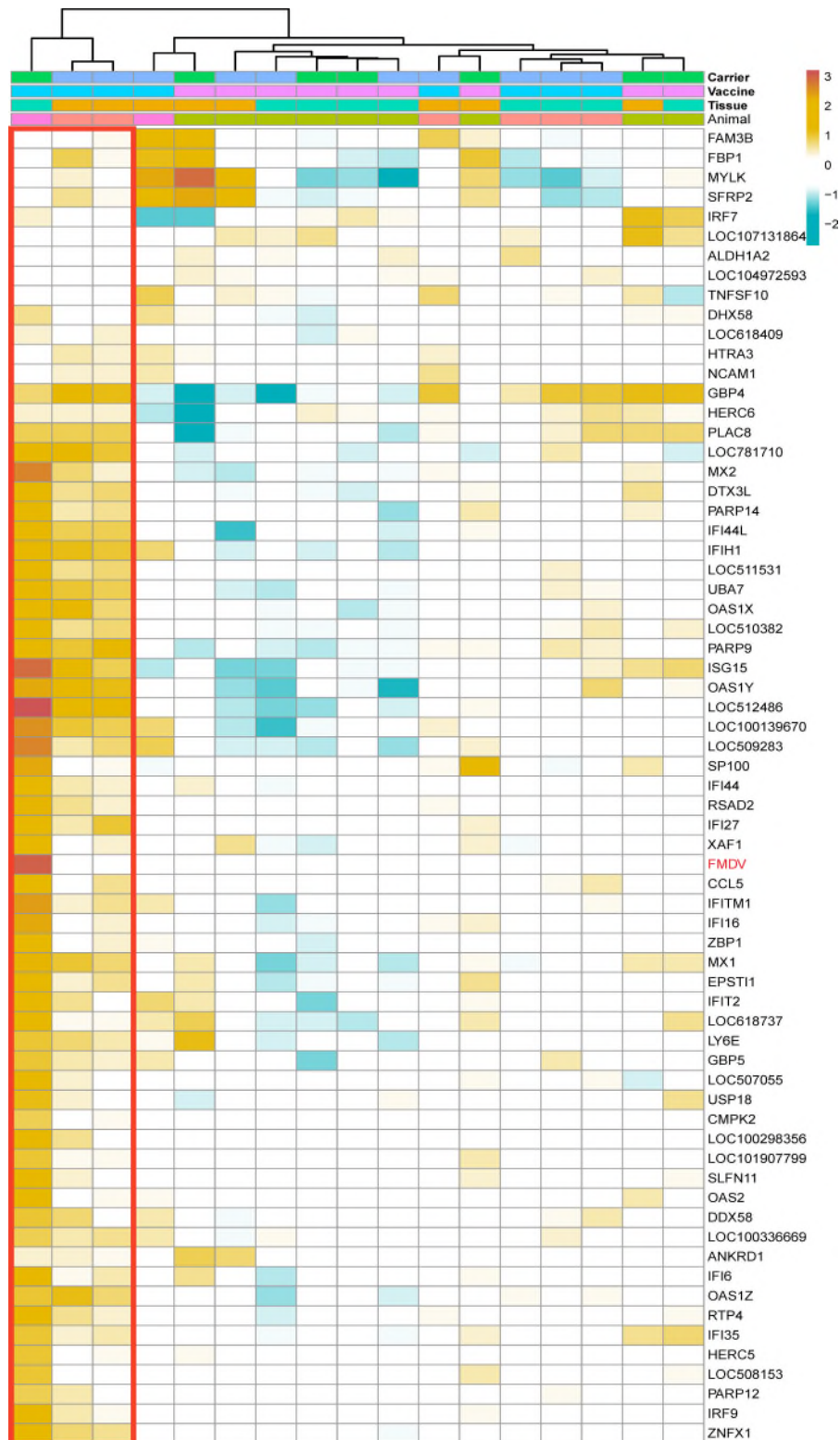


Abbildung 8: Aktivität Persistenz-assoziiierter Gene in ex-vivo Proben.

Die detaillierte Auswertung dieser Daten ist noch nicht abgeschlossen. Sollte der Nachweis der Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus der Zellkultur auf die Situation im Tier gelingen, stellt dies einen Durchbruch in der MKS-Forschung mit unmittelbaren Auswirkungen auf die Diagnostik und Prävention persistenter Infektionen dar. Darüber hinaus könnten dann

zukünftige Untersuchungen zur persistenten Infektion in Zellkultur anstatt in Tieren durchgeführt werden, was sowohl aus ethischer als auch aus ökonomischer Sicht einen großen Fortschritt darstellen würde. Die im Projekt erzielten Ergebnisse legen eine solche Übertragbarkeit zumindest für einen Teil der *ex-vivo* Proben nahe. Abschließende Analysen müssen aber den genauen Zusammenhang klären.

### **3 Angemessenheit von Aufwand und Zeit (“Wirtschaftlichkeit“)**

Die Handhabung des Zellkultursystems und Probenpräparation im Sicherheitsbereich stellten hohe Anforderungen an die Bearbeiter und waren mit einem großen zeitlichen Aufwand verbunden, da das System zunächst etabliert werden musste. Im Vergleich zu einem Tierversuch mit mehreren Rindern in einem Hochsicherheitsstall waren die einmal etablierten Zellkultursysteme aber deutlich günstiger und ethisch unbedenklicher. Damit stellten die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Untersuchungen zu Persistenz von MKSV im weichen Gaumen von Rindern eine erhebliche Verbesserung in Bezug auf den Arbeitsaufwand in Vergleich zu ähnlichen Studien dar. Die Durchführung der Expressionsexperimente in einem zellkulturbasierten System minimierte die durch einen vergleichbaren Tierversuch verursachten Aufwand und Kosten signifikant.

Zusätzlich wurden bei dem geplanten Tierversuch zur Immunogenität und Schutzwirkung einer rekombinanten CAV-2-MKS-Vakzine im Rind mehr Proben genommen als ursprünglich geplant. Diese Proben boten wiederum eine einmalige Möglichkeit die Ergebnisse der zellkulturbasierten Expressionsstudie *in vivo* zu bestätigen. Dabei entstanden keine unnötigen Mehrkosten und der ohnehin geplante Tierversuch wurde optimal ausgenutzt.

Die gewählten „omics“ Systeme zur Untersuchung der Genexpression waren mit hohen Kosten verbunden, sind aber sehr fortschrittlich, da sie die simultane Untersuchung aller Gene oder Proteine in einer Probe erlauben. Dies ermöglichte eine umfängliche Analyse. Vergleichbare etablierte Methoden wie PCR sind zwar günstiger, liefern aber nur Daten zu vorausgewählten Genen und sind für größere Zahlen von Kandidatengen deutlich aufwendiger.

### **4 Aufführung von Abreiten, die zu keiner Lösung geführt haben**

Wie bereits unter 2.2 beschrieben wurde der Versuch zur Immunogenität und Schutzwirkung einer rekombinanten CAV-2-MKS-Vakzine im Rind erfolgreich durchgeführt. Die experimentelle Vakzine CAV-2-MKS zeigte allerdings keine ausreichende Schutzwirkung



gegen eine MKS-Erkrankung. Hingegen konnten eine kommerziell erhältliche MKS-Vakzine die Tiere im Versuch zuverlässig vor klinischen Anzeichen einer MKS-Erkrankung schützen. Tiere in den anderen Impfgruppen, die die CAV-2-MKS-Vakzine intramuskulär oder intranasal erhalten hatten, zeigten hingegen klinische Anzeichen einer MKS-Erkrankung in ähnlichem Ausmaß wie nicht geimpfte Tiere.

## **5 Anschlussfähigkeit**

Außer den Partnern im Projekt gibt es weltweit unseres Wissens nach wie vor keine Arbeitsgruppe, die Untersuchungen mit MKS-Virus an primären Zellkulturen des weichen Gaumens von Rindern auf Membranen an einer Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche durchführt. Bisher publizierte Arbeiten anderer Gruppen beziehen sich überwiegend auf artifizielle permanente Zellkulturen und nicht auf Gewebe vom eigentlichen Wirt und dem Ort der Persistenz.

Daher sind die zusätzlich im MKSV-Impfstoffversuch gewonnenen Proben sehr wertvoll, da sie die Möglichkeit bieten, die Entstehung von persistenten MKSV-Infektion auch im natürlichen Wirt zu untersuchen. Im Rahmen der Projektverlängerung wurde bereits damit begonnen, diese Proben zu bearbeiten und Hypothesen (1.1.1) zur Entstehung der persistenten MKSV-Infektion auch im natürlichen Wirt zu untersuchen, aber eine vollumfängliche Untersuchung steht derzeit noch aus. Eine weitergehende Analyse auf Basis dieser Proben könnte deshalb die Grundlage eines weiteren Forschungsvorhabens bilden.

Des Weiteren bieten sich die hier ermittelten Kandidatengene als mögliche diagnostische Marker einer persistenten MKSV-Infektion an. Umsetzbarkeit und Nutzen müssen aber in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Die während der persistenten MKSV-Infektion regulierten Stoffwechselwege können außerdem in weiteren Versuchen mit geeigneten Substanzen oder Medikamenten gezielt moduliert werden, um deren genaue Rolle zu untersuchen.

## **6 Bewertung des Einsatzes von Bundesmitteln für die Erreichung des geplanten Vorhabenziels (Mitnahmeeffekte)**

Ohne die gewährten Bundesmittel wäre das Projektziel nicht zu erreichen gewesen, da Kernelemente der Experimente wie die Probenvorbereitung (RNA-Isolierung, Bibliotheken-Herstellung) und die Etablierung von Auswertemethoden nicht möglich gewesen wären.

Die etablierten bioinformatischen Methoden werden nun weiterentwickelt und bilden aktuell die Grundlage für ähnliche Expressionsstudien am FLI.

Forschung mit dem MKS-Virus wird weiterhin nur sehr eingeschränkt an wenigen Standorten durchgeführt. Es sind daher keine neuen Erkenntnisse von dritter Seite hinzugekommen, die den Arbeitsplan beeinflussten. Außer den Partnern im Projekt gibt es weltweit unseres Wissens nach wie vor keine Arbeitsgruppe, die Untersuchungen mit MKS-Virus an primären Zellkulturen des weichen Gaumens von Rindern auf Membranen an einer Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche durchführt. Bisher publizierte Arbeiten anderer Gruppen beziehen sich überwiegend auf artifizielle permanente Zellkulturen und nicht auf Gewebe vom eigentlichen Wirt und dem Ort der Persistenz. Seit dem letzten Bericht sind weitere Ergebnisse von Untersuchungen veröffentlicht worden, die mit anderen als im Projekt verwendeten Verfahren, aber auch an von infizierten Rindern entnommenen Proben, durchgeführt wurden. Diese beeinflussten die weitere Durchführung des Vorhabens in der Verlängerung nicht, bieten aber die Möglichkeit, die mit unserer Methode gewonnenen Erkenntnisse mit bestehenden Daten zu korrelieren und so ihre Aussagekraft noch weiter zu steigern.

Erfindungen oder Schutzrechte wurden im Zusammenhang mit dem Vorhaben bisher nicht angemeldet oder erteilt. Die Ergebnisse der Transkriptom- und Proteomanalysen aus der ursprünglichen Projektlaufzeit wurden in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht. Zusätzlich wurden die gewonnenen MKSV-Sequenzen und Transkriptomdaten in einschlägigen Sequenzdatenbanken veröffentlicht und stehen somit für die weitere öffentliche Nutzung zur Verfügung. Weitere Publikationen auch nach Ende der Projektlaufzeit sind zu erwarten. Eine abschließende Einschätzung des wirtschaftlichen Nutzens kann momentan noch nicht erfolgen, es ist aber weiterhin zu erwarten, dass die Erkenntnisse dieser Studien langfristig für die Landwirtschaft in Deutschland und der Welt nutzbar sein werden, insbesondere durch die Verbesserung von Impfstoffen und Bekämpfungskonzepten gegen die MKS.

## 7 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

### 7.1 Meetings innerhalb des Projektes

- 06.03.2015 Kick-Off Meeting in Maisons-Alfort, Frankreich
- 20.01.2016 Telefonkonferenz mit Projektpartnern aus WP2
- 07.10.2016 Skype-Meeting mit Projektpartnern aus WP2
- 19./20.06.2017 Treffen mit den Projektpartnern in Uppsala, Schweden
- 20.11.2017 Skype-Meeting mit Projektpartnern aus WP2
- 18.12.2017 Skype-Meeting mit Projektpartnern aus WP2
- 01.10.2018 Telefonkonferenz mit Projektpartnern aus WP2
- 01.11.2018 Treffen mit den Projektpartnern in Borgo Egnazia, Italien

Weitere Treffen fanden nicht statt, da die Teilprojekte der Partner nicht verlängert wurden.

### 7.2 Publikationen

- Hägglund *et al.* mit Projektpartnern ANSES und SLU, sowie der Universität Greifswald, veröffentlicht im Journal *Transboundary and Emerging Diseases* am 21.01.2019: *“Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate”*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7003861/>
- Pfaff *et al.* mit Projektpartnern ANSES und SLU, sowie der Universität Greifswald, veröffentlicht im Journal *Viruses* am 12.01.2019: *„Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus“*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356718/>
- Forth *et al.* veröffentlicht im Journal *Pathogens* am 16.01.2020: *“High-Resolution Composition Analysis of an Inactivated Polyvalent Foot-and-Mouth Disease Vaccine”*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168581/>
- Geplante Publikation der ersten Auswertung zu den im Tierversuch gewonnenen Proben (2.3.) in einer Sonderausgabe von *Viruses* (circa Februar 2021)

### 7.3 Vorstellung der Ergebnisse des Projekts in Vorträgen und Postern

- Martina Zoli, *FLI Junior Scientist Symposium*, Jena (21.-23.09.2016)
- Martina Zoli, *1st Summer School Infection Biology*, Greifswald (28.-30.09.2016)
- Michael Eschbaumer, *RNA Virus Persistence Meeting*, Universitätsklinikum Freiburg (23. bis 25.08.2018)
- Michael Eschbaumer, *Wissenschaftliches Seminar des FLI* (15.10.2018)
- Florian Pfaff, *Open Session of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*, Borgo Egnazia, Italien (29.-31.10.2018)
- Florian Pfaff, *13th EPIZONE Annual Meeting*, Berlin (26.-28.08.2019)