



## TRANSCRIPTOVAC

### Reaktionen des Wirtes auf MKS-Infektionen, unter besonderer Berücksichtigung genetischer Signaturen von Impfung und persistenter Infektion

Förderkennzeichen: 2814ERA02D

Vorhabenlaufzeit: 03.2015 bis 12.2019

#### KURZDARSTELLUNG:

TRANSCRIPTOVAC ist ein multinationales Projekt zur Untersuchung der biologischen Grundlagen der Persistenz des Maul- und Klauenseuche-Virus in Wiederkäuern. Dabei wurden spezielle Zellkultur-basierte Infektionsmodelle etabliert, die die Situation im Tier erstmals realitätsnah widerspiegeln können. Die genetischen Signaturen des Wirtes in Reaktion auf die Virusinfektion wurden mit modernen molekularbiologischen Methoden ausgelesen und bioinformatisch ausgewertet. Die Analysen lieferten einen detaillierten Blick auf die kritischen Elemente der Wirtsantwort und könnten langfristig zur Entwicklung verbesserter diagnostischer Verfahren und wirksamerer Impfstoffe gegen das Maul- und Klauenseuche-Virus beitragen.

Einige der zahlreichen Teilziele umfassen:

- Identifizierung der Immunantwort, einschließlich der Gensignatur, bei einer akuten MKSV-Infektion und bei MKSV-Persistenz
- Übertragung der gewonnenen *in-vitro* Ergebnisse auf das *in-vivo* Modell

#### VORHABENSCHWERPUNKT und ERA-NET

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine der bedeutendsten Tierkrankheiten bei Klautieren und die damit einhergehenden ökonomischen Verluste gehen in die Milliardenhöhe. Die Krankheit MKS wird durch das Maul- und Klauenseuche-Virus (MKSV) verursacht. Zwar existieren heute wirksame Impfstoffe gegen MKSV, doch diese induzieren nur einen kurzen, durch Antikörper vermittelten Schutz vor generalisierter Erkrankung und schützen nicht vor lokal begrenzter Virusvermehrung. In circa 50% der geimpften Tiere kommt es daher zu einer Persistenz des Virus und sowohl virale RNA als auch infektiöses Virus können über Wochen oder Monate in diesen Tieren nachgewiesen werden. Von der persistenten Infektion betroffen sind vorwiegend die Schleimhäute des Nasenrachens. Die biologischen Grundlagen der Viruspersistenz sind weitestgehend ungeklärt und erschweren die Bekämpfung der MKS deutlich. Im Rahmen des Projekts TRANSCRIPTOVAC entwickelten Partner aus Frankreich, Belgien, Schweden und Deutschland Verfahren um die persistente MKSV-Infektion erstmals in einem naturnahen Zellkulturmodell nachzustellen und anschließend deren biologischen Grundlagen erforschen zu können. Das Projekt wurde im Rahmen der zweiten ERA-NET Ausschreibung durchgeführt: „Etablierung von Grundlagenwissen, das zur Entwicklung oder Verbesserung von Diagnostikmethoden, Präventionsmaßnahmen sowie Impfstoffen führen kann.“

#### ERGEBNISSE

Den Projektpartnern gelang es, ein Kultursystem mit Zellen aus dem Nasenrachen des Rinds (dorsaler Anteil des weichen Gaumens) zu etablieren. Eine Besonderheit des Systems ist die Kultivierung eines differenzierten Epithelgewebes an einer Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche, die den realen physiologischen Bedingungen im Tier sehr nahekommt. Dieses Zellkultursystem wurde verwendet, um eine akute (24 Stunden nach Infektion) und persistente (28 Tage nach Infektion) MKSV-Infektion mit Zellen aus zwei Rindern nachzustellen (Abbildung 1).

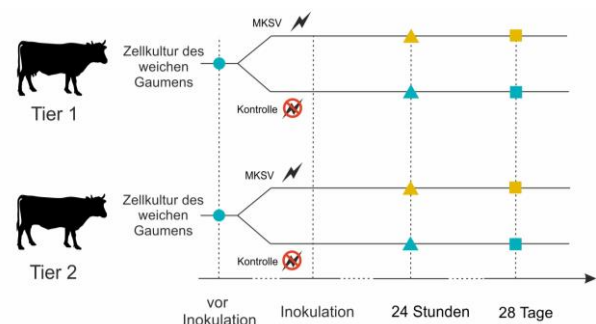


Abbildung 1: Versuchsaufbau zur Untersuchung der MKSV-Persistenz in einem neuartigen Zellkultursystem des weichen Gaumens des Rindes.

Von den infizierten Zellkulturen der jeweiligen Zeitpunkte und den dazugehörigen Kontrollen wurde im Anschluss das Transkriptom (Gesamtheit der mRNAs) als auch das Proteom (Gesamtheit der Proteine) erfasst und bioinformatisch ausgewertet. Die explorative Datenanalyse des Transkriptoms zeigte eindeutige Unterschiede in

der Genexpression zwischen den Proben, sowohl zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen als auch zwischen der akuten und persistenten Phase der Infektion (Abbildung 2).

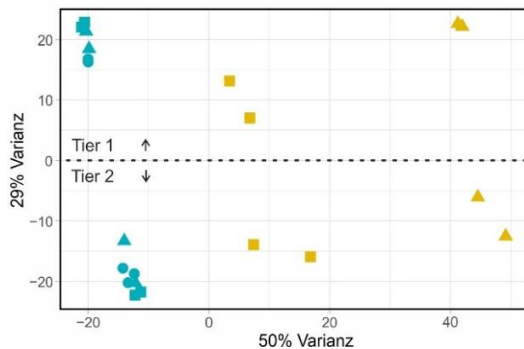


Abbildung 2: Hauptkomponentenanalyse zeigt Einfluss der MKSV-Infektion auf das Transkriptom.

Diese deutlichen Änderungen in den Expressionsmustern als Reaktion auf die MKSV-Infektion konnten in einem nächsten Schritt einzelnen Genen zugeordnet und quantifiziert werden. Dabei wurden Gene identifiziert, deren Expression sich ausschließlich als Reaktion auf die akute Infektion änderte (Abbildung 3, blaue Gruppe), solche Gene, die während der akuten und persistenten Infektion gleichermaßen aktiv waren (Abbildung 3, grüne Gruppe) und auch Gene, die zwischen den beiden Tieren unterschiedlich stark exprimiert wurden (Abbildung 3, rote Gruppe).

Während beider Infektionsstadien stehen die meisten der regulierten Gene in Zusammenhang mit der Interferonantwort, insbesondere den Interferonen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Eine Reihe von Interferon-stimulierten Genen sind hochgradig aktiviert. Im Allgemeinen induzieren diese Gene starke antivirale Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Während der akuten Infektion sind insbesondere Transkripte solcher Gene angereichert, die den programmierten Zelltod (Apoptose) vermitteln können. Dies steht im Gegensatz zur persistenten Infektion. Das Gen NCAM1, das u.a. mit der Interferon- $\gamma$ -Antwort in Verbindung steht sowie andere Proteine der extrazellulären Membranen wurden ausschließlich während der MKSV-Persistenz herunterreguliert.

Ein nachfolgender Versuch legte nahe, dass einige der festgestellten Expressionsmuster aus der Zellkultur auch im Tiermodell identifiziert werden können. Dazu wurden Rinder experimentell mit MKSV infiziert und Gewebeproben des persistent infizierten weichen Gaumens mit geeigneten Kontrollen verglichen.

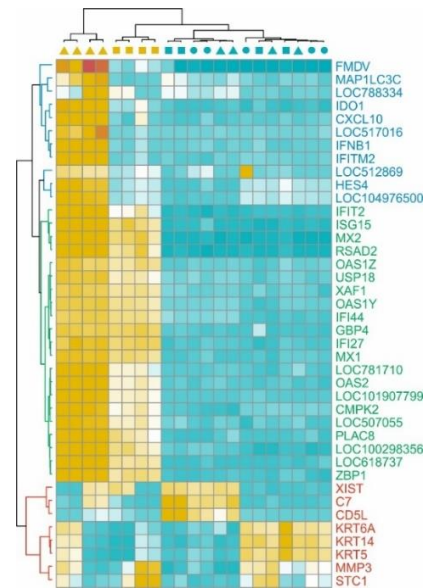


Abbildung 3: Änderungen der Expressionsmuster ausgewählter Gene.

## FAZIT

Das Zusammenspiel aus innovativen Zellkultursystemen, parallele Erfassung des Transkriptoms und Proteoms sowie bioinformatischer Auswertung ermöglichte im Rahmen von TRANSCRIPTOVAC einmalige Einblicke in die Wirtsreaktionen während der persistenten MKSV-Infektion von Rindern. 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.

## PUBLIKATIONEN

Hägglund *et al.* mit Projektpartnern FLI, ANSES und SLU, sowie der Universität Greifswald, am 29.08.2019 veröffentlicht im Journal *Transboundary and Emerging Diseases*: "Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate" (doi: 10.1111/tbed.13332)

Pfaff *et al.* mit Projektpartnern FLI, ANSES und SLU, sowie der Universität Greifswald, am 12.01.2019 veröffentlicht im Journal *Viruses*: „Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus“ (doi: 10.3390/v11010053)

### Projektbeteiligte:

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort, Frankreich  
 Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CODA-CERVA), Groeselenberg 99, 1180 Brüssel, Belgien  
 Swedish University for Agricultural Sciences (SLU), Ulls hus, Almas allé 8, 75007 Uppsala, Schweden  
 Friedrich-Loeffler Institut (FLI), Am Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Deutschland  
 Merial, S.A.S., 29 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, Frankreich

### Kontakt:

Stéphan Zientara, +33 143967041, stephan.zientara@vet-alfort.fr, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort