

# Abschlussbericht „VolnMo“

**Zuwendungsempfänger:** Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik, Prof. Dr. Martin Beer

**Vorhabensbezeichnung:** *Vole Infection Model „VolnMo“*

Querschnittsprojekt - Etablierung des Infektionstiermodells „Rötelmaus“

**Vorhabenskennzeichen:** FKZ 19103314

**Laufzeit des Vorhabens:** 21 Monate

**Berichtszeitraum:** 01.10.2014 – 30.06.2016

**Projektangestellte:** Dr. Susanne Röhrs

## 1. Einleitung:

Das Projekt „Etablierung des Infektionstiermodells Rötelmaus“ ist als Querschnittsprojekt der Zoonoseplattform nach Verlängerung am 30.06.2016 erfolgreich abgeschlossen worden. Die Hauptziele des Projektes waren die Etablierung einer **Rötelmauszucht** und deren Nutzung als **Infektionsmodell**. Rötelmäuse (*Myodes glareolus*), stellt zusammen mit den anderen Wühlmausarten ein wichtiges und zentrales Reservoir für zahlreiche zoonotische Pathogene dar. Um das Model zu etablieren, wurden drei unterschiedliche **Modellerreger** (Pockenviren, Hantaviren und Hepaciviren) ausgewählt und im Modell getestet. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie in Bonn, wurden verschiedenste **Werkzeuge** sogenannte „Tools“ besonders im Bereich der Immunologie (z.B. Oberflächenmarker, anti-spezies-Antikörper) und der Zellkultur-Technologie getestet und etabliert.

Die Zucht und das Tiermodell werden am FLI auf Basis der im Projekt erarbeiteten Ergebnisse fortgeführt und geben damit zukünftig auch anderen Gruppen die Möglichkeit der in vivo Testung mit Rötelmäusen. Dabei finden die etablierten Tools direkte Anwendung. Erste Projekte z.B. zur Infektion mit Toxoplasmen oder Echinokokken sind bereits sehr weit in der Planung.

Im Folgenden werden die Hauptpunkte **Zucht**, **Infektionsmodelle** und **Werkzeuge** kurz vorgestellt, ebenso wie das **Rötelmausmodell-Handbuch** und der mit dem Projekt assoziierte **Workshop**.

## 2. Zucht :

Nachdem die Rötelmauszucht und die Handhabung unter Infektionsbedingungen am Friedrich-Loeffler-Institut optimiert worden war, konnten in der zweiten Phase des Projektes die Tierversuche mit Hepaci-, Puumala-Hanta- und Orthopockenviren durchgeführt werden. Dafür wurden im ersten Schritt die bereits im Biosicherheitsbereich S2 etablierten Methoden und Werkzeuge unter dem erhöhten Biosicherheitsstandard S3 angewandt. Es zeigte sich in mehrere unabhängigen Versuchen, dass die Infektion mit Puumala-Hantaviren und Orthopockenviren anders verliefen als erwartet. Zwar bildeten die Tiere teilweise spezifische Antikörper, aber eine Replikation des Virus z.B. in den Organen der Rötelmäuse konnte nicht nachgewiesen. Besonders bei den Kuhpockenviren zeigten die Tiere eine Art Resistenz, die auch durch Variation des Tieralters oder des Infektionsweges nicht durchbrochen werden konnte. Auch klinische Symptome wurden für diese Viren in der Regel nicht beobachtet.

Um den aus biologischen Feldstudien bekannten Hinweis zur genetischen Variabilität der Rötelmauspopulationen aufzunehmen, wurden im Rahmen des Projektes verschiedene Arbeitsgruppen in Europa kontaktiert und weitere Zuchtpaare für die FLI interne Kolonie angefragt. Aus einer Kooperation mit Prof. Pawel Koteja konnten dafür 6 Zuchtpaare aus Polen an das FLI gebracht und eine getrennte zweite genetische Zuchtlinie am FLI angelegt werden. Diese Tiere wurden bereits für erste weitergehende Studien genutzt (Kuhpockeninfektions-Versuche) und stehen nun für zukünftige Fragestellungen zur Verfügung.

Erreichtes Ziel: Die Zucht konnte für 2 genetisch differente Rötelmauslinien etabliert werden. Diese Zuchtlinien werden am FLI weitergeführt und stehen für weitere Versuche zur Verfügung.

## 3. Infektionsmodelle:

Für die Durchführung der Tierversuche wurden insgesamt vier verschiedene Tierversuchsanträge formuliert, genehmigt und umgesetzt. Insgesamt konnten auf dieser Basis im Projekt 5 Inokulationsexperimente mit Rötelmaus-Hepaciviren durchgeführt werden, 2 Kuhpockenvirus-Versuche sowie 2 Puumala-Hantavirus Inokulationsversuche. Bei diesen Experimenten, die zunächst der *in vivo*-Anzucht dieser Viren im natürlichen Reservoirwirt dienten, konnten Blutparameter mit Hilfe des vetscan2 Systems ermittelt werden, ein serologisches Schnelltestsystem für die Antikörperantwort validiert werden, 3 Puumala Hantavirus-real-time RT-PCR Systeme etabliert, sowie Vollgenom-Sequenzen von 5 verschiedenen Viren erstellt werden. Die Vollängengenome wurden mittels *next-generation sequencing* generiert.

Darüber hinaus wurde in allen Versuchen die Pathogenese im Reservoirwirt verfolgt und histologische, pathologische und elektronmikroskopische Analysen von Virus-haltigen Organen vorgenommen.

Im Folgenden werden kurz die einzelnen Virusmodell vorgestellt:

### **3.1. Hepaciviren:**

Die bei der Rötelmaus 2013 erstmalig beschriebenen Hepaciviren wurden in mehreren Versuchen in vivo vermehrt und untersucht. Dabei wurden die Tiere über unterschiedliche Routen inokuliert und zu verschiedenen Zeiten Organ- sowie Blutproben auf den Erreger untersucht. Außerdem wurden die Auswirkungen der Infektion auf das Lebergewebe und Blutparameter der Tiere analysiert. Hierfür wurden verschiedene Partner des Projektnetzwerkes eingebunden. Die Versuche und ihre Ergebnisse sind in einer Publikation zusammen gefasst worden, die zeitnah bei einem internationalen Journal unter dem Titel „*The bank vole (Myodes glareolus) - small animal model for hepacivirus infection*“ eingereicht werden wird (Röhrs et al.). Die Versuche waren sehr erfolgreich und Virus konnte in fast allen inokulierten Tieren so vermehrt werden, dass hohe Genomkopienzahlen nachweisbar waren. Dabei zeigte sich auch, dass sich verschiedene Stämme unterschiedlich in der Rötelmaus verhalten haben. Während ein Stamm nur für kurze Zeit nachweisbar war und von den Tieren eliminiert werden konnte, wurden für einen anderen Stamm persistierende Infektionen über mehr als 160 Tage beobachtet. Dieser Stamm wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Weiterhin wurden erste Versuche mit unterschiedlichen Inokulationsrouten durchgeführt. Damit konnte auch der natürlichen Übertragungsweg des Virus weiter analysiert werden. Bisher gelingt die Infektion allerdings nur parenteral, dort aber selbst mit hochgradig verdünntem Ausgangsmaterial. Im Zuge dessen konnte auf einen Daten- und Probensatz bestehend aus Zecken von Prof. Martin Pfeffer (Universität Leipzig Veterinärmedizinische Fakultät) zurückgegriffen werden, um zu eruieren, ob eine Vektorübertragung des Virus möglich wäre. Dafür wurden 96 Leberproben von Rötelmäusen aus der freien Wildbahn analysiert. Von diesen Tieren erwiesen sich 25% als Hepacivirus positiv, woraufhin die von diesen Tieren abgesammelten Zecken ebenfalls analysiert wurden. 3 von 5 getesteten Zeckenpools waren dabei ebenfalls Hepacivirus-positiv. In einem Fall konnte aus einer solchen PCR-positiven Zecke Virus in vivo in der Rötelmaus vermehrt werden. Das könnte interessanterweise ein erstes Anzeichen dafür sein, dass eine Vektorübertragung als ursprünglicher Infektionsweg für Hepaciviren in Frage kommt. Diese Untersuchungen werden auch nach Projektende fortgeführt und sind von zentraler Bedeutung für das generelle Verständnis der Hepacivirus-Transmission.

### **3.2 Puumala-Hantaviren:**

Für die Puumala-Hantavirus-Experimente musste in einem ersten Schritt zunächst ausreichen PUUV-positives Organmaterial generiert werden. Hierfür wurde PUUV positives Lungenmaterial aus Feldversuchen der AG R. Ulrich, sowie Material einer Zellkulturanzucht des Erasmus MC in Rotterdam in Tiere inokuliert.

Diese ersten Inokulationsversuche zeigten dabei, dass keines der Tiere nach der Inokulation in der PCR Hantavirus positiv getestet werden konnte. Diskussionen innerhalb der Projektgruppe und mit externen Fachleuten ergaben, dass vermutlich weitere Faktoren für das Angehen einer Infektion im Reservoirwirt entscheidend sind. Ein Virus aus Tieren des gleichen genetischen Backgrounds, wie z.B. den Tiere des geplanten Infektionsversuches, schien daher am vielversprechendsten für eine erfolgreiche in vivo Vermehrung. Zu diesem Zweck wurden daher sehr gut dokumentierte und gelagerte Proben von Prof. Pawel Koteja (Polen) in einer Sektion aus infizierten Rötelmäusen seiner Zuchtlinie entnommen und positiv auf PUUV Hantaviren getestet.

Aus diesem Pool an infizierten und tiefgekühlten Rötelmäusen wurden 30 weibliche Tiere ausgewählt, die in einer großangelegten Sektion begutachtet und beprobt wurden. Dabei wurde aus jedem Tier ein Panel aus 23 unterschiedlichen Organproben sowohl für die histologische Untersuchung als auch die Analyse mittels real-time PCR gewonnen und eingelagert. 10 Tiere wurden mittels real-time PCR auf PUUV-Genom getestet. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Lunge hochgradig Virus-positiv ist. Die entnommenen Organproben werden nun im Detail von Doktoranden der Universität Gießen sowie am Erasmus MC in Rotterdam mit verschiedenen histologischen Methoden weiter untersucht. Makroskopisch konnten an den Tieren keine Virus-spezifischen Veränderungen festgestellt werden. Dies deckt sich mit dem Vorbericht, dass die Tiere in der Zucht keine Klinik zeigten. Dennoch haben die Tiere „ihr“ Hantavirus in großer Menge und dieses hochgradig positive Material wird zukünftig als Grundlage für weitere Tierversuche genutzt werden. Die aus Polen stammende zweite FLI-Kolonie ist der genetisch passende Wirt für diesen PUUV-Stamm. Für die Folgeuntersuchungen steht daher nun erstmals ausreichend homologes Infektionsmaterial zur Verfügung, welches die Analyse direkt im Reservoirwirt erlaubt. Weitere Untersuchungen mit diesem Modell sind in der AG R. Ulrich vorgesehen und werden fortgeführt.

### **3.3. Orthopockenviren (Kuhpocken-Viren):**

Rötelmäuse der westlichen Linie wurden auf unterschiedlichen Wegen mit einer hohen Dosis CPXV infiziert (intranasal und subkutan) und über einen Zeitraum von 21 Tagen beprobt. Dabei wurden ebenfalls verschiedene Altersgruppen der Rötelmäuse betrachtet (4 Wochen bis zu 1 Jahr alt). Insgesamt wurden mehrere Versuche durchgeführt, wovon 2 im Folgenden näher erläutert werden.

#### *Infektionsversuch 1:*

Jeweils 6 Tiere im Alter von 3-4 Monaten wurden entweder intranasal oder subkutan mit einer hohen Dosis von  $5,5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> CPXV RatPox09 infiziert. Nach 24 Stunden wurden pro Infektionsweg 2 Transmissionstiere zugesetzt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden Nasentupfer- sowie zusätzlich an ausgewählten Tagen Rachentupferproben genommen und direkt mittels qPCR untersucht. Da die Rötelmäuse bis zum Tag 14 nachweislich kein Virus ausschieden, wurde das Experiment mit Tag 14 beendet.

Die Sektion der Tiere umfasste folgende Organentnahmen: Nasenmuschel, Haut, Leber, Milz, Trachea, linker und rechter Lungenflügel. Die Analyse der Organe mittels qPCR ergab ebenfalls, dass keines der Organe mit CPXV belastet war. Zusätzlich wurden Serumproben der Tiere mittels indirektem Immunfluoreszenztest auf CPXV-spezifische Antikörper untersucht. Diese Untersuchung ergab, dass keines der Tiere -weder intranasal noch subkutan infiziert- Antikörper bildete.

#### *Infektionsversuch 2:*

Im ersten Infektionsversuch wurden unterschiedliche Applikationsformen untersucht. Der zweite Infektionsversuch sollte klären, welchen Einfluss das Alter der Rötelmäuse auf die CPXV-Infektion hat. Deshalb wurden 6 Tiere im Alter von 4 Wochen intranasal mit einer hohen Dosis von  $5,5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> CPXV RatPox09 infiziert. Anschließend wurden wieder nach 24 Stunden 2 Transmissionstiere zugesetzt. Wie bereits im ersten Versuch wurden jeden zweiten Tag Nasen- sowie Rachentupferproben genommen. Die qPCR-Analysen der Tupfer ergab hier ebenfalls wieder ein negatives Ergebnis, keines der Tiere schied CPXV aus. Aus diesem Grund wurde der Versuch an Tag 14 nach Infektion beendet und verschiedene Organe bei der Sektion entnommen (siehe Versuch 1). Die Organe waren ebenfalls in der qPCR negativ, es konnte keine CPXV-DNA nachgewiesen werden. Das Serum aller Tiere war ebenfalls CPXV-Antikörper negativ.

Zusammenfassend entsprechen unsere ersten CPXV-Infektionsversuche mit Rötelmäusen nicht dem erwarteten Bild eines Reservoirwirtes. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein und sind in Folgeexperimenten zu untersuchen bzw. untersucht worden. Aber auch die Infektion der zweiten Rötelmauslinie ergab kein verändertes Bild. Daher wurde für ein Folgeexperiment die Applikationsform geändert und die sogenannte Footpad-Methode verwendet, welche für Untersuchungen mit den Kuhpockenviren verwandten Vaccinia-Viren (VACV) sehr häufig eingesetzt wird. Doch auch hier zeigten sich Rötelmäuse als weitgehend resistent.

Insgesamt betrachtet scheinen Rötelmäuse unter den genannten Bedingungen weitgehend resistent gegenüber CPXV zu sein und anders als Feldmäuse zu reagieren. Das ist unerwartet und außerordentlich interessant, da in weiteren Studien der Resistenzmechanismus, der für Kuhpockenviren sehr ungewöhnlich ist, weiter untersucht werden soll. Erste Transkriptomstudien in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Manja Marz, Universität Jena, wurden daher bereits begonnen.

Erreichte Ziele: Mit drei unterschiedlichen viralen Erregern konnte das Rötelmausmodell wie geplant etabliert werden. Erstmals gelang dabei die Vermehrung von Rötelmaus-Hepaciviren. Die Resistenz von Rötelmäusen gegenüber Kuhpockenviren wurde entdeckt und Hantavirus-Material für weitere Pathogenese-Studien wurde generiert. Insgesamt konnte die Rötelmaus damit als neues Reservoirspezies-Tiermodell in der Infektionsmedizin etabliert werden. In neuen Projekten wird dieses Tiermodell weiter eingesetzt werden.

#### 4. Entwicklung und Sammlung von Werkzeugen für das Rötelmausmodell:

Neben der Etablierung der Rötelmauszucht und den verschiedenen Tierversuchen mit drei Infektionserregern ist weiterhin an der Entwicklung von sogenannten „Werkzeugen“ (Tools) gearbeitet worden. Hier sollen im Folgenden einige Beispiele dieser Tool-Sammlung aufgeführt werden.

- So konnten Antigene und polyklonale Kaninchenseren für das NS3 und das Core-Protein der Rötelmaus-Hepaciviren gewonnen werden, um erste serologische Studien durchzuführen. Eine Charakterisierung erfolgte im Western Blot sowie in der Immunfluoreszenzanalyse. Diese Tools stehen nun für weitere Hepaci-Modellversuche zur Verfügung.
- Aus der Kolonie und weiteren Wildfängen von Rötelmäusen konnten insgesamt 4 permanente Epithelzelllinien von Nieren und Lungen der östlichen und westlichen Rötelmauslinie in Kooperation mit dem Projekt „Epizell“ entwickelt und getestet werden. Diese Zellen stehen nun als charakterisierte Linien für weitergehende Experimente zur Verfügung.
- Ein Vollgenom der Rötelmaus wurde durch eine finnische Arbeitsgruppe zum Ende des Jahres 2015 in der Gendatenbank veröffentlicht und bildete die Grundlage, um immunologisch relevante Gensequenzen (Interferon-Gene) und bereits vorhandene Transkriptomdaten abzugleichen.
- Eine Rötelmaus-spezifische Interferon real-time RT-PCR wurde validiert und mit ihrer Hilfe ein Interferon Bioassay etabliert. Damit kann nun in einem ersten Schritt die angeborene Immunantwort der Rötelmaus in vitro wie auch in vivo untersucht werden.
- Um Werkzeuge für die erworbene Immunantwort zur Verfügung zu haben, konnten im Rahmen des Projektes verschiedene Antikörper im FACS getestet werden. Dabei wurden eine Reihe Maus-spezifischer monoklonaler Antikörper identifiziert, die auch für Untersuchung von Rötelmäusen genutzt werden können. Eine Liste dieser Reagenzien wurde erstellt und steht für weitergehende Studien zur Verfügung.

Im Rahmen des Projektes *VolnMo* wurden sowohl bei der Zucht, den Infektionsexperimenten und den Studien zu Tools und Zellkulturen eine große Menge an Erkenntnissen zum Modeltier „Rötelmaus“ generiert. Um diese Kenntnisse gesammelt zur Verfügung zu stellen, wurde ein „Handbuch Rötelmaus“ entwickelt, das sich in der finalen Phase der Fertigstellung befindet und demnächst als zentrales Projektergebnis zur Verfügung steht. Im Folgenden findet sich daher eine kurze Zusammenfassung der Handbuch-Charakteristika.

Erreichte Ziele: Eine Sammlung von Werkzeugen wurde erstellt und steht für zukünftige Studien zur Verfügung. Wichtige Erkenntnisse zum Rötelmausmodell werden in Form eines Handbuchs fixiert.

#### **4.1 Handbuch:**

Für das Handbuch sind z.B. Sektionen von nicht infizierten Tieren vorgenommen worden und Fotos sowohl der Sektion, als auch von Organen sowie ein histologischer Bildkatalog von Besonderheiten der Rötelmaus erstellt worden. Verschiedene Haltungsformen wurden ebenso als Bildmaterial integriert wie das Handling und die geprüften Probenentnahmetechniken.

Für die Rötelmaus-Infektionsversuche wurde ein klinischer *Score* entwickelt, um Symptome quantitativ erfassbar und damit auch statistisch auswertbar darstellen zu können. Der Score ist damit auch die Basis, um Versuchsabbruchkriterien festlegen zu können.

Weiterhin wurden die verschiedenen Markierungsmethoden für Rötelmäuse auf ihre Praktikabilität und Handhabbarkeit getestet.

Am Handbuch wird aktuell noch gearbeitet. Ein erster Rohentwurf liegt aber bereits der Zoonosenplattform vor und wird zeitnah in die finale Version überführt.

#### **5. Schulung, Training, Dienstreisen:**

Neben der Zucht, den Laborarbeiten und den verschiedenen Infektionsversuchen wurden zwei Trainingseinheiten für Tierpfleger durchgeführt, und der direkt an das Projekt angegliederte Workshop geplant und durchgeführt. Außerdem wurden weitere Arbeitsgruppen ausführlich beraten, die nun die Planung von Rötelmausversuchen z.B. mit Echinokokken und Toxoplasmen vorantreiben.

Um die Vernetzung von internationalen und nationalen Rötelmaushaltungen und interessierten Arbeitsgruppen auszubauen, wurden verschiedene Dienstreisen unternommen, die im Anhang aufgelistet sind. Die Daten aus der Rötelmaushaltung und den bereits durchgeführten Tierversuchen wurden auf verschiedenen Konferenzen vorgestellt und diskutiert (siehe Liste im Anhang).

##### **5.1 Workshop:**

Am 10. und 11.02.2016 fand der im Rahmen des Projektes geplante und gesondert beantragte Workshop „AKtimo“ – Alternative Kleinsäugertierversuchsmodelle statt. Die Veranstaltung war am Hauptstandort des Friedrich-Loeffler-Instituts auf der Insel Riems bei Greifswald angesiedelt. Neben nationalen Wissenschaftlern nahmen auch die polnische Arbeitsgruppe von Prof. Pawel Koteja und der Gastsprecher Prof. Tony Schountz (USA) an der Veranstaltung teil. Insgesamt 35 am Thema hochgradig Interessierte Teilnehmer hatten sich offiziell angemeldet.

Die *Keynote*-Session mit den Vorträgen von Pawel Koteja („*The emergence and elimination of Puumala virus infection in the experimental colony of bank voles*“) und Tony Schountz („*Reservoir Host Immune Responses*“)

to *Hantaviruses*“) fand im neuen Konferenzsaal des Instituts statt und lockte zusätzlich zu den externen Teilnehmern des Workshops ca. 80 interessierte Mitarbeiter des FLI an. Des Weiteren gaben Prof. Martin Pfeffer und Dr. Rainer Ulrich zwei Übersichtsvorträge zu zoonotischen Pathogenen in verschiedenen Wildnagern.

Neben den sehr interessanten Kurzvorträgen über verschiedene Tierversuchsmodelle wie Rötelmaus, Spitzmaus, Siebenschläfer und Opossum wurden im Rahmen des Workshops auch aktuelle Forschungsdaten aus Infektionsstudien und neuen Methoden vorgestellt.

## **6. Finanzen:**

Die finanziellen Mittel für den oben genannten Zeitraum wurden bereits mit dem Mittelgeber abgerechnet.

## **7. Anhang:**

### Kooperationsaufenthalte:

Karolinska Institut Schweden, Stockholm, Schweden (2 Tage)

Universität Bonn, Institut für Virologie, Kick off Meeting (2 Tage)

Erasmus MC, Rotterdam, Niederlande (4 Tage)

### Konferenzen (jeweils mit Poster oder Vortrag teilgenommen):

Zoonosentagung, Berlin (2 Tage)

International Viral Hepatitis Congress, Berlin (3 Tage)

One Health Congress, Amsterdam (3 Tage)

Nagerworkshop des Nagernetzwerks „NaüPaNet“, Leipzig (2 Tage)

Zoonosennachwuchsmeeting, München Oberschleißheim (2 Tage)