



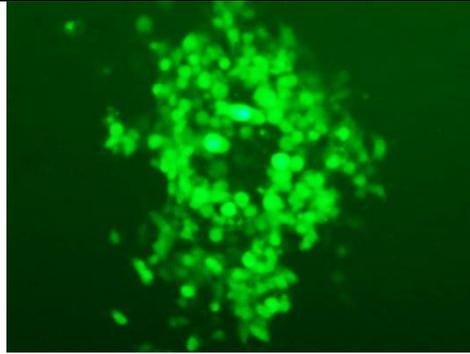
Doktorandenprogramm des BMEL

Erarbeitung von Grundlagen für die gezielte Entwicklung von Impfstoffen gegen die Afrikanische Schweinepest in Ost- und Südafrika: Korrelation von Unterschieden der viralen Genomsequenzen mit der Virulenz sowie der Virus- und Wirtszell-Transkription und Proteinexpression (AVSOA)

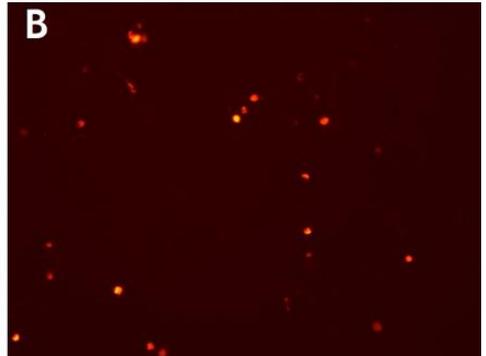
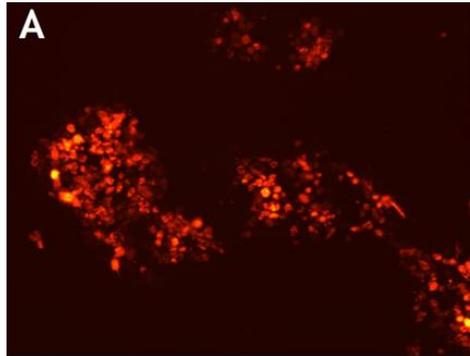
Land/Länder	Östliches und südliches Afrika (v. a. Uganda und Kenia)
Fördernde Organisation	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft – BMEL
Projektträger	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung – BLE
Koordinator	Dr. Walter Fuchs Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Partner	
Projektbudget	98.843,66 €
Projektlaufzeit	01.06.2016 bis 31.10.2019

Schlagwörter	Afrikanische Schweinepest, Lebendvirusimpfstoffe, Vektorimpfstoffe, Resistente Schweine
Hintergrundinformation	<p>In vielen Ländern Afrikas ist die Bedeutung der Schweinehaltung während der letzten Jahrzehnte erheblich gestiegen. Diese Entwicklung wird jedoch durch verschiedene Tierseuchen gehemmt, unter denen die Afrikanische Schweinepest (ASP) besonders problematisch ist. Während die Infektion in Hausschweinen meist tödlich verläuft, verursacht das durch Lederzecken übertragene Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASPV) in wildlebenden Warzen- und Pinselohrschweinen allenfalls milde Symptome und ist in diesen deshalb weit verbreitet, sodass es zur häufigen Neuübertragung auf Haustierbestände kommt. Obwohl Laborexperimente darauf hindeuten, dass eine Schutzimpfung gegen die ASP prinzipiell möglich sein sollte, ist es bislang nicht gelungen, einen praxistauglichen Impfstoff herzustellen.</p>
Projektziel	<p>Im Hinblick auf die Entwicklung potenzieller Impfstoffe sollten zum einen Virulenzfaktoren des ASPV zu deletiert und zum anderen immunogene ASPV Proteine in viralen Vektoren exprimiert werden. Da ASPV Isolate unterschiedliche Virulenz und erhebliche Unterschiede auf DNA- und Proteinebene zeigen, sollten Viren verschiedener Genotypen mittels „next generation sequencing“ und Massenspektrometrie untersucht werden. Hierdurch sollte eine Korrelation zwischen genetischen Markern und der Virulenz hergestellt werden. Um die biologische Relevanz auffälliger Gene zu verifizieren, sollten sie mittels gentechnischer Methoden in Zellkultur-adaptierten ASPV Stämmen mutiert werden. Sobald isogene Gruppen aus virulenten parentalen ASP-Viren und Virus-Rekombinanten mit potentiellen Virulenzgen-Mutationen vorliegen, sollte deren Vermehrung <i>in vitro</i> sowie deren Pathogenität <i>in vivo</i> vergleichend untersucht werden. Soweit möglich, sollte eine Prüfung der Schutzwirkung durch Belastungsinfektion mit virulentem ASPV folgen.</p> <p>Außerdem sollten abundante Strukturproteine des ASPV in einem abgeschwächten Pseudorabies Virus Impfstamm (PrV-Bartha) exprimiert und die Schutzwirkung der erhaltenen Vektorkonstrukte im Schwein untersucht werden.</p> <p>In einem weiteren Ansatz sollte das CRISPR/Cas9 System genutzt werden, die ASPV-Replikation in Zellkultur durch den Angriff einzelner oder multipler essenzieller Virusgene zu inhibieren, die in afrikanischen und eurasischen Isolaten konserviert sind. Fernziel dieser Experimente war die Generierung ASP resistenter Hausschweine.</p>

<p>Projektergebnisse</p>	<p>ASPV Mutanten wurden durch Transfektion einer permissiven Wildschweinezelllinie (WSL) mit Rekombinationsplasmiden und anschließende Infektion mit ASPV Wildtypvirus generiert. Zur Steigerung der Effizienz wurden die zu deletierten Virusgene mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems gespalten und durch transient in das ASPV Genom inserierte Reportergene für fluoreszierende Proteine (eGFP) oder andere selektierbare Marker (CD4) ersetzt. Auf diese Weise konnten bislang fünf in Zellkultur nicht essenzielle Gene eines kenianischen Genotyp IX ASPV Isolates deletiert werden: A104R, E165R (dUTPase), EP402R (CD2v), K196L (Thymidinkinase) und K145R. Aus einem armenischen Genotyp II Virus wurden darüber hinaus die Gene KP177R (p22) und 285L entfernt. Die erhaltenen Mutanten zeigten allenfalls geringfügige Replikationsdefekte in Zellkultur. Die Deletion essenzieller ASPV Gene gelang bislang nicht.</p> <p>Im PrV-Impfstamm Bartha konnten mittels BAC und CRISPR/Cas9 Technologie bislang 15 verschiedene ASPV Proteine abundant exprimiert werden, darunter das Kapsidprotein p72 sowie die Oberflächenproteine p12, p22, p30 und p54. Die Restvirulenz der ASPV Mutanten, sowie die Schutzwirkung abgeschwächter ASP Viren und der Vektorkonstrukte gegen virulentes ASPV bleibt zu prüfen.</p> <p>Außerdem wurden rekombinante WSL-Zellen generiert, welche die Cas9 Nuklease und single guide RNAs (sgRNAs) gegen essenzielle ASPV Gene stabil exprimierten. Während Genotyp-spezifische sgRNAs gegen CP204L (p30) selektiv die Replikation von ASPV Armenia (II) oder Kenia (IX) inhibierten, konnte durch Expression einer O61R (p12) spezifischen sgRNA jegliche ASPV Replikation fast vollständig unterdrückt werden. Erste Versuche deuten darauf hin, dass diese Systeme auch in transgenen Schweinen stabil exprimierbar sind und deshalb eventuell eine ASPV Resistenz vermitteln könnten.</p>
<p>Empfehlungen</p>	<p>Die verbesserten Methoden zur Herstellung von ASPV Rekombinanten und Vektor-Konstrukten sollten auch in den betroffenen afrikanischen Ländern etabliert werden um vor Ort die Produktion und Validierung erschwinglicher Genotyp-spezifischer Impfstoffe zu ermöglichen.</p>
<p>Fotos</p>	 <p>Schweinefarm mit ASPV-infiziertem Tier in Uganda</p>



Virusplaque einer Thymidinkinasegen-deletierten und GFP-exprimierenden Mutante von ASPV Kenia in WSL Zellen.



Virusausbreitung einer RFP-exprimierenden Mutante von ASFV Kenya in normalen WSL Zellen (A), und inhibitorischen CRISPR/Cas9 Zellen (B).