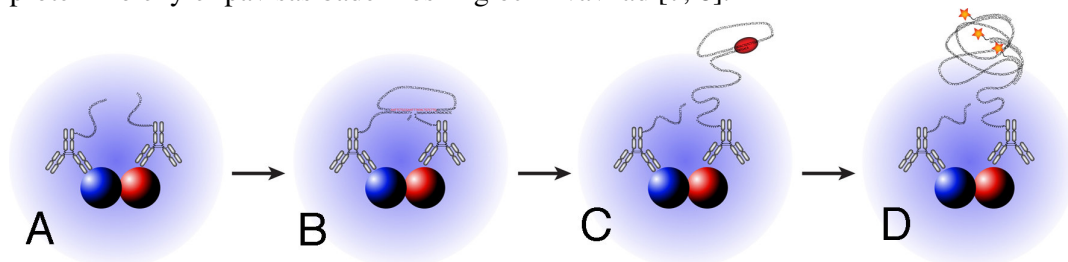


Närhetsligering (proximitetsligering) för att påvisa bornavirusinfektioner

Jonas Johansson Wensman, Ulf Landegren, Mikael Berg

Bakgrund

Bornavirus (Borna disease virus, BDV) är ett RNA-virus som infekterar celler i centrala nervsystemet (CNS) och orsakar neurologisk sjukdom hos bland annat häst, får, hund och katt. I Sverige har BDV-infektion främst varit knutet till vingelsjuka hos katt, men virus och/eller virusspecifika antikroppar har även påvisats hos häst, lodjur och vilda fåglar [1]. Nyligen har ett aviärt bornavirus (ABV) knutits till en sjukdom hos papegoj fåglar som kallas proventricular dilatation disease (PDD, sv. arasjukan) [2, 3]. BDV orsakar en persistent infektion av CNS och därför kan endast små mängder virus påvisas där. Vid BDV-infektion utvecklar hästar oftast antikroppar även om titern kan vara låg [4]. Katter med vingelsjuka utvecklar låga antikroppstitrar och ibland kan antikroppar ej detekteras med nuvarande metoder [5]. Det finns därför ett behov av känsligare metoder för att påvisa virusantigen i vävnad och antikroppar i serum. En sådan metod är närhets- eller proximitetsligering (proximity ligation assay, PLA), som kan användas för att påvisa protein både i lösning och i vävnad [6]. Metoden bygger på att oligonukleotider (bestämda DNA-sekvenser) kopplas till antikroppar specifika för det protein som ska detekteras (figur 1A). När antikropparna binder in till proteinet kommer DNA-strängarna nära varandra och kan då bindas samman med ett enzym. Vid närhetsligering i vävnad (*in situ* PLA) bildas cirkulärt DNA (figur 1B). DNA-cirkeln kan sedan användas för att förlänga en av oligonukleotidarmarna genom rullande cirkelamplifiering (figur 1C). En fluorescensinmärkt oligonukleotid hybridiserar sedan in till den amplifierade DNA-sekvensen och kan på så sätt detekteras (figur 1D). Vid närhetsligering i lösning binds DNA-strängarna samman med enzym och därefter kan den nya DNA-sekvensen amplifieras med Realtids-PCR. Med närhetsligering kan ned till enstaka proteinmolekyler påvisas både i lösning och i vävnad [7, 8].



Figur 1. Principer för närhetsligering i vävnad. A) Antikroppar specifika för målprotein/er har oligonukleotidarmar länkade till sig. B) När de binder till målprotein kommer de nära varandra och DNA-strängarna kan bindas samman med ett enzym. C) En av oligonukleotidarmarna kan förlängas med hjälp av rullande cirkelamplifiering. D) En fluorescensinmärkt oligonukleotid binds in till den amplifierade DNA-sekvensen och kan på så vis detekteras i fluorescensmikroskop.

Vid BDV-infektion utvecklas en kraftig lokal inflammation i CNS [9]. Trots det lyckas BDV etablera en långvarig infektion i neuron och astrocyter. Hur BDV lyckas undkomma värdens immunsvar är ännu inte helt utrett. Tidigare studier har visat att BDV kan binda till olika proteiner hos värden och på så sätt påverka olika signaleringsvägar [10]. Två sådana värdproteiner är HMGB1 och Cdc2. HMGB1 är ett litet nukleärt protein, som vid infektion

kan utsöndras från cellen och bidra till en ökad inflammation [11]. Interaktionen mellan BDV och HMGB1 skulle kunna vara ett sätt för BDV att undkomma immunsvaret. Cdc2 är ett viktigt protein i cellcykeln [12]. Genom att påverka cellcykeln och därmed cellens tillväxt kan BDV underlätta en etablering av en persistent infektion. Hittills har dessa interaktioner mellan virus och värd endast studerats i infekterade celler. Vi ville därför se om dessa interaktioner även sker i infekterade djur.

Syftet med denna studie var att utveckla nya känsliga metoder för att påvisa markörer vid bornavirusinfektion. Dessa metoder är PLA-baserade och syftar till att påvisa BDV-specifika antikroppar i serum och cerebrospinalvätska (CSF) samt BDV-protein i hjärnvävnad i olika djurslag. Vidare syftade studien till att påvisa proteininteraktioner mellan BDV och infekterade djur. En ökad kunskap om hur BDV kan etablera en långvarig infektion i hjärnan hos djur är nödvändig för att i framtiden kunna utveckla behandlingsmöjligheter.

## Material och metoder

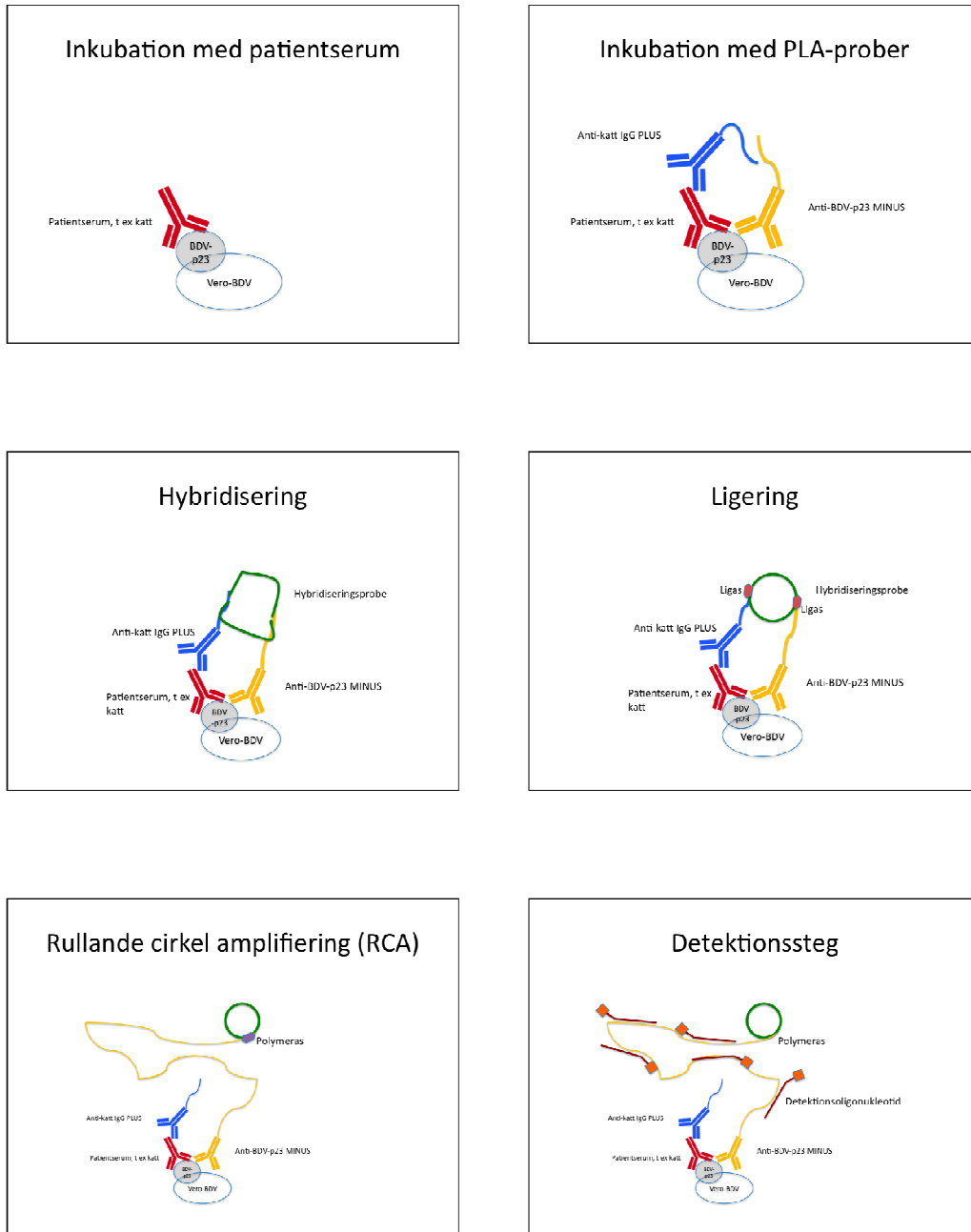
### *In situ PLA för detektion av BDV-protein i celler och vävnad*

Till att börja med användes persistent infekterade och icke-infekterade celler för att utveckla och utvärdera metoden. En kaninpolyklonal och en musmonoklonal antikropp riktade mot virusets fosfoprotein (BDV P) användes. Därefter användes sekundära antikroppar riktade mot kanin- och musantikroppar. De sekundära antikropparna var konjugerade med oligonukleotider (Olink Biosciences, Uppsala). Därefter användes ett Duolink-kit (Olink Biosciences) för hybridisering, ligering och slutligen detektion. Cellerna analyserades i fluorescensmikroskop.

Hjärnvävnad från experimentellt infekterad råtta och naturligt infekterad häst och katt studerades. Icke-infekterad råtta, häst och katt användes som negativa kontroller. Paraffinsnitt lades ut på objektsglas. Efter avparaffinisering och rehydrering, värmebehandlades vävnaden i en tryckkokare för att öppna upp proteiner. Därefter användes samma primära och sekundära antikroppar som ovan, följt av samma detektionssystem. För att bli av med bakgrund i form av autofluorescens, samt för att behålla den morfologiska bilden, omvandlades fluorescerande signal till ett färgomslag som kan ses i vanligt ljusmikroskop (DuoCISH, Dako, Glostrup, Danmark).

### *In situ PLA för detektion av BDV-specifika antikroppar i serum*

Serum från experimentellt infekterad katt samt från en negativ kontrollkatt användes [13]. En antikropp riktad mot kattantikroppar liksom en polyklonal kaninantikropp riktad mot BDV P konjugerades med oligonukleotider (Probemaker, Olink Biosciences) och användes som sekundära antikroppar. Serum från katterna sattes i en spädningsserie i brunnar med BDV-infekterade celler (figur 2). Som kontroll sattes även samma serum på icke-infekterade celler. Efter ett inkubationssteg tillsattes de sekundära antikropparna. Därefter utfördes hybridisering, ligering och detektion i enlighet med ovan. För jämförelse användes ett indirekt immunofluorescensstest (IFT). Serum sattes till infekterade respektive icke-infekterade celler på samma sätt som vid *in situ* PLA för antikropsdetektion. Istället för de oligonukleotidkonjugerade antikropparna användes fluorescensinmärkta antikroppar riktade mot kattantikroppar. Direkt efter inkubation med den sekundära antikroppen avlästes resultaten i ett fluorescensmikroskop.



Figur 2. Principen för detektion av BDV-specifika antikroppar i kattserum.

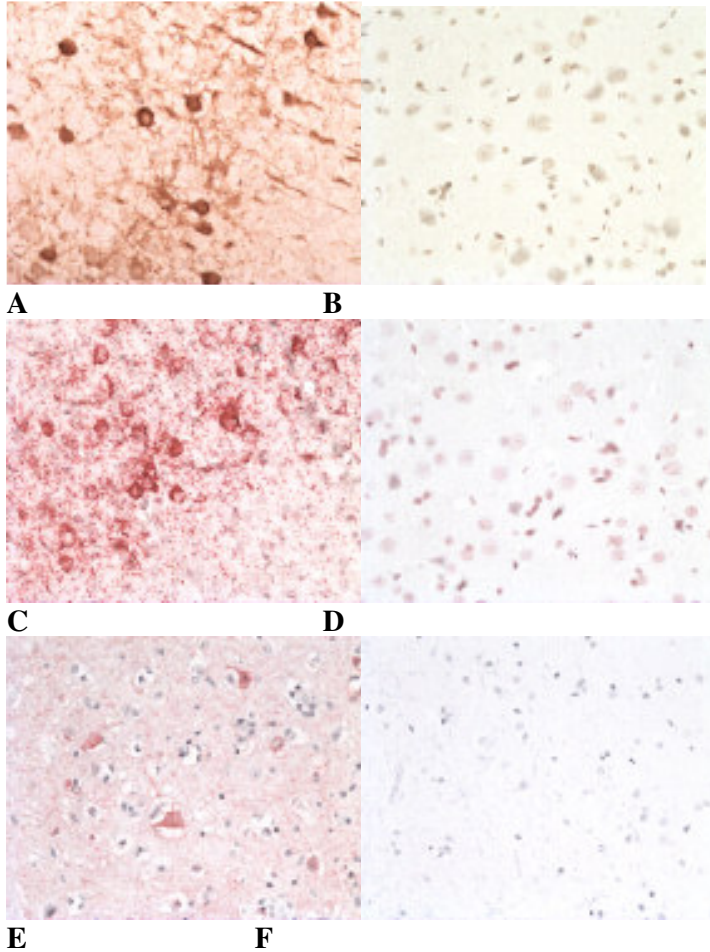
### *In situ* PLA för att påvisa proteininteraktioner mellan BDV och dess värd

Först användes persistent infekterade celler för att påvisa proteininteraktioner mellan BDV och dess värd. Antikroppar riktade mot BDV P och nukleoproteinet (BDV N), liksom antikroppar riktade mot värdproteinerna HMGB1, Cdc2 och DLC8 användes. Dessutom användes antikroppar riktade mot fosforylerat serin, för att se om BDV P var fosforylerat. I övrigt användes samma sekundära antikroppar och detektionssystem som tidigare beskrivits. Hjärnvävnad från råttor och hästar användes för att studera proteininteraktioner. De behandlades på samma sätt som vid virusdetektionen, varefter antikroppar mot virusprotein och värdprotein tillsattes.

## Resultat

### *Detektion av BDV-protein med hjälp av in situ PLA*

För att göra en första utvärdering användes BDV-infekterade och oinfekterade C6-celler, som är en astrocytomcellinje från råtta. En tydlig skillnad mellan infekterade (se figur 2A i Lägesrapport) och icke-infekterade celler (figur 2B, Lägesrapport) kunde ses, där de infekterade visar ett starkt uttryck av virusprotein vilket saknas i de icke-infekterade. Därefter analyserades hjärnvävnad från experimentellt infekterad råtta (figur 2C, Lägesrapport). Även där ses ett tydligt uttryck av virusprotein i vissa celler. För att veta vilka typer av celler som är infekterade kan dubbelvägningsteknik användas. Då används förutom antikropparna mot bornavirus även en antikropp riktad mot cellspecifikt protein. Ett sådant protein är GFAP (glial fibrillary acidic protein) som är specifikt för astrocyter. I figur 2D (Lägesrapport) ses hjärnvävnad från katt och i figur 2E (Lägesrapport) hjärnvävnad från häst som är dubbelinfärgad för bornavirusprotein och GFAP. Både BDV-infekterade astrocyter, liksom andra infekterade celler kan ses.



**Figur 3. Jämförelse mellan IHC och in situ PLA. IHC för BDV P i 3A) experimentellt infekterad råtta och 3B) i icke-infekterad råtta. In situ PLA för BDV P i 3C) experimentellt infekterad råtta, 3D) icke-infekterad råtta, 3E) naturligt infekterad häst och 3F) icke-infekterad häst.**

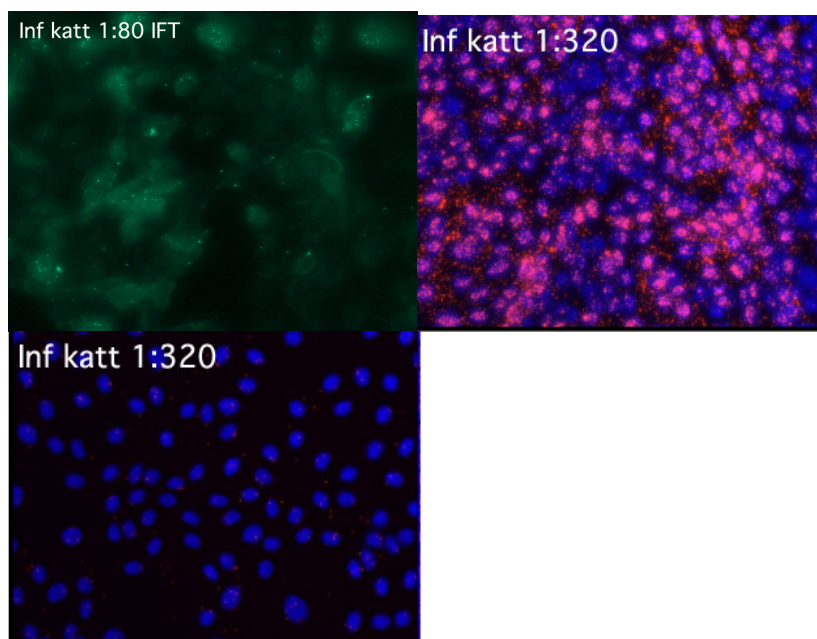
I och med att hjärnvävnad är benägen att ge fluorescens av sig själv (autofluorescens), vilket försvårar tolkningen av resultat, beslöt vi att konvertera fluorescenssignalerna till signaler som kan studeras i vanligt ljusmikroskop. För att jämföra den nya metoden använde vi även vanlig immunhistokemi. I figur 3 visas jämförelse mellan IHC (figur 3A och 3B, råtta) och *in situ* PLA (figur 3C och 3D (råtta), figur 3E och 3F (häst)). Med *in situ* PLA sågs samma

infärgningsmönster som vid IHC, men något färre BDV-positiva celler. Det beror sannolikt på en högre selektivitet vid *in situ* PLA, där två antikroppar (en polyklonal och en monoklonal) måste binda till BDV P för att kunna ge upphov till en signal. Den större mängden signal vid IHC kan därför bero på en viss korsreaktivitet hos det polyklonala antiserat.

Katter med vingelsjuka studerades också, men där uppvisar de negativa kontrollerna en för hög bakgrund för att resultaten ska vara tillfredsställande. Vi arbetar vidare med att få ned denna bakgrund.

#### *Närhetsligering för detektion av antikroppar i serum*

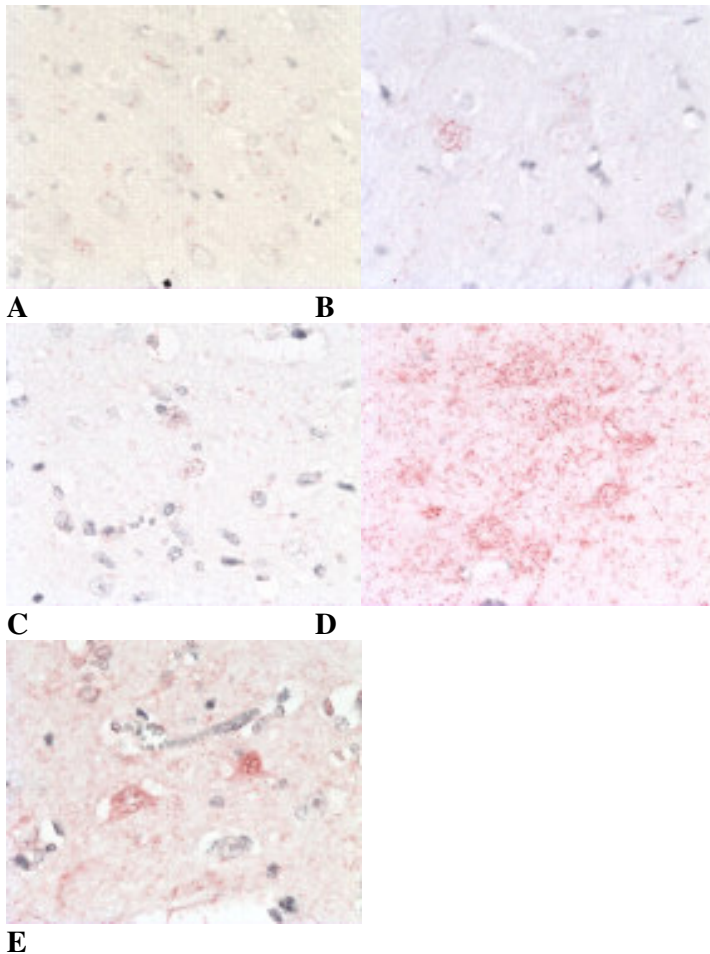
För att utvärdera närhetsligering för detektion av antikroppar i serum jämförde vi med IFT, som är den idag mest använda metoden vid bornavirusserologi. När serum från experimentellt infekterad katt testades med IFT erhöles en antikroppstiter om 1:40-1:80. *In situ* PLA gav en högre titer på minst 1:320, vilket betyder att känsligheten är två-tre gånger högre (figur 4).



*Figur 4. Jämförelse mellan IFT och närhetsligering för detektion av antikroppar i serum. Serum från experimentellt infekterad katt användes i olika koncentrationer. Med IFT kunde antikroppar påvisas vid en titer på 1:40-1:80. Med närhetsligering kunde serat spädas ner till 1:320. Signalen är betydligt tydligare och starkare vid närhetsligering, vilket gör att serat kan spädas ytterligare. Inga signaler ses när kattserat sätts på icke-infekterade celler.*

#### *In situ PLA för att påvisa proteininteraktioner mellan BDV och dess värd*

Samtliga tidigare publicerade interaktioner (BDV P + HMGB1, BDV P + Cdc2, BDV N + Cdc2) kunde för första gången visualiseras i infekterade celler. Dessutom kunde vi påvisa tidigare okända interaktioner (BDV N + HMGB1, BDV P + DLC8) [14]. De senare behöver dock bekräftas med andra metoder. Därefter testades några av dessa interaktioner i vävnad från sjuka djur. I experimentellt infekterad råtta kunde interaktion mellan BDV P och HMGB1, samt BDV N och Cdc2 påvisas i spridda neuron (figur 5A och 5B). I häst med bornasjuka kunde däremot endast interaktionen mellan BDV N och Cdc2 påvisas, även då i spridda neuron (figur 5C). Fosforylerat BDV P kunde påvisas i neuron och astrocyter hos både råtta och häst (figur 5D och 5E).



**E**  
 Figur 5. *In situ* PLA för att påvisa proteininteraktioner mellan virus och värd. 5A) Interaktion mellan BDV P och HMGB1 (råtta). 5B) Interaktion mellan BDV N och Cdc2 (råtta). 5C) Interaktion mellan BDV N och Cdc2 (häst). 5D) Fosforilerat BDV P i råtta och 5E) häst.

## Diskussion

BDV orsakar en persistent infektion i CNS hos flertalet däggdjur och fåglar. I och med den långvariga infektionen är det ofta låga mängder virus i CNS. Antikroppar utvecklas inte heller alltid eller bara i små mängder, ibland under detektionsnivån. Det finns därför ett stort behov av känsligare metoder för att påvisa virus på plats i vävnad och antikroppar i serum. Vi använde oss av närhetsligering (*in situ* PLA), som är en ny känslig och specifik metod för att påvisa proteiner och proteinkomplex.

Med hjälp av närhetsligering har vi kunnat påvisa bornavirusprotein i hjärnan hos experimentellt infekterad råtta och häst med bornasjuka (figur 3). Jämfört med den gängse metoden idag, immunhistokemi (IHC), såg vi något färre infekterade celler. Det beror sannolikt på en högre selektivitet i och med att närhetsligering kräver att två antikroppar binder in till samma protein för att ge upphov till signal. Dessutom kan en del av den signal som ses vid IHC bero på korsreaktivitet hos den använda antikroppen, vilket delvis ger en ospecifik signal. Närhetsligering ger alltså en specifikare signal och säkrare diagnos, i och med att det blir färre falska positiva resultat. Hos katter såg vi tyvärr för liten skillnad mellan infekterad vävnad och vävnad från katter utan kliniska symtom på vingelsjuka. Detta är något som vi kommer att arbeta vidare med.

Närhetsligering för att påvisa antikroppar i serum visade sig ha omkring 2-3 gånger så hög känslighet jämfört med IFT (figur 4), som är den metod som används mest idag. Antikroppar kan inte alltid påträffas hos sjuka djur när IFT används, vilket kan bero på låg känslighet. Vid en persistent infektion i CNS är det heller inte säkert att antikroppar kan ses i serum. En känslig metod som närhetsligering skulle alltså lättare fånga upp ett positivt serologiskt svar och ge möjlighet till att en diagnos ställs tidigare.

Hur BDV kan undkomma den massiva inflammation som uppkommer i CNS är till allra största del ännu okänt. Metoder för att studera proteininteraktioner mellan virus och vävnad från sjuka djur har tidigare saknats. Introducerandet av närhetsligering som metod har öppnat upp helt nya möjligheter för sådana studier. Här testade vi några tidigare kända proteininteraktioner i vävnad från råtta och häst (figur 5). Vi tror att närhetsligering kommer att vara en viktig metod för att kunna studera sjukdomsmekanismer direkt i vävnad från sjuka djur. Sådana studier har tidigare i stort sett varit begränsade till cellmodeller. Framtida studier där närhetsligering används för att studera hur virus och värd interagerar med varandra är viktiga för att generera ny kunskap om hur infektion och sjukdom uppkommer. En kunskap som kan leda till nya behandlingsstrategier.

#### Publikationer

Wensman, J.J., Berg, M. & Berg, A.L. 2008. *Experiences of Borna disease virus infection in Sweden*. APMIS Suppl, 124(116):46-49.

Leuchowius, K.J., Wensman, J.J., Blomström, A.L., Berg, A.L., Landegren, U., Belák, S., Söderberg, O. & Berg, M., 2008. *Detection of Borna disease virus antigen by in situ proximity ligation assay*. Second Annual Meeting EPIZONE "Need for Speed", Brescia, Italien, 2008-06-04—06.

Wensman, J.J. *Vingelsjuka hos katt – studier av bornavirus*. Veterinärkongressen 2008, 107-110.

Leuchowius, K.J., Wensman, J.J., Blomström, A.L., Berg, A.L., Landegren, U., Belák, S., Söderberg, O. & Berg, M., 2008. *Detection of Borna disease virus antigen by in situ proximity ligation assay*. Uppsala BIO-Ångström "New Diagnostics – Needs, Demands and Technical Solutions", Uppsala, Sverige, 2008-11-18.

Wensman, J.J. 2009. *Feline Borna Disease*. Congress of European Society of Feline Medicine, Cavtat, Kroatien, 2009-06-19—21.

Wensman, J.J., Leuchowius, K.J., Berg, A.L., Bode, L., Ludwig, H., Belák, S., Landegren, U., Söderberg, O. & Berg, M. 2009. *In situ proximity ligation assay for studying virus and pathogenesis*. 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Ungern, 2009-08-23—26.

Yan, J. 2010. *Visualization of Borna disease virus and host-virus protein-protein interactions by in situ proximity ligation assay*. Master of Science avhandling vid Uppsala universitet.

Wensman, J.J., Leuchowius, K.J., Yan, J., Berg, A.L., Ludwig, H., Bode, L., Belák, S., Landegren, U., Söderberg, O. & Berg, M. *Visualization of Borna disease virus and its interactions with host proteins using in situ proximity ligation assay*. Manuskript ämnat att skickas in till Journal of Neuroinflammation under hösten 2010.

## Övrig resultatförmedling till näringen

Under 2008-2010 har bakgrunden till projektet beskrivits och resultat presenterats i följande sammanhang:

1. Muntlig presentation vid International Berlin Symposium on Bornavirus Infections, 2008-01-26, Berlin, Tyskland. Bakgrund till projektet och resultat från *in situ* PLA presenterades.
2. Posterpresentation vid 2nd Annual Meeting of Epizone, Brescia, Italien, 2008-06-04—06. Epizone är ett EU-nätverk för epizootiska sjukdomar, med veterinärinstitut och universitet från de flesta EU-länder. Bakgrund till projektet och resultat från *in situ* PLA presenterades.  
Leuchowius K-J, Wensman JJ, Blomström A-L, Berg A-L, Landegren U, Belák S, Söderberg O & Berg M. *Detection of Borna disease virus antigen by in situ proximity ligation assay.*
3. Muntlig presentation vid Veterinärkongressen, Uppsala 2008-11-06—07, under titeln Vingelsjuka hos katt – studier av bornavirus. Bakgrund till projektet och resultat från *in situ* PLA presenterades.
4. Posterpresentation vid Uppsala BIO-Ångström 2008-11-18, som är ett möte för universitet och industri under rubriken New Diagnostics – Needs, Demands and Technical Solutions.
5. Hippocampus-seminarium under titeln *Bornavirusinfektioner i Sverige*, 2009-05-20. Bakgrund till projektet och resultat redovisades.
6. Muntlig presentation under titeln *Feline Borna disease* vid kongressen för European Society of Feline Medicine i samband med prisutdelningen av the European Advisory Board of Cat Diseases and Merial Young Scientist Award, Cavtat, Kroatien, 2009-06-19—21. Bakgrund till projektet och resultat redovisades.
7. Muntlig presentation vid 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Ungern, 2009-08-23—26. Bakgrund till projektet och resultat redovisades.

JJW och MB har fortlöpande kontakter med djurägare, veterinärer, med flera, om frågor kring bornavirusinfektioner samt diagnostik och behandling av dessa.

Projektet har skett i samarbete med följande partners:

Karl-Johan Leuchowius, Uppsala universitet (PLA-expert)

Anna-Lena Berg, Astrazeneca (neuropatolog)

Ola Söderberg, Uppsala universitet (PLA-expert)

Louise Treiberg Berndtsson, SVA (veterinärvirolog)

Gunilla Blomqvist, SVA (veterinärvirolog)

Anne-Lie Blomström, SLU (doktorand i virologi)

Sándor Belák, SLU/SVA (professor i virologi)

Hanns Ludwig, FU Berlin, Berlin, Tyskland (professor i virologi, bornavirusexpert)

Liv Bode, Robert Koch Institut, Berlin, Tyskland (bornavirusexpert)

Karin Hultin-Jäderlund, SLU & NVH (veterinärneurolog)

Jan Skidell, Regiondjursjukhuset Helsingborg (hästveterinär)

Olink Biosciences, (kommersialiserar PLA-tekniken)



## Referenser

1. Wensman, J.J., M. Berg, och A.L. Berg, *Experiences of Borna disease virus infection in Sweden*. APMIS Suppl, 2008(124): p. 46-9.
2. Kistler, A.L., et al., *Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent*. Virol J, 2008. **5**: p. 88.
3. Honkavuori, K.S., et al., *Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(12): p. 1883-6.
4. Richt, J.A., A. Grabner, och S. Herzog, *Borna disease in horses*. Vet Clin North Am Equine Pract, 2000. **16**(3): p. 579-95, xi.
5. Johansson, M., M. Berg, och A.L. Berg, *Humoral immune response against Borna disease virus (BDV) in experimentally and naturally infected cats*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **90**(1-2): p. 23-33.
6. Weibrecht, I., et al., *Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox*. Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(3): p. 401-9.
7. Söderberg, O., et al., *Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 995-1000.
8. Nordengrahn, A., et al., *Evaluation of a novel proximity ligation assay for the sensitive and rapid detection of foot-and-mouth disease virus*. Vet Microbiol, 2008. **127**(3-4): p. 227-36.
9. Gosztonyi, G. och H. Ludwig, *Borna disease--neuropathology and pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **190**: p. 39-73.
10. Planz, O., S. Pleschka, och T. Wolff, *Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways*. Cell Microbiol, 2009. **11**(6): p. 872-9.
11. Yang, D., et al., *The alarmin functions of high-mobility group proteins*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(1-2): p. 157-63.
12. Castedo, M., et al., *Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe*. Cell Death Differ, 2002. **9**(12): p. 1287-93.
13. Lundgren, A.L., et al., *Neurological disease and encephalitis in cats experimentally infected with Borna disease virus*. Acta Neuropathol (Berl), 1997. **93**(4): p. 391-401.
14. Yan, J., *Visualization of Borna disease virus and host-virus protein-protein interactions by in situ proximity ligation assay*, in *Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health*. 2010, Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala. p. 21.