

Hästens typ I interferonsystem – en nyckelkomponent i försvaret mot infektioner

H0947226

Eva Wattrang

GENERELL BAKGRUND

Infektionssjukdomar och inflammatoriska tillstånd utgör stora problemområden inom modern hästmedicin då de orsakar både lidande för djuren och ekonomiska förluster för ägare och tränare. När det gäller smittsamma sjukdomar kan också stora utbrott orsaka allvarliga och kostsamma problem för flera delar av hästnäringen. Det är därför mycket viktigt att kunskapen om hästens immunförsvar ökas så att effektiva behandlingsmetoder och vacciner mot infektionssjukdomar kan tas fram. En viktig del av försvaret mot infektioner är typ I interferonerna, en grupp proteiner som bl.a. i ett tidigt skede av en infektion förhindrar att virus förökar sig och som även styr resten av immunsvaret så att ett effektivt försvar mot infektionen utvecklas. I dagsläget anses det finnas totalt nio olika typ I interferon (IFN) hos däggdjur. De flesta djurslag som hittills studerats har dock ett mindre antal. Olika typ I IFN produceras också i varierande omfattning vid infektion med olika mikroorganismer. Innan detta projekt startade hade hästens typ I IFN-system inte studerats ingående.

PROJEKTETS SYFTE & STRATEGI

Projektets övergripande målsättning var att utöka kunskapen om hästens immunsystem och i synnerhet hästens typ I interferonsystem. Detta är en förutsättning för att klargöra patogenesen för många infektionssjukdomar och även autoimmuna sjukdomar hos häst. Denna kunskap vidgar också möjligheterna att förbättra nuvarande metoder och utveckla nya strategier för immunmodulation, t.ex. vaccination, inom hästmedicinen. Med detta mål har vi under 2010-2013 framförallt arbetat med delprojekten som beskrivs nedan. I projektet har docent Eva Wattrang varit huvudansvarig med hjälp av Dr Olivier Detournay, post-doc i projektet från september 2009 till september 2011, och docent David Morrison, SLU, som bistått med bioinformatisk expertis i delprojekt 1. Casper Wahlund utförde sitt examensarbete för Bachelor i delprojekt 2. Vi har också ett nära samarbete med Dr Bettina Wagner, Cornell University, USA, vilket framförallt varit mycket värdefullt i delprojekt 1, 3 och 4. Projektet har hittills presenterats vid internationella vetenskapliga konferenser och i peer-review tidskrifter.

RAPPORTERING DELPROJEKT

Delprojekt 1: Kartläggning och uttryck av hästens typ I IFNer

Bakgrund

Interferon upptäcktes i mitten på 50-talet på grund av dess förmåga att inhibera virusinfektion och virusreplikation. Man har nu fastsällt att det finns tre olika sorters IFNer eller IFN-familjer, typ I, II och III. Det planerade projektet behandlar typ I IFNerna som är en stor familj med små, strukturellt närbesläktade cytokiner som har en gemensam receptor. I dagsläget anses att typ I IFN-familjen hos däggdjur omfattar 9 ”officiella” olika medlemmar s.k. klasser: IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ , IFN- ω , IFN- ν och IFN- ξ ⁽¹⁾. En ytterligare klass, IFN- α/ω , hade enbart identifierats vid studier av nukleinsyrasekvenser (*in silico*) utan funktionell analys vid detta projekts början. En del av dessa typ I IFN-klasser finns bara hos vissa grupper av djur, t.ex. IFN- τ som bara hittats hos idisslare och IFN- ξ som bara påvisats hos möss. Andra klasser såsom IFN- α , IFN- β och IFN- ω förefaller finnas hos alla arter som studerats. Vidare förekommer en del av IFN-klasserna i multipla subtyper. Det mest studerade exemplet på detta är IFN- α där de flesta arter som undersökts har ett stort antal subtyper, t.ex. har människa 13, möss, nötkreatur

Slutrapport 2010-2013

och katter 14 och grisar 17⁽²⁾. De olika subtyperna uppvisar bland annat mindre skillnader i biologisk aktivitet, t.ex. i anti-viral effekt⁽³⁾.

De hittills mest studerade typ I IFNerna är IFN- α och IFN- β . Dessa förknippas oftast med försvaret mot virusinfektioner där de utför viktiga funktioner både i det ospecifika, ”snabba”, immunsvaret och i regleringen av det efterföljande specifika immunsvaret. Deras kanske mest karaktäristiska kännetecken är förmågan att förhindra virusinfektion av celler och inhibera virusreplikation genom att försätta celler i ett ”antiviral state”⁽⁴⁾. De är också inblandade i en rad olika funktioner som möjliggör ett effektivt immunsvaret mot virus, och andra intracellulära patogener⁽⁵⁾. De flesta celler producerar IFN- β när de infekterats av virus, medan IFN- α framförallt produceras av speciella vita blodkroppar: monocytter och en mycket specialiserad cell som benämns naturlig IFN- α producerande cell (NIPC) och är en sorts plasmacytoid dendritisk cell (pDC)⁽⁶⁾. De exakta mekanismerna involverade i igenkänning av virus och efterföljande induktion av IFN- α/β -produktion är fortfarande inte helt kartlagda men under senare tid har detta forskningsområde expanderat lavinartat och man känner nu till ett antal av de inblandade induktionsvägarna. Det är till exempel allmänt accepterat att cellerna i det ospecifika immunförsvaret med hjälp av olika receptorer känner igen strukturer/molekyler som är gemensamma för en grupp mikroorganismer och därigenom fungerar som ”varningssignaler” för immunsystemet⁽⁷⁾. På detta sätt aktiveras mekanismer i den ospecifika immuniteten som sedan i sin tur styr utvecklingen av den specifika immuniteten så att ett försvar som är relevant i bekämpningen av infektionsämnet i fråga aktiveras. När det gäller induktion av IFN- α/β är de hittills mest studerade ”varningssignalerna” olika former av nukleinsyra, t.ex. dubbelsträngat (ds) och enkelsträngat (ss) RNA och DNA. I vissa fall är även speciella nukleotidsekvenser i nukleinsyran identifierade som avgörande för igenkänningen, t.ex. DNA innehållande ometylerade CG-sekvenser (CpG-DNA). De receptorer som känner igen dessa ”virus-varningssignaler” innefattar t.ex. s.k. Toll-likareceptorer (TLR) som är membranbundna och receptorer i cellcytoplasman^(7,8).

I detta delprojekt avsåg vi därför att kartlägga vilka, och hur många, typ I IFN gener som hästen har samt påbörja studierna av vilka av dessa gener som uttrycks vid olika slags stimulering och vilka celler som kan uttrycka dessa gener.

Material & metoder

För att identifiera och kartlägga generna för typ I IFNer hos häst användes databaser där hästens arvs massa finns sekvenserad, NCBI *Equus caballus* genome. Under projektperioden uppdaterades databasen vilket medförde att både version 1.1 och 2.0 analyserades (Eca1.1 respektive Eca2.2). I dessa analyser användes kända däggdjurs-typ I IFN sekvenser (bl.a. häst, gris, människa och nötkreatur) från bl.a. NCBI GenBank databasen för att söka tänkbara sekvenser i hästens arvs massa (s.k. BLAST-analys). De möjliga sekvenserna som identifierades i hästens arvs massa analyserades därefter vidare och identifierades bl.a. med hjälp av släktskapsanalys (fylogenetisk analys) och ”släktskapsträd” (fylogenetiska träd) konstruerades. Sekvenserna analyserades också med avseende på konserverade sekvenser som är karakteristiska för typ I IFN, t.ex. sekvenser som är involverade i viktiga funktioner såsom bindning till typ I IFN-receptorn.

För att studera mRNA-uttrycket av de olika typ I IFN-generna designades och etablerades kvantitativa realtids RT-PCR-tester för alla de 7 identifierade häst-typ I IFNerna som verkade ha funktionella gener, samt för 2 kontroll-gener (β -2-microglobulin och GAPDH). Vid analys av data relaterades uttrycket av IFN-mRNA till uttrycket av kontrollgenerna som anses uttryckas konstant i alla celler.

För dessa experiment användes hästceller som stimulerades till uttryck av typ I IFN i cellkultur. Vi använde vita blodkroppar som isolerades från blodprover, en primär cell-linje

Slutrapport 2010-2013

med embryolungfibroblaster (celler av bindvävstyp) s.k. EEL-celler samt en kontinuerlig cell-linje med tumörvandlade celler av lymfocytärt ursprung (lymfosarkom) s.k. EqT8888-celler. De vita blodkropparna isolerades från blodprover från klinisk friska hästar (etiskt tillstånd för djurförsök C188/8). Till validering av PCR-metodiken användes blod från 17 olika hästar. För det slutgiltiga induktionsförsöket användes blod från totalt 13 olika hästar, 9 ston och 4 vallacker, 5-20 år gamla. Gruppen innefattade 6 st svenska varmblod, 2 st holländska varmblod (KWPN), 2 st engelska fullblod, 1 st irländsk sporthäst och 2 st av ponnyras. Alla celltyper odlades i närvaro av en panel av kända IFN-inducerare (Tabell 1) med målet att studera flera av de kända induktionsvägarna för typ I IFN. IFN-induktionen i cellkulturerna utvärderades sedan vid två tidpunkter: efter 6 (optimalt för mRNA) och 24 (optimalt för protein) timmars odling. Vid dessa tidpunkter isolerades nukleinsyran från cellerna för PCR-analys av mRNA-uttryck. Cell-supernatanten samlades för analys av IFN- α innehåll med ELISA. Alla IFN-inducerare testades med vita blodkroppar från ≥ 6 olika hästar och cell-linjerna testades med alla inducerare vid tre olika tillfällen.

Tabell 1. IFN-inducerare använda i delprojekt 1

Inducerare	Förkortning	Beskrivning och induktionsväg
Sendai virus	SV	Levande RNA-virus, infekterar de flesta celltyper och inducerar sannolikt IFN-produktion via ett flertal signalvägar
Ekvint herpesvirus typ 1	EHV-1	Levande DNA-virus, infekterar bl.a. hästens vita blodkroppar, inducerar sannolikt IFN-produktion via ett flertal signalvägar
Oligodeoxyribonukleotid 2395	ODN	Syntetisk DNA innehållande CG-sekvens som anses inducera IFN-produktion via TLR 9 i endosomer
Lipopolysaccharid	LPS	Del av gram-negativa bakteriers cellvägg som anses inducera f.f.a. IFN- β -produktion via TLR 4 på cellmembran
Poly-inosin/poly-cytidyl-syra (polyI:C) + LyoVec	poly I:C	Syntetiskt dubbelsträngat RNA som kombinerad med transfektionsmedlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via RIG-I-lik receptorer i cytoplasman
Poly-uridin (poly U) + LyoVec	poly U	Enkelsträngad RNA U-sekvens som kombinerad med transfektions-medlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer

RIG-I – retinoic acid inducible gene-I

TLR – "Toll"-lik receptor

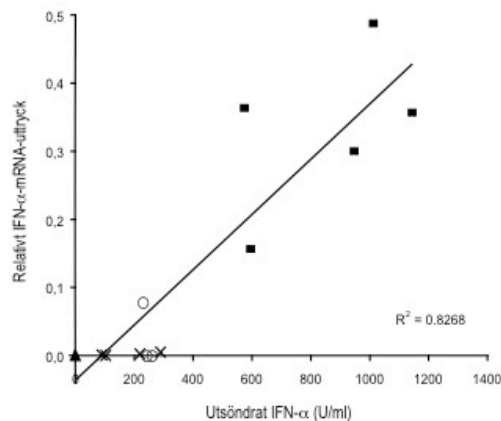
Resultat & diskussion

Analysen av hästens arvsmassa visade att det finns 32 potentiella typ I IFN-gener och att dessa är lokaliserade tillsammans på hästens kromosom 23 samt en "oplacerad" del av arvsmassan (den senare tillhör sannolikt också kromosom 23). Hästens kromosom 23 motsvarar bl.a. människans kromosom 9p21 där människans typ I IFN-gener också är lokaliserade⁽⁹⁾. Släktskapsanalys visade att hästens typ I IFN-gener tillhörde 8 olika klasser: IFN- α (6 subtyper), IFN- β (4 subtyper), IFN- ω (8 subtyper och 4 pseudogener), IFN- δ (3 subtyper och 1 pseudogen), IFN- $\alpha\omega$ (3 subtyper), IFN- κ och IFN- ϵ , samt 1 IFN- ν pseudogen. Vi fann att alla dessa klasser utom IFN- ν omfattade gener som var potentiellt funktionella, d.v.s. kan uttryckas. Generna hade också de sekvenser som anses karaktäristiska för typ I IFNer och är viktiga för deras funktion t.ex. bindning till typ I IFN-receptorn. De flesta av klasserna hade beskrivits hos andra djurslag men IFN- $\alpha\omega$ hade inte tidigare studerats. Vi fann att IFN- $\alpha\omega$ -generna utgör en tydlig systergrupp till IFN- α , IFN- ω och IFN- δ -generna. Dessa gener är sålunda släktskapsmässigt skilda från tidigare beskrivna typ I IFNer och vi föreslår att denna "nya" klass skall benämnas IFN- μ . Detta förslag har sedermera också godkänts av den internationella IFN-nomenklaturkommittén (www.iscir.org). Hos hästen skilde sig också antalet gener (subtyper) för olika klasser av typ I IFN från vad man funnit hos andra djurslag, hästen har bl.a. väldigt få IFN- α subtyper.

Slutrapport 2010-2013

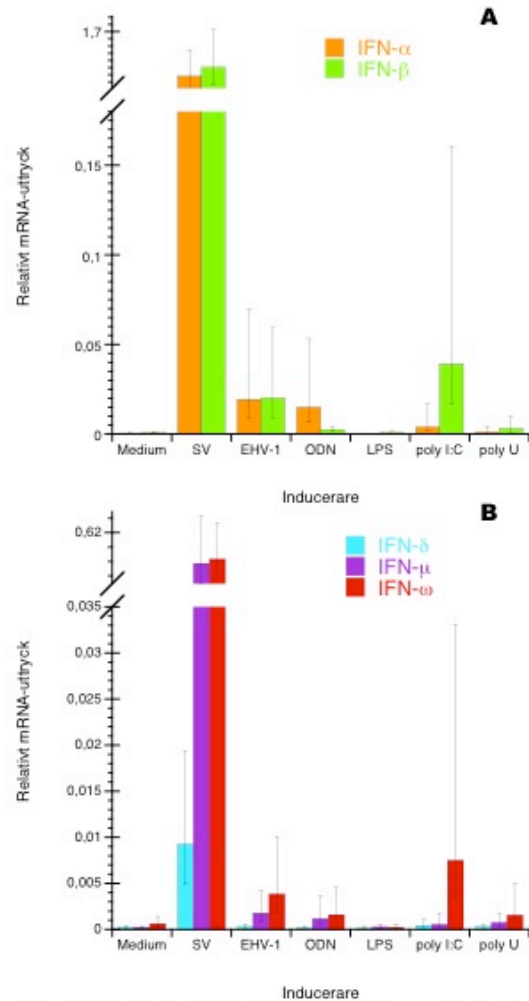
Stimulering av vita blodkroppar i cellkultur resulterade i att totalt fem olika typ I IFN-klasser aktiverades (Figur 1). Två av dem, IFN- α och IFN- β , visade det högsta mRNA-uttrycket medan IFN- δ , IFN- ω och IFN- μ uttrycktes i lägre grad. IFN- δ visade det lägsta uttrycket och aktiverades endast vid stimulering med Sendai virus (SV). Inducerat uttryck av IFN- κ respektive IFN- ϵ -mRNA observerades bara i vita blodkroppar från en häst vardera utav 11 testade hästar.

Som väntat aktiverade de två levande virusen mRNA-uttryck av de flesta typ I IFNerna och SV var den mest potenta av de testade inducerarna. I likhet med vad som observerats för andra däggdjur, inducerade ODN framförallt uttryck av IFN- α -mRNA och poly I:C var en potent inducerare av IFN- β -mRNA. Slående var också att IFN- α och IFN- μ respektive IFN- β och IFN- ω verkande ha liknande induktionsmönster vilket kan tyda på att de har överlappande/additiva funktioner, vilket är en ny observation. Till skillnad från andra däggdjur var poly U inte någon stark IFN-inducerare och LPS inducerade inte uttryck av någon typ I IFN-gen. Vi analyserade också IFN- α i cellkultursupernatanten från de stimulerade vita blodkropparna och utsöndringen av protein vid 24 h överinstämde väl med uttrycket av IFN- α -mRNA vid 6 h (Figur 2). För att få en uppfattning om vilka celltyper som uttrycker de olika typ I IFNerna användes även EEL- och EqT8888-celler i induktionssystemet. Dessa analyser visade att



Figur 2. Korrelation mellan uttryck av IFN- α -mRNA i vita blodkroppar stimulerade i cellkultur i 6 h och IFN- α utsöndrat i cellkulturmediet vid 24 h.

tidskrift.



Figur 1. Uttryck av typ I IFN-mRNA i vita blodkroppar stimulerade i cellkultur med de indikerade inducerarna i 6 h. Medelvärden \pm 95% konfidensintervall, $n \geq 6$.

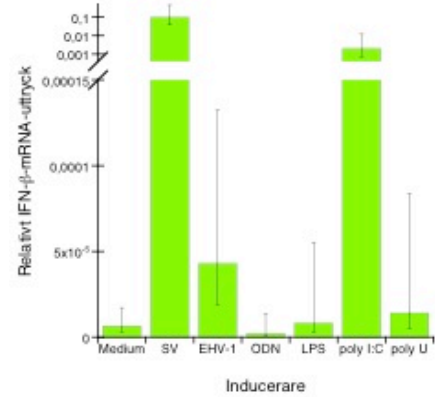
EEL-cellerna endast uttryckte IFN- β och detta enbart vid infektion med levande virus eller stimulering med poly I:C (Figur 3) vilket överinstämmer med vad man funnit för fibroblaster hos andra däggdjur. Lymfosarkom-cellerna EqT8888 uttryckte däremot inga av typ I IFNerna oavsett stimuli. Det är beskrivet att många tumörceller från andra däggdjur har mutationer i typ I IFN generna och vi misstänker därför att även EqT8888-cellerna har ett defekt typ I IFN system. Sammantaget visar dessa resultat både likheter och skillnader med typ I IFN-systemen hos andra djurslag. Preliminära resultat från denna studie har presenterats vid internationella vetenskapliga konferenser och de samlade resultaten är publicerade i en internationell peer-review

Slutrapport 2010-2013

Delprojekt: 2 Pilotstudie av typ I IFN-uttryck i hästtarm

Bakgrund

Typ I IFNer är inblandade i patogenesen hos flera autoimmuna och/eller inflammatoriska sjukdomar. Mest känd är kanske typ I IFNernas roll i den autoimmuna sjukdomen systemisk lupus erythematosus (SLE) hos människa⁽⁵⁾. Det finns även rapporter att typ I IFN kan vara inblandade i inflammatoriska tarmsjukdomar⁽¹⁰⁾. Vi utförde därför en pilotstudie i samarbete med professor Ronny Lindberg (SLU) och medarbetare som driver projektet "Immunologisk reaktivitet i tarmslemhinnan hos friska hästar och hos hästar med kroniska inflammatoriska tarmsjukdomar". Studiens syfte var att kartlägga om typ I IFNer uttrycks i hästens tarmslemhinna, vilka klasser som i så fall uttrycks, och studera ifall typ I IFN är inblandade i kroniska inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD) hos häst.



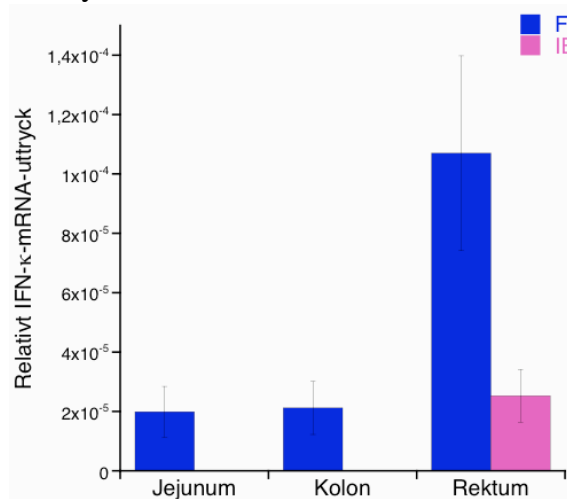
Figur 3. Uttryck av IFN- β -mRNA i hästfibroblaster (EEL-celler) stimulerade i cellkultur med de indikerade inducerarna i 6 h. Medelvärden \pm 95% konfidensintervall, n=3.

Material & metoder

Studien innefattade 3 tarmprover (jejunum, kolon och rektum) från vardera 6 friska hästar samt 4 rektumbiopsier och ett kolonprov från hästar där diagnosen IBD ställts histologiskt. RNA isolerades från vävnadsproverna och analyserades för uttryck av typ I IFN-gener och kontrollgener med vår kvantitativa RT-PCR-metodologi.

Resultat & diskussion

I analyserna av tarmvävnad ifrån friska hästar och hästar med IBD fann vi att IFN- α , IFN- β ,



Figur 4. Uttryck av IFN- κ -mRNA i tarmvävnad från friska hästar (n=6) och rektumvävnad från hästar med kronisk tarminflammation (n=4). Medelvärden \pm 1SE.

IFN- δ , IFN- μ och IFN- ω inte uttrycktes i något av proverna. Detta är inte förvånande med tanke på att någon tarminfektion inte misstänktes hos varken de friska eller de sjuka hästarna. Vi fann däremot ett relativt lågt men tydligt uttryck av IFN- κ -mRNA i tarmvävnaden hos de friska hästarna. Alla de friska hästarna (n=6) uttryckte IFN- κ -mRNA i minst 2 av de 3 tarmproverna och uttrycket tenderade att vara högre i rektumvävnaden än i kolon och jejunum. Tre av de 6 friska hästarna uttryckte också mycket låga nivåer av IFN- ϵ -mRNA i 1 eller 2 av tarmproverna. Både IFN- κ och IFN- ϵ är relativt nyligen upptäckta typ I IFNer och lite är känt om deras

funktion. Det har dock visats att de kan uttryckas normalt (konstitutivt) i olika vävnader bl.a. i duodenum hos gris⁽¹¹⁾. I proverna från hästar med IBD påvisade vi uttryck av IFN- κ -mRNA i alla 4 rektumbiopsierna och IFN- ϵ -mRNA i 3 av 4 rektumbiopsier medan kolonprovet var negativt för uttryck av båda dessa IFNer. Uttrycket av IFN- κ -mRNA tenderade att vara lägre i rektumbiopsier från hästar med IBD än i rektumbiopsier från friska hästar. IFN- κ kan alltså vara av betydelse för utvecklingen av kronisk tarminflammation. Det krävs dock ett större material för att kunna dra några säkra slutsatser

Slutrapport 2010-2013

om typ I IFNernas roll i kroniska inflammatoriska tarmsjukdomar hos häst. Detta viktiga arbete fortsätter därför nu inom professor Ronny Linbergs projekt. Inom detta delprojekt utförde Casper Wahlund, studerande vid Medicinska fakulteten, Uppsala Universitet, sitt Bachelors-arbete (20 p).

Delprojekt 3: Induktion av olika typ I IFNer i hästceller – utveckling av reagens

Bakgrund

Vår analys av hästens typ I IFN-gener i delprojekt 1 visar att det kan finnas artskillnader också i uttrycket av olika typ I IFNer. Kan t.ex. det relativt låga antalet IFN- α -subtyper och det höga antalet IFN- ω -subtyper betyda att hästen använder IFN- ω till en del immunfunktioner där andra djurslag använder olika IFN- α -subtyper? Vi kommer därför att utföra ingående studier av hästens olika typ I IFN. Resultaten från mRNA-uttrycksexperimenten i delstudie 1 ger oss vägledning om vilka av hästens typ I IFNer som uttrycks av immunceller vid ”klassisk” stimulering. Dessa IFNer kommer att framställas som rekombinanta protein såsom vi tidigare gjort med häst-IFN- α ⁽¹²⁾ och IFN- γ ⁽¹³⁾. För att sedan kunna studera funktionen av, produktionen av och vilka celler som producerar dessa typ I IFNer kommer vi att ta fram specifika reagens i form av monoklonala antikroppar.

Material & metoder

Arbetet inleddes med IFN- β och Dr Bettina Wagner har under projektperioden uttryckt detta cytokin och även tagit fram monoklonala antikroppar mot rekombinant häst-IFN- β . Vi har testat det rekombinanta IFN- β i en väletablerad IFN-bioassay⁽¹²⁾ där cytokinets antivirala aktivitet kvantifieras.

Resultat & diskussion

Med hjälp av IFN-bioassayen fann vi att detta rekombinanta häst-IFN- β inte visade någon biologisk aktivitet även i hög koncentration. Vidare fann vi att de monoklonala antikropparna mot detta protein hade låg känslighet när de användes i immunoassays såsom ELISA. Dessa resultat var givetvis mycket nedslående. Då vi anser att IFN- β och goda reagens mot detta cytokin är mycket viktigt för att studera bl.a. infektionssjukdomar hos hästar har vi fortsatt med att uttrycka IFN- β på nytt i ett annat system. Arbetet är därmed pågående och kommer att fortsätta med studier av vita blodkroppar i cellkultur vid stimulering med rekombinant IFN- β och utvärdering av effekter på t.ex. uttrycket av MHC klass I och II⁽¹³⁾. Resultat från dessa experiment ger svar på hur biologiskt aktivt IFN- β är jämfört med t.ex. IFN- α och IFN- γ . Rekombinant IFN- β kommer också att användas för att generera specifika mAk för detektion av naturligt producerade cytokiner liksom vi gjort för IFN- α ⁽¹²⁾. Vi kommer sedan att använda dessa mAk för att med ELISA-teknik detektera och kvantifiera IFN- β som producerats av vita blodkroppar vid stimulering med olika IFN-inducerare i cellkultur. Vi kommer också att kunna identifiera de celler som producerar IFN- β genom att etablera ELISpot och intracellulärfärgning. Vi planerar att fortsätta detta arbete med andra typ I IFNer på samma sätt. För tillfället finansieras detta arbete i USA bl.a. med anslag för att utveckla den ”immunologiska verktygslådan” med reagens för djurslag av veterinärmedicinsk betydelse.

Delprojekt 4: Utvärdering av TLR 7/8- och TLR 13-stimulerare för cytokinproduktion i vita blodkroppar från häst

Bakgrund

Typ I IFNerna betraktades länge enbart som en del av den ospecifika immuniteten mot virusinfektioner men den i dagsläget ackumulerade kunskapen visar tydligt att de är viktiga i försvaret mot ett flertal infektionsämnen och även är inblandade i patogenesen för flera

Slutrapport 2010-2013

autoimmuna sjukdomar. Förmågan hos t.ex. IFN- α att reglera utvecklingen av specifika immunsvar så att de ger ett effektivt försvar mot virus och andra intracellulära infektionsämnen är också eftertraktad inom vaccnutveckling. För att förstå typ I IFNernas roll i hästsjukdomar och för att kunna använda IFN, IFN-inducerare eller IFN-inhibitorer inom hästmedicinen behövs mer kunskap om funktionen hos hästens olika typ I IFNer och hur de induceras. För detta ändamål har vi tidigare bland annat studerat induktion av typ I IFNer och andra cytokiner vid stimulering i cellkultur med CpG-DNA, som bland annat anses vara ett potent Th1-adjuvans. Vi fann då både likheter och skillnader i hästens immunsvar jämfört med andra däggdjurs t.ex. människa och gris^(14, 15). I resultaten från delprojekt 1 fann vi också indikationer på att induktion av typ I IFNer hos häst skiljer sig från "normen" som framför allt baseras på studier i möss och människor. Bland annat gav de allmänt accepterade IFN-inducerarna poly U och LPS mycket lägre respektive inget IFN-svar. Poly U hör till en grupp IFN-inducerare som studerats mycket i mus och människa och som också fått genomslag som inom humanmedicin. Enkelsträngat RNA med olika varianter av U-, GU- och AU-rika sekvenser anses binda till receptorerna TLR 7 och/eller TLR 8 i endosomer hos bl.a. pDC och därvid stimulera till produktion av höga nivåer av IFN- α/β . Dessa sekvenser utvärderas därför ofta kliniskt bl.a. som vaccinadjuvans. I vidare studier av TLR 7/8 stimulering har man funnit att vissa små molekyler som liknar guanin nukleotider, s.k. "bas-analoger" är starka inducerare av typ I IFN-produktion via TLR 7/8. Några av dessa "bas-analoger" t.ex. imiquimod (R837) och resiquimod (R848) används inom humanmedicinen bl.a. som behandling av genitala och perianala vårtor, basalcellscarcinom och aktiniska keratoser. Deras effekt antas då bero på deras förmåga att inducera typ I IFN och andra cytokiner. Även inom hästmedicinen har "bas-analoger" för humant bruk prövats som behandling⁽¹⁶⁾, t.ex. sarcoider behandlas med imiquimod (Aldara™) med rapporterat gott resultat. Vi har dock tidigare funnit att imiquimod inte inducerade typ I IFN-produktion i vita blodkroppar från häst (opublicerade resultat). Med tanke på den kliniska användningen av TLR 7/8-stimulerare och denna motsägelsefulla observation tillsammans med resultaten från delstudie 1 där poly U inducerade mycket låga typ I IFN-svar ansåg vi att det var viktigt att grundligare utreda hur TLR 7/8-stimulerare påverkar hästens immunceller. Vidare ville vi studera ifall den nyligen identifierade receptorn TLR 13 som anses känna igen RNA från bakterier⁽¹⁷⁾ var aktiv i induktionen av typ I IFN hos häst. Vi stimulerade därför vita blodkroppar i cellkultur med en panel av olika TLR 7/8-stimulerare samt TLR 13-stimuleraren ORN Sa19 (Tabell 2).

Material & metoder

Till denna delstudie användes vita blodkroppar som isolerades från blodprover från klinisk friska hästar (etiskt tillstånd för djurförsök C205/11). Blod från totalt 8 olika hästar inkluderades, 6 ston och 2 vallacker, 7-21 år gamla. Gruppen innefattade 3 st svenska varmblood, 2 st engelska fullblood, 1 st holländskt varmblood (KWPN), 1 st tyskt varmblood och 1 st Connemarapponny. De vita blodkropparna odlades i närvaro av en panel olika inducerare (Tabell 2) i 24h. Därefter samlades cell-supernatanten för analys av cytokininnehåll med en s.k. Luminex-immunoassay som möjliggör detektion av flera olika cytokiner samtidigt. De cytokiner som inkluderades i denna test var IFN- α , IFN- γ , interleukin-4 (IL-4), IL-10 och IL-17. För att korrigera något för den naturliga stora inter-individuella variationen i nivån av cytokinproduktion uttrycktes resultaten inom individ som proportioner av en positiv kontroll. Därefter beräknades gruppmedelvärden och variation för varje inducerare. Som positiv kontroll för IFN- α och IFN- γ användes ODN 2395 (en TLR 9-stimulerare) och för IL-4, IL-10 och IL-17 användes Con A som är en generell stimulerare av produktion av många cytokiner, dock inte typ I IFN (Tabell 2).

Slutrapport 2010-2013

Tabell 2. Inducerare använda i delprojekt 4

Inducerare	Förkortning	Beskrivning och induktionsväg
Oligodeoxyribonukleotid 2395	ODN 2395	Syntetisk DNA innehållande CG-sekvens som anses inducera IFN-produktion via TLR 9 i endosomer
Concanavalin A	Con A	Ett växtlektin från ärtväxten <i>Concanavalia ensiformis</i> som spesifikt stimulerar ffa T-lymfociter till celledelning och cytokinproduktion troligen via bindning till receptorer på cellytan
Poly-uridin (poly U) + LyoVec	poly U	Enkelsträngad RNA U-sekvens som kombinerad med transfektions-medlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer
ORN02 +LyoVec	ORN02	Enkelsträngad RNA AU-sekvens som kombinerad med transfektions-medlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer
ORN06 + LyoVec	ORN06	Enkelsträngad RNA GU-sekvens som kombinerad med transfektions-medlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer
ssRNA40 + LyoVec	RNA40	Enkelsträngad RNA GU-sekvens som kombinerad med transfektions-medlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer
ssRNA41 + LyoVec	RNA41	Enkelsträngad RNA GC-sekvens kombinerad med transfektions-medlet LyoVec är inaktiv kontroll till ssRNA40
ssRNA-DR + LyoVec	RNADR	Enkelsträngad RNA UGCA-sekvens som kombinerad med transfektions-medlet LyoVec, anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer
R848 - imidazoquinolin	R848	En s.k. "bas-analog" som anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer
CL307 – 8-hydroxyadenin derivat	CL307	En s.k. "bas-analog" som anses inducera IFN-produktion via TLR 7 i endosomer
CL075 - thiazoloquinolin	CL075	En s.k. "bas-analog" som anses inducera IFN-produktion via TLR 7/8 i endosomer (f.f.a. via TLR 8)
Poly-thymidin (poly T)	Poly (dT)	Enkelsträngad syntetisk poly-T RNA som anses inaktiv i sig själv men kombinerad med en "bas-analog" medför att denna aktiverar TLR 8 i stället för TLR 7
ORN Sa19	ORN Sa19	Enkelsträngad RNA sekvens ursprungligen från ribosomalt RNA i bakterien <i>Staphylococcus aureus</i> som anses aktivera TLR 13
ORN Sa19 control	ORN Sa19C	Enkelsträngad RNA sekvens – inaktiv kontroll till ORN Sa19

Resultat & diskussion

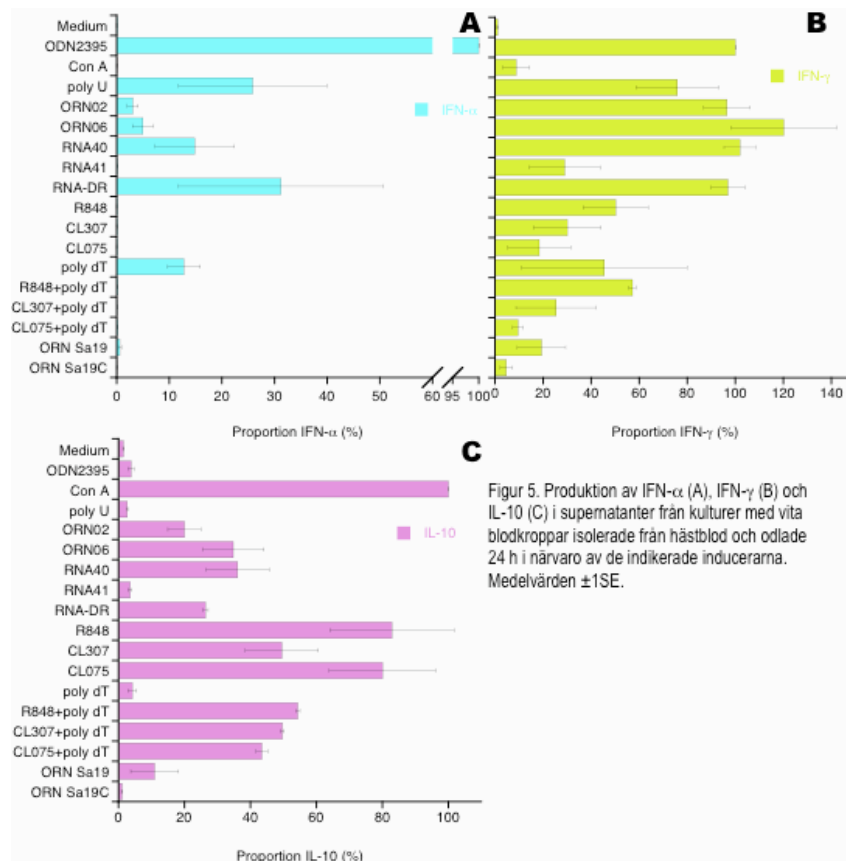
Resultaten från stimuleringen av vita blodkroppar från hästar med olika TLR 7/8-stimulerare visade att IFN- α producerades vid stimulering med olika U-, GU- och AU-rika enkelsträngade RNA sekvenser; poly U, ORN02, ORN06, RNA40 och RNA-DR (Figur 5A). Poly U och RNA-DR verkade av dessa vara de starkaste IFN- α -inducerarna men generellt var nivåerna av detta cytokin låga, i snitt maximalt ca 35% av de inducerade med den positiva kontrollen ODN 2395. De s.k. "bas-analogerna", R848, CL307 och CL075 inducerade däremot inte någon IFN- α -produktion alls. Produktion av IFN- γ (typ II IFN) inducerades både av de enkelsträngade RNA-inducerarna och av "bas-analogerna" (Figur 5B). IFN- γ -nivåerna inducerade av enkelsträngat RNA var i samma storleksordning som de inducerade av den positiva kontrollen ODN2395 medan "bas-analogerna" tenderade att inducera något lägre nivåer av IFN- γ . Produktion av IL-10 inducerades också av både de enkelsträngade RNA-inducerarna och av "bas-analogerna" (Figur 5C) men här tenderade "bas-analogerna" att inducera de högsta IL-10-nivåerna jämfört med RNA-inducerarna. Aktivering av hästens immunceller via TLR 7/8 verkar alltså skilja sig väsentligt från den som observerats för mus och människa där TLR 7/8 stimulering anses vara en stark signal för typ I IFN produktion.

En ytterligare väsentlig djurslagsskillnad observerades med den enkelsträngade poly-T-sekvensen (poly dT). Denna har bl.a. i musceller rapporterats vara inaktiv i sig själv men i kombination med "bas-analoger" medföra att dessa aktiverar TLR 8 istället för TLR 7 ⁽¹⁸⁾. Vid stimulering av vita blodkroppar från häst inducerade dock poly dT i sig själv både produktion av IFN- α och IFN- γ men inte av IL-10 i någon högre grad (Figur 5). Vidare påverkades inte IFN- γ - eller IL-10-svaren inducerade av "bas-analogerna" nämnvärt av poly dT och ingen induktion av IFN- α med "bas-analogerna" observerades vid kombination med poly dT trots att enbart poly dT inducerade produktion av detta cytokin.

Våra resultat visar följaktligen att dessa TLR 7/8-stimulerare inte ger de, från studier i människa och mus, förväntade cytokinsvaren vid aktivering av hästens immunceller. Framförallt gäller detta de s.k. "bas-analogerna" som i hästceller inte inducerar någon produktion av typ I IFN. Däremot inducerade "bas-analogerna" produktion av IFN- γ och IL-10 i vita blodkroppar från häst. Interferon- γ är ett typ II IFN som har viss anti-viral effekt men som framförallt är viktig i regleringen av immunsvaret mot s.k. Th1-svar.

Slutrapport 2010-2013

Interleukin-10 är ett potent cytokin med många funktioner, både inflammatoriskt och kanske framförallt anti-inflammatoriskt och det är associerat med immunsvaret av s.k. Th2-typ. "Bas-analoger" har ett viktigt användningsområde kliniskt inom humanmedicinen där deras förmåga att inducera typ I IFN anses vara den viktigaste verkningsmekanismen. Inom hästmedicin anser man att "bas-analoger" har viss effekt på t.ex. sarkoider, men mot bakgrund av våra resultat skulle sannolikt substanser som inducerade typ I IFN också i hästceller vara mer verksamma.



Figur 5. Produktion av IFN- α (A), IFN- γ (B) och IL-10 (C) i supernatanter från kulturer med vita blodkroppar isolerade från hästblod och odlade 24 h i närvaro av de indikerade inducerarna. Medelvärden \pm 1SE.

Vi inkluderade även TLR 13-stimuleraren ORN Sa19 i detta experiment. TLR 13 är en relativt nyupptäckt receptor som anses känna igen RNA från bakterier⁽¹⁷⁾. Vidare uttrycks TLR 13 i immunceller från mus men inte i humana celler (den humana TLR 13-genen är inte funktionell). Vi undersökte därför hästens arvs massa med avseende på genen för TLR 13 och fann en gen som potentiellt var funktionell. En ytterligare indikation på att TLR 13-aktivering kan ske i hästens immunceller erhöles således i detta experiment, då stimulering med ORN Sa 19 resulterade i produktion av IFN- γ , IL-10 samt även låga men tydligt detekterbara nivåer av IFN- α (Figur 5).

Sammantaget ger dessa resultat ny viktig information om hästens immunsystem. Denna kunskap är nödvändig för att förstå infektions- och inflammationssjukdomar hos häst och för att korrekt använda, och utveckla ny, behandling och profylax för dessa sjukdomar. Denna delstudie utfördes framförallt under hösten 2013 och resultaten är nu under sammanställning för publikation i en vetenskaplig peer-review tidskrift.

SLUTSATSER & RESULTATFÖRMEDLING

Detta projekt har bidragit med viktig ny kunskap om hästens immunsystem. Vi har funnit både likheter och väsentliga skillnader i hästens typ I IFN system jämfört med det hos andra däggdjur. Denna kunskap är avgörande för förståelsen av infektions- och inflammationssjukdomar hos häst. Vidare har typ I IFNer stor potential för att användas i terapi och profylax mot dessa sjukdomar. Resultaten från detta projekt har och kommer att presenteras i vetenskapliga forum och publikationer. Projektledare Eva Waträng är aktiv inom undervisningen av veterinärstudenter i immunologi och föreläser om immunologi och

Slutrapport 2010-2013

vaccination där resultat från detta projekt presenteras vid t.ex. Veterinärkongressen och Läkemedelsakademien och andra forum där hästnäringen är representerad.

PUBLIKATIONER

1. Wattrang, E., B. Wagner, and D. Morrison, *Genomic analysis of the equine type I interferon family*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 330. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466608006637>)
2. Wattrang, E. *Type I interferons: IFN- α and family - with focus on the horse*. in *3rd European Veterinary Immunology Workshop*. 2009. Berlin, Germany.
3. Detournay, O. and E. Wattrang. *Type I IFN gene expression measured by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes*. in *Frontiers in Immunology Research*. 2010. Athens, Greece.
4. Detournay, O., D.A. Morrison, B. Wagner, B. Zarnegar, and E. Wattrang, *Genomic analysis and mRNA expression of equine type I interferon genes*. J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(12): p. 746-59. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23772953>)
5. Wahlund, C. *Detection and quantification of equine type I interferons*. 2011. publicerat i DiVA (<http://uu.diva-portal.org/smash/record.jsf?searchId=2&pid=diva2:443410>)

REFERENSER

1. Krause, C.D. and S. Pestka, *Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives*. Pharmacol Ther, 2005. **106**(3): p. 299-346.
2. Woelk, C.H., S.D. Frost, D.D. Richman, P.E. Higley, and S.L. Kosakovsky Pond, *Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals*. Gene, 2007. **397**(1-2): p. 38-50.
3. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 8-32.
4. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
5. Theofilopoulos, A.N., R. Baccala, B. Beutler, and D.H. Kono, *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 307-36.
6. Fitzgerald-Bocarsly, P., J. Dai, and S. Singh, *Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 3-19.
7. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 352-7.
8. Wang, Z., M.K. Choi, T. Ban, H. Yanai, H. Negishi, Y. Lu, T. Tamura, A. Takaoka, K. Nishikura, and T. Taniguchi, *Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5477-82.
9. Leeb, T., C. Vogl, B. Zhu, P.J. de Jong, M.M. Binns, B.P. Chowdhary, M. Scharfe, M. Jarek, G. Nordsiek, F. Schrader, and H. Blocker, *A human-horse comparative map based on equine BAC end sequences*. Genomics, 2006. **87**(6): p. 772-6.
10. Baumgart, D.C., D. Metzke, O. Guckelberger, A. Pascher, C. Grotzinger, I. Przesdzing, Y. Dorffel, J. Schmitz, and S. Thomas, *Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis*. Clin Exp Immunol, 2011. **166**(1): p. 46-54.
11. Sang, Y., R.R. Rowland, R.A. Hesse, and F. Blecha, *Differential expression and activity of the porcine type I interferon family*. Physiol Genomics, 2010. **42**(2): p. 248-58.
12. Wagner, B., J.M. Hillegas, M. Flaminio, and E. Wattrang, *Monoclonal antibodies to equine interferon- α (IFN- α): New tools to neutralize IFN activity and to detect secreted IFN- α* . Vet Immunol Immunopathol, 2008. **125**: p. 315-325.
13. Wagner, B., J. Robeson, M. McCracken, E. Wattrang, and D.F. Antczak, *Horse cytokine/IgG fusion proteins-mammalian expression of biologically active cytokines and a system to verify antibody specificity to equine cytokines*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **105**(1-2): p. 1-14.
14. Wattrang, E., M. Berg, and M. Magnusson, *Immunostimulatory DNA activates production of type I interferons and interleukin-6 in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **107**(3-4): p. 265-79.
15. Wattrang, E., A.K. Palm, and B. Wagner, *Cytokine production and proliferation upon in vitro oligodeoxynucleotide stimulation of equine peripheral blood mononuclear cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **146**(2): p. 113-24.
16. Torres, S.M. and S.N. Koch, *Papillomavirus-associated diseases*. Vet Clin North Am Equine Pract, 2013. **29**(3): p. 643-55.
17. Hidmark, A., A. von Saint Paul, and A.H. Dalpke, *Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2717-21.
18. Gorden, K.K., X. Qiu, J.J. Battiste, P.P. Wightman, J.P. Vasilakos, and S.S. Alkan, *Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 8164-70.