



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi

Ekvint infektiöst anemivirus - immunsvarets roll för virusets persistens

Linnea Ebersson

*Uppsala
2016*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2016:18

Ekvint infektiöst anemivirus

– immunsvarets roll för virusets persistens

Equine infectious anemia virus

- The function of the immune response in persistence of virus

Linnea Ebersson

Handledare: *Caroline Fossum och Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi*

Examinator: *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2016:18

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: EIAV, SCID, immunförsvar, virusutveckling

Key words: EIAV, SCID, immune system, development of virus

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Ekvint infektiöst anemivirus.....	4
Viruskomponenter.....	4
EIAV hos en immunkompetent individ.....	5
SCID hos arabiskt fullblod	7
Rekombination av VDJ-gensegment och lymfocytdifferentiation	7
Mekanism bakom SCID hos arabiskt fullblod.....	8
Immunförsvar hos föl med SCID.....	8
EIAV hos föl med severe combined immunodeficiency	8
DISKUSSION	10
LITTERATURFÖRTECKNING.....	12

SAMMANFATTNING

Ekvint infektiöst anemivirus (EIAV) är utbrett över nästan hela världen. Virusnet innebär en utmaning för hästnäringen då det varken finns vaccin eller behandling för smittade individer. EIAV tillhör genuset lentivirus i familjen retrovirus och skapar persisterande infektioner hos smittade hästar. Trots immunförsvarets möjlighet att kontrollera viruset kan individer aldrig eliminera det helt. En anledning till att viruset kan persistera är dess förmåga till förändring och att därmed undkomma immunförsvaret.

Förmågan att undkomma immunförsvaret härrör från olika mekanismer, en av dessa tros vara immunförsvarets egen förmåga att driva utvecklingen av viruset. Detta är en av svårigheterna med EIAV och för att undersöka immunförsvarets roll vid EIAV-infektion har olika undersökningar gjorts. Studier har utförts för att försöka kartlägga immunsvaret mot EIAV samt vid vilken tidpunkt i infektionsförloppet som de olika delarna i immunförsvaret är som mest aktiva. För att undersöka dessa komponenter har friska individer exponerats för viruset men det har också gjorts liknande försök på hästar med severe combined immunodeficiency (SCID).

Hästar med SCID har ett dysfunktionellt immunförsvaret i den mening att individerna saknar fungerande B- och T-celler. Detta beror på en mutation i en gen som kodar för DNA-PKcs, en del av ett enzym som krävs för rekombination av gener som sedan skapar receptorer på B- och T-cellernas yta. Om dessa receptorer inte skapas på rätt sätt kommer cellerna inte att kunna utvecklas.

Individerna med SCID ger möjlighet att studera EIAV i en individ helt utan adaptivt immunförsvaret. Detta är en unik situation där miljön för viruset till stor del kan förändras utifrån behov och frågeställning. Med hjälp av dessa immundefekta individer är det möjligt att studera hur olika delar av immunförsvaret kontrollerar en infektion med EIAV och när i processen kontrollen sker. Det som verkar klart i samtliga försök är att immunförsvaret spelar roll i utvecklingen av EIAV i en individ, men det finns fortfarande många oklarheter gällande vilken del av immunförsvaret som gör vad vid vilken tidpunkt.

Syftet med denna litteraturstudie är att förstå om hästar med SCID utgör en bra testmodell, om det finns möjlighet att fortsätta försök i SCID-individer kan hjälpa kartläggningen av immunförsvaret vid en EIAV-infektion och om skulle detta kunna vara ett sätt för att finna ett vaccin?

Det verkar som att föl med SCID utgör en ovärderlig grund i arbetet för att vidare förstå vad som sker vid en infektion med EIAV. Modeller där SCID-föl har använts för att studera EIAV har bidragit till att kartlägga immunsvaret. Trots att det är långt kvar till full förståelse har många viktiga upptäckter gjorts. Studierna har, utöver att ha skapat en början till förståelse för immunsvaret, även lett till funderingar om epitoper hos viruset som skulle kunna leda till vaccinutveckling mot EIAV och möjligtvis andra lentivirus. Sammantaget krävs det mer forskning för vidare kartläggning av immunsvaret och för att fullt förstå vilka komponenter av detta som verkar hur och när i EIAVs infektionscykel och för att förstå vilka delar det är som driver utvecklingen av viruset i en individ.

SUMMARY

Equine infectious anemia virus (EIAV) is distributed in nearly the whole world. Since there is no vaccine or treatment for infected individuals, the virus is a challenge for all of the industries containing horses. EIAV is one of the lentiviruses in the family retroviruses and causes persistent infections in horses. Even though the immune system is able to control the virus, it can never eliminate it totally. One of the reasons that makes it possible for the virus to persist is its ability to antigenic variation and with that escape the immune system.

The ability to escape the immune system derives from different mechanisms, which one is believed to be the capability of the immune system itself to impel development of the virus. This is one of the difficulties of EIAV and because of this, a number of different investigations have been made with the aim of understanding the function of the immune system at EIAV-infections. Studies have included the first steps of trying to map the immune system against EIAV and also which part of the immune system that might be active during different stages of infection. To investigate these components, healthy individuals have been exposed for EIAV and studied, these experiments have also been done in horses with severe combined immunodeficiency (SCID).

Horses with SCID have a dysfunctional immune system. The B- and T-cells of SCID-horses are not functional due to a mutation in a gene coding for an enzyme necessary for a successful gene rearrangement. Rearrangement is essential to produce functional receptors for B- and T-cells, if the rearrangement is intervened no antigen receptors are generated and development of the cells stops.

Individuals with SCID enable a unique environment to study EIAV in. The lack of adaptive immune system constitutes a situation where it's possible to alter the environment in which the virus is studied to the right preferences. It is possible to study specific responses of the immune system and when the responses occur related to the progression of the infection. What has been stated in all studies is that the immune response has an important role in the development of EIAV in an individual, but it's still not clear which part of the immune system that is active in which stage of the infection.

The purpose of this report is to summarize if SCID in horses is considered to be a good model for studying EIAV and if it's possible to map the immune response against the virus with further studies using this model. Could this help in the development of a vaccine?

It seems like foals with SCID constitute an invaluable resource in the research about EIAV and the immune system following infection. Studies made in foals with the disorder have helped to map the immune response, but there's still a long way to go. The studies have made a basis for further studies and also brought more thoughts into the field regarding vaccine and specific epitopes. In summary, more research is needed to fully understand the immune response against EIAV and to eventually find the way to make an efficient vaccine.

INLEDNING

Det finns många olika typer av agens och genetiska defekter som kan påverka en individs immunsystem. Beroende på vilken typ av skada eller påverkan det rör sig om blir immunsystemet dysfunktionellt i olika grad. Vad som däremot är mindre utforskat är om och hur immunförsvaret i sig kan påverka utvecklingen av ett agens i en värd. Vidare finns frågan om djur med immundefekter kan användas för att undersöka detta.

Ekvint infektiöst anemivirus (EIAV) infekterar hästar i stora delar av världen. Med tiden förändras viruset och immunsvaret mot det, en bakomliggande teori är att det är immunsvaret som driver den utvecklingen av viruset (Mealey *et al.*, 2004). För att undersöka om detta är en möjlig hypotes har man använt SCID-föl för att förstå immunförsvarets roll (Perryman *et al.*, 1988).

SCID (severe combined immunodeficiency) är en primär immundefekt som finns hos arabhästar. Sjukdomen ger upphov till defekta B- och T-celler vilket resulterar i ett icke funktionellt immunsystem hos individen (Crisman & Scarratt, 2008; Emelyanova *et al.*, 2008).

Situationen med en individ som inte kan motarbeta infektiösa agens är unik, något som gör att tester på SCID-föl är ett bra sätt att undersöka infektioner och olika typer av immunsvars roll vid en infektion. I försök har individer med SCID infekterats med EIAV i kombination med olika immunceller för att studera hur olika delar av immunförsvaret påverkar sjukdomen och hur den eventuellt kan behandlas (Perryman *et al.*, 1988). Studierna har gjorts med förhoppningen om att få en bättre förståelse för individens immunförvar, vilka faktorer som är drivande för neutralisering av virus, vilken typ av immunsvaret som är aktivt i infektionens olika skeden och hur det påverkar sjukdomens förlopp (Mealey *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2011). En förhoppning om att man med hjälp av SCID-föl som modell för EIAV-infektion ska kunna driva utvecklingen av ett vaccin mot viruset och likartade virus finns också (Cook *et al.*, 2013). Syftet med den här litteraturstudien var att skapa förståelse för vad begreppet ”SCID” betyder hos häst, vad man har fått ut av studier genom att använda sig av SCID-föl och vilket immunsvaret som är centralt mot EIAV samt hur det påverkar individen och infektionen.

MATERIAL OCH METODER

Under litteratursökningar användes databaserna Web of Science, PubMed och delvis Google Scholar. Sökningarna var till en början breda men smalnade gradvis av. Sökord som har använts är: SCID AND horse* OR equine, Primary immunodeficiency AND horse OR equine, EIAV AND immunology, EIAV AND SCID. Dessa sökord och kombinationer av sökord är inte begränsande, de är ett urval av de som använts. För att utesluta artiklar som behandlade SCID hos människor och andra djurslag, vilka inte var aktuella, lades exempelvis ”NOT human OR mice OR dog” till i sökningen. Sökord till artiklar samt artiklar i sig har även hämtats direkt från referenslistor hos andra intressanta artiklar.

LITTERATURÖVERSIKT

Ekvint infektiöst anemivirus

Ekvint infektiöst anemivirus är ett lentivirus som tillhör familjen retroviridae. Som alla virus inom familjen är viruset ett höljeförsett ssRNA-virus. EIAV har tropism för makrofager och orsakar persisterande infektioner hos hästar och ponnier (Leroux *et al.*, 2004). Det replikerar i vävnadsmakrofager och perifera blodmonocytdriverade makrofager (MDM), men infekterar även monocyter och endotelceller (Du *et al.*, 2015). Viruset är av stor betydelse för världens hästupulation och är en av de elva hästsjukdomarna som listas av OIE (Cook *et al.*, 2013). EIAV beskrevs för första gången i Frankrike 1843 och är idag utspritt över hela världen. Sjukdomen förekommer inte endemiskt i Europa men spridda fall upptäcks varje år, en orsak till sjukdomsfallen är importerade hästar samt infekterad blodplasma. EIAV är en blodsmitta och sprids via vektorer, kontaminerade kanyler och blodprodukter. Smittan kan även spridas vertikalt från moder till foster, via mjölk och veneriskt. Hos hästar kan sjukdomen vara akut och dödlig även om de flesta infekterade individerna verkar utveckla en livslång persisterande subklinisk infektion med låga virustitrar och antikropps nivåer. Vid en kronisk form av sjukdomen ses ofta återkommande perioder av feber och slöhet hos individen. För att diganosticera EIAV används Coggins test (AGID), ett serologiskt test som detekterar antikroppar mot virus. I dagsläget finns det inget vaccin tillgängligt, tidigare vaccin används inte längre till följd av svårigheten att skilja vaccinerade och naturligt infekterade hästar åt. Vaccinet gav inte heller skydd om virusets epitoper förändrades. Behandling för hästar som bekräftats vara infekterade med EIAV finns inte. Eftersom hästarna blir virusbärare och riskerar att sprida smittan måste de hållas isolerade eller helst avlivas (*Infektiös anemi (EIA) - SVA*, 2014).

Viruskomponenter

Viruset har liksom alla retrovirus ett omvänt transkriptas som möjliggör omvänd transkription. Den omvända transkriptionen resulterar i ett provirus som integreras med värdens eget genom via viralt integras. EIAV består av gener som gag, pol och env, vilka alla kodar för specifika strukturer hos viruset. Gag (*group specific antigen*) är en gen som resulterar i fyra strukturella proteiner hos EIAV, däribland matrixproteinet som är inblandat i vidfästandet till innersidan av värdcellens membran. Pol (*polymeras*) är den gen som kodar för virala enzymer så som det omvända transkriptaset. Env (*envelope*) -genen kodar för virusets hölje: SU (*surface unit*) och TM (*transmembran del*). Hos EIAV kodar env-genen för glykoprotein 90, en specifik typ av SU (även kallad gp90 eller endast SU), och för glykoprotein 45, en specifik typ av TM (även kallad gp45 eller endast TM). Strukturerna är viktiga för adherering till receptorer hos värdens celler (Issel *et al* 2014) och vidare för infektion av cellen. Hos häst är en specifik receptor, till vilken bindningen sker, identifierad som en receptor ur familjen TNF-receptorer och betecknas ELR-1 (*equine lentivirus receptor-1*) (Zhang *et al.*, 2005). Regionen som kodar för SU har ett område som kallas principiell neutraliserande domän (*principal neutralizing domain, PND*). I detta område finns

strukturerna som neutraliserande antikroppar känner igen. SU, eller gp90, är det enda protein som i dagsläget har epitoper som kan identifieras av neutraliserande antikroppar (Cook *et al.*, 2013). Gp90 har möjlighet att förändras mycket rent sekventiellt, troligen genom misstag under den omvända transkriptionen i form av deletioner och insertioner, utan att förlora sin funktion. Detta påverkar regionen för PND och det finns teorier om att detta är något som är bidragande till persisterande EIAV-infektioner med återkommande viremiska perioder. Det kan även vara en del av svårigheten i att hitta ett bra vaccin (Kono, 1988; Leroux *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2013).

Vad mer som verkar drivande för selektionen av nya gp90-varianter *in vivo* verkar vara värdens eget immunsvaret (Kono, 1988; Mealey *et al.*, 2004). Att antikroppar kan orsaka förändringar i gp90 stöds av experiment där man har hittat antigena varianter av EIAV i närvaro av neutraliserande antiserum. Förändring av gp90 resulterar inte bara i att viruset undkommer redan bildade antikroppar, utan även att det undkommer det specifika cellmedierade immunsvaret (Cook *et al.*, 2013).

EIAV hos en immunkompetent individ

Tidigt immunsvaret

De kliniska tecknen vid en infektion av EIAV drivs av proinflammatoriska cytokiner som TNF α , IL-6 och TGF β . Det är cytokiner som frisätts från vävnaden vid tillräckligt hög viruskoncentration (Issel *et al.*, 2014). Det är ännu osäkert vad som är den egentliga källan till cytokinfrisättningen men det har diskuterats om det är närliggande celler till de infekterade makrofagerna eller om det är makrofagerna i sig. Vad som har visats är att EIAV kan störa värdcellens genuttryck och uppreglera produktion av TNF α , IL-1 α , IL-1 β och IL-6 (Cook *et al.*, 2013). De proinflammatoriska cytokinerna som frisätts orsakar feber, trombocytopeni och anemi som är karakteristiskt för den akuta fasen av sjukdomen (Perryman *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 2013). Efter den akuta fasen utvecklar individen ett kroniskt tillstånd där återkommande episoder av viremi förekommer. Dessa avtar med tiden och infektionen blir persistent, individen blir ofta asymptomatisk men lyckas inte göra sig av med infektionen (Perryman *et al.*, 1988; Issel *et al.*, 2014).

Cellmedierat immunsvaret

Den största initiala viremiska kontrollen tros tillfalla det cellmedierade immunsvaret i form av cytotoxiska T-lymfocyter (CTL), samt icke-neutraliserande antikroppar (Hammond *et al.*, 1997). Virusspecifika CTL kan hittas hos den infekterade värden redan 14 dagar efter infektion (post infection, pi) (Mealey *et al.*, 2005). De cytotoxiska T-lymfocyternas svar är riktat mot specifika epitoper hos viruset, SU, som anses vara immunodominanta (Cook *et al.*, 2013), epitoperna hos viruset har många variabla regioner som lätt muterar vilket kan vara en förklaring till att CTL-nivåerna snabbt kan sjunka (Hammond *et al.*, 1997). Det är troligt att CTL riktade mot epitoperna inom SU kan selektera fram nya epitoper och ett nytt utseende av viruset (Mealey *et al.*, 2004). Det cellmedierade svaret tidigt under infektionen kan vidare, förutom att svara för initial viremisk kontroll, vara ett sätt att ge det humoral immunsvaret

mer tid för att utvecklas mot ett virusspecifikt svar (Hammond *et al.*, 1997).

Förutom CTL har man också sett T-hjälparcellssvar vid infektion av ekvina makrofager. Majoriteten av dessa T-celler var CD4⁺ (Hammond *et al.*, 1997). I en studie av Liu *et al* (2014) undersöktes peptidspecifika T-cellssvar under ett långt infektionsförlopp. Studien indikerar att T-cellssvaret förändras under sjukdomens gång, från att till en början ha varit riktat mot några få regioner till att senare i förloppet, efter sex månader, vara riktat mot hela sekvenser i gp90 (Liu *et al.*, 2014).

Humoralt immunsvaret

Enligt en studie av Hammond *et al* (1997) tar det tar ungefär sex till åtta månader för det humorala immunsvaret att utvecklas helt. Antikroppar som upptäcks tidigt i infektionsstadiet, 14-28 dagar pi, verkar sakna signifikant neutraliserande verkan mot viruset. Under den tid det tar för immunsvaret att utvecklas helt blir antikropparna gradvis mer EIAV-specifika. Antikroppar med neutraliserande verkan kan normalt inte hittas förrän 38-87 dagar pi och uppnår inte sin maximala verkan förrän 90-148 dagar pi (Hammond *et al.*, 1997; Issel *et al.*, 2014). Hammond *et al* (1997) kunde i en studie se att antikroppar, IgG och IgM, serokonverterade i närvaro av proteiner tillhörande EIAV-höljet och gick över till att vara mer virusspecifika. Antikropparna persisterade under olika lång tid av infektionen och inget direkt samband med viremiska perioder kunde ses, vilket indikerar att antikropparnas funktion i den viremiska kontrollen ännu inte är helt klarlagd. Mealey *et al* (2004) konstaterar dock att det under infektionens akuta fas uppkommer nya varianter av viruset i samband med varje viremi. Dessa nya varianter är benägna att undkomma antikroppar som bildats mot tidigare EIAV-varianter i infektionen, samt driva uppkomst av nya antikroppar. Senare i infektionsförloppet uppstår sekventiella varianter av gp90 hos viruset som blir mer och mer resistent mot neutraliserande antikroppar.

I en studie av Sponseller *et al* (2007) upptäcktes typspecifika antikroppar som kunde neutralisera chimära varianter av EIAV under den akuta perioden av sjukdomen. Selektion för antigena varianter hos SU verkade dock ske fort vilket tyder på att viruset undkommer immunförsvaret. I det persisterande stadiet av sjukdomen indikeras det att breda neutraliserande antikroppar spelar en större roll. Ofta sammanfaller början av det persistenta stadiet med uppkomsten av de breda neutraliserande antikropparna samt en ökad genetisk variabilitet i PND. Med infektionens fortgång uppkommer ökat motstånd mot de breda antikropparna på grund av resistent mutationer, vilket indikerar att det breddade immunsvaret i sig är den faktor som utövar selektionstryck på viruset (Sponseller *et al.*, 2007).

Till skillnad från det cellmedierade immunsvaret i form av CTL, som tycks vara det som står för resolutionen av den första initiala viremin, har det inte konstaterats att antikropparna har någon liknande verkan för kommande stadier. Antikropparna verkar snarare vara en del av immunsvaret som upprätthåller en neutraliserande verkan mot viruset i det långa loppet (Hammond *et al.*, 1997).

SCID hos arabiskt fullblod

Severe combined immunodeficiency disease är en primär immundefekt som finns beskriven för arabiska fullblod, möss, människor och hundar (Crisman & Scarratt, 2008). Hos arabiska fullblod konstaterades sjukdomen 1973 för första gången (McGuire & Poppie, 1973). Individer med sjukdomen utvecklar inga fungerande B- och T-celler och får inget fullgott immunförsvar. Till följd av olika infektioner dör individerna tidigt, ofta innan sex månaders ålder (Emelyanova *et al.*, 2008). SCID är en genetisk defekt och nedärvs med autosomal recessiv arvsång. Den underliggande orsaken till sjukdomen är att rekombination av V(D)J-gensegment inte kan ske (Wiler *et al.*, 1995), vilket resulterar i att individens B- och T-lymfocyter avstannar i utvecklingen och att prekursorerna slutligen elimineras (Perryman, 2004).

Rekombination av VDJ-gensegment och lymfocytdifferentiering

För en normal utveckling av immunsvaret är rekombination av V(D)J-segment essentiellt. Rearrangemanget skapar nära nog oändligt många kombinationer av de antigenspecifika receptorerna på immuncellernas yta (Wiler *et al.*, 1996). För att B- och T-celler ska utvecklas och mogna krävs ett rearrangemang som skapar TCR och immunoglobulinreceptorer på respektive celltyp (Wiler *et al.*, 1995; Perryman, 2004). Rearrangemanget av de olika gensegmenten V (variabel), D (diversitet) och J (joining) möjliggör transkription och translation och sker normalt under lymfoidernas tidiga differentiation under inverkan av två enzymgrupper (Perryman, 2004). Rekombinasaktiverande gener 1 och 2 (RAG 1 och RAG 2), som står för produktionen av en av de två enzymgrupperna, uttrycks bara i lymfoid vävnad medan DNA-beroende proteinkinase (DNA-PK) förekommer i praktiskt taget alla typer av vävnad. Under inverkan av RAG 1 och RAG 2 klyvs DNA för att rearrangemang ska kunna genomföras, DNA-PK verkar sedan vara den faktor som skapar de nya sammanfogningarna av DNA hos de lymfoida prekursorerna, vilket producerar det DNA som kodar för antigenspecifika TCR och immunoglobulinreceptorer. Rekombinationen leder till att kodande regioner bildas (*coding joints*) hos DNA och att introner (*intervening DNA*) klipps bort och formar cirkulära strukturer med specifika fogar (*signal joints*). *Coding joints* bildas mellan V- och (D)- regioner och (D)- och J-regioner och spelar stor roll i bindning av antigen till immunoglobulinreceptorer samt hos T-cellernas receptorer (Perryman, 2004). Vilken roll *signal joints* har är ännu inte helt klarlagt, möjliga uppgifter är att de kan binda upp lösa DNA-fragment som annars skulle orsaka skada eller att de kan hjälpa till att bevara kromosomer (Neiditch *et al.*, 2002). Vid det normala rearrangemanget sammanfogas V(D)J-gensegmenten på olika sätt, förändringar hos DNA i form av deletioner eller insertioner kan ske i processen (Leber *et al.*, 1998).

Det DNA-beroende proteinkinaset har tre subenheter: Två Ku-delar och DNA-PKcs. Ku-delarna består av två subenheter som har olika molekylvikt. Den större subenheten binder lösa ändar av DNA på ett sekvensoberoende sätt för att sedan sammankopplas med DNA-PKcs (den katalytiska subenheten av DNA-beroende proteinkinase). Då Ku-delen sammanfogas med

DNA-PKcs bildas ett funktionellt kinas, DNA-PK, vilket adderar fosfatgrupper på proteiner. Ett funktionellt DNA-PK är essentiellt för att *coding joints* och *signal joints* ska bildas på rätt sätt hos hästar (Perryman, 2004).

Den uteblivna förmågan att rearrangera gensegmenten leder till att B-cellsspecifika immunoglobulinreceptorer och T-cells antigenreceptorer inte bildas på ett normalt sätt och att B- och T-celler förblir prekursorer som med tiden elimineras. Hos individen leder det nästintill en total avsaknad av mogna T- och B-lymfocyter (Perryman, 2004).

Mekanism bakom SCID hos arabiskt fullblod

SCID hos arabiska fullblod uppstår då individen inte har förmåga att rearrangera av V(D)J-gensegment. Anledningen till den uteblivna rekombinationen är en genetisk defekt som påverkar DNA-PKcs (Wiler *et al.*, 1995). Genen för hästens DNA-PKcs återfinns på kromosom nummer nio (Bailey *et al.*, 1997). Med hjälp av celler från föl har man kunnat konstatera att Ku-protein finns hos individerna vilket möjliggör bindning av DNA vid rekombinationen. Från samma celler har dock inga detekterbara nivåer DNA-PKcs hittats (Wiler *et al.*, 1995). Sekvenseranalyser av den katalytiska subenheten i DNA-PK har visat en deletion av ett antal baspar i den kodande genen som orsakar en mutation som leder till förändring av läsramen (*frame-shift*) och ett stoppkodon (Shin *et al.*, 1997). Mutationen förhindrar läsning av ett antal aminosyror och resulterar i ett instabilt protein (Perryman, 2004). Hästar med SCID saknar mätbara nivåer av aktivt DNA-PK till följd av de låga nivåerna DNA-PKcs, den katalytiska subenheten (Leber *et al.*, 1998).

Immunförsvar hos föl med SCID

Då rekombinationen inte fungerar är SCID-föl helt utan B- och T-celler och saknar ett adaptivt immunförsvar (Emelyanova *et al.*, 2008). Det immunförsvar som återfinns hos föl med SCID är det maternella skyddet i form av antikroppar som möjliggör överlevnad upp till sex månader. Om inte kolostrum intas förkortas detta livsspann märkbart. Föl med SCID dör vanligtvis inom sex månader till följd av infektionssjukdomar. SCID är behandlingsbar genom benmärgstransplantation (Leber *et al.*, 1998).

EIAV hos föl med severe combined immunodeficiency

För att studera immunförsvarets antivirala roll är det en unik möjlighet att kunna använda sig av individer som är mottagliga för smitta men inte kan åstadkomma ett eget adaptivt immunsvär. Genom att studera EIAV hos sådana individer kan infektionen i en frisk värd och en immuninkompetent värd jämföras (Perryman *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 2010). Studier av denna typ som utförts på föl med SCID har visat att det adaptiva immunförsvaret är essentiellt för att kunna kontrollera en infektion med EIAV. Både CTL och neutraliserande antikroppar spelar en stor roll (Perryman *et al.*, 1988; Mealey *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2011).

Unga föl med SCID klarar inte av att eliminera EIAV på egen hand. För att fölen ska klara av

infektionen krävs en överföring av EIAV-specifika T- och B-lymfocyter vilket leder till funktionella cytotoxiska T-lymfocyter och neutraliserande antikroppar (Taylor *et al.*, 2010). I samma studie av Taylor *et al* (2010), indikeras det att signifikant förändring i SU inte sker i frånvaro av neutraliserande antikroppar, men att snabb diversitet av SU utvecklas då det adaptiva immunsvaret rekonstrueras. Att förändringarna av SU uppkommer i närvaro av antikroppar tyder på att just det adaptiva immunförsvaret driver viruset till att utveckla nya subtyper som kan undkomma de neutraliserande antikropparna. Ytterligare en faktor som verkar drivande för virusets utveckling är CTL, som också känner igen SU hos viruset. I detta fall har varianter som undgår vissa epitoper hittats, vilket tyder på att viruset ändrat sin struktur.

I en annan studie av Taylor *et al* (2011) undersökte om nya subtyper av EIAV kunde undvikas i en individ genom att infusera de exponerade SCID-fölen med en högre dos antikroppar. Det konstaterades att breda neutraliserande IgG-antikroppar kunde blockera homolog EIAV-infektion i frånvaro av annat adaptivt immunsvaret. Antikropparna skyddade mot den typ av EIAV-virus som fölen hade exponerats för, samt en annan subtyp som fanns i mindre mängd i samma isolat. Dock sågs inget skydd vid exponering av en heterolog virusklon, men den initiala viremin fördröjdes.

Det finns också studier som syftar till att skapa en matematisk modell för att kunna förstå interaktionerna mellan viruset och värden. I dessa har antikroppssvar studerats hos SCID-föl som exponerats för olika varianter av EIAV och som fått infusioner av EIAV-specifika antikroppar (Ciupe & Schwartz, 2014). Studier som görs med matematiska modeller kan vara ett verktyg för att kunna hitta förhållanden mellan EIAV och antikroppar i en individ, detta för att kunna förutse vid vilken koncentration av antikroppar som viruset inte lyckas undkomma, det vill säga vilken koncentration av antikroppar som krävs för kontroll av viruset (Schwartz & Smith, 2014).

Föl med SCID har också använts för att undersöka vilka komponenter i det cellmedierade svaret mot virusinfektionen som krävs för att uppnå en fullgod bekämpning. Att CTL spelar en stor roll är klarlagt, men det finns inga studier gjorda på huruvida dessa celler kräver hjälp från andra för att kunna ha sin funktion. I en studie av Mealy *et al* (2008) användes SCID-föl för att studera om CTL-svaret kan vara fullgott i frånvaro av CD4+ T-hjälparceller samt neutraliserande antikroppar. I försöket transplanterades CTLs till ett antal SCID-föl och en modifierad form av IL-2 tillsattes för att stimulera dessa. Fölen infekterades sedan med EIAV och man studerade om fölen klarade av att kontrollera infektionen. Försöket lyckades inte och fölen visade symptom på att inte kunna hantera viremin, något som troligen berodde på att den modifierade formen av IL-2 inte kunde stimulera CTL tillräckligt väl (Mealey *et al.*, 2008).

DISKUSSION

Ekvint infektiöst anemivirus är ett lentivirus som ställer mycket höga krav på sin värds immunförsvaret. Trots att individer verkar kunna kontrollera initial viremi samt återkommande viremiska perioder elimineras EIAV aldrig helt ur sin värd (Cook *et al.*, 2013). Att det är just individens eget immunförsvaret som tycks driva virusets utveckling är en del av problematiken med EIAV. Då individen försöker motarbeta viruset leder det till att det istället utvecklas och undkommer immunförsvaret på nytt. Detta är en av anledningarna till svårigheten med att framställa ett skyddande vaccin.

För att kunna gå vidare med idén kring ett vaccin är det ett viktigt första steg att förstå hur viruset uppträder i värden. Vad det är som faktiskt resulterar i kontrollen av viruset är inte helt klarlagt och olika forskarlag har olika teorier. De flesta verkar vara överens om att den initiala kontrollen av viruset bör tillskrivas cytotoxiska T-lymfocyter (Hammond *et al.*, 1997). Vad som däremot kontrollerar kommande faser av infektionen är ännu inte helt utrett. Antikropparnas roll under infektionen är inte helt klar även om teorier gällande kontroll av viruset i det långa loppet tillskrivs dessa (Hammond *et al.*, 1997; Issel *et al.*, 2014). Vidare är immunförsvarets roll under den asymptomatiske fasen osäker (Hammond *et al.*, 1997) och behöver utredas.

Tidpunkten för när antikroppssvar mot EIAV kan upptäckas i individen skiljer sig mellan olika studier. Det råder också delade meningar om hur effektivt detta antikroppssvar är samt vad det har för roll senare i sjukdomen. Enligt Issel *et al* (2014) kunde ett maximalt antikroppssvar med neutraliserande verkan upptäckas 90-148 dagar efter infektion och antikroppar upptäcktes så tidigt som 14-28 dagar efter infektion. Antikropparna som upptäcktes på ett tidigt plan tycktes dock inte ha någon större neutraliserande verkan. Detta är något som både stärks och motsägs i en studie av Hammond *et al* (1997). Resultaten från den studien tyder på att neutraliserande antikroppar inte finns hos den infekterade individen förrän tidigast sex till åtta månader efter infektion. Vad som mer framkom i studien var att det tidiga antikroppsvaret inte verkade vara neutraliserande, vilket stämmer överens med resultaten i studien av Issel *et al* (2014). I ytterligare en studie av Sponseller *et al* (2007) kunde det konstateras att det sena antikroppsvaret verkar vara det som kontrollerar infektionen i det långa loppet, men det är inte helt klarlagt när detta svar uppkommer. En annan sak som det råder delade meningar om är ett eventuellt samband mellan persisterande antikroppar och viremiska perioder i en infekterad individ. Enligt Hammond *et al* (1997) kan inget samband ses, men i en studie av Mealey *et al* (2004) konstateras det att varje ny viremi ger upphov till en ny specificitet hos de nybildade antikropparna.

Till stor del är resultaten från olika studier överensstämmande, även om de skiljer sig gällande tidpunkten för när ett neutraliserande antikroppssvar kan hittas. Vissa skillnader tycks även finnas gällande sambandet kring viremier, persisterande antikroppar och nybildning av antikroppar. En möjlig anledning till detta kan vara att studierna till viss del är gjorda med stora mellanrum, tekniken har utvecklats och möjlighet till noggrannare analyser finns. Vidare kan det konstateras att det är ett intressant område där det finns utrymme för fler och nya

undersökningar, då det som verkar vara gemensamt för alla studier som är gjorda är att antikropparnas roll faktiskt inte är helt klarlagd i sammanhanget.

Immundefekten SCID är en genetisk åkomma som i dagsläget är klarlagd och förstådd. Med hjälp av avel försöker man minska prevalensen av sjukdomen, då drabbade individer inte överlever särskilt länge (Perryman, 2004). Inom forskningen finns det dock en fördel med hästar som har SCID. Avsaknaden av ett adaptivt immunförsvar möjliggör en unik testmiljö i vilken det är möjligt att undersöka vilken del av immunsvaret som fungerar mot olika patogener (Perryman *et al.*, 1988).

Föl med SCID har använts flitigt vid studier av EIAV och betydelsen av immunsvaret mot viruset. Många olika studier med syftet att bättre förstå immunsvaret mot en infektion med EIAV har genomförts och framsteg har gjorts. Med hjälp av hästarna med SCID har vissa delar av immunsvaret mot lentivirus kartlagts och skapat viss förståelse för hur en infektion med EIAV fortskrider. Trots att många studier innehåller motsägande delar kan den stora bilden ändå sägas vara positiv i det att de övergripande delarna överensstämmer studier emellan. Att kunna kartlägga immunsvaret är ett viktigt första steg till att vidare förstå viruset och sjukdomen, samt att eventuellt kunna ta fram ett vaccin. Om det med vidare studier är en möjlighet att ytterligare kunna definiera vilka delar av immunförsvaret som är aktiva när under infektionsförloppet så kan problematiken kring EIAV ringas in mer. Om nya studier skulle kunna specifikt isolera vad det är som driver virusets utveckling och varför värdens immunförsvar aldrig kan eliminera viruset är det i sig kanske en milstolpe för att i framtiden kunna isolera virusstrukturer som bör ingå i vaccin. Om ett vaccin mot EIAV skulle utvecklas är detta också ett stort framsteg i utvecklingen av vaccin mot andra lentivirus, så som HIV hos människor.

Det kan alltså konstateras att hästar med SCID utgör en bra modell för studier av EIAV och att en stor del av de upptäckter som har gjorts går att härröra till undersökningar gjorda hos föl med just denna defekt. Vidare kartläggning av immunsvaret vid en infektion verkar nödvändigt för att eventuellt kunna förstå vad det är som driver utvecklingen av viruset och leder till dess föränderlighet, studier som eventuellt skulle kunna utföras hos föl med SCID. Att tidigare forskning även väckt frågor gällande vaccin och epitoper hos EIAV som inte är lika utsatta för förändring är också något som kräver fler studier. Även inom detta område kan hästar med SCID vara till en god hjälp för att nå resultat.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bailey, E., Reid, R. C., Lear, T. L., Skow, L. C., Mathiason, K. & McGuire, T. C. (1997). Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; syntenicity and FISH mapping to ECA9. *Animal Genetics*, 28(4): 268–273.
- Ciupce, S. M. & Schwartz, E. J. (2014). Understanding virus–host dynamics following EIAV infection in SCID horses. *Journal of Theoretical Biology*, 343: 1–8.
- Cook, R. F., Leroux, C. & Issel, C. J. (2013). Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Veterinary Microbiology*, 167(1–2): 181–204 (Special Issue: Equine Infectious Diseases).
- Crisman, M. V. & Scarratt, W. K. (2008). Immunodeficiency disorders in horses. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 24(2): 299–.
- Du, C., Liu, H.-F., Lin, Y.-Z., Wang, X.-F., Ma, J., Li, Y.-J., Wang, X. & Zhou, J.-H. (2015). Proteomic alteration of equine monocyte-derived macrophages infected with equine infectious anemia virus. *Proteomics*, 15(11): 1843–1858.
- Emelyanova, V., Ivanova, E., Khrabrova, L. & Gavrilicheva, I. (2008). Severe combined immunodeficiency in horses. (Sterne, D., Ed) *Agronomijas Vestis*, (10): 258–262.
- Hammond, S. A., Cook, S. J., Lichtenstein, D. L., Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (1997). Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *Journal of Virology*, 71(5): 3840–3852.
- Infektiös anemi (EIA) - SVA*. [online] (2014-06-05). Available from: <http://www.sva.se/djurhalsa/hast/infektionssjukdomar-hast/infektios-anemi-eia-hos-hast>. [Accessed 2016-03-04].
- Issel, C. J., Cook, R. F., Mealey, R. H. & Horohov, D. W. (2014). Equine Infectious Anemia in 2014: Live with It or Eradicate It? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 30(3): 561–577 (New Perspectives in Infectious Diseases).
- Kono, Y. (1988). Antigenic variation of equine infectious anemia virus as detected by virus neutralization. *Archives of Virology*, 98(1-2): 91–97.
- Leber, R., Wiler, R., Perryman, L. E. & Meek, K. (1998). Equine SCID: mechanistic analysis and comparison with murine SCID. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65(1): 1–9.
- Leroux, C., Cadoré, J.-L. & Montelaro, R. C. (2004). Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary Research*, 35(4): 485–512.
- Leroux, C., Craigo, J. K., Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (2001). Equine Infectious Anemia Virus Genomic Evolution in Progressor and Nonprogressor Ponies. *Journal of Virology*, 75(10): 4570–4583.
- Liu, C., Cook, S. J., Craigo, J. K., Cook, F. R., Issel, C. J., Montelaro, R. C. & Horohov, D. W. (2014). Epitope shifting of gp90-specific cellular immune responses in EIAV-infected ponies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161(3–4): 161–169.
- McGuire, T. C. & Poppie, M. J. (1973). Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horses: a Primary Combined Immunodeficiency Disorder. *Infection and Immunity*, 8(2): 272–277.
- Mealey, R. H., Fraser, D. G., Oaks, J. L., Cantor, G. H. & McGuire, T. C. (2001). Immune Reconstitution Prevents Continuous Equine Infectious Anemia Virus Replication in an Arabian Foal with Severe Combined Immunodeficiency: Lessons for Control of Lentiviruses. *Clinical Immunology*, 101(2): 237–247.

- Mealey, R. H., Leib, S. R., Pownder, S. L. & McGuire, T. C. (2004). Adaptive Immunity Is the Primary Force Driving Selection of Equine Infectious Anemia Virus Envelope SU Variants during Acute Infection. *Journal of Virology*, 78(17): 9295–9305.
- Mealey, R. H., Littke, M. H., Leib, S. R., Davis, W. C. & McGuire, T. C. (2008). Failure of low-dose recombinant human IL-2 to support the survival of virus-specific CTL clones infused into severe combined immunodeficient foals: Lack of correlation between in vitro activity and in vivo efficacy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(1-2): 8–22.
- Mealey, R. H., Sharif, A., Ellis, S. A., Littke, M. H., Leib, S. R. & McGuire, T. C. (2005). Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD8⁺ lymphocytes in equine infectious anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Virology*, 339(1): 110–126.
- Neiditch, M. B., Lee, G. S., Huye, L. E., Brandt, V. L. & Roth, D. B. (2002). The V(D)J Recombinase Efficiently Cleaves and Transposes Signal Joints. *Molecular Cell*, 9(4): 871–878.
- Perryman, L. E. (2004). Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs. *Veterinary Pathology*, 41(2): 95–100.
- Perryman, L. E., O'Rourke, K. I. & McGuire, T. C. (1988). Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. *Journal of Virology*, 62(8): 3073–3076.
- Schwartz, E. J. & Smith, R. J. (2014). Identifying the Conditions Under Which Antibodies Protect Against Infection by Equine Infectious Anemia Virus. *Vaccines*, 2(2): 397–421.
- Shin, E. K., Perryman, L. E. & Meek, K. (1997). A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *The Journal of Immunology*, 158(8): 3565–3569.
- Sponseller, B. A., Sparks, W. O., Wannemuehler, Y., Li, Y., Antons, A. K., Oaks, J. L. & Carpenter, S. (2007). Immune selection of equine infectious anemia virus env variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virology*, 363(1): 156–165.
- Taylor, S. D., Leib, S. R., Carpenter, S. & Mealey, R. H. (2010). Selection of a Rare Neutralization-Resistant Variant following Passive Transfer of Convalescent Immune Plasma in Equine Infectious Anemia Virus-Challenged SCID Horses. *Journal of Virology*, 84(13): 6536–6548.
- Taylor, S. D., Leib, S. R., Wu, W., Nelson, R., Carpenter, S. & Mealey, R. H. (2011). Protective Effects of Broadly Neutralizing Immunoglobulin against Homologous and Heterologous Equine Infectious Anemia Virus Infection in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. *Journal of Virology*, 85(13): 6814–6818.
- Wiler, R., Leber, R., Moore, B. B., VanDyk, L. F., Perryman, L. E. & Meek, K. (1995). Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25): 11485–11489.
- Wiler, R., Leber, R., Moore, B. B., VanDyk, L. F., Perryman, L. E. & Meek, K. (1996). Equine SCID: a defect in V(D)J recombination, double strand break repair and DNA-dependent protein kinase activity. (Shewen, P. E. & Gershwin, L. J., Eds) *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1/4): 19.
- Zhang, B., Jin, S., Jin, J., Li, F. & Montelaro, R. C. (2005). A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28): 9918–9923.