

Valeria Lorenza Rechenauer

Dr.med.

## Die Genetischen Determinanten der Neuroinvasivität des FSME-Virus

Fach: Mikrobiologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Bugert

Das FSME-Virus ist der Erreger der Frühsommer-Meningoenzephalitis und gilt mit jährlich durchschnittlich 9000-12000 Infektionen des zentralen Nervensystems im europäischen und russischen Raum als eine der wichtigsten und gefährlichsten vektorübertragenen Virusinfektionen des Menschen in Europa (Gritsun et al. 2003b; Kunze 2016). Enzephalitis auslösende Viren stehen auf der NATO AMedP6-Liste der B-Schutz relevanten Erreger und sind daher Gegenstand aktueller Forschung am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München. Zudem ist FSME auch in Deutschland endemisch, wobei die höchsten Infektionszahlen in Bayern und Baden-Württemberg auftreten. Somit stellt das FSME Virus sowohl im zivilen, wie auch militärischen Gesundheitsbereich eine erhebliche Bedrohung dar (Kunze 2016).

Ziel dieser Arbeit war es, genomisch lokalisierte Determinanten der unterschiedlichen Neuroinvasivität zwischen den beiden FSME Stämmen Torö2003 und HB171/11 zu detektieren. Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass sich verschiedene Stämme des europäischen FSME-Subtyps in ihrer Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, deutlich unterscheiden. In einem Tiermodell wurde nachgewiesen, dass der am InstMikroBioBw aus einer Zecke isolierte FSME-Stamm „HB171/11“ eine stark verminderte Neuroinvasivität im Vergleich zu „Torö-2003“, einem gut untersuchten FSME-Feldstamm aus Schweden, aufweist (Kurahde et al. 2018). Sequenzanalysen zeigten, dass sich die beiden Stämme nur an 35 Positionen ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Von diesen 35 Aminosäureabweichungen liegen nur vier in den Strukturproteinen, die die FSME-Viruspartikel bilden. Diese vier Strukturmutationen sollten in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Hierzu wurden Verfahren der reversen Genetik am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr etabliert. Bei reverser Genetik handelt es sich um eine molekularbiologische

Technik, die die Herstellung von Viruspartikeln mit einer gewünschten Genomsequenz erlauben. Mithilfe der hier vorgelegten Arbeit sollten verschiedene FSME-Viren hergestellt werden, die, basierend auf dem Genom von Torö2003, an gezielten Stellen die Nukleotidvarianten von HB171/11 enthalten, um diese anschließend hinsichtlich eventueller Veränderungen ihrer Neuroinvasivität im Tiermodell zu untersuchen. Diese und darauf aufbauende Experimente ermöglichen das gezielte Lokalisieren der Gene, die für die Neuroinvasivität verantwortlich sind, und bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Entwicklung eines minimal neuroinvasiven attenuierten Lebendimpfstoffs. Für die Infektionsprävention durch Impfung werden zurzeit ausschließlich Totimpfstoffe eingesetzt, durch die jedoch kein lebenslanger Schutz gewährleistet wird. Im Moment stehen keine virusspezifischen, sondern nur symptomatische Therapieformen zur Verfügung (Kunz 2003). Eine postexpositionelle Immunprophylaxe ist derzeit nicht möglich (Kubinski et al. 2020; Kunz 2002).

Vor den eigentlichen Klonierungsarbeiten wurden die durch schwedische Laborpartner zur Verfügung gestellten Plasmide des FSME-Stammes Torö2003, nochmals am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr sequenziert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Plasmide bereits eine aminosäureverändernde Mutation abweichend vom Wildtyp Genom Torö2003 der Gendatenbank aufwiesen. So enthält der Stamm Torö2003 an Position 1324 die Aminosäure Lysin, während unsere Sequenzierung an dieser Stelle Asparagin zeigte. Da auf Rückfrage an die schwedische Forschungsgruppe mitgeteilt wurde, dass schon der schwedische Klon hier eine Abweichung gegenüber Torö aufweist, konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, dass hierin eine Determinante der höheren Neuroinvasivität von Torö gegenüber HB171/11 liegt. In einem nächsten Schritt gelang es, die vier Mutationen zwischen Torö2003 und HB171/11 auf dem Torö Plasmid p511 gezielt hin zu der gewünschten Genomsequenz von HB171/11 zu verändern. Eine Verstärkung der Pathogenität des Stammes Torö war hierdurch nicht zu erwarten, da die Modifikation hin zu einem weniger pathogenen Stamm erfolgte. Hierfür wurde die *site directed mutagenesis*-Methode neu am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München etabliert. Es zeigte sich, dass es sich bei dieser Methode um ein schnelles und unkompliziertes Verfahren handelt, mit welchem sich gezielte Mutationen in ein Genom einbringen lassen. Einzelmutationen gelingen jedoch durch dieses Verfahren leichter als mehrere parallele Mutationsinduktionen. So gelang es erst nach mehreren Versuchsdurchführungen einen fehlerfreien Plasmidklon mit den vier geplanten Mutationen zu erhalten. Wie im Verlauf der weiteren Arbeit gezeigt werden konnte, eignet sich die *site directed Mutagenesis*-Methode auch für Insertionen und Deletionen in

einem Plasmidgenom, wobei hier Insertionen empirisch leichter zu induzieren erschienen als Deletionen. Desweiteren gelang es anschließend die beiden Subgenomplasmide bestehen aus Strukturteil und Nicht-Strukturteil von FSME wieder zu einem Einzelgenomplasmid unter Kontrolle eines Phagen-Promotors zusammenzufügen. Hierzu wurde das NEBuilder Verfahren erstmals am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München eingesetzt und aufgrund der guten Effizienz auch von weiteren Arbeitsgruppen übernommen. Bei der NEBuilder Methode handelt es sich um ein Ligations Werkzeug, unabhängig von Restriktionsschnittstellen, wodurch maximale Flexibilität im Zusammensetzen verschiedenen Genabschnitte möglich wird. Wie sich im weiteren Verlauf zeigte, konnte aus den mittels reverser Genetik hergestellten Einzelgenomplasmiden anschließend wieder infektiöse Virus-RNA gewonnen werden. Somit bildet die hier vorliegende Dissertation die Grundvoraussetzung, um designte Mutationsklone in nachfolgenden Mausmodellen hinsichtlich neuro-invasiven und -pathogenen Verhaltens zu testen. Inwieweit die vier gezielt induzierten Strukturmutationen die Neurovirulenz von FSME beeinflussen, ist derzeit Gegenstand von aktuellen Untersuchungen am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig in weiterer Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München.