

Rotaviren aus Geflügelbeständen können Gene mit Rotaviren aus Säugetieren austauschen - Infektionsrisiko für den Menschen gering

Zusammenfassender Forschungsbericht zum BfR-Forschungsprojekt „Charakterisierung des zoonotischen Potenzials von Rotaviren des Geflügels“ des BfR vom 17. August 2020

Rotaviren der Vögel sind in Geflügelbeständen für die Lebensmittelgewinnung weit verbreitet. Sie sind jedoch nur entfernt mit den Rotaviren verwandt, die bei Säugetieren und dem Menschen vorkommen und dort zu Erkrankungen führen. Im von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten BfR Forschungsprojekt „Charakterisierung des zoonotischen Potenzials von Rotaviren des Geflügels“ zeigten Professor Dr. Reimar Johné und seine Forschungsgruppe, dass Rotaviren der Vögel mit Rotaviren der Säuger genetisches Material austauschen können, was zur Entstehung neuartiger Rotaviren führen kann. Das Risiko der Bildung derartiger, Reassortanten¹ genannter Virustypen in der Natur wird von den Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen allerdings als gering eingeschätzt. Denn vermehrungsfähige neuartige Viren traten unter Laborbedingungen nur in wenigen Fällen auf. Sie konnten sich auch nur schlecht weiter vermehren. Das Infektionsrisiko für den Menschen wird daher als relativ gering eingeschätzt. Dennoch sollten Untersuchungen zur Rotavirus-Vielfalt beim Menschen zukünftig auch weniger verwandte Rotaviren wie die der Vögel einschließen, um das Auftreten neuartiger Typen früh feststellen zu können.

Im Gegensatz zu den Rotaviren der Säugetiere waren die Rotaviren der Vögel bisher nur wenig untersucht worden. Ziel des BfR war es, die genetische Vielfalt der Rotaviren vor allem bei Vögeln zu analysieren und deren Potential zur Übertragung auf und Anpassung an Säugetiere und den Menschen zu ermitteln. Eine wichtige Frage war dabei, ob die Rotaviren der Vögel mit denen der Säugetiere genetisches Material austauschen, wobei eventuell neuartige Rotaviren entstehen könnten. Im Projekt wurde eine breite Vielfalt verschiedener bekannter sowie bisher unbekannter Rotavirus-Arten und -Typen sowohl in Vögeln als auch in Säugetieren identifiziert. Das Erbgut dieser Viren wurde mit neu entwickelten Methoden meistens vollständig sequenziert, wodurch eine genaue Charakterisierung ihrer Eigenschaften und ihrer Verwandtschaft mit bekannten Rotaviren möglich wurde. Insgesamt weisen die Analysen darauf hin, dass mit einem breiten Repertoire divergenter Rotavirus-Stämme im Tierreich gerechnet werden muss, die eventuell direkt auf den Menschen übertragen werden können oder durch den Austausch von Genomsegmenten zur Ausbildung neuer Rotaviren führen könnten. Für die Rotaviren der Vögel scheint dies allerdings nur sehr selten vorzukommen.

Rotaviren gehören zu den häufigsten Erregern von Magen-Darm-Erkrankungen beim Menschen und bei zahlreichen Tierarten. Es existieren viele unterschiedliche Rotavirus-Typen, die sich durch Mutationen und den Austausch von Genomsegmenten ständig weiterentwickeln. Erkrankungen beim Menschen werden vor allem durch humane Rotaviren hervorgerufen. Bekannt ist aber auch, dass bestimmte Rotaviren von Tieren auf den Menschen übertragen werden können und umgekehrt. Seit 2006 gibt es Impfstoffe gegen humane Rotavirus-Erkrankungen, die generell gut wirksam sind. Wenn sich jedoch neue Rotaviren ausbilden, die genetisches Material von Tieren enthalten, könnte die durch die Impfung erworbene Immunität gegenüber einer solchen Infektion unwirksam werden.

¹ Reassortanten sind neue Virustypen, die durch Austausch von Genomsegmenten verschiedener Ausgangsviren der gleichen Spezies entstehen.

1 Thema, Ausgangsfragen und Zielsetzung des Forschungsprojektes

Rotaviren zählen zu den häufigsten Erregern von Magen-Darm-Erkrankungen beim Menschen und bei zahlreichen Tierarten. Wechselseitige Übertragungen zwischen Säugetieren und Menschen wurden häufig beschrieben. Dadurch existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Rotavirus-Typen, die sich durch Mutationen und den Austausch von Genomsegmenten ständig weiterentwickeln. Seit 2006 sind Impfstoffe gegen humane Rotavirus-Erkrankungen verfügbar, die seit 2013 in ganz Deutschland zur Anwendung empfohlen werden. Auch wenn eine generelle Wirksamkeit der Impfstoffe mittlerweile nachgewiesen ist, bleibt unklar, ob diese Impfstoffe gegen die Vielzahl der einzelnen zirkulierenden Rotavirus-Typen eine gleichbleibende Effizienz zeigen. Möglicherweise wird – wie dies bei Influenzaviren beobachtet wird – durch die Impfung eine Selektion von bestimmten Virustypen stattfinden.

Gerade Rotaviren aus Tieren, die genetisch und antigenetisch nur vergleichsweise wenig mit denen des Menschen verwandt sind, kommen als Kandidaten für das Auftreten und die Selektion neuer Rotavirus-Typen beim Menschen infrage. Im Gegensatz zu den Rotaviren der Säuger sind die Rotaviren der Vögel bisher nur wenig untersucht worden. Unsere Vorarbeiten zeigten, dass diese nur entfernt mit den Säugetier-Rotaviren und humanen Rotaviren verwandt sind. Trotzdem gab es Hinweise auf vereinzelte Übertragungen von genetischem Material aviärer Rotaviren auf Säugetiere und den Menschen. Unsere Vorarbeiten zeigten auch, dass die aviären Gruppe A-Rotaviren untereinander zum Austausch von Genomsegmenten fähig sind, wodurch neuartige Antigen-Kombinationen von Rotaviren entstehen konnten. Wie leicht eine Übertragung von aviären Rotaviren auf Säuger erfolgen kann und ob zwischen Vogel- und Säuger-Rotaviren Genomsegmente ausgetauscht werden können, sodass neuartige Antigenkombinationen von humanen Rotaviren entstehen, war dagegen nicht bekannt.

Ziel des Projekts war es deshalb, die genetische Vielfalt der aviären Rotaviren zu ermitteln, deren Potential zur zoonotischen Übertragbarkeit auf Säuger sowie zum Austausch von Genomsegmenten mit Säuger-Rotaviren zu untersuchen. Hierfür sollten sowohl Genomanalysen von Feldstämmen als auch Zellkultur-Untersuchungen und moderne reverse genetische Systeme eingesetzt werden. Einige der Untersuchungstechniken mussten für das Projekt neu entwickelt werden.

Spezielle Teilziele des Vorhabens waren:

1. Die Charakterisierung weiterer aviärer Rotaviren, wodurch die genetische Vielfalt der Rotaviren der Vögel analysiert und deren Verwandtschaft mit Säuger-Rotaviren ermittelt werden sollte. Die Ergebnisse sollten zeigen, mit welchen Rotavirus-Typen in Vögeln zu rechnen ist und welche evolutionären Beziehungen zu anderen Rotaviren bestehen.
2. Die Ermittlung der Fähigkeit von Rotaviren des Geflügels zum Austausch genetischen Materials mit Säuger-Rotaviren. Darin enthalten sind auch Untersuchungen zur Infizierbarkeit von Säuger-Zellen durch aviäre Rotaviren, die eine Voraussetzung für das Reassortment ist. Die Ergebnisse sollten zeigen, ob eine Infektion von Säugern mit Geflügel-Rotaviren wahrscheinlich ist und ob sich durch Reassortment daraus neue Virustypen entwickeln können, die an Säuger angepasst sind.
3. Die Charakterisierung von Reassortanten, die Genomteile von Vogel- und Säuger-Rotaviren besitzen. Hierbei sollte abgeschätzt werden, wie gut sich die Reassortanten in Vogel- und Säugerzellen vermehren können und ob sich durch ihre Passagierung Anpassungen, z.B. in anderen Genomsegmenten, ergeben. Die untersuchten Aspekte sollten u.a. klären,

inwieweit das Auftreten von Vogel/Säuger-Reassortanten und ihre Ausbreitung in der menschlichen Population wahrscheinlich sind.

4. Etablierung eines reversen genetischen Systems (RGS) für aviäre Rotaviren. Es sollte versucht werden, aviäre Rotaviren oder Reassortanten aus Säuger- und Vogelrotaviren aus klonierten Plasmiden herzustellen. Die Verfügbarkeit eines reversen genetischen Systems würde die Herstellung von gezielt veränderten Rotaviren ermöglichen und damit einen Ausgangspunkt für gezieltere Untersuchungen zu ihrer Molekularbiologie, zu Pathogenitätsmechanismen sowie zur Vakzine-Entwicklung darstellen.

Insgesamt sollten die Ergebnisse eine Abschätzung des zoonotischen Potenzials von Vogel-Rotaviren ermöglichen, relevante aviäre Rotavirus-Typen identifizieren und damit zur Entwicklung breit wirksamer Vakzine beitragen.

2 Durchgeführte Arbeiten

Alle geplanten Untersuchungen von Teilziel 1 „Charakterisierung von aviären Rotaviren“ wurden durchgeführt. Es wurden die Genome verschiedener Rotavirus-Isolate sequenziert und die Verbreitung von aviären Rotaviren im Wirtschaftsgeflügel wurde ebenfalls untersucht. Bedingt durch die rasante technische Entwicklung auf dem Gebiet der Genomsequenzierung sind Next Generation Sequencing (NGS)-Techniken für Rotaviren neu entwickelt und angewendet worden. Hierbei wurden zunächst 454-basierte Sequenzierungen und später Illumina-basierte NGS-Techniken verwendet.

Beim Teilziel 2 „Ermittlung der Reassortment-Fähigkeit“ wurden Feldstämme mit reassortierten Genomkonstellationen untersucht und Infektionsversuche von Säugerzell-Kulturen mit aviären Rotaviren durchgeführt. Außerdem wurden Vogel/Säuger-Rotavirus-Reassortanten mit reverser Genetik hergestellt.

Beim Teilziel 3 „Charakterisierung der Reassortanten“ wurden Wachstumskinetiken in Zellkulturen untersucht sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Partikel-Charakterisierung durchgeführt.

Beim Teilziel 4 „Etablierung eines reversen genetischen Systems (RGS)“ wurden alle geplanten Plasmide und BACmide hergestellt. Es wurden ein Helfervirus-abhängiges und ein Helfervirus-unabhängiges RGS etabliert und diese Systeme zur Herstellung von Reassortanten verwendet.

3 Erreichte Ergebnisse und Diskussion im Hinblick auf den relevanten Forschungsstand, mögliche Anwendungsperspektiven und denkbare Folgeuntersuchungen

3.1. Charakterisierung weiterer Rotaviren

3.1.1. Etablierung neuer Techniken zum Nachweis und zur Charakterisierung von Rotaviren

Zum Nachweis von aviären Rotaviren in Feldproben wurden neue PCR-basierte Nachweissysteme entwickelt. Dies beinhaltete real-time RT-PCR-Systeme für die Detektion von aviären RVA-Stämmen sowie für RVD-Stämme [3]. Aufgrund der Heterologie der Sequenzen mussten hierfür separate Protokolle für die RVAs des Huhnes und denjenigen der Pute entwickelt werden. Die Protokolle zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität und wurden in einer ersten Studie zur Verbreitung der aviären Rotaviren im Wirtschaftsgeflügel angewendet [3].

Zur Genomcharakterisierung von Rotaviren wurden verschiedene NGS-Systeme entwickelt. Zunächst erfolgte dies mit Hilfe der Roche-454-Technik, wodurch erstmals Gesamtgenome aviärer Rotavirus-Isolate aus Zellkulturen mittels NGS sequenziert wurden [4]. In einer späteren Phase wurden die entsprechenden Labor-Protokolle auf die neuere Illumina-Technik umgestellt. Hierdurch konnten Rotavirus-Genome sowohl aus Kotproben (von Spitzmäusen) [8], als auch Zellkultur-Überständen (mit aviären RVA-Stämmen) [9] charakterisiert werden. Die Technik erlaubt in Verbindung mit einer entwickelten Bioinformatik-Pipeline die Genomsequenzierung einer sehr breiten Palette von Rotaviren ohne die Verwendung spezifischer Primer, wodurch auch eine Identifizierung der völlig neuartigen Rotaviren K und L aus Spitzmäusen ermöglicht wurde. Es wurden fast die kompletten Genome der Rotaviren sequenziert, nur die Sequenzierung der Genomsequenz-Enden, die nur in etwa 50 % vollständig erfolgte, muss noch optimiert werden.

3.1.2. Verbreitung von Rotaviren von Vögeln und Säugern

Mit Hilfe der entwickelten PCR-Systeme wurden Proben von Hühnern und Puten aus verschiedenen europäischen Ländern und Bangladesch untersucht [3]. Hierbei wurden in 16 % der Proben RVA und in 39 % der Proben RVD gefunden. Die Nachweise erfolgten in beiden Tierarten und in allen untersuchten Ländern. Dies weist auf eine weite Verbreitung von RVA und RVD in Geflügelbeständen weltweit hin. RVF und RVG wurden mit klassischen Gelelektrophorese-Techniken in nur 2 % der Proben nachgewiesen. Auch wenn diese Technik nur eine geringere Sensitivität als die PCR hat, weisen die Ergebnisse auf eine eher untergeordnete Rolle dieser Viren bei den aviären Rotavirus-Infektionen hin.

Eine Untersuchung von Kotproben von Spitzmäusen aus Deutschland führte zur Identifikation eines breiten Spektrums neuer RVA-Stämme und der neuartigen Rotavirus-Arten RVK und RVL (s. 3.1.3) [8]. Mittels klassischer PCR-Protokolle wurde RVA in 22 %, RVK in 11 % und RVL in 15 % der Proben nachgewiesen. Die erstmaligen Daten zur Verbreitung von Rotaviren in Spitzmäusen weisen darauf hin, dass diese ein wichtiges Reservoir für Rotaviren darstellen könnten und weiter untersucht werden sollten. Rotaviren mit Sequenzhomologien zu aviären Rotaviren wurden in diesen Tieren nicht gefunden.

3.1.3. Genomcharakterisierung von Rotaviren von Vögeln und Säugern

Im Projekt wurden vor allem Genome von aviären Rotaviren durch Genomsequenzierung weitergehend charakterisiert. Vor Projektbeginn lagen hierfür nur wenige Kompletengenome aviärer RVA-Stämme sowie eine VP6-Sequenz eines RVD-Stammes vor. Es wurden nun erstmals die kompletten Genomsequenzen jeweils eines Stammes von RVD [1], RVF und RVG [5] sequenziert, die nachfolgend zu den Referenzstämmen für diese Rotavirus-Spezies wurden. Sowohl die Prozente der Sequenzidentitäten der kodierenden Regionen als auch die konservierten Sequenzen an den Genomenden bestätigten die Einordnung dieser Viren als separate Rotavirus-Arten.

Die ermittelten Genomsequenz-Daten wurden nachfolgend für phylogenetische Verwandtschaftsanalysen mit anderen Rotavirus-Arten genutzt [5]. Hierbei zeigte sich, dass die Rotavirus-Arten in zwei große phylogenetische Gruppen fallen, wobei die eine RVA, RVC, RVD und RVF enthält, die andere RVB, RVG und RVH. Die Viren beider Gruppen unterscheiden sich auch stark in den Sequenzen an den Genomenden, wodurch ein Austausch

von Genomsegmenten zwischen diesen beiden Gruppen unmöglich erscheint. Eine Anpassung an den Wirt erscheint für RVD, RVF und RVG plausibel, da diese bisher ausschließlich in Vögeln vorgefunden wurden.

Zur besseren und einfacheren Einteilung von Rotaviren in verschiedene Arten wurden die Daten weitergehend genutzt, um ein neues Klassifizierungssystem aufzubauen, das ausschließlich auf Sequenzanalysen basiert [2]. Es wurde hierzu ein cut-off-Wert von 53 % für die Aminosäure-Sequenzen des VP6-Gens ermittelt, unter dem ein Rotavirus zu einer neuen Spezies gehört. Das System ist vollständig konsistent mit dem vorher genutzten, bei dem Antikörper-Reaktivitäten und Genom-Elektrophorese-Daten verwendet wurden. Es wurde vom ICTV anerkannt und mittlerweile für die Klassifizierung verschiedener neu entdeckter Rotaviren genutzt.

Im Gegensatz zu den speziesspezifischen RVD, RVF und RVG werden RVA-Stämme sowohl in Säugern als auch in Vögeln häufig gefunden, was eine wechselseitige Übertragung möglich machen könnte. Eine genauere phylogenetische Analyse zeigt allerdings, dass die aviären und mammären RVA-Isolate weitgehend in separate Untergruppen clustern, sodass häufige wechselseitige Übertragungen und Austausch von Genomsegmenten offensichtlich selten sind. Die von uns durchgeführte Genomanalyse an einem RVA-Isolat aus einem Fasan gibt allerdings deutliche Hinweise darauf, dass ein Reassortment zwischen beiden Gruppen möglich ist und in der Natur offensichtlich auch stattfindet [4]. Dieses Isolat bestand aus 10 Genomsegmenten mit enger Verwandtschaft zu aviären Rotaviren, während das für VP4 kodierende Genomsegment eng mit dem von Säuger-Rotaviren verwandt war. Die Gesamtgenome von 4 weiteren RVA-Isolaten aus Hühnern wurden in einem späteren Projektteil vollständig sequenziert, wodurch weitere Hinweise auf ein Reassortment zwischen verschiedenen aviären RVA-Stämmen, aber nicht mit denen der Säuger, erhalten wurden [9]. Offensichtlich sind Austausch von genetischem Material zwischen Säuger- und Vogel-Rotaviren prinzipiell möglich, sie treten offensichtlich aber nur sehr selten auf.

Die im Projekt etablierten Methoden wurden auch zur Untersuchung von Spitzmäusen auf Rotaviren eingesetzt [8]. Hierbei wurden neue RVA-Genotypen nachgewiesen, die das genetische Spektrum von RVA-Stämmen erheblich erweitert haben. Die RVA-Sequenzen clusternten zwar nicht direkt zusammen mit aviären Rotaviren, allerdings entsprang ihr Ast im phylogenetischen Stammbaum an der Basis, bevor sich die Vogel- und Säuger-Rotavirus-Äste teilten. Überraschenderweise wurden zusätzlich fast komplette Genome von zwei bis dahin noch unbekanntem Rotavirus-Arten (RVK und RVL) identifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass auch in Säugern unerwartet diverse Rotaviren vorkommen, die – ähnlich den Vogel-Rotaviren – das Potenzial haben, durch Reassortment starke antigene Änderungen in humanen Stämmen hervorzurufen.

3.2. Ermittlung der Fähigkeit von Rotaviren des Geflügels zum Austausch genetischen Materials mit Säuger-Rotaviren

3.2.1. Identifizierung von Vogel/Säuger-RVA-Reassortanten in Feldproben

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, wurde ein RVA-Stamm aus einem Fasan identifiziert, der ein VP4-Gen mit hoher Sequenzidentität zu Säuger-Rotaviren in einem sonst aus Vogel-RVA-Segmenten bestehenden Genom enthielt [4]. Der Stamm stellt damit wahrscheinlich eine Reassortante dar, die ein VP4-Gen aus einem (unbekanntem) Säuger-Rotavirus und den Rest des Genoms aus einem typischen Fasanen-Rotavirus besitzt. Dies weist

auf die prinzipielle Möglichkeit des Reassortments zwischen Vogel- und Säuger-RVA-Stämmen unter Feldbedingungen hin. Da dies die einzige bisher veröffentlichte Reassortante dieser Art ist, scheint ein solches Reassortment aber nur sehr selten stattzufinden.

3.2.2. Doppelinfectionsversuche in Zellkultur

Verschiedene Untersuchungen wurden zur Herstellung von Reassortanten durch Doppelinfection mit Vogel- und Säuger-RVA-Stämmen durchgeführt. Insgesamt wurden bei mehreren Versuchen keine Reassortanten erhalten. Leider konnten aber auch bereits beschriebene Säuger/Säuger-Rotavirus-Reassortanten mit dieser Technik nicht erzeugt werden, was auf ein technisches Problem mit der Etablierung der Methode im Labor hinweist. Die Ergebnisse können deshalb nicht ausgewertet und interpretiert werden.

3.2.3. Herstellung von Reassortanten durch reverse Genetik

Verschiedene Versuche wurden durchgeführt, um mit Hilfe von RGSs Reassortanten mit Genomsegmenten von Vogel- und Säuger-RVA-Stämmen zu generieren. Dies war zum ersten Mal gelungen, als im Projekt ein Affen-Rotavirus (SA11) mit einem Temperatur-sensitiven VP4-Gen verwendet wurde, und dieses Gen gegen ein VP4 aus einem Hühner-RVA-Stamm ausgetauscht werden konnte [6]. Die resultierende Reassortante replizierte stabil und wurde weitergehend charakterisiert.

Nach der Verfügbarkeit eines vollständig Plasmid-basierten RGS für den SA11-Stamm, das von einer japanischen Arbeitsgruppe entwickelt und bereitgestellt wurde, wurden im Projekt weitere Experimente zur Herstellung von Reassortanten gemacht. Hierbei konnte die vorher hergestellte Reassortante mit einem VP4-Gen aus einem Hühner-RVA-Stamm reproduziert werden und eine weitere mit dem VP4 aus dem Fasan-RVA-Stamm hergestellt werden [9]. Trotz enger Verwandtschaft mit dem Hühner RVA-Stamm gelang hingegen die Herstellung einer Reassortante mit dem VP4-Gen aus einem Puten-RVA-Stamm nicht. Interessanterweise gelang die Herstellung von VP4-Reassortanten aus verschiedenen Säugetier-Stämmen gut, während in den meisten getesteten Fällen keine Reassortanten mit VP4-Genen aus humanen Stämmen erzeugt werden konnten [7]. Bisher bleibt unklar, welche Determinanten die Möglichkeit des Reassortments zwischen unterschiedlichen Rotavirus-Stämmen bestimmen.

In einem weiteren Projektteil wurde versucht, Mono-Reassortanten des SA11-Virus herzustellen, die jeweils eines der 11 Genomsegmente des Hühner RVA-Stammes enthalten [10]. Neben der bereits bekannten VP4-Reassortante gelang dies nur für das VP3-Gen, während alle anderen Genomsegmente nicht zur Bildung infektiöser Viren führten. Auch hier sind die zugrundeliegenden Mechanismen nicht bekannt. Die Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass offensichtlich nur wenige Kombinationen zur Bildung infektiöser Reassortanten aus Vogel- und Säuger-RVA-Stämmen möglich sind, was die geringe Zahl von solchen im Feld vorgefundenen Reassortanten erklären könnte.

3.3. Charakterisierung von Reassortanten

3.3.1. Untersuchung des Wachstums in Zellkultur

Die im Abschnitt 3.2.3. beschriebenen Reassortanten wurden in der Zellkultur hinsichtlich der Wachstumskinetiken untersucht. Die VP4 (Huhn)-Reassortante zeigte hierbei ein langsameres Wachstum und geringere Endpunkt-Titer im Vergleich zu beiden Elternviren (Hühner-Rotavirus und SA11-Stamm) [6, 7]. Dies war sowohl in der Affen-Nierenzelle MA104 als auch in embryonalen Hühnerfibroblasten-Zellen zu beobachten. Das SA11-Virus wuchs auf

den MA104-Zellen am besten, während sich das Ausgangsvirus vom Huhn am besten auf den Hühnerzellen vermehrte, was auf eine Anpassung an die Wirtsspezies schließen lässt. Die andere VP4 (Fasan)-Reassortante [7] und die VP3 (Huhn)-Reassortante [10] vermehrten sich ebenfalls auf MA104-Zellen langsamer als das SA11-Virus. Alle im Labor hergestellten Vogel/Säuger-Rotavirus-Reassortanten vermehrten sich über viele Zellkultur-Passagen stabil und reproduzierbar. Die Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass sie eine geringere Fitness als die zirkulierenden Ausgangsviren haben.

3.3.2. Untersuchungen zu Genom-Veränderungen durch häufige Passagierung in Zellkultur

Die Experimente zu Genom-Veränderungen der VP4 (Huhn)-Reassortante durch häufige Passagierung in MA104-Zellen mussten ohne klares Ergebnis beendet werden. Erste ermutigende Resultate mit Replikationssteigerung nach 10 Zellkultur-Passagen führten zur Identifizierung einer Punktmutation im VP4-Gen mittels Sanger-Sequenzierung. Leider ließ sich dieses Resultat durch eine weitere Sequenzierung mittels NGS nicht bestätigen. Die Ergebnisse können deshalb nicht ausgewertet und interpretiert werden. Eine Wiederholung des Experiments sowie das Testen von unterschiedlichen Versuchsbedingungen (z. B. weitere Passagen, verschiedene MOIs, Isolation einzelner Klone mittels Plaque-Assay, andere Zelllinien) waren zeitlich jedoch nicht mehr möglich.

3.3.3. Strukturelle Untersuchungen mit Elektronenmikroskopie

Alle hergestellten Reassortanten wurden mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) untersucht [7, 10]. Hierbei wurden in allen Fällen typische dreischalige Viruspartikel nachgewiesen, die sich in ihrer Struktur nicht von den Elternviren unterschieden.

Bei der TEM-Analyse eines anderen Vogel-RVA-Stammes aus einem Huhn fiel ein hoher Anteil von doppelschaligen Kapsiden auf [9]. Die Genomanalyse dieses Stammes zeigte, dass er ein ungewöhnliches aviäres VP4-Gen enthält. Die Replikationskinetik dieses Stammes war auch deutlich langsamer als bei den anderen untersuchten aviären RVA-Stämmen. Die Ergebnisse weisen möglicherweise darauf hin, dass VP4-Reassortanten manchmal instabile Kapside bilden, die zu einer niedrigeren Replikationsrate führen.

3.4. Etablierung eines reversen genetischen Systems für aviäre Rotaviren

3.4.1. Versuche zur Etablierung eines RGS für ein aviäres Rotavirus

Hierfür wurden zunächst für alle 11 Genomsegmente eines Hühner-RVA-Stammes komplette cDNAs hergestellt, die anschließend in Plasmide mit regulatorischen Sequenzen kloniert wurden. Die Plasmide hatten einen T7-RNA-Polymerase-Promotor vor der Genomsegment-Sequenz und eine HDV-Ribozym-Sequenz dahinter, die Nukleotid-genaue Anfangs- und Endsequenzen garantieren. Das System ist identisch mit dem für SA11 beschriebenen. Nach Transfektion aller 11 Plasmide in Kombination (auch zusammen mit Helferplasmiden aus dem SA11-System) entstanden aber leider in mehreren Versuchen keine infektiösen Nachkommen-Viren [10].

Da die Vermutung nahelag, dass die Transfektion von 11 Plasmiden nur in wenigen Fällen zur Aufnahme eines kompletten Satzes von Plasmiden durch eine Zelle führt, wurden Anstrengungen unternommen, die Zahl der nötigen Plasmide zu verringern. Hierfür wurden die

Genomsegmente zusammen mit den funktionellen Regionen aus den einzelnen Plasmide nacheinander in ein BACmid kloniert. Am Ende wurde ein BACmid erhalten, das alle Strukturprotein-Segmente enthielt, und ein anderes mit allen Nichtstrukturprotein-Segmenten. Nach Transfektion beider BACmide entstand leider ebenfalls kein infektiöses Nachkommen-virus (nicht publiziert).

Um die Ursachen hierfür zu ermitteln, wurden sowohl die Plasmide als auch die BACmide nochmals sequenziert, wobei keine Mutationen festgestellt wurden. Da die Sequenzen ursprünglich auf einer Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten vom Zellkultur-Virus basierten, wurde das Ausgangsvirus nochmals mittels NGS sequenziert [9]. Hierbei wurden vereinzelte Nukleotid-Austausche festgestellt, die aber nach eingehender Analyse die Funktionalität der Gene nicht beeinträchtigen sollten. Zumindest für das VP3- und VP4-Gen konnte die Funktionalität auch direkt durch die Herstellung vermehrungsfähiger Reassortanten nachgewiesen werden. Insgesamt bleibt unklar, warum durch das System keine infektiösen Viren hergestellt werden konnten. Man muss allerdings auch beachten, dass bisher nur für zwei Rotavirus-Stämme (SA11 und ein humanes Rotavirus) funktionale RGSs entwickelt werden konnten, was auf generelle Probleme der derzeitigen Systeme hinweist. Im Falle des aviären Rotavirus ist auch die vergleichsweise langsame Vermehrungskinetik zu beachten, die zu einem ineffizienten RGS beigetragen haben könnte.

3.4.2. Herstellung von Säuger/Vogel-RVA-Reassortanten mittels RGS

Verschiedene RGSs, die auf dem Affen-Rotavirus SA11 basieren, wurden während des Projekts im Labor etabliert und erfolgreich zur Herstellung verschiedener Säuger/Vogel-RVA-Reassortanten verwendet [6]. Zunächst wurde eine temperatur-sensitive (ts) SA11-Mutante verwendet, die einen Defekt im VP4-Gen besaß, die zu einer ineffizienten Vermehrung bei höheren Temperaturen führte. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um dieses VP4-Gen gegen ein solches aus einem Hühner-RVA auszutauschen. Hierfür wurde das Plasmid mit dem VP4 (Huhn)-Gen in T7-RNA-exprimierende Zellen transfiziert und nachfolgend mit der ts-SA11-Mutante infiziert. Nach einer anfänglichen Inkubation bei 31°C konnten sich sowohl ts-SA11-viren als auch VP4(Huhn)-Reassortanten bilden. Die freigesetzten Viren wurden anschließend auf MA104-Zellen bei 39°C inkubiert, wobei sich nur die Reassortante effizient vermehren konnte. Das System ermöglichte die Herstellung dieser Reassortante, war aber aufwendig und nur auf den VP4-Austausch beschränkt.

In einem späteren Projektteil wurde das von einer japanischen Arbeitsgruppe entwickelte Plasmid-basierte System verwendet [7, 10]. Dieses besteht aus 11 Plasmiden, die die jeweiligen Genomsegmente für das SA11-virus tragen, zwei Plasmiden, die Untereinheiten für ein Vacciniavirus-Capping-Enzym exprimieren sowie einem Plasmid, das ein Zell-Fusionsprotein herstellt. Alle Plasmide werden in eine T7-exprimierende Zelllinie transfiziert, wodurch sich in dieser infektiöses SA1-Virus bilden kann. Durch Austausch einzelner Plasmide lassen sich Reassortanten herstellen. Das System wurde erfolgreich im Labor etabliert und verschiedene Reassortanten (s. Abschnitt 3.2.3.) konnten hergestellt werden.

4 Schlussfolgerungen

Im Projekt konnte eine breite Vielfalt verschiedener Rotavirus-Arten und –Stämme sowohl in Vögeln als auch in Säugetieren identifiziert werden. Insgesamt wurde das Spektrum bekannter Rotavirus-Arten um die Rotaviren K und L aus Spitzmäusen erweitert und die bereits bekannten aviären Rotavirus-Arten D, F und G konnten erstmals genetisch charakterisiert werden. Auch bei den sowohl in Säugern als auch in Vögeln vorkommenden RVA-Stämmen wurden im Projekt neue Genotypen identifiziert und charakterisiert. Insgesamt muss also mit

einem breiten Repertoire divergenter RVA-Stämme im Tierreich gerechnet werden, die eventuell direkt auf den Menschen übertragen werden können oder durch Reassortment zur Ausbildung neuer antigener Misch-Rotaviren führen könnten.

Für die RVA-Stämme der Vögel wurde im Projekt gezeigt, dass diese im Wirtschaftsgeflügel weit verbreitet sind. Das überwiegend separate phylogenetische Clustering von Vogel- und Säuger-RVA-Stämmen weist allerdings auf eine weitgehend separate Evolution beider Virusgruppen ohne häufige Virusübertragungen zwischen den Wirten hin. Eine im Projekt identifizierte Reassortante aus einem Fasan, die ein Säuger-RVA-ähnliches VP4-Gen trug, zeigt jedoch, dass ein Austausch genetischen Materials zwischen beiden Gruppen auch unter Feldbedingungen möglich ist.

Die durchgeführten *in vitro*-Analysen zeigen damit übereinstimmend, dass sich Säuger-RVA-Reassortanten mit Vogel-RVA-VP4-Genen herstellen lassen, die sich stabil in Zellkulturen vermehren lassen. Die vorgefundene verminderte Replikationseffizienz weist allerdings auf eine geringere Fitness im Vergleich zu den Elternviren hin. Neben dem VP4-Gen ließ sich *in vitro* nur das VP3-Gen austauschen, während der Austausch der anderen Gene nicht zu überlebensfähigen Viren führte.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die Entstehung von Säuger-Rotavirus-Reassortanten mit genetischem Material von Vogel-Rotaviren prinzipiell möglich ist. Allerdings erscheint das Risiko der Entstehung niedrig, weil vermehrungsfähige Reassortanten auf den Austausch des VP3- und VP4-Gens beschränkt zu sein scheinen und die entstandenen Reassortanten eine geringe Fitness zeigen. Da beim Austausch des VP4-Gens jedoch auch wichtige antigene Determinanten verändert werden könnten, sollte der Eintrag vor allem bei einer breiten Impfstoff-Nutzung mit der möglichen Folge einer Selektion solcher Stämme in Betracht gezogen werden. Die Systeme zur Überwachung der Rotavirus-Diversität in der humanen Population sollten deshalb in die Lage versetzt werden, auch genetisches Material von divergenten (u.a. aviären) RVA-Stämmen identifizieren zu können. Die im Projekt entwickelten Techniken, vor allem die NGS- und RGS-basierten Methoden, können zukünftig helfen, Rotavirus-Genome besser und umfassender zu charakterisieren und die Auswirkung von Genomveränderungen auf ihr biologisches Verhalten gezielter zu untersuchen.

5 Publikationen aus dem Forschungsprojekt

a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Zeitpunkt der Berichterstellung erschienen oder endgültig angenommen sind:

1. Trojnar, E., Otto, P., Roth, B., Reetz, J., und Johne, R. (2010): The genome segments of group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. *J. Virol.*, 84, 10254-10265.
2. Matthijssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., Johne, R. (2012): VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.*, 157, 1177–1182.
3. Otto, P., Ahmed, M.U., Hotzel, H., Machnowska, P., Reetz, J., Roth, B., Trojnar, E., Johne, R. (2012): Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet. Microbiol.*, 156, 8–15.

4. Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R. (2013): Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene of close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.*, 94, 136-142.
5. Kindler, E., Trojnar, E., Heckel, G., Otto, P.H., Johne, R. (2013): Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect. Genet. Evol.* 14:58-67.
6. Johne, R., Reetz, J., Kaufer, B.B., Trojnar, E. (2016): Generation of an avian/mammalian rotavirus reassortant using a helpervirus-dependent reverse genetics system. *J. Virol.*, 90, 1439-1443.
7. Falkenhagen, A., Patzina-Mehling, C., Rückner, A., Vahlenkamp, T.W., Johne, R. (2019): Generation of Simian Rotavirus Reassortants with Diverse VP4 Genes Using Reverse Genetics. *J. Gen. Virol.*, 100, 1595-1604.
8. Johne, R., Tausch, S.H., Grützke, J., Falkenhagen, A. Patzina-Mehling, C., Beer, M., Höper, D., Ulrich, R.G. (2019): Distantly Related Rotaviruses in Common Shrews, Germany, 2004-2014. *Emerg. Inf. Dis.*, 25, 2310-2314.
9. Patzina-Mehling, C., Falkenhagen, A., Gadicherla, A.K., Grützke, J., Tausch, S.H., Johne, R. (2020): Whole genome sequence analysis of cell culture-adapted rotavirus A strains from chicken. *Infect. Genet. Evol.*, 81, 104275.
10. Patzina-Mehling, C., Falkenhagen, A., Trojnar, E., Gadicherla, A.K., Johne, R. (2020): Potential of avian and mammalian species A rotaviruses to reassort as explored by plasmid only-based reverse genetics. *Virus Res.*, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198027>.

b) Arbeiten zur wissenschaftlichen Qualifikation:

Eva Trojnar: „Charakterisierung aviärer Rotaviren und Untersuchungen zu ihrem zoonotischen Potenzial“

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften, Freie Universität Berlin, 2013.

Weitere Informationen auf der BfR-Website zum Thema Rotaviren

https://www.bfr.bund.de/de/a-z_index/rotaviren-62281.html#fragment-2



„Stellungnahmen-App“ des BfR

Über das BfR

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist eine wissenschaftlich unabhängige Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft

(BMEL). Es berät die Bundesregierung und die Bundesländer zu Fragen der Lebensmittel-, Chemikalien- und Produktsicherheit. Das BfR betreibt eigene Forschung zu Themen, die in engem Zusammenhang mit seinen Bewertungsaufgaben stehen.