

Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

1. Aufgabenbeschreibung

Das Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie (IMVZ) (vormals Institut für Molekularbiologie) ist eines von elf Fachinstituten des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (FLI), einer selbständigen Bundesoberbehörde und Ressortforschungseinrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Im Rahmen seiner gesetzlichen Aufgaben, die hauptsächlich in §27 Tiergesundheitsgesetz niedergelegt sind, erforscht das Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie unter besonderer Berücksichtigung viraler Infektionen landwirtschaftlicher Nutztiere die Mechanismen der Interaktion von Infektionserregern mit Wirtszellen und -organismen. Dafür werden klassisch-virologische, molekularbiologische, biochemische, massenspektrometrische sowie bildgebende Arbeitsmethoden eingesetzt. Diese Arbeiten dienen der Aufklärung grundlegender Mechanismen viraler Infektionsprozesse als Basis für die Entwicklung von Strategien zur Vermeidung von infektionsbedingten Schädigungen der Tiergesundheit und der Übertragung von Erregern vom Tier auf den Menschen (Zoonosen). Das Institut berät das BMEL auf den genannten Gebieten.

Da die Universität Greifswald das Fach Virologie in der Lehre der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät stärken möchte, ist eine gemeinsame Berufung vorgesehen.

2. Aufgabenfelder und Arbeitsschwerpunkte

Die Kenntnis der molekularen Vorgänge bei der Interaktion zwischen Infektionserreger und Wirt ist grundlegende Voraussetzung für das Verständnis der komplexen Wechselwirkungen, die zur Infektion und zur Ausprägung von Krankheitssymptomen führen. Sie ist auch die Basis für die Entwicklung von neuen Präventions- und Therapieverfahren. Dazu gehört die molekularbiologische Untersuchung von Erregern hinsichtlich ihrer genetischen Ausstattung und der Aufklärung der Funktion viraler Genprodukte. Dies hat in der Vergangenheit z.B. zur Einführung der die Tierseuchenbekämpfung revolutionierenden Marker- oder DIVA-Impfstoffe geführt. Im Gegensatz dazu sind die vielfältigen Virus-Wirtszell-Wechselwirkungen auf Grund der Komplexität der Wirte nur unzureichend bekannt. Die Kenntnis dieser Interaktionen auf molekularer Ebene ist aber essentielle Grundlage für neue Präventions- und Bekämpfungsverfahren von Tierseuchen und Zoonosen, die über die bisher verfügbaren Impfstoffe und Therapeutika hinausgehen. Durch Kombination von molekularbiologischen Techniken wie der reversen Genetik, massenspektrometrischen Analysen und modernen mikroskopischen Verfahren wie der Confocal-, *Live cell*- und Lichtblatt-Mikroskopie werden virale Genprodukte funktionell charakterisiert, infektionsbedingte Veränderungen im Proteinmuster des Wirts aufgedeckt und der Verlauf von Infektionen in Zellkulturen und komplexen Wirtsgeweben erforscht. Die Kombination der am IMVZ etablierten Schlüsseltechnologien ermöglicht umfassende molekulare Analysen infektionsbiologischer und

pathogenetischer Vorgänge, wobei bioinformatische Kompetenzen im Hinblick auf zunehmende Digitalisierung, Umfang und Komplexität erzielter Daten an Bedeutung gewinnen.

Das Spektrum der bearbeiteten Erreger umfasst vor allem anzeigepflichtige Tierseuchenerreger und zoonotische Viren. Neben Erregern der höchsten Risikogruppe 4 wie Ebola- und Henipaviren besteht ein besonderer Fokus auf neurotrophen Viren und Infektionserregern des Respirationstraktes. Dabei werden neben grundlagenorientierten Fragestellungen auch Aufgaben im Rahmen der Tierseuchendiagnostik (Nationale Referenzlaboratorien für Tollwut, Aujeszky'sche Krankheit und Infektiöse Laryngotracheitis) erfüllt. Für die Bearbeitung der unterschiedlichen Erreger werden neben klassischen Zellkultursystemen relevante Primärzellmodelle und moderne Verfahren zur Detektion von Virus-Wirt-Interaktionen im infizierten Tier entwickelt.

Das Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie bearbeitet die folgenden Themenbereiche:

2.1. Tollwut

Während die terrestrische Tollwut in Westeuropa als ausgerottet gilt, ist sie in anderen Teilen der Erde weiterhin die wichtigste Zoonose. Mehr als 70.000 Menschen sterben weltweit jährlich an der Infektion, die in den meisten Fällen auf Übertragung durch Verletzungen nach Hundekontakt zurückzuführen ist. Daneben werden zunehmend neue Tollwutviren in Reservoirwirten entdeckt, zu denen vor allem Fledermäuse gehören. Die Kenntnis des Spektrums in der Natur vorkommender Tollwutviren sowie das Verständnis der Interaktion mit den verschiedenen Wirten liefert die Grundlage für die Weiterentwicklung von Impfstoffen sowie den Schutz des Menschen vor der Infektion. Daher wurde im IMVZ die Tollwut-Forschung des FLI gebündelt. Das nationale Referenzlaboratorium für Tollwut, das OIE-Referenzlabor sowie das WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research sind ebenso am Institut angesiedelt wie die Arbeitsgruppe Molekularbiologie der Tollwutviren, so dass in enger Zusammenarbeit praktische Aspekte der Tollwutbekämpfung, das Verständnis der Pathogenese der Tollwut im infizierten Wirt sowie die molekulare Basis dieser Interaktion untersucht werden können.

2.2. Aujeszky'sche Krankheit (AK, Pseudorabies)

Die anzeigepflichtige AK ist eine Herpesvirusinfektion des Schweins, die aber auch andere Säugetierspezies mit Ausnahme höherer Primaten einschließlich des Menschen betrifft. Durch den erstmaligen Einsatz von Markerimpfstoffen (DIVA-Prinzip) wurde die AK bei Hausschweinen in Deutschland getilgt, ist aber in anderen europäischen und außereuropäischen Ländern weiterhin präsent. Trotz erheblicher Fortschritte bei der Tilgung nehmen Infektionen in Wildschweinebeständen drastisch zu. Am Institut sind die Arbeiten zu AK im Rahmen der molekularbiologischen Forschung und des nationalen Referenzlaboratoriums zusammengefasst. Grundlegende Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Interaktion viraler und zellulärer Komponenten bei der Virusmorphogenese zur Aufklärung und ggf. gezielten Inaktivierung von für die Virusvermehrung notwendigen zellulären Stoffwechsel- und Transportwegen. In Kooperation mit

anderen Forschergruppen werden ausgesuchte virale Proteine auch strukturell dargestellt und analysiert. Darüber hinaus werden Pseudorabiesviren aus Wildschweinen molekularbiologisch und hinsichtlich ihrer Pathogenese charakterisiert.

2.3. Influenza

Die Influenza spielt sowohl im Tierseuchenbereich (aviäre Influenza, „Vogelgrippe“, Schweineinfluenza) als auch im öffentlichen Gesundheitswesen („Schweinegrippe“) eine bedeutende Rolle. Im Sinne einer „One Health Strategie“ schafft die Erforschung von pathogenen Eigenschaften auf Basis molekularer Virus-Wirt-Wechselwirkungen wichtige Grundlagen für neuartige Impfstoffe und wissenschaftliche Risikoanalysen. Im IMVZ werden auf Basis von rekombinanten porcinen und aviären Influenzaviren (reverse Genetik) krankheits- und wirtsdeterminierenden Faktoren charakterisiert und Mechanismen des Wirtswechsels untersucht. Dabei stehen die Transformation von gering pathogenen aviären Influenzaviren in hochpathogene Geflügelpesterreger sowie der Speziesübergang von Enten- zu Hühnervögeln und von tierischen Wirten wie Vögeln oder Schweinen zum Menschen im Mittelpunkt.

2.4. Afrikanische Schweinepest

Die ursprünglich auf Afrika beschränkte Afrikanische Schweinepest (ASP) hat sich in den letzten Jahren vor allem in Osteuropa ausgebreitet und inzwischen die Grenzen der EU überschritten. Bis heute stehen weder Impfstoffe noch Therapeutika gegen diese Tierseuche zur Verfügung. Das IMVZ hat grundlegende Forschungsarbeiten zum Verständnis der ASP-Infektion und neue Ansätze zur Entwicklung von Impfstoffen initiiert. Als phylogenetisch alleinstehendes, komplexes DNS-Virus stellt der Erreger der ASP ein bisher nur unzureichend verstandenes Forschungsobjekt dar. Ziel der Untersuchungen ist ein besseres Verständnis der Biologie der ASP sowie der Bedeutung viraler Proteine für den Vermehrungszyklus des Virus, für die Immunantwort des Wirts und für deren Unterdrückung (Immunevasion). Dazu wird die umfangreiche Expertise des Instituts bei der Erforschung der ähnlich komplexen DNS-haltigen Herpesviren unter Einsatz von modernen Virus- und Wirtsgenom manipulierenden Techniken wie CRISPR/CAS eingesetzt.

2.5. Newcastle Disease

Die Newcastle-Krankheit (Newcastle Disease, ND) oder atypische Geflügelpest ist eine anzeigepflichtige virusbedingte Infektionskrankheit, die bei Nutzgeflügel zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen kann. In Deutschland werden gehaltene Hühnervögel obligatorisch gegen die Infektion geimpft. Am IMVZ wurde eines der ersten reversen genetischen Systeme für den Erreger NDV etabliert. Auf dieser Basis finden Forschungsarbeiten zum grundlegenden Verständnis der Funktionen viraler Genprodukte sowie ihrer Interaktion mit der Wirtszelle statt. Mit Hilfe von NDV-Vektoren werden auch neue Ansätze für die Impfung gegen andere Geflügelseuchen, wie die aviäre Influenza, entwickelt.

2.6. Infektiöse Laryngotracheitis

Die in Deutschland meldepflichtige infektiöse Laryngotracheitis (ILT) ist eine Herpesvirusinfektion der Hühner, die in der Regel zwar nur moderate wirtschaftliche Schäden verursacht, bislang aber trotz der Verfügbarkeit wirksamer Impfstoffe nicht

getilgt werden konnte. Am IMVZ ist das nationale Referenzlaboratorium für die ILT angesiedelt.

2.7. Filoviren

Filoviren (Ebola-, Marburg- und Cuevaviren) sind zoonotische Viren, welche im Menschen hämorrhagische Fieber mit hoher Sterblichkeit hervorrufen können. Infektiöse Viren können als Erreger der höchsten Risikogruppe 4 nur in Hochsicherheitslaboren erforscht werden. Infektionen mit Ebola-Viren sind in Deutschland anzeigepflichtig. Während die meisten Filovirus-Ausbrüche in Afrika vorkommen, wurden die eng mit Ebolaviren verwandten Cuevaviren, deren Pathogenitätspotential derzeit unbekannt ist, auch in Europa (Spanien und Ungarn) gefunden. Das IMVZ untersucht die Virus-Wirts-Interaktionen und Pathogenitätsmechanismen, um neue Ansatzpunkte für breit wirkende Therapeutika zu finden und Grundlagenwissen für evidenzbasierte Risikoabschätzungen bei neuauftretenden Filoviren zu sammeln. Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Identifizierung und Charakterisierung neuartiger Filoviren, sowie in der Entwicklung und Anwendung von Modellsystemen, welche Forschungsarbeiten an Filoviren und das Testen von Therapeutika auch außerhalb von Hochsicherheitslaboren gestatten.

2.8. Henipaviren

Hendra und Nipah Viren sind zoonotische Erreger der Risikogruppe 4, die im landwirtschaftlichen Nutztier (Schwein und Pferd) sowie im Menschen schwere, oft lethale Infektionen des Respirationstraktes und des zentralen Nervensystems hervorrufen. Das IMVZ forscht an molekularen Virus-Wirts-Interaktionen und etabliert neue reverse genetische Systeme für die Erforschung von Henipaviren im S4 Hochsicherheitslabor des FLI. Dabei werden grundlegende Analysen zur Erregerreplikation und Beteiligung zellulärer Wirtsfaktoren durchgeführt und deren Relevanz in Tiermodellen v.a. unter Zuhilfenahme von neuen 3D Imaging Ansätzen untersucht.

2.9. Confocal, Live-Cell Imaging und Lichtblattmikroskopie

Die Analyse viraler Replikationsprozesse durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie stellt eine neue Dimension der Darstellung der Interaktion zwischen Erreger und Wirt dar. Am IMVZ werden besonders intra- und interzelluläre Reifungs- und Transportprozesse durch Live-Cell Imaging in Kombination mit elektronenmikroskopischen Ultrastrukturdarstellungen untersucht. Hierzu stehen in den Schutzstufen 2, 3 und 4 moderne Laserscan-Mikroskope mit *high speed* Live-Imaging Ausrüstung zur Verfügung. Die erzielten Ergebnisse liefern grundlegende Erkenntnisse über die Erreger-Wirtszell-Interaktionen, Virusausbreitung und Hinweise auf mögliche Interventionsmöglichkeiten. Die Verwendung von Primärzellen wie isolierte Neuronen oder Airway Liquid Interphase (ALI) Kulturen aus primären Lungenepithelzellen erlauben dabei die Untersuchung von Infektionsdynamiken neurotroper und respiratorischer Viren in relevanten, semi-in vivo Infektionsmodellen. Virusreplikation und pathogenetische Prozesse in Geweben und Organen werden unter anderem mittels 3D Imaging optisch geklärt. Proben lichtmikroskopisch erfasst und quantitativ ausgewertet. Dies erlaubt die Analyse intrazellulärer Vorgänge direkt im infizierten Gewebe, sowie zukünftig mit Hilfe von

neuartigen Lichtblatt-Mikroskopieverfahren die Darstellung von Infektionsprozessen in vollständigen Kleintierorganen und größeren Gewebsbereichen.

2.10. Massenspektrometrie

Am IMVZ ist die Massenspektrometrie-Plattform des FLI angesiedelt. Sie verfügt über ein leistungsfähiges MALDI-Massenspektrometer mit MALDI-Imaging Einrichtung, was auch eine orts aufgelöste massenspektrometrische Untersuchung von Gewebeschnitten erlaubt. Die Untersuchung der Proteinausstattung einer Zelle oder eines Gewebes und der Veränderungen nach Infektion ermöglicht eine detaillierte Kartierung der durch Erreger manipulierten zellulären Prozesse und damit die Identifizierung von Zielstrukturen für präventive und therapeutische Eingriffe. Proteomanalysen spielen vor allem auch bei der Suche nach zellulären Interaktionspartnern viraler Komponenten eine herausragende Rolle. In der bakteriologischen Diagnostik wird die MALDI-TOF Massenspektrometrie zunehmend zur schnellen Erregeridentifizierung und zur Artbestimmung eingesetzt.

2.11. Mittelfristige Ziele

Ziel ist eine Stärkung der Forschung auf dem Gebiet der Zellbiologie als Basis für ein umfassenderes Verständnis der Erreger-Wirts-Interaktionen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind für gezieltere Interventionsmaßnahmen mit neuartigen Wirkmechanismen und eine bessere Risikoanalyse relevant. Neben einer Ausweitung der Forschung an hochpathogenen Erregern der Risikogruppen 3 und 4 sollen molekular- und zellbiologische Aspekte von Infektions- und Pathomechanismen zunehmend in relevanten in vivo und Primärzell-Infektionsmodellen durchgeführt werden. Damit soll der Bedeutung komplexerer Interaktionen wie Zelltropismus, intra- und extrazellulärer Wirtsfaktoren incl. Immunreaktionen und Immunpathogenese für die Erregerbiologie Rechnung getragen werden.

Methodisch ist eine Vernetzung der Proteomics mit anderen „Omics“-Technologien (Genomics, Transcriptomics) zur systembiologischen Analyse von Virus-Wirts-Interaktionen vorgesehen. Mit der Etablierung neuartiger Probenaufarbeitungs- und Imaging-Verfahren wie uDISCO und Lichtblattmikroskopie sollen aktuelle Bestrebungen zur Ex-Vivo-Analyse komplexer Gewebe mit zellulärer und subzellulärer Auflösung vorangetrieben und bioinformatische Verfahren zur Darstellung und quantitativen Analyse von 3D Bilddatensätzen gestärkt werden.

3. Zusammenarbeit

Das Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie pflegt enge Kooperationen mit den anderen Fachinstituten innerhalb des FLI. Dies spiegelt sich auch in gemeinsamen Projekten wieder und ist von großer Bedeutung für die Bearbeitung komplexer Fragestellungen bei Infektionsgeschehen, bei denen die Expertisen der einzelnen Fachinstitute genutzt werden. Zum Teil wird dies gezielt durch FLI-interne Forschungsverbünde gefördert. Verbünde zu Virus-Wirts-Interaktionen und Pathogenese von zoonotischen Viren der Risikogruppe 4 sowie zur Pathogenese, Diagnostik und Surveillance von Lyssaviren werden vom IMVZ koordiniert. Im Rahmen der Zusammenarbeit innerhalb des FLI besteht die Möglichkeit, auf

Schlüsseltechnologien wie Elektronenmikroskopie und Next-Generation-Sequencing zurückzugreifen.

Es bestehen auch vielfältige Kooperationen auf nationaler und internationaler Ebene mit Universitäten und Forschungseinrichtungen. Eine Reihe dieser Zusammenarbeiten ergeben sich aus Verbundprojekten, die durch DFG, BMBF, EU oder Industrie gefördert werden. Die Einwerbung von Mitteln von der Deutschen Forschungsgemeinschaft wird im Institut als wesentlich für die erfolgreiche Bearbeitung der Fragestellungen angesehen.

Mit folgenden Instituten bestehen Kooperationen:

Inland:

- Universität Greifswald
- Freie Universität Berlin
- IDT Biologika Dessau/Riems
- Paul-Ehrlich-Institut, Langen
- Philipps-Universität Marburg
- Heinrich-Pette-Institut Hamburg
- Tierärztliche Hochschule Hannover
- Universität Leipzig
- Justus-Liebig-Universität Gießen
- Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen

Ausland:

- Animal and Plant Health Agency, Weybridge, UK
- CRESA, Barcelona, Spanien
- INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich
- Institut Pasteur, Paris, Frankreich
- International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenia
- Leeds University, UK
- MSD, Boxmeer, Niederlande
- Tel Aviv University, Israel
- The Pirbright Institute, Vereinigtes Königreich
- Universität Ghent, Belgien
- Universität Lissabon, Portugal
- University of Oxford, Oxford Particle Imaging Centre, Vereinigtes Königreich
- Damanhur Universität, Ägypten
- Njala University, Sierra Leone
- Sierra Leone Agricultural Research Institute (SLARI), Sierra Leone
- Institut Pasteur Conakry in Guinea
- Gifu University, Japan

4. Lehrtätigkeit

Wissenschaftler/innen des Institutes üben Lehrtätigkeiten primär an der Universität Greifswald aus. Der Institutsleiter/die Institutsleiterin wird gemeinsam mit der Universität Greifswald berufen. Die Aufgaben umfassen die Lehrtätigkeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald im Fach Virologie mit einem Lehrdeputat von 2 SWS.

5. Veröffentlichungen des Instituts für molekulare Virologie und Zellbiologie:

Ausgewählte Publikationen aus dem Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie der letzten 3 Jahre:

- Keßler C, Forth JH, Keil GM, Mettenleiter TC, Blome S, Karger A. (2018) The intracellular proteome of African swine fever virus. *Sci Rep.*
- Hübner A, Petersen B, Keil GM, Niemann H, Mettenleiter TC, Fuchs W. (2018) Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Sci Rep.*
- Zaech L, Potratz M, Freuling C M, Müller T, Finke S. (2019) High-Resolution 3D Imaging of Rabies Virus Infection in Solvent-Cleared Brain Tissue. *J Vis Exp.*
- Hassel R, Vos A, Clausen P, Moore S, van der Westhuizen J, Khaiseb S, Kabajani J, Pfaff F, Hoper D, Hundt B, Jago M, Bruwer F, Lindeque P, Finke S, Freuling CM, Müller T. (2018). Experimental screening studies on rabies virus transmission and oral rabies vaccination of the Greater Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Sci Rep.*
- Eggerbauer E, Pfaff F, Finke S, Hoper D, Beer M, Mettenleiter TC, Nolden T, Teifke JP, Müller T, Freuling CM. (2017). Comparative analysis of European bat lyssavirus 1 pathogenicity in the mouse model. *PLoS Negl Trop Dis.*
- Martin S, Chiramel AI, Schmidt ML, Chen YC, Whitt N, Watt A, Dunham EC, Shifflett K, Traeger S, Leske A, Buehler E, Martellaro C, Brandt J, Wendt L, Müller A, Peitsch S, Best SM, Stech J, Finke S, Römer-Oberdörfer A, Groseth A, Feldmann H, Hoenen T. (2018) A genome-wide siRNA screen identifies a druggable host pathway essential for the Ebola virus life cycle. *Genome Med.*
- Kämper L, Zierke L, Schmidt ML, Müller A, Wendt L, Brandt J, Hartmann E, Braun S, Holzerland J, Groseth A, Hoenen T. (2019) Assessment of the function and intergenus-compatibility of Ebola and Lloviu virus proteins. *J Gen Virol.*
- Vallbracht M, Brun D, Tassinari M, Vaney M-C, Pehau-Arnaudet G, Guardado-Calvo, P, Haouz A, Klupp BG, Mettenleiter TC, Rey FA, Backovic M. (2018) Structure-Function Dissection of Pseudorabies Virus Glycoprotein B Fusion Loops. *J Virol.* 92 (spotlight)
- Klupp BG, Hellberg T, Granzow H, Franzke K, Dominguez Gonzalez B, Goodchild RE, Mettenleiter TC. (2017) Integrity of the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Is Required for Efficient Herpesvirus Nuclear Egress. *J Virol.*
- Dittrich A, Scheibner D, Salaheldin AH, Veits J, Gischke M, Mettenleiter TC, Abdelwhab EM. (2018) Impact of Mutations in the Hemagglutinin of H10N7 Viruses Isolated from Seals on Virus Replication in Avian and Human Cells. *Viruses*
- Karsunke J, Heiden S, Murr M, Karger A, Franzke K, Mettenleiter TC, Römer-Oberdörfer A. (2019) W protein expression by Newcastle disease virus. *Virus Res.*
- Pauker VI, Bertzbach LD, Hohmann A, Kheimar A, Teifke JP, Mettenleiter TC, Karger A, Kaufer BB (2019). Imaging mass spectrometry and proteome analysis of Marek's disease virus-induced tumors. *mSphere* 4