

**Untersuchung zur Transmission, Virusverbreitung und  
Pathogenität der Zecken-übertragenen Flaviviren  
Tick-borne encephalitis Virus und Langat Virus in Mäusen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

von: **M.Sc. Sarah Schreier**

geb. am: 13. November 1989 in: Dortmund

Gutachterinnen: Prof. Dr. Andrea Kröger

Prof. Dr. Stefanie Christine Becker

eingereicht am: 22.04.2021 verteidigt am: 13.09.2021



## Zusammenfassung

Die durch Zecken übertragene Enzephalitis (engl.: tick-borne encephalitis = TBE) ist eine durch Arthropoden übertragene Viruserkrankung (arboviral), die durch eine schwere Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) im Menschen gekennzeichnet ist. Die Fähigkeit des Tick-borne encephalitis Virus (TBEV), eine Erkrankung des ZNS zu verursachen, hängt von seiner Fähigkeit ab, in das Gehirn einzudringen. Welche Mechanismen für die Neurovirulenz und Neuroinvasion verantwortlich sind, ist bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Infektionswege sowie eine mögliche horizontale Transmission von TBEV und dem Langat Virus (LGTV) analysiert. Es wurden mögliche Eintrittswege in das Gehirn untersucht. Zuletzt wurde die Pathogenität und die Immunreaktion des virulenten TBEV Stammes Torö-2003 mit dem weniger pathogenen Stamm MucArHB171/11 (HB171/11) verglichen.

Eine horizontale Übertragung konnte für TBEV und LGTV im Mausmodell nachgewiesen werden. Voraussetzungen für die Übertragung waren eine hohe Viruslast beim Donor und ein suszeptibler Empfänger. Die Infektion konnte ohne direkten Körperkontakt erfolgen. Eine Übertragung über Schmierinfektionen ist wahrscheinlich, weil hohe Mengen viraler RNA in Urin und Kot nachgewiesen wurden.

Eine Infektion über verschiedene Infektionswege führt zur Erkrankung von Mäusen. Die direkte Invasion des Gehirns über olfaktorische Rezeptorneuronen scheint unwahrscheinlich, da eine intranasale Infektion zu einem verzögerten Krankheitsverlauf führt. Wahrscheinlicher erscheint eine Neuroinvasion über die Blut-Liquor-Schranke, da die tiefen zervikalen Lymphknoten als drainierende Lymphknoten des Gehirns, früher mit LGTV infiziert sind, als umliegende oberflächliche zervikale Lymphknoten.

Einzelne Veränderungen in der Aminosäuresequenz wurden zwischen Torö-2003 und HB171/11 festgestellt. Überlebensstudien zeigten eine geringere Pathogenität und Neurovirulenz von HB171/11. Zudem gab es eine frühere und stärkere proinflammatorische Zytokin-Antwort in den HB171/11 Mäusen. Dies könnte bedeuten, dass die unterschiedlich regulierte Immunreaktion einen Einfluss auf die Neuroinvasion und Neurovirulenz in den HB171/11 Mäusen haben könnte.

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse in der Transmission, Virusverbreitung sowie Neuropathogenese von TBEV und LGTV.

## Abstract

The Tick-borne encephalitis (TBE) is an arthropod-borne viral disease (arboviral) that is characterized by a severe disease of the central nervous system (CNS) in humans. The ability of the Tick-borne encephalitis virus (TBEV) to cause disease of the CNS depends on its ability to infiltrate the brain. The underlying mechanisms for neurovirulence and neuroinvasion remain unknown.

In this work, different infection routes as well as a possible horizontal transmission of TBEV and the Langat virus (LGTV) were analyzed. Possible entry routes into the brain were examined. Finally, the pathogenicity and the immune reaction of the virulent TBEV strain Torö-2003 were compared with the less pathogenic strain MucArHB171/11 (HB171/11).

Horizontal transmission was demonstrated for TBEV and LGTV in the mouse model. A high viral load in the donor and a sensitive recipient were required for transmission. The infection could take place indirect without direct contact. Transmission via smear infections is likely because high levels of viral RNA have been found in urine, feces and secrets.

An infection through various infection routes leads to disease in mice. The direct invasion of the brain via olfactory receptor neurons seems unlikely, since intranasal infection leads to a delayed course of the disease. Neuroinvasion across the blood-cerebrospinal fluid barrier appears more plausible, since the deep cervical lymph nodes, as draining lymph nodes of the brain, are infected earlier with LGTV than the surrounding superficial cervical lymph nodes.

Single changes in the amino acid sequence were found between Torö-2003 and HB171/11. Survival studies showed a lower pathogenicity and neurovirulence of HB171/11. In addition, there was an earlier and stronger proinflammatory cytokine response in the HB171/11 mice. This could mean that the differently regulated immune reaction could have an influence on the neuroinvasion and neurovirulence in the HB171/11 mice.

This work provides new insights into the transmission, virus spread and neuropathogenesis of TBEV and LGTV.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Struktur und Morphologie der Flaviviren.....	1
1.2 Das Tick-borne encephalitis Virus.....	3
1.2.1 TBEV Subtypen und Epidemiologie.....	4
1.2.2 Transmission von TBEV.....	5
1.2.3 Klinischer Verlauf einer TBEV Infektion.....	6
1.2.4 Langat Virus.....	6
1.2.5 Wege der Neuroinvasion von Viren.....	7
1.2.6 Mögliche Eintrittswege von TBEV ins Gehirn.....	9
1.2.7 Interaktion des Immunsystems mit TBEV und LGTV.....	10
<b>2. Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>16</b>
3.1 Transmission.....	16
3.1.1 Effiziente LGTV Übertragung zwischen Mäusen mit direktem Kontakt zueinander.....	16
3.1.2 Einfluss viraler Titer auf die horizontale Übertragung von LGTV.....	19
3.1.3 Aerosole übertragen nicht LGTV.....	20
3.1.4 Einfluss des Maus-zu-Maus-Kontakts auf die horizontale LGTV Übertragung.....	21
3.1.5 Kontakt zu Kot und Urin überträgt nicht das Virus.....	22
3.1.6 Virale RNA wird durch verschiedene Körperflüssigkeiten ausgeschieden.....	22
3.1.7 Eine LGTV Infektion kann über verschiedene Infektionswege erfolgen.....	23
3.1.8 Maus-zu-Maus-Übertragung von TBEV.....	25
3.1.9 TBEV Transmission erfolgt nur in immundefizienten Mäusen.....	27
3.1.10 TBEV infiziert Mäuse über den gastrointestinalen Trakt.....	27
3.2 Vergleich der Virusverteilung von LGTV in immunkompetenten und immundefizienten Mäusen.....	30
3.2.1 Intakter IFNAR1 verhindert LGTV bedingte Virämie.....	30
3.2.2 LGTV breitet sich in der Peripherie systemisch aus.....	31
3.2.3 Bulbus olfactorius bevorzugt von LGTV infiziert.....	34
3.2.4 Die Rolle der olfaktorischen Route bei der Neuroinvasion.....	36
3.2.5 LGTV Infektion der tiefen zervikalen Lymphknoten in <i>Ifnar1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	37
3.3 Vergleich der Pathogenität der TBEV Stämme Torö-2003 und MucArHB171/11.....	40
3.3.1 HB171 / 11 ist weniger pathogen als Torö-2003.....	41
3.3.2 Höhere Viruslast in peripheren Organen Torö-2003 infizierter Mäuse.....	42
3.3.3 HB171/11 infiziert nicht den gastrointestinalen Trakt in Mäusen.....	43

3.3.4	Frühe Zytokin- und Chemokinreaktion in HB171/11 infizierten lymphoiden Organen	44
3.3.5	Torö-2003 repliziert stärker im Gehirn als HB171/11	45
3.3.6	HB171/11 ist weniger neurovirulent als Torö-2003	46
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1	Horizontale Transmission von TBEV und LGTV in suszeptiblen Mäusen möglich	48
4.2	Exkreme und Sekrete sind mögliche Überträger von LGTV	50
4.3	Keine Transmission über den Verdauungstrakt	50
4.4	Keine Transmission und Neuroinvasion von LGTV über die olfaktorische Route	51
4.5	Plexus choroideus als mögliche Eintrittspforte für LGTV	52
4.6	Pathogenitätsunterschiede zwischen Torö-2003 und HB171/11	54
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>57</b>
5.1	Liste der Verbrauchsmaterialien	57
5.2	Chemikalien und Reagenzien (auch Puffer)	58
5.3	Laborequipment	59
5.4	Computer Software	60
5.5	Statistische Analyse	61
5.6	Ethik	61
5.7	Viren und Titerbestimmung	61
5.8	Mäuse und Tierhaltung	62
5.9	Anästhesie und Infektion der Mäuse	62
5.10	Haltungsbedingungen der Transmissionsexperimente	63
5.11	Probenentnahme von Kot, Urin, Speichel, Nase und Augenabstrichen	64
5.12	Blutentnahme	64
5.13	Probenentnahme von Organen und Geweben für die quantitative RT-PCR	64
5.14	RNA Extraktion	64
5.15	Quantitative real time RT-PCR	65
5.16	Neutralisierungsassay	66
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Anlage</b>	<b>83</b>

# 1. Einleitung

Humanpathogene Viren stellen trotz des medizinischen Fortschritts weiterhin eine hohe Gefahr für den Menschen dar. Zur Familie der *Flaviviridae* gehören viele Arboviren, die Krankheiten in Menschen auslösen können. Zu diesen gehören das Japanische Enzephalitis Virus (JEV), das West Nil Virus (WNV), das Gelbfiebervirus (YFV), das Zika Virus (ZIKV) und das Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus (engl: Tick-borne encephalitis virus (TBEV)) [1]–[4]. Diese Viren sind über die gesamte Welt verbreitet und werden durch Mosquitos (WNV, ZIKV) oder Zecken (TBEV) übertragen [4]. Sie bergen ein hohes zoonotisches Potential, da sie auf unterschiedliche Wirte übertragen werden [4]. In den vergangenen Jahren kam es zur Verbreitung einiger Flaviviren auf andere Kontinente [5]–[8]. Tourismus und Klimaveränderungen könnten ursächlich sein, so wurden durch den weltweiten Tourismus Tigermücken nach Europa und Deutschland eingeschleppt und erste Fälle von WNV Infektionen in Deutschland gemeldet [9]. Auch TBEV verbreitet sich zunehmend. Erste Fälle einer TBE traten in den vergangenen Jahren in den Niederlanden auf [10]. Zudem steigt die Anzahl der TBEV Risikogebiete innerhalb Deutschlands [11], [12].

Der Erforschung der Übertragung und Pathogenese von TBEV kommt daher eine wichtige Aufgabe zu, um die Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion zu verstehen und geeignete Therapien gegen eine TBEV Infektion zu entwickeln.

## 1.1 Struktur und Morphologie der Flaviviren

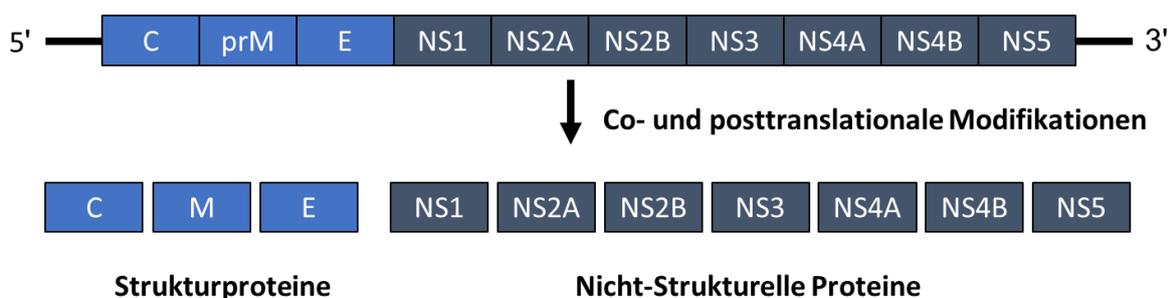
Flaviviren sind einzelsträngige RNA Viren, deren Aufbau innerhalb der Gattung gleich ist. Ihr Durchmesser beträgt etwa 50 nm [13]–[16]. Die Virushülle ist ikosaedrisch [13]–[16]. Das Genom von Flaviviren ist ungefähr 10-11 Kilobasen (kb) lang mit einem einzelnen offenen Leserahmen (engl.: open reading frame (ORF)), der durch nicht-codierende Regionen (engl.: untranslated regions (UTRs)) flankiert ist [16]–[19] (Beispiele Genomsequenz aus NCBI Datenbank: NC\_001563 (WNV), NC\_012532 (ZIKV), NC\_001672 (TBEV), NC\_001474 (DENV)). Der ORF codiert für ein Polyprotein, das in 3 strukturelle und 7 nicht-strukturelle Proteine gespalten wird (zusammengefasst in [20]). In Abbildung 1 ist der Aufbau des Genoms schematisch dargestellt, sowie die Funktion der einzelnen Proteine in der Tabelle 1 aufgelistet.

Es wird zwischen dem unreifen (engl.: immature) und dem reifen (engl.: mature) Virion unterschieden. Das infektiöse reife Virion enthält einen etwa 30 nm großen Kern (Nukleokapsid), der sich aus dem Kapsidprotein C und dem Genom zusammensetzt [20], [21]). Umrundet wird das Nukleokapsid von einer Lipidmembran, die das Hüllprotein E, sowie das Membranprotein M enthält [13], [15].

Das Hüllprotein E ist ein Glykoprotein, das mit den Rezeptoren der Zielzellen interagiert und so den Zelleintritt des Virus ermöglicht [22], [23]. Das Glykoprotein E ist das Hauptziel neutralisierender Antikörper im Wirtsorganismus [22], [24]–[26].

Das Membranprotein M ist nur in einem reifen Virion vorhanden. Bevor die neu gebildeten Viruspartikel aus der Zelle durch Exozytose ausgeschleust werden, wird das Membranprotein M im Reifungsprozess von dem Vorläuferprotein M (engl.: precursor (pr)M) eines unreifen Virions proteolytisch abgespalten [27]–[29].

Die nicht-strukturellen Proteine sind für die Virusreplikation wichtig. Das intrazelluläre NS1 bildet an der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) zusammen mit dem NS2A-Protein einen Replikationskomplex [20], [30], [31]. Zudem ist NS1 hoch immunogen [32]–[34]. NS2B ist ein Co-Faktor für das multifunktionale Protein NS3 [35]. NS3 ist das zweitgrößte nicht-strukturelle Protein. Zusammen mit NS2B bildet es einen Serin-Protease Komplex aus und fungiert als RNA Helikase und RNA Nucleosid Triphosphatase (RNA NTPase) [36]–[40]. Das Transmembran NS4A interagiert mit NS4B und ist Teil des Replikationskomplexes [41], [42]. NS2A und NS4B können zusammen den Interferon-Signalweg inhibieren [43], [44]. Das größte nicht-strukturelle Protein ist NS5, welches die Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und der Methyltransferase einnimmt [45]–[48]. Außerdem agiert NS5 als Antagonist für das Interferonsystem, zum Beispiel während einer WNV [49], [50], ZIKV [51], DENV [52], LGTV [49], [53], [54] und TBEV Infektion [49], [50].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Genoms von Flaviviren.

Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau des Genoms von Flaviviren vor und nach co- sowie posttranslationalen Modifikationen. Eine genaue Beschreibung der Proteine kann dem Text entnommen werden.

**Tabelle 1: Auflistung aller struktureller und nicht-struktureller Proteine von Flaviviren**

Virales Protein	Funktion
<b>C</b>	Nukleokapsid
<b>E</b>	Hüllprotein Rezeptorbindung an und Fusion mit der Wirtsmembran
<b>M</b>	Membranprotein An Faltung des E Proteins beteiligt
<b>NS1</b>	Glykoprotein (immunogen) Replikation
<b>NS2A</b>	Replikation
<b>NS2B</b>	Co-Faktor für NS3
<b>NS3</b>	Serin-Protease RNA-Helikase NTPase
<b>NS4A</b>	Replikation Inhibierung des IFN Signalweges
<b>NS4B</b>	Replikation Inhibierung des IFN Signalweges
<b>NS5</b>	RNA-abhängige RNA Polymerase Methyltransferase Antagonist des Interferonsystems

## 1.2 Das Tick-borne encephalitis Virus

Das Tick-borne encephalitis Virus (TBEV) ist der bekannteste Vertreter der durch Zecken übertragenen Flaviviren [1]. TBEV kann im Menschen zu neurologischen Erkrankungen wie eine Meningitis (Hirnhautentzündung), Enzephalitis (Entzündung des Gehirns) oder Myelitis (Rückenmarksentzündung) führen [55]–[57]. In Europa ist TBEV die häufigste Ursache arboviraler Enzephalitis. 2012 wurde die Tick-borne encephalitis (TBE) von dem Europäischen Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) auf die Liste der „obligatorisch meldepflichtigen Krankheiten“ aufgenommen [58]. Jährlich werden weltweit etwa 10.000-12.000 TBE-Fälle gemeldet [59]. Die Fallzahlen in Deutschland nahmen in den vergangenen Jahren stetig zu. Zwischen 2001 (Aufzeichnungsbeginn) und 2011 wurden insgesamt 2444 Fälle einer TBE in Deutschland vom Robert Koch Institut (RKI) gemeldet (Stand 14. April 2011)

[11]. Diese Zahl hatte sich bis 2020 mit insgesamt 7219 gemeldeten Fällen (Stand 04. März 2021) fast verdreifacht [12]. Zudem erhöhte sich die Anzahl der Kreise, die als Risikogebiet in Deutschland eingestuft wurden, in diesem Zeitraum von 137 auf 169 [12]. Im Jahr 2020 wurde die höchste Anzahl von TBEV Neuinfektionen innerhalb eines Jahres ( $n = 704$ ) in Deutschland seit Aufzeichnungsbeginn im Jahr 2001 gemeldet [12]. Im Jahr 2020 brach die weltweite Sars-Coronavirus 2 (engl.: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (Sars-CoV2)) Pandemie aus. Weltweit wurden zur Eindämmung der Virusinfektion Lockdowns verhängt. Es wird vermutet, dass durch die verhängten Reiseverbote die Menschen ihre Freizeitaktivitäten, während des Frühlings und Sommers 2020, vermehrt in der Natur verbrachten. Die damit verbundene erhöhte Exposition gegenüber Zecken könnte zu vermehrten TBEV Infektionen geführt haben.

### 1.2.1 TBEV Subtypen und Epidemiologie

In Europa ist TBEV der häufigste Auslöser einer arboviralen Enzephalitis [60]. Endemisch ist TBEV in vielen Teilen Zentraleuropas, der früheren Sowjetunion und Asien zu finden ([61]–[64]). Die Anzahl westeuropäischer Länder, in denen TBEV endemisch ist, steigt. Phylogenetisch wird TBEV in drei Subtypen unterteilt: Der Europäische (TBEV-EU), der Fernöstliche (TBEV-FE) und der Sibirische (TBEV-Sib) Subtyp. Die Subtypen unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz. Zwischen TBEV-EU und den beiden anderen liegt der Unterschied bei 4-6 %, sowie 4-6 % zwischen TBEV-FE und TBEV-Sib [65]. TBEV-EU ist in Zentraleuropa u.a. in Frankreich [66], Deutschland [12], [66], Schweden [67], Ukraine [68] und erstmals seit 2016 in den Niederlanden zu finden [10]. Zudem wurde TBEV-EU außerhalb Europas in Südkorea [69] und im asiatischen Teil von Russland [70] nachgewiesen. Der Fernöstliche Subtyp TBEV-FE ist in Teilen von Eurasien [71] sowie Japan [64], [72] und China [73], aber auch in Teilen Russlands [74] verbreitet. Das Verbreitungsgebiet von TBEV-Sib ist das weltweit größte und erstreckt sich u.a. von Finnland [75], [76], Estland [77], über das Uralgebirge in Russland, [61], Kasachstan (zusammengefasst in [78], bis hin zur Mongolei [79]. Die unterschiedliche Verteilung der Subtypen steht in Relation mit den Zeckenarten, die als Vektoren der TBEV Subtypen dienen. TBEV-EU wird hauptsächlich über *Ixodes ricinus* verbreitet (zusammengefasst in [80]). Diese Zeckenart ist in Europa heimisch. Die Zecke *I. persulcatus* dagegen ist in Teilen Europas, Zentral- und Nordasien bis nach Japan verbreitet und ist der Hauptvektor der Subtypen TBEV-Sib und TBEV-FE [80], [81]. Seit einigen Jahren werden drei weitere mögliche Subtypen diskutiert.

In der Baikal Region in Sibirien wurden die Stämme 178-19 und 886-84 isoliert [70]. Ihre Nukleotidsequenz unterscheidet sich zu den drei bekannten Subtypen um 11-16 % bei Stamm 178-19 [82], [83] bzw. bis zu 12 % bei Stamm 886-84 [82], [83]. Der mögliche sechste Subtyp wurde im Gebiet des Himalayas entdeckt und als Himalaya Subtyp bezeichnet [84]. Dieser Subtyp weist im Vergleich zu den anderen Subtypen einen Unterschied von 16-18 % in der Nukleotidsequenz auf [84].

### 1.2.2 Transmission von TBEV

Zecken sind der Hauptvektor für TBEV. Die Spinnentiere, die zur Gruppe der Milben gehören, sind auf der ganzen Welt verbreitet [85]. In Europa wird TBEV meist durch Schildzecken (*Ixodidae*) übertragen [85]. Die bekanntesten Vertreter sind *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus* [85]. Der Lebenszyklus von Zecken kann in drei Abschnitte unterteilt werden: 1. Larve, 2. Nymphe und 3. adulte Zecke [85]. Zecken häuten sich zwischen Stadium 1 und 2, sowie zwischen 2 und 3 [85]. Dazu befallen Zecken einen Wirt, stechen diesen und saugen das Blut aus dem entstehenden Hämatom [85]. Durch die große Volumenzunahme ist die Zecke anschließend dazu gezwungen sich zu häuten [85]. Die Übertragung von TBEV auf Zecken kann transovarial von dem Muttertier auf die Eier [86], transstadial zwischen dem Larven- und Nymphen-Stadium [87], sexuell bei der Zeckenpaarung oder über die Co-Fütterung einer infizierten und nicht infizierten Zecke am selben Wirt erfolgen [88]–[90]. Die Transmission von TBEV von der Zecke auf den Wirt erfolgt zwischen den Lebenszyklen der Zecke während der Blutmahlzeit [80]. Die Zecke sticht und dringt mit ihrem Mundwerkzeug in den Wirt ein (umgangssprachlich „Zeckenbiss“). TBEV wird mit dem Speichel über den Saugrüssel (Hypostom) in den Wirt übertragen [80], [91]. Zecken-Larven und Nymphen befallen bevorzugt kleinere Nagetiere wie Mäuse [92]–[94], wohingegen adulte Zecken größere Vertebraten wie Füchse [95], Vögel [96], Kühe [97], Schafe [97], Ziegen [97], [98] und als Fehlwirt den Menschen befallen [12]. In den vergangenen Jahren sind zudem Fälle der TBEV Übertragung auf den Menschen durch den Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten beschrieben worden [98], [99]. Infizierte Ziegen gaben das Virus über ihre Milch an den Menschen weiter. Fälle der oralen Infektion wurden 2015 in Kroatien und 2016 in Deutschland beschrieben [99], [100]. *Paulsen et al.* wiesen zudem in einer Studie aus Norwegen TBEV RNA in der Milch von Kühen nach [101]. Weitere natürliche Übertragungswege auf den Menschen (sexuell, vertikal von Mutter auf Kind, Aerosole) sind nicht beschrieben.

### 1.2.3 Klinischer Verlauf einer TBEV Infektion

Der klinische Verlauf einer TBEV Infektion variiert zwischen den drei Subtypen. Während bis zu 30 % aller mit TBEV infizierten Menschen keine Symptome entwickeln, sind es bei den mit TBEV-Sib und TBEV-FE infizierten Menschen sogar 70-95 % [102]. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 4-28 Tage [55], [57], [103]. Oft bleiben Zeckenstiche unbemerkt, wodurch eine genauere Einschätzung der Inkubationszeit erschwert wird. In 74-85 % der TBE Fälle verläuft die TBEV-EU Infektion biphasisch [57], [104], [105]. In der ersten initialen Phase, die zwischen 1-8 Tage lang andauern kann, entwickeln die Patienten Grippe-ähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Übelkeit, Erbrechen oder Müdigkeit [57], [104]–[106]. Die zweite Phase wird durch das Eindringen von TBEV in das ZNS initiiert. Patienten können in der zweiten Phase eine Meningitis (Gehirnhautentzündung), eine Meningoenzephalitis (Entzündung von Hirnhäuten und Gehirn) oder eine Meningoenzephalomyelitis (Meningitis unter Mitbeteiligung von Gehirn und Rückenmark) ausbilden [56], [57], [106]–[108]. Eine Meningitis ist mit Kopfschmerzen, Übelkeit und einem steifen Nacken assoziiert. Als Folge einer Meningoenzephalomyelitis können Koordinationsstörungen oder Lähmungserscheinungen in Armen, Beinen und Lähmungen des Gesichtsnervs eintreten [55]. Eine Entzündung des Rückenmarks verursacht oft Lähmungen in den Extremitäten und der Schulter, die über einen längeren Zeitraum andauern können [109]. Nahezu alle Patienten erholen sich von einer TBEV-EU Infektion. In etwa 1-2% der Fälle sterben die Menschen an einer TBEV-EU Infektion (zusammengefasst in [55]). Patienten, die mit TBEV-Sib oder TBEV-FE infiziert sind, durchlaufen oftmals nur die zweite Phase mit neurologischen Symptomen [110]. Chronische Verläufe wurden bisher nur für TBEV-Sib beschrieben [111], [112]. Weniger als 2 % der Patienten zeigen einen chronischen Verlauf der Erkrankung [112]. Eine gezielte Therapie gegen TBEV Infektionen gibt es derzeit nicht. Jedoch sind in Europa zwei Impfstoffe vorhanden – der auf den inaktivierten TBEV Stamm Neudörfl basierenden Impfstoff FSME-IMMUN® und auf den K23 basierenden Impfstoff Encepur® [22], [113].

### 1.2.4 Langat Virus

Das Langat Virus (LGTV) ist ein Flavivirus, welches im Jahre 1956 in Malaysia aus Schildzecken des Genus *Ixodes* isoliert wurde [114]. Der Isolierte Stamm wird in der Wissenschaft unter dem Namen LGTV TP21 geführt. LGTV gehört zum Komplex der durch Zecken übertragenen

Viren, wozu auch das Louping ill Virus (LIV), das Powassan Virus (POWV), Kyasanur forest disease Virus (KFDV) und TBEV gehören. Über die Verbreitung von LGTV ist wenig bekannt. Eine LGTV Infektion im Menschen ist bisher unter natürlichen Bedingungen nicht beschrieben. Wegen seiner hohen Homologie wurde LGTV in den 1970er Jahren zur Entwicklung eines lebend attenuierten Impfstoff gegen TBEV verwendet. Bereits nach einmaliger Impfung konnte eine Immunisierung gegen TBEV nachgewiesen werden [3]. Allerdings erkrankte 1 von 20.000 Probanden an einer Enzephalitis, sodass dieser Impfstoff nicht weiter eingesetzt wurde [115], [116]. LGTV wird als experimentelles Modell für TBEV Infektionen verwendet [117]–[119]. LGTV weist eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz von bis zu 88 % mit TBEV auf [116]. In C57BL/6 Wildtyp Mäusen verläuft eine LGTV Infektion wie eine TBEV Infektion im Menschen meist asymptomatisch [117]. Zudem ist LGTV wie TBEV ein neuroinvasives Virus [117], [118], [120]. In einigen Studien konnte bereits in C57BL/6 Wildtyp Mäusen gezeigt werden, dass LGTV den Bulbus olfactorius (Riechkolben) im Gehirn infiziert [117]. Im Gegensatz zu TBEV, ein Biosicherheitsstufe 3 (BSL3) Virus, wird LGTV in Europa in die Biosicherheitsstufe 2 (BSL2) eingestuft und eignet sich als biologischer Modellorganismus für TBEV.

### **1.2.5 Wege der Neuroinvasion von Viren**

TBEV ist ein neurotropes Virus, das im Gehirn Neuronen infiziert [117], [121]. Der Weg des Eindringens in das ZNS ist für TBEV nicht bekannt. Im Allgemeinen können neurotrophe Viren über verschiedene Mechanismen in das Gehirn gelangen: (1) Durch den axonalen Transport über die olfaktorischen Rezeptorneuronen, (2) durch den retrograden axonalen Transport entlang peripherer Nerven, (3) durch einen "Trojanisches Pferd" -Mechanismus oder (4) durch Überwindung der neurovaskulären Einheit, die die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke im Plexus choroideus umfasst.

#### *(1) Olfaktorisches System*

Das olfaktorische System ist wichtig für die Wahrnehmung von Gerüchen. Es ermöglicht ein Eindringen von Viren aus der Peripherie (vom Nasengang ausgehend) ins ZNS über den olfaktorischen Nerv, welcher sich vom olfaktorischen Epithelium bis zum Bulbus olfactorius (Riechkolben) im Gehirn erstreckt [122]. Die Dendriten der olfaktorischen Rezeptorneuronen liegen im Epithelium der Nasen-Rachenhöhle [122]. In Infektionsversuchen konnte dieser Weg der

Neuroinvasion u.a. für das Vesikular Stomatitis Virus (VSV) [123], Influenza A Virus [124] und das Tollwutvirus [125] gezeigt werden.

### *(2) Retrograder Transport*

Viren, die über den retrograden Transport ins ZNS gelangen, nutzen die Verbindung von peripheren Nerven zum Gehirn, durch Bindung an die Rezeptoren der axonalen Enden von sensorischen oder motorischen Nerven [122]. Das Herpes Simplex Virus (HSV-1) gelangt über die Membranfusion sensorischer Neurone ins Gehirn [126], [127]), während das Tollwutvirus die neuromuskuläre Verbindung zwischen Muskeln und Motorneuronen nutzt [128].

### *(3) Neuroinvasion über das „Trojanische Pferd“*

Einige Viren sind in der Lage über infizierte Leukozyten, wie Monozyten oder Makrophagen, im Blut unentdeckt ins Gehirn einzudringen [129]–[131]. Für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) konnte bereits gezeigt werden, dass infizierte Monozyten das Virus ins Gehirn transportieren, nachdem die Blut-Hirn-Schranke durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) geöffnet wurde [132].

#### *(4a) Blut-Hirn-Schranke als Barriere für Viren*

Die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht den Gasaustausch sowie den Transport von wichtigen Metaboliten und kleinen hydrophoben Proteinen ins Gehirn [122]. Sie schützt zudem vor dem Eindringen von Makromolekülen und Pathogenen wie Viren und Bakterien [122]. Die Blutkapillaren sind umrundet von mikrovaskulären Endothelzellen, die untereinander mit speziellen Verbindungsproteinen verknüpft sind [122]. Diese Verbindungsproteine verhindern den parazellulären Eintritt von Pathogenen in das Gehirn [122]. Die Endothelzellen werden durch eine Basalmembran umschlossen, welche von Gehirn-residenten Zellen wie Astrozyten, Neuronen aber auch Mikroglia-Zellen und Perizyten umrundet sind [122]. Der Eintritt von Viren kann zum einen über die mikrovaskulären Endothelzellen ins Gehirn erfolgen, wie es bei ZIKV [133] und WNV-Infektionen [134], [135] geschieht oder über die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke durch eine vom Virus ausgelösten Zytokin-Antwort. [132]

#### (4b) Der Plexus choroideus

Lokalisiert ist der Plexus choroideus zweifach im lateralen Ventrikel, sowie je einmal im dritten und vierten Ventrikel im Gehirn [136]. Der Plexus choroideus produziert den Liquor (Cerebrospinalflüssigkeit), bildet die Blut-Liquor-Schranke aus und sorgt für eine Entgiftung der Hirnflüssigkeit [136]. Die Blut-Liquor-Schranke ermöglicht den aktiven Transport von Natrium- und Chloridionen [136]. Dies kann nur erfolgen, da das Blut von Endothelzellen umrandet ist, welche untereinander keine Verbindungsproteine ausbilden [136]. Dadurch ist das Endothel für das Blutserum und die darin enthaltenen Moleküle durchlässig [136]. Die Flüssigkeitsansammlung wird durch Epithelzellen umkleidet [136]. Diese Epithelzellen bilden zueinander Verbindungsproteine aus und schaffen so eine Barriere zwischen dem Stroma und des Liquors im Plexus choroideus [136]. Der Liquor zirkuliert in dem sub-arachnoiden Raum der Meningen um das Gehirn und kann (I) über den Sinus (Hauptvene) der Dura mater (äußere Hirnhaut) [137], (II) über den Riechnerv im Bulbus olfactorius in ein lymphatisches System in der Mukosa [138], oder (III) über das Parenchym [139] und den meningealen Raum über die drainierenden zervikalen Lymphknoten in das lymphatische System abgeleitet werden [140]. Viren könnten durch die Zerstörung der Verbindungsproteine zwischen den Epithelzellen oder durch Infiltration über die Epithelzellen in den Plexus choroideus gelangen und über das Liquor weitere Gehirnareale erreichen und infizieren. Für das ZIKV wurde die Möglichkeit erörtert, dass der Eintritt des Virus über die Zerstörung der Blut-Liquor-Schranke erfolgen könnte, da im Plexus choroideus infizierte Perizyten entdeckt wurden [141].

#### 1.2.6 Mögliche Eintrittswege von TBEV ins Gehirn

Die Frage, wie TBEV ins Gehirn gelangt, ist nicht abschließend geklärt. In TBE Patienten konnten post-mortem TBEV Antigene in den Neuronen nachgewiesen werden [121]. TBEV ist zudem in der Lage *in vitro* weitere Zelltypen des Gehirns zu infizieren, darunter Astrozyten [142] und die mikrovaskulären Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke [143]. In der Literatur wird vermehrt der Eintrittsweg von TBEV über die Blut-Hirn-Schranke diskutiert [117], [143]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass TBEV die Blut-Hirn-Schranke über einen transzellulären Weg überwinden kann, ohne die Barriere aktiv zu zerstören. *In vivo* Studien konnten dies für TBEV und LGTV belegen. In *Ifnar1<sup>-/-</sup>* Mäusen erfolgte der Nachweis von LGTV im Gehirn vor Öffnung der Blut-Hirn-Schranke [117]. Eine andere Studie wies nach, dass die spätere Öffnung der Blut-

Hirn-Schranke durch Zytokine erfolgte, die von TBEV infizierten Zellen im Gehirn produziert wurden [144]. Eine Öffnung dieser Barriere ist für die Neuroinvasion von TBEV somit nicht notwendig. Allerdings ist damit nicht gesagt, dass TBEV diesen Weg der Neuroinvasion nutzt. Es ist möglich, dass die Neuroinvasion von TBEV über verschiedene Wege erfolgen könnte. Für andere neurotrope Viren wie das Tollwutvirus [128] und ZIKV [133] wurde dies bereits gezeigt. TBEV könnte über den Plexus choroideus ins Gehirn einwandern. Im Menschen ist virale RNA von TBEV in der ersten Phase des Krankheitsverlaufs sowohl im Blut als auch im Liquor detektiertbar [145]–[147]. Während der Virämie könnte TBEV zum Plexus choroideus vordringen und über die Zerstörung der Verbindungen zwischen den Epithelzellen oder durch Infektion dieser Zellen in den Plexus choroideus gelangen und das Liquor infizieren. Von dort ausgehend könnte TBEV über den Liquor im Gehirn verbreitet werden. Dies und andere mögliche Routen der TBEV Invasion ins Gehirn müssten durch weitere Studien bestätigt oder widerlegt werden.

### **1.2.7 Interaktion des Immunsystems mit TBEV und LGTV**

Eine TBEV Infektion im Menschen ist nicht leicht zu erforschen, da Patienten oftmals erst in der zweiten Phase der Infektion ärztlich untersucht werden, nachdem sie Symptome wie zum Beispiel eine Meningoenzephalitis entwickelt haben. Doch bereits in der ersten Infektionsphase reagiert das Immunsystem auf die Virusinfektion.

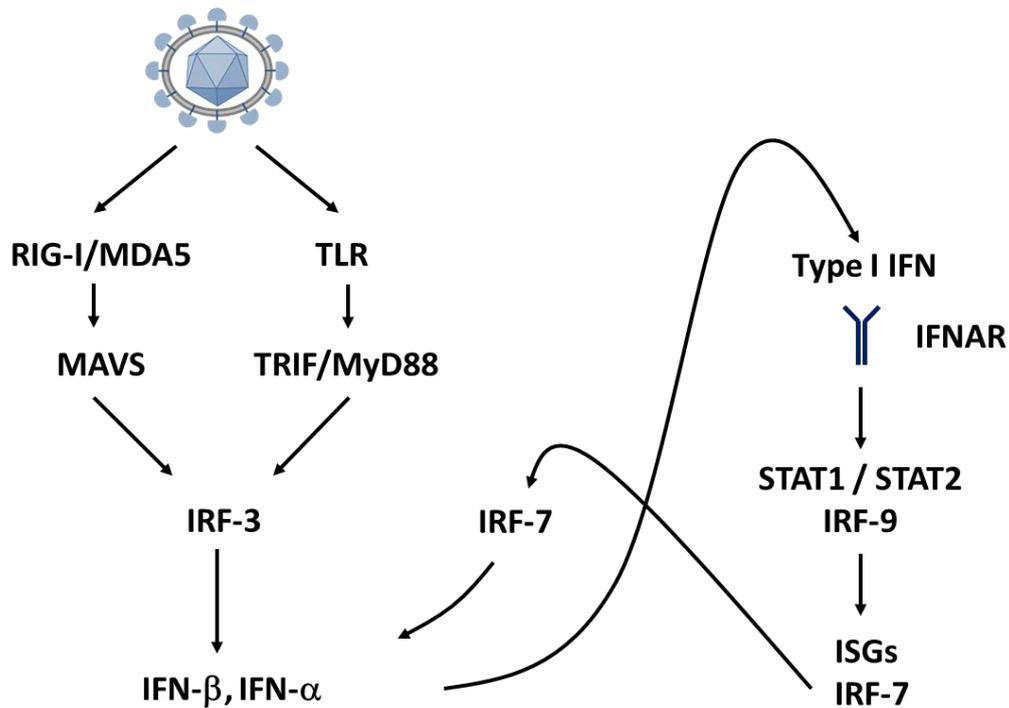
Das Typ I Interferonsystem des angeborenen Immunsystems ist in der Erkennung und Abwehr von Virusinfektionen durch die Expression antiviraler Proteine und Zytokine sehr wichtig. Die Zelle erkennt die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl.: pathogen associated molecular patterns (PAMPs)) der Viren, wie zum Beispiel ssRNA, durch die wirtseigenen Muster-erkennenden Rezeptoren (engl.: pattern recognition receptors (PRRs)) (Abb. 2) [148], [149]). PRRs sind auf der Oberfläche von Zellmembranen, Endosomen und im Zytoplasma zahlreicher Zelltypen lokalisiert [149]. Die Detektion viraler RNA erfolgt durch die Toll-like Rezeptoren (TLR) auf den Endosomen und durch die Retinsäure-induzierbaren Gen-1 (engl.: retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I)) ähnlichen Rezeptoren (RLR), welche im Zytoplasma vorliegen [148], [149]. TBEV ist in der Lage die vom Virus produzierte dsRNA für eine gewisse Zeit vor RIG-I zu verbergen, indem es in der Membran des endoplasmatischen Retikulums Replikationsvesikel ausbildet [150]. Diese Öffnung der Vesikel ist zu klein für RIG-I, sodass die dsRNA von TBEV erst nach erfolgreicher Replikation und bei hohen Konzentrationen aus dem Vesikel austritt

und von RIG-I erkannt werden kann [150]. Dadurch erfolgt eine verspätete Immunantwort [150].

Durch die Bindung der viralen RNA an die PRRs erfolgt die Aktivierung einer Signalkaskade. RIG-I bindet an das mitochondriale antivirale Signalübertragungsprotein (engl.: mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)) auf der Mitochondrien-Membran [151]. *In vivo* Studien belegen eine wichtige Rolle von MAVS während einer LGTV Infektion. In MAVS defizienten Mäusen wurde eine höhere Replikation der viralen RNA, sowie eine Infiltration von Immunzellen ins Gehirn festgestellt [118]. Ohne MAVS überlebten die Mäuse die LGTV Infektion nicht [118]. MAVS initiiert die Phosphorylierung des Interferon-regulierenden Faktor 3 (IRF-3) unter Einbindung von Kinasen im Zytosol [152]. Die Aktivierung von IRF-3 führt zur Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, wo IRF-3 an spezifische Interferon-stimulierte Antwortelemente (engl.: IFN stimulated response elements (ISRE)) bindet und so die Transkription der Interferone alpha (IFN- $\alpha$ ) und beta (IFN- $\beta$ ) induziert [153].

Die produzierten Interferone sekretieren aus der Zelle und binden an den IFN- $\alpha/\beta$  Rezeptor (IFNAR) auf der Zellmembran der eigenen Zelle (autokrin) oder einer Nachbarzelle (parakrin) [154].

Dies führt zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, in dem die Janus-Protein-Tyrosin-Kinasen (JAK1/TYK2) die Proteine STAT1 und STAT2 (engl.: Signal transducer and activator of transcription 1 and 2 (STAT1/2)), phosphorylieren. Die phosphorylierten STAT1 und STAT2 Proteine dimerisieren und bilden mit IRF-9 den IFN-stimulierten Genfaktor 3 Komplex (engl.: IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3)) [155], [156]. Dieser Komplex wandert in den Zellkern und induziert dort die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISG). Es gibt ungefähr 1000 bekannte ISGs [157]. Ein wichtiges ISG ist IRF-7. IRF-7 kann in einem positiven Feedback-Kreislauf die Expression von Typ I IFNs und folglich auch die Hochregulation von weiteren ISGs induzieren [158]. Hierfür bildet das phosphorylierte IRF-7 ein Homo- oder mit IRF-3 ein Heterodimer, welches im Zellkern die Transkription von Typ I IFNs induziert [158]. Weitere bekannte Proteine mit antiviraler Wirkung sind Viperin und das dreigliedrige Motiv Protein 79 $\alpha$  (engl.: tripartite motif (TRIM) protein 79 $\alpha$  (TRIM79 $\alpha$ )). Beide Proteine verhindern die Replikation von TBEV. Viperin verursacht eine Proteasom-abhängige Degradierung des TBEV NS3 Proteins [159] und durch TRIM79 $\alpha$  erfolgt eine Degradierung der viralen RNA-Polymerase NS5 [160].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ I Interferon Systems**

Eine genaue Beschreibung des Signalweges ist im Text vorzufinden. RIG-I = Retinsäure-induzierbares Gen I; MDA5 = Melanom-Differenzierungs-assoziiertes Gen 5; TLR = Toll-like Rezeptor; MAVS = Mitochondriales antivirales Signalübertragungsprotein; TRIF = TIR-Domäne enthaltendes Adapter-induzierendes Interferon  $\beta$ ; MyD88 = Myeloides Differenzierungs-Primärantwortgen (88); IFN-  $\alpha$  /  $\beta$  = Interferon  $\alpha$  /  $\beta$ ; IFNAR = Typ I Interferon-Rezeptor; STAT = Signalwandler und Aktivator der Transkription; ISG = Interferon-stimuliertes Gen; IRF-3/7 = Interferon-Regulationsfaktor 3/7.

Wie wichtig die Typ I IFN Antwort in der Abwehr einer TBEV und LGTV Infektion im Gehirn ist, zeigen verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien. In LGTV infizierten *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgte durch die gehinderte Typ I IFN Antwort eine erhöhte Virusreplikation in peripheren Organen und im Gehirn [117]. Ohne IFNAR starben die Mäuse an einer LGTV und TBEV Infektion.

Im Menschen ist über die Verbreitung von TBEV im Gehirn wenig erforscht. Bekannt ist aber, dass sowohl TBEV als auch LGTV (in Mäusen) primär Neuronen infizieren [117], [161], [162].

Humane Neuronen reagieren *in vitro* auf eine TBEV Infektion mit der Hochregulation von RLRs und begünstigen eine vermehrte Expression von ISGs [163]. Doch auch andere Gehirn-residente Zellen wie die Astrozyten spielen eine entscheidende Rolle in der antiviralen Abwehr von TBEV. *In vitro* sind Astrozyten in der Lage die Typ I IFN Antwort gegen TBEV zu induzieren, was zu einer reduzierten Virusreplikation und Verbreitung führt [164]. *In vivo* konnte zudem

beobachtet werden, dass eine intakte Typ I IFN Antwort Astrozyten vor einer LGTV Infektion schützt [118].

Während einer TBEV Infektion gibt es eine systemische Immunreaktion in der Peripherie sowie eine lokale Inflammation im Gehirn der Patienten. Neben den Typ I Interferonen und den ISGs, spielen Zytokine, wie zum Beispiel Interleukine und Chemokine, eine wichtige Rolle. Im Allgemeinen regulieren Zytokine das Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen [165]. Die Chemokine, auch als chemotaktische Zytokine bekannt, lösen eine sogenannte Chemotaxis aus [166]. In einer Chemotaxis wandern Zellen mit steigender Konzentration zum Ursprungsort der Chemokin-Produktion [166]. Es wird zwischen der homöostatischen und inflammatorischen Chemotaxis unterschieden [167]. Die homöostatische Chemotaxis erfolgt ohne Stimulus konstitutiv. Dadurch ist u.a. gegeben, dass Immunzellen in die Lymphknoten wandern, um dort auf mögliche Pathogene zu reagieren, oder um das Wachstum von Blutgefäßen (Angiogenese) zu stimulieren [167]. Die inflammatorische Chemotaxis wird durch Zellschäden oder Infektionen ausgelöst und bewirkt das Einwandern von Immunzellen zum Ort der Gewebeschädigung oder Inflammation [166].

Im Serum von TBE Patienten wurde in der frühen Phase der TBEV Infektion steigende Level verschiedener Interleukine wie IL-1a, IL-6 und IL-12 gemessen [168]–[170]. In der zweiten Phase der Infektion nahmen diese Konzentrationen ab, während die Konzentration von Wachstumsfaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor und das Matrix-Metalloproteinase-9 Protein (MMP-9) zunahm [170], [171]. In Gehirnen von TBE Patienten sind vorgefundene Gewebeschäden mit einem hohen Level an MMP-9 assoziiert worden [172].

Im Liquor von Patienten wiederum nahmen die Konzentrationen von Chemokinen im Vergleich zum Blut zu. Steigende Level von C-X-C Motiv Chemokin 9 und 10 (CXCL-9, CXCL-10) [173]–[175] und C-C-Motiv-Chemokin Liganden 3 und 5 (CCL-3, CCL-5) [176], [177] wurden identifiziert. CCL-3 und CCL-5 sind Liganden des CCR-5, ein Transmembranprotein auf der Oberfläche verschiedener Leukozyten wie CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den natürlichen Killer (NK) Zellen [178]. In Patienten wurden hohe Level an CCL-5 sowie eine Pleozytose festgestellt [177]. Eine Pleozytose bezeichnet die Infiltration von Immunzellen in den Liquor. CCL-5 bewirkte die Rekrutierung von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in den Liquor, welche hohe Level des C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR-5) exprimierten [177]. In CCR-5 defizienten Mäusen wurden während einer LGTV Infektion im Gehirn hohe Level der Chemokine CXCL-1 und CXCL-2 nachgewiesen [179]. Diese Chemokine rekrutieren Neutrophile, deren Anzahl in

den CCR-5 defizienten Mäusen während der LGTV Infektion im Gehirn stark erhöht war [179]. Zudem wiesen diese Mäuse eine hohe Virusreplikation und ein geringeres Überleben auf [179]. Die steigenden Level von Chemokinen im humanen Liquor deuten auf eine Migration von Immunzellen ins Gehirn hin. Allerdings spiegelt die Anzahl infiltrierender Immunzellen im Liquor nicht die Immunzellinfiltration im Gehirn wider. Biopsien von humanem Gehirngewebe konnten eine Infiltration cytotoxischer Immunzellen während einer TBE zeigen [162]. Da Biopsien des Gehirns von Menschen nur an verstorbenen Patienten entnommen werden können, ist noch wenig über die Virusverbreitung, die lokale Immunantwort der Gehirn-residenten Zellen sowie die proinflammatorische Antwort von infiltrierenden Immunzellen bekannt.

## 2. Ziel dieser Arbeit

TBEV ist der bekannteste Vertreter der durch Zecken übertragenen Flaviviren. Die Verbreitung von TBEV erfolgt vor allem über Zecken in spezifischen Regionen. Zudem wurden vermehrt Fälle einer Ansteckung mit TBEV beschrieben, die nicht durch einen Zeckenstich, sondern durch den Verzehr von Rohmilch oder Rohmilchprodukten erfolgte [99], [100]. Eine horizontale Übertragung von TBEV beim Menschen, wie bei anderen Flaviviren wie dem ZIKV, wurde bisher nicht beobachtet.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine horizontale Übertragung von LGTV und TBEV möglich ist und welche alternativen Infektionsrouten zu einer Infektion führen können.

TBEV ist ein neurotropes Virus. Wie TBEV in das Gehirn eindringen kann, ist nicht bekannt. Das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke wird als möglicher Eintrittsweg beschrieben [143], jedoch zeigen Versuche in Mäusen, dass das Virus bereits vor Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke im Gehirn nachweisbar ist [117]. Es ist denkbar, dass TBEV auch über andere Mechanismen ins Gehirn eindringen kann. Unter Verwendung des Modellvirus LGTV soll anhand von Infektionsversuchen in asymptomatischen C57BL/6 Wildtyp und symptomatischen *Ifnar1<sup>-/-</sup>* Mäusen die Virusverbreitung in der Peripherie und im Gehirn im zeitlichen Verlauf der Infektion untersucht werden, um ein besseres Verständnis über mögliche Eintrittswege ins Gehirn zu erhalten.

Der Ausbruch einer TBEV Infektion mit Symptomen kann abhängig vom Subtyp unterschiedlich verlaufen. Während TBEV-EU Stämme meist einen biphasischen Krankheitsverlauf verursachen, sind in den TBEV-FE und TBEV-Sib Infektionen monophasische Verläufe mit neurologischen Symptomen typisch [55], [57], [104], [110]. Auch innerhalb der TBEV-EU-Stämme gibt es unterschiedlich virulente Stämme [22], [180]. Die Pathogenität definiert sich aus der Fähigkeit des Virus in das Gehirn einzudringen (Neuroinvasion) und dort eine Erkrankung hervorzurufen (Neurovirulenz). Die Kenntnis der unterschiedlichen klinischen Verläufe und der Schwere der durch TBEV Stämme verursachten Krankheit kann ein wichtiges Kriterium für die Diagnose und Behandlung der Krankheit sein. In dieser Arbeit sollen deshalb zwei TBEV Stämme unterschiedlicher Pathogenität im Mausmodell verglichen werden und ihre Fähigkeit der Neuroinvasion, Neurovirulenz und Induktion von proinflammatorischen Zytokinen untersucht werden, um ein Verständnis der Pathogenese bei TBEV Infektionen zu bekommen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Transmission

Die von Zecken übertragene Enzephalitis ist eine schwere zoonotische Erkrankung des zentralen Nervensystems, die durch TBEV verursacht wird. TBEV wird meist durch den Stich einer Zecke auf den Menschen übertragen. Zunehmend werden jedoch Fälle einer Übertragung von TBEV durch den Verzehr infektiöser Rohmilch oder Rohmilchprodukte gemeldet [99]–[101]. Für andere Flaviviren wie das ZIKA Virus wurden alternative Übertragungswege wie die horizontale Übertragung beschrieben. Eine horizontale Übertragung von TBEV von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht dokumentiert, obwohl bereits virale RNA von TBEV in Körperflüssigkeiten von immunsupprimierten Patienten detektiert wurde [181], [182]. Da es keine gezielte Therapie gegen eine TBEV Infektion gibt, ist es wichtig weitere mögliche Infektionsrouten zu erforschen. Experimente zur Transmission wurden sowohl mit dem Modellvirus LGTV als auch mit TBEV durchgeführt.

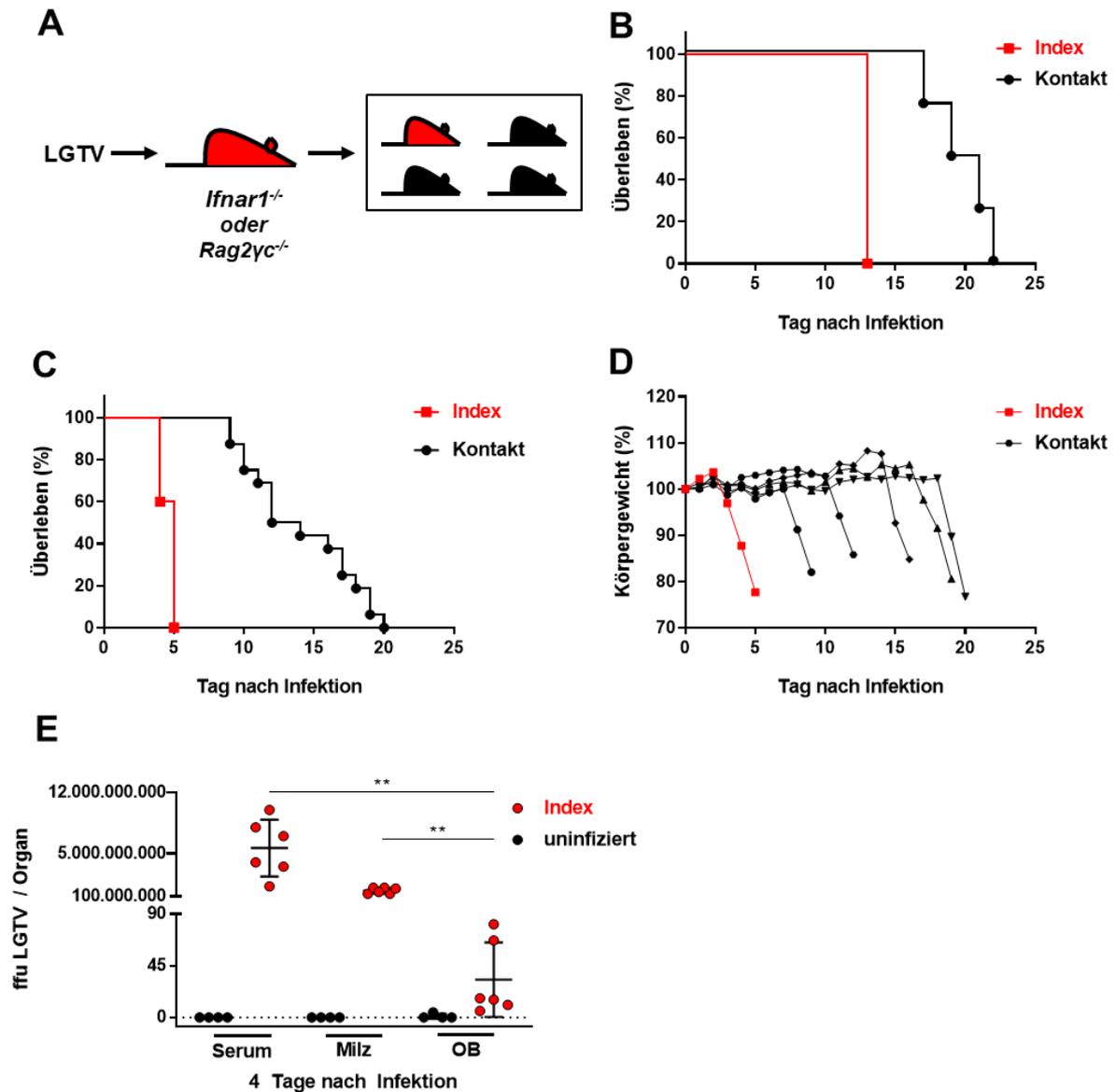
Die folgenden Ergebnisse dieser Arbeit (Abb. 3-10) wurden von mir im *Journal of Virology* publiziert [183].

#### 3.1.1 Effiziente LGTV Übertragung zwischen Mäusen mit direktem Kontakt zueinander

Um potentielle Infektionswege von LGTV zu definieren, sollte untersucht werden, ob die horizontale Übertragung von LGTV in Mäusen möglich ist. Dazu wurden suszeptible *Ifnar1<sup>-/-</sup>* und *Rag2 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>* Mäuse verwendet, in denen die LGTV Infektion zur Ausbildung von schweren Krankheitssymptomen führt. *Ifnar1<sup>-/-</sup>* besitzen keinen IFNAR1, die *Rag2 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>* weisen einen Immundefizit in T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen auf. *Ifnar1<sup>-/-</sup>* oder *Rag2 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden intraperitoneal (in die Bauchhöhle) mit einer Konzentration von  $10^2$  Fokus-bildenden Einheiten (ffu) mit LGTV infiziert und als „Index-Maus“ definiert (Abb. 3A). Eine Index-Maus des jeweiligen Genotyps wurde mit weiteren naiven *Ifnar1<sup>-/-</sup>* bzw. *Rag2 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>* Mäusen (Kontakt-Mäuse) zusammen in einem Käfig gehalten (Cohousing). Bei einer erfolgreichen Maus-zu-Maus Übertragung sollten Kontakt-Mäuse Krankheitssymptome aufweisen. Hierfür wurde der Gesundheitszustand und das Gewicht der Index- und Kontakt-Mäuse täglich kontrolliert. Bei Erreichen definierter Abbruchkriterien (s. Abschnitt 5.9. und Anhang Score Tabelle) wurden die Tiere getötet. Die *Rag2 $\gamma$ c<sup>-/-</sup>* Index-Mäuse zeigten ab Tag 10 nach Infektion einen Gewichtsverlust (Abb.

3B). Bedingt durch den Gewichtsverlust und der Entwicklung weiterer Krankheitssymptome 13 Tage nach Infektion, mussten die *Rag2 $\gamma$ c*<sup>-/-</sup> Index-Mäuse 13 Tage nach der Infektion getötet werden. Alle Kontakt-Mäuse entwickelten dieselben Krankheitszeichen wie die Index-Mäuse und mussten zwischen Tag 17-22 getötet werden. *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Index-Mäuse zeigten bereits 4-5 Tage nach Infektion Krankheitssymptome und wurden getötet (Abb. 3C-D). *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Index-Mäusen wurden Serum, Milz und der Bulbus olfactorius des Gehirns entnommen und der virale Titer mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) bestimmt (Abb. 3E). Alle Mäuse wiesen eine hohe Konzentration von Virus-RNA in Milz und Serum auf. Auch konnte eine Virusverbreitung bis in das Gehirn detektiert werden. Alle *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse verloren im Laufe der Zeit Gewicht und wurden 2-3 Tage nach Eintritt des Gewichtsverlustes an den Tagen 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19 und 20 getötet.

Alle Kontakt-Mäuse wiesen denselben Krankheitsverlauf wie die Index-Mäuse auf. Dies weist darauf hin, dass eine Maus-zu-Maus Transmission von LGTV in immundefizienten *Ifnar1*<sup>-/-</sup> und *Rag2 $\gamma$ c*<sup>-/-</sup> Mäusen möglich ist. Die lange Zeitspanne des Krankheitsbeginns der Kontakt-Mäuse weist darauf hin, dass eine Übertragung von LGTV nicht ausschließlich direkt von der Index-Maus ausgehen muss, sondern auch zwischen den Kontakt-Mäusen untereinander erfolgen kann.



**Abbildung 3: Maus-zu-Maus Übertragung von LGTV**

**A.** Schematische Darstellung des Experiments. Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert (Index = rot) und zusammen in einem Käfig mit naiven Mäusen (Kontakt = schwarz) gehalten. **B.** Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der *Rag2γc<sup>-/-</sup>* Mäuse dar (Index-Mäuse n = 1, Kontakt-Mäuse n = 4). Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\*p=0.0455) im Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse. **C.** Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der *Ifnar1<sup>-/-</sup>* Mäuse dar (Index-Mäuse n = 5; Kontakt-Mäuse n = 16). Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests ermittelt und ergab einen signifikanten Unterschied (\*\*\*\*p<0.0001) im Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse. **D.** Analyse des Körpergewichtes von individuellen Mäusen im Verlauf von 20 Tagen. Die Daten sind repräsentativ für ein unabhängiges Experiment (Index-Mäuse n = 1, Kontakt-Mäuse n = 5). **E.** Virale Titer in Organen nicht infizierter (schwarz) und LGTV infizierter *Ifnar1<sup>-/-</sup>* Mäuse (rot) mittels Fokus-bildenden Assay an Tag 4 nach Infektion. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (n = 6). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test, \*\*p=0.0022.

### 3.1.2 Einfluss viraler Titer auf die horizontale Übertragung von LGTV

LGTV kann in suszeptiblen *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen horizontal übertragen werden. Es soll untersucht werden, ob die Höhe des viralen Titers der Index-Maus die Transmission beeinflusst. Dazu wurden Wildtyp C57BL/6 Mäuse als Index-Mäuse verwendet. Vorherige Studien haben gezeigt, dass eine LGTV Infektion in Wildtyp Mäusen nur zu einer geringen Virusreplikation führt [118]. Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert (Index) und zusammen in einem Käfig mit naiven *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontakt) gehalten (Abb. 4A). Weder Index-Mäuse noch die suszeptiblen Kontakt-Mäuse verloren an Gewicht oder entwickelten Anzeichen einer Erkrankung (Abb. 4B). Um nachzuweisen, ob die *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse infiziert wurden, die virale Dosis aber nicht ausreichend gewesen ist um eine Erkrankung auszulösen, wurden neutralisierende Antikörper gegen LGTV analysiert. Dazu wurde 21 Tage nach Infektion das Serum von den Wildtyp Index-Mäusen sowie von suszeptiblen Kontakt-Mäusen entnommen und die Produktion neutralisierender Antikörper überprüft. In den infizierten Wildtyp Index-Mäusen konnten neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. In keiner Kontakt-Maus konnten neutralisierende Antikörper gegen LGTV nachgewiesen werden. (Abb. 4C).

Diese Daten zeigen, dass die geringe Viruslast in Wildtyp Mäusen nicht für eine horizontale Übertragung auf suszeptible Index-Mäuse ausreicht. Eine hohe Viruslast sowie suszeptible Kontakt-Mäuse sind für eine horizontale Transmission von LGTV notwendig.

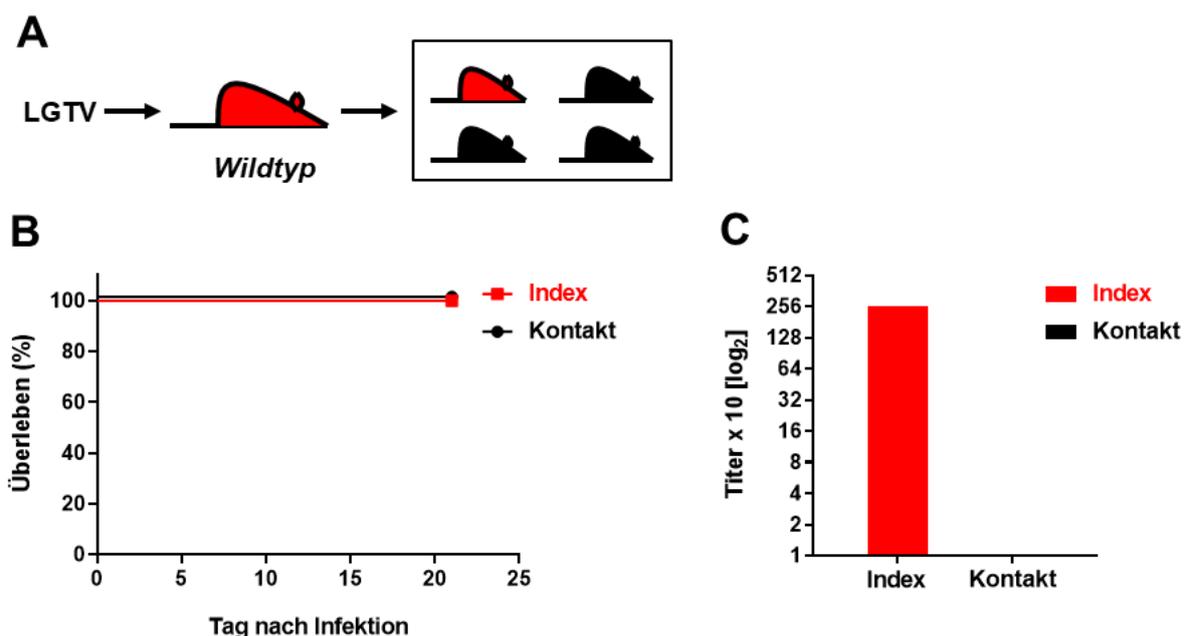


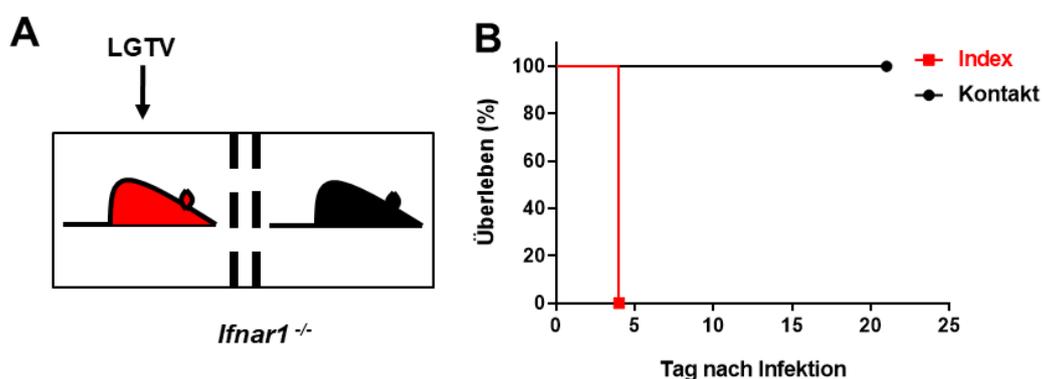
Abbildung 4: Hohe virale Titer in den Index-Mäusen führen zu einer Maus-zu-Maus Übertragung

**A.** Schematische Darstellung des Experiments. Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert (Index = rot) und zusammen in einem Käfig mit naiven *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontakt = schwarz) gehalten (Index-Mäuse n = 2, Kontakt-Mäuse n = 7). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. **B.** Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der *Rag2yc*<sup>-/-</sup> Mäuse dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab keinen signifikanten Unterschied im Überleben von Index und Kontakt-Mäusen. **C.** Serumproben wurden an Tag 21 nach Infektion entnommen und spezifische Antikörper gegen LGTV mittels Neutralisierungssassay quantifiziert. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

### 3.1.3 Aerosole übertragen nicht LGTV

Die Transmission von LGTV von Maus-zu -Maus wurde nachgewiesen. Um den Übertragungsweg näher zu definieren sollte überprüft werden, ob die Transmission über die Luft möglich ist. *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Index-Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert und ohne direkten Kontakt zueinander mit naiven *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäusen in einem Käfig gehalten. Die zwei Gruppen wurden durch ein 2 mm dickes löchriges Metallgitter, das eine 4 cm weite Distanz der beiden Gruppen zueinander sicherstellt, voneinander getrennt (Abb. 5A). Jede Gruppe hatte eigenes Streu, Futter und eine eigene Wasserflasche. Der Luftaustausch erfolgte zwischen den zwei Bereichen durch das Metallgitter. Die Index-Mäuse entwickelten Krankheitsanzeichen und erreichten die Abbruchkriterien an Tag 4 nach Infektion (Abb. 5B). Konträr dazu überlebten alle Kontakt-Mäuse ohne Anzeichen einer Infektion.

Die Daten zeigen, dass die LGTV Transmission von Maus-zu-Maus nicht über die Luft erfolgt.



**Abbildung 5: Keine Luftübertragung von LGTV**

*Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert (Index = rot). Naive *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse (Kontakt = schwarz) wurden separat von Index-Mäusen in denselben Käfig gesetzt (Index-Mäuse n = 6, Kontakt-Mäuse n = 7). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. **A.** Schematische Darstellung des Experiments. **B.** Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels

des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\*\*p=0.0005) zwischen dem Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse.

### 3.1.4 Einfluss des Maus-zu-Maus-Kontakts auf die horizontale LGTV Übertragung

Um zu untersuchen, ob ein direkter Kontakt zwischen den naiven Kontakt-Mäusen und den Index-Mäusen für die Virusübertragung erforderlich ist, wurden serielle Transferexperimente durchgeführt (Abb. 6A). *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Index-Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert und für 24 Stunden in einem Käfig gehalten. Anschließend wurden die Index-Mäuse in einen neuen Käfig mit neuem Futter und Wasser gesetzt. Die naiven *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse wurden in den benutzten Käfig der Index-Mäuse überführt. Die naiven Kontakt-Mäuse hatten Kontakt zu demselben Futter, Wasser, Kot, Urin, Streu und Papier der infizierten Index-Mäuse. Dieses Verfahren wurde täglich wiederholt, bis die Index-Mäuse Krankheitssymptome entwickelten und die Abbruchkriterien 4 bis 5 Tage nach der Infektion erreichten (Abb. 6B). Im Verlauf des Experiments entwickelten 5 von 9 Kontakt-Mäusen vom 9. bis zum 20. Tag typische Krankheitssymptome. Die überlebenden Mäuse blieben symptomfrei.

Diese Daten zeigen, dass eine Infektion ohne direkten Kontakt von Index- und Kontakt-Mäusen möglich ist, um LGTV von Maus-zu-Maus zu übertragen.

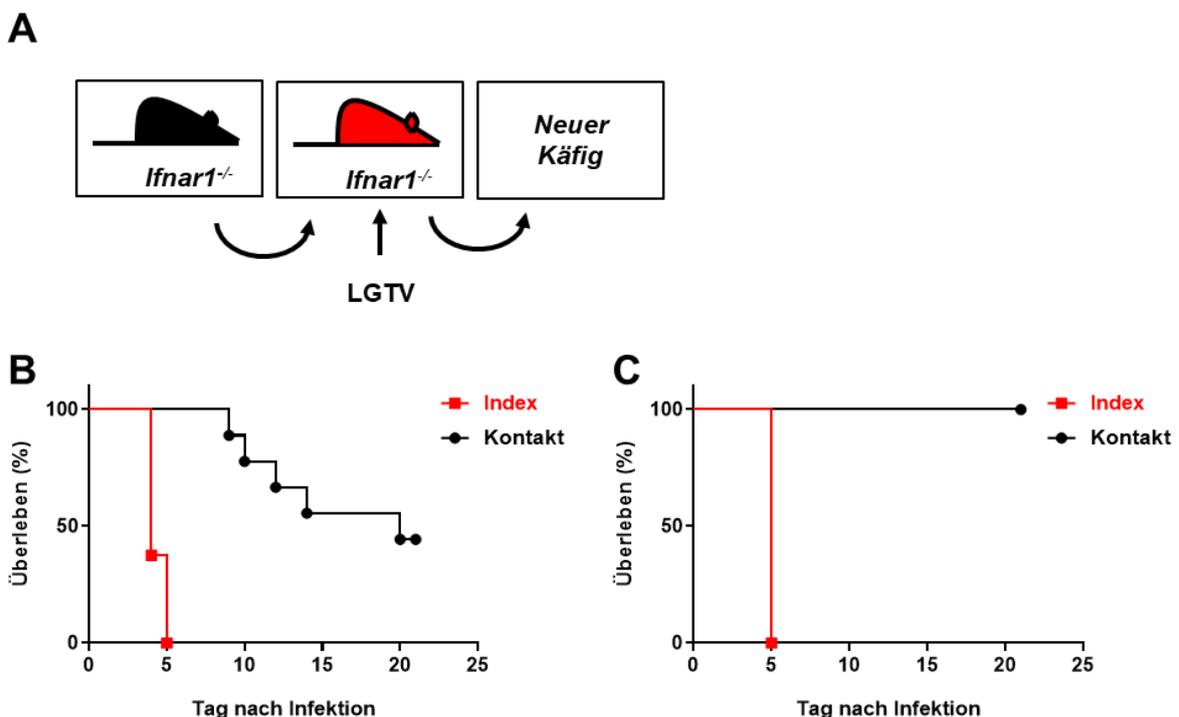


Abbildung 6: Kontaktlose Transmission von LGTV

Käfigtransfer-Experimente wurden durchgeführt. *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert. **A.** Schematische Darstellung des Experiments. Alle 24 Stunden wurden die Mäuse in einen neuen Käfig überführt. Naive *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse wurden in den Käfig gesetzt, der zuvor von den infizierten *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Index-Mäusen genutzt wurde. **B.** Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests, und ergab einen signifikanten Unterschied (\*\*\*\*p<0.0001) im Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse. **C.** Um den Kontakt zu Urin und Kot zu intensivieren wurden die *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Index-Mäuse abwechselnd in einem Käfig mit oder ohne Einstreu für je 12 Stunden gehalten. Naive *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse wurden in den zuvor von infizierten Index-Mäusen genutzten Käfig gesetzt. Wasser und Futter wurden kurz vorher ausgetauscht. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar (Index-Mäuse n = 3, Kontakt-Mäuse n = 3). Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\*p=0.0253) zwischen dem Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse.

### 3.1.5 Kontakt zu Kot und Urin überträgt nicht das Virus

Um zu bestimmen wie es zu einer kontaktlosen Transmission von LGTV kommt, wurde das vorherige Transferexperiment modifiziert (Abb. 6A). Index-Mäuse wurden mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert. Um den Kontakt zu Urin und Kot zu intensivieren, wurden Index-Mäuse wiederkehrend für 12 Stunden ohne Einstreu auf Papier gehalten. Anschließend wurden die Tiere zur Erholung für 12 Stunden in einen normalen Käfig mit Einstreu gesetzt. Die naiven *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse wurden alternativ 12 Stunden lang in den Käfig ohne Streu, der zuvor von den infizierten Index-Mäusen genutzt wurde, oder in neue saubere Käfige mit Streu gebracht. Um eine Übertragung durch Wasser und Futter auszuschließen, wurde dies alle 12 Stunden gewechselt, wenn die Index-Mäuse in einen neuen Käfig gesetzt wurden. Das Verfahren wurde 5 Tage fortgesetzt. Die Index-Mäuse entwickelten im Verlauf der Infektion Krankheitssymptome und erreichten 5 Tage nach der Infektion die Abbruchkriterien (Abb. 6C). Keine Kontakt-Maus zeigte Anzeichen einer Erkrankung.

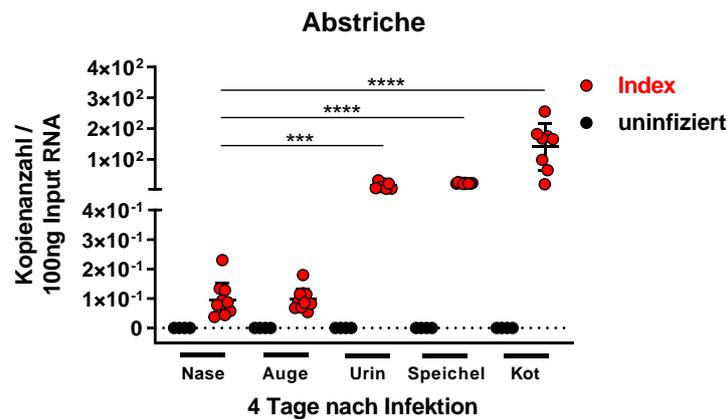
Diese Daten zeigen, dass der Kontakt mit Kot und Urin der infizierten Mäuse allein nicht ausreicht, um LGTV auf susceptible *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse zu übertragen.

### 3.1.6 Virale RNA wird durch verschiedene Körperflüssigkeiten ausgeschieden

Die horizontale Transmission von LGTV kann ohne direkten Körperkontakt erfolgen. Es sollte deshalb untersucht werden in welchen Körperflüssigkeiten, Sekreten und Exkrementen virale RNA nachweisbar ist. Verschiedene Sekrete und Exkremente wurden mittels qRT-PCR auf Virus-RNA untersucht. *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert. 4 Tage

nach Infektion wurden Proben von Kot und Urin, sowie Abstriche von Speichel, Nase und Augen der erkrankten *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse entnommen und die virale RNA durch qRT-PCR gemessen (Abb. 7). Virale LGTV RNA konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration viraler RNA konnte in Kot festgestellt werden, die geringste Konzentration viraler RNA wurde in den Augen- und Nasen-Abstrichen detektiert.

Diese Daten zeigen, dass erkrankte *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse virale RNA in verschiedenen Körperflüssigkeiten ausscheiden und diese damit potentiell infektiös sein könnten.



**Abbildung 7: Nachweis von LGTV RNA in Sekreten und Exkrementen**

*Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden nicht infiziert (schwarz) oder intraperitoneal infiziert (rot) mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV. Urin, Kot, sowie Speichel-, Nasen- und Augen-Abstriche wurden 4 Tage nach der Infektion gesammelt. Die virale RNA von LGTV wurde mittels qRT-PCR gemessen. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (nicht infiziert n = 4, Nase n = 10, Auge n = 10, Urin n = 7, Speichel n = 10, Kot n = 8). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test, \*\*\*p=0.0001, \*\*\*\*p<0.0001.

### 3.1.7 Eine LGTV Infektion kann über verschiedene Infektionswege erfolgen

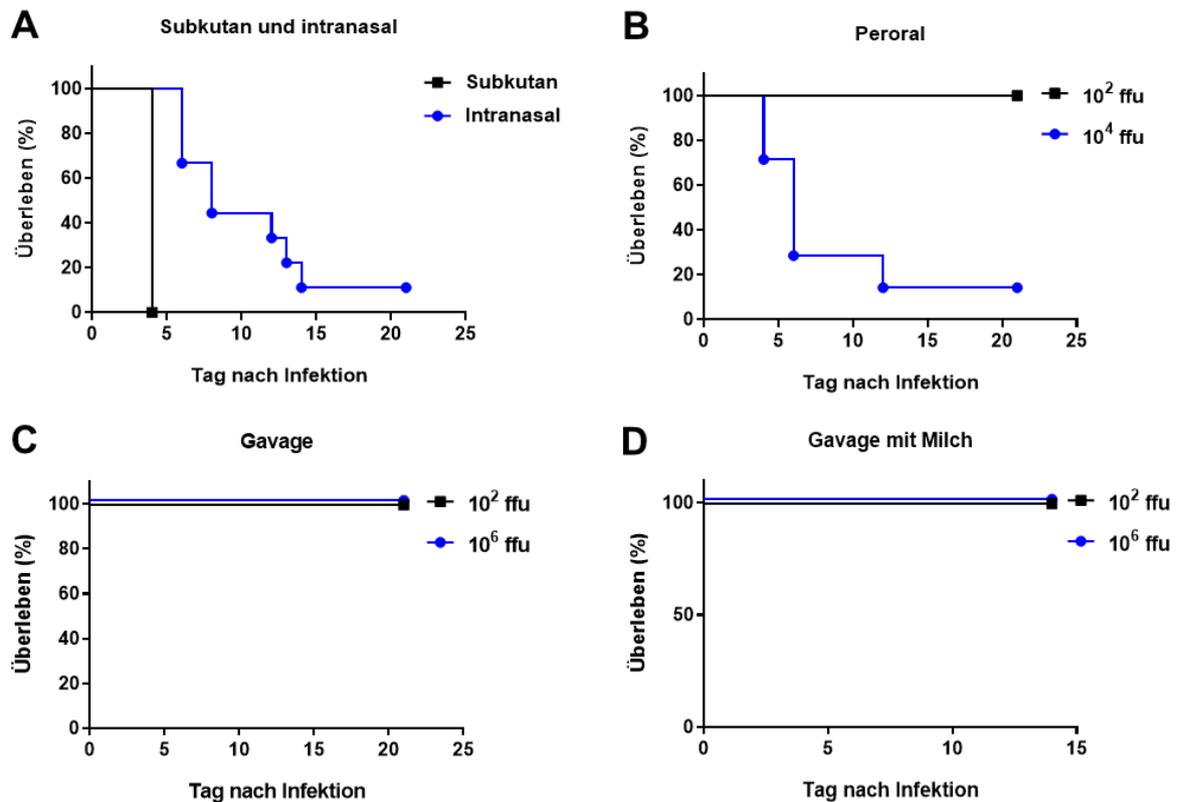
LGTV RNA wurde in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen. Dies könnte zur Übertragung von LGTV von Maus-zu-Maus über verschiedene Mechanismen führen. Um zu untersuchen, ob eine LGTV Infektion über verschiedene Infektionswege zu einer Erkrankung der Mäuse führen kann, wurden *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse subkutan, intranasal, peroral oder durch Applikation mittels Fütterungskanüle (gavage) mit unterschiedlichen LGTV Konzentrationen infiziert. Die Kinetik der subkutanen Infektion mit 10<sup>2</sup> ffu (Abb. 8A) ist vergleichbar mit einer intraperitonealen Infektion (Abb. 3C). Alle subkutan infizierten Mäuse haben die Abbruchkriterien 4 Tage nach Infektion mit denselben Krankheitssymptomen erreicht (Abb. 8A). *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse waren zudem suszeptibel gegenüber einer intranasalen Infektion mit 10<sup>2</sup> ffu. 8 von 9 Mäusen (89 %) haben die Abbruchkriterien erreicht. Die durchschnittliche Überlebensdauer war 8 Tage

nach Infektion (Abb. 8A). Die lange Infektionskinetik bei intranasaler Infektion weist darauf hin, dass keine direkte Infektion des Gehirns über olfaktorische Rezeptorneuronen stattfinden.

Während geringe Viruskonzentrationen bei subkutaner und intranasaler Infektion ausreichend waren, überlebten alle Mäuse nach einer peroralen Infektion mit  $10^2$  ffu (Abb. 8B). Erst ein hoher viraler Titer mit  $10^4$  ffu löste eine Erkrankung in den peroral infizierten Tieren aus. 6 von 7 Mäuse (86 %) erreichten die Abbruchkriterien. Im Gegensatz dazu führten in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen sehr hohe Viruskonzentrationen von bis zu  $10^6$  ffu, die direkt in den Magen (gavage) appliziert wurden, zu keiner Erkrankung der Mäuse (Abb. 8C). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Virusinfektion in dem oberen Verdauungstrakt vor dem Erreichen des Magens stattfindet.

TBEV kann auch durch den Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten infizierter Tiere übertragen werden [98]–[100]. Milch soll zur Stabilisierung des Virus im Magen-Darm-Trakt führen [184]. Um den Einfluss von Milch auf die Infektiosität von LGTV zu untersuchen wurde das Virus oral in Milch appliziert (Abb. 8D). Alle Mäuse überlebten die Infektion ohne Anzeichen einer Erkrankung.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass susceptible *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse über verschiedene Infektionswege mit LGTV infiziert werden können, auch wenn bei einigen Routen Krankheitssymptome erst durch höhere Viruskonzentrationen oder nach einer längeren Inkubationszeit eintreten.



**Abbildung 8: Der Infektionsweg beeinflusst die Entstehung einer schweren Infektion**

*Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch verschiedene Infektionsrouten mit der angegebenen LGTV Konzentration infiziert. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests. **A.** Subkutane (10<sup>2</sup> ffu, n = 11, schwarz) und intranasale Infektion (10<sup>2</sup> ffu, n = 9, blau). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied (\*\*\*\*p<0.0001) im Überleben von subkutan und intranasal infizierten Mäusen. **B.** Perorale Infektion (10<sup>2</sup> ffu, n = 3, schwarz; 10<sup>4</sup> ffu, n = 7, blau). Die Daten sind repräsentativ für ein (10<sup>2</sup> ffu) oder zwei unabhängige Experimente (10<sup>4</sup> ffu). Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied (\*p=0.0277) im Überleben. **C.** Orale Applikation mittels einer Fütterungskanüle (gavage) (10<sup>2</sup> ffu, n = 14, schwarz; 10<sup>6</sup> ffu, n = 8, blau). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. **D.** Orale Applikation mittels Fütterungskanüle (gavage) mit Milch (10<sup>2</sup> ffu, n = 9, schwarz; 10<sup>6</sup> ffu, n = 9, blau). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

### 3.1.8 Maus-zu-Maus-Übertragung von TBEV

Da LGTV sich von Maus-zu-Maus übertragen lässt, sollte überprüft werden, ob auch eine Transmission bei TBEV Infektionen in Mäusen erfolgen kann. Hierfür wurde das Cohousing-Experiment mit TBEV Torö-2003 infizierten Mäusen wiederholt. Dazu wurden *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup> oder Wildtyp C57BL/6 Mäuse mit 10<sup>4</sup> ffu Torö-2003 intraperitoneal infiziert (Abb. 9A). *Ifnar1*<sup>-/-</sup>

$^{-/-}$  Mäuse sind sehr suszeptibel für eine TBEV Infektion (Abb. 9B-C). Aufgrund eines starken Gewichtsverlusts und dem Erreichen der Abbruchkriterien erfolgte die Tötung aller Tiere an Tag 6 nach der Infektion. In den Kontakt-Mäusen wurden vergleichbare Verlaufsformen der TBEV Infektion beobachtet. Die Tiere erreichten die Abbruchkriterien 9 bis 15 Tage nach Infektion. Die immundefizienten *Rag2* $^{-/-}$  Index-Mäuse, welche eine Beeinträchtigung in der B- und T-Zell Entwicklung haben, zeigten Krankheitssymptome nach der TBEV Infektion (Fig. 9D). Mit einer mittleren Überlebensdauer von 14 Tagen verlief die Infektion deutlich langsamer als in den *Ifnar1* $^{-/-}$  Mäusen. Dennoch erfolgte eine Transmission zwischen den *Rag2* $^{-/-}$  Mäusen in 1 von 4 (25%) Kontakt-Mäusen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass wie bei LGTV Infektionen eine Übertragung von TBEV von Maus-zu-Maus in suszeptiblen Mäusen möglich ist.

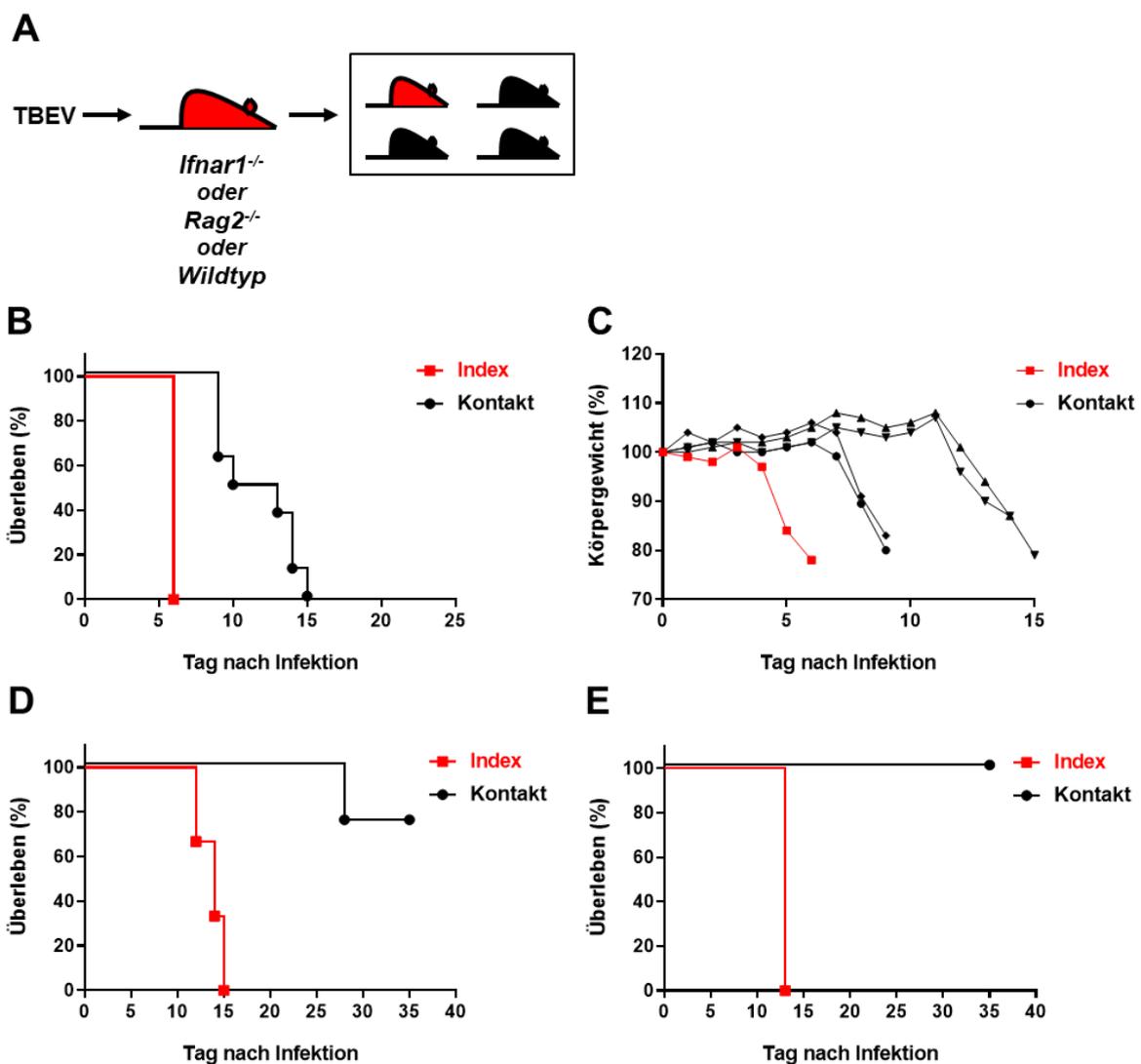


Abbildung 9: TBEV Transmission von Maus-zu-Maus

**A.** Schematische Darstellung des Experiments. **B.** *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> ffu TBEV Torö-2003 infiziert (Index = rot) und zusammen in einen Käfig mit naiven *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontakt = schwarz) gesetzt. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar (Index-Mäuse n = 2, Kontakt-Mäuse n = 8). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\*\* p=0.0027) im Überleben zwischen Index- und Kontakt-Mäuse. **C.** Analyse des Körpergewichtes von individuellen Mäusen aus Abb. 9B (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) im Verlauf von 14 Tagen. Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment (Index-Mäuse n = 1, Kontakt-Mäuse n = 4). **D.** *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> ffu TBEV Torö-2003 infiziert (Index = rot) und zusammen in einen Käfig mit naiven *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontakt = schwarz) gesetzt. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar (Index-Mäuse n = 3, Kontakt-Mäuse n = 4). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\* p=0.0101) im Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse. **E.** Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>4</sup> ffu TBEV Torö-2003 infiziert (Index = rot) und zusammen in einen Käfig mit naiven Wildtyp C57BL/6 Mäusen (Kontakt = schwarz) gesetzt. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar (Index-Mäuse n = 1, Kontakt-Mäuse n = 4). Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\*\* p=0.0455) im Überleben der Index- und Kontakt-Mäuse.

### 3.1.9 TBEV Transmission erfolgt nur in immundefizienten Mäusen

Eine TBEV Transmission erfolgte in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> und *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäusen. Folgend sollte untersucht werden, ob eine Übertragung von TBEV auch in immunologisch kompetenten Wildtyp Mäusen möglich ist. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass Wildtyp C57BL/6 Mäuse 9-10 Tage nach einer TBEV Infektion die Abbruchkriterien erreichten [117], [118], [185]. Für das Cohousing Experiment wurden Wildtyp C57BL/6 Mäuse (Index) intraperitoneal mit 10<sup>4</sup> ffu TBEV Torö-2003 infiziert und mit naiven Wildtyp Mäusen in einen Käfig zusammengesetzt. Während die Index-Maus die typischen Symptome einer TBEV Infektion zeigte und 13 Tage nach Infektion die Abbruchkriterien erreichte, überlebten Kontakt-Mäuse ohne Anzeichen einer Erkrankung (Abb. 9E). Diese Daten zeigen, dass eine TBEV Transmission nur in immundefizienten Mäusen erfolgen kann.

### 3.1.10 TBEV infiziert Mäuse über den gastrointestinalen Trakt

Zunehmend wurden Fälle einer TBEV Infektion durch den Verzehr infizierter Milchprodukte in Menschen beschrieben [99]–[101]. Um den Einfluss des oralen Infektionsweges zu untersuchen, wurde Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen in den Mund (peroral) 10<sup>4</sup> oder 10<sup>6</sup> ffu TBEV Torö-2003 appliziert. Alle Wildtyp Mäuse, infiziert mit 10<sup>4</sup> ffu TBEV, überlebten ohne Anzeichen von

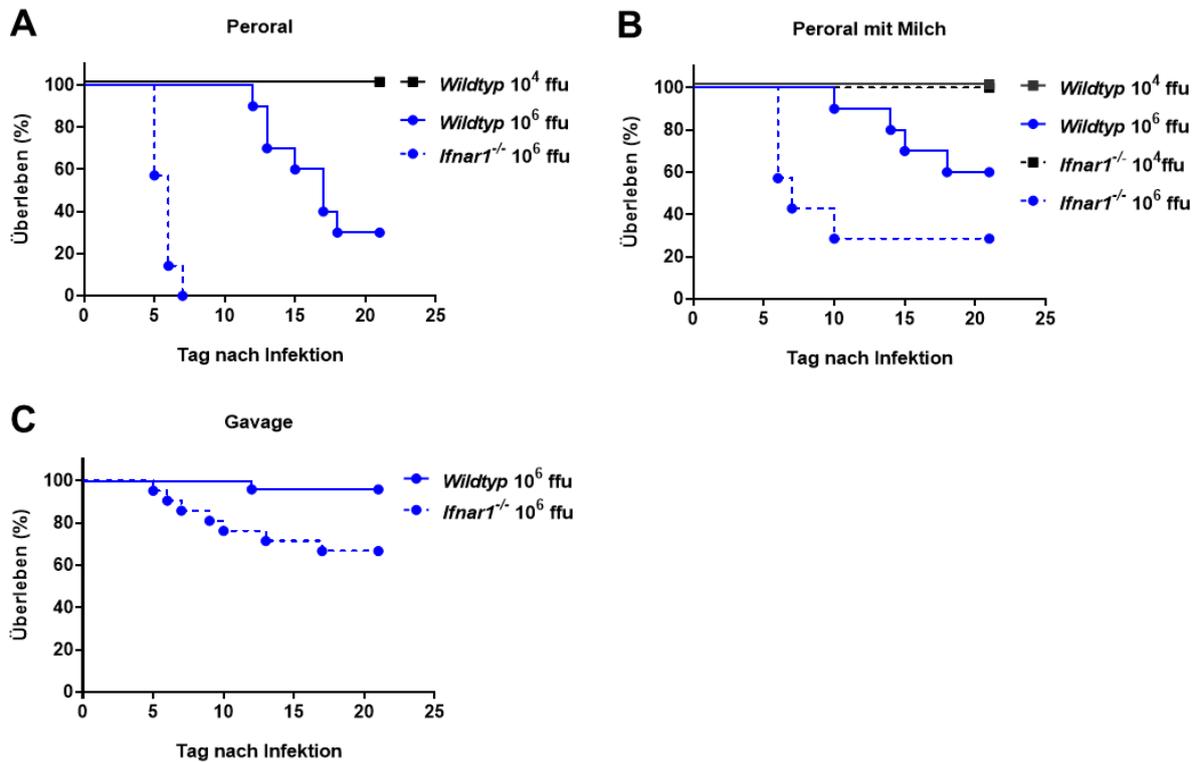
Symptomen (Abb. 10A). Hingegen zeigten mit steigender Infektionsdosis ( $10^6$  ffu) 7 von 10 (70 %) Wildtyp Mäusen Krankheitssymptome und erreichten die Abbruchkriterien durchschnittlich 17 Tage nach Infektion. Alle suszeptiblen *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse erreichten die Abbruchkriterien bereits 5-6 Tagen nach Infektion (Abb. 10A). Die Ausbildung von Symptomen in Mäusen nach einer peroralen Infektion ist somit abhängig von der applizierten Viruskonzentration.

Um den Einfluss von Milch auf die Stabilität von TBEV und die Infektiosität zu untersuchen wurde Mäusen TBEV in Milch peroral appliziert. Auch hier war das Auftreten von Krankheitssymptomen konzentrationsabhängig (Abb. 10B).

Alle Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse überlebten eine perorale Infektion von  $10^4$  ffu in Milch. Bei einer höheren Konzentration von  $10^6$  ffu erreichten 4 von 10 (40 %) Wildtyp Mäusen die Abbruchkriterien. Im Vergleich zu einer Applikation ohne Milch gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen erreichten 5 von 7 (71 %) der Tiere nach peroraler Applikation von  $10^6$  ffu in Milch die Abbruchkriterien. Im Vergleich zu einer Applikation ohne Milch erreichten weniger Tiere die Abbruchkriterien. Eine Erhöhung der Infektiosität von Milch von TBEV konnte nicht bestätigt werden.

Um abschließend zu klären, ob eine TBEV Infektion auch im Magen oder unterem gastrointestinalen Trakt erfolgen könnte, wurde Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen  $10^6$  ffu des Virus mittels Fütterungskanüle direkt in den Magen (gavage) appliziert. Nur 1 von 27 (4%) der Wildtyp Mäuse und 7 von 21 (33 %) der *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse mussten nach Erreichen der Abbruchkriterien getötet werden (Abb. 10C).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine Infektion von TBEV vor allem im oberen Mund-Nasenraum erfolgt. Eine stabilisierende Wirkung des Virus in Milch konnte nicht gezeigt werden und spielt wahrscheinlich für die Infektion keine Rolle.



**Abbildung 10: Der Infektionsweg beeinflusst die Entwicklung einer schweren TBEV Infektion**

Wildtyp C57BL/6 und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch verschiedene Infektionsrouten mit der angegebenen TBEV Torö-2003 Konzentration infiziert. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar. Statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests. **A.** Perorale Infektion von Wildtyp (10<sup>4</sup> ffu, n = 5, schwarz; 10<sup>6</sup> ffu, n = 10, blau) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (10<sup>6</sup> ffu, n = 7, blau gestrichelte Linie). Die Daten sind repräsentativ für ein (Wildtyp 10<sup>4</sup> ffu) oder zwei (Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> 10<sup>6</sup> ffu) unabhängige Experimente. Die statistische Auswertung ergab folgende signifikanten Unterschiede: \*p=0.0199 (Wildtyp 10<sup>4</sup> ffu – Wildtyp 10<sup>6</sup> ffu), \*\*\*\*p<0.0001 (10<sup>6</sup> ffu: Wildtyp - *Ifnar1*<sup>-/-</sup>). **B.** Perorale Infektion mit Milch von Wildtyp (10<sup>4</sup> ffu, n = 9, schwarz; 10<sup>6</sup> ffu, n = 10, blau) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (10<sup>4</sup> ffu, n = 5, schwarze gestrichelte Linie; 10<sup>6</sup> ffu, n = 7, blau gestrichelte Linie). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Auswertung ergab folgende Signifikanzen: \*p=0.0383 (Wildtyp 10<sup>4</sup> ffu – Wildtyp 10<sup>6</sup> ffu), \*p=0.0192 (*Ifnar1*<sup>-/-</sup> 10<sup>4</sup> ffu – *Ifnar1*<sup>-/-</sup> 10<sup>6</sup> ffu), ns p>0.9999 (10<sup>4</sup> ffu: Wildtyp – *Ifnar1*<sup>-/-</sup>) und nicht signifikant (ns) p=0.0600 (10<sup>6</sup> ffu: Wildtyp – *Ifnar1*<sup>-/-</sup>). **C.** Orale Applikation mittels Fütterungskanüle (gavage) in Wildtyp (10<sup>6</sup> ffu, n = 27, blau) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (10<sup>6</sup> ffu, n = 21, blaue gestrichelte Linie). Die Daten sind repräsentativ für sechs unabhängige Experimente. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied (\*\*p=0.0057) im Überleben der Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse.

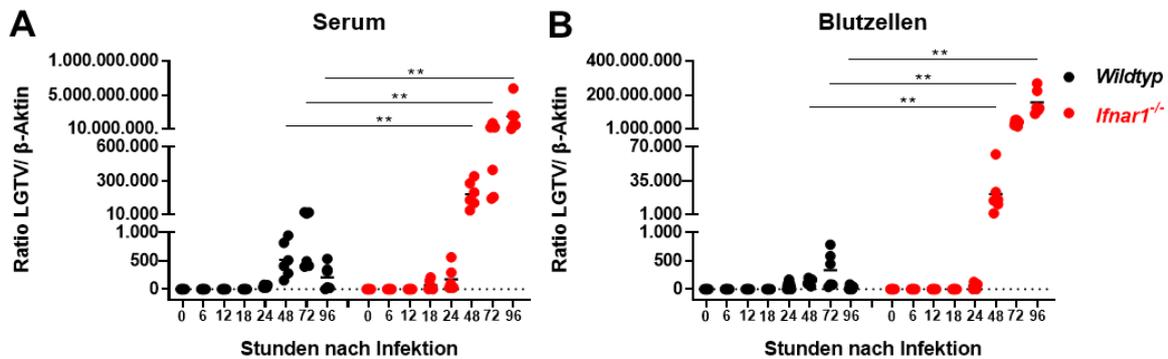
### **3.2 Vergleich der Virusverteilung von LGTV in immunkompetenten und immundefizienten Mäusen**

Eine Transmission von LGTV erfolgt nur in immunkompetenten Mäusen. *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind sehr anfällig für eine LGTV Infektion, während immunkompetente Wildtyp Mäuse ohne Symptome eine Infektion mit LGTV überleben. Es ist nicht bekannt, wie die Ausbreitung von LGTV im Körper erfolgt und wie das Virus in das Gehirn gelangt. Möglich ist, dass das Virus in Wildtyp Mäusen bereits in der Peripherie durch das intakte Immunsystem bekämpft wird und das Gehirn nicht erreicht. Zudem könnte das Typ I IFN System einen Einfluss auf die Neuroinvasion von LGTV haben. Für WNV konnte bereits gezeigt werden, dass der Typ I IFN Signalweg in Astrozyten die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke reguliert und dadurch das Gehirn von Mäusen vor einer WNV Infektion schützen kann [186]. Die Expression von IFNAR in neuroektodermalen Zellen kann die Entstehung einer Enzephalitis nach LGTV Infektion verhindern [117]. Um einen möglichen Einfluss von IFNAR auf die Virusverbreitung von LGTV zu untersuchen, soll folgend die virale RNA von LGTV in verschiedenen Organen über den zeitlichen Verlauf der Infektion in Wildtyp C57BL/6 und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen erforscht werden.

#### **3.2.1 Intakter IFNAR1 verhindert LGTV bedingte Virämie**

Zu Beginn soll analysiert werden, ab wann eine LGTV Infektion eine Virämie verursacht und ob es Unterschiede zwischen immunkompetenten und immundefizienten Mäusen gibt. Wildtyp C57BL/6 und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden subkutan mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert. An verschiedenen Zeitpunkten wurde das Blut der Mäuse isoliert, in Serum und Blutzellen aufgeteilt und anschließend die virale RNA durch qRT-PCR gemessen. In den Wildtyp Mäusen konnten ab 24 Stunden nach Infektion geringe Mengen viraler RNA im Serum gemessen werden (Abb. 11A). Die Werte stiegen bis 72 Stunden nach Infektion leicht an, sanken aber bereits nach 96 Stunden wieder ab. In den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen war bereits 18 Stunden nach Infektion virale RNA nachweisbar. Im weiteren Zeitverlauf stieg die Konzentration der viralen RNA stetig stark an und war im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen signifikant höher. In den Blutzellen der Wildtyp Mäuse wurde ebenfalls virale RNA ab 24 Stunden nach Infektion gemessen, mit einem geringen Anstieg bis 72 Stunden nach Infektion (Abb. 11B). In den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen war nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied in der Konzentration viraler RNA in den Blutzellen nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein intaktes Immunsystem die Konzentration viraler RNA im Blut bereits 96 Stunden nach Infektion abklingen lassen kann. Weiterhin kann durch die frühzeitige Virämie nach 18 Stunden in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen bzw. 24 Stunden nach Infektion in den Wildtyp Mäusen das Virus im Körper verbreitet werden.



**Abbildung 11: Der Verlust von IFNAR1 führt zu einer Virämie während einer LGTV Infektion**

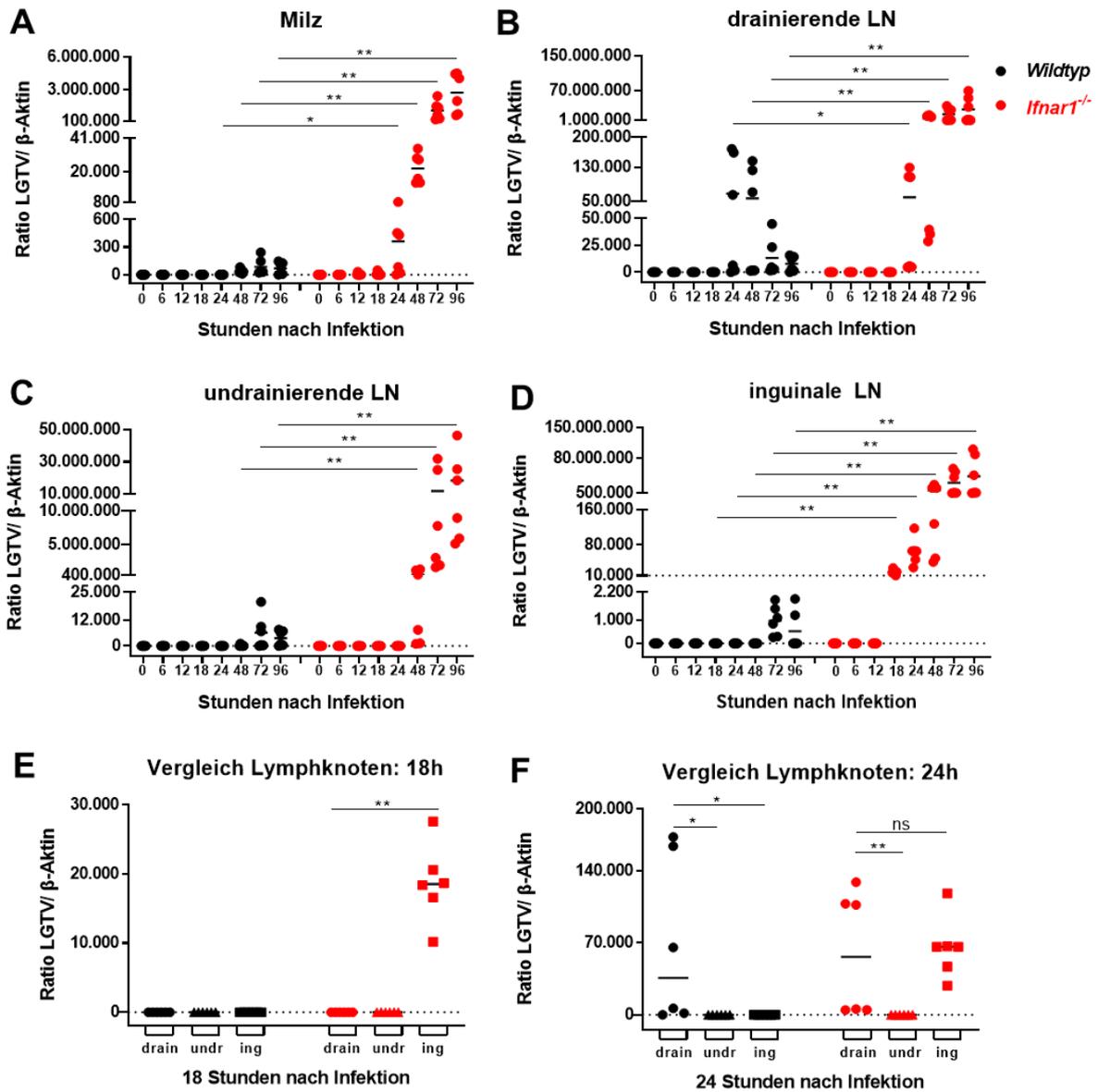
Wildtyp C57BL/6 (schwarz) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse (rot) wurden subkutan am rechten Hinterbein mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert und die virale RNA an verschiedenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR in **A**. Serum und **B**. Blutzellen analysiert. Der Zeitpunkt 0h gibt die Werte der nicht infizierten Kontrollen an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (n = 6). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test, \*\*p=0.0022.

### 3.2.2 LGTV breitet sich in der Peripherie systemisch aus

Um die Virusausbreitung in den peripheren Organen zu bestimmen wurde die Milz, der drainierende popliteale und der undrainierende popliteale Lymphknoten sowie der inguinale Lymphknoten an verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion isoliert und mittels qRT-PCR auf LGTV RNA untersucht. Wildtyp C57BL/6 und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden subkutan mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert. In der Milz von Wildtyp Mäusen konnten nur sehr geringe Mengen viraler RNA 24, 48 und 96 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden (Abb. 12A). In den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen war die Konzentration viraler RNA in der Milz bereits ab 24 Stunden nach Infektion signifikant höher als in den Wildtyp Mäusen und stieg im weiteren zeitlichen Verlauf an. Ähnliches konnte im drainierenden Lymphknoten analysiert werden (Abb. 12B). Auch hier war die virale RNA von LGTV in Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen frühestens ab 24 Stunden nach Infektion detektierbar. In den Wildtyp Mäusen stagnierte die LGTV Infektion bereits ab 72 Stunden nach Infektion, während sie in den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen erst 96 Stunden nach Infektion ihren Höchstwert erreichte. In den Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde erst 48 Stunden nach Infektion virale

RNA in den undrainierenden Lymphknoten gemessen (Abb. 12C). In den Wildtyp Mäusen blieb die Konzentration viraler RNA gering, während sie in den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant anstieg. In den inguinalen Lymphknoten wurde in den Wildtyp Mäusen erst 72 Stunden nach Infektion LGTV RNA gemessen, die bereits 96 Stunden nach Infektion abklang (Abb. 12D). Im Gegensatz dazu wurde in den inguinalen Lymphknoten der *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse bereits 18 Stunden nach Infektion virale RNA gemessen, ein früherer Zeitpunkt als in dem drainierenden poplitealem Lymphknoten. Diese Unterschiede in den Lymphknoten 18 und 24 Stunden nach Infektion sind gesondert in Abbildung 12 E+F gegenübergestellt.

Diese Ergebnisse veranschaulichen eine systemische LGTV Infektion in peripheren Organen von Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen innerhalb der ersten 24 Stunden, wobei ein intaktes Typ I IFN System die LGTV Infektion nach 96 Stunden abklingen lässt.



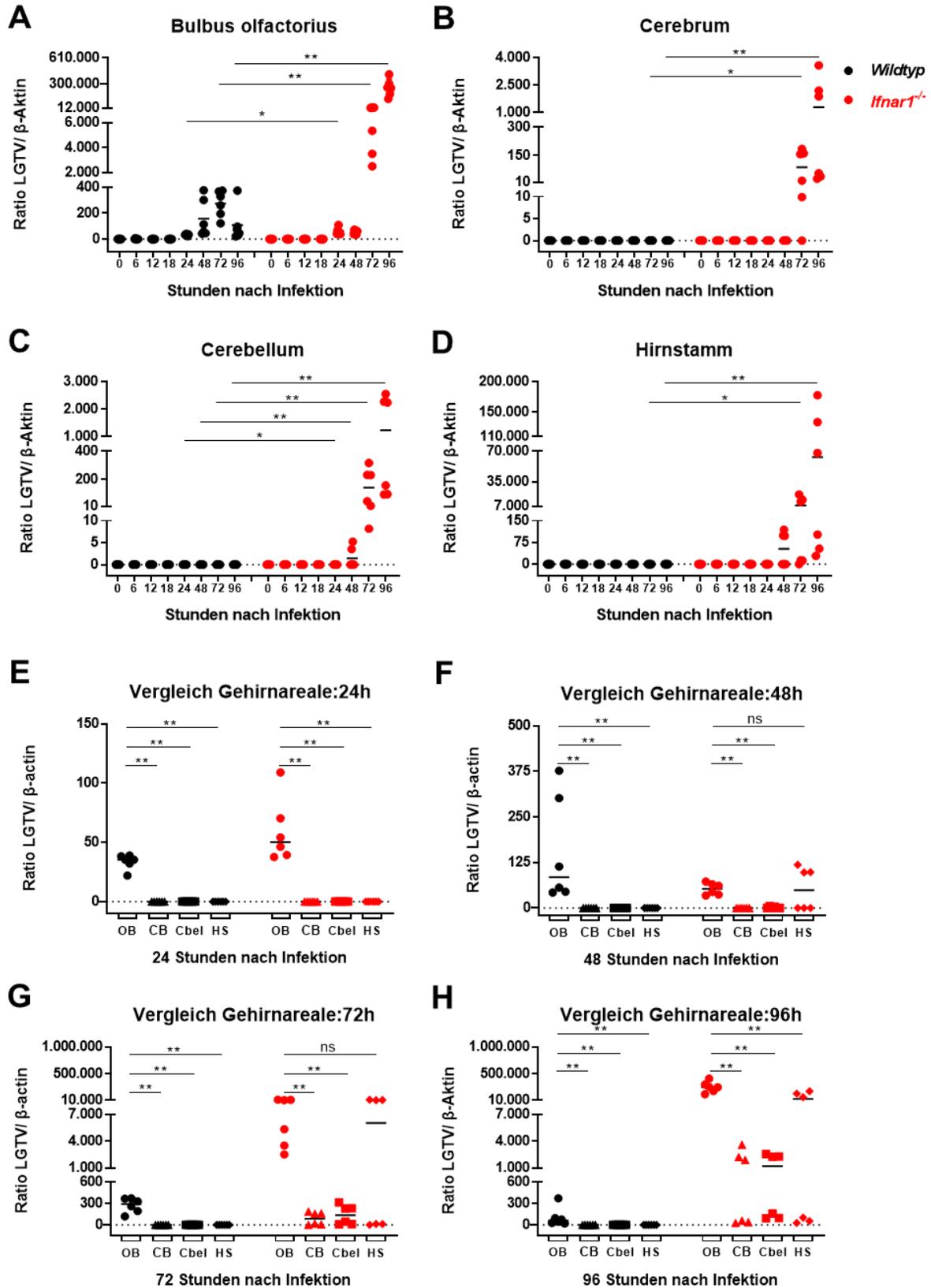
**Abbildung 12: Systemische LGTV Infektion in der Peripherie**

Wildtyp C57BL/6 (schwarz) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse (rot) wurden subkutan am rechten Hinterbein mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert und die virale RNA an verschiedenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR in **A**. Milz, **B**. drainierende popliteale Lymphknoten (LN), **C**. undrainierende popliteale und **D**. inguinale Lymphknoten analysiert. Der Zeitpunkt 0h gibt die Werte der nicht infizierten Kontrollen an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente ( $n = 6$ ). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. Milz: \* $p=0.0152$ , \*\* $p=0.0022$ ; drainierende LN: \*\* $p=0.0022$ ; undrainierende LN: 48h: \*\* $p=0.0043$ , 72h+96h: \*\* $p=0.0022$ ; inguinale LN: \*\* $p=0.0022$ . Direkter Vergleich der Messergebnisse aus Abbildung C-D in den drainierenden, undrainierenden und inguinalen Lymphknoten **E**. 18 und **F**. 24 Stunden nach Infektion. Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. ns=nicht signifikant, \* $p=0.0152$ , \*\* $p=0.0022$ .

### 3.2.3 Bulbus olfactorius bevorzugt von LGTV infiziert

Frühere Studien über LGTV zeigen, dass das Virus bereits 2 Tage nach Infektion im Gehirn nachweisbar ist. Um herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt LGTV in welcher Gehirnregion nachweisbar ist, wurden die Gehirnareale Bulbus olfactorius, Cerebrum (Großhirn), Cerebellum (Kleinhirn) und der Hirnstamm nach subkutaner Infektion mit  $10^2$  ffu LGTV an verschiedenen Zeitpunkten aus Wildtyp C57BL/6 und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse isoliert und virale RNA mittels qRT-PCR untersucht. LGTV RNA war sowohl in den Wildtyp als auch in den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen frühestens 24 Stunden nach Infektion im Bulbus olfactorius detektierbar (Abb. 13A). Während in den Wildtyp Mäusen die Konzentration bis 72 Stunden nach Infektion leicht anstieg und dann wieder absank, stieg die Konzentration viraler RNA in den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen stetig an und war stets signifikant höher verglichen mit den Wildtyp Mäusen. In den Wildtyp Mäusen konnte in keiner weiteren Gehirnregion virale RNA gemessen werden (Abb. 13B-D). In den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse dagegen konnte im Cerebrum 72 Stunden (Abb. 13B), im Cerebellum (Abb. 13C) und Hirnstamm (Abb. 13D) 48 Stunden nach Infektion LGTV RNA nachgewiesen werden. Wie schon im Bulbus olfactorius stieg die Konzentration viraler RNA stetig an. Die Unterschiede der einzelnen Gehirnareale 24 bis 96 Stunden nach Infektion sind für Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse in Abbildung 13E-H gesondert dargestellt.

Die Daten zeigen, dass der Bulbus olfactorius die erste Gehirnregion ist, die von LGTV infiziert wird. Während in den Wildtyp Mäusen eine Verbreitung von LGTV in andere Gehirnregionen verhindert werden kann, begünstigt das Fehlen des IFNAR1-Rezeptors eine Ausbreitung von LGTV im Gehirn.



**Abbildung 13: IFNAR1 unterdrückt die LGTV Infektion im ZNS**

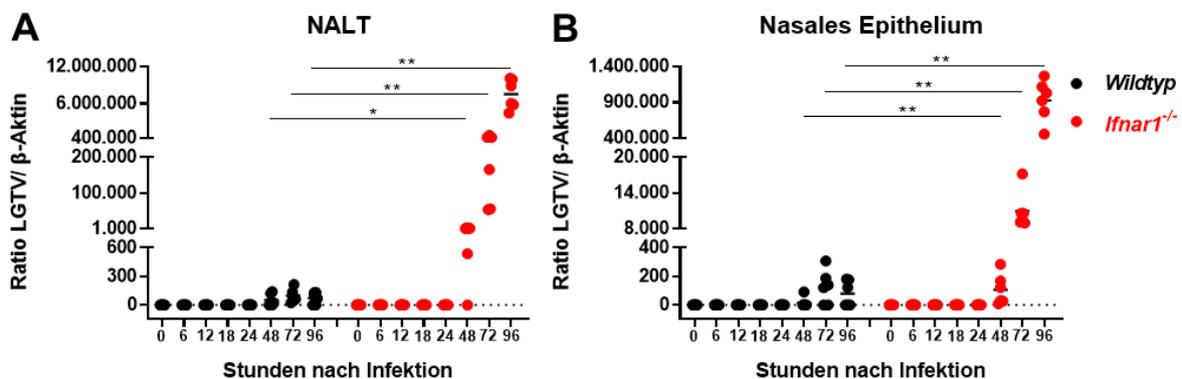
Wildtyp C57BL/6 (schwarz) und *Ifnar1<sup>-/-</sup>* Mäuse (rot) wurden subkutan am rechten Hinterbein mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert und die virale RNA an verschiedenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR in **A**. Bulbus olfactorius (OB), **B**. Cerebrum (CB = Großhirn), **C**. Cerebellum (Cbel = Kleinhirn) und **D**. Hirnstamm (HS) analysiert. Der Zeitpunkt 0h gibt

die Werte der nicht infizierten Kontrollen an. Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (n = 6). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. OB: 24h: \*\*p=0.0152, 72h+96h: \*\*p=0.0022; CB: \*p=0.0152, \*\*p=0.0022; Cbel: \*\*p=0.0022; HS: \*p=0.0152, \*\*p=0.0022. Direkter Vergleich der Messergebnisse aus Abbildung A-D in den verschiedenen Gehirnarealen E. 24, F. 48, G. 72 und H. 96 Stunden nach Infektion. Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. Alle \*\*p=0.0022 außer: 96h OB-HS \*\*p=0.0087, ns=nicht signifikant.

### 3.2.4 Die Rolle der olfaktorischen Route bei der Neuroinvasion

LGTV wurde sowohl in Wildtyp als auch in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Gehirn nachgewiesen. Der Mechanismus der Neuroinvasion ist bisher unbekannt. Da LGTV im Verlauf der Infektion als erstes im Bulbus olfactorius nachgewiesen wurde, könnte LGTV über die olfaktorischen Rezeptorneuronen in das Gehirn einwandern. In den Transmissionsstudien wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass virale RNA sowohl im Nasen- als auch im Mundabstrich von *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen vorhanden ist. Zur Überprüfung, ob LGTV über die olfaktorische Route eindringt, wurde das nasale Epithelium und das nasal assoziierte Lymphgewebe (NALT) in Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Verlauf der Infektion auf LGTV RNA mittels qRT-PCR untersucht. Sowohl im NALT (Abb. 14A) als auch im nasalen Epithelium (Abb. 14B) konnte virale RNA in den Wildtyp und den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen erst 48 Stunden nach Infektion gemessen werden. Im Bulbus olfactorius war bereits nach 24 Stunden LGTV RNA nachweisbar.

Anhand dieser Ergebnisse ist die Neuroinvasion von LGTV über die olfaktorischen Nerven unwahrscheinlich.



**Abbildung 14: Olfaktorische Route ist für LGTV ist nicht Eintrittsweg ins ZNS**

Wildtyp C57BL/6 (schwarz) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse (rot) wurden subkutan am rechten Hinterbein mit 10<sup>2</sup> ffu LGTV infiziert und die virale RNA an verschiedenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR im A. nasal assoziierten lymphoiden

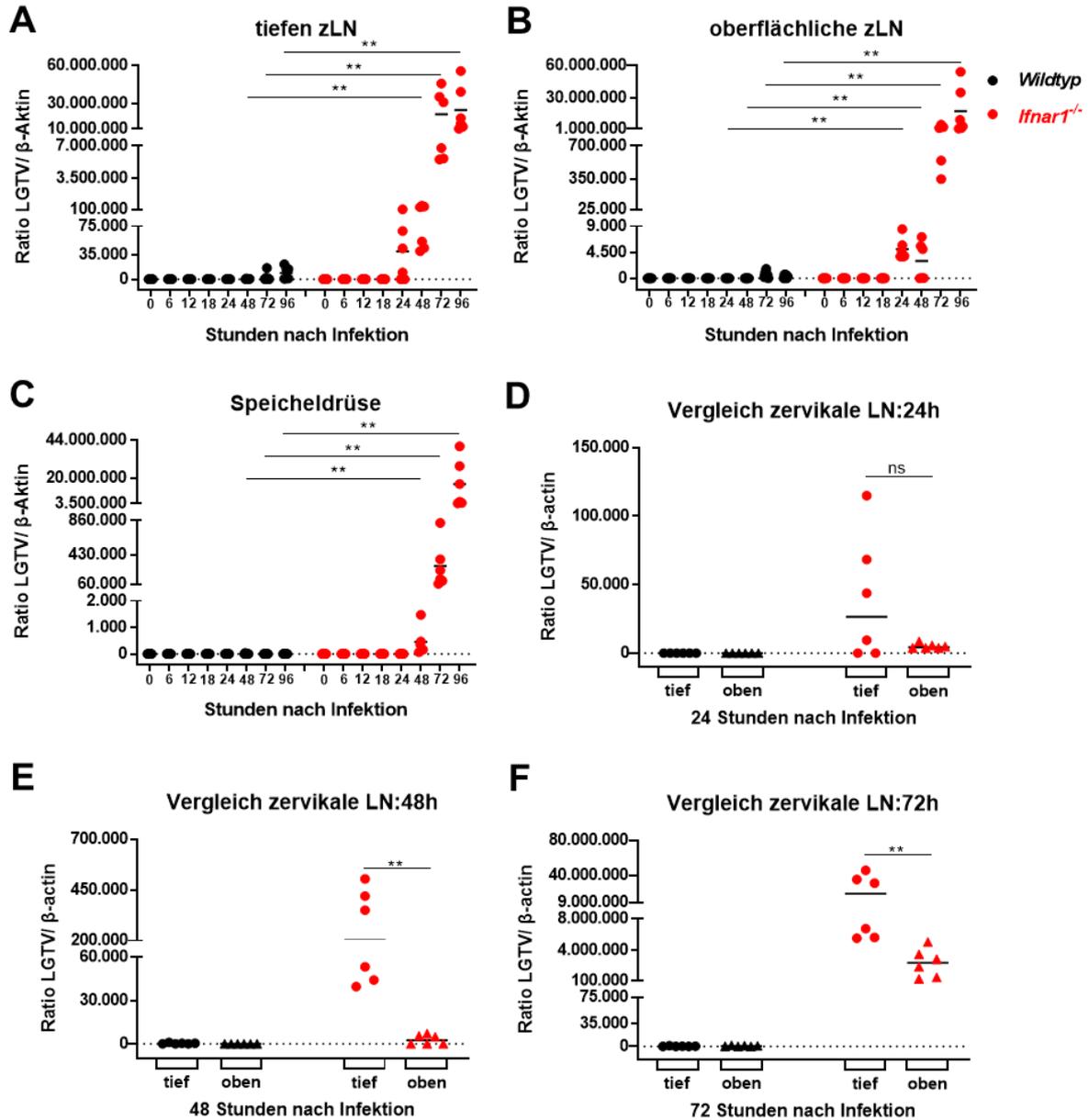
Gewebe (NALT) und **B.** nasalem Epithelium (NE) analysiert. Der Zeitpunkt 0h gibt die Werte der nicht infizierten Kontrollen an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (n = 6). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. NALT: \*p=0.0411, \*\*p=0.0022; NE: 48h: \*\*p=0.0087, 72+96h: \*\*p=0.0022.

### 3.2.5 LGTV Infektion der tiefen zervikalen Lymphknoten in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Neuroinvasion von LGTV könnte über die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Liquor-Schranke erfolgen. Da *Weber et al.* bereits nachweisen konnten, dass LGTV vor der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bereits im Gehirn nachweisbar ist [117], wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit der Neuroinvasion über den Plexus choroideus genauer betrachtet. LGTV könnte über den Plexus choroideus eindringen und über den Liquor das Gehirn infizieren. Der Liquor steht mit der Gewebsflüssigkeit des Gehirns in Verbindung und umfließt das gesamte Gehirn im Subarachnoidalraum. Es steht damit direkt mit den Meningen, dem Kleinhirn und dem Bulbus olfactorius in Kontakt und kann diese infizieren. Der Liquor wird über die tiefen zervikalen Lymphknoten abgeleitet. Erfolgt die Verteilung des Virus über den Liquor, sollten Zellen der tiefen zervikalen Lymphknoten infiziert werden. Wird LGTV über den Liquor und nicht über das periphere lymphatische System in die Lymphknoten verbreitet, sollten die oberflächlichen zervikalen Lymphknoten und die Speicheldrüse zu einem späteren Zeitpunkt als die tiefen zervikalen Lymphknoten infiziert werden. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden die tiefen zervikalen, die oberflächlichen zervikalen Lymphknoten und die Speicheldrüse von LGTV infizierten Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und die LGTV RNA mittels qRT-PCR im Verlauf der Infektion analysiert. In den Wildtyp Mäusen konnten in den tiefen zervikalen Lymphknoten nur geringe Mengen viraler RNA 72 und 96 Stunden nach Infektion gemessen werden (Abb. 15A). Empfindliche *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen bereits 24 Stunden nach Infektion eine signifikante Menge viraler RNA auf, die im weiteren Zeitverlauf anstieg. Ähnliche Werte wurden für die oberflächlichen zervikalen Lymphknoten in Wildtyp und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen ermittelt (Abb. 15B). In der Speicheldrüse von Wildtyp Mäusen konnte keine virale RNA gemessen werden, wohingegen in den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen 48 Stunden nach Infektion virale RNA nachweisbar war (Abb. 15C). Der detaillierte Vergleich der viralen RNA Menge von tiefen und oberflächlichen zervikalen Lymphknoten zeigt, dass die Menge der viralen RNA in den tiefen zervikalen Lymphknoten bereits nach 24h möglich war, eine signifikant höhere Menge an viraler RNA war nach 48h

messbar (Abb. 15E-F). Die tiefen zervikalen Lymphknoten der Wildtyp Mäuse weisen sehr geringe Konzentrationen viraler RNA auf, die im Vergleich zu den oberflächlichen Lymphknoten nicht signifikant verändert war.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen die tiefen zervikalen Lymphknoten früher als die oberflächlichen Lymphknoten infiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Verteilung des Virus im Gehirn über den Liquor erfolgt und somit der Eintritt über den Plexus choroideus erfolgen könnte. In den Wildtyp Mäusen konnte kein Unterschied zwischen den tiefen und oberflächlichen zervikalen Lymphknoten ermittelt werden. Es kann in dieser Arbeit nicht eindeutig bewiesen werden, dass LGTV in Wildtyp Mäusen auch über den Liquor verbreitet wird, da die Menge an viraler RNA von LGTV in den Wildtyp Mäusen unter der Nachweisgrenze liegen könnte. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste den Liquor auf virale RNA überprüft werden.



**Abbildung 15: LGTV Infektion der tiefen zervikalen Lymphknoten**

Wildtyp C57BL/6 (schwarz) und *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse (rot) wurden subkutan am rechten Hinterbein mit  $10^2$  ffu LGTV infiziert und die virale RNA an verschiedenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR in den **A.** tiefen zervikalen Lymphknoten (tief), **B.** den oberflächlichen zervikalen Lymphknoten und **C.** der Speicheldrüse analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (n = 6). Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test, \*\*p=0.0022. Direkter Vergleich der Messergebnisse aus Abbildung A und B in den verschiedenen zervikalen Lymphknoten **D.** 24, **E.** 48 und **F.** 72 Stunden nach Infektion. Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. \*\*p=0.0022.

### 3.3 Vergleich der Pathogenität der TBEV Stämme Torö-2003 und MucArHB171/11

Die Pathogenität europäischer TBEV Stämme könnte in Menschen unterschiedlich sein. In den Jahren 2005-2011 wurden in einem Gebiet in Süddeutschland Patienten identifiziert, die milde gastrointestinale und konstitutionelle Symptome ohne neurologische Manifestationen zeigten. Die Patienten berichteten von zurückliegenden Zeckenstichen und es wurden TBEV Antikörper nachgewiesen. Die retrospektive Analyse der Infektion führte zur Identifizierung eines natürlichen Fokus im Südosten Deutschlands [187]. Hier wurde ein TBEV Stamm aus sechs erwachsenen *Ixodes ricinus* Zecken isoliert [187]. Im Vergleich zu klassischen neurovirulenten TBEV Stämmen zeigt der Stamm MucArHB171/11 (HB171/11) bei Patienten nur eine geringe Pathogenese.

Zur Charakterisierung des HB171/11-Stammes wurde die Pathogenese von HB171/11 mit dem europäischen Stamm Torö-2003 verglichen. Der Torö-2003-Stamm wurde aus RNA erzeugt, die 2003 aus einem Pool von *I. ricinus* Zecken extrahiert wurde, die auf der Insel Torö im schwedischen Stockholm-Archipel gesammelt wurden [188]. Aus dieser RNA wurde ein cDNA-infektiöser Klon erzeugt, der als Torö-2003 bezeichnet wurde [185]. Vier Patienten, die auf der Insel Torö mit TBEV infiziert wurden, entwickelten leichte neurologische Symptome. Experimente an Mäusen haben bereits gezeigt, dass Torö-2003 eine vergleichbar hohe Virulenz aufweist wie der des TBEV Stamms Hypr [185].

Die Sequenzanalyse ergab 35 Aminosäureunterschiede im Polyprotein von HB171/11 und Torö-2003 (Abb. 16) (Genomsequenz aus NCBI Datenbank: DQ401140.3 (Torö-2003), KX268728.1 (HB171/11)). Die meisten Unterschiede liegen in der Sequenz des nicht strukturellen Proteins NS5, das als Methyltransferase und RNA-abhängige RNA-Polymerase für die Virusreplikation essentiell ist. Diese Veränderungen in der Sequenz von HB171/11 und Torö-2003 scheinen den Infektionsverlauf zu beeinflussen.

<b>Kernprotein C</b>	Position nt Austausch	371	457										
	MucAr-HB171/11	K	T										
	Torö-2003	R	A										
<b>preM Protein</b>	Position nt Austausch	890											
	MucAr-HB171/11	I											
	Torö-2003	T											
<b>Glykoprotein E</b>	Position nt Austausch	2260											
	MucAr-HB171/11	M											
	Torö-2003	L											
<b>nicht-strukturelles Protein NS1</b>	Position nt Austausch	2581/83	2798	3074	3271	3318/20							
	MucAr-HB171/11	T	K	K	Y	T							
	Torö-2003	A	R	M	H	V							
<b>nicht-strukturelles Protein NS2A</b>	Position nt Austausch	3613	3637	3842	3880	3884	3972	4085					
	MucAr-HB171/11	A	I	I	G	A	V	K					
	Torö-2003	T	V	T	S	V	A	R					
<b>nicht-strukturelles Protein NS2B</b>	Position nt Austausch	4574											
	MucAr-HB171/11	M											
	Torö-2003	T											
<b>nicht-strukturelles Protein NS3</b>	Position nt Austausch	4709	6173										
	MucAr-HB171/11	N	F										
	Torö-2003	S	Y										
<b>nicht-strukturelles Protein NS4B</b>	Position nt Austausch	6964/65	7264	7480	7491	7538	7588						
	MucAr-HB171/11	S	L	V	M	R	S						
	Torö-2003	A	F	M	I	K	G						
<b>nicht-strukturelles Protein NS5</b>	Position nt Austausch	7762	8092	8501/02	8555	8837	8879	8929	8967	10290	10307		
	MucAr-HB171/11	L	V	Q	E	K	K	S	H	I	K		
	Torö-2003	M	I	R	A	R	R	G	Q	M	R		

**Abbildung 16: Aminosäureunterschiede im Genom von HB171/11 und Torö-2003**

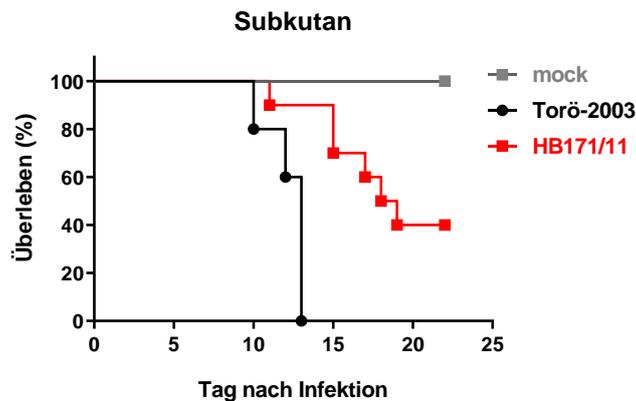
Diese Darstellung zeigt die Unterschiede zwischen HB171/11 und Torö-2003 in ihrer Aminosäuresequenz im Polyprotein.

Die folgenden Daten und Abbildungen (Abb. 17-22) wurden bereits im Journal *Emerging Infectious Diseases* publiziert [189]. S. Schreier, C. Kurhade und YP Lee sind gleichberechtigte Erst-Autoren.

### 3.3.1 HB171 / 11 ist weniger pathogen als Torö-2003

Um Unterschiede in der Pathogenität zwischen HB171/11 und Torö-2003 zu bestimmen, wurde die Mortalitätsrate bei Wildtyp C57BL/6 Mäusen untersucht. Wildtyp Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 oder mit HB171/11 infiziert. Der Gesundheitszustand und das Gewicht der Mäuse wurden täglich beurteilt. Die mit Torö-2003 infizierten Mäuse begannen zwei Tage vor Erreichen der Abbruchkriterien an Gewicht zu verlieren und wurden 10 bis 13 Tage nach der Infektion getötet (Abb. 17). Die durchschnittliche Überlebensrate betrug 12 Tage. Von den HB171/11 infizierten Tieren zeigten dagegen nur 6 von 10 (60 %) Mäusen Symptome aufgrund der Infektion. Die erkrankten HB171/11 infizierten Mäuse zeigten den gleichen Krankheitsverlauf wie die mit Torö-2003 infizierten Tiere. Das mediane Überleben von

HB171/11 infizierten Tieren betrug 18,5 Tage. Die Überlebenden Mäuse zeigten keine Symptome. Diese Daten zeigen, dass HB171/11 weniger pathogen ist als Torö-2003.

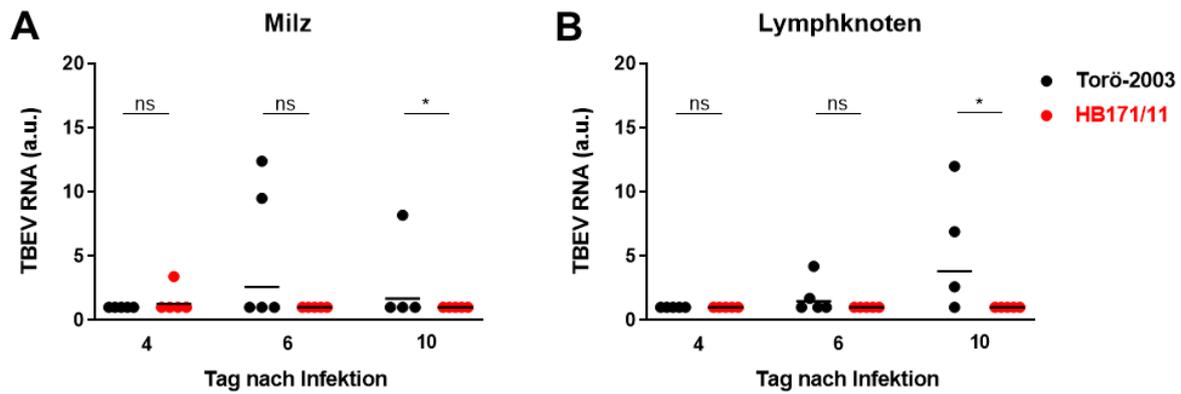


**Abbildung 17: Analyse des Überlebens von Torö-2003 und HB171/11 infizierten C57BL/6 Mäusen.**

6-10 Wochen alte weibliche Wildtyp C57BL/6 Mäuse (mock: n = 4, Torö-2003: n = 10, HB171/11: n = 10) wurden mit PBS mock-infiziert (grau) oder subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 (schwarz) oder HB171/11 infiziert. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied \*\*\*\* $p < 0.0001$  zwischen dem Überleben von Torö-2003 und HB171/11.

### 3.3.2 Höhere Viruslast in peripheren Organen Torö-2003 infizierter Mäuse

Die Letalität aufgrund einer Virusinfektion ist häufig mit einer erhöhten Virämie, Viruslast und Virusausbreitung verbunden. Um die Viruslast zwischen Torö-2003 und HB171/11 in Mäusen bestimmen zu können, wurden Wildtyp C57BL/6 Mäuse subkutan mit Torö-2003 oder HB171/11 infiziert und die Viruslast in der Milz und den inguinalen Lymphknoten durch qRT-PCR quantifiziert. Hierfür wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten an den Tagen 4, 6 und 10 nach Infektion isoliert. In den Torö-2003 infizierten Mäusen konnte virale RNA ab Tag 6 nach der Infektion in der Milz (Abb. 18A) und 10 Tage nach der Infektion in den inguinalen Lymphknoten (Abb. 18B) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, konnte zu keinem Zeitpunkt der Analyse in HB171/11 infizierten Mäusen in beiden Organen virale RNA detektiert werden. Diese Daten zeigen, dass die Infektion mit Torö-2003 zu einer hohen Viruslast und einer Ausbreitung in peripheren Organen führt, während die HB171/11 Infektion in peripheren Organen nicht nachweisbar ist.

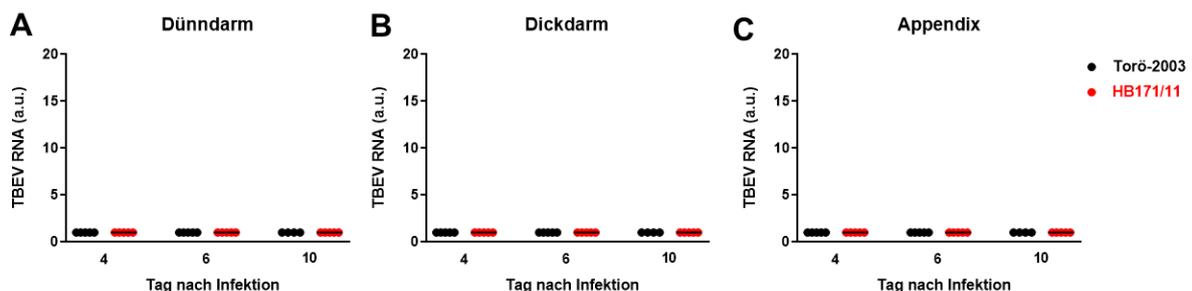


**Abbildung 18:** TBEV Belastung in Milz und Lymphknoten in Torö-2003 und HB171/11 infizierten Wildtyp C57BL/6 Mäusen.

6–10 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 (n = 4-5, schwarz) oder HB171/11 (n = 5, rot) infiziert. **A.** Milz- und **B.** inguinale Lymphknoten wurden 4, 6 und 10 Tage nach Infektion isoliert. Die virale RNA wurde durch qRT-PCR nachgewiesen, die auf (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) GAPDH normalisiert worden ist. Die Ergebnisse sind repräsentativ für ein Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. ns = nicht signifikant, \*p = 0.0476.

### 3.3.3 HB171/11 infiziert nicht den gastrointestinalen Trakt in Mäusen

Patienten, die im Bereich der HB171/11 Isolierung mit TBEV infiziert waren, entwickelten atypische Symptome wie milde gastrointestinale und konstitutionelle Symptome (zusammengefasst in [187]). Um zu untersuchen, ob HB171/11 bevorzugt gastrointestinale Organe infiziert, wurde die virale RNA im Darm durch qRT-PCR bestimmt. Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 oder HB171/11 infiziert. Dünndarm (Abb. 19A), Dickdarm (Abb. 19B) und Appendix (Abb. 19C) wurden an den Tagen 4, 6 und 10 nach der Infektion isoliert. Virale RNA konnte weder in Torö-2003 noch in HB171/11 infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass eine HB171/11 Infektion nicht zu einer Virusreplikation im Darm führt.



**Abbildung 19:** TBEV Belastung in Teilen des Darms in Torö-2003 und HB171/11 infizierten Wildtyp Mäusen.

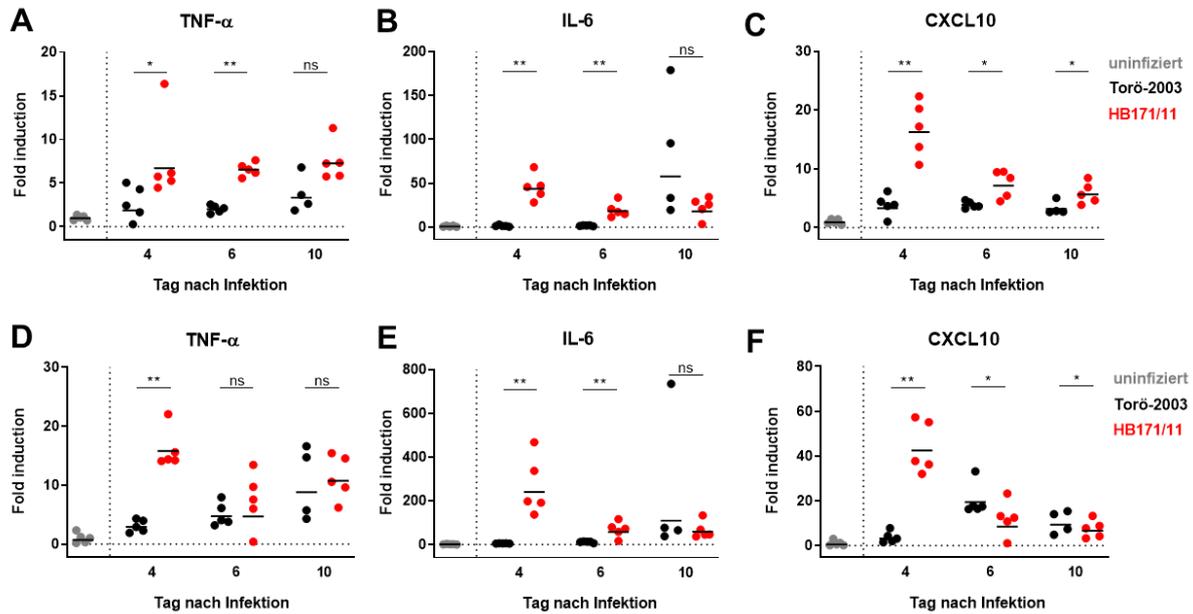
6–10 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 (n = 4-5, schwarz) oder HB171/11 (n = 5, rot) infiziert. **A.** Dünndarm. **B.** Dickdarm und **C.** Appendix wurden 4, 6 und 10 Tage nach Infektion isoliert. Die virale RNA wurde durch qRT-PCR nachgewiesen, die auf GAPDH normalisiert worden ist. Die Ergebnisse sind repräsentativ für ein Experiment.

### **3.3.4 Frühe Zytokin- und Chemokinreaktion in HB171/11 infizierten lymphoiden Organen**

Da keine virale RNA in Milz und Lymphknoten in HB171/11 infizierten Mäusen nachweisbar war, kam die Vermutung auf, dass eine frühe antivirale Reaktion die virale Replikation hemmen könnte. Um mögliche Unterschiede in der Immunantwort zwischen Torö-2003 und HB171/11 infizierten Mäusen zu untersuchen, wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL-6) und des Chemokins C-X-C-Motivligand 10 (CXCL-10) in der Milz und den inguinalen Lymphknoten analysiert.

Vergleichende Analysen zwischen Torö-2003 und HB171/11 infizierten Mäusen zeigten, dass in der Milz (Abb. 20A-C) und den inguinalen Lymphknoten (Abb. 20D-E) die allgemeine Induktion der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie des Chemokins CXCL-10 in den HB171/11 infizierten Mäusen höher ist, als in den Torö-2003 infizierten Tieren. Zudem erfolgte die Induktion von IL-6, TNF- $\alpha$  und CXCL-10 in den HB171/11 Mäusen an den Tagen 4 und 6 nach Infektion deutlich früher, während in den Torö-2003 infizierten Mäusen die Expressionslevel erst 10 Tage nach Infektion anstiegen. Obwohl der zeitliche Verlauf der proinflammatorischen Immunantwort in der Milz oder den inguinalen Lymphknoten in der jeweiligen Infektion mit HB171/11 oder mit Torö-2003 sich sehr ähneln, erfolgte eine deutlich höhere Expression in den Lymphknoten verglichen mit der Milz.

Diese Daten zeigen, dass sich die generelle Zytokin-Antwort zwischen den HB171/11 und den Torö-2003 infizierten Tiere unterscheidet. In den Lymphknoten der HB171/11 infizierten Mäuse erfolgte eine frühere und stärkere proinflammatorische Immunantwort, jedoch gleichen sie sich den Werten der Torö-2003 infizierten Tiere im zeitlichen Verlauf der Infektion an.



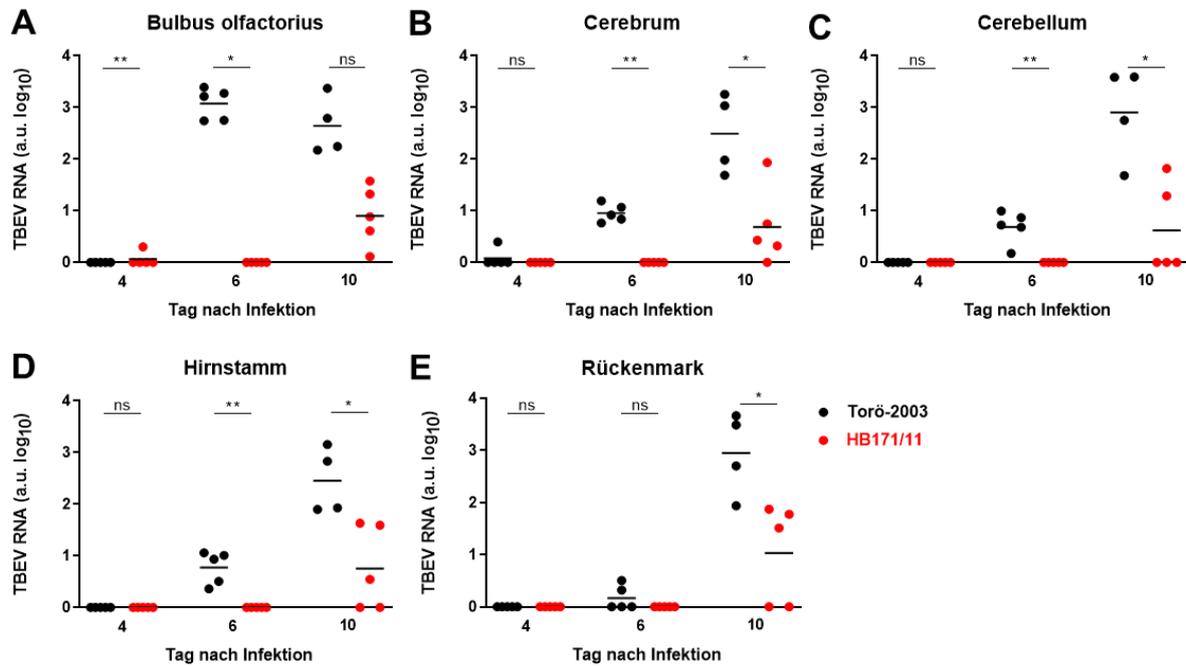
**Abbildung 20: Proinflammatorische Immunantwort in Milzen und inguinalen Lymphknoten**

6–10 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 ( $n = 4-5$ , schwarz) oder HB171/11 ( $n = 5$ , rot) infiziert. **A.** Milzen und **B.** inguinale Lymphknoten wurden 4, 6 und 10 Tage nach Infektion isoliert. Die RNA der proinflammatorischen Gene Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL-6) und CXCL-Motivligand 10 (CXCL-10) wurde durch qRT-PCR nachgewiesen, die auf GAPDH normalisiert worden ist. Die Ergebnisse sind repräsentativ für ein Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. ns = nicht signifikant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 3.3.5 Torö-2003 repliziert stärker im Gehirn als HB171/11

In Torö-2003 infizierten Mäusen wurde eine höhere Viruslast in peripheren Organen gemessen. TBEV ist neurotrop, deshalb sollte die Virusreplikation im Gehirn bestimmt werden. Dazu wurde die virale RNA in verschiedenen Gehirnarealen mittels qRT-PCR gemessen. Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu Torö-2003 oder HB171/11 infiziert. Der Bulbus olfactorius, das Cerebrum, das Cerebellum, der Hirnstamm und das Rückenmark wurden an Tag 4, 6 und 10 nach Infektion isoliert. Torö-2003 RNA war an Tag 6 nach Infektion in allen Hirnregionen nachweisbar (Abb. 21A-E). Die höchste Menge an viraler RNA wurde im Bulbus olfactorius detektiert (Abb. 21A), während der Gehalt an viraler RNA im Cerebrum (Abb. 21B), im Cerebellum (Abb. 21C), im Hirnstamm (Abb. 21D) und im Rückenmark (Abb. 21E) vergleichbar blieb. Im Bulbus olfactorius blieben die Werte an Tag 10 nach Infektion konstant hoch, während sich die Virusreplikation in den anderen Hirnregionen den Werten im Bulbus olfactorius annäherte. Im Gegensatz dazu wurden kleine Mengen an viraler RNA von HB171/11

infizierten Mäusen in den Hirnregionen erst an Tag 10 nach Infektion nachgewiesen. Der Gehalt an viraler RNA ist in allen Hirnregionen ungefähr gleich, jedoch im Vergleich zu Torö-2003 signifikant niedriger. Diese Daten zeigen, dass HB171/11 im Gehirn replizieren kann, dies geschieht jedoch zu einem späteren Zeitpunkt als in Torö-2003.



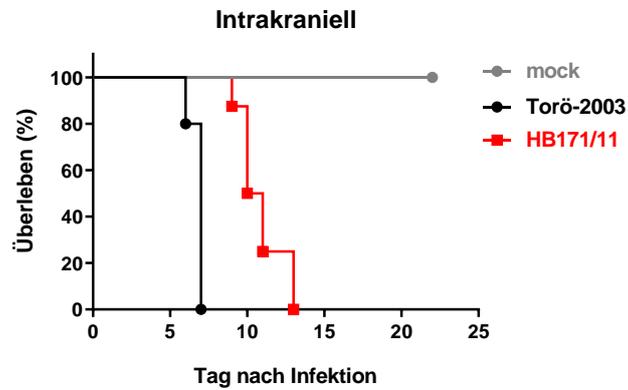
**Abbildung 21: Vergleich der Virusreplikation von Torö-2003 und HB171/11 im ZNS**

6–10 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden subkutan mit  $10^4$  ffu von Torö-2003 (n = 4-5, schwarz) oder HB171/11 (n = 5, rot) infiziert. A. Bulbus olfactorius, B. Cerebrum (Großhirn), C. Cerebellum (Kleinhirn), D. Hirnstamm und E. Rückenmark wurden 4, 6 und 10 Tage nach Infektion isoliert. Die virale RNA wurde durch qRT-PCR nachgewiesen, die auf GAPDH normalisiert worden ist. Die Ergebnisse sind repräsentativ für ein Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney Test. ns = nicht signifikant, \*p<0.05, \*\*p<0.005.

### 3.3.6 HB171/11 ist weniger neurovirulent als Torö-2003

Um auszuschließen, dass die geringere Replikation von HB171/11 im Gehirn durch eine verringerte Neuroinvasion oder Neurovirulenz bedingt ist, wurden Wildtyp C57BL/6 Mäuse intrakraniell (direkte Injektion ins Gehirn) mit  $10^2$  ffu Torö-2003 oder HB171/11 infiziert. Die mit Torö-2003 infizierten Mäuse erreichten 6 bis 7 Tage nach Infektion die Abbruchkriterien (Abb. 22). Die Mäuse begannen zwei Tage vor dem Tod an Gewicht zu verlieren. Das mediane Überleben betrug 7 Tage. Alle mit HB171/11 infizierten Tiere erreichten die Abbruchkriterien mit den gleichen Symptomen wie Torö-2003. Im Gegensatz dazu betrug das mediane Überleben

von HB171/11 infizierten Tieren 10.5 Tage. Diese Daten zeigen eine geringere Neurovirulenz von HB171/11.



**Abbildung 22: Analyse des Überlebens von Torö-2003 und HB171/11 infizierten C57BL/6 Mäusen nach intrakranieller Injektion**

6-10 Wochen alte weibliche Wildtyp C57BL/6 Mäuse (mock: n = 5, Torö-2003: n = 10, HB171/11: n = 8) wurden mit PBS mock-infiziert (grau) oder intrakraniell mit  $10^2$  ffu Torö-2003 (schwarz) oder HB171/11 (rot) infiziert. Kaplan-Meier-Kurven stellen das Überleben der Mäuse dar. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels des log-rank (Mantel-Cox) Tests und ergab einen signifikanten Unterschied (\*\*\* $p < 0.0001$ ) im Überleben von Torö-2003 und HB171/11 infizierten Mäusen.

## 4. Diskussion

TBEV ist das bekannteste durch Zecken übertragene Flavivirus. Obwohl in den letzten Jahren die Erkenntnisse und Erforschung zu TBEV stetig zunehmen, sind einige Fragen bisher unbeantwortet geblieben. In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Infektionswege auf die Pathogenese sowie die Möglichkeit einer horizontalen Transmission von TBEV und LGTV in Mäusen untersucht. Das Vorhandensein von LGTV in peripheren Organen und Gehirnarealen von Wildtyp C57BL/6 und suszeptiblen *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde analysiert um die möglichen Verbreitungswege ins Gehirn genauer zu untersuchen. Schließlich wurde die Pathogenese von zwei verschiedenen TBEV Stämmen HB171/11 und Torö-2003 in C57BL/6 Wildtyp Mäusen verglichen, um die Maus als Untersuchungsmodell für die TBEV induzierte Pathogenese zu etablieren und mögliche Auswirkungen von Veränderungen im Genom auf die Pathogenität zu analysieren.

### 4.1 Horizontale Transmission von TBEV und LGTV in suszeptiblen Mäusen möglich

Viren der TBE-Serogruppe sind Auslöser von Zoonosen und werden über verschiedene Wege übertragen. Zecken wie *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus* fungieren als Vektor und sind der zentrale Punkt des Übertragungszyklus von TBEV [80]. Sie verbreiten das Virus unter einer Vielzahl von Tierarten [95]–[98].

Im Lebenszyklus der Zecken kann das Virus während der verschiedenen Entwicklungsphasen durch transstadiale und, mit geringer Effizienz, transovariale Übertragung erhalten bleiben [190]. Darüber hinaus kann die Übertragung zwischen verschiedenen Zecken durch gemeinsame oder durch sequentielle Fütterung eines infizierten Reservoirwirts vermittelt werden [191]. Unklar ist dabei, ob für die Übertragung der Viren vom Reservoirwirt auf die Zecke eine Virämie notwendig ist. Allerdings führt die experimentelle Infektion von *Myodes glareolus* (Rötelmaus) mit TBEV zu einer lang anhaltenden Virämie, ohne dass die Tiere erkranken [192]. Eine Virämie kann deshalb im gesunden Tier leicht übersehen werden [93], [193], [194]. Eine Übertragung in virämischen Tieren würde die Übertragung auf Zecken sicherlich erhöhen .

Mäuse als warmblütige Reservoirwirte weisen eine hohe Prävalenz von TBEV auf. Ihre Rolle bei der Aufrechterhaltung der Virusverbreitung ist unklar. Es ist derzeit wenig über Übertragungswege innerhalb der Spezies bekannt. Myoden wie *Myodes rutilus* sind kleine

wilde Nagetiere und als Reservoirwirte für TBEV bekannt, die das Virus über lange Zeit als persistierende Infektionen aufrechterhalten können [195]. Eine vertikale Übertragung von TBEV wurde für diese Mäuse bestätigt, nachdem das Virus in der Plazenta und im Embryo nachgewiesen werden konnte [196], [197]. Während für TBEV in Menschen bisher keine vertikale Transmission beschrieben worden ist, können verwandte Flaviviren wie WNV [198], ZIKV [199], [200] und Dengue Virus (DENV) [201] im Menschen vertikal übertragen werden. WNV [202] und ZIKV [203], [204] können im Menschen auch sexuell übertragen werden. Allerdings wurde diese Übertragungsform für TBEV noch nicht beschrieben. Interessanterweise wurde die sexuelle Übertragung von TBEV bereits für Labormäuse zwischen infizierten Männchen und nicht infizierten Weibchen beschrieben, obwohl diese keine angepassten Reservoirwirte für das Virus sind [205].

Eine horizontale Übertragung von Flaviviren in Menschen wurde für ZIKV beschrieben. Die Übertragung erfolgt über Sekrete [206], Muttermilch [207] und Sperma [208]. Eine horizontale Transmission von TBEV in Menschen ist bislang nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine horizontale Transmission von TBEV und LGTV in Inzuchtmäusen zwischen suszeptiblen Mäusen möglich ist (Abb. 3 und Abb. 9). Nach dem Cohousing von einer infizierten Index-Maus verstarben suszeptible naive Kontakt-Mäuse (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup> oder *Rag2γc*<sup>-/-</sup>). Die meisten Mäuse wiesen Anzeichen einer Erkrankung auf und verstarben (Abb. 3 und 9). In suszeptiblen *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen führt die Infektion mit 1 ffu LGTV zur Erkrankung der Mäuse [117], d.h. schon sehr geringe Virusmengen können zu einer Infektion führen. Da keine Wildtyp Mäuse durch Kontakt mit Index-Mäusen erkrankten, kann davon ausgegangen werden, dass keine oder nur sehr geringe Virusmengen übertragen werden. Das Cohousing mit einer infizierten Wildtyp Maus führte nicht zu Krankheitssymptomen (Abb. 4). Um eine asymptomatische Infektion auszuschließen wurden Virus-spezifische Antikörper im Serum der Mäuse untersucht (Abb. 4). Nur die infizierte Index-Maus wies neutralisierende Antikörper auf. Dies zeigt, dass infizierte Wildtyp Mäuse kein Virus an Mäuse im gleichen Käfig weitergeben können. Ähnliche Ergebnisse wurden mit natürlichen Reservoir-Tieren erzielt. Infizierte Wühlmäuse konnten trotz Infektion und chronischer Virämie das Virus nicht auf Wühlmäuse im gleichen Käfig übertragen [193]. Eine horizontale Transmission kann somit wahrscheinlich nur erfolgen, wenn Index-Mäuse eine hohe Viruslast aufweisen und Kontakt-Mäuse suszeptibel für TBEV oder LGTV sind.

## **4.2 Exkrememente und Sekrete sind mögliche Überträger von LGTV**

Die Sekretion von TBEV in Körperflüssigkeiten könnte ein möglicher Übertragungsweg für die horizontale Transmission sein und Auswirkungen auf Hygienekonzepte bei infizierten Patienten haben.

Für immunsupprimierte Patienten konnte TBEV RNA im Urin nachgewiesen werden [181]. In den in Abbildung 6 dargestellten Versuchen wurde durch Käfigtransferexperimente gezeigt, dass Virus ohne direkten Kontakt der Mäuse übertragen werden kann. Der Kontakt mit Sekreten oder Ausscheidungen scheint ausreichend zu sein, um susceptible Mäuse zu infizieren. Die Virusübertragung erfolgte durch den Kontakt infektiöser Exkrememente oder Sekretrückstände an Futter oder der Wasserflasche. Virale RNA war in Kot, Urin, Speichel und im Augenabstrich nachweisbar (Abb. 7). Der direkte Kontakt nur zu Kot und Urin war in den hier gezeigten Experimenten nicht ausreichend für eine Virusübertragung, obwohl in Kot und Urin die höchste Viruslast gemessen wurde. Dies kann an dem Versuchsaufbau gelegen haben. Die Mäuse wurden alle 12 Stunden in einen neuen Käfig gesetzt, zeitweise ohne Einstreu. Inwieweit der Versuchsaufbau das Verhalten der Mäuse und damit die Aufnahme von Kot verändert hat, ist nicht bekannt. Weiterhin wurde die Viruslast mittels qRT-PCR ermittelt. Diese Methode lässt keine Aussage über die Replikationsfähigkeit des Virus zu. Ob Kot oder Urin ein replikationskompetentes Virus enthalten und wie lange LGTV in Kot oder Urin aktiv ist, bleibt unklar.

## **4.3 Keine Transmission über den Verdauungstrakt**

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Ausbrüche einer TBEV Infektion im Menschen beim Verzehr von TBEV kontaminierten Rohmilchprodukten gemeldet [99]–[101]. Es wurde vermutet, dass TBEV über den Magen-Darm-Trakt eintreten kann. Frühere Studien belegen, dass TBEV in Milch [184] und in einem weiten Bereich von pH-Bedingungen stabil ist [209]. Es wurde daraus geschlossen, dass das Virus den Magen passieren und Zellen im Darm infizieren kann. Hier konnte gezeigt werden, dass eine direkte Verabreichung von LGTV in den Magen zu keiner Infektion führte (Abb. 8). Allerdings erfolgte die Inokulation in Abwesenheit von Milch. Das Milch dennoch keine schützende Wirkung gegen eine Inaktivierung des Virus hat, konnte anhand der peroral mit TBEV infizierten Mäuse bewiesen werden, da diese Mäuse ein längeres Überleben als die Kontroll-Mäuse ohne Milch zeigten (Abb. 10). Eine Virusinfektion

über die Nahrung führt häufig zu einer Virusreplikation in Epithelzellen der Darmwand. Es ist bekannt, dass TBEV *in vitro* humane intestinale Caco-2-Zellen, immortalisierte menschliche kolorektale Adenokarzinomzellen, infizieren kann [210]. Zudem wurde die Virusreplikation im Darm von Balb/c Mäusen nach Infektion mit dem TBEV-Sofijin Stamm nachgewiesen [211]. In dieser Arbeit wurde der TBEV Stamm HB171/11 vorgestellt. Menschen, die sich im HB171/11 Hotspot mit TBEV infiziert hatten, entwickelten vor allem gastrointestinale Symptome (zusammengefasst in [187]). Überraschenderweise wurde im Darm von Wildtyp Mäusen, die mit diesem Stamm infiziert wurden, keine Virusreplikation gefunden (Abb. 19). Dies lässt vermuten, dass die Virusübertragung bereits im Pharynx erfolgt sein könnte. Bei Rhesusaffen führt die direkte Exposition von ZIKV gegenüber den Mandeln zu einem symptomatischen Krankheitsverlauf mit Virusnachweis im Urin [212]. Anstelle von Mandeln haben Mäuse das nasal assoziierte Lymphgewebe (NALT). Das NALT könnte als Einstiegspunkt für TBEV oder LGTV mit systemischer Infektion über das Lymphsystem dienen, was den uninfizierten Darm in HB171/11 infizierten Wildtyp Mäusen erklären könnte. Die subkutan mit LGTV infizierten Mäuse wiesen eine hohe Viruslast in drainierenden (Abb. 12B) und zu späteren Zeitpunkten auch in den undrainierenden Lymphknoten (Abb. 12C), der Milz (Abb. 12 A) und im NALT (Abb. 14A) auf, was auf eine Verbreitung des Virus über das lymphatische System innerhalb der Peripherie deutet.

#### **4.4 Keine Transmission und Neuroinvasion von LGTV über die olfaktorische Route**

Der Mechanismus der Maus-zu-Maus-Übertragung von TBEV ist nicht vollständig verstanden. Die Übertragung des Virus durch Aerosole könnte eine mögliche Route sein. Das Cohousing Experiment mit einer luftdurchlässigen Zwischenwand, bei denen der direkte Kontakt der Mäuse gehemmt war, zeigten, dass Aerosole in dieser Versuchsanordnung das Virus nicht übertragen konnte (Abb. 5). Dennoch sollte eine Aerosolübertragung von TBEV auf den Menschen möglich sein, da eine Aerosolübertragung im Falle einer versehentlichen Laborinfektion beim Menschen durch einen zerbrochenen Zellkulturkolben mit hohen Virusmengen oder durch Homogenisierung infizierter Mausgehirne postuliert wurde [213], [214]. Das in diesem Cohousing Experiment keine Übertragung von LGTV in Mäusen erfolgte, könnte auf eine geringe Viruskonzentration in Aerosolen zurückzuführen sein oder das Virus wird über Tröpfchen übertragen. Wie eine intranasale TBEV Infektion zur Krankheit führen kann, ist unklar. Eine mögliche Infektionsroute wäre über das olfaktorische System. Eine

direkte Infektion von Riechrezeptorneuronen und ein Transport zum Bulbus olfactorius wurde für das VSV bei Mäusen gezeigt [215]. Die frühe Detektion von LGTV im Bulbus olfactorius 24 Stunden nach subkutaner Infektion sowohl in Wildtyp als auch in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 13), sowie weitere Studien mit *MAVS*<sup>-/-</sup> Mäusen [118], könnten diese Hypothese stützen. Zudem wurde LGTV im Gehirn zuerst im Bulbus olfactorius und erst im weiteren Verlauf der Infektion in anderen Gehirnarealen der *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäuse nachgewiesen (Abb. 13A-D). Auch der hohe Virustiter von LGTV im Nasensekret von *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 7) bekräftigt die Vermutung. Dagegen spricht allerdings der späte Krankheitsbeginn bei intranasal infizierten Mäusen in den Überlebensstudien (Abb. 8), was darauf hindeutet, dass das Virus nicht direkt auf das Gehirn übertragen wird, sondern über andere Mechanismen ins Gehirn gelangt. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung einer Laborinfektion beim Menschen. Das Einatmen von hohen Viruskonzentrationen nach Laborhaverie führte zu einem zweiphasigen Krankheitsverlauf, mit der Entwicklung einer Enzephalitis in der zweiten Infektionsphase [213]. Zudem wurde LGTV im nasalen Epithelium erst 48 Stunden nach Infektion nachgewiesen (Abb. 14B), was eine Verbreitung des Virus vom nasalen Epithelium zum Bulbus olfactorius wahrscheinlicher macht. Die Experimente weisen darauf hin, dass der Eintritt von LGTV ins Gehirn über die olfaktorische Route unwahrscheinlich ist.

#### **4.5 Plexus choroideus als mögliche Eintrittspforte für LGTV**

Neurotrope Viren können auf unterschiedlichen Wegen in das Gehirn eindringen. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine wichtige Eintrittspforte verschiedener Viren. Sie ist eine hochselektive semipermeable Membranbarriere, die das Blut vom ZNS trennt (zusammengefasst in [122]). Die Barriere wird durch Endothelzellen gebildet, die durch Verbindungsproteine (engl.: tight junctions) miteinander verbunden sind [122]. Neurotrope Viren haben verschiedene Mechanismen entwickelt, mit denen sie die Barriere der Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Einige überwinden die Barriere transzellulär, parazellulär oder über zirkulierende Immunzellen, ohne die Barriereintegrität zu zerstören [133]–[135], wieder andere wie HIV dringen über eine TNF- $\alpha$ -induzierte Zerstörung der Barriere in das Gehirn ein [132]. *Weber et al.* konnten zeigen, dass LGTV ohne die Zerstörung der Blut-Hirnschranke in das Gehirn eintreten kann, da virale RNA bereits 2 Tage nach Infektion im Gehirn nachweisbar war, während die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke erst 4 Tage nach Infektion erfolgte [117]. Im Fall von TBEV wurde gezeigt, dass die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke in späteren Stadien

der Infektion zunimmt, wenn eine hohe Viruslast im Gehirn vorhanden ist [144]. Hier geht man davon aus, dass der Eintritt von TBEV in das Gehirn einer Störung der Blut-Hirn-Schranke vorausgeht. Eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke ist nicht zwingend notwendig. So können WNV [216] und ZIKV [133] über die mikrovaskulären Endothelzellen ins Gehirn eindringen ohne die Barriere zu zerstören. *Palus et al.* haben gezeigt, dass TBEV mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro* infizieren kann und virale Partikel produziert werden [143]. Eine Lyse der Zellen wurde nicht nachgewiesen, sodass vermutet werden kann, dass TBEV auch auf diesem Weg in das Gehirn gelangen kann. In dieser Arbeit wurde eine frühzeitige Virämie 24 Stunden nach Infektion mit LGTV festgestellt (Abb. 11). Über das Blut könnten die Viren an die Blut-Hirn-Schranke gelangen und wie WNV [134], [135] oder ZIKV [133] über die Endothelzellen ins Gehirn eintreten. Allerdings ist unklar, wieso einzig der Bulbus olfactorius in den Wildtyp Mäusen infiziert wurde (Abb. 13A). Infektionsversuche an Mäusen mit dem Venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis Virus (engl.: Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)) ergaben, dass die Blut-Hirn-Schranke nur im Bulbus olfactorius durchlässig war, während sie in anderen Gehirnregionen weiterhin intakt geblieben ist [217]. Allerdings erfolgte der Eintritt des Virus über Axone entlang der olfaktorischen Route [217]. Dieser Weg der Neuroinvasion von LGTV scheint aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit unwahrscheinlich. Erfolgt die Neuroinvasion direkt über olfaktorische Rezeptorneuronen, wäre ein schnellerer Infektionsverlauf bei intranasaler Infektion (Abb. 8A) wahrscheinlich gewesen.

Im intakten Zustand ist die Blut-Hirn-Schranke durch die Zellverbindungen zwischen den Endothelzellen nur für kleinste Moleküle wie Sauerstoff, Kohlendioxid, Aminosäuren oder Zucker passierbar [218]). Anders die Blut-Liquor-Schranke im Plexus choroideus, deren Endothelzellen keine Verbindungsproteine zueinander ausbilden [136]). Im Plexus choroideus bilden die Epithelzellen die Verbindungen zueinander aus, die jedoch über Transzytose den Molekülaustausch zwischen Blutserum und Liquor gewährleisten [219]. An neugeborenen Mäusen wurde bereits gezeigt, dass der Plexus choroideus anfällig für eine HSV-1 Infektion ist [220]. Zudem zeigt eine neue Studie, dass ZIKV die Perizyten des Plexus choroideus *in vivo* infiziert [141] und in *in vitro* Modellen die Blut-Liquor-Schranke durchdringen kann [141]. LGTV wurde im Plexus choroideus (unpublizierte Daten) und im Liquor nachgewiesen (persönliche Mitteilung D. Fritsch). Eine Invasion von LGTV über den Plexus choroideus kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Allerdings deuten die hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 15A) der Messung viraler RNA von LGTV in den tiefen zervikalen Lymphknoten darauf hin, dass

ein Eintritt über den Plexus choroideus in suszeptiblen Mäusen möglich sein könnte. LGTV hätte den Liquor nach Überwinden der Blut-Liquor-Schranke infizieren und so auf andere Gehirnareale verbreitet werden können. Der Liquor wird anschließend über das lymphatische System abgeleitet, wobei die tiefen zervikalen Lymphknoten einen frühzeitigeren Kontakt mit dem Liquor haben, als die oberflächlichen zervikalen Lymphknoten [140]). Wäre der Liquor von LGTV infiziert worden, hätte LGTV zuerst die tiefen zervikalen Lymphknoten erreichen und infizieren können. In den tiefen zervikalen Lymphknoten der suszeptiblen Mäuse konnte bereits 48 Stunden nach Infektion eine deutlich höhere Menge viraler RNA als in den oberflächlichen zervikalen Lymphknoten (Abb. 15E) gemessen werden. Dies konnte in den Wildtyp Mäusen nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die Menge der LGTV RNA unter der Nachweisgrenze gelegen haben könnte.

#### **4.6 Pathogenitätsunterschiede zwischen Torö-2003 und HB171/11**

TBEV wird in die drei Subtypen TBEV-EU, TBEV-Sib und TBEV-FE unterteilt. Der klinische Verlauf einer TBEV Infektion unterscheidet sich zwischen den Subtypen. Während Infektionen mit TBEV-EU meist biphasisch verlaufen und weniger lethal sind [55], [57], [104], verlaufen Infektionen mit TBEV-Sib oder TBEV-FE oftmals monophasisch mit neurologischen Symptomen und einer höheren Sterblichkeitsrate [110]. Unterschiede in der Pathogenität treten nicht nur zwischen den Subtypen, sondern auch innerhalb eines Subtypes auf. In dieser Arbeit wurden die TBEV-EU-Stämme Torö-2003 und MucArHB171/11 auf ihre Pathogenität im Mausmodell untersucht (Abb. 17-22). Patienten, die sich auf der Insel Torö mit TBEV infiziert hatten, zeigten neurologische Symptome, wohingegen Menschen, die sich im HB171/11 Hotspot aufhielten, nur gastrointestinale Erkrankungserscheinungen aufwiesen (zusammengefasst in [187]). In den hier durchgeführten Experimenten konnten Unterschiede in der Pathogenität zwischen den beiden Virusstämmen im Mausmodell festgestellt werden. HB171/11 infizierte Tiere überlebten die Infektion deutlich länger als Torö-2003 infizierte Mäuse (Abb. 17). HB171/11 infizierte Mäuse zeigten wie die Torö-2003 infizierten Mäuse keine gastrointestinalen Symptome (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde keine virale RNA im Darm, weder in Torö-2003 noch HB171/11 infizierten Mäusen, nachgewiesen (Abb. 19). Da keine Gewebeschnitte vom Darm der Mäuse histologisch untersucht wurden, können kleinste Veränderungen des Darms nicht ausgeschlossen werden. Generell scheinen verschiedene TBEV Stämme in der Lage zu sein, Caco-2 Zellen *in vitro* zu infizieren [210]. Allerdings waren

dies *in vitro* Experimente. *In vivo* können andere Virulenzfaktoren entscheidend sein, die sich wiederum zwischen Mensch und Maus unterscheiden können. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Krankheitssymptome in Mensch und Maus nicht vollständig vergleichbar sind

Die erhöhte Suszeptibilität von Torö-2003 infizierten Tieren könnte dagegen auf eine frühere und stärkere proinflammatorische Immunantwort in den HB171/11 infizierten Tieren in der Peripherie zurückzuführen sein. Dies spiegelt sich in den Expressionprofilen von IL-6, TNF $\alpha$  und CXCL-10 wieder (Abb. 20). IL-6 ist im Allgemeinen für die Differenzierung von B- und T-Zellen zuständig [165]. In TBE-Patienten konnten in der frühen Phase der Erkrankung IL-6 und weitere Interleukine im Serum gemessen werden [168]–[170]. Die frühere und zugleich höhere Expression von IL-6 in den HB171/11 infizierten Mäusen (Abb. 20) könnte eine frühere Aktivierung von T-Zellen, sowie eine schnellere Sekretion von Immunglobulin G durch die Ausdifferenzierung der B-Zellen bewirkt haben, was die geringere Pathogenität von HB171/11 erklären könnte. Zudem könnte die hohe Menge an CXCL-10 die Rekrutierung von Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen ausgelöst und so die geringere Pathogenität im Gehirn bewirkt haben. Im Liquor von TBE Patienten wurden steigende Konzentrationen von CXCL-10 detektiert, die vermutlich durch einen Chemokingradienten die Rekrutierung von CXCR-3 T-Zellen ins Gehirn induzierten [173], [174].

Wie Torö-2003 und HB171/11 diese unterschiedliche Immunantwort auslösen, ist unklar. Einzelne Mutationen im Genom könnten zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führen. Dies kann zu einer veränderten Neurovirulenz oder Neuroinvasion des Virus führen. Ein Vergleich der Sequenzen von Torö-2003 und HB171/11 zeigte einen Unterschied von 35 Aminosäuren in der Sequenz des Polyproteins (Abb. 16). Eine wichtige Rolle in der Neurovirulenz und Neuroinvasion von TBEV wird dem E Protein nachgesagt [22]. *Mandl et al.* konnten zeigen, dass bereits einzelne Substitutionen von Aminosäuren im Glykoprotein E zu einer schnelleren und höheren Replikation von TBEV *in vitro* führen kann [221]. Zudem war die Fähigkeit der Neuroinvasion in adulten Tieren signifikant reduziert [221]. Weitere Studien belegen, dass ein Austausch von Serin zu Prolin an Position 40 des Glykoproteins E des Oshima-Stammes, ein in Japan isoliertes TBEV [222], bereits zu einer geringeren Neurovirulenz führen kann [223]. In Torö-2003 und HB171/11 konnte kein Unterschied in den von *Mandl et al.* und *Hyasaka et al.* untersuchten Sequenzen festgestellt werden. Die veränderte Aminosäure zwischen Torö-2003 und HB171/11 befindet sich an einer anderen Position (Position 430) der

Aminosäuresequenz des Glykoproteins E. Doch nicht jede Punktmutation hat eine Auswirkung auf die Pathogenität eines Virustammes. *Belikov et al.* untersuchten die Sequenzen von 34 TBEV-FE-Stämmen [224]. Die Viren wurden entweder von subklinischen Menschen, Patienten mit fieberhaften Symptomen oder von Patienten, die nach Ausbildung einer Enzephalitis verstorben sind, isoliert. In allen strukturellen und nicht-strukturellen Proteinsequenzen fanden sie Unterschiede in den Aminosäuren, jedoch führten nicht alle zu Veränderungen der Pathogenität [224]. Während Substitutionen in der 3' UTR und dem Glykoprotein E keine besondere Rolle in den unterschiedlichen Pathogenitäten der untersuchten TBEV Stämme zu haben scheinen, haben Deletionen im Kapsidprotein, sowie Substitutionen im NS3 und NS5 Protein einen Effekt auf die RNA Replikation und die Ausbildung der Viruspartikel [224]. Diese Auswirkungen können laut *Belikov et al.* einen Einfluss auf die Virulenz der Virenstämme haben. Die gefundenen Aminosäureunterschiede, wie im NS5 Protein, in Torö-2003 und HB171/11 könnten die geringere Neurovirulenz von HB171/11 erklären. Um jedoch genaue Aussagen über einzelne Mutationen treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen, wie die Erstellung von Klonen mit Punktmutationen und Analysen zu den Kristallstrukturen der einzelnen Proteine, durchgeführt werden.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Liste der Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit genutzten Verbrauchsmaterialien sind folgend in Tabelle 2 dargestellt:

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

Material	Detail	Hersteller
Cellstar® Zellkulturplatten	6 Well, 96 Well	Greiner bio-one
Costar® Stripette® Serologische Pipette	10 ml, 25 ml	Corning
Discardit™ II Spritze	20 ml	Becton Dickinson GmbH
Disposable Skalpell No.10		pfm-medical AG
Doppel-Enden Mikrospatel gerade und abgewinkelt	13 cm	Fine Science Tools
Falcon-Röhrchen	15 ml, 50 ml	Corning
Feine Pinzette gebogen	11.5 cm	Fine Science Tools
Fütterungsknopfkanüle		Praxisdienst online
Irisschere extra fein gerade/spitz	8,5 cm	Fine Science Tools
Krankenunterlage		Medi-Inn
Metallwattestäbchen extra dünn und steril	15 cm lang, 1 mm Kopf	CLS Medizin-Technik + Vertrieb
Micro-Fine™ + Demi Insulin Spritze	U-100, 0.3 ml, 0.3 mm x 8 mm	Becton Dickinson GmbH
Mutiwell Plate 96 Well LightCycler 480		Roche
Omnican®-F Tuberculin Spritze	1 ml, 0.3 mm x 12 mm	B   Braun
Ringpinzette	3 x 0.75 mm, 9 cm	Fine Science Tools
Safe Seal Micro Tube	1.5 ml, 2 ml	Sarstedt AG
Schere gerade/spitz	10 cm	Fine Science Tools
Sicherheitsbutterfly		Becton Dickinson GmbH
TipOne® Filter Tips	10/20 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB

Vacutainer® Safety-Lok™ Blutisolisierungsset	0.8 mm x 19 mm x 178 mm	Becton Dickinson GmbH
Zellkulturflasche	25 ml, 50 ml oder 75 ml	Sarstedt AG
Cellstar® Zellkulturplatten	6 Well, 96 Well	Greiner bio-one

## 5.2 Chemikalien und Reagenzien (auch Puffer)

Die eingesetzten Chemikalien, Reagenzien und Kits sind in Tabelle 3 aufgelistet:

**Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien**

Material	Hersteller
Avicel RC591 NF Methylcellulose	IMCD Deutschland GmbH & Co. KG
Beta-Actin	Primer MWG dna online
BioWhittaker™10x PBS ohne Ca & Mg	Lonza
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V, pH 7	Capricorn Scientific GmbH
Chloroform	Fluka Analytical
CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
D (+) Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich
Ethanol Absolute	Otto Fischer GmbH & Co. KG
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck Millipore
DMEM with high glucose (DMEM)	Gibco™
Glutamin	Gibco™
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG
HEPES	Gibco™
Incidin™ Liquid	Ecolab Deutschland GmbH
Isofluran	Baxter
Isopropanol	J.T. Baker
Kaninchen-Anti-Maus Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter Antikörper (Nr. 315-035)	Jackson
KAPA Probe FAST qPCR Universal Mastermix, Kit of 10 ml	KAPA Biosystems

KAPA SYBR FAST Universal Mastermix, Kit of 10 ml	KAPA Biosystems
Ketamin (10%)	Bela-Pharm GmbH & Co. KG
Kochsalzlösung (NaCl 0.9 %)	Serumwerk Bernburg AG
Lyse-Matrix	Nodric Biolabs
Maus-Anti-TBEV E MoAb 19/1786	Quelle Niedrig
M-MLV Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen
Natriumchlorid (NaCl) 0.9 %	B   Braun
Natriumpyruvat	Gibco™
Nucleo-Spin RNA II-Kit	Macherey-Nagel
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG
PBS ohne Ca & Mg (PBS)	Gibco™
Penicillin	Gibco™
peqGOLD TriFAST	VWR PeqLab
QIAmp-Virus-RNA-Mini Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription (RT) Kit	Qiagen
QuantiTect-Primer-Assay	Qiagen
RPMI 1640	Gibco™
Streptomycin	Gibco™
SYBER® Green	KAPA Biosystems
Triton-X-100	Sigma Aldrich
TrueBlue	KPL Gaithersburg
Trypan Blau Lösung	Sigma Aldrich
Vollmilch 3.5 %	Aldi
Xylazin (2 %)	Ceva Tiergesundheit GmbH

### 5.3 Laborequipment

Zur Fertigstellung dieser Arbeit wurde verschiedene Laborgeräte genutzt, die namentlich in Tabelle 4 aufgeführt sind:

**Tabelle 4: Laborequipment**

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	MC6	Waldner Inc.
Autoklav	5075 EL	biomedis®
Fast-Real-Time-PCR-Systems	7900HT	Applied Biosystems
Gefrierschrank	-20°C	Liebherr
Homogenisator	FastPrep-24™	MP Biomedicals
CO <sub>2</sub> Inkubatoren	Thermo Scientific™ Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kühlschrank	Comfort	Liebherr
LightCycler® 480 Instrument II	Light Cyler 480 II	Roche
NanoDrop (Spektrometer)	Nanodrop 1000 ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 3001	Heidolph
Mikroliterzentrifugen	Biofuge® pico	Heraeus
Mikropipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Mikroskop	Labovert	leica
Panorama-Schutzbrille		Carl Roth GmbH + Co. KG
Pipettenkontrolle	PIPETBOY acu 2	Integra
Schüttler	MTS 4	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Sterile Werkbank	Heraeus HS15	Thermo Fisher Scientific Inc.
Waage	1419MP8-1	Sartorius
Wasserbad	1002	GFL
Zentrifuge	Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zentrifuge	-80 °C HFU 586 Basic	Heraeus
Zentrifuge	Heraeus HSP12	Thermo Fisher Scientific Inc.

## 5.4 Computer Software

Die Datenerfassung, -berechnung und -verarbeitung erfolgte mit Microsoft (MS) Office Professional 2010 Word, Excel und Power Point. Grafiken wurden mit GraphPad Prism 7.0 und

8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt. Referenzen und Literaturverzeichnis wurden mit dem Literaturverwaltungsprogramm Mendeley (Version 1803) verwaltet und erstellt.

## **5.5 Statistische Analyse**

Die Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 7.0 und 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) analysiert. Die Überlebenskurven wurden durch den log-rank-Test (Mantel-Cox) auf statistische Signifikanz getestet. Die Daten der qRT-PCR Analysen wurden durch einen nicht-parametrischen t-Test und Mann-Whitney-Test analysiert.

## **5.6 Ethik**

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz (EU-Richtlinie 2010/63 / EU) durchgeführt. Die Mäuse wurden gemäß der von FELASA definierten guten Tierpraxis gehalten und gehandhabt. Alle Tierversuche wurden vom niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter der Genehmigungsnummer AZ 33.19-42502-04-15 / 1895 oder vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt AZ 42502-2-1344 der Universität Magdeburg genehmigt.

## **5.7 Viren und Titerbestimmung**

Der LGTV Stamm TP21 (bereitgestellt von Gerhard Dobler), Torö-2003 [185] und HB171/11 (zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler) wurden auf VeroB4 Zellen repliziert und titriert. Der Virustiter wurde durch einen Fokus-bildenden Assay bestimmt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen von der LGTV Anzucht oder TBEV Anzucht 1 Stunde lang auf VeroB4-Zellen gegeben. Das Inokulum wurde entfernt und die Zellen mit 1 % Avicel RC/CL (IMCD Deutschland) in 1x Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) (Verhältnis 1:1), ergänzt mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) (Merck Millipore), 100 U/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) und Glutamin (Gibco), überschichtet. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit 6% Paraformaldehyd (Roth) fixiert und durch 1x Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Gibco), 0.5 % Triton X-100 (Sigma Aldrich), 20 mM Glycin (Carl Roth) permeabilisiert. LGTV und TBEV Foci wurden mit Maus-Anti-TBEV E monoklonalen Antikörper 19/1786 [225] und sekundärem Kaninchen-Anti-Maus-Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertem Antikörper (Jackson, Nr.

315-035) in 1x PBS (Gibco), 10 % FCS (Merck Millipore), gefärbt. LGTV oder TBEV positive Foci wurden durch TrueBlue-Färbung (KPL, Gaithersburg) sichtbar gemacht.

## 5.8 Mäuse und Tierhaltung

C57BL/6OlaHsd (Wildtyp), B6.129S2-*Ifnar1*<sup>tm1Agt</sup> (*IFNAR1*<sup>-/-</sup>), B6(Cg)-*Rag2*<sup>tm1.1Cgn</sup> (*Rag2*<sup>-/-</sup>) und *Rag2*<sup>tm1.1Flv</sup>||*I2rg*<sup>tm1.1Flv</sup> (*Rag2γc*<sup>-/-</sup>) wurden unter spezifisch Pathogen-freien (SPF-) Bedingungen an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig gezüchtet oder von ENVIGO erworben. Tierversuche mit TBEV Infektionen wurden in der Biosicherheitsstufe 3-Einrichtung des Helmholtz-Zentrums durchgeführt. Alle Experimente wurden mit 6-10 Wochen alten männlichen oder weiblichen Mäusen durchgeführt, um geschlechtsspezifische Auswirkungen auszuschließen. Die Mäuse wurden in individuell belüfteten IVC Käfigen (Tecniplast Germany GmbH) gehalten, die nach Geschlecht getrennt waren. Mäuse hatten ad libitum Zugang zu Futter und Wasser und wurden unter standardisierten Bedingungen in einem 12 bis 12 oder 14 bis 10-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus, einer Beleuchtungsstärke von 50 Lux, bei 55% Luftfeuchtigkeit und 22 °C gehalten.

## 5.9 Anästhesie und Infektion der Mäuse

Um Mäuse für eine längere Zeit zu narkotisieren, wurden 100 µL/10g Körpergewicht einer sterilen Lösung von 10% Ketamin (Bela-Pharm GmbH & Co. KG), 5 % Xylazin (Ceva Tiergesundheit GmbH) in 0,9% NaCl (B|Braun) injiziert. Dieses Verfahren bewirkt eine Bewusstlosigkeit der Mäuse für etwa 30 Minuten. Die Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) mit 10<sup>2</sup> und 10<sup>4</sup>, intrakraniell (i.c.) mit 10<sup>2</sup>, intranasal (i.n.) mit 10<sup>2</sup>, subkutan (s.c.) mit 10<sup>2</sup> oder 10<sup>4</sup>, per os (durch den Mund) mit 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> und 10<sup>6</sup> oder durch eine Fütterungskanüle (Sonde = gavage) mit 10<sup>2</sup> und 10<sup>6</sup> Fokus-bildenden Einheiten (ffu) von LGTV, Torö-2003 oder HB171/11 in PBS oder handelsüblicher Vollmilch (3,5%) infiziert. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich beurteilt. Spätestens bei einer mittleren Belastung wurden die Tiere sofort getötet. Eine Score-Tabelle mit definierten Abbruchkriterien ist in dieser Arbeit im Anhang beigefügt.

## 5.10 **Haltungsbedingungen der Transmissionsexperimente**

### Zusammensetzung des Experiments: Übertragung durch physischen Kontakt

Wildtyp, *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, *Rag2γc*<sup>-/-</sup> oder *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit 10<sup>2</sup> oder 10<sup>4</sup> ffu LGTV oder TBEV (Torö-2003) (Index) infiziert. Index-Mäuse wurden zusammen mit naiven Wildtyp-, *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, *Rag2γc*<sup>-/-</sup> oder *Rag2*<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontakt) gehalten.

### Versuchszusammensetzung: Übertragung über Luft

Infizierte *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (10<sup>2</sup> ffu LGTV) Index-Mäuse und Kontakt-Mäuse wurden 21 Tage lang in einem Käfig platziert. Physischer Kontakt wurde durch das Vorhandensein von 2 mm Maschenweite verhindert, wobei ein Abstand von 4 cm bereitgestellt wurde. In diesem Wohnszenario war der Luftstrom zwischen den beiden Kompartimenten uneingeschränkt, aber Index- und Kontakt-Mäuse hatten keinen direkten Kontakt miteinander und teilten keine Nahrungsmittel- und Wasserquellen.

### Zusammensetzung des Experiments: Übertragung über nicht-physischen Kontakt

Infizierte *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (10<sup>2</sup> ffu LGTV) Index-Mäuse wurden 24 Stunden in einem Käfig gehalten, bevor sie in einen neuen Käfig überführt wurden. Naive *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse wurden in den Käfig überführt, in dem zuvor die infizierten Index-Mäuse lebten. Kontakt-Mäuse hatten Kontakt zu Streu, Kot, Urin, Futter und Wasser der Index-Mäuse. Das Verfahren wurde 5 Tage fortgesetzt.

### Versuchszusammensetzung: Direkter Kontakt zu Kot / Urin

Infizierte *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (10<sup>2</sup> ffu LGTV) -Index-Mäuse wurden alternativ 12 Stunden in Käfigen ohne Einstreu/Nestmaterial oder mit Einstreu/Nestmaterial gehalten. Naive *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Kontakt-Mäuse wurden in den Käfig überführt, in dem zuvor die infizierten Index-Mäuse lebten. Wasserflasche und Lebensmittel wurden vor jedem Transfer ausgetauscht. Das Verfahren wurde 5 Tage fortgesetzt.

### **5.11 Probenentnahme von Kot, Urin, Speichel, Nase und Augenabstrichen**

Kot und Urin wurden gesammelt, indem Mäuse in ein Becherglas gesetzt wurden und gewartet wurde, bis sie freiwillig Kot und Urin abgesetzt hatten. Nach Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere durch Inhalation von CO<sub>2</sub> getötet und Speichel-, Augen- und Nasensekret entnommen. Der Abstrich wurde mit einem in PBS (Gibco) getränkten Tupfer (CLS Medizin-Technik + Vertrieb) gesammelt.

### **5.12 Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte durch eine Herzbeutelpunktion. Direkt nach dem Tod der Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation wurde der Brustkorb eröffnet und Blut durch Punktion des Herzens entnommen. Um Serum zu erhalten, wurde das Blut 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen um zu koagulieren und anschließend 10 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Die klare Schicht wurde als Serum gesammelt. Das Serum und der Rest des Blutes wurden bei -20 °C gelagert.

### **5.13 Probenentnahme von Organen und Geweben für die quantitative real time RT-PCR**

Die Organ- und Gewebeproben wurden bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert. Für die Probenentnahme wurden die Mäuse durch Inhalation von CO<sub>2</sub> betäubt und unmittelbar danach durch transkardiale Perfusion mit 20 ml 1× PBS (Gibco) getötet.

### **5.14 RNA Extraktion**

Zur RNA-Extraktion wurden Lymphknoten, Milz, Speicheldrüse, Gehirnteile, nasal assoziiertes Lymphgewebe, Nasenepithel und Kot in peqGOLD TriFast (PeqLab) unter Verwendung eines Fast-Prep-24-Homogenisators (MP) homogenisiert. Die TBEV RNA wurde unter Verwendung des Nucleo-Spin RNA II-Kits (Macherey-Nagel) extrahiert. LGTV RNA aus Urin, Augensekretion, Nase und Speichel wurde unter Verwendung des QIAmp-Virus-RNA-Mini-Kits (Qiagen) von den Tupfern gemäß der Anweisung des Herstellers isoliert. Die Extraktion der LGTV RNA aus Lymphknoten, Milz, Speicheldrüse, Gehirnteile, NALT, Nasenepithel und Kot wurde mittels Zwei-Phasen-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurden in ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß 200 µL Chloroform (Fluka Analytical) vorgelegt und 1 ml der homogenisierten Probe

zugegeben und für 15 Sekunden in der Hand geschüttelt. Nach einer Ruhephase von 10 Minuten bei RT erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C. In ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß wurde 500 µL Isopropanol (J.T. Baker) vorgelegt und die klare Phase der abzentrifugierten Probe beigemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol (Otto Fischar GmbH & Co. KG) gewaschen und bei 13.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 60 µL RNase freiem Wasser resuspendiert. Die Messung der RNA erfolgte am NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). Die cDNA-Synthese der RNA aus den TBEV Proben wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription (RT) Kit (Qiagen) durchgeführt. Die cDNA-Synthese der LGTV RNA erfolgte mit dem M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt.

### **5.15 Quantitative real time RT-PCR**

#### LGTV RNA

LGTV RNA wurde mit dem KAPA probe FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems) unter Verwendung von LGTV NS3 (Vorwärtsprimer 5'-AACGGAGCCATAGCCAGTGA-3', Rückwärtsprimer 5'-AACCCGTCCCGCCACTC-3', Sonde FAM-AGAGACAGATCCCTGATGG-MGB) bestimmt. Dazu wurden 5 µL der cDNA-Synthese eingesetzt (500 ng RNA). Die Proben wurden mit dem LightCycler® 480 Instrument II (Roche) gemessen. Das Verhältnis von LGTV/β-Aktin oder die Kopienanzahl von LGTV wurde mit der LightCycler® Software 480 II (Roche) analysiert.

#### TBEV RNA und RNA der Zytokine

Die RNA von Maus-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Mm\_Gapdh\_3\_SG QT01658692), Interleukin-6 (IL-6; Mm\_Il6\_1\_SG QT00098875), Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α; Mm\_Tnf\_1\_SG QT00104006) und Chemokin CXCL-10 (Mm\_Cxcl10\_1\_SG QT00093436) wurde durch validierte QuantiTect-Primer-Assays (Qiagen) und den KAPA SYBR FAST qPCR Kit unter Verwendung des Fast-Real-Time-PCR-Systems 7900HT (Applied Biosystems) analysiert. Virale TBEV RNAs wurden mit TaqMan-Sonden für TBEV (Vorwärtsprimer 5'-GGG CGG TTC TTG TTC TCC-3', Rückwärtsprimer 5'-ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT-3', Sonde FAM- TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA) [226] und dem KAPA-probe FAST qPCR-Kit (KAPA Biosystems) nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des

Housekeeping-Gens GAPDH normalisiert und als Fold Change relativ zu RNA-Proben von scheininfizierten Mäusen unter Verwendung der Methode des Vergleichsschwellenzyklus ( $\Delta\Delta CT$ ) analysiert.

### **5.16 Neutralisierungsassay**

Der Neutralisierungsassay wurde, wie zuvor von *Charan und Zinkernagel* beschrieben, [227] durchgeführt. VeroB4-Zellen wurden auf 96-Well-Platten in RPMI 1640 (Gibco), 10% FCS (Merck Millipore), 1 % Natriumpyruvat (Gibco), 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/ml Penicillin (Gibco) und 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin (Gibco) ausplattiert. Für jede Serumverdünnung wurden  $1.4 \times 10^3$  ffu LGTV Viruspartikel in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben, gemischt und 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Gemisch wurde zu VeroB4-Zellen gegeben, 6-7 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, mit 1× PBS (Gibco) gewaschen, 1 Stunde bei RT mit 6 % Formaldehyd (Carl Roth GmbH) fixiert und mit Kristallviolett (Sigma Aldrich) für 30 Minuten gefärbt.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] G. Dobler, "Zoonotic tick-borne flaviviruses," *Veterinary Microbiology*, vol. 140, no. 3–4. Elsevier, pp. 221–228, Jan. 27, 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.024.
- [2] H. Weissenböck, Z. Hubálek, T. Bakonyi, and N. Nowotny, "Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases," *Veterinary Microbiology*, vol. 140, no. 3–4. Elsevier, pp. 271–280, Jan. 27, 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.025.
- [3] T. S. Gritsun and E. A. Gould, "Tick-Borne Encephalitis Viruses," in *Encyclopedia of Virology*, Elsevier, 2008, pp. 45–54.
- [4] E. Gould and T. Solomon, "Pathogenic flaviviruses," *The Lancet*, vol. 371, no. 9611. Elsevier B.V., pp. 500–509, 2008, doi: 10.1016/S0140-6736(08)60238-X.
- [5] V. Sambri *et al.*, "West Nile virus in Europe: Emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 19, no. 8. Blackwell Publishing Ltd, pp. 699–704, Aug. 01, 2013, doi: 10.1111/1469-0691.12211.
- [6] A. E. Platonov *et al.*, "Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 7, no. 1, pp. 128–132, 2001, doi: 10.3201/eid0701.010118.
- [7] T. Bakonyi and J. M. Haussig, "West nile virus keeps on moving up in Europe," *Eurosurveillance*, vol. 25, no. 46. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Nov. 01, 2020, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001938.
- [8] S. C. Weaver *et al.*, "Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control," *Antiviral Research*, vol. 130. Elsevier B.V., pp. 69–80, Jun. 01, 2016, doi: 10.1016/j.antiviral.2016.03.010.
- [9] U. Ziegler *et al.*, "West Nile virus epidemic in Germany triggered by epizootic emergence, 2019," *Viruses*, vol. 12, no. 4. MDPI AG, Apr. 01, 2020, doi: 10.3390/v12040448.
- [10] M. Dekker, G. D. Laverman, A. de Vries, J. Reimerink, and F. Geeraedts, "Emergence of tick-borne encephalitis (TBE) in the Netherlands," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 10, no. 1, pp. 176–179, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.10.008.
- [11] Robert-Koch-Institut, "FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: April 2011)," 2002. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/Ausgaben/17\\_11.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/Ausgaben/17_11.pdf?__blob=publicationFile) (accessed Feb. 22, 2021).
- [12] Robert-Koch-Institut, "RKI - Archiv 2021 - FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2021)," 2021. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2021/09/Art\\_01.html;jsessionid=F5A86683D46A41B3B7766411F314FAAD.internet072](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2021/09/Art_01.html;jsessionid=F5A86683D46A41B3B7766411F314FAAD.internet072) (accessed Apr. 21, 2021).
- [13] R. J. Kuhn *et al.*, "Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion," *Cell*, vol. 108, no. 5, pp. 717–725, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00660-8.
- [14] X. Wang *et al.*, "Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus reveals critical determinants of virulence and stability," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00024-6.
- [15] D. Sirohi *et al.*, "The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus," *Science (80-. )*, vol. 352, no. 6284, pp. 467–470, Apr. 2016, doi: 10.1126/science.aaf5316.

- [16] F. X. Heinz and C. W. Mandl, "The molecular biology of tick-borne encephalitis virus," *APMIS*, vol. 101, no. 7–12. APMIS, pp. 735–745, 1993, doi: 10.1111/j.1699-0463.1993.tb00174.x.
- [17] T. S. Gritsun, P. A. Nuttall, and E. A. Gould, "Tick-borne Flaviviruses," in *Advances in Virus Research*, vol. 61, Academic Press Inc., 2003, pp. 317–371.
- [18] C. W. Mandl, F. X. Heinz, E. Stöckl, and C. Kunz, "Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses.," *Virology*, vol. 173, no. 1, pp. 291–301, Nov. 1989, doi: 10.1016/0042-6822(89)90246-8.
- [19] G. Kuno and G. J. J. Chang, "Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses," *Arch. Virol.*, vol. 152, no. 4, pp. 687–696, Apr. 2007, doi: 10.1007/s00705-006-0903-z.
- [20] B. D. Lindenbach and C. M. Rice, "Molecular biology of flaviviruses," *Adv. Virus Res.*, vol. 59, pp. 23–61, 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)59002-9.
- [21] I. Slávik, E. Mrena, and V. Mayer, "Studies on Tick-borne encephalitis virus. II. Virus morphology and some data on virus structure.," *Acta Virol.*, vol. 14, no. 1, pp. 8–16, Jan. 1970.
- [22] R. Lindqvist *et al.*, "The envelope protein of tick-borne encephalitis virus influences neuron entry, pathogenicity, and vaccine protection," *J. Neuroinflammation*, vol. 17, no. 1, Sep. 2020, doi: 10.1186/s12974-020-01943-w.
- [23] R. Kanai *et al.*, "Crystal Structure of West Nile Virus Envelope Glycoprotein Reveals Viral Surface Epitopes," *J. Virol.*, vol. 80, no. 22, pp. 11000–11008, Nov. 2006, doi: 10.1128/jvi.01735-06.
- [24] H. Holzmann, K. Stiasny, H. York, F. Dorner, C. Kunz, and F. X. Heinz, "Tick-borne encephalitis virus envelope protein E-specific monoclonal antibodies for the study of low pH-induced conformational changes and immature virions," *Arch. Virol.*, vol. 140, no. 2, pp. 213–221, Feb. 1995, doi: 10.1007/BF01309857.
- [25] K. P. Wu *et al.*, "Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: Solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 46, pp. 46007–46013, Nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M307776200.
- [26] J. Fan, Y. Liu, X. Xie, B. Zhang, and Z. Yuan, "Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by flavivirus recombinant E protein domain III," *Virol. Sin.*, vol. 28, no. 3, pp. 152–160, Jun. 2013, doi: 10.1007/s12250-013-3331-8.
- [27] J. A. Roby, Y. X. Setoh, R. A. Hall, and A. A. Khromykh, "Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins," *Journal of General Virology*, vol. 96, no. 7. Society for General Microbiology, pp. 1551–1569, Jul. 01, 2015, doi: 10.1099/vir.0.000097.
- [28] S. Elshuber, S. L. Allison, F. X. Heinz, and C. W. Mandl, "Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus," *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 1. pp. 183–191, Jan. 01, 2003, doi: 10.1099/vir.0.18723-0.
- [29] K. Stadler, S. L. Allison, J. Schalich, and F. X. Heinz, "Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin.," *J. Virol.*, vol. 71, no. 11, pp. 8475–8481, 1997, doi: 10.1128/jvi.71.11.8475-8481.1997.
- [30] B. D. Lindenbach and C. M. Rice, "trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication.," *J. Virol.*, vol. 71, no. 12, 1997.

- [31] S. Youn, R. L. Ambrose, J. M. Mackenzie, and M. S. Diamond, "Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis.," *Viol. J.*, vol. 10, p. 339, Nov. 2013, doi: 10.1186/1743-422X-10-339.
- [32] E. A. Gould, A. Buckley, A. D. T. Barrett, and N. Cammack, "Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice," *J. Gen. Virol.*, vol. 67, no. 3, pp. 591–595, Mar. 1986, doi: 10.1099/0022-1317-67-3-591.
- [33] J. Chen, M. M. L. Ng, and J. J. H. Chu, "Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection," *PLoS Pathog.*, vol. 11, no. 7, p. e1005053, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1005053.
- [34] P. Avirutnan, R. E. Hauhart, P. Somnuek, A. M. Blom, M. S. Diamond, and J. P. Atkinson, "Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 1, pp. 424–433, Jul. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1100750.
- [35] V. F. Yamshchikov and R. W. Compans, "Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 4, pp. 1995–2003, 1995, doi: 10.1128/jvi.69.4.1995-2003.1995.
- [36] T. J. Chambers *et al.*, "Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 22, pp. 8898–8902, 1990, doi: 10.1073/pnas.87.22.8898.
- [37] B. Falgout, M. Pethel, Y. M. Zhang, and C. J. Lai, "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins.," *J. Virol.*, vol. 65, no. 5, pp. 2467–2475, 1991, doi: 10.1128/jvi.65.5.2467-2475.1991.
- [38] A. E. Matusan, M. J. Pryor, A. D. Davidson, and P. J. Wright, "Mutagenesis of the Dengue Virus Type 2 NS3 Protein within and outside Helicase Motifs: Effects on Enzyme Activity and Virus Replication," *J. Virol.*, vol. 75, no. 20, pp. 9633–9643, Oct. 2001, doi: 10.1128/jvi.75.20.9633-9643.2001.
- [39] G. Wengler and G. Wengler, "The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity," *Virology*, vol. 197, no. 1, pp. 265–273, Nov. 1993, doi: 10.1006/viro.1993.1587.
- [40] H. Li, S. Clum, S. You, K. E. Ebner, and R. Padmanabhan, "The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids.," *J. Virol.*, vol. 73, no. 4, pp. 3108–3116, Apr. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.4.3108-3116.1999.
- [41] J. Zou *et al.*, "Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction," *J. Virol.*, vol. 89, no. 7, pp. 3455–3470, Apr. 2015, doi: 10.1128/jvi.03453-14.
- [42] X. D. Li *et al.*, "Genetic interaction between NS4A and NS4B for replication of Japanese encephalitis virus," *J. Gen. Virol.*, vol. 96, no. Pt 6, pp. 1264–1275, 2015, doi: 10.1099/vir.0.000044.
- [43] J. L. Muñoz-Jordán *et al.*, "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses.," *J. Virol.*, vol. 79, no. 13, pp. 8004–13, Jul. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005.

- [44] J. L. Muñoz-Jordán, G. G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, and A. García-Sastre, "Inhibition of interferon signaling by dengue virus," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. SUPPL. 2, pp. 14333–14338, Nov. 2003, doi: 10.1073/pnas.2335168100.
- [45] D. Ray *et al.*, "West Nile Virus 5'-Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N-7 and Ribose 2'-O Methylations by Nonstructural Protein 5," *J. Virol.*, vol. 80, no. 17, pp. 8362–8370, Sep. 2006, doi: 10.1128/jvi.00814-06.
- [46] G. Lu and P. Gong, "A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus," *Virus Research*, vol. 234. Elsevier B.V., pp. 34–43, Apr. 15, 2017, doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.020.
- [47] T. L. Yap *et al.*, "Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution," *J. Virol.*, vol. 81, no. 9, pp. 4753–4765, May 2007, doi: 10.1128/jvi.02283-06.
- [48] H. Malet *et al.*, "Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 14, pp. 10678–10689, Apr. 2007, doi: 10.1074/jbc.M607273200.
- [49] K. J. Lubick *et al.*, "Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 surface expression," *Cell Host Microbe*, vol. 18, no. 1, pp. 61–74, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.chom.2015.06.007.
- [50] M. Laurent-Rolle *et al.*, "The NS5 Protein of the Virulent West Nile Virus NY99 Strain Is a Potent Antagonist of Type I Interferon-Mediated JAK-STAT Signaling," *J. Virol.*, vol. 84, no. 7, pp. 3503–3515, Apr. 2010, doi: 10.1128/jvi.01161-09.
- [51] A. Grant *et al.*, "Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling," *Cell Host Microbe*, vol. 19, no. 6, pp. 882–890, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009.
- [52] M. Mazzon, M. Jones, A. Davidson, B. Chain, and M. Jacobs, "Dengue virus ns5 inhibits interferon- $\alpha$  signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation," *J. Infect. Dis.*, vol. 200, no. 8, pp. 1261–1270, Oct. 2009, doi: 10.1086/605847.
- [53] S. M. Best *et al.*, "Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist," *J. Virol.*, vol. 79, no. 20, pp. 12828–39, Oct. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.20.12828-12839.2005.
- [54] G. S. Park, K. L. Morris, R. G. Hallett, M. E. Bloom, and S. M. Best, "Identification of Residues Critical for the Interferon Antagonist Function of Langkat Virus NS5 Reveals a Role for the RNA-Dependent RNA Polymerase Domain," *J. Virol.*, vol. 81, no. 13, pp. 6936–6946, Jul. 2007, doi: 10.1128/jvi.02830-06.
- [55] M. Haglund and G. Günther, "Tick-borne encephalitis - Pathogenesis, clinical course and long-term follow-up," *Vaccine*, vol. 21, no. SUPPL. 1. Elsevier BV, pp. S11–S18, Apr. 01, 2003, doi: 10.1016/S0264-410X(02)00811-3.
- [56] D. Demetriades and B. Rabinowitz, "A Prospective Study of 651 Patients," *Ann. Surg.*, vol. 205, no. 2, pp. 129–132, 1987, doi: 10.1097/0000658-198702000-00005.
- [57] R. Kaiser, "The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98. A prospective study of 656 patients," *Brain*, vol. 122, no. 11, pp. 2067–2078, Nov. 1999, doi: 10.1093/brain/122.11.2067.

- [58] T. E. Commission, "Commission Decision of 3 September 2012 amending Decision 2000/96/EC as regards tick-borne encephalitis and the category of vector-borne communicable diseases (notified under document C(2012) 3241)Text with EEA relevance," 2012. Accessed: Apr. 14, 2021. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:239:0003:0004:EN:PDF>.
- [59] S. Randolph, "Tick-borne encephalitis," in *Environnement, Risques et Sante*, 2002, vol. 1, no. SPEC. 1, Accessed: Apr. 21, 2021. [Online]. Available: [https://www.who.int/health-topics/tick-borne-encephalitis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/tick-borne-encephalitis#tab=tab_1).
- [60] O. Donoso Mantke, R. Schädler, and M. Niedrig, "A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries.," *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, vol. 13, no. 17. European Centre for Disease Prevention and Control, p. 18848, Apr. 24, 2008, doi: 10.2807/ese.13.17.18848-en.
- [61] S. Y. Kovalev, D. N. Chernykh, V. S. Kokorev, T. E. Snitkovskaya, and V. V. Romanenko, "Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries," *J. Gen. Virol.*, vol. 90, no. 12, pp. 2884–2892, Dec. 2009, doi: 10.1099/vir.0.012419-0.
- [62] S. Y. Kovalev, V. S. Kokorev, and I. V. Belyaeva, "Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union," *J. Gen. Virol.*, vol. 91, no. 12, pp. 2941–2946, Dec. 2010, doi: 10.1099/vir.0.023879-0.
- [63] O. Donoso Mantke, C. Escadafal, M. Niedrig, M. Pfeffer, and collective on behalf of the Working group for, "Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009," *Eurosurveillance*, vol. 16, no. 39, p. 19976, Sep. 2011, doi: 10.2807/ese.16.39.19976-en.
- [64] K. Yoshii, J. Y. Song, S. B. Park, J. Yang, and H. J. Schmitt, "Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China," *Emerging microbes & infections*, vol. 6, no. 9. Emerg Microbes Infect, p. e82, Sep. 20, 2017, doi: 10.1038/emi.2017.69.
- [65] G. Dobler and S. Tkachev, "General epidemiology of TBE," in *The TBE Book*, 2nd ed., D. Dobler, W. Erber, M. Bröker, and H. Schmitt, Eds. Singapore: Global Health Press Pte Ltd, 2019, pp. 192–211.
- [66] M. Bestehorn *et al.*, "Phylogenetics of tick-borne encephalitis virus in endemic foci in the upper Rhine region in France and Germany," *PLoS One*, vol. 13, no. 10, p. e0204790, Oct. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0204790.
- [67] M. Haglund *et al.*, "Characterisation of Human Tick-Borne Encephalitis Virus From Sweden," *J. Med. Virol.*, vol. 71, no. 4, pp. 610–621, Dec. 2003, doi: 10.1002/jmv.10497.
- [68] O. O. Yurchenko, D. O. Dubina, N. O. Vynograd, and J. P. Gonzalez, "Partial Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus Isolates from Ticks of Southern Ukraine," *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 17, no. 8, pp. 550–557, Aug. 2017, doi: 10.1089/vbz.2016.2094.
- [69] S. Y. Kim *et al.*, "Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea," *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 8, no. 1, pp. 7–13, Feb. 2008, doi: 10.1089/vbz.2006.0634.
- [70] T. V. Demina *et al.*, "Comparative analysis of complete genome sequences of European subtype tick-borne encephalitis virus strains isolated from Ixodes persulcatus ticks, long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*), and human blood in the Asian part of Russia," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 8, no. 4, pp. 547–553, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.03.002.
- [71] M. Ecker, S. L. Allison, T. Meixner, and F. X. Heinz, "Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia," *J. Gen. Virol.*, vol. 80, no. 1, pp. 179–185, 1999, doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179.

- [72] D. Hayasaka *et al.*, “Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia,” *J. Gen. Virol.*, vol. 80, no. 12, pp. 3127–3135, 1999, doi: 10.1099/0022-1317-80-12-3127.
- [73] G. N. Leonova and S. I. Belikov, “Phylogenetic analysis and distribution of far eastern tick-borne encephalitis virus subtype (Flaviridae, Flavivirus, TBEV-FE) from Asia,” *Vopr. Virusol.*, vol. 64, no. 5, pp. 250–256, 2019, doi: 10.36233/0507-4088-2019-64-5-250-256.
- [74] N. M. Pukhovskaya *et al.*, “Tick-borne encephalitis virus in arthropod vectors in the Far East of Russia,” *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 9, no. 4, pp. 824–833, May 2018, doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.01.020.
- [75] A. Jääskeläinen *et al.*, “Siberian subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* in a newly emerged focus, Finland,” *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 7, no. 1, pp. 216–223, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.013.
- [76] A. E. Jääskeläinen, T. Tikkakoski, N. Y. Uzcátegui, A. N. Alekseev, A. Vaheri, and O. Vapalahti, “Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 10, pp. 1568–1571, 2006, doi: 10.3201/eid1210.060320.
- [77] I. Golovljova, S. Vene, K. B. Sjölander, V. Vasilenko, A. Plyusnin, and Å. Lundkvist, “Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia,” *J. Med. Virol.*, vol. 74, no. 4, pp. 580–588, Dec. 2004, doi: 10.1002/jmv.20224.
- [78] A. Dmitrovskiy, “TBE in Kazakhstan,” in *The TBE Book*, 2nd ed., G. Dobler, W. Erber, M. Bröker, and H. J. Schmitt, Eds. Global Health Press Pte Ltd, 2019, pp. 315–321.
- [79] S. Frey *et al.*, “Isolation, preliminary characterization, and full-genome analyses of tick-borne encephalitis virus from Mongolia,” *Virus Genes*, vol. 45, no. 3, pp. 413–425, Dec. 2012, doi: 10.1007/s11262-012-0795-9.
- [80] L. Chitimia-Dobler, U. Mackenstedt, O. Kahl, and T. Petney, “Transmission/Natural Cycle,” in *The TBE Book*, 2nd ed., G. Dobler, W. Erber, M. Bröker, and H. J. Schmitt, Eds. Singapore: Global Health Press Pte Ltd, 2019, pp. 62–86.
- [81] T. Smura *et al.*, “Recent establishment of tick-borne encephalitis foci with distinct viral lineages in the Helsinki area, Finland,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 8, no. 1, pp. 675–683, Jan. 2019, doi: 10.1080/22221751.2019.1612279.
- [82] T. V. Demina *et al.*, “Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes,” *J. Med. Virol.*, vol. 82, no. 6, pp. 965–976, May 2010, doi: 10.1002/jmv.21765.
- [83] I. V. Kozlova *et al.*, “Genetic and Biological Properties of Original TBEV Strains Group Circulating in Eastern Siberia,” in *Encephalitis*, 2013.
- [84] X. Dai, G. Shang, S. Lu, J. Yang, and J. Xu, “A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China article,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41426-018-0081-6.
- [85] A. A. Guglielmone, D. A. Apanaskevich, A. Estrada-Peña, R. G. Robbins, T. N. Petney, and I. G. Horak, *The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. Springer Netherlands, 2014.
- [86] V. Danielová, J. Holubová, M. Pejčoch, and M. Daniel, “Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus,” *Folia Parasitol. (Praha)*, vol. 49, no. 4, pp. 323–325, 2002, doi: 10.14411/fp.2002.060.
- [87] P. A. Nuttall and M. Labuda, “Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface,” *Adv. Virus Res.*, vol. 60, pp. 233–272, 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)60007-2.

- [88] M. Labuda *et al.*, "Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission," *Virology*, vol. 219, no. 2, pp. 357–366, May 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0261.
- [89] R. Rosà, A. Pugliese, R. Norman, and P. J. Hudson, "Thresholds for disease persistence in models for tick-borne infections including non-viraemic transmission, extended feeding and tick aggregation," *J. Theor. Biol.*, vol. 224, no. 3, pp. 359–376, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0022-5193(03)00173-5.
- [90] M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams, V. Danielova, and P. A. Nuttall, "Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks.," *J. Med. Entomol.*, vol. 30, no. 1, pp. 295–299, 1993, doi: 10.1093/jmedent/30.1.295.
- [91] M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams, and P. A. Nuttall, "Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 7, no. 2, pp. 193–196, Apr. 1993, doi: 10.1111/j.1365-2915.1993.tb00674.x.
- [92] E. Tonteri *et al.*, "Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 72–75, Jan. 2011, doi: 10.3201/eid1701.100051.
- [93] K. Achazi *et al.*, "Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus," *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 11, no. 6, pp. 641–647, Jun. 2011, doi: 10.1089/vbz.2010.0236.
- [94] V. Zöldi, T. Papp, J. Reiczigel, and L. Egyed, "Bank voles show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary," *Infect. Dis. (Auckl.)*, vol. 47, no. 3, pp. 178–181, 2015, doi: 10.3109/00365548.2014.975743.
- [95] M. A. Rieger *et al.*, "Foxes as indicators for TBE endemicity - A comparative serological investigation," in *Zentralblatt für Bakteriologie*, Dec. 1999, vol. 289, no. 5–7, pp. 610–618, doi: 10.1016/S0934-8840(99)80017-6.
- [96] T. P. Mikryukova *et al.*, "Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia)," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 5, no. 2, pp. 145–151, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.10.004.
- [97] E. Cisek, A. Wójcik-Fatla, V. Zajac, J. Sroka, A. Buczek, and J. Dutkiewicz, "Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in Eastern Poland," *Ann. Agric. Environ. Med.*, vol. 17, pp. 283–286, 2010, doi: 17283 [pii].
- [98] Z. Balogh *et al.*, "Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk," *J. Virol. Methods*, vol. 163, no. 2, pp. 481–485, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jviromet.2009.10.003.
- [99] S. O. Brockmann *et al.*, "A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016," *Eurosurveillance*, vol. 23, no. 15, pp. 17–00336, Apr. 2018, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.15.17-00336.
- [100] L. Markovinović *et al.*, "An outbreak of tick-borne encephalitis associated with raw goat milk and cheese consumption, Croatia, 2015," *Infection*, vol. 44, no. 5, pp. 661–665, Oct. 2016, doi: 10.1007/s15010-016-0917-8.
- [101] K. M. Paulsen *et al.*, "Tick-borne encephalitis virus in cows and unpasteurized cow milk from Norway," *Zoonoses Public Health*, vol. 66, no. 2, pp. 216–222, Dec. 2019, doi: 10.1111/zph.12554.

- [102] T. S. Gritsun, V. A. Lashkevich, and E. A. Gould, "Tick-borne encephalitis.," *Antiviral Res.*, vol. 57, no. 1–2, pp. 129–46, Jan. 2003, Accessed: Jul. 16, 2014. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615309>.
- [103] R. Kaiser, "Tick-Borne Encephalitis," *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 22, no. 3, pp. 561–575, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.idc.2008.03.013.
- [104] G. Günther, M. Haglund, L. Lindquist, M. Forsgren, and B. Sköldenberg, "Tick-borne encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningo-encephalitis of other etiology: A prospective study of clinical course and outcome," *J. Neurol.*, vol. 244, no. 4, pp. 230–238, 1997, doi: 10.1007/s004150050077.
- [105] N. Barp, A. Trentini, M. Di Nuzzo, V. Mondardini, E. Francavilla, and C. Contini, "Clinical and laboratory findings in tick-borne encephalitis virus infection," *Parasite Epidemiol. Control*, vol. 10, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.parepi.2020.e00160.
- [106] R. Kaiser, "[Epidemiology and progress of early summer meningoencephalitis in Baden-Württemberg between 1994 and 1999. A prospective study of 731 patients].," *Dtsch. Med. Wochenschr.*, vol. 125, no. 39, pp. 1147–1153, Sep. 2000, doi: 10.1055/s-2000-7668.
- [107] G. Karelis *et al.*, "Tick-borne encephalitis in Latvia 1973-2009: epidemiology, clinical features and sequelae.," *Eur. J. Neurol.*, vol. 19, no. 1, pp. 62–68, Jan. 2012, doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03434.x.
- [108] P. Czupryna, A. Moniuszko, S. A. Pancewicz, S. Grygorczuk, M. Kondrusik, and J. Zajkowska, "Tick-borne encephalitis in Poland in years 1993-2008 - epidemiology and clinical presentation. A retrospective study of 687 patients," *Eur. J. Neurol.*, vol. 18, no. 5, pp. 673–679, May 2011, doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03278.x.
- [109] R. Kaiser, "Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults," *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 162, no. 11–12, pp. 239–243, May 2012, doi: 10.1007/s10354-012-0105-0.
- [110] L. Lindquist and O. Vapalahti, "Tick-borne encephalitis.," *Lancet*, vol. 371, no. 9627, pp. 1861–71, May 2008, doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4.
- [111] T. S. Gritsun *et al.*, "Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis," *J. Virol.*, vol. 77, no. 1, pp. 25–36, Jan. 2003, doi: 10.1128/jvi.77.1.25-36.2003.
- [112] T. V Poponnikova, "Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia.," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 296 Suppl, pp. 59–62, May 2006, doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.023.
- [113] D. Zavadska *et al.*, "Recommendations for tick-borne encephalitis vaccination from the Central European Vaccination Awareness Group (CEVAG)," *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 9, no. 2, pp. 362–374, 2013, doi: 10.4161/hv.22766.
- [114] C. E. Gordon Smith, "A Virus Resembling Russian Spring–Summer Encephalitis Virus from an Ixodid Tick in Malaya," *Nature*, vol. 178, no. 4533, pp. 581–582, Sep. 1956, doi: 10.1038/178581a0.
- [115] A. A. Romyantsev, B. R. Murphy, and A. G. Pletnev, "A tick-borne Langat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice.," *J. Virol.*, vol. 80, no. 3, pp. 1427–39, Feb. 2006, doi: 10.1128/JVI.80.3.1427-1439.2006.

- [116] C. W. Mandl, L. Iacono-Connors, G. Wallner, H. Holzmann, C. Kunz, and F. X. Heinz, "Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence tick-borne flaviviruses Langat TP21 and Yelantsev," *Virology*, vol. 185, no. 2, pp. 891–895, 1991, doi: 10.1016/0042-6822(91)90567-U.
- [117] E. Weber *et al.*, "Type I Interferon Protects Mice from Fatal Neurotropic Infection with Langat Virus by Systemic and Local Antiviral Responses," *J. Virol.*, vol. 88, no. 21, pp. 12202–12212, Nov. 2014, doi: 10.1128/jvi.01215-14.
- [118] C. Kurhade *et al.*, "Type I Interferon response in olfactory bulb, the site of tick-borne flavivirus accumulation, is primarily regulated by IPS-1," *J. Neuroinflammation*, vol. 13, no. 1, Jan. 2016, doi: 10.1186/s12974-016-0487-9.
- [119] C. Maffioli, D. Grandgirard, O. Engler, and S. L. Leib, "A tick-borne encephalitis model in infant rats infected with langat virus," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 73, no. 12, pp. 1107–15, Dec. 2014, doi: 10.1097/NEN.000000000000131.
- [120] M. S. Campbell and A. G. Pletnev, "Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence," *Virology*, vol. 269, no. 1, pp. 225–237, 2000, doi: 10.1006/viro.2000.0220.
- [121] E. Gelpi, M. Preusser, F. Garzuly, H. Holzmann, F. X. Heinz, and H. Budka, "Visualization of central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 64, no. 6, pp. 506–512, 2005, doi: 10.1093/jnen/64.6.506.
- [122] O. O. Koyuncu, I. B. Hogue, and L. W. Enquist, "Virus infections in the nervous system," *Cell Host and Microbe*, vol. 13, no. 4, Cell Press, pp. 379–393, Apr. 17, 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.03.010.
- [123] B. Lundh, K. Kristensson, and E. Norrby, "Selective infections of olfactory and respiratory epithelium by Vesicular stomatitis and Sendai virus," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 13, no. 2, pp. 111–122, Mar. 1987, doi: 10.1111/j.1365-2990.1987.tb00175.x.
- [124] D. Van Riel *et al.*, "Evidence for influenza virus CNS invasion along the olfactory route in an immunocompromised infant," *J. Infect. Dis.*, vol. 210, no. 3, pp. 419–423, Aug. 2014, doi: 10.1093/infdis/jiu097.
- [125] F. Lafay *et al.*, "Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation," *Virology*, vol. 183, no. 1, pp. 320–330, 1991, doi: 10.1016/0042-6822(91)90145-2.
- [126] R. S. Tirabassi, R. A. Townley, M. G. Eldridge, and L. W. Enquist, "Molecular mechanisms of neurotropic herpesvirus invasion and spread in the CNS," in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oct. 1998, vol. 22, no. 6, pp. 709–720, doi: 10.1016/S0149-7634(98)00009-8.
- [127] G. Smith, "Herpesvirus transport to the nervous system and back again," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 66, pp. 153–176, Oct. 2012, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150051.
- [128] G. Ugolini, *Rabies Virus as a Transneuronal Tracer of Neuronal Connections*, vol. 79. Adv Virus Res, 2011.
- [129] J. M. Tabor-Godwin *et al.*, "A novel population of myeloid cells responding to coxsackievirus infection assists in the dissemination of virus within the neonatal CNS," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 25, pp. 8676–8691, Jun. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-10.2010.
- [130] R. Peluso, A. Haase, L. Stowring, M. Edwards, and P. Ventura, "A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes," *Virology*, vol. 147, no. 1, pp. 231–236, Nov. 1985, doi: 10.1016/0042-6822(85)90246-6.

- [131] M. E. Baeva, "Crossing Barriers: How JC Virus Crosses the Blood Brain Barrier and Induces Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients on Disease-Modifying Therapies," 2018. Accessed: Apr. 15, 2021. [Online]. Available: <https://jemi.microbiology.ubc.ca/>.
- [132] M. Fiala *et al.*, "TNF- $\alpha$  Opens a Paracellular Route for HIV-1 Invasion across the Blood-Brain Barrier," *Mol. Med.*, vol. 3, no. 8, pp. 553–564, 1997, doi: 10.1007/bf03401701.
- [133] M. P. Papa *et al.*, "Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption.," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 2557, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02557.
- [134] S. Verma *et al.*, "West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier," *Virology*, vol. 385, no. 2, pp. 425–433, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.virol.2008.11.047.
- [135] K. Roe, M. Kumar, S. Lum, B. Orillo, V. R. Nerurkar, and S. Verma, "West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases," *J. Gen. Virol.*, vol. 93, no. 6, pp. 1193–1203, Jun. 2012, doi: 10.1099/vir.0.040899-0.
- [136] A. Louveau, S. Da Mesquita, and J. Kipnis, "Lymphatics in Neurological Disorders: A Neuro-Lympho-Vascular Component of Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease?," *Neuron*, vol. 91, no. 5, Cell Press, pp. 957–973, Sep. 07, 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2016.08.027.
- [137] M. Boulton *et al.*, "Drainage of CSF through lymphatic pathways and arachnoid villi in sheep: Measurement of 125I-albumin clearance," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 22, no. 4, pp. 325–333, 1996, doi: 10.1111/j.1365-2990.1996.tb01111.x.
- [138] M. Johnston, A. Zakharov, C. Papaiconomou, G. Salmasi, and D. Armstrong, "Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species," *Cerebrospinal Fluid Res.*, vol. 1, p. 2, Dec. 2004, doi: 10.1186/1743-8454-1-2.
- [139] A. Aspelund *et al.*, "A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules," *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 7, pp. 991–999, Jun. 2015, doi: 10.1084/jem.20142290.
- [140] A. Louveau *et al.*, "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels," *Nature*, vol. 523, no. 7560, pp. 337–341, Jul. 2015, doi: 10.1038/nature14432.
- [141] J. Kim *et al.*, "Zika virus infects pericytes in the choroid plexus and enters the central nervous system through the blood-cerebrospinal fluid barrier," *PLoS Pathog.*, vol. 16, no. 5, May 2020, doi: 10.1371/journal.ppat.1008204.
- [142] M. Palus *et al.*, "Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus.," *J. Gen. Virol.*, 2014, doi: 10.1099/vir.0.068411-0.
- [143] M. Palus, M. Vancova, J. Sirmarova, J. Elsterova, J. Perner, and D. Ruzek, "Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity," *Virology*, vol. 507, pp. 110–122, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.virol.2017.04.012.
- [144] D. Růžek, J. Salát, S. K. Singh, and J. Kopecký, "Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020472.

- [145] H. Holzmann, "Diagnosis of tick-borne encephalitis," *Vaccine*, vol. 21, no. SUPPL. 1, pp. S36–S40, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0264-410X(02)00819-8.
- [146] A. Saksida, D. Duh, S. Lotrič-Furlan, F. Strle, M. Petrovec, and T. Avšič-Županc, "The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis," *J. Clin. Virol.*, vol. 33, no. 4, pp. 331–335, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.jcv.2004.07.014.
- [147] A. Saksida *et al.*, "Virus RNA load in patients with tick-borne encephalitis, Slovenia," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 7, pp. 1315–1323, Jul. 2018, doi: 10.3201/eid2407.180059.
- [148] M. Yoneyama and T. Fujita, "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors," *Immunological Reviews*, vol. 227, no. 1. Immunol Rev, pp. 54–65, Jan. 2009, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x.
- [149] O. Takeuchi and S. Akira, "Pattern Recognition Receptors and Inflammation," *Cell*, vol. 140, pp. 805–820, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- [150] A. K. Överby, V. L. Popov, M. Niedrig, and F. Weber, "Tick-Borne Encephalitis Virus Delays Interferon Induction and Hides Its Double-Stranded RNA in Intracellular Membrane Vesicles," *J. Virol.*, vol. 84, no. 17, pp. 8470–8483, Sep. 2010, doi: 10.1128/jvi.00176-10.
- [151] H. Oshiumi, K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya, "DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- $\beta$ -inducing potential," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 4, pp. 940–948, Apr. 2010, doi: 10.1002/eji.200940203.
- [152] G. A. Versteeg and A. García-Sastre, "Viral tricks to grid-lock the type I interferon system," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 4. Curr Opin Microbiol, pp. 508–516, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.mib.2010.05.009.
- [153] M. J. Servant, B. Tenoever, and R. Lin, "Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 22, no. 1. Mary Ann Liebert, Inc., pp. 49–58, Jul. 07, 2002, doi: 10.1089/107999002753452656.
- [154] K. Honda and T. Taniguchi, "IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 9. Nat Rev Immunol, pp. 644–658, Sep. 2006, doi: 10.1038/nri1900.
- [155] J. Bromberg and J. E. Darnell, "The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function.," *Oncogene*, vol. 19, no. 21, pp. 2468–73, May 2000, doi: 10.1038/sj.onc.1203476.
- [156] K. Shuai, "Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins.," *Oncogene*, vol. 19, no. 21, pp. 2638–44, May 2000, doi: 10.1038/sj.onc.1203522.
- [157] J. W. Schoggins and C. M. Rice, "Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions," *Current Opinion in Virology*, vol. 1, no. 6. Elsevier B.V., pp. 519–525, 2011, doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.008.
- [158] M. Sato *et al.*, "Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha/\beta$  gene induction," *Immunity*, vol. 13, no. 4, pp. 539–548, 2000, doi: 10.1016/S1074-7613(00)00053-4.
- [159] C. Panayiotou *et al.*, "Viperin Restricts Zika Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Targeting NS3 for Proteasomal Degradation," *J. Virol.*, vol. 92, no. 7, Jan. 2018, doi: 10.1128/jvi.02054-17.

- [160] R. T. Taylor *et al.*, "TRIM79 $\alpha$ , an interferon-stimulated gene product, restricts tick-borne encephalitis virus replication by degrading the viral RNA polymerase," *Cell Host Microbe*, vol. 10, no. 3, pp. 185–196, 2011, doi: 10.1016/j.chom.2011.08.004.
- [161] M. Hirano, K. Yoshii, M. Sakai, R. Hasebe, O. Ichii, and H. Kariwa, "Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures," *J. Gen. Virol.*, vol. 95, pp. 849–861, 2014, doi: 10.1099/vir.0.061432-0.
- [162] E. Gelpi *et al.*, "Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue.," *J. Neurovirol.*, vol. 12, pp. 322–327, 2006, doi: 10.1080/13550280600848746.
- [163] M. Selinger *et al.*, "Analysis of tick-borne encephalitis virus-induced host responses in human cells of neuronal origin and interferon-mediated protection," *J. Gen. Virol.*, vol. 98, no. 8, pp. 2043–2060, Aug. 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000853.
- [164] R. Lindqvist *et al.*, "Fast type I interferon response protects astrocytes from flavivirus infection and virus-induced cytopathic effects," *J. Neuroinflammation*, vol. 13, no. 1, Oct. 2016, doi: 10.1186/s12974-016-0748-7.
- [165] L. C. Borish and J. W. Steinke, "2. Cytokines and chemokines," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 111, no. 2 SUPPL. 2. Mosby Inc., pp. S460–S475, Feb. 01, 2003, doi: 10.1067/mai.2003.108.
- [166] A. V. Vorotnikov, "Chemotaxis: movement, direction, control.," *Biochemistry. (Mosc.)*, vol. 76, no. 13, pp. 1528–1555, Dec. 2011, doi: 10.1134/S0006297911130104.
- [167] E. J. Fernandez and E. Lolis, "Structure, function, and inhibition of chemokines.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 42, pp. 469–499, 2002, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838.
- [168] K. Blom *et al.*, "NK Cell Responses to Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection," *J. Immunol.*, vol. 197, no. 7, pp. 2762–2771, 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1600950.
- [169] A. V. Atrasheuskaya, T. M. Fredeking, and G. M. Ignatyev, "Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 131, no. 1, pp. 148–154, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02050.x.
- [170] M. Palus, P. Formanová, J. Salát, E. Žampachová, J. Elsterová, and D. Růžek, "Analysis of serum levels of cytokines, chemokines, growth factors, and monoamine neurotransmitters in patients with tick-borne encephalitis: Identification of novel inflammatory markers with implications for pathogenesis," *J. Med. Virol.*, vol. 87, no. 5, pp. 885–892, May 2015, doi: 10.1002/jmv.24140.
- [171] M. Palus, E. Žampachová, J. Elsterová, and D. Růžek, "Serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in patients with tick-borne encephalitis," *J. Infect.*, vol. 68, no. 2, pp. 165–169, 2014, doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.028.
- [172] X. Kang *et al.*, "Elevation of matrix metalloproteinase-9 level in cerebrospinal fluid of tick-borne encephalitis patients is associated with igg extravassation and disease severity," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e77427, Nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0077427.
- [173] S. Ž. Lepej *et al.*, "Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis," *Acta Neurol. Scand.*, vol. 115, no. 2, pp. 109–114, Feb. 2007, doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00726.x.

- [174] J. Zajkowska *et al.*, "Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE)," *Adv. Med. Sci.*, vol. 56, no. 2, pp. 311–317, Dec. 2011, doi: 10.2478/v10039-011-0033-z.
- [175] O. M. Koper, J. Kamińska, S. Grygorczuk, J. Zajkowska, and H. Kemon, "CXCL9 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of patients with tick-borne encephalitis," *Arch. Med. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 313–320, Mar. 2018, doi: 10.5114/aoms.2016.58667.
- [176] S. Grygorczuk, J. Zajkowska, R. Swierzińska, S. Pancewicz, M. Kondrusik, and T. Hermanowska-Szpakowicz, "Elevated concentration of the chemokine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) in cerebrospinal fluid and serum of patients with tick borne encephalitis," *Adv. Med. Sci.*, vol. 51, pp. 340–344, 2006.
- [177] S. Grygorczuk *et al.*, "The expression of the chemokine receptor CCR5 in tick-borne encephalitis," *J. Neuroinflammation*, vol. 13, no. 1, p. 45, Feb. 2016, doi: 10.1186/s12974-016-0511-0.
- [178] C. E. Hughes and R. J. B. Nibbs, "A guide to chemokines and their receptors," *FEBS Journal*, vol. 285, no. 16. Blackwell Publishing Ltd, pp. 2944–2971, Aug. 01, 2018, doi: 10.1111/febs.14466.
- [179] D. Michlmayr, S. V. Bardina, C. A. Rodriguez, A. G. Pletnev, and J. K. Lim, "Dual Function of Ccr5 during Langat Virus Encephalitis: Reduction in Neutrophil-Mediated Central Nervous System Inflammation and Increase in T Cell-Mediated Viral Clearance," *J. Immunol.*, vol. 196, no. 11, pp. 4622–4631, Jun. 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1502452.
- [180] D. Růžek *et al.*, "Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus," *Virology*, vol. 374, no. 2, pp. 249–255, May 2008, doi: 10.1016/j.virol.2008.01.010.
- [181] I. Caracciolo *et al.*, "Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in North-Eastern Italy," *J. Clin. Virol.*, vol. 69, pp. 48–51, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.jcv.2015.05.019.
- [182] M. Veje *et al.*, "Detection of Tick-Borne encephalitis virus RNA in urine," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 11, pp. 4111–4112, Nov. 2014, doi: 10.1128/JCM.02428-14.
- [183] S. Schreier, K. Cebulski, and A. Kröger, "Contact-dependent transmission of Langat and tick-borne encephalitis virus in type I interferon receptor-1 deficient mice.," *J. Virol.*, Jan. 2021, doi: 10.1128/jvi.02039-20.
- [184] D. K. Offerdahl, N. G. Clancy, and M. E. Bloom, "Stability of a tick-borne flavivirus in milk," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. MAY, 2016, doi: 10.3389/fbioe.2016.00040.
- [185] N. Asghar *et al.*, "The role of the poly(A) tract in the replication and virulence of tick-borne encephalitis virus," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 39265, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep39265.
- [186] B. P. Daniels *et al.*, "Regional astrocyte IFN signaling restricts pathogenesis during neurotropic viral infection," *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 3, pp. 843–856, Mar. 2017, doi: 10.1172/JCI88720.
- [187] G. Dobler, M. Bestehorn, M. Antwerpen, and A. Överby-Wernstedt, "Complete genome sequence of a low-virulence tick-borne encephalitis virus strain," *Genome Announc.*, vol. 4, no. 5, pp. e01145-16, Oct. 2016, doi: 10.1128/genomeA.01145-16.
- [188] W. Melik, A. S. Nilsson, and M. Johansson, "Detection strategies of tick-borne encephalitis virus in Swedish *Ixodes ricinus* reveal evolutionary characteristics of emerging tick-borne flaviviruses.," *Arch. Virol.*, vol. 152, no. 5, pp. 1027–34, Jan. 2007, doi: 10.1007/s00705-006-0922-9.

- [189] C. Kurhade *et al.*, “Correlation of severity of human tick-borne encephalitis virus disease and pathogenicity in mice,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 9, pp. 1709–1712, Sep. 2018, doi: 10.3201/eid2409.171825.
- [190] G. Karbowski and B. Biernat, “The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus,” *Annals of parasitology*, vol. 62, no. 1. Ann Parasitol, pp. 3–9, 2016, doi: 10.17420/ap6201.25.
- [191] M. Labuda, O. Kozuch, E. Zuffová, E. Elecková, R. S. Hails, and P. A. Nuttall, “Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts,” *Virology*, vol. 235, no. 1, pp. 138–143, Aug. 1997, doi: 10.1006/viro.1997.8622.
- [192] A. Michelitsch *et al.*, “Long-term presence of tick-borne encephalitis virus in experimentally infected bank voles (*Myodes glareolus*),” *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 12, no. 4, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101693.
- [193] A. Michelitsch *et al.*, “In vivo characterization of tick-borne encephalitis virus in bank voles (*Myodes glareolus*),” *Viruses*, vol. 11, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.3390/v11111069.
- [194] E. Tonteri *et al.*, “The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*),” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, Dec. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0081214.
- [195] O. V. Morozova, V. V. Panov, and V. N. Bakhvalova, “Innate and adaptive immunity in wild rodents spontaneously and experimentally infected with the tick-borne encephalitis virus,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 80, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104187.
- [196] A. Molnárová and V. Mayer, “Experimental infection of pregnant mice with viruses of the tick-borne encephalitis (TBE) complex,” *Acta Virol.*, vol. 24, no. 4, p. 297, Jun. 1980, Accessed: Apr. 15, 2020. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6106382>.
- [197] V. N. Bakhvalova, O. F. Potapova, V. V. Panov, and O. V. Morozova, “Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents,” *Virus Res.*, vol. 140, no. 1–2, pp. 172–178, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.virusres.2008.12.001.
- [198] D. R. O’Leary *et al.*, “Birth outcomes following west nile virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004,” *Pediatrics*, vol. 117, no. 3, pp. e537–e545, Mar. 2006, doi: 10.1542/peds.2005-2024.
- [199] F. R. Cugola *et al.*, “The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models,” *Nature*, vol. 534, no. 7606, pp. 267–271, May 2016, doi: 10.1038/nature18296.
- [200] T. Tabata *et al.*, “Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission,” *Cell Host Microbe*, vol. 20, no. 2, pp. 155–166, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.chom.2016.07.002.
- [201] T. Boussemart, P. Babe, G. Sibille, C. Neyret, and C. Berchel, “Prenatal transmission of dengue: Two new cases,” *J. Perinatol.*, vol. 21, no. 4, pp. 255–257, Sep. 2001, doi: 10.1038/sj.jp.7200530.
- [202] R. E. Kelley, J. R. Berger, and B. P. Kelley, “West Nile Virus Meningo-Encephalitis: Possible Sexual Transmission,” *J. La. State Med. Soc.*, vol. 168, no. 1, pp. 21–22, Jan. 2016.
- [203] E. D’Ortenzio *et al.*, “Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 22, pp. 2195–2198, Jun. 2016, doi: 10.1056/nejmc1604449.

- [204] A. Davidson, S. Slavinski, K. Komoto, J. Rakeman, and D. Weiss, "Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016," *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 65, no. 28, pp. 716–717, Jul. 2016, doi: 10.15585/mmwr.mm6528e2.
- [205] L. A. Gerlinskaya, V. N. Bakhvalova, O. V. Morozova, N. A. Tsekhanovskaya, V. A. Matveeva, and M. P. Moshkin, "Sexual transmission of tick-borne encephalitis virus in laboratory mice," *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1997, doi: 10.1007/BF02445427.
- [206] M. C. Bonaldo *et al.*, "Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.1371/journal.pntd.0004816.
- [207] J. R. Sotelo *et al.*, "Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 5, pp. 856–857, May 2017, doi: 10.3201/eid2305.161538.
- [208] D. T. Deckard *et al.*, "Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016," *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 65, no. 14, pp. 372–374, Apr. 2016, doi: 10.15585/mmwr.mm6514a3.
- [209] M. Gresikova-Kohutova, "Effect of pH on infectivity of the tick-borne encephalitis virus.," *Acta Virol.*, vol. 3, pp. 159–167, Jul. 1959, Accessed: Apr. 15, 2020. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13851762>.
- [210] C. Yu, K. Achazi, L. Möller, J. D. Schulzke, M. Niedrig, and R. Bückler, "Tick-borne encephalitis virus replication, intracellular trafficking, and pathogenicity in human intestinal Caco-2 cell monolayers," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96957, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096957.
- [211] N. Nagata *et al.*, "The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 74, no. 3, pp. 250–260, Mar. 2015, doi: 10.1097/NEN.000000000000166.
- [212] C. M. Newman *et al.*, "Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 169, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00246-8.
- [213] T. Avšič-Županc *et al.*, "Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains," *Clin. Diagn. Virol.*, vol. 4, no. 1, pp. 51–59, Jul. 1995, doi: 10.1016/0928-0197(94)00062-Y.
- [214] W. Haymarker, G. E. Sather, and W. M. Hammon, "Accidental Russian spring-summer viral encephalitis cases occurring in two laboratory workers, one fatal, with postmortem study.," *AMA. Arch. Neurol. Psychiatry*, vol. 73, no. 6, pp. 609–630, Jun. 1955.
- [215] I. V. Plakhov, E. E. Arlund, C. Aoki, and C. S. Reiss, "The Earliest Events in Vesicular Stomatitis Virus Infection of the Murine Olfactory Neuroepithelium and Entry of the Central Nervous System," *Virology*, vol. 209, no. 1, pp. 257–262, May 1995, doi: 10.1006/viro.1995.1252.
- [216] M. Kumar, S. Verma, and V. R. Nerurkar, "Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death," *J. Neuroinflammation*, vol. 7, Oct. 2010, doi: 10.1186/1742-2094-7-73.
- [217] M. D. Cain *et al.*, "Virus entry and replication in the brain precedes blood-brain barrier disruption during intranasal alphavirus infection," *J. Neuroimmunol.*, vol. 308, pp. 118–130, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.04.008.
- [218] R. Daneman and A. Prat, "The blood–brain barrier," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 1, Jan. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a020412.

- [219] H. Wolburg and W. Paulus, "Choroid plexus: Biology and pathology," *Acta Neuropathologica*, vol. 119, no. 1. pp. 75–88, Jan. 24, 2010, doi: 10.1007/s00401-009-0627-8.
- [220] D. R. Wilcox, S. S. Folmsbee, W. J. Muller, and R. Longnecker, "The type I interferon response determines differences in choroid plexus susceptibility between newborns and adults in herpes simplex virus encephalitis," *MBio*, vol. 7, no. 2, Apr. 2016, doi: 10.1128/mBio.00437-16.
- [221] C. W. Mandl, S. L. Allison, H. Holzmann, T. Meixner, and F. X. Heinz, "Attenuation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Structure-Based Site-Specific Mutagenesis of a Putative Flavivirus Receptor Binding Site," *J. Virol.*, vol. 74, no. 20, pp. 9601–9609, Oct. 2000, doi: 10.1128/jvi.74.20.9601-9609.2000.
- [222] A. Goto, D. Hayasaka, K. Yoshii, T. Mizutani, H. Kariwa, and I. Takashima, "Genetic and biological comparison of tick-borne encephalitis viruses from Hokkaido and Far-Eastern Russia," 2002.
- [223] D. Hayasaka *et al.*, "Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus," *Journal of General Virology*, vol. 85, no. 4. J Gen Virol, pp. 1007–1018, Apr. 2004, doi: 10.1099/vir.0.19668-0.
- [224] S. I. Belikov, I. G. Kondratov, U. V. Potapova, and G. N. Leonova, "The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094946.
- [225] M. Niedrig *et al.*, "Monoclonal antibodies directed against tick-borne encephalitis virus with neutralizing activity in vivo.," *Acta Virol.*, vol. 38, no. 3, pp. 141–149, Jun. 1994.
- [226] M. Schwaiger and P. Cassinotti, "Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA," *J. Clin. Virol.*, vol. 27, no. 2, pp. 136–145, Jul. 2003, doi: 10.1016/S1386-6532(02)00168-3.
- [227] S. Charan and R. M. Zinkernagel, "Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus," *J. Immunol.*, vol. 136, no. 8, pp. 3057–30561, Apr. 1986, Accessed: Apr. 15, 2020. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3007610>.

## 7. Anlage

### Glossar

°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
µl	Microliter
Abb.	Abbildung
BSL2	Biosicherheitsstufe 2
BSL3	Biosicherheitsstufe 3
C	Kapsid Protein
CB	Cerebrum
Cbel	Cerebellum
CCL	C-C-Motiv-Chemokin Ligand
CCR	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster der Differenzierung
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CXCL	C-X-C Motiv Chemokin
DENV	Dengue Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dpi	Tag nach Infektion
drain	drainierend
dsRNA	doppelsträngige RNA
E	Glykoprotein E
ECDC	Europäische Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
ffu	Fokusbildende Einheit
FSME	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis
h	Stunde
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Hirnstamm
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
i.c.	intrakraniell
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IFNAR	Typ I Interferon-Rezeptor
<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i>	Typ I Interferon-Rezeptor 1 knockout

IFN- $\alpha$	Interferon alpha
IFN- $\beta$	Interferon beta
IL	Interleukin
ing	inguinal
IRF	Interferon-regulierenden Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISRE	Interferon-stimulierte Antwortelement
JAK1/TYK2	Janus-Protein-Tyrosin-Kinasen
JEV	Japanische Enzephalitis Virus
kb	Kilobasen
KFDV	Kyasanur forest disease Viru
LGTV	Langat Virus
LIV	Louping ill Virus
LN	Lymphknoten
M	Membranprotein
MAVS	Mitochondriale antivirale Signalübertragungsprotein
MDA5	Melanom-Differenzierungs-assoziiertes Gen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP-9	Matrix-Metalopeptidase-9 Protein
MoAb	Monoklonaler Antikörper
MucArHB171/11	HB171/11
MyD88	Myeloides Differenzierungs-Primärantwortgen 88
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NALT	Nasal assoziierte Lymphgewebe
NE	Nasales Epithelium
NK	natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NS	nicht-strukturelles Protein
nt	Nukleotid
OB	Bulbus olfactorius
ORF	offener Leserahmen
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekularen Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
POWV	Powassan Virus
prM	Vorläufer Protein M
PRR	Muster-erkennenden Rezeptoren
qRT-PCR	quantitativer <i>real-time</i> PCR
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen-1
RKI	Robert Koch Institut
RLR	RIG-I ähnliche Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Drehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
Sars-CoV2	Sars-Coronavirus 2
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT	Signalwandler und Aktivator der Transkription 1
Tab.	Tabelle
TBE	Tick-borne encephalitis
TBEV	Tick-borne encephalitis Virus
TBEV-EU	TBEV Europäischer Subtyp
TBEV-FE	TBEV Fernöstlicher Subtyp
TBEV-Sib	TBEV Sibirischer Subtyp
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRIF	TIR-Domäne enthaltendes Adapter-induzierendes Interferon $\beta$
TRIM79 $\alpha$	dreigliedriges Motiv Protein 79 $\alpha$
undrain	undrainierend
UTR	nicht-codierende Region
VEEV	Venezolanische Pferdeenzephalomyelitis Virus
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
YEV	Gelbfieberevirus
ZIKV	Zika Virus
ZNS	Zentralnervensystem

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des Genoms von Flaviviren
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ I Interferon Systems
- Abbildung 3: Maus-zu-Maus Übertragung von LGTV
- Abbildung 4: Hohe virale Titer in den Index-Mäusen führen zu einer Maus-zu-Maus Übertragung
- Abbildung 5: Keine Luftübertragung von LGTV
- Abbildung 6: Kontaktlose Transmission von LGTV
- Abbildung 7: Nachweis von LGTV RNA in Sekreten und Exkrementen
- Abbildung 8: Der Infektionsweg beeinflusst die Entstehung einer schweren Infektion
- Abbildung 9: TBEV Transmission von Maus-zu-Maus
- Abbildung 10: Der Infektionsweg beeinflusst die Entwicklung einer schweren TBEV Infektion
- Abbildung 11: Der Verlust von IFNAR1 führt zu einer Virämie während in LGTV Infektion
- Abbildung 12: Systemische LGTV Infektion in der Peripherie
- Abbildung 13: IFNAR1 unterdrückt die LGTV Infektion im ZNS
- Abbildung 14: Olfaktorische Route ist für LGTV nicht Eintrittsweg ins ZNS
- Abbildung 15: LGTV Infektion der tiefen zervikalen Lymphknoten
- Abbildung 16: Aminosäureunterschiede im Genom von HB171/11 und Torö-2003
- Abbildung 17: Analyse des Überlebens von Torö-2003 und HB171/11 infizierten C57BL/6 Mäusen
- Abbildung 18: TBEV Belastung in Milz und Lymphknoten in Torö-2003 und HB171/117 infizierten Wildtyp C57BL/6 Mäusen
- Abbildung 19: TBEV Belastung in Teilen des Darms in Torö-2003 und HB171/11 infizierten Wildtyp Mäusen
- Abbildung 20: Proinflammatorische Immunantwort in Milzen und inguinalen Lymphknoten
- Abbildung 21: Vergleich der Virusreplikation von Torö-2003 und HB171/11 im ZNS
- Abbildung 22: Analyse des Überlebens von Torö-2003 und HB171/11 infizierten C57BL/6 Mäusen nach intrakranieller Injektion

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung aller struktureller und nicht-struktureller Proteine von Flaviviren

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Laborequipment

## Score Sheet: Ableitung von kumulativen Abbruchkriterien

<b>Beobachtung</b> <i>zu erwartende Belastungsanzeichen, deren Gewichtung und zu ergreifende Maßnahmen</i>	<b>Punktwertung</b>
<b>I Körpergewicht</b> - unbeeinflusst oder Anstieg - Gewichtsreduktion <5% - Gewichtsreduktion 5-10% - Gewichtsreduktion 11-14% - Gewichtsreduktion 15-20% - Gewichtsreduktion >20%, <b>alleiniges Abbruchkriterium</b>	0 1 5 10 15 20
<b>II Allgemeinzustand</b> - Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend - Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege) - Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb; erhöhter Muskeltonus - schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus - Verkrampfungen, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten); „Katzenbuckel“; Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an, <b>alleiniges Abbruchkriterium</b>	0 1 5 10 20
<b>III Spontanverhalten</b> - normales Verhalten (Lokomotion, Neugier, Sozialkontakte) - geringe Abweichungen vom Normalverhalten - ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik - Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien; Koordinationsstörungen; Schmerzreaktion beim Berühren <b>alleiniges Abbruchkriterium</b>	0 1 5 20
<b>IV Klinischer Befund</b> - Atmung normal, Schleimhäute gut durchblutet, feucht, glatt, glänzend - geringe Abweichungen von der Normalsituation - schnelle oder flache Atmung	0 1 15
<b>Bewertung, Maßnahmen</b>	<b>Punktsumme</b>
Belastungsgrad 0 = keine Belastung Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; unverzüglich tierärztliche Versorgung einleiten (Analgesie) Belastungsgrad 3 = schwere Belastung; sofort Versuch am betroffenen Tier abbrechen und Tier einschläfern	0 1-9 10-20 21 oder höher

angelehnt an Morton and Griffiths (*Vet Rec.* 1985 Apr 20; 116(16): 431-6)

### **Kontrolle der Tiere:**

Zur Beurteilung des Gesundheitszustandes eines Tieres wird dieses Score Sheet herangezogen. Alle Tiere werden zu Versuchsbeginn und im Verlauf gewogen. Die Tiere werden zusätzlich regelmäßig auf die in der Tabelle aufgeführten Parameter hin beobachtet. Bei Erreichen einer Gesamtpunktzahl von  $\geq 10$  werden die Tiere 2x täglich morgens und abends beurteilt. Sollte eine Punktzahl von 20 erreicht werden, wird das Tier unverzüglich schmerzfrei getötet.

Eine Gewichtsabnahme  $> 20\%$  ist für alle Versuche als alleiniges Abbruchkriterium festgelegt. Zeigt ein Tier einen Gewichtsverlust von  $> 20\%$  berechnet auf sein Ausgangsgewicht, wird es unverzüglich aus dem Versuch genommen und schmerzfrei getötet.

