

Afrikanische Schweinepest – Genetische Varianten auf dem Vormarsch

Sten Calvelage

FLI, Institut für Virusdiagnostik, Labor für NGS und Microarray-Diagnostik



Sten Calvelage
(© M. Jörn, FLI)

Vor etwa zwei Jahren fand die Afrikanische Schweinepest (ASP, engl. African swine fever) ihren Weg über die polnische Grenze nach Deutschland. Am 10. September 2020 detektierte das nationale Referenzlabor für ASP auf der Insel Riems zum ersten Mal den Erreger der Krankheit, das Afrikanische Schweinepest-Virus (kurz ASPV, engl. African swine fever virus), bei einem stark verwesenen Wildschweinkadaver aus

dem Brandenburgischen Spree-Neiße Landkreis. Seitdem hat sich das für Wild- und Hausschweine zumeist tödliche Virus kontinuierlich im Osten der Republik ausgebreitet und konnte mittlerweile bei 4.277 Fällen im Schwarzwild und sieben Ausbrüchen in Hausschweinbetrieben (Stand 14.09.2022) nachgewiesen werden. Parallel zur diagnostischen Abklärung von ASP-Verdachtsfällen durch PCR-Nachweisverfahren wurde frühzeitig das Next-Generation Sequencing (NGS) ausgesuchter ASP-Proben etabliert, um die (molekular)epidemiologische Ausbreitung des Erregers in Deutschland zu verfolgen. Hierfür sollten insbesondere Sequenziermethoden der zweiten Generation Anwendung finden, um die etwa 190.000 Basenpaar lange Sequenz des komplexen, doppelsträngigen DNA-Genoms zu entschlüsseln. Insbesondere die beträchtliche Größe des Genoms als auch lange Homopolymer-Regionen und Tandem-Repeats kurzer Genabschnitte stellen hierbei große Herausforderungen für die Sequenzierung und bioinformatische Auswertung dar – ein Umstand, der sich auch in der verhältnismäßig geringen Zahl publizierter ASPV-Vollgenome widerspiegelt und im Kontrast zum nahezu pandemischen Ausmaß dieser Krise steht. Dass die Vollsequenzierung von ASPV dennoch unverzichtbar ist, zeigt das Beispiel Deutschland.

Genetische Vielfalt von ASPV in Deutschland – Evolution eines pandemischen Erregers

Im Zuge des kontinuierlichen dt. Ausbruchsgeschehens wurden im Zeitraum September 2020 bis August 2021 repräsentative ASP-Proben sequenziert und insgesamt 22 neue ASP-Vollgenome neben der bereits im Oktober 2020 veröffentlichten ersten deutschen ASPV-Sequenz (NCBI Accession Nr. LR899193) generiert. Ein Alignment der 23 deutschen Sequenzen konnte die Zuordnung aller Viren zum ASPV-Genotyp II bestätigen, der sich seit seinem Eintrag 2007 nach Georgien in einer Vielzahl osteuropäischer Länder ausgebreitet hat und 2018 seine westlichste europäische Ausdehnung in einem lokal begrenzten Ausbruch in Belgien erreichte.

Weiterhin weisen die 22 neu generierten ASPV-Vollgenome insgesamt 17 charakteristische Mutationen im Vergleich zur LR899193-Sequenz an Positionen im Genom auf, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Von diesen 17 Mutationen betreffen 13 Mutationen annotierte offene Leserahmen (engl. open reading frames – kurz ORFs), die in acht Fällen zur Verschiebung des Leserahmens führen. Diese so genannten High-Impact Mutationen sind durch sechs Indels (Insertionen oder Deletionen einer Base) sowie zwei Nonsense-Mutationen (Formation eines Stopp-Codons) in den deutschen ASPV-Sequenzen repräsentiert und haben durch die zumeist hervorgerufene Verkürzung der Aminosäuresequenz einen potentiell großen Einfluss auf die Funktionalität der codierten viralen Proteine. Die verbliebenen fünf Mutationen teilen sich in drei Substitutionen (Austausch einer Aminosäure) und zwei synonyme Mutationen (Basenaustausch ohne Änderung der Aminosäuresequenz) auf und werden aufgrund ihrer geringen Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz als Low-Impact Mutationen geführt. Diese Mutationen zugrunde legend lassen sich mittlerweile fünf Lineages und insgesamt zehn verschiedene ASPV-Varianten definieren, die in deutschen Wildschweinpopulationen verbreitet sind (Abb. 1). Diese Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, da trotz der nunmehr über zehnjährigen epidemischen Zirkulation des Genotyp II in Europa bislang nur wenige Mutationen im Virusgenom akkumuliert wurden, geschweige denn sich in viralen Genen manifestieren konnten.

Von der Vollgenomsequenz zum Varianten-Monitoring – Sanger-Sequenzierung deutscher ASPV-Proben weist geographische Varianten-Cluster nach

Auch wenn die Vollgenomsequenzierung dt. ASPV-Fälle unerlässlich für die Entdeckung neuer Mutationen bleibt, so ist die Methodik aufgrund ihres zeitlichen als auch finanziellen Aufwands nur bedingt für ein weitreichendes Screening von bereits bekannten Varianten geeignet. Aus diesem Grund wurde ein Amplikon-basiertes Sanger-Sequenzierungsverfahren entwickelt, mit dessen Hilfe die im NGS identifizierten mutierten Genombereiche gezielt und effizient nach dem Auftreten der beschriebenen Mutationen gescreent werden konnten. Als Ergebnis konnten im genannten Zeitraum insgesamt 834 dt. ASP-Fälle einer der 10 definierten Varianten zugeordnet werden. Zusammen mit den geographischen Fundorten der jeweiligen ASP-Fälle zeigt sich durch die Formation variantenspezifischer Cluster ein eindeutiger Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Nähe der untersuchten Proben (Abb. 2). Sind Varianten der Lineage IV (IV; IV.1; IV.2; IV.3) bislang hauptsächlich im nordöstlichen Bereich Sachsens und dem südlichen Brandenburgs (Landkreis Spree-Neiße) beschrieben, so findet sich im Osten Brandenburgs (Landkreis Oder-Spree, Dahme-Spreewald, Stadt Frankfurt-Oder) die größte genetische Vielfalt an ASP-Varianten (I; II; II.1; III.1; V), wohingegen Variante III bislang ausschließlich im Norden Brandenburgs detektiert wurde (Landkreis Märkisch-Oderland).

Treiber genetischer Vielfalt – O174L als potentielles Mutator-Gen

Ein wichtiger Baustein für das Verständnis dieser neuen genetischen Diversität ist mit der Suche von Ursachen für das vermehrte Auftreten von Varianten verbunden. Eine potentielle Erklärung hierfür lässt sich in einer 14 Basenpaar-Duplikation im Gen O174L finden, die zunächst für drei polnische ASPV-Proben beschrieben wurde und bei allen bislang sequenzierten dt. Genomen vorkommt. Das O174L Gen codiert für die DNA-Polymerase X (PolX), ein gut charakterisiertes Enzym des „base-excision repair“-Systems, das unmittelbar an der Replikation des Virusgenoms beteiligt ist. Wie auch die anderen variantenspezifischen High-Impact Mutationen erzeugt die O174L-Mutation eine Verschiebung des offenen Leserahmens, in deren Folge eine Verkürzung um sieben Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins erfolgt

sowie weitere acht Aminosäurereste substituiert werden. Diese Mutationen betreffen insbesondere die C-terminal gelegene Alpha-Helix α F, die zusammen mit anderen Resten der C-terminalen Region einen Teil einer positiv geladenen Tasche bildet, die die negative Ladung des 5'-Phosphats von DNA-Substraten an Einzelstrang-Brüchen koordiniert. Erste Computermodellierungen der O174L-Mutante weisen auf einen kompensierenden Effekt anderer, z. T. neu eingeführter Aminosäurereste hin, so dass davon auszugehen ist, dass die generelle Funktionalität der PolX erhalten bleibt, sich jedoch kinetische und thermodynamische Parameter des Enzyms vom Wildtyp unterscheiden. Diese Effekte könnten sich mittelbar in Form einer erhöhten genetischen Diversität von ASPV äußern, so wie es für die dt. Fälle gezeigt wurde. Eine finale Klärung der Ursache kann jedoch erst durch weitere gezielte Experimente erreicht werden.

Publikation: DOI: 10.1101/2022.09.07.506908

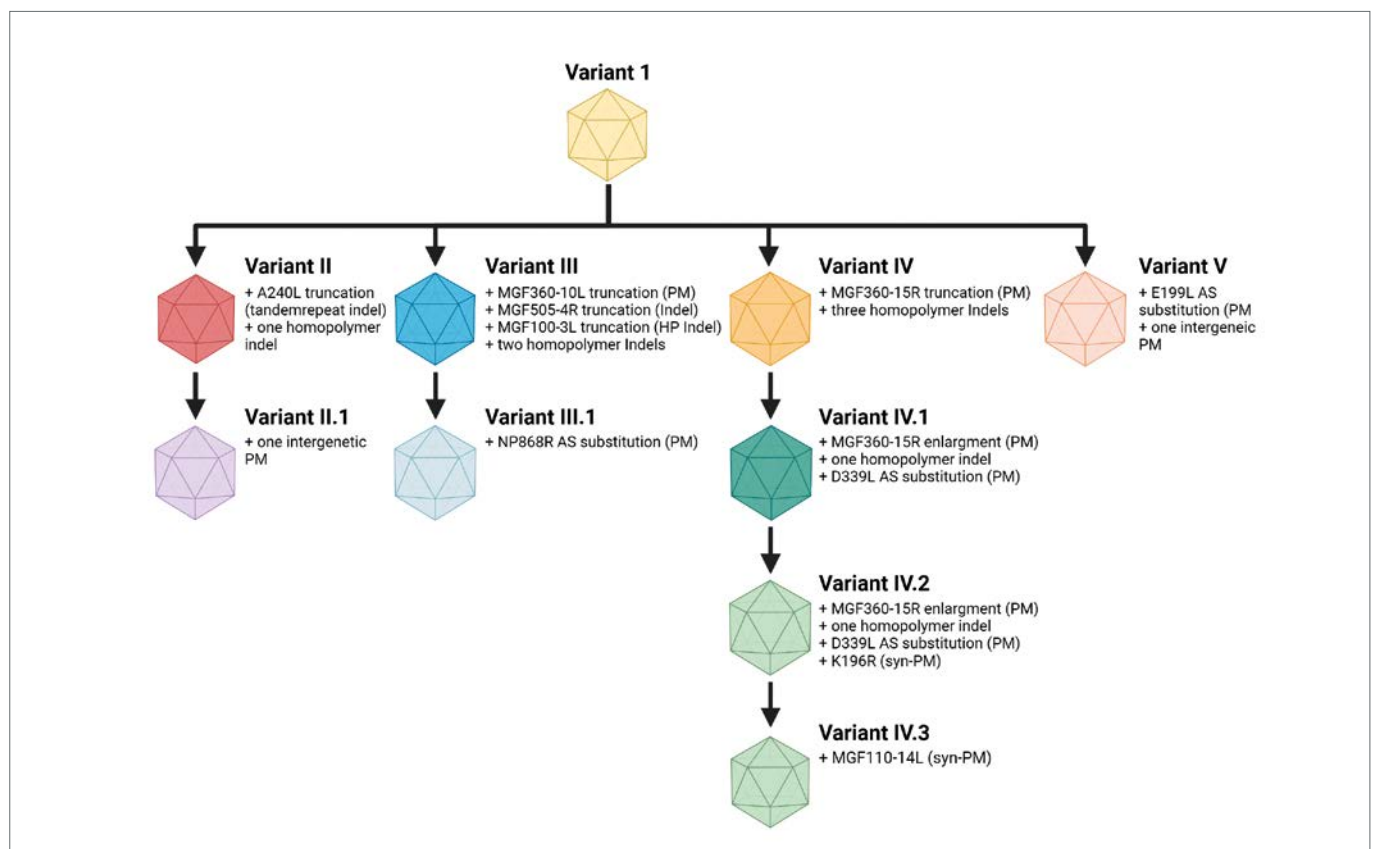


Abb. 1: Übersicht der von September 2020 bis August 2021 gefundenen dt. ASPV-Varianten. Insgesamt fünf Lineages mit zehn verschiedenen Varianten konnten anhand bislang unbekannter Mutationsmarker definiert werden. Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

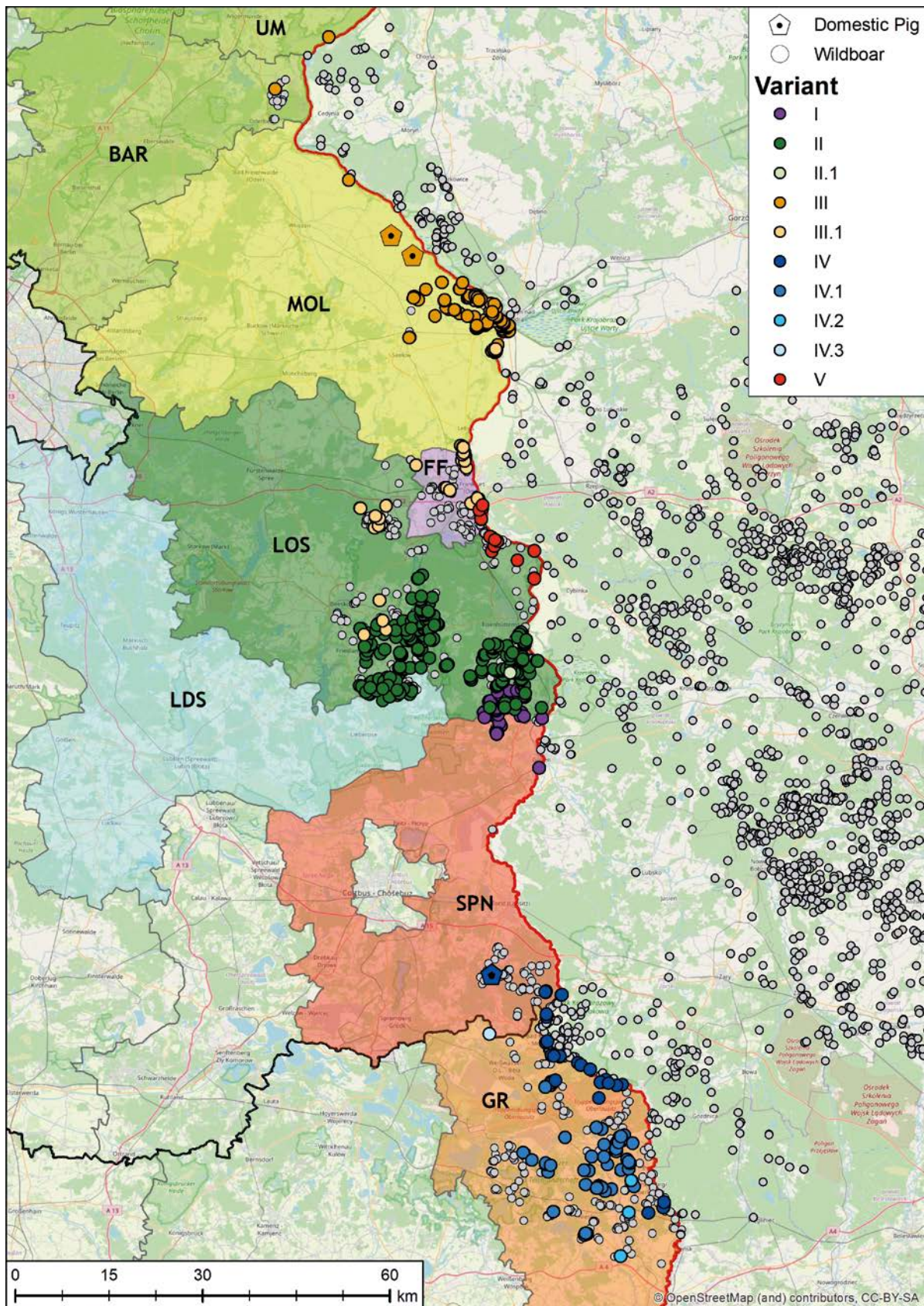


Abb. 2: Verteilung viraler ASPV-Varianten in den Bundesländern Sachsen und Brandenburg nahe der polnischen Grenze (links). Weiße Kreise entsprechen bestätigten ASPV-Fällen in Wildschweinen im Zeitraum vom 10. September 2020 bis 12. August 2021. Varianten, die durch Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnten ($n=834$), sind entsprechend der Legende eingefärbt. Drei im Zeitraum aufgetretene Ausbrüche in Hausschweinbetrieben sind als Pentagon dargestellt und zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen diesen und lokalen ASPV-Varianten im Wildschwein. Abkürzungen der Landkreise/kreisfreien Städte: GR – Görlitz; SPN – Spree-Neiße; LDS – Dahme-Spreewald; LOS – Oder-Spree; MOL – Märkisch-Oderland; BAR – Barnim; UM – Uckermark. Großer Dank geht an das Institut für Epidemiologie und im Speziellen an PD Dr. Carola Sauter-Louis für die Anfertigung und Bereitstellung dieser Abbildung.