

## Informationsmaterial

### Die schnelle Evolution der Influenza-Viren

#### Influenza-A-Viren

Influenza-Viren vom Typ A (Abb. 1) können in den verschiedensten Varianten vorkommen. Die Erbsubstanz, das Genom, ist segmentiert, d.h. es besteht aus 8 getrennten, einzelsträngigen RNA-Molekülen, auf denen 11 Proteine codiert sind. Diese Proteine umfassen eine Polymerase und verschiedene Struktur- und Hüllproteine. Ein unverwechselbares Merkmal dieser Viren sind

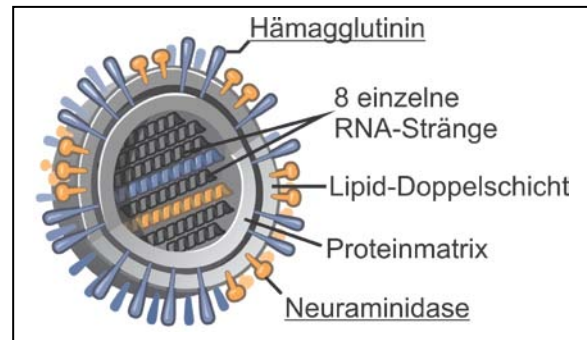


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Influenza-A-Virus  
© National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (verändert)

die Oberflächenproteine Hämagglutinin (H oder HA) und Neuraminidase (N oder NA), von denen bisher 16 (H1-16) bzw. 9 (N1-9) verschiedene Formen identifiziert wurden. Diese Oberflächenproteine haben für die Verbreitung und Vermehrung der Viren wichtige Funktionen. Das Hämagglutinin initiiert die Infektion der Wirtszelle, indem es an entsprechende Rezeptoren der Wirtszelle bindet (Sialinsäuren auf der Oberfläche der Wirtszellen), während die Neuraminidase den in der Wirtszelle neu entstandenen Viren hilft, die Wirtszelle wieder zu verlassen und somit neue Wirtszellen zu infizieren.

Die Bezeichnung der unterschiedlichen Subtypen der Influenza-A-Viren leitet sich von der jeweiligen Kombination der Oberflächenproteine H und N ab. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, welche Subtypen für die jeweilige Epidemie der letzten Jahrzehnte verantwortlich waren. Auch das Vogelgrippe-Virus H5N1 ist ein Subtyp der Influenza-A-Viren, der 1997 erstmalig beim Menschen auftrat.

**Nomenklatur innerhalb der Influenza-Viren**  
**Typ:** Influenza-A-Virus  
**Subtyp:** Kombination aus H (1-16) und N (1-9)  
**Stamm:** Variante eines Subtyps, die durch Abwandlung (Gendrift oder Genshift) entstanden ist

Tabelle 1: Grippe-Epidemien im 20. Jahrhundert (WHO, 2008)

Jahr des Ausbruchs	Grippe-Epidemie	Virus-Subtyp
1918/19	Spanische Grippe	H1N1
1957/58	Asiatische Grippe	H2N2
1968/69	Hongkong Grippe	H3N2
1976	Schweine Grippe	H1N1
1977/78	Russische Grippe	H1N1
1997	Hongkong Grippe	H5N1

### **Ursachen für die „schnelle“ Evolution der Influenza-Viren**

Die meisten Krankheitserreger, so auch Viren, haben große Populationsgrößen und kurze Generationszeiten. Der vollständige Replikationszyklus eines Virus in der Wirtszelle dauert oft nur wenige Stunden und hat die Entstehung vieler Tausend Viren zur Folge. Da die viralen RNA-Polymerasen keine Fehlerkorrektur-Funktion besitzen, werden mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  falsche Nukleotide bei der RNA-Replikation eingebaut. Somit werden hohe Mutationsraten verursacht. Die Fehlerrate ist ca. 1000fach höher als die der DNA-Polymerase des menschlichen Organismus. Diese Eigenschaften (große Populationen, kurze Generationszeit, hohe Mutationsraten) tragen dazu bei, dass Viren extrem schnell evolvieren. Jede Mutation, die ihren Träger befähigt, vom wirtseigenen Immunsystem unerkannt zu bleiben, wird (positiv) selektiert, weitergegeben und verbreitet. Influenza-Viren evolvieren ca. 1 Million Mal schneller als Säugetiere. 5 Jahre Virus-Evolution entsprechen demnach in etwa der Zeitspanne, welche die Menschen vom letzten gemeinsamen Vorfahren mit den Schimpansen trennt (Freeman & Herron 2007).

### **Überleben durch Variabilität**

Die Oberflächenproteine der Viren (Antigene) sind dem Selektionsdruck des wirtsspezifischen Immunsystems ausgesetzt, da sie für die Bildung von Antikörpern durch das Immunsystem des Wirtsorganismus verantwortlich sind. Hämagglutinin ist dasjenige Protein des Virus, das vom Immunsystem des Wirtes erkannt wird. Es ist vorteilhaft für die Viren, wenn diese einen Wirt finden, der diesem Typ Hämagglutinin noch nicht ausgesetzt war oder wenn sich das Hämagglutinin so deutlich verändert, dass es vom Abwehrsystem nicht mehr erkannt wird und das Virus somit einen selektiven Vorteil gegenüber den unveränderten Viren hat. Diese für das Virus überlebensnotwendige Variabilität wird auf unterschiedliche Art und Weise während des Vermehrungszyklus des Virus gewährleistet. Die beiden wichtigsten Mechanismen in diesem Zusammenhang sind Mutation (insbesondere Antigendrift) und Antigen shift.

### Variabilität durch Mutation: Antigendrift

In der Wirtszelle kommt es zur Replikation der Viren-RNA. Diese Aufgabe übernimmt die virale RNA-Polymerase, die im Vergleich zu DNA-Polymerasen eine relativ hohe Fehlerrate bei der Vervielfältigung des viralen Genoms hat und zudem keine Korrektur- und

Evolution im Zeitraffer – Vogelgrippe/Influenza-A (Information)

Reparaturfunktion besitzt, wie es bei anderen Polymerasen der Fall ist. Dadurch ändert sich durchschnittlich 1 Nukleotid pro Virus-Generation.

Die zahlreichen Punktmutationen stellen minimale Veränderungen im Genom dar, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen können. Diese kontinuierliche Abwandlung des Genoms wird als „Gendrift“ bezeichnet. In dem speziellen Fall, dass die Mutationen solche Gene betreffen, welche für die Antigene codieren, kann sich die Struktur dieser Oberflächenproteine minimal verändern, daher spricht man von „Antigendrift“ (Abb. 2). Durch diese Veränderungen kann der durch vorangegangene Infektionen (und/oder Impfungen) erworbene Immunschutz des Wirts nicht mehr voll wirksam werden. Die neuen, minimal abgewandelten Virusvarianten werden vom Immunsystem nicht mehr erkannt, da das Schlüssel-Schloss-Prinzip der Antigen-Antikörper-Interaktion nicht mehr optimal abgestimmt ist. Solche Variationen durch Antigendrift sind die Ursache für die jährlich wiederkehrenden Influenzaausbrüche.

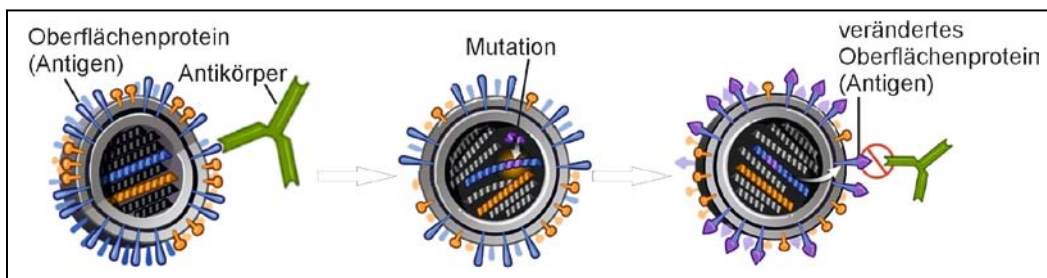


Abb. 2: Antigendrift © National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (verändert)

**Gendrift - ein Begriff mit verschiedenen Bedeutungen**

Bei der hier vorliegenden Darstellung der Virusgenetik wird der Begriff Gendrift (Zufallsdrift) anders verwendet als in der Populationsgenetik. Als Zufallsdrift werden in der Populationsgenetik zufällige Veränderungen in den Allelfrequenzen bezeichnet, die insbesondere in kleinen Populationen einen großen Einfluss haben können. Zufallsdrift führt zu unvorhersehbaren Veränderungen im Genpool, die zur Fixierung des einen oder anderen Allels führen können.

Bezüglich der Viren bezieht sich die Bezeichnung Gendrift in erster Linie auf die kontinuierlichen Veränderungen (durch Mutationen) der Gene, die für die Antigene codieren, also „Antigendrift“. Durch die kontinuierliche Abwandlung der Antigene und die Selektion durch das Immunsystem des Wirtes setzen sich diejenigen Mutationen durch, die einen Selektionsvorteil bieten.

Variabilität durch Neukombination: Antigen shift

Viren mit segmentierten Genomen können zusätzlich zu Mutationen genetische Veränderungen durchlaufen, die als „genetic reassortment“ bezeichnet werden. Darunter versteht man den Austausch von einem oder mehreren Gensegmenten zwischen zwei

Evolution im Zeitraffer – Vogelgrippe/Influenza-A (Information)

miteinander verwandten Viren, die gleichzeitig eine Zelle infiziert haben (Abb. 3A). Bei einer derartigen Doppelinfection werden die Baupläne beider Viren in einer Wirtszelle repliziert. Beim anschließenden „Zusammenbau“ der Viren kann es nun zu einer falschen Kombination der Bestandteile kommen, denn das System kann nicht mehr unterscheiden, welches RNA-Segment von welchem Virus-Subtyp stammte. Diese Neukombination von ganzen Einheiten genetischen Materials führt zur Entstehung von „Reassortanten“ oder „Mosaik-Viren“ (Abb. 3B,C). Kommt es beim „genetic reassortment“ zum Austausch der Gensegmente, die für die viralen Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase codieren, erhalten die Viren ein neues antigenes Muster, man spricht von „Antigenshift“ (Abb. 3C). Dieses Phänomen ist einerseits ganz normal, bildet andererseits aber den Auslöser für Pandemien unter den Menschen, da es sich bei den Pandemieviren oft um genetische Reassortanten aus humanen und aviären (von Vögeln stammenden) Influenza-A-Virus-Subtypen handelt (siehe auch Tabelle 1). Eine besondere Rolle bei der Entstehung neuer Influenzaviren spielen Schweine. Sie stellen eine Art „Mischgefäß“ dar, da sie sowohl für die Infektion mit aviären als auch mit humanen Influenza-A-Viren empfänglich sind. Im Gegensatz dazu können aviäre Influenza-A-Subtypen den Menschen im Allgemeinen nicht infizieren und Geflügel ist im Allgemeinen nicht empfänglich für humane Virus-Subtypen. Schweine spielen somit eine besondere Rolle, da von ihnen ausgehend die Übertragung neuer Virusvarianten auf den Menschen erfolgen kann. Diese Gefahr des Überschreitens der Artbarriere Vogel – Mensch besteht insbesondere auch für den tödlichen Vogelgrippe-Erreger H5N1, der bisher nur in seltenen Fällen eine Infektion des Menschen verursacht hat.

Die Bildung neuer Viren-Subtypen ist ein sehr drastisches Beispiel für die Auswirkungen des Antigenshifts. Neben diesen deutlichen Veränderungen finden auch weniger auffällige Neukombinationen und Mutationen der Segmente statt, die innerhalb eines Subtyps für die Ausbildung unterschiedlicher Genotypen verantwortlich sind. So wurden beispielsweise für das Vogelgrippe-Virus H5N1 inzwischen 9 verschiedene Genotypen festgestellt (Li et al., 2004), die sich im Grad ihrer Pathogenität unterscheiden.

Evolution im Zeitraffer – Vogelgrippe/Influenza-A (Information)

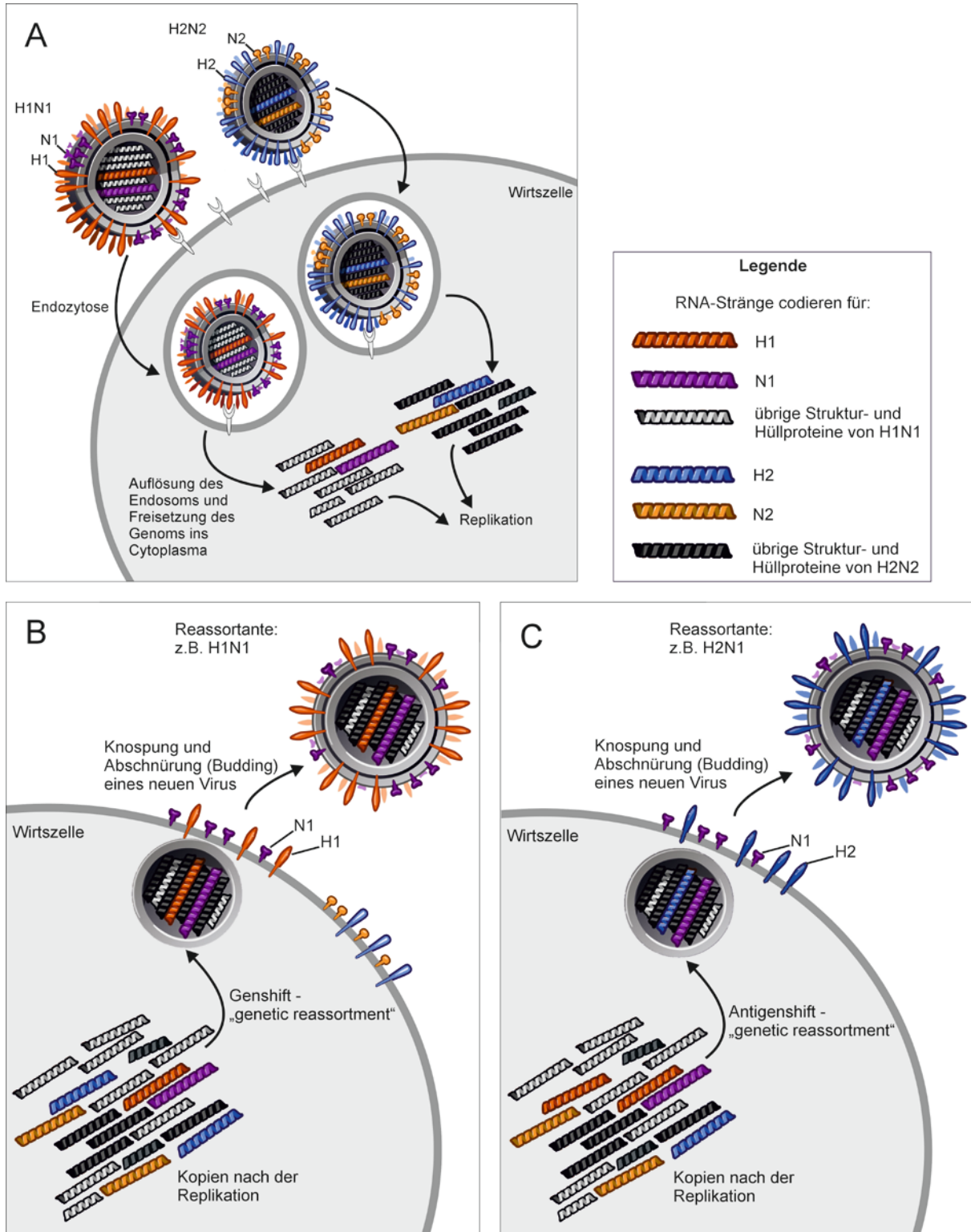


Abb. 3: Genshift und Antigenshift bei Influenza-Viren.

A: **Doppelinfection** einer Wirtszelle z.B. mit H1N1 und H2N2.

B: **Genshift** – Beim Zusammenbau der neuen Viren kommt es zu einer Neukombination der Gensegmente („genetic reassortment“). Zufällig sind von dieser Neukombination nicht diejenigen Gensegmente betroffen, die für Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) codieren, daher erhält die Reassortante in dem hier dargestellten Fall keine neue Bezeichnung. Auch das neue Virus ist vom Subtyp H1N1.

C: **Antigenshift** – Beim Zusammenbau der Viren kommt es auch hier zu einer Neukombination der Gensegmente („genetic reassortment“). In diesem Fall kommt es allerdings auch zu einer Neukombination derjenigen Gensegmente, die für Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) codieren. Die Reassortante ist nun vom Subtyp H2N1. Auch eine Reassortante vom Subtyp H1N2 wäre möglich, wird hier aber nicht dargestellt. © NIAID (verändert)

### Ist die Variabilität der Influenza-Viren sichtbar?

1. Hämagglutinin und Neuraminidase sind die beiden Oberflächenproteine des Influenza-Virus, die maßgeblich dafür verantwortlich sind, dass das Virus erfolgreich eine Wirtszelle infiziert und die Nachkommen freigesetzt werden. Jedoch wird das Virus an eben diesen Oberflächenproteinen vom Immunsystem des Wirts als Eindringling erkannt. Das Immunsystem übt somit einen starken Selektionsdruck auf die Oberflächenproteine aus. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft für das Virus, wenn sich die Struktur der Oberflächenproteine stetig ein wenig verändert, so dass die Anheftungsfunktion an die Wirtszelle erhalten bleibt, das Immunsystem die Struktur aber nicht wieder erkennt. Um diese Hypothese zu untersuchen, sequenzierten Fitch et al. (1991) das Hämagglutinin-Gen aus Virus-Proben, die aus einem Zeitraum von ca. 20 Jahren stammten. Anhand eines Vergleichs dieser Sequenzen konnten die Forscher eine kontinuierliche Zunahme an Mutationen in diesem Gen über die Zeit feststellen (Abb. 4). Zudem fanden Fitch et al. heraus, dass die Mutationsrate und damit die Variabilität der Proteinstruktur bei Oberflächenproteinen deutlich größer ist als bei Genen, die für Proteine codieren, die dem Immunsystem nicht direkt ausgesetzt sind (z.B. Nicht-Strukturproteine).

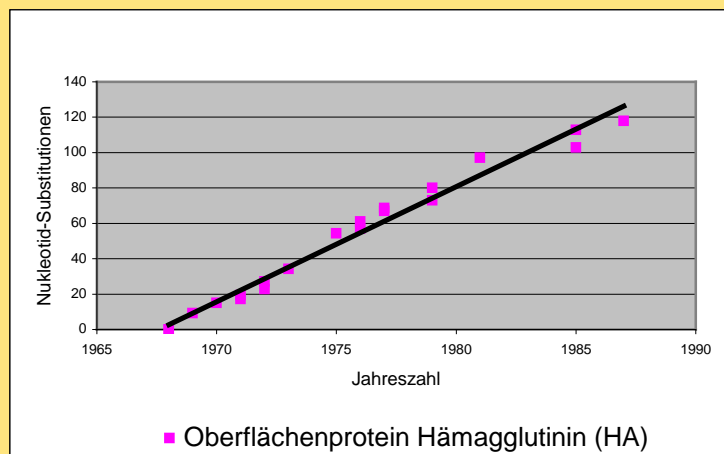


Abb. 4: zeitliche Veränderung des Hämagglutinin-Gens (in Anlehnung an Fitch et al., 1991)

2. Ein indirekter Hinweis auf die hohe Variabilität der Influenza-Viren besteht darin, dass eine Gripeschutzimpfung nicht dauerhaft schützt. Maximal 2-3 Jahre hält eine Gripeschutzimpfung vor. Im Gegensatz dazu schützt eine einmalige Masernimpfung im Kindesalter lebenslang. Das Virus unterliegt nach wie vor einem kontinuierlichen Wandel und dem Selektionsdruck des Immunsystems und der Impfung. Immer wieder können sich abgewandelte Virenstämme etablieren, so dass die Gripeschutz-Impfung jährlich neu auf die zirkulierenden Virenstämme abgestimmt werden muss.
3. Ein weiterer indirekter Hinweis auf die hohe Variabilität und damit die Anpassungsfähigkeit des Influenza-Virus zeigt sich besonders am Beispiel H5N1. Dieses eigentlich vogelspezifische Virus hat es durch die hohe Mutationsrate bei der Replikation bereits mehrfach geschafft, durch geeignete Mutationen die Artgrenze zu überschreiten (Vogel – Katze, Vogel – Mensch) und sich, wenn auch nur sehr begrenzt, an einen neuen Wirt anzupassen.

## Die Entwicklung von Impfstoffen

Pocken und Poliopandemien hatten einst verheerende Auswirkungen auf die Weltbevölkerung. Dank flächendeckender Impfungen wurden die Pocken offiziell ausgerottet, Polio ist auf dem besten Weg dahin. Die Schutzimpfung ist auch die bedeutendste präventive Maßnahme gegen die Influenza. Leider funktioniert die Strategie der Ausrottung durch Impfung bei Grippeviren nicht, da sie hochgradig wandlungsfähig sind. Inflenzaviren, wie auch die meisten anderen Viren, evolvieren durch die hohe Mutationsrate und das Phänomen des Antigenshifts so schnell, dass zu jedem Zeitpunkt eine große Zahl unterschiedlicher Genotypen vorliegt (siehe auch 2.1.2). Ein Impfstoff muss jedoch möglichst exakt zum Virus passen, um vor einer Infektion schützen zu können. Somit muss der Influenza-Impfstoff jährlich angepasst werden. Grundlage für diese Anpassung sind bei dem saisonalen Grippeimpfstoff die drei jeweils am häufigsten zirkulierenden Stämme.

Für die Saison 2008/2009 wurde der Impfstoff beispielsweise aus folgenden Stämmen zusammengesetzt (WHO):

- ein Stamm, der A/Brisbane/59/2007 (H1N1) ähnelt,
- ein Stamm, der A/Brisbane/10/2007 (H3N2) ähnelt und
- ein B Stamm, der B/Florida/4/2006 ähnelt.

(Nomenklatur: Virus-Typ/ geographischer Ort der Isolierung/ die Nummerierung des Isolats/ Jahr/ Subtypen der HA- und NA-Proteine)

Die Herstellung und Lagerung von geeigneten Impfstoffen gegen eine drohende H5N1-Pandemie unter den Menschen birgt jedoch eine wesentliche Schwierigkeit. Bislang existiert ein solcher Erreger, der von Mensch zu Mensch übertragen werden kann, noch nicht. Welcher Virus-Subtyp also die Basis für eine Impfstoffentwicklung darstellen soll, weiß man erst mit Gewissheit, wenn die Pandemie bereits ausgebrochen ist. Aus diesem Grund werden Prototypen-Impfstoffe hergestellt, die auf denjenigen Virusvarianten beruhen, welche für den Menschen in der Vergangenheit infektiös waren, bzw. in welche die Schlüsselkomponenten, die eine Immunantwort gegen den Erreger auszulösen, erst nachträglich eingefügt werden, sobald der Pandemiestamm bekannt ist (z.B. GlaxoSmithKline, Chiron Vaccines). Die geschätzte Weltjahresproduktion des saisonalen Grippeimpfstoffes mit 3 Stämmen besteht aus 300 Millionen Dosen. Die benötigte Antigenmenge für das Vogelgrippevirus ist jedoch etwa 6mal höher als die für die saisonale Immunisierung benötigte Menge. Ginge ein solcher Impfstoff in die Massenproduktion, würde man schnell an Grenzen stoßen. Die Menge würde

Evolution im Zeitraffer – Vogelgrippe/Influenza-A (Information)  
 auf 150 Millionen Dosen zusammenschumpfen und da 2 Impfungen für eine volle Immunisierung erforderlich sind, reicht das nicht einmal für die deutsche Bevölkerung aus. Aus diesem Grund arbeiten einige Firmen an der Entwicklung sog. Adjuvantien, chemischen Zusatzstoffen, die den Impfstoff strecken und das Immunsystem zusätzlich unterstützen. Damit kann die weltweite Kapazität zur Produktion und Lagerung großer Mengen eines Impfstoffes wesentlich erweitert werden (Gibbs et al. 2006, Schneider 2006).

## Literatur

- Fitch, W.M., Leiter, J.M.E., Li, X., Palese, P. (1991). Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 4270-4274.
- Freeman, S., Herron, J.C. (2007): *Evolutionary Analysis*. Pearson Education International, 4<sup>th</sup> Edition.
- Gibbs, W.W., Soares, C., Schneider, A.G. (2006): Sind wir gegen eine Pandemie gewappnet? *Spektrum der Wissenschaft*, Januar 2006, 72-80.
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith G.J.D., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Esteopangestie, A.T.S., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T.H., Webby, R.J., Poon, L.L.M., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G., Peiris, J.S.M. (2004): Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430, 209-213.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003): *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID): [www3.niaid.nih.gov/](http://www3.niaid.nih.gov/) (Dezember 2008)
- Schneider, A.G. (2006): Wie schnell gäbe es genügend Pandemie-Impfstoff? *Spektrum der Wissenschaft*, April 2006, 36-37.
- World Health Organization (WHO): [www.who.int](http://www.who.int) (Dezember 2008)