

Molekularbiologische Grundlagen der Spezies- und Organspezifität von Influenza-A-Viren

Von Christoph Scholtissek*

Die Influenza ist eine der großen Seuchen, die noch nicht unter Kontrolle gebracht werden konnte. Dies beruht auf der hohen Variabilität des auslösenden Agens, der Influenza-A-Viren. Diese Viren benehmen sich wie ein Chamäleon: Sie passen sich außerordentlich schnell veränderten Umweltbedingungen an. Neue Stämme werden „synthetisiert“, die die Immunabwehr des Wirtes unterlaufen können, die Speziesbarrieren überschreiten und die hochpathogen sein können. Wir beginnen, die molekularen Grundlagen für diese außergewöhnliche Variabilität zu verstehen. Das Genom der Influenza-A-Viren besteht aus acht Einzelstrang-RNA-Segmenten. Jedes der acht RNA-Segmente, deren Totalsequenz bekannt ist, ist ein Gen. Bei der Doppelinfektion eines geeigneten Organismus mit zwei verschiedenen Influenza-A-Stämmen benimmt sich jedes RNA-Segment wie ein Chromosom. Das bedeutet, daß durch Umverteilung der 16 RNA-Segmente theoretisch $2^8 - 2 = 254$ Neukombinationen (Reassortanten) erwartet werden können, die alle verschiedene Eigenschaften haben. Weiterhin werden Mutationen in den einzelnen RNA-Segmenten relativ leicht toleriert. Ein weiteres großes Problem ergibt sich aus dem gewaltigen Reservoir verschiedener Influenza-A-Viren im Tierreich, vor allen Dingen in den Wasserzugvögeln, in denen diese Viren kaum Symptome auslösen und die die unterschiedlichsten Virus-Subtypen über Kontinente verbreiten. Diese Erkenntnisse lassen es notwendig erscheinen, prinzipiell neue Wege zur Bekämpfung dieser großen Seuche einzuschlagen.

1. Einleitung

Influenza-A-Viren sind die Erreger von großen Pandemien, wie z. B. 1918/19 der Spanischen Grippe oder 1968 der Hongkong-Grippe. Weiterhin infizieren Influenza-A-Viren, im Gegensatz zu den Typen B und C, unter natürlichen Bedingungen auch andere Spezies wie Vögel, Pferde, Schweine, Seehunde, Nerze und Wale, in denen sie die unterschiedlichsten Symptome hervorrufen. Deshalb soll in diesem Beitrag nur auf die Influenza-A-Viren eingegangen werden.

1.1. Struktur

Influenza-A-Viren sind relativ komplex aufgebaut (Abb. 1, rechts)^[1]. Sie haben eine Lipidhülle, die während der Virusreifung von der Wirtszelle beigesteuert wird, und aus der nach außen zwei verschiedene Glycoproteine ragen. Da ist einmal das Hämagglutinin(HA), das als Trimer an den Neuraminsäure-haltigen Wirtszellrezeptor bindet und die wichtigste immunogene Komponente ist, gegen die der infizierte Organismus neutralisierende Antikörper produziert. Die zweite Oberflächenkomponente, die für die Immunabwehr eine weniger wichtige Rolle spielt, ist das den Rezeptor zerstörende Enzym, die Neuraminidase(NA). Obwohl dieses Enzym sehr gut studiert ist^[2,3], sind noch viele Fragen zur Rolle, die es im Infektionsgeschehen spielt, unbeantwortet.

Die Lipidhülle ist innen vom Matrix- oder Membran(M)-Protein ausgekleidet. Der Kern des Virus, das

Nucleocapsid, hat, elektronenmikroskopisch betrachtet, eine fädige, helicale Struktur; als Hauptbestandteil enthält er das basische Nucleoprotein(NP). Die drei sogenannten P-Proteine (PB1, PB2 und PA) kommen nur in etwa je zehn Exemplaren pro Nucleocapsid vor. In das Nucleocapsid ist das genetische Material des Influenza-A-Virus eingelagert. Es besteht aus Einzelstrang-RNA (vRNA), die nicht, wie bei den meisten Viren, in einem einzigen Makromolekül pro Viruspartikel vorkommt, sondern in acht Segmenten. Jedes Segment stellt ein Gen dar (Abb. 1, links)^[4,5]. Das Nucleocapsid hat RNA-Polymerase-Aktivität, d.h. an der internen vRNA-Matrize wird die dazu komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert.

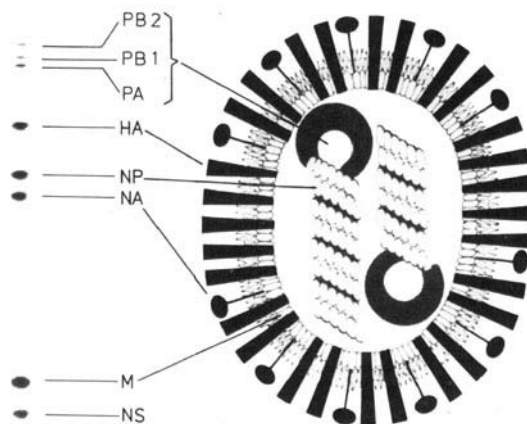


Abb. 1. Struktur und Strukturelemente eines Influenza-A-Virus (rechts) und Zuordnung der Genprodukte (Mitte) zu den durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten viralen RNA-Segmenten (Gene) (links). Im Innern des Virus befindet sich der Polymerasekomplex, der aus den drei P-Proteinen PB2, PB1, PA und dem Nucleoprotein NP besteht. Die Lipiddoppelschicht ist innen mit dem Membran- oder M-Protein ausgekleidet. Eingelagert und nach außen ragend sind die beiden Glycoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Das kleinste RNA-Segment enthält die Information für zwei Nichtstrukturproteine (NS).

[*] Prof. Dr. C. Scholtissek

Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin und Tierzucht der Universität
Frankfurter Straße 107, D-6300 Gießen

1.2. Nomenklatur

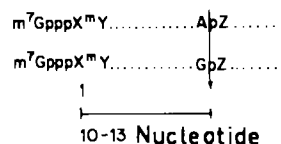
Die Proteine im Innern des Virus, wie das NP- oder das M-Protein, sind gruppenspezifische Antigene, nach denen die Inflenzaviren in die Typen A, B und C eingeteilt werden. Da diese Viruskomponenten im intakten Partikel von monospezifischen Antikörpern nicht erreicht werden können, unterliegen sie nicht dem Selektionsdruck durch das Immunsystem des Wirtes und sind deshalb im Gegensatz zu den Oberflächenkomponenten HA und NA relativ konserviert. Die Influenza-A-Viren teilt man aufgrund signifikanter serologischer Unterschiede der HAs und NAs in Subtypen ein. Man unterscheidet bis jetzt dreizehn HA- und neun NA-Subtypen, die in fast allen Kombinationen miteinander auftreten^[6]. Bei humanpathogenen Isolaten hat man bisher allerdings nur drei HA- und zwei NA-Subtypen gefunden. Bei der Bezeichnung der Virusstämme gibt man in der Regel bei den Erstisolaten, mit Ausnahme der aus Menschen isolierten Viren, noch die Spezies an. Weiterhin wird der Ort der Isolierung, die Isolatennummer und das Jahr angemerkt. Meistens fügt man vereinfacht noch den Serotyp bezüglich HA (H) und NA (N) an. Folgendes Isolat, das 1976 aus einer Ente in Alberta (Kanada) isoliert wurde, soll als Beispiel dienen: A/duck/Alberta/35/76 (H1N1).

1.3. Vermehrung

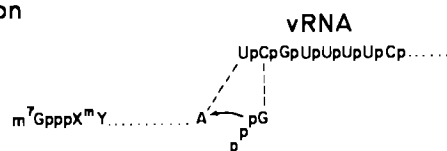
Die Inflenzaviren gehören zu den Negativstrang-Viren. Das bedeutet, daß die virale (v) RNA nicht infektiös ist, da sie keine Boten-RNA(mRNA)-Funktion hat. Da in nicht-infizierten Wirtszellen keine RNA-abhängige RNA-Polymerase vorkommt, müssen alle Negativstrang-Viren ihre eigene RNA-Polymerase mitbringen. Nach Adsorption an die Wirtszelle und Fusion der Virusmembran mit zellulären Membranen wird das Nucleocapsid freigesetzt und wandert in den Zellkern. Dort beginnt nun die sehr komplizierte Synthese der viralen mRNA. Dazu bindet der Polymerasekomplex an die permethylierte Cap-Struktur (siehe Abb. 2) am 5'-Ende der von der Wirtszelle frisch

synthetisierten Vorläufer-mRNA (hochmolekulare, heterogene Kern-RNA (hnRNA)) und spaltet die hnRNA nach 10–13 Nucleotiden hinter einem Purin (Abb. 3). Dieses 5'-Endstück der zellulären hnRNA dient als Startermolekül für die eigentliche virusspezifische mRNA (Basenpaarung nach den Watson-Crick-Regeln), so daß hinter diesem letzten Purinnucleotid die Sequenz komplementär zum 3'-Ende der vRNA ist^[7]. In der Nähe des 5'-Endes der vRNA

Spaltung



Initiation



Verlängerung

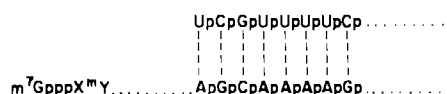


Abb. 3. Drei Schritte, die für den Start der für Inflenzaviren spezifischen mRNA-Synthese notwendig sind. 1. Bindung des viralen Polymerase-Komplexes an die permethylierte Cap-Struktur der neu synthetisierten zellulären hnRNA und Spaltung 10 bis 13 Nucleotide hinter einem Purinnucleotid. 2. Initiation der Synthese der viralen mRNA durch Basenpaarung des am 3'-Ende der vRNA befindlichen Uridinmonophosphates mit dem Purin am 3'-Ende des zellulären Startermoleküls und Anlagerung des ersten Guanosintriphosphates (Paarung mit dem vorletzten Cytidinmonophosphat der vRNA). 3. Verlängerung der viralen mRNA entsprechend den Watson-Crick-Regeln (nach Krug [7]).

befindet sich ein Signal für die unspezifische Synthese eines Polyadenylsäureschwanzes von 50–200 AMPs, so daß nicht die gesamte Information auf die mRNA übertragen wird. Das heißt, daß die acht in vivo synthetisierten Inflenzavirusspezifischen mRNA-Segmente am 5'-Ende völlig heterogen sind, da fast alle zellulären hnRNAs als Starter dienen können. Da außerdem am 3'-Ende der mRNA-Segmente Information fehlt, kann diese RNA selbstverständlich nicht als Matrize für die Synthese der vRNA-Segmente dienen, die später in die reifen Viruspartikel eingebaut werden sollen. Aus diesem Grunde wird in der infizierten Zelle eine zweite Sorte von cRNA synthetisiert, die weder die von der zellulären hnRNA übernommene Cap-Struktur enthält noch den Poly-A-Schwanz am 3'-Ende, sondern die gesamte unmodifizierte komplementäre Information besitzt^[8]. Beide Sorten der virusspezifischen cRNA – jeweils aus acht Segmenten bestehend – kommen in der infizierten Zelle nebeneinander vor. Die Regulationsmechanismen, die zu diesen beiden unterschiedlichen cRNAs führen, sind noch völlig unbekannt. An den sechs größten vRNA-Segmenten wird jeweils eine mRNA synthetisiert, an den beiden kleinsten vRNAs dagegen jeweils zwei unterschiedliche mRNAs. Eine dieser beiden mRNAs entsteht durch Spleißen, d. h. am RNA-Segment 7 wird neben der ungespleißten mRNA, die für das M-Protein codiert, noch eine gespleißte mRNA synthetisiert, die das Nichtstrukturprotein M2 codiert. Entsprechend enthält das

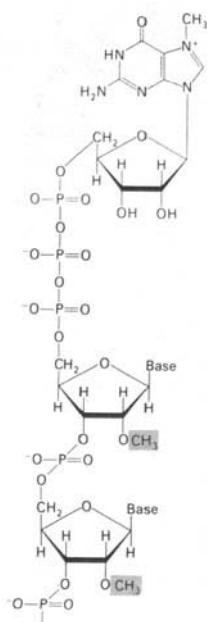


Abb. 2. Methylierte Cap-Struktur am 5'-Ende der von der Wirtszelle neu synthetisierten hnRNA.

RNA-Segment 8 die Information für die beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2^[9]. Über den Mechanismus, wie die richtigen acht vRNA-Segmente ausgewählt und in die Viruspartikel verpackt werden, ist noch nichts bekannt.

Die Synthese der nicht glycosylierten Proteine findet (wahrscheinlich mit Ausnahme des M2-Proteins) an freien Polysomen im Cytoplasma der Wirtszelle statt, während die Glycoproteine (und wahrscheinlich das M2-Protein) an den membrangebundenen Polysomen gebildet werden. Auf dem Weg über den Golgi-Apparat zu der Cytoplasmamembran werden die viralen Glycoproteine weiter modifiziert, z. B. durch Glycosylierung, Verknüpfung mit Fettsäuren und Spaltung des HAs zu den über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten HA₁ und HA₂^[10]. Durch Aneinanderlagerung der verschiedenen Struktureinheiten, Knospung (Budding) und Abschnüren bilden sich dann die neuen infektiösen Viruspartikel.

1.4. Zuordnung der RNA-Segmente zu den Genprodukten

Für die Zuordnung der RNA-Segmente zu den Genprodukten wurde von uns zunächst eine Vielzahl von temperatursensitiven (ts) Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest (fowl plague virus (FPV)), A/FPV/Rostock/34 (H7N1), durch Mutagenisierung mit 5-Fluoruracil und Selektion mit Hilfe des Plaque-Vergrößerungstestes^[11] hergestellt. Danach wurden primäre Hühnerembryozellen (HEZ) in Kultur paarweise mit den verschiedenen ts-Mutanten doppelt infiziert; dann wurde geprüft, ob bei 40°C, eine Temperatur, bei der sich die ts-Mutanten nicht vermehren („nichtpermissive Temperatur“), Virusvermehrung stattfand. Wenn die die Temperatursensitivität verursachenden Defekte (ts-Defekte) bei den beiden zur Doppelinfektion verwendeten Viren in verschiedenen RNA-Segmenten (Genen) liegen, entsteht bei einem Reassortment – einer Art Umverteilung der Gene – unter anderem der Wildtyp (siehe Abb. 4), d. h. die nicht-defekten Gene ergänzen sich zu einem bei 40°C vermehrungsfähigen Virus. Liegen die

ts-Defekte bei den beiden zur Doppelinfektion verwendeten Mutanten dagegen im gleichen RNA-Segment, ist Rekombination zum Wildtyp nicht möglich. Auf diese Weise kann man sämtliche ts-Mutanten entsprechend der Anzahl der RNA-Segmente in acht Rekombinationsgruppen einteilen und aufgrund des biologischen Defektes bereits eine grobe Zuordnung der Mutationen treffen^[12]. Wenn man jedoch HEZ bei 40°C mit je einer ts-Mutante und einem anderen Influenza-A-Virus doppelt infiziert, das in HEZ keine Plaques bilden kann (siehe Abschnitt 4), sind alle bei 40°C vermehrungsfähigen Viren automatisch Reassortanten, bei denen mindestens das defekte Gen der FPV-Mutante durch das allele Gen des anderen Virus ersetzt ist. Die Herkunft der einzelnen RNA-Segmente in solchen Reassortanten, ob sie von dem einen oder dem anderen Elterntyp herkommen, haben wir ursprünglich mit der Hybridisierungstechnik festgestellt^[13]. Eine andere Möglichkeit, den Ursprung der einzelnen Gene festzustellen, ist ein Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese der RNA-Segmente und der viralen Proteine der Elternstämme mit denen der Reassortanten^[4] oder ein Vergleich der „tryptischen Fingerprints“ der Proteine der Eltern und der Reassortanten^[14]. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt.

2. Molekulare Grundlagen der Influenza-Pandemien und -Epidemien

2.1. Antigen shift

Durchschnittlich alle zehn bis zwanzig Jahre tritt erfahrungsgemäß plötzlich ein humanpathogenes Influenza-A-Virus mit neuen Oberflächenantigenen auf, gegen die in der menschlichen Population keine neutralisierenden Antikörper vorhanden sind, so daß dieser neue Stamm eine Pandemie starten kann (Antigen shift). Als wir den 1968 plötzlich aufgetretenen A/Hong Kong/1/68(H3N2)-Stamm genetisch mit der Hybridisierungstechnik untersuchten, stellten wir fest, daß alle Gene mit Ausnahme des HA-Gens praktisch identisch waren mit dem vorher in der menschlichen Population vorhandenen H2N2-Virus (A/Singapore/1/57). Das HA-Gen des Hongkong-Virus zeigte dagegen genetisch eine enge Verwandtschaft mit dem allelen Gen eines bereits 1963 aus einer Ente in der Ukraine isolierten Influenza-A-Virus^[15]. Deshalb stellen wir uns die Entstehung des Hongkong-Stammes entsprechend der Darstellung in Abbildung 5 vor: Danach sollen diejenigen Gene, die für die Speziespezifität, d. h. Vermehrungsfähigkeit im Menschen und für die entsprechenden Symptome verantwortlich sind, beim Reassortment in einem doppelt infizierten Wirt – möglicherweise im Schwein (siehe Abschnitt 6.2) – von dem H2N2-Stamm übernommen worden sein, und nur das HA-Gen wurde durch das Entenvirus beigesteuert. Das bedeutet, daß die Natur „Wölfe im Schafspelz“ produziert und damit die Immunabwehr des Organismus unterläuft. Beim Singapur-Stamm, der 1957 eine Pandemie auslöste, stellten wir fest, daß nur die RNA-Segmente 1, 5, 7 und 8 von einem vorher aufgetretenen humanpathogenen H1N1-Stamm übernommen wurden und die Segmente 2, 3, 4 und 6 – d. h. beide Oberflächenantigene – ausgetauscht waren^[15].

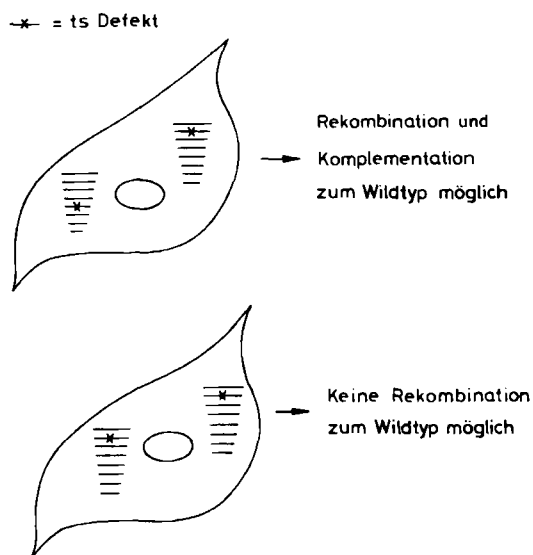


Abb. 4. Schema des Reassortments (der Rekombination) zum Wildtyp nach Doppelinfektion einer Zelle mit zwei verschiedenen temperatursensitiven (ts) Mutanten eines Influenza-A-Virus, bei denen die ts-Defekte entweder in zwei verschiedenen oder in denselben RNA-Segmenten liegen. Bei der nichtpermissiven Temperatur von 40°C wird auf den Wildtyp selektioniert.

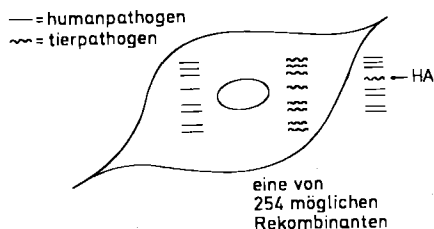


Abb. 5. Schema zur Erklärung der Entstehung eines neuen pandemischen Influenza-A-Stammes (Antigenshift). Eine Zelle wird gleichzeitig von einem tierpathogenen und dem zur Zeit vorherrschenden humanpathogenen Stamm infiziert. Eine der 254 möglichen Neukombinationen hätte die rechts im Bild angegebene Genkonstellation, bei der nur das HA-Gen vom tierpathogenen Stamm herrührt, die anderen Gene vom humanpathogenen Virus übernommen werden.

Eine andere Möglichkeit, eine Pandemie auszulösen, besteht darin, daß ein Virussubtyp für viele Jahre in der menschlichen Population nicht nachweisbar ist und dann, wenn eine neue Generation junger Menschen herangewachsen ist, plötzlich wieder auftaucht. Das geschah 1977, als ein H1N1-Virus eine Pandemie auslöste, das genetisch in allen RNA-Segmenten praktisch identisch war mit einem bereits 1950 isolierten H1N1-Stamm^[16,17]. Mit dem neuen H1N1-Virus wurden fast nur nach 1950 geborene Menschen infiziert, da in älteren Menschen noch schützende Antikörper gegen diesen Stamm vorhanden waren. Möglicherweise hat 1950 der H1N1-Stamm durch Genaustausch die Wirtsspezifität gewechselt (siehe Abschnitt 3), verblieb für 27 Jahre in diesem neuen Wirt, und kehrte dann durch neuerlichen Austausch des gleichen Gens wieder in den ursprünglichen Wirt zurück. Wir haben einen solchen zweimaligen Wirtswechsel durch Genaustausch beim Virus der Klassischen Geflügelpest im Laboratorium im Modellexperiment nachvollziehen können^[18].

2.2. Antigendrift

Das plötzliche Auftauchen pandemischer Influenza-A-Stämme durch Austausch der Gene, die für die Oberflächenantigene NA und/oder HA codieren – man spricht von Antigenshift –, wird durch die Segmentierung des Genoms ermöglicht. Neben dem plötzlichen Auftreten neuer Stämme gibt es noch die langsame Veränderung der Oberflächenantigene durch Mutation und die Selektion der dabei entstehenden Varianten durch das Immunsystem. Diesen Vorgang bezeichnet man als Antigendrift. Antigendrift scheint deshalb bei Inflenzaviren so stark ausgeprägt zu sein, weil die Oberflächenantigene offensichtlich Domänen besitzen, in denen Mutationen selten letal, d.h. funktionell wenig bedeutsam sind, in denen aber die Antigen-determinanten liegen. Anders als die übrigen Gene, die weitgehend konserviert sind, zeigen die HA- und NA-Gene bestimmte Regionen hoher genetischer Variabilität^[19]. Diese Regionen sind identisch mit den Antigendomänen^[20,21] (siehe Abb. 6). Trotz des Antigendriffs gibt es noch unterschiedlich stark ausgeprägte serologische Kreuzreaktionen, d.h. „Driftviren“ werden von vorhandenen Antikörpern teilweise erkannt. Durch Driftviren werden die meist weniger heftigen und bisweilen örtlich begrenzten Epidemien ausgelöst.



Abb. 6. Schematische Darstellung der Struktur des Hämagglutinin-Monomers des A/Aichi/2/68(H3N2)-Stammes. Die Symbole ▲, ●, ■ und ◆ geben Mutationen in den vier Antigenbereichen an, die zu immunologischen Veränderungen führen. Die Balken geben α-Helix-, die breiten Pfeile β-Faltblatt-Strukturen wieder (mit Genehmigung von Macmillan Journals Ltd. dem Deckblatt von *Nature (London)* 289 (1981) Nr. 5796 entnommen) [21].

3. Beeinflussung von Pathogenität, Wirtsspezifität und Organtropismus durch Reassortment

3.1. Konstruktion apathogener Reassortanten

Die Natur macht beim Antigenshift offensichtlich von der Möglichkeit Gebrauch, „Wölfe im Schafspelz“ zu produzieren. Deshalb haben wir^[22] und andere^[23,24] versucht, „Schafe im Wolfspelz“ herzustellen, um sie als Lebendvaccine zu nutzen. Unter Beibehaltung der Gene für die Oberflächenglycoproteine HA und NA sollten die Gene der gefährlichen Viren ausgetauscht werden, die deren Pathogenität verursachen. Mit unseren ts-Mutanten haben wir nach den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Methoden eine Vielzahl unterschiedlicher Reassortanten des Virus der Klassischen Geflügelpest hergestellt und auf ihre Pathogenität getestet. Dabei stellte sich heraus, daß durch Austausch des RNA-Segmentes 1 (PB2-Gen) durch das allele Gen des humanpathogenen A/PR/8/34(H1N1)-Stammes eine für Hühner völlig apathogene Reassortante entstand, die die Oberflächenantigene des gefährlichen Stammes enthielt. Hühner konnten durch Infektion mit dieser Reassortante gegen eine Überinfektion mit dem Wildstamm völlig geschützt werden. Wenn für den gleichen Versuch allerdings das Schweine-Influenzavirus A/sw/1976/31 verwendet wurde, war die entsprechende Reassortante so pathogen wie der Wildtyp. In diesem Fall mußte eine andere ts-Mutante mit einem Defekt im PB1-Gen (RNA-Segment 2) verwendet werden. Die Reassortante, die das RNA-Segment 2 vom Schweine-Influenzavirus enthielt, war völlig apathogen und konnte als möglicher Kandidat für eine Lebendvaccine betrachtet werden^[22]. Bei all diesen Studien kam heraus, daß wir zwar nicht voraussagen kön-

nen, welches Gen des gefährlichen Virus durch das entsprechende Gen eines welchen Prototypstammes ersetzt werden muß, um die Pathogenität zu verlieren, daß es aber in erster Linie auf die Genkonstellation des Polymerasekomplexes ankommt, d. h. auf Gene, deren Genprodukte eng kooperieren (siehe Abschnitt 1.1)^[25]. Weitere Studien ergaben, daß sich die apathogenen Reassortanten des Virus der Klassischen Geflügelpest bei der Körpertemperatur des Huhnes (41°C) nur langsam vermehren, so daß die Immunabwehr den Wettlauf mit dem Virus im infizierten Organismus gewinnt. Ausgehend von dieser Beobachtung konnten wir sehr rasch potentielle Vaccinestämme isolieren, und zwar durch Doppelinfektion selbst mit zwei hochpathogenen Elternstämmen und Selektion mit dem Plaque-Vergrößerungstest auf Reassortanten, die schlecht bei 41°C wachsen. Diese Reassortanten waren alle apathogen für Hühner und hatten Basenaustausche in den Genen des Polymerasekomplexes^[26].

3.2. Neurotrope Reassortanten

Wenn wir in der Lage sind, durch RNA-Segmentaustausch die Pathogenität von Influenza-A-Viren zu eliminieren, sollte es auch möglich sein, ausgehend von zwei für einen bestimmten Organismus harmlosen Viren, hochpathogene Reassortanten zu konstruieren. Für Studien zur Pathogenitätssteigerung eignen sich Mäuse, da diese Tiere unter natürlichen Bedingungen frei von Influenza sind. Solange Influenzaviren nicht durch Passagieren, d. h. durch mehrere Cyclen von Infektion und Isolation, an diese Tiere adaptiert sind, werden Mäuse normalerweise nach artifizieller Infektion mit diesen Viren nicht krank. Als Reassortanten, die durch Reassortment des Virus der Klassischen Geflügelpest mit verschiedenen humanpathogenen oder aviären (von Vögeln stammenden) Influenzastämmen erhalten worden waren, in jungen Mäusen getestet wurden, stellte sich heraus, daß einige dieser Reassortanten in der Lage waren, die Tiere zu töten. Anders als die Elternviren vermehrten sich die pathogenen Reassortanten besonders in den Mäusegehirnen zu hohen Titern. Auch in Mäusegehirn-Zellkulturen replizierten sich diese Reassortanten, während die Elternviren oder apathogene Reassortanten das nicht konnten. Entscheidend war auch hier wieder der Austausch bestimmter Polymerasegene^[27,28]. Der Zusammenhang zwischen Genkonstellation und Neurotropismus für das Elternpaar FPV/Virus N ist in Tabelle 1 gezeigt^[29]. Hier haben wir es also mit einem besonders klaren Fall der Veränderung des Organtropismus und parallel dazu mit einer Steigerung der Pathogenität durch Reassortment zu tun. Kritisch bei diesen Experimenten ist, daß die Mäuse durch Immunisierung gegen eine intranasale Infektion – das entspricht dem natürlichen Infektionsweg – mit diesen neurotrophen Reassortanten nicht geschützt werden können, da die Nervenendigungen des Riechnervs in der Nasenschleimhaut das Virus aufnehmen, das sich dann über den Bulbus olfactorius über das gesamte Gehirn ausbreitet. Durch die Immunisierung kann nur eine Virämie und eine generalisierte Infektion^[30] verhindert werden; dies hat jedoch keinen Einfluß auf die Virusvermehrung im Gehirn und damit auf den tödlichen Ausgang^[31].

Tabelle 1. Vermehrung von Reassortanten aus dem Virus der Klassischen Geflügelpest (F) und dem A/chicken/Germany,,N"/49-Virus (N) in Lungen und Gehirnen nach intranasaler Infektion von zwei Tage alten Mäusen. Mit Ausnahme des ersten Virus (Virus N) stammen bei allen Reassortanten die Gene PB2, HA, NA und M vom Virus der Klassischen Geflügelpest ab. Wenn das PB1- und/oder PA-Gen vom Virus N stammen, sind die Reassortanten für Mäuse neurotrop. Wenn außerdem noch das NS-Gen ausgetauscht ist, ist der Virustiter im Gehirn nochmals erhöht. Austausch des NP-Gens bewirkt dagegen Verlust der neurotrophen Eigenschaften oder schwächt diese Eigenschaft zumindest ab. Alle Tiere, bei denen Viren im Gehirn gefunden werden, sterben, allerdings entsprechend den Titern unterschiedlich schnell [29].

Herkunft der Gene				Virustiter vier Tage nach Infektion [Plaque-bildende Einheiten/mL Suspension]	
PB1	PA	NP	NS	Lunge	Gehirn
N	N	N	N	10 ⁴	< 10 ¹
F	F	F	F	10 ¹	< 10 ¹
N	F	F	F	10 ⁶	10 ³
N	F	F	N	10 ⁶	10 ⁵
F	N	F	F	10 ⁶	10 ⁴
N	N	F	F	10 ⁷	10 ⁵
N	N	F	N	10 ⁷	10 ⁶
F	F	N	F	< 10 ¹	< 10 ¹
F	N	N	F	< 10 ¹	< 10 ¹
N	N	N	F	10 ⁶	10 ⁴

Die Natur scheint auch von dieser Möglichkeit der Pathogenitätssteigerung Gebrauch zu machen: 1979 kam es an der Neuenglandküste in den USA zu einem großen Seehundsterben, wobei man bei den toten Tieren ein Influenza-A-Virus sowohl aus der Lunge als auch aus dem Gehirn isolieren konnte^[32]. Die genetische Analyse dieses Virus ergab, daß es sich offensichtlich um eine Reassortante aus aviären Influenzastämmen handelte^[33].

4. Beeinflussung von Pathogenität und Wirtsspezifität durch Mutation

Eine übliche Methode zur Pathogenitätsabschwächung durch Mutation und Selektion von apathogenen Varianten ist das Passagieren eines pathogenen Virus in einem anderen Wirt. Darüber hinaus sind ts-Mutanten von Influenzaviren schon früh als mögliche Kandidaten einer Lebendvaccine isoliert worden. Die Idee ist, daß sich solche Viren im oberen Respirationstrakt bei relativ niedrigen Temperaturen noch vermehren und dort die Bildung von Antikörpern induzieren, insbesondere solcher der IgA-Klasse. Die Körpertemperatur im unteren Respirationstrakt würde eine weitere Vermehrung der ts-Mutante verhindern^[34,35]. Viren, die an niedrige Temperaturen (25°C) adaptiert sind und dementsprechend eine Vielzahl von Mutationen haben, scheinen für diese Zwecke besonders geeignet, weil die Wahrscheinlichkeit der Reversion zum Wildtyp abnimmt^[36,37]. Folgende Fakten müssen dabei berücksichtigt werden: Begünstigt wiederum durch das segmentierte Genom sind Suppressormutationen (Pseudoreversionen)^[38,39] und Suppressorrekombinationen^[40] – darunter versteht man die Unterdrückung des ts-Erscheinungsbildes durch Mutation in anderen Genen oder durch Austausch von anderen Genen unter Beibehaltung der ts-Mutation – bei Influenzaviren nicht selten, so daß Reversionen zum ts⁺-Phänotyp selbst bei Viren mit multiplen ts-Defekten häufig vorkommen. Eine genaue Analyse solcher ts-Mutanten hat ergeben, daß die Häufigkeit der Reversion zum ts⁺-Phänotyp vom RNA-Segment abhängt, in dem sich der ts-Defekt befindet. Die Reversion ist in den Genen am häufig-

sten, deren Genprodukte miteinander kooperieren; die Ursache sind wahrscheinlich Suppressormutationen. Wenn Doppelmutanten bei mittlerer Temperatur in Gewebekulturen passagiert werden, erscheinen sehr schnell ts⁺-Revertanten. Bei hoher Temperatur geht solch eine Mutante beim Passagieren verloren (keine Replikation). Bei niedriger Temperatur gibt es keinen Selektionsdruck, und deshalb haben mögliche Revertanten keine Chance. Dementsprechend wurden Hühner, die mit einer Doppelmutante des Virus der Klassischen Geflügelpest intratracheal (über die Luftröhre) infiziert wurden (relativ niedrige Temperatur im oberen Respirationstrakt) krank, oder sie starben. Wenn sie intramuskulär infiziert wurden (sofort 41 °C), lösten sie keinerlei Symptome aus^[41]. Aus diesem Grunde scheint die Idee, ts-Mutanten über den Respirationstrakt zu applizieren, nicht vielversprechend. Außerdem zeigte sich, daß beim Passagieren der in Abschnitt 3.1 beschriebenen apathogenen Reassortanten bei erhöhter Temperatur sehr schnell wieder hochpathogene Varianten entstanden^[42]. Selbst der Austausch ganzer RNA-Segmente führt also nicht zu einer sicheren Lebendvaccine.

Die Spaltbarkeit des Hämagglutinins (HA) in die Spaltprodukte HA₁ und HA₂ in infizierten Zellen durch Trypsin-ähnliche Enzyme ist die Voraussetzung dafür, daß sich Influenza-A-Viren über viele Cyclen vermehren können^[43,44]; sie ist deshalb ein wichtiger Pathogenitätsfaktor^[45]. Zellen, bei denen die entsprechende Protease das Hämagglutinin eines bestimmten Stammes nicht spalten kann, können nur nichtinfektiöse Viren ausschleusen, es sei denn, man fügt dem Kulturmedium kleine Mengen Trypsin zu^[43,44,46]. Die Spaltbarkeit von HA hängt also zum einen vom Virus ab, zum anderen von der Wirtszelle. Zum Beispiel vermehren sich in der Chorioallantoismembran des angebrüteten Hühnereis praktisch alle Influenzaviren. Die ausgeschleusten Viren besitzen alle ein gespaltenes HA. Damit kann man Hühnerembryozellen (HEZ) in Kultur infizieren. Aber nur einige wenige Stämme vom H5- und H7-Subtyp verlassen die HEZ mit gespaltenem HA und können in diesen Zellen Plaques bilden. Die anderen Viren durchlaufen in HEZ nur einen einzigen Vermehrungszyklus und bilden keine Plaques^[43-45]. Aufgrund dieser Eigenschaft sollte man erwarten, daß bei einem Virus, bei dem das HA von der in einer bestimmten Zelle vorhandenen Protease nicht gespalten wird, das HA-Gen durch Mutation so verändert werden kann, daß das Genprodukt spaltbar wird. Genau das ist bei der Adaptation eines Influenzavirus durch Passagieren in einer normalerweise (fast) nicht permissiven Zelllinie erreicht worden. Die so gewonnenen Varianten produzierten ohne Zusatz von Trypsin ein gespaltenes HA in der neuen Wirtszelle, in der sie sich nun gut vermehrten. Die Spaltbarkeit von HA in der neuen Wirtszelle konnte durch Sequenzanalyse der HA-Gene des Ausgangsstammes und der Varianten dem Austausch einer einzigen Aminosäure zugeordnet werden^[47]. Dies ist ein Beispiel dafür, daß durch eine einzige Punktmutation das Virus sich so verändert, daß es in einem zunächst nicht-permissiven Wirt infektiös wird.

Die Natur macht auch von dieser Möglichkeit Gebrauch, um die Pathogenität eines Virus für seinen natürlichen Wirt zu erhöhen. So wurde im Frühjahr 1983 in einer Hühnerfarm in Pennsylvania ein Influenzavirus isoliert, das in Hühnern nur milde Symptome wie verminderte Ei-

legefähigkeit hervorrief. Bereits im Oktober desselben Jahres starben in umliegenden Farmen viele Hühner, aus denen man ein Virus isolierte, das sich nur in wenigen Punktmutationen von dem ersten Isolat unterschied. Das kaum pathogene Virus vermehrte sich in primären Hühnerfibroblasten mit (fast) ungespaltenem HA zu ganz niedrigen Titern, während bei der pathogenen Variante in der gleichen Wirtszelle das HA gespalten wurde und die Virustiter hoch waren. Auch hier konnte durch Sequenzierung des HA-Gens gezeigt werden, daß diese Eigenschaftsänderung mit einem einzigen Aminosäureaustausch korreliert, der zum Verlust einer Kohlenhydratseitenkette in der Nähe der Spaltstelle führte^[48].

5. Möglicher Organotropismus durch Stabilität des Virus im sauren Milieu

Bei Influenzaviren mit gespaltenem Hämagglutinin kommt es bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6 zu einer irreversiblen Konformationsänderung des HAs; sie wird mit der Fusion der Virusmembran mit den Endosomenmembranen – Endosomen sind intrazelluläre Vesikel – und damit mit der Einschleusung des Nucleocapsids in die infizierte Zelle in Verbindung gebracht^[49]. Bei Viren mit ungespaltenem HA findet diese Konformationsänderung nicht statt. Diese Viren können keine Infektion starten, da sich bei ihnen die HA-Konformation nicht ändert und sie deshalb nicht in Endosomen aufgenommen werden^[50]. Werden Viren mit gespaltenem HA in freier Lösung einem niedrigen pH ausgesetzt, so findet eine Konformationsänderung statt, und die Viren erleiden einen irreversiblen Verlust der Infektiosität. Viele Viren mit ungespaltenem HA halten dagegen eine längere Säurebehandlung bei pH-Werten weit unter 5 aus. Diese Viren benötigen allerdings für ihre weitere Vermehrung ein Enzym mit Trypsin-ähnlicher Spaltungsspezifität (siehe Abschnitt 4). Die hochpathogenen aviären Influenzaviren werden im Gegensatz zu apathogenen Stämmen von allen bisher untersuchten Zellen mit gespaltenem HA ausgeschleust^[45]; sie sind gegen Säuren extrem empfindlich^[51]. Das größte Reservoir für unterschiedliche Influenza-A-Viren bieten die Wasservögel. Diese Influenzaviren sind für ihre natürlichen Wirte weitgehend apathogen, und sie werden während der großen Vogelzüge über weite Strecken transportiert und verteilt^[52]. Sie vermehren sich in einem einigermaßen gut definierten Abschnitt des Dünndarms^[53]. Die natürliche Infektionsroute bei Wasservögeln ist nicht bekannt. Sie lassen sich im Laboratorium aber über die Kloake infizieren. Wäre dies auch der natürliche Infektionsweg, dann würden die im Teichwasser bei relativ niedrigem pH-Wert überlebenden Viren^[54] mit ungespaltenem HA in die Regionen des Darmes vordringen, in denen noch genügend Trypsin zu ihrer Aktivierung vorhanden ist und dort eine Infektion auslösen. In unteren Regionen des Darmes, in denen Trypsin fehlt, würden die Viren nur mit ungespaltenem HA ausgeschleust und über die Fäces ins Teichwasser entlassen werden. Dieses Verhalten der aviären Influenzaviren würde einmal erklären, warum diese Viren bei Wasservögeln einen so eng begrenzten Organotropismus haben und deswegen weitgehend apathogen sind und sich enorm leicht in der Natur ausbreiten. Zum anderen wäre

verständlich, warum sich die hochpathogenen aviären Viren wegen ihrer hohen Säureempfindlichkeit (Harnsäure, die in Vogelfäces in hohen Konzentrationen vorkommt, hat einen pK -Wert von 5.5) sehr schlecht ausbreiten und nur deshalb ihren natürlichen Wirt nicht ausrotten^[51]. Die oben genannten Eigenschaften des HAs bei Viren der Wasservogel ist aber sicherlich nicht der einzige Faktor für deren Organtropismus, da Reassortanten zwischen Entenviren und humanpathogenen Stämmen mit in HEZ nicht spaltbarem HA des zweiten Elternvirus im Laboratoriums-experiment einen anderen Tropismus aufweisen können^[55].

6. Die Rolle des Nucleoproteins bei der Organ- und Speziespezifität

6.1. Das Nucleoprotein als Phosphoprotein

Viren können nur dann eine Zelle infizieren, wenn diese Rezeptoren für sie haben. Rezeptoren für Influenza-A-Viren sind Neuraminsäure-haltige Glycoproteine und -lipide wie Ganglioside. Obwohl es in bezug auf die Bindungsart der Neuraminsäure eindeutig Rezeptorspezifitäten für Influenzaviren gibt^[56], kommen auf Vertebratenzellen meistens alle möglichen Neuraminsäure-haltigen Rezeptoren vor, so daß fast alle Warmblüter-Vertebratenzellen, zumindest abortiv, d. h. ohne infektiöse Viruspartikel zu bilden, von allen Influenzaviren infiziert werden können. Das heißt, daß es bei diesen Viren Faktoren in den Zellen geben muß, die es ihnen verbieten oder erlauben, sich zu vermehren. Wichtig ist zum Beispiel, ob es in der betreffenden Zelle oder in ihrer unmittelbaren Umgebung eine Protease mit Trypsin-Spaltungsspezifität (Spaltung nach Arg oder Lys) gibt, die in der Lage ist, das HA des infizierenden Influenzastammes zu spalten. Da aber Reassortanten existieren, die zwar ein für eine bestimmte Wirtszelle spaltbares HA haben, sich dort aber trotzdem nicht vermehren können^[18], muß es noch weitere Restriktionen geben.

Im Prinzip geht es also darum, daß die Wirtszelle eine oder mehrere Viruskomponenten so verändert, daß sich das Virus entweder vermehren kann oder nicht. Eine in der Natur viel verwendete Regulationsmethode ist die Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung^[57]. Bei Influenzaviren gibt es mindestens drei virusspezifische Proteine, die phosphoryliert sein können. Das sind das NP^[58–62] sowie das M^[63] und das NS1-Protein^[64]. Da bei allen bisher untersuchten Influenza-A-Virusstämmen das NP phosphoryliert ist, aber keineswegs bei allen Stämmen das NS1- und/oder das M-Protein, haben wir uns zunächst mit dem Studium der Phosphorylierung des NPs befaßt^[65].

Wenn tatsächlich die in den verschiedenen Zellen vorkommenden Protein-Phosphokinasen mit unterschiedlicher Phosphorylierungsspezifität bestimmen, ob das richtig oder falsch phosphorylierte NP seine Funktion bei der Virusvermehrung erfüllen kann, dann sollten folgende Voraussetzungen erfüllt sein: 1) Die Phosphopeptid-Fingerprints der NPs sollten sich nach Markierung mit ³²P-Orthophosphat in vivo und Verdauung der isolierten NPs mit Trypsin unterscheiden, wenn man ein und denselben Wirtszelltyp mit verschiedenen Influenza-A-Viren infiziert.

2) Die Phosphopeptid-Fingerprints des NPs eines bestimmten Influenzavirus sollten sich auch unterscheiden, wenn man verschiedene Wirtszellen mit diesem Virus infiziert. 3) Die Phosphopeptid-Fingerprints sollten durch Mutation im NP-Gen beeinflussbar sein, wenn gleichzeitig die Funktion, d. h. der Phänotyp des NPs verändert wird. Wie Abbildung 7 zeigt, ist das Phosphopeptidmuster der

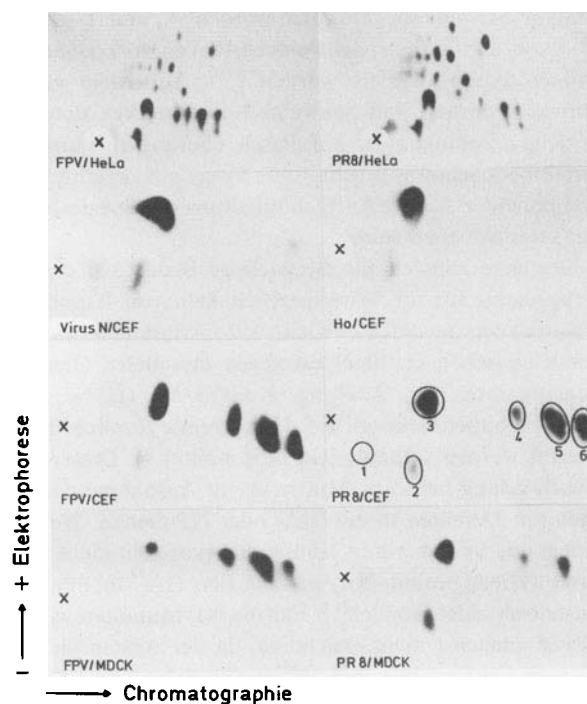


Abb. 7. Phosphopeptid-Fingerprints von Nucleoprotein verschiedener Influenza-A-Stämme, das in Gegenwart von ³²P-Orthophosphat in unterschiedlichen Zellen synthetisiert wurde. Folgende Viren wurden eingesetzt: das Virus der Klassischen Geflügelpest (A/FPV/Rostock/34), Virus N (A/chicken/Germany „N“/49), HO (A/Hong Kong/1/68) und PR8 (A/PR/8/34). Folgende Wirtszellen wurden verwendet: CEF = Primäre Hühnerembryozellen; MDCK = Permanente Hundenierenzellen; HeLa = Permanente menschliche Carzinomzellen. Die Virusausbeute nimmt durchschnittlich von CEF nach MDCK um den Faktor 10 ab, von CEF nach HeLa um den Faktor 1000. Nach Wachstum auf HeLa-Zellen ist das NP überphosphoryliert. Nach Wachstum auf MDCK-Zellen fehlt dem PR8-NP das Phosphopeptid 6; beim FPV ist das Hauptphosphopeptid 3 nur noch schwach markiert [65].

NPs tatsächlich Virusstamm-spezifisch, wenn ein und dieselbe Wirtszelle von verschiedenen Viren infiziert wird, und es hängt von der Wirtszelle ab, wenn ein und dasselbe Virus sich in verschiedenen Wirtszellen vermehrt. Weiterhin fanden wir, daß sich das Phosphorylierungsmuster ändert, wenn ein Virus eine ts-Mutation im NP-Gen hat. Bei Reversion zum Wildtyp wird das Muster wieder normal^[65]. Diese Befunde sind zwar noch keine Beweise für die These, daß der Organismus über die Phosphorylierung von viralen Proteinen die Virusvermehrung kontrolliert, sie sind jedoch mit ihr in Einklang. Gegenwärtig versuchen wir, mit Hilfe von Substanzen, die spezifisch mit zellulären Protein-Phosphokinasen reagieren, die Virusvermehrung zu beeinflussen. Hier bieten sich in erster Linie Hormone an, die möglicherweise auf dieser Ebene in das Krankheitsgeschehen eingreifen. Erste Ergebnisse zeigen, daß wir z. B. mit Insulin in einer Konzentration, die der physiologischen nahekommt, die Vermehrung von Influenzaviren verzögern können. Dieser Effekt wird durch Substanzen, die den Insulinrezeptor durch Phosphorylierung verändern, noch verstärkt^[66].

6.2. Das Nucleoprotein als bestimmende Komponente für die Speziespezifität

Die Erfahrung lehrt, daß Vogel-Inflenzaviren unter natürlichen Bedingungen Menschen nicht infizieren und umgekehrt humanpathogene Inflenzaviren nicht Vögel. Dasselbe trifft für Pferde-Inflenzaviren zu. Schweine bilden offensichtlich eine Ausnahme. Humanpathogene Viren sind in Schweinen gefunden worden^[67], und Landwirte sind von den in ihren Schweinebeständen vorkommenden Inflenzaviren infiziert worden^[68,69]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß Schweine-Inflenzaviren unter natürlichen Bedingungen auf Puten übertragen wurden^[70]. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, welche Virus-komponenten für die Aufrechterhaltung der Speziesbarrieren verantwortlich sind.

Der erste Hinweis für die wichtige Bedeutung des Nucleoproteins für die Wirtsspezifität kam von Experimenten, in denen die defekten Gene von ts-Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest gegen die allelen Gene des humanpathogenen A/Hong Kong/1/68 (H3N2)-Virus durch Doppelinfektion auf Hühnerembryozellen ausgetauscht werden sollten (siehe Abschnitt 1.4). Dieser Austausch gelang bei allen Mutanten mit Ausnahme von solchen mit Defekten in den HA- oder NP-Genen. Weil der Hongkong-Stamm ein in Hühnerembryozellen nicht spaltbares Hämagglutinin hat, war bei den HA-Mutanten der Austausch nicht möglich^[13]. Für die NP-Mutanten war der Grund zunächst nicht ersichtlich, da der Austausch nach Doppelinfektion mit den getesteten Schweine-, Pferde- oder Vogel-Inflenzaviren ohne weiteres möglich war. Als für die Doppelinfektion eine andere Wirtszelle, eine permanente Hundenierenzelle(MDCK), verwendet wurde, gelang der Austausch des NP-Genes des Geflügelpestvirus gegen das NP-Gen des Hongkong-Stammes problemlos. Die so auf MDCK-Zellen gewonnenen Reassortanten vermehrten sich allerdings nicht mehr auf HEZ und waren apathogen für Hühner^[18]. Das bedeutet, daß wir das Geflügelpestvirus durch Austausch des NP-Genes dazu brachten, seinen Wirt zu wechseln.

In den siebziger und achtziger Jahren haben *Shortridge* et al. im südchinesischen Raum eine Vielzahl von H3N2-Viren nicht nur vom Menschen, sondern auch von Vögeln und Schweinen isoliert. Seit Jahrhunderten leben dort Menschen, Enten und Schweine in engem Kontakt^[71], so daß sich die Isolate besonders gut zum Studium der Frage eignen, inwieweit Inflenzaviren die Speziesbarrieren überschreiten können. Wir haben acht humanpathogene, zehn porcine und fünfzehn aviäre H3N2-Isolate in dem oben beschriebenen Doppelinfektionstest mit NP-ts-Mutanten des Virus der Klassischen Geflügelpest eingesetzt, um zu sehen, ob wir auf HEZ vermehrungsfähige Reassortanten erhalten. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, gelang der Austausch des NP-Genes des Geflügelpestvirus mit keinem der humanpathogenen H3N2-Stämme, dagegen mit allen aviären Isolaten. Bei den Schweine-Inflenzaviren gelang der Austausch mit zwei Isolaten (Sw126 und Sw127) sehr gut, mit den anderen acht nicht. Das NP-Gen der Sw126- und Sw127-Isolate zeigte im Hybridisierungstest etwa die gleiche niedrige genetische Verwandtschaft zum ursprünglich vom Menschen isolierten WSN-Teststamm (A/WSN/33; H1N1) wie die aviären Viren, wäh-

Tabelle 2. Zusammenfassung der Eigenschaften von H3N2-Influenza-A-Viren, die von Menschen, Schweinen und Vögeln isoliert wurden. WSN ist ein ursprünglich humanpathogener Teststamm; 3/1, 5/1 etc. kennzeichnen individuelle Monoklone, die die verwendeten monoklonalen Antikörper produzieren.

Untersuchte Eigenschaften	Virus isoliert aus			
	Mensch alle Isolate	Schwein alle, außer Sw126 und Sw127	Geflügel alle Isolate	Schwein nur Sw126 und Sw127
Fähigkeit, das NP-Gen von FPV auszutauschen	—	—	+	+
Hybridisierung mit WSN-RNA-Segment 5, RNase-Resistenz [%]	28–31	28	17	17–18
Bindung an monoklonale Antikörper gegen NP des WSN-Virus, gebundene Monoklone	3/1, 5/1, 7/3	3/1, 5/1, 7/3	3/1, 5/1, 7/3, 150/4, 469/4	3/1, 5/1, 150/4

rend die humanpathogenen und porcinen Isolate, bei denen kein NP-Genaustausch auf HEZ möglich war, die gleiche relativ hohe genetische Verwandtschaft zum WSN-Stamm aufwiesen (Tabelle 2). Die NPs wurden auch mit fünf unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern gegen das NP des WSN-Stammes serologisch untersucht. Hier nehmen die Isolate Sw126 und Sw127 eine Mittelstellung ein (Tabelle 2). Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß die humanpathogenen H3N2-Viren nicht direkt auf Vögel übertragen werden können und wahrscheinlich auch nicht umgekehrt; wahrscheinlich muß es vorher zu einem Reassortment im Schwein kommen. Die Schweine sind in bezug auf die Vermehrung humaner und aviärer Inflenzaviren offensichtlich toleranter. In dem beschriebenen Fall wird die Speziespezifität durch das NP-Gen und dessen Genprodukt determiniert. Die Gene, die für die Oberflächenglycoproteine H3 und N2 codieren, können die Speziesbarriere wahrscheinlich leicht überschreiten, da sie in allen hier untersuchten Isolaten, unabhängig von der Spezies, vorkommen. Doppelinfektionsexperimente mit ts-Mutanten mit Defekten in anderen Genen des Geflügelpestvirus ergaben, daß auch die anderen Gene für die Überschreitung der Speziesbarriere keine entscheidende Rolle spielen^[72].

Die Isolate Sw126 und Sw127 nehmen in bezug auf das NP-Gen eine Mittelstellung zwischen den humanen und aviären H3N2-Stämmen ein (Tabelle 2). Das könnte bedeuten, daß diese NPs von einem aviären Virus stammen und sich an den neuen Wirt adaptieren, daß dieser Prozeß aber noch nicht abgeschlossen ist. Die Phosphopeptid-Fingerprints der NPs dieser beiden Viren sind bereits identisch mit denen der anderen porcinen H3N2-Stämme und verschieden von denen der aviären und humanpathogenen H3N2-Isolate^[72].

Aufgrund dieser besonderen Stellung des Schweines als Wirt für Inflenzaviren verschiedener Herkunft könnten diese Tiere für das plötzliche Auftreten neuer pandemischer Stämme (Reassortment nach Doppelinfektion) verantwortlich sein. Die Lebensbedingungen in China böten darüber hinaus auch eine Erklärung, warum die meisten Pandemien vom südchinesischen Raum ausgehen^[71]. Vielleicht würde die Veränderung dieser Bedingungen helfen, das Auftreten des Antigenshifts zu vermeiden oder zumindest seltener werden zu lassen.

- [5] C. Scholtissek, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 80 (1978) 139.
- [6] V. S. Hinshaw, R. G. Webster, R. J. Rodriguez, *Arch. Virol.* 67 (1981) 191.
- [7] R. M. Krug in P. Palese, D. W. Kingsbury (Hrsg.): *Genetics of Influenza Viruses*, Springer, Wien 1983, S. 70.
- [8] J. J. Skehel, A. J. Hay, *J. Gen. Virol.* 39 (1978) 1.
- [9] R. A. Lamb in P. Palese, D. W. Kingsbury (Hrsg.): *Genetics of Influenza Viruses*, Springer, Wien 1983, S. 21.
- [10] H.-D. Klenk, R. Rott, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90 (1980) 19.
- [11] R. W. Simpson, G. K. Hirst, *Virology* 35 (1968) 41.
- [12] C. Scholtissek, A. L. Bowles, *Virology* 67 (1975) 576.
- [13] C. Scholtissek, E. Harms, W. Rohde, M. Orlich, R. Rott, *Virology* 74 (1976) 332.
- [14] E. Harms, W. Rohde, F. Bosch, C. Scholtissek, *Virology* 86 (1978) 413.
- [15] C. Scholtissek, W. Rohde, V. von Hoyningen, R. Rott, *Virology* 87 (1978) 13.
- [16] C. Scholtissek, V. von Hoyningen, R. Rott, *Virology* 89 (1978) 613.
- [17] K. Nakajima, U. Desselberger, P. Palese, *Nature (London)* 274 (1978) 334.
- [18] C. Scholtissek, I. Koennecke, R. Rott, *Virology* 91 (1978) 79.
- [19] C. Scholtissek, *Virology* 93 (1979) 594.
- [20] I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature (London)* 289 (1981) 366.
- [21] D. C. Wiley, I. A. Wilson, J. J. Skehel, *Nature (London)* 289 (1981) 373.
- [22] C. Scholtissek, R. Rott, M. Orlich, E. Harms, W. Rohde, *Virology* 81 (1977) 74.
- [23] A. S. Beare: *Basic and Applied Influenza Research*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1982, S. 211.
- [24] B. R. Murphy, M. L. Clements, H. F. Maassab, A. J. Buckler-White, S.-F. Tian, W. T. London, R. M. Chanock in C. H. Stuart-Harris (Hrsg.): *The Molecular Virology and Epidemiology of Influenza*, Academic Press, New York 1984, S. 211.
- [25] C. Scholtissek, *Behring Inst. Mitt.* 69 (1981) 30.
- [26] R. Rott, M. Orlich, C. Scholtissek, *Virology* 120 (1982) 215.
- [27] A. Vallbracht, B. Flehmig, H.-J. Gerth, *Intervirology* 11 (1979) 16.
- [28] C. Scholtissek, A. Vallbracht, B. Flehmig, R. Rott, *Virology* 95 (1979) 492.
- [29] J. Bonin, C. Scholtissek, *Arch. Virol.* 75 (1983) 255.
- [30] A. Vallbracht, C. Scholtissek, B. Flehmig, H.-J. Gerth, *Virology* 107 (1980) 452.
- [31] M. Reinacher, J. Bonin, O. Narayan, C. Scholtissek, *Lab. Invest.* 49 (1983) 686.
- [32] R. Geraci, D. J. St. Aubin, I. K. Barker, R. G. Webster, V. S. Hinshaw, W. J. Bean, H. L. Ruhnke, J. H. Prescott, G. Early, A. S. Baker, S. Maddoff, R. T. Schooly, *Science* 215 (1982) 1129.
- [33] V. S. Hinshaw, W. J. Bean, R. G. Webster in D. P. Nayak (Hrsg.): *Genetic Variation among Influenza Viruses*, Academic Press, New York 1981, S. 515.
- [34] H. W. Kim, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, R. H. Parrott, B. R. Murphy, D. D. Richman, R. M. Chanock, *Pediatr. Res.* 10 (1976) 238.
- [35] B. R. Murphy, R. M. Chanock in D. P. Nayak (Hrsg.): *Genetic Variation among Influenza Viruses*, Academic Press, New York 1981, S. 601.
- [36] H. F. Maassab, *Nature (London)* 213 (1967) 612.
- [37] N. J. Cox, A. P. Kendal, A. A. Shilov, G. I. Alexandrova, Y. Z. Ghendon, A. I. Klimov, *J. Gen. Virol.* 66 (1985) 1697.
- [38] B. R. Murphy, M. D. Tolpin, J. G. Massicot, H. Y. Kim, R. H. Parrott, R. M. Chanock, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 354 (1980) 172.
- [39] C. Scholtissek, S. B. Spring in D. P. Nayak (Hrsg.): *Genetic Variation among Influenza Viruses*, Academic Press, New York 1981, S. 399.
- [40] C. Scholtissek, S. B. Spring, *Virology* 118 (1982) 28.
- [41] C. Scholtissek, R. Rott, *Virus Res.* 1 (1984) 117.
- [42] R. Rott, M. Orlich, C. Scholtissek, *Virology* 126 (1983) 459.
- [43] H.-D. Klenk, R. Rott, M. Orlich, J. Blödmann, *Virology* 68 (1975) 426.
- [44] S. G. Lazarowitz, P. W. Choppin, *Virology* 68 (1975) 440.
- [45] F. X. Bosch, M. Orlich, H.-D. Klenk, R. Rott, *Virology* 95 (1979) 191.
- [46] G. Appleyard, H. B. Maber, *J. Gen. Virol.* 25 (1974) 351.
- [47] R. Rott, M. Orlich, H.-D. Klenk, M. L. Wang, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *EMBO J.* 3 (1984) 3329.
- [48] Y. Kawaoko, C. Naeye, R. G. Webster, *Virology* 139 (1984) 303.
- [49] J. J. Skehel, P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, D. C. Wiley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 968.
- [50] C. Scholtissek, *Arch. Virol.*, im Druck.
- [51] C. Scholtissek, *Arch. Virol.* 85 (1985) 1.
- [52] R. G. Webster, W. G. Laver in E. D. Kilbourne (Hrsg.): *The Influenza Viruses and Influenza*, Academic Press, New York 1975, S. 269.
- [53] R. G. Webster, M. Yakhno, V. S. Hinshaw, W. J. Bean, G. Murti, *Virology* 84 (1978) 268.
- [54] V. S. Hinshaw, R. G. Webster, B. Turner, *Intervirology* 11 (1979) 66.
- [55] V. S. Hinshaw, R. G. Webster, C. W. Naeye, B. R. Murphy, *Virology* 128 (1983) 260.
- [56] H. H. Higa, G. N. Rogers, J. C. Paulson, *Virology* 143, im Druck.
- [57] P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* 151 (1985) 439.
- [58] M. L. Privalsky, E. E. Penhoet, *J. Virol.* 24 (1977) 401.
- [59] M. L. Privalsky, E. E. Penhoet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3625.
- [60] M. L. Privalsky, E. E. Penhoet, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5368.
- [61] T. Petri, N. J. Dimmock, *J. Gen. Virol.* 57 (1981) 185.
- [62] J. W. Almond, V. Felsenreich, *J. Gen. Virol.* 60 (1982) 295.
- [63] A. Gregoriades, T. Christie, K. Markarian, *J. Virol.* 49 (1984) 229.
- [64] T. Petri, S. Patterson, N. J. Dimmock, *J. Gen. Virol.* 61 (1982) 217.
- [65] O. Kistner, H. Müller, H. Becht, C. Scholtissek, *J. Gen. Virol.* 66 (1985) 465.
- [66] C. Scholtissek et al., unveröffentlicht.
- [67] W. D. Kundin, *Nature (London)* 288 (1970) 587.
- [68] W. R. Dowdle, M. A. W. Mattwick, *J. Infect. Dis.* 136 (1977) 386.
- [69] V. S. Hinshaw, W. J. Bean, R. G. Webster, B. C. Easterday, *Virology* 84 (1978) 51.
- [70] V. S. Hinshaw, R. G. Webster, W. J. Bean, J. Downie, D. A. Senne, *Science* 220 (1983) 206.
- [71] K. F. Shortridge, C. H. Stuart-Harris, *Lancet* ii (1982) 812.
- [72] C. Scholtissek, H. Bürger, O. Kistner, K. F. Shortridge, *Virology*, im Druck.
- [73] H. Steuler, B. Schröder, H. Bürger, C. Scholtissek, *Virus Res.* 3 (1985) 35.