

1 H1N1 – VIROLOGISCHE GRUNDLAGEN

1.1 Das Influenzavirus und seine Replikation

- 1.1.1 Klassifikation der Orthomyxoviren
- 1.1.2 Wirte und Verbreitung der Orthomyxoviren
- 1.1.3 Das Influenza-A-Virus – Aufbau des Virions, Genomstruktur und Proteine
- 1.1.4 Replikationszyklus des Influenza-A-Virus

1.2 Genetische Variabilität des Influenza-A-Virus

- 1.2.1 Antigen-Drift und Antigen-Shift – zwei Mechanismen zur Generierung genetischer Variabilität bei Influenzaviren
- 1.2.2 Das Konzept der genetischen Linien bei Influenzaviren

1.3 Die genetischen Linien des H1N1

- 1.3.1 Humanes H1N1
- 1.3.2 Porzines H1N1
- 1.3.3 Aviäres H1N1
- 1.3.4 Neues pandemisches H1N1 (S-OIV)

1.4 Literatur

1.1 Das Influenzavirus und seine Replikation

1.1.1 Klassifikation der Orthomyxoviren

Influenzaviren gehören zur Familie *Orthomyxoviridae*. Humanpathogen sind drei der fünf bekannten Gattungen: Influenzavirus A, B und C mit jeweils einer Spezies (ebenfalls als Influenzavirus A, B und C bezeichnet). Diese sind die Erreger der Grippe (Influenza). Daneben gibt es die Gattungen Thogotovirus (zwei Spezies: Dhori-Virus, Batken-Virus) und Isavirus (eine Spezies: *Infectious salmon anemia virus*; [1]). Die Bezeichnung *Influenza* leitet sich aus dem Italienischen her, wo man im 15. Jahrhundert eine Seuche als *influentia* bezeichnete (von lat. *influere*, beeinflussen). Die Bezeichnung *Grippe* leitet sich vom französischen *grippe* für eine "plötzlich auftretende Krankheit" ab und ist etymologisch mit dem althochdeutschen Wort *grifan* für *greifen* und dem noch älteren, altsächsischen Wort *gripan* verwandt.

1.1.2 Wirte und Verbreitung der Orthomyxoviren

Influenza-A-Viren haben ein breites Wirtsspektrum. Hauptwirte sind Wasservögel der Ordnungen *Anseriformes* und *Charadriiformes*, aber auch zahlreiche andere Vogelarten können produktiv infiziert werden. Zu den wichtigsten Säugetierwirten zählen der Mensch, das Schwein und das Pferd. Hunde, Katzen und katzenartige Raubtiere sowie verschiedene Marderarten (Frettchen, Steinmarder, Nerz) und Meeressäugetiere (Wale, Seehunde) wurden als weitere Wirtsspezies beschrieben. Tiermodelle für experimentelle Influenzavirusinfektionen sind Frettchen, Maus, Meerschweinchen, Schwein und verschiedene Affenspezies. **Influenza-B- und -C-Viren** haben den Menschen als natürlichen Wirt – Infektionen des Schweins kommen aber auch vor. Thogotoviren sind Arboviren. Sie werden von Zecken übertragen und infizieren v. a. Rinder, Schafe, Esel, Kamele, Büffel und Ratten. Laborinfektionen des Menschen wurden beschrieben [2]. Das Isavirus ist wasserbürtig und infiziert Lachse. Während die Influenzaviren eine weltweite Verbreitung zeigen, erstreckt sich die Verbreitung der Thogotoviren von Zentralafrika über Südeuropa und Russland in den asiatischen Raum bis nach Indien. Isaviren wurden in den Küstenregionen des Nordatlantiks und an der chilenischen Pazifikküste nachgewiesen.

1.1.3 Das Influenza-A-Virus – Aufbau des Virions, Genomstruktur und Proteine

Influenza-A-Viren sind behüllte Negativstrang-RNA-Viren. Das Virion ist bei seiner Erstisolierung meist filamentös oder pleomorph mit einem Durchmesser von 80 nm und einer Länge bis zu mehreren Mikrometern. Nach Zellkulturadaption erscheint es sphärisch (Abb. 1). Die Virushülle wird aus der Zellmembran gebildet und enthält fast ausschließlich viruseigene Oberflächenproteine. Besonders prominent sind das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA), die in elektronenmikroskopischen Darstellungen in der Virushülle dominieren (Abb. 1). Ein drittes viruseigenes Protein in der Virushülle ist der M2-Protonenkanal. Die Innenseite der Hülle wird durch das Matrixprotein (M1) ausgekleidet. Im Inneren des Virions befinden sich Nukleokapside, das sind Komplexe aus RNA und Protein. Elektronenmikroskopisch erscheinen diese als etwa 10–15 nm weite und 30–120 nm lange Stäbchen, die zurückgefaltet und in sich verdreht sind [3]. Sie sind über das Matrixprotein mit der Hülle assoziiert [4].

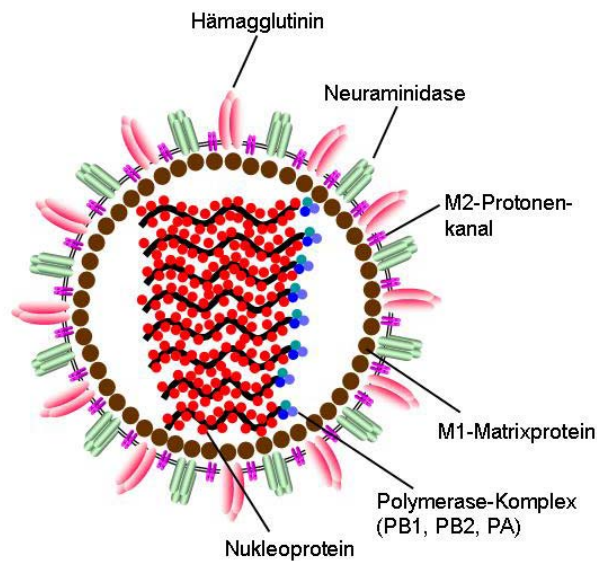


Abb. 1 Struktur des Influenzavirus. Das Teilbild zeigt schematisch die Struktur des Influenzavirus. Dargestellt sind die wesentlichen Strukturkomponenten bestehend aus Hülle mit Oberflächenproteinen Hämagglutinin, Neuraminidase und M2-Protonenkanal, die anliegende Matrix sowie 8 Nukleokapside aus viraler RNA, Nukleoprotein und Polymerase-Komplex. (Abb.: Wutzler).

Das RNA-Genom ist segmentiert [5] und mit dem viralen Nukleoprotein (NP) und der viralen Polymerase assoziiert. Die 8 RNA-Segmente sind unterschiedlich groß (zwischen 890 und 2341 Nukleotide) und codieren für 11 Proteine. Die RNA hat Negativstrangorientierung, d. h. die Expression der viralen Gene erfolgt erst nach Transkription von der genomischen RNA mit Hilfe der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase.

Die 11 viruseigenen Proteine werden üblicherweise in 2 Gruppen eingeteilt, die Oberflächenproteine HA, NA und M2 und die sog. internen Proteine. Das **Hämagglutinin** (HA) ist ein Trimer. Es dient der Adsorption des Virus an die Wirtszellmembran und vermittelt die Fusion der Virushülle mit der Wirtszelle. Die **Neuraminidase** (NA), ein Tetramer, spaltet endständige Neuraminsäuren von den Zuckerseitenketten, sowohl der viralen Hüllproteine als auch der Wirtszellmembran, und ermöglicht damit die Freisetzung neugebildeter Viren von der Wirtszelloberfläche. Serologisch lassen sich 16 HA-Typen und 9 NA-Typen unterscheiden. Der **M2-Protonenkanal** (M2) ist 97 Aminosäuren lang und ein Tetramer. Seine Funktion ist die Absenkung des pH im Virion nach der Infektion. Die sog. internen Proteine befinden sich im Inneren des Virions oder übernehmen in der infizierten Zelle als Nichtstrukturproteine wichtige Aufgaben im Replikationszyklus. Das **Nukleoprotein** (NP) hat 2 wesentliche Funktionen. Es ist die Hauptproteinkomponente des Nukleokapsids und ist zu Beginn des Infektionszyklus für den Kerntransport der Nukleokapside verantwortlich [6]. Die **RNA-Polymerase**, ebenfalls Bestandteil des Nukleokapsids, ist ein Heterotrimer und besteht aus 2 basischen Untereinheiten (PB1 und PB2) und einer sauren Untereinheit (PA). Die Polymerase wird sowohl für die Transkription als auch für die Replikation benötigt. Das **Matrixprotein** (M1) ist ein multifunktionelles Protein. Es kleidet als Strukturprotein die Innenseite der Virionhülle aus und ist am filamentösen Phänotyp der Influenzaviren beteiligt [7, 8]. Es interagiert mit den viralen Proteinen NEP, NP, den zellulären ESCRT-Proteinen, der viralen RNA und den Nukleokapsiden. Zinkgebundene und nicht an Zink gebundene Matrixproteine mit möglicherweise unterschiedlicher biologischer Aktivität lassen sich in den Virionen nachweisen [9]. Auch das **Nichtstrukturprotein** (NS1) hat multiple Funktionen im viralen Replikationszyklus. Als Antagonist der zellulären

Interferonantwort inhibiert es die Wirtsimmunantwort und die Apoptose. Gleichzeitig induziert es Signalwege (z. B. den Phosphatidylinosit-3-Kinase-Akt/Proteinkinase B-Weg), um eine effiziente Virusreplikation zu ermöglichen [10]. Die virale RNA-Synthese, das Spleißen der viralen mRNA und ihre Translation werden ebenso beeinflusst wie die virale Morphogenese. Hierfür wurde eine Vielzahl von Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen nachgewiesen. Das **Nuclear-Export-Protein** (NEP), früher als NS2 bezeichnet, ist ein *Shuttle*-Protein, das zusammen mit dem Matrixprotein M1 Nukleokapside aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Das **PB1-F2** ist ein antiapoptotisches Protein mit Lokalisation in der inneren Membran der Mitochondrienhülle [11]. Es steht in Verdacht, die Pathogenese der Influenza zu beeinflussen. Da viele Virusstämme jedoch nur über ein verkürztes PB1-F2 ohne Mitochondrienlokalisierungssignal (*mitochondrial targeting signal*, MTS) verfügen (z. B. saisonale H1N1-Stämme seit den 1950er Jahren, alle klassischen Schweineinfluenzaviren, viele europäische Schweineinfluenzaviren; [12], scheint diese Funktion nichtessentiell zu sein. Intaktes PB1-F2 interagiert mit den mitochondrialen Proteinen ANT3 und VDAC1 [13].

1.1.4 Replikationszyklus des Influenza-A-Virus

Der Replikationszyklus der Influenza-A-Viren beginnt mit der Adsorption des Virions an die Wirtszelle. Hierfür bindet das virale Hämagglutinin an zelluläre Rezeptormoleküle, die in verschiedenen Organen und Spezies unterschiedliche Strukturen haben können. So werden über die Rezeptoren sowohl Wirtsspezifität als auch Tropismus der Influenza-A-Viren beeinflusst [14]. Das Virion wird durch rezeptorvermittelte Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen. Im Endosom kommt es mit Hilfe des HA und des M2-Protonenkanals zur Fusion von Virushülle und Endosomenmembran [15]. Dadurch werden die Nukleokapside in das Zytoplasma freigesetzt [16].

Die Nukleokapside werden mit Hilfe von Importinen in den Zellkern transportiert, wo die Replikation stattfindet. Dort transkribiert die viruseigene Polymerase zunächst mRNA. Später wird die genomische RNA repliziert.

Die Virionmorphogenese beginnt mit dem Assembly („Zusammenführung“) der Nukleokapside im Zellkern. Hierfür werden die Polymeraseuntereinheiten, NP, NEP und M1 mit Hilfe von Importinen in den Zellkern transportiert. Dort assoziieren die Polymeraseuntereinheiten und das NP mit neusynthetisierter genomischer RNA. Anschließend werden die Komplexe aus M1-NEP-Nukleokapsiden mit Hilfe von Exportinen aus dem Zellkern zur Zellmembran transportiert. Die Zellmembran enthält zahlreiche Moleküle der viralen Oberflächenproteine HA, NA und M2. Sie wurden zunächst am rauen ER synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. HA und NA werden auf ihrem Weg zur Zellmembran glykosyliert. Das HA induziert die Knospung viraler Partikel. Das M1-Protein und die zytoplasmatische Domäne des M2-Proteins sind daran beteiligt. Damit sich die neu formierten Virionen von der Zelloberfläche ablösen können, hat die Neuraminidase zuvor die Neuraminsäuren an den Zuckerketten der viralen und zellulären Oberflächenproteine abgespalten. Eine letzte Modifikation stellt die Spaltung des Hämagglutinins in die beiden Domänen HA1 (hämagglutinierende Domäne) und HA2 (Fusionsdomäne) dar, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Im Menschen wird diese Spaltung durch das bronchiale epitheliale Miniplasmin oder durch die Protease Clara der bronchialen Clarazellen katalysiert. Bei den hochpathogenen H5- und H7-Stämmen der aviären Influenzaviren findet diese Prozessierung schon intrazellulär durch Furine oder subtilisinähnliche Proteasen statt [17]. Die intrazelluläre Prozessierung erweitert den Organtropismus und stellt einen bedeutenden Pathogenitätsmechanismus dar.

1.2 Genetische Variabilität von Influenza-A-Virus

1.2.1 Antigen-Drift und Antigen-Shift – zwei Mechanismen zur Generierung genetischer Variabilität bei Influenzaviren

Eine typische Eigenschaft der Influenza-A-Viren ist ihre große Veränderlichkeit durch antigenetische **Drift** und antigenetischen **Shift**. Unter der **Antigen-Drift** versteht man die über Jahre akkumulierten Mutationen. Die Mutationsrate für Influenzaviren wird von verschiedenen Autoren je nach verwendeter Methode mit Werten zwischen 10^{-5} und 10^{-6} Austauschen/Nukleotidposition/Replikationszyklus angegeben (z. B. [18, 22, 20]). Bei einer Gesamtgröße des Genoms von etwa 13.600 Nukleotiden bedeutet das, dass etwa 1–10% der Nachkommenviren mutiert sind. In älteren Untersuchungen wurden sogar noch höhere Mutationsraten bestimmt (z. B. [21, 22]). Allerdings sind die allermeisten Basenaustausche neutral, d. h. sie verursachen keine Änderung der Aminosäuresequenz, oder eine Aminosäureänderung hat keinen Einfluss auf die *Fitness* (Replikationserfolg) des Virus. Die meisten Aminosäurepositionen unterliegen einer negativen Selektion. Austausche an solchen Positionen verschlechtern die *Fitness* des Virus. Nur wenige Aminosäurepositionen unterliegen einer positiven Selektion. Sie wird auch als "diversifizierende Selektion" bezeichnet, weil sie die Heterogenität im Genpool vergrößert. Ein Beispiel für die positive Selektion bei Influenzaviren sind die antigenen Determinanten im Hämagglutinin. Hier führen bestimmte Austausche zu *Immune-Escape-Varianten*; das sind Varianten, die eine größere Chance haben, Wirte mit Vorimmunität erfolgreich zu infizieren. Tatsächlich wurden in der hämagglutinierenden HA1-Domäne des H3 18 Aminosäurecodons identifiziert, die positiv selektioniert werden [23, 24]. Auch wenn serologisch die Antigen-Drift des Hämagglutinins besonders auffällig ist, so treten im HA-Gen Veränderungen mit derselben Frequenz auf wie in allen anderen Genen des Influenzavirus. Der Unterschied betrifft also das Verhältnis der stummen Mutationen ohne Aminosäureaustausch zu den durch positive Selektion geförderten Aminosäureveränderungen.

Der zweite wichtige Mechanismus zur Generierung von Variabilität bei Influenzaviren ist die Reassortierung; das ist der Austausch eines oder mehrerer Gensegmente. Dies kann zu einem Antigen-Shift führen. Ihre biologische Bedeutung liegt in einer Neukombination der durch positive oder negative Selektion gut adaptierten Genomsegmente. Die Reassortierung wird durch das segmentierte Virusgenom und durch Doppel- bzw. Mehrfachinfektionen des Wirts mit Viren unterschiedlicher Subtypen oder genetischer Linien ermöglicht. Von Bedeutung sind Reassortierungen, in denen HA- und NA-Segmente ausgetauscht werden.

Bei freier Reassortierung erlauben 16 HA-Typen und 9 NA-Typen insgesamt 144 HA/NA-Kombinationen; mehr als 110 Typen wurden inzwischen bei Vögeln beschrieben. Ob tatsächlich alle theoretisch möglichen Kombinationen vorkommen, ist nicht bekannt. Bei Säugetieren werden nur bestimmte Subtypen nachgewiesen. Für den Menschen spielen aktuell die Subtypen H1N1 und H3N2 eine Rolle. Zwischen 1957 und 1968 zirkulierten H2N2-Stämme und ältere serologische Arbeiten sprechen für eine Zirkulation eines ähnlichen Virus in den Jahren 1889/90 bis 1900 und von H3N8-Viren in der Zeit von 1900 bis 1918 [25, 26]. Das erste Auftreten eines neuen Subtyps löste wegen des damit verbundenen Antigen-Shifts jedes Mal eine weltweite Pandemie aus. In den interpandemischen Zeiten zeigt die Inzidenz der Influenza eine ausgeprägte Saisonalität mit Peaks in den jeweiligen Wintermonaten der Nord- und Südhemisphäre. Zirkulieren zwei oder mehr Subtypen parallel, wie dies für saisonale Influenzaviren seit 1977 der Fall ist, können Reassortanten entstehen, die nicht mit einem Antigen-Shift

assoziiert sind. Beispiele hierfür sind die 1988/89 in China und zwischen 2001 und 2003 weltweit aufgetretenen H1N2-Reassortanten aus saisonalen H1N1- und H3N2-Stämmen [27, 28]. In Konkurrenz mit den saisonalen Viren konnten sich diese Reassortanten nicht stabil etablieren. Neben den Gensegmenten für die Oberflächenantigene können auch die anderen Segmente ausgetauscht werden. Lange Zeit blieben solche Reassortierungen unbeobachtet, weil sie serologisch unauffällig sind und nur die wenigsten Virusisolate komplett sequenziert wurden. Ein Ereignis der jüngeren Vergangenheit ist jedoch von Bedeutung gewesen: ein (4+4)-Austausch verknüpfte das HA-Segment einer *Immune-escape*-Variante mit einem Adamantanresistenz-vermittelnden M-Segment [29]. Wegen des Selektionsvorteils durch die Antigen-*Drift* verbreitete sich die adamantanresistente Reassortante sehr schnell und innerhalb von nur drei Jahren waren 96,7% der weltweit isolierten saisonalen H3N2-Stämme resistent gegen die Virustatika Amantadin und Rimantadin [30]. Dieser Effekt wurde als *hitch-hiking* bezeichnet, weil die Verbreitung des Resistenzgens – gewissermaßen als Trittbrettfahrer – durch den Selektionsvorteil der *Immune-escape*-Variante begünstigt wurde.

1.2.2 Das Konzept der genetischen Linien bei Influenzaviren

Der Antigen-*Drift* hat nicht nur zur Evolution der bekannten HA- und NA-Typen beigetragen, sondern bei allen Segmenten auch zur Entwicklung definierter genetischer Linien (Genotypen) geführt [31]. Influenzavirus-Sequenzierungsprogramme haben ganz erheblich zur Charakterisierung der genetischen Linien beigetragen. Während die Nukleotidsequenzen der 16 verschiedenen HA-Typen im Mittel zu 56% identisch sind, weisen Sequenzen einer genetischen Linie eine Sequenzidentität von mehr als 90% auf. Zwei Faktoren bestimmen die Evolution genetischer Linien: Speziesbarrieren und geographische Isolation. So etablierten sich bei der Pandemie von 1918 praktisch zeitgleich stabile Infektketten mit dem neuen H1N1-Typ bei Menschen und bei Schweinen. Schon nach wenigen Jahren hatten sich daraus zwei neue genetische Linien evolviert: das saisonale H1N1 und das *classical swine* H1N1. Solche Linien lassen sich für alle 8 Genomsegmente nachweisen. Auch für Enten/Gänse (*Anseriformes*), Möwen/Watvögel (*Charadriiformes*) und Pferde gibt es getrennte Linien. Viren solcher Linien sind an ihre Wirtsspezies adaptiert. Transspeziesinfektionen kommen vor, die Replikation ist aber wenig effizient und Infektketten brechen häufig nach wenigen Generationen ab. Nur selten etablieren sich stabile Infektketten. Neben den pandemischen Viren des letzten Jahrhunderts und des *classical swine* H1N1 etablierten sich in den letzten Jahrzehnten folgende stabile Infektketten: die eurasischen Schweineinfluenzaviren und die amerikanischen Triple-Reassortanten bei Schweinen. Die aktuelle Pandemie könnte zu einer weiteren genetischen Linie führen.

Zusätzlich zu den Speziesbarrieren kann geographische Isolation zur Ausbildung genetischer Linien führen. Bedingt durch unterschiedliche Flugrouten der Zugvögel entstanden amerikanische und eurasische Influenzaviruslinien – sowohl bei den Viren der *Anseriformes* als auch der *Charadriiformes*. Da für die Evolution dieser Linien nur die geographische Isolation, nicht aber die Adaptation an einen spezifischen Wirt eine Rolle spielt, sind Virusübertragungen nicht ungewöhnlich. Sie kommen bei überlappenden Brutgebieten vor, etwa im Bereich der arktischen Bering-See [32] oder bei Translokation infizierter Vögel [33].

Ein weiterer für die Beschreibung genetischer Linien wichtiger Aspekt ist die zeitlich begrenzte Prävalenz bestimmter Linien. Im Jahr 1957 führte das Auftreten von humanen H2N2-Stämmen zu einer weltweiten Pandemie, aber schon 1968 wurde das H2 durch ein H3 ersetzt. Weniger spektakulär und aufgrund unvollständiger Sequenzdaten weniger gut belegbar ist das Verschwinden verschiedener Linien bei aviären und equinen Influenzaviren, die offenbar nach

einigen Jahren der Zirkulation wieder ausstarben. Die Sequenzierung alter Virusisolate und verstetigte Virusisolierungsprogramme könnten die aktuell schwache Datenlage verbessern und solche Unsicherheiten für die Zukunft vermeiden helfen. Die Bedeutung der zeitlich begrenzten Prävalenz ist erst durch großangelegte Sequenzierprojekte wie das Influenzagenom-Projekt des amerikanischen Nationalen Instituts für Allergie und Infektionskrankheiten (NIAID) aufgefallen. Die Sequenzierung einiger Hundert Virusisolate und der Vergleich mit vorhandenen Sequenzdaten zeigten, dass verschiedene ältere Isolate andere Genotypen aufwiesen als aktuelle Stämme [34]. Trotz Generierung Tausender von Sequenzdaten ist unser gegenwärtiges Verständnis der Dynamik der Influenzavirusepidemiologie bei Vögeln und nichthumanen Säugetieren aber immer noch lückenhaft. Bei den 16 HA-Typen wurden 69 genetische Linien beschrieben, für die 9 NA-Typen 46 Linien und für jedes Segment, das für ein internes Protein codiert, 7 bis 11 Linien.

1.3 Die genetischen Linien des H1N1

1.3.1 Humanes H1N1

Influenzaviren mit dem Hämagglutinin-Subtyp H1 traten beim Menschen erstmals 1918 auf und lösten eine schwere kontinentübergreifende Pandemie mit geschätzten 20-50 Millionen Todesfällen aus. Erst 1933 gelang es W. Smith, C. Andrewes und P. Laidlaw Influenzavirus aus menschlichen Proben im Hühnerei anzuzüchten. Das Virus hatte serologische Ähnlichkeit zu dem 1930 von Richard E. Shope isolierten Schweineinfluenzavirus. Beide Viren wurden als direkte Nachfahren des Pandemiestamms von 1918 angesehen. Unklar ist die Herkunft des Pandemiestamms. Aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Lungenproben von Opfern der Pandemie und aus gefrorenen Leichen, die im Permafrostboden Alaskas die Jahrzehnte seit 1918 überdauert hatten, konnte das Genom des hochvirulenten Virus Ende der 1990er Jahre sequenziert, phylogenetisch analysiert und durch Reverse-Genetik rekonstruiert werden (u. a. [35, 36]). Wegen mangelnder Vergleichssequenzen kann jedoch die Frage nicht abschließend geklärt werden, ob das Virus direkt von Vögeln auf den Menschen übertragen worden war, oder ob zuerst Schweine infiziert wurden und das Virus dann von diesen auf den Menschen übertragen wurde. Alle Isolate seit 1933 werden der Linie 1B zugeordnet, während die Sequenzen des pandemischen Stamms von 1918 zur Linie 1A (klassische Schweineinfluenzaviren) gezählt werden (Abb. 2).

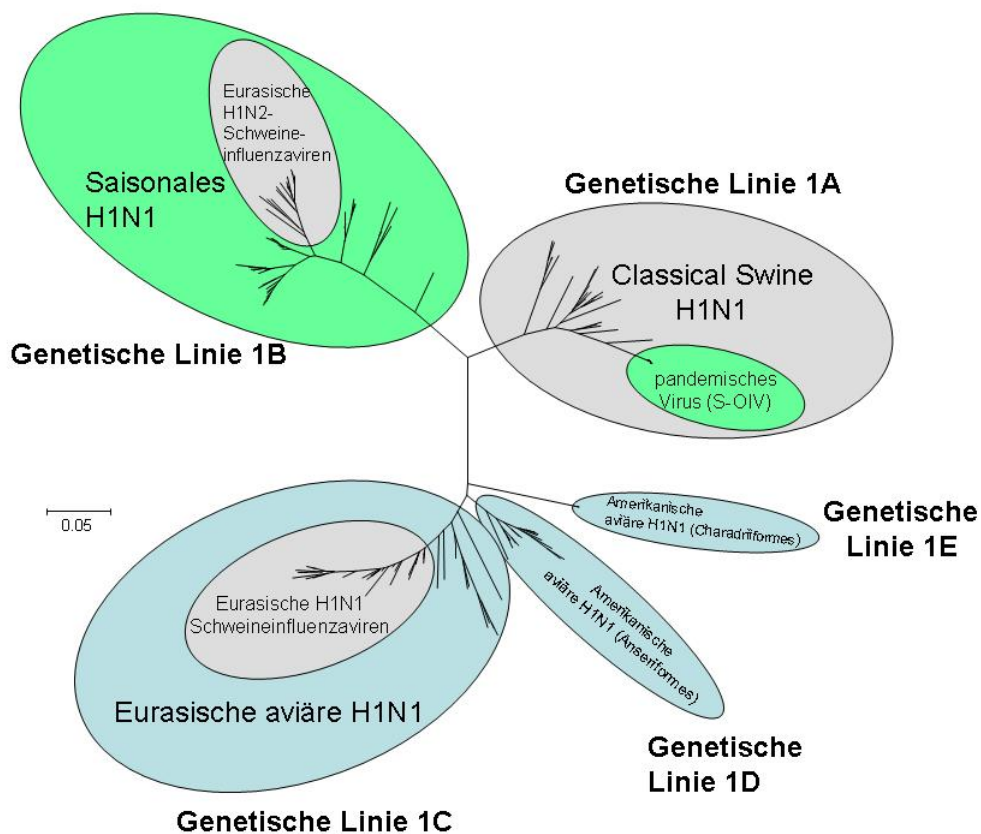


Abb. 2 Die genetischen Linien des H1N1. Dargestellt ist ein phylogenetischer Stammbaum, der mit der *Neighbor-joining*-Methode erstellt wurde. Die Signifikanz der Verzweigungen wurde durch eine Bootstrap-Analyse (1000 Replikas) geprüft. Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm MEGA 4.0 durchgeführt. Der Maßstab gibt die Anzahl der Nukleotidsubstitutionen pro Nukleotidposition wieder. Für die Stammrekonstruktion wurden 135 H1-Sequenzen (z. T. aus der GenBank) herangezogen. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurden die Bootstrap-Werte und die Stammbezeichnungen nicht dargestellt. Sequenzen humaner Isolate sind grün unterlegt, die Sequenzen porziner Stämme grau und Sequenzen aviärer Stämme hellblau. Der Stammbaum zeigt fünf genetische Linien, die von Lu et al. mit 1A bis 1E bezeichnet wurden. [31]

H1N1 zirkulierte von 1918 bis 1957 in der menschlichen Population und wurde dann durch ein H2N2-Virus abgelöst ("asiatische Grippe"), das seinerseits 1968 durch ein H3N2-Virus ersetzt wurde ("Hongkong-Grippe"). Im Jahr 1977 trat H1N1 plötzlich wieder auf ("russische Grippe") und zirkuliert seither neben H3N2. Analysen des Virus legten nahe, dass es nicht zwei Jahrzehnte in Vögeln oder anderen Organismen persistiert hatte, sondern diese Zeit tiefgefroren überdauert hatte und dann in die menschliche Population wiedereingeführt worden war [37]. Abbildung 3 zeigt die zoonotischen Infektionen und Reassortierungsereignisse, die zu den pandemischen Viren des 20. Jahrhunderts geführt haben. Gelegentlich kommt es durch Reassortierungen zu neuen HA-NA-Kombinationen, wie z. B. bei H1N2-Reassortanten aus saisonalen H1N1- und H3N2-Stämmen, die weltweit zwischen 2001 und 2003 zu Infektionen führten, sich aber nicht fest etablieren konnten [28]. Ähnliche Reassortanten wurden zuvor schon einmal 1988/89 in China isoliert [27].

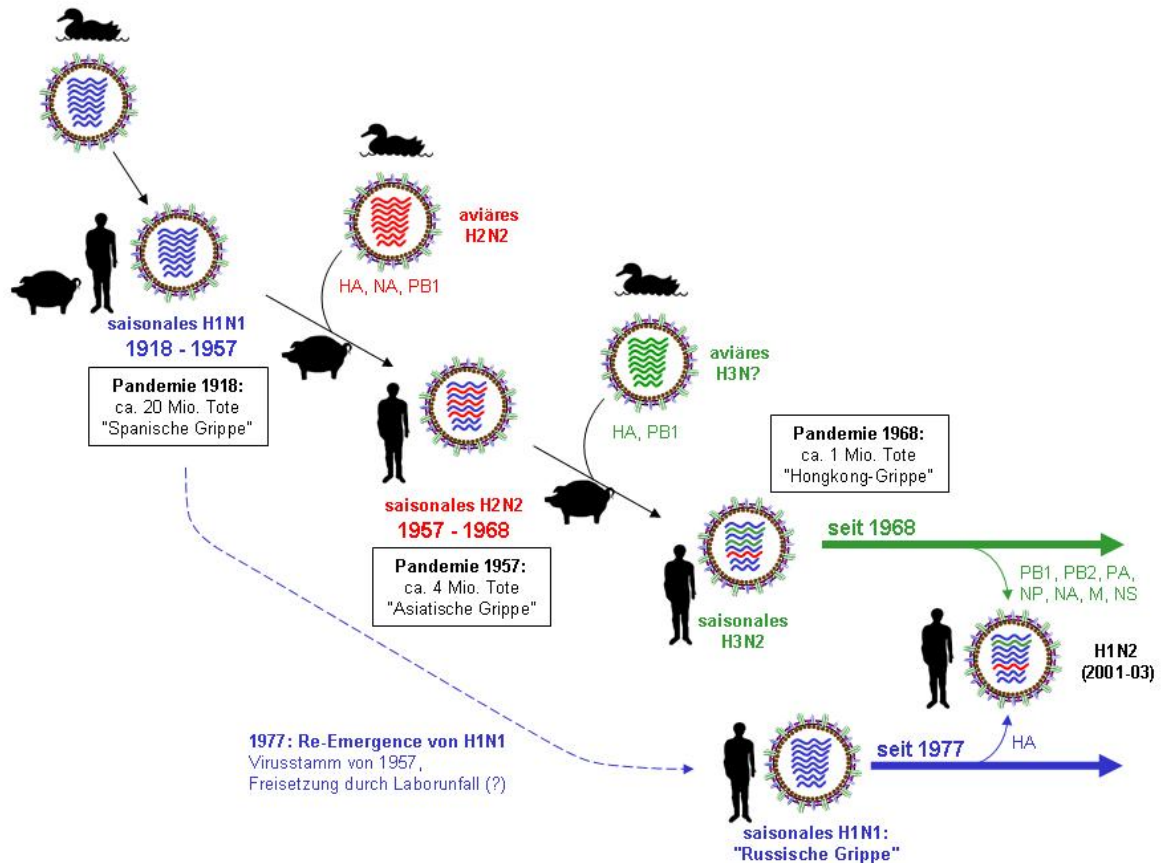


Abb. 3 Reassortierungsereignisse bei humanen Influenzaviren. Die Pandemie von 1918 wurde wahrscheinlich durch direkte Übertragung eines aviären H1N1-Influenzavirus auf Menschen ausgelöst. Zeitgleich trat erstmals Influenza auch bei Schweinen auf. Die Reassortierung des saisonalen H1N1 (Donor von 5 Segmenten) mit einem aviären H2N2 (Donor von HA, NA, PB1) führte 1957 zu einem Antigen-Shift, der eine zweite Pandemie auslöste. Eine Reassortierung des H2N2 (Donor von 6 Segmenten) mit einem aviären H3-Virus löste einen weiteren Antigen-Shift und die Pandemie von 1968 aus. Es wird angenommen, dass beide Reassortierungen im Schwein stattfanden. Bei jeder Pandemie verschwand das zuvor zirkulierende Virus. Im Jahr 1977 tauchte H1N1 wieder auf. Wegen seiner großen Ähnlichkeit mit Stämmen der 1950er Jahre wurde eine natürliche Persistenz in Vögeln bezweifelt. Seit 1977 ko-zirkulieren saisonale H1N1- und H3N2-Virusstämme. Eine Reassortierung zwischen diesen beiden Subtypen (zuletzt 2001–2003 beobachtet) stellt keinen Antigen-Shift dar. Die Segmente für PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M und NS sind im Schema von oben nach unten dargestellt. Die Farben symbolisieren ihre jeweilige Herkunft von aviären H1N1- (blau), H2N2- (rot) oder H3-Viren (grün). (Abb. Wutzler)

Neben der saisonalen Influenza treten sporadisch Fälle von zoonotischer Influenza auf, wenn Viren von Haustieren auf den Menschen übertragen werden (sog. Schweinegrippe, Vogelgrippe). Erste Hinweise darauf liegen seit den 1960er Jahren vor ([38]; s. auch [39]). Seit den 1970er Jahren werden mit einiger Regelmäßigkeit immer wieder Schweineinfluenzaviren aus menschlichen Proben isoliert.

1.3.2 Porzines H1N1

Schweine spielen in der Influenzavirusökologie eine herausgehobene Rolle. Sie besitzen sowohl Neuraminsäure- α 2,3-Galactose als Rezeptor für aviäre Influenzaviren als auch Neuraminsäure- α 2,6-Galactose für die Bindung saisonaler, humaner Influenzaviren [14]. Aufgrund dieser Rezeptorausstattung sind Schweine mit aviären und saisonalen Influenzaviren infizierbar und wurden von Scholtissek

als *mixing vessel* für die Reassortierung neuer Stämme bezeichnet [40]. Eine frühere Arbeit hatte die Pandemiestämme von 1957 und 1968 als Resultate von Reassortierungen zwischen humanen und aviären Viren gezeigt [41].

Die Schweineinfluenza wurde 1918 erstmals als Krankheit des Schweins von J. S. Koen beobachtet [42]. Wegen der zeitgleichen weltweiten Grippepandemie und einer bemerkenswerten Ähnlichkeit der Symptome mit der humanen Influenza wurde die neue Krankheit als *hog flu*, Schweinegrippe, bezeichnet. Im Jahr 1930 gelang Richard E. Shope die erste Isolierung eines Schweineinfluenzavirus [43]. Dieses Isolat repräsentiert den Ausgangsstamm für eine distinkte genetische Linie des Influenza-A-Virus (Linie 1A, Abb. 2), die seit nunmehr fast 80 Jahren immer wieder von Schweinen isoliert werden konnte. Diese Viruslinie wird als klassisches Schweineinfluenzavirus (*classical swine H1N1*) bezeichnet und breitete sich auch nach Asien und Europa aus. Seit 1997 gibt es in Nordamerika neben den klassischen Schweineinfluenzaviren auch Tripelreassortanten, mit dem PB1-Segment des saisonalen H3N2 und den PB2- und PA-Segmenten von aviären Influenzaviren der nordamerikanischen Linie. Die übrigen Segmente stammen – je nach Subtyp – von klassischen Schweineinfluenzaviren oder saisonalen Viren (Abb. 3). Fünf Subtypen gibt es: zunächst traten H3N2-Tripelreassortanten auf, danach folgten davon abgeleitete H1N1-, H1N2-, H2N3- und H3N1-Stämme.

In Europa wurden die ersten H1N1-Influenzaviren aus Schweinen in den 1930er Jahren isoliert. Es handelte sich dabei um zoonotische Infektionen der Schweine mit humanen Viren. Im Jahr 1976 kam es in Europa zum ersten Ausbruch mit klassischen Schweineinfluenzaviren, zunächst in Italien, dann auch in anderen Ländern. Seit 1979 zirkulieren aviäre H1N1-Viren in der europäischen Schweinepopulation (Abb. 3). Diese Viren (sog. *avian-like H1N1*) wurden erstmals in Belgien und Deutschland beobachtet [44, 45] und sind eng mit Stämmen verwandt, die 1977 in Bayern aus Enten isoliert wurden. Sie verbreiteten sich schnell in Europa, reassortierten mit saisonalen Influenzaviren zu porzinen H3N2- (seit 1984) und H1N2-Varianten (seit 1994) und verdrängten die klassischen Schweineinfluenzaviren. Das letzte klassische Schweineinfluenzavirus-Isolat stammt aus England aus dem Jahre 1993. Um 1987 erwarben die *Avian-like*-Schweineinfluenzaviren eine Amantadinresistenz, die sehr schnell auf den damals ebenfalls zirkulierenden H3N2-Subtyp übertragen wurde. Seit dieser Zeit wurden in Europa keine amantadinsensitiven Stämme mehr isoliert.

Europäische Schweineinfluenzaviren gelangten auch nach Asien, wo sie mit nordamerikanischen Schweineinfluenzaviren reassortierten [46]. Ein hochdynamisches Influenzageschehen ließ dort H1N1-, H1N2- und H3N2-Varianten entstehen. Auch zoonotische Infektionen mit Reassortanten wurden aus Asien berichtet [47].

1.3.3 Aviäres H1N1

Aviäre Influenzaviren mit dem Hämagglutininsubtyp H1 sind nicht selten und werden zumeist aus Enten isoliert. Es gibt nur wenige Isolate aus Hausgeflügel, darunter einige als Resultat zoonotischer Infektionen mit porzinen Stämmen. Nur wenige aviäre Isolate wurden komplett sequenziert; die vorliegenden Sequenzdaten zeigen aber deutlich die Evolution von drei Linien, eine eurasische (Linie 1C) und zwei amerikanische Linien (1D und 1E, Abb. 2). Innerhalb der eurasischen Linie hat sich nach einer zoonotischen Infektion eine stabile Infektkette bei Schweinen etabliert (*avian-like* eurasische Schweineinfluenzaviren). Die Mehrzahl der amerikanischen H1-Sequenzen gehört zu Linie 1D und infiziert vornehmlich Enten und Gänse (*Anseriformes*). Die Linie 1E ist nur durch zwei Isolate belegt. Beide stammen aus Lummen (*Charadriiformes*) und wurden 1976 isoliert, dem Jahr der ersten Surveillance bei Wildvögeln in Nordamerika.

Hämagglutinine der Linie 1E wurden seitdem nicht mehr beobachtet und es kann spekuliert werden, dass auch diese Linie inzwischen ausgestorben ist.

1.3.4 Neues pandemisches H1N1 (S-OIV)

Im April 2009 wurde bei zwei Grippepatienten (9 und 10 Jahre alt) aus Kalifornien ein Influenzavirus vom Subtyp H1N1 isoliert, das eine völlig andere genetische Zusammensetzung aufwies als das saisonale H1N1 [48]. Dieses neuartige H1N1 wurde zunächst bei Patienten aus Nordamerika (Mexiko, USA, Kanada), später auch bei Patienten anderer Regionen nachgewiesen. Am 11. Juni 2009 erklärte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Pandemie. Der neue Pandemiestamm wird als *swine-origin influenza virus* (S-OIV) bezeichnet. Er ist nach heutigen Erkenntnissen zoonotisch, da die Sequenzvergleiche für eine Reassortante aus einer nordamerikanischen H1-Tripelreassortante und einem eurasischen H1N1-Schweinegrippevirus sprechen (Abb. 4). Die Gensegmente für HA, NP und NS stammen von den klassischen Schweineinfluenzaviren, NA und M von eurasischen Schweinegrippeviren, PB2 und PA von nordamerikanischen aviären Influenzaviren und das PB1 vom saisonalen H3N2. Wegen der Verwandtschaft des Hämagglutinins mit dem der klassischen Schweineinfluenzaviren trifft das S-OIV auf eine weitgehend naive Population. Lediglich Seren von Blutspendern der Geburtsjahrgänge vor 1920 reagieren mit diesem Virus [49]. Daher kann das Auftreten dieses Virus als ein weiterer antigenetischer *Shift* aufgefasst werden, obwohl kein neuer Subtyp vorliegt.

Die Herkunft des Virus ließ sich allerdings bislang nicht einwandfrei klären. So ist unklar, ob die Reassortierung beim Menschen oder Schwein stattfand. Vor dem Auftreten der ersten humanen Fälle im März/April 2009 sind jedenfalls keine Erkrankungen bei Schweinen bekannt geworden. Unklar ist auch, wie das eurasische Schweinegrippevirus nach Nordamerika gelangte. Das M-Segment zeigt größte Ähnlichkeit mit Isolaten aus Hong Kong (1999–2002); allerdings handelt es sich dabei durchweg um H3N2-Stämme, was eine weitere unentdeckte Reassortierung voraussetzen würde. Das NA-Segment ist eng mit deutschen Isolaten verwandt (R. Zell, R. Dürrwald, A. Krumbholz, A. Philipps, P. Wutzler, unveröffentlicht). Das plötzliche Auftreten von S-OIV zeigt, wie wichtig ein regelmäßiges, flächendeckendes Monitoring der Influenza bei Schweinen ist.

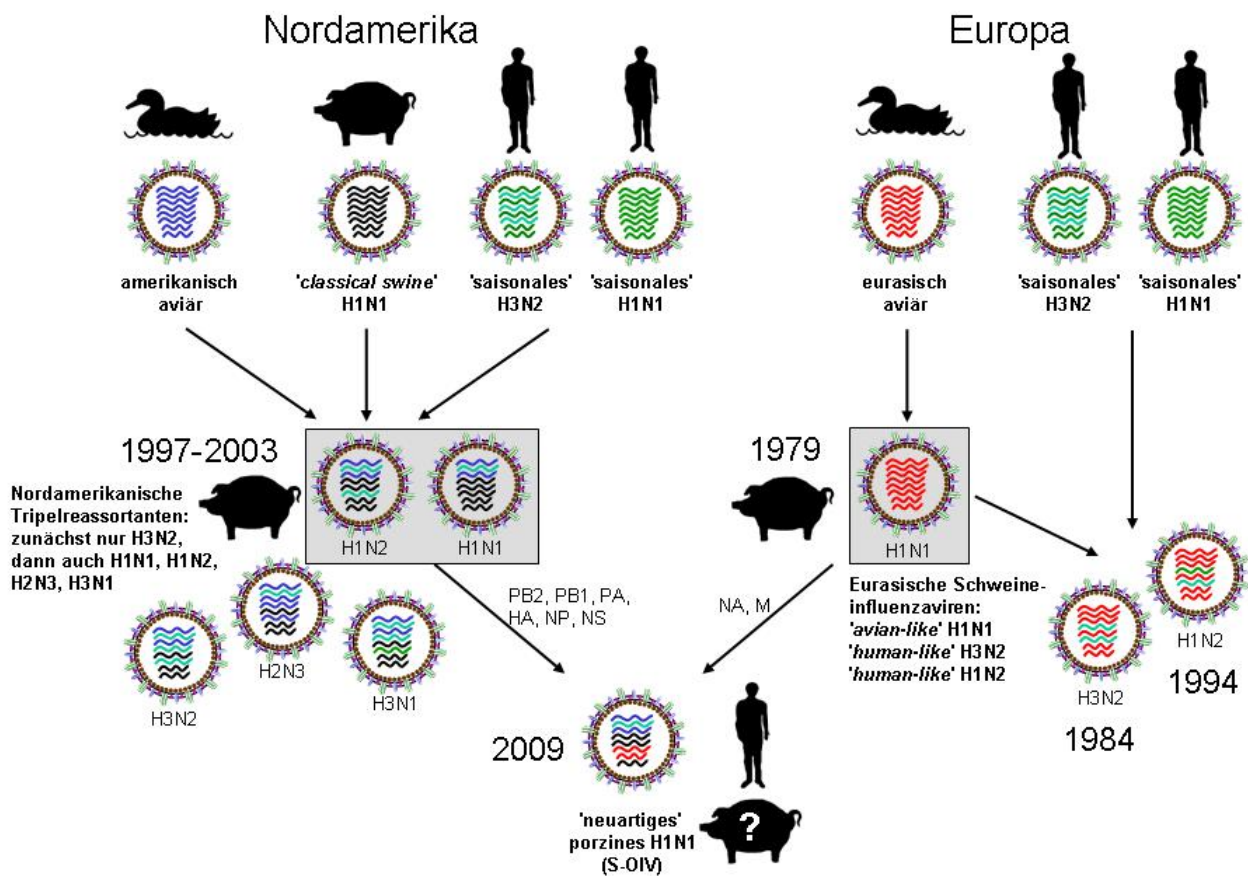


Abb. 4 Reassortierungsereignisse bei porzinen Influenzaviren. In Nordamerika zirkulieren porzine Influenzaviren vom Subtyp H1N1 seit der Pandemie von 1918, während bei Menschen saisonale H1N1- und H3N2- und bei Vögeln viele Subtypen der amerikanischen Linien vorkommen. Durch Reassortierung haben sich aus diesen Linien 1997 zunächst H3N2-Tripelreassortanten entwickelt. In der Folge entstanden durch Reassortierungen weitere Subtypen (H1N1, H1N2, H2N3, H3N1) mit unterschiedlichen Genotypen. In Europa zirkulieren neben den saisonalen H1N1- und H3N2- auch eurasische aviäre Influenzaviren, die 1979 zur Etablierung der *Avian-like*-H1N1-Schweineinfluenzaviren führten. Diese reassortierten mit saisonalen H3N2- zu sog. *Human-like*-H3N2-Schweineinfluenzaviren (seit 1984) und mit saisonalen H3N2- und H1N1- zu *Human-like*-H1N2-Tripelreassortanten (seit 1994). Im Jahr 2009 trat eine weitere Reassortante aus eurasischen *Avian-like*-H1N1- und nordamerikanischen H1-Tripelreassortanten auf (neuartiges S-OIV), die bei Menschen eine Pandemie auslöste. Unklar ist, ob diese Reassortierung zuerst im Schwein auftrat. Die Segmente für PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M und NS sind im Schema von oben nach unten dargestellt. Die Farben symbolisieren ihre jeweilige Herkunft von amerikanischen aviären Influenzaviren (blau), eurasischen aviären Influenzaviren (rot), klassischen H1N1-Schweineinfluenzaviren (schwarz) und saisonalen H1N1- und H3N2-Viren (hell- und dunkelgrün). (Abb. Wutzler)

1.4 Literatur

1. Kawaoka Y, Cox NJ, Haller O, Hongo S, Kaverin N, Klenk HD, Lamb RA, McCauley J, Palese P, Rimstad E, Webster RG (2005) Family orthomyxoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic, San Diego, pp 681-693
2. Butenko AM, Leshchinskaia EV, Semanshko IV, Donets MA, Mart'ianova LI (1987) Dhori virus – a causative agent of human disease. 5 cases of laboratory infection [in russisch]. *Vopr Virusol* 32:724–729
3. Compans RW, Content J, Duesberg PH (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* 10(4):795–800
4. Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439:490–492
5. Duesberg PH (1968) The RNAs of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 59:930–937
6. Portela A, Digard P (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83:723–734
7. Bourmakina SV, Garcia-Sastre A (2003) Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J Gen Virol* 84:517–527
8. Elleman CJ, Barclay WS (2004) The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology* 321:144–153
9. Elster C, Fourest E, Baudin F, Larsen K, Cusack S, Ruigrok RW (1994) A small percentage of influenza virus M1 protein contains zinc but zinc does not influence in vitro M1-RNA interaction. *J Gen Virol* 75:37–42
10. Ehrhardt C, Ludwig S (2009) A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol* 11:863–871
11. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* 77(13):7214–7224
12. Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhauer KJ, Wutzler P (2007) Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol* 88:536–546
13. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P (2005) Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLOS Pathog* 1(1):e4, 40–54
14. Ito T, Couceiro JNSS, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y (1998) Molecular Basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72(9):7367–7373
15. Skehel JJ, Wiley DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531–569.
16. Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F (2007) Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 124:12–21
17. Horimoto T, Kawaoka Y (1994) Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 68:3120–3128
18. Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG (1999) Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol* 73(3):1878–1884
19. Nobusawa E, Sato K (2006) Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* 80(7):3675–3678
20. Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P (1986) Measurement of the mutation rates of animal viruses: Influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* 59(2):377–383
21. Yewdell JW, Webster RG, Gerhard WU (1979) Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A haemagglutinin. *Nature* 279:246–248
22. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S (1982) Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577–1585
23. Bush RM, Bender CA, Subbarao K, Cox NJ, Fitch WM (1999) Predicting the evolution of human influenza A. *Science* 286:1921–1925
24. Bush RM, Fitch WM, Bender CA, Cox NJ (1999). Positive selection on the H3 hemagglutinin of human influenza virus A. *Mol Biol Evol* 16:1457–1465.

25. Masurel N (1968) Antibody response obtained by vaccination with the influenza A/Equi 2 virus in man. *Nature* 218:100–101
26. Mulder J, Masurel N (1958) Pre-epidemic antibody against 1957 strain of Asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands. *Lancet* 271:810–814
27. Guo YJ, Xu XY, Cox NJ (1992) Human influenza A (H1N2) viruses isolated from China. *J Gen Virol* 73:383–387
28. Xu X, Smith CB, Mungall BA, Lindstrom SE, Hall HE, Subbarao K, Cox NJ, Klimov A. (2002) Intercontinental circulation of human influenza A(H1N2) reassortant viruses during the 2001–2002 influenza season. *J Infect Dis* 186:1490–1493
29. Simonsen L, Viboud C, Grenfell BT, Dushoff J, Jennings L, Smit M, Macken C, Hata M, Gog J, Miller MA, Holmes EC (2007) The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol Biol Evol* 24(8):1811–1820
30. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubareva LV, Cox NJ, Klimov AI (2007) Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2 and A (H1N1) viruses isolated worldwide. *J Inf Dis* 196 (15 July):249–257
31. Lu G, Rowley T, Garten R, Donis RO (2007) FluGenome: a web tool for genotyping influenza A virus. *Nucl Acids Res* 35:W275–W279
32. Wahlgren A, Waldenström J, Sahlin S, Haemig PD, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Pinhassi J, Bonnedahl J, Pisareva M, Grudin M, Kiselev O, Hernandez J, Falk KI, Lundkvist A, Olsen B (2008) Gene segment reassortment between American and Asian lineages of avian influenza virus from waterfowl in the Beringia area. *Vector-borne Zoon Dis* 8(6):783–789
33. Makarova NV, Kaverin NV, Krauss S, Senne D, Webster RG (1999) Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. *J Gen Virol* 80:3167–3171
34. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, Xu X, Wang J, Ma J, Fan Y, Rakestraw KM, Webster RG, Hoffmann E, Krauss S, Zheng J, Zhang Z, Naeve CW (2006) Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311:1576–1580
35. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG (1997) Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 275:1793–1796
36. Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG (2004) Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 2:909–914
37. Nakajima K, Desselberger U, Palese P (1978) Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature* 274:334–339
38. Kluska V, Macku M, Mensik J (1961) Demonstration of antibodies against swine influenza viruses in man [in Tschechisch]. *Cesk Pediatr* 16:408–414
39. Schnurrenberger PR, Woods GT, Martin RJ (1970) Serologic evidence of human infection with swine influenza virus. *Am Rev Respir Dis* 102:356–361
40. Scholtissek C, Bürger H, Kistner O, Shortridge KF (1985) The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 147:287–294
41. Scholtissek C., Rohde W, Hoyningen V von, Rott R (1978) On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87:13–20
42. Koen JS (1919) A practical method for field diagnosis of swine disease. *Am J Vet Med* 14:468
43. Shope RE (1931) Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med* 54:373–385
44. Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA (1981) Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull WHO* 59(1):75–78
45. Witte KK, Nienhoff H, Ernst H, Schmidt U, Prager D (1981) The 1st appearance of swine influenza in pig herds in the Federal-Republic-of-Germany. *Tierärztliche Umschau* 36(9):591
46. Smith, GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JSM, Guan Y, Rambaut A (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122–1125
47. Komadina N, Roque V, Thawatsupha P, Rimando-Magalong J, Waicharoen S, Bomasang E, Sawanpanyalert P, Rivera M, Iannello P, Hurt AC, Barr IG (2007) Genetic analysis of two influenza A (H1) swine viruses isolated from humans in Thailand and the Philippines. *Virus Genes* 35:161–165
48. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 360:159–163

49. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460:1021–1025