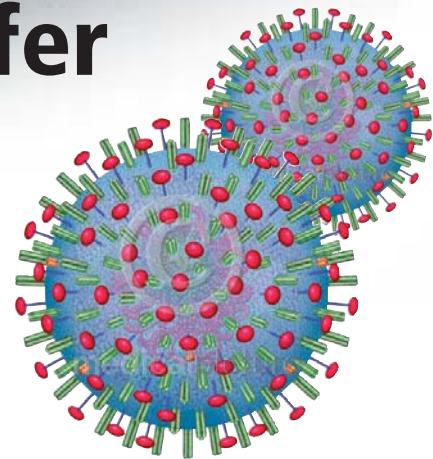


Gentechnisch veränderte Geflügelviren als Helfer im Kampf gegen die „Vogelgrippe“

Jutta Veits, Dorothee Wiesner, Elke Starick, Dörte Lüschow, Angela Römer-Oberdörfer, Ortrud Werner, Thomas C. Mettenleiter und Walter Fuchs (Insel Riems)



Seit Ende 2003 verursacht der erneute Ausbruch der klassischen Geflügelpest oder Vogelgrippe in Asien enorme Verluste bei Hühnern und anderen Nutzvögeln, wodurch vor allem den Bewohnern ärmerer Länder eine wichtige Existenzgrundlage entzogen wird. Darüber hinaus bedrohen die Viren in zunehmendem Maße auch unmittelbar Gesundheit und Leben des Menschen. Auch in Europa ist die Vogelgrippe auf dem Vormarsch. Eine zuverlässige Impfung des Geflügels gegen die Seuche ist problematisch, aber nicht unmöglich. Herkömmliche Impfstoffe, die aus abgetöteten Grippeviren gewonnen werden, haben zahlreiche Nachteile, die durch so genannte Marker-Vakzine überwunden werden könnten. Zur Entwicklung solcher Impfstoffe wurden am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems andere, weniger gefährliche Geflügelviren gentechnisch verändert und als Träger (Vektoren) für immunogene Proteine der Geflügelpesterreger genutzt. Erste Tierexperimente zeigen, dass diese neue Art von Lebendvirusimpfstoffen geeignet sein könnte, gefährdete Hühnerbestände vor drohenden Geflügelpestepidemien zu schützen.

Seit der ersten wirksamen Pockenschutzimpfung durch Edward Jenner im Jahre 1798 konnten viele Viruskrankheiten von Mensch und Tier durch Schutzimpfungen zurückgedrängt werden. Bei einigen Infektionskrankheiten ließen sich bislang allerdings keine dauerhaften Erfolge erzielen. Dies gilt unter anderem für die durch Influenzaviren hervorgerufenen Krankheiten, zu denen die Grippe beim Menschen

und die neuerdings oft als Vogelgrippe bezeichnete klassische Geflügelpest gehören. Letztere wütet nun schon seit dem Jahr 2003 in Ostasien, ohne dass ein nahes Ende der Seuche absehbar wäre. Mittlerweile wurden die Erreger bis Europa verbreitet; seit Februar 2006 treten sie auch in Deutschland auf.

Anders als die meisten früher aufgetretenen Geflügelpestviren kann der Erreger

des gegenwärtigen Seuchenzuges auch für den Menschen gefährlich sein. Bis März 2006 wurden in asiatischen Ländern rund 180 Infektionen bestätigt, etwa die Hälfte mit tödlichem Ausgang. Alle Opfer hatten direkten Kontakt zu krankem Geflügel; eine Ausbreitung des Virus von Mensch zu Mensch wurde bislang nicht beobachtet. Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich dieses

aviäre Influenzavirus (AIV) durch genetische Veränderungen an den Menschen anpassen und damit zum Auslöser einer neuen Grippe-Pandemie werden könnte.

Hohe Variabilität von Grippeviren

Hauptursache für diese Gefahr und die Probleme bei der Bekämpfung von Influenzaviren ist deren ungewöhnlich hohe Variabilität. Diese beruht auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen ist die Erbinformation der Grippeviren nicht wie bei den meisten anderen Viren auf einem einzigen Nukleinsäuremolekül gespeichert, sondern auf 8 RNS-Moleküle verteilt, von denen die meisten für jeweils ein virales Protein kodieren (Abb. 1). Treffen zwei verschiedene Influenzaviren in einer Zelle aufeinander, können durch Neukombination der Genomsegmente Virusvarianten entstehen, die Eigenschaften der beiden „Elternviren“ in sich vereinen. Daneben verändern sich die Viren auch auf Grund fehlerhafter Vervielfältigung des Genoms. Infolge solcher Mutationen verändern sich die Proteine allmählich so sehr, dass sie von den während früherer Infektionen oder Impfungen gebildeten Antikörpern des Wirtes nicht mehr erkannt werden und dieser deshalb gegen die neuen Virustypen nicht mehr geschützt ist.

Die größte Variabilität zeigen die beiden in die Hüllmembran der Influenzaviren eingelagerten Proteine, Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) (Abb. 1), von denen bei den Influenza A Viren inzwischen 16 bzw. 9 verschiedene Subtypen bekannt sind. Durch Mutationen können sich aber auch der Wirtsbereich und die krankmachenden Eigenschaften (Pathogenität) erheblich verändern. Eine Schlüsselrolle spielt dabei das Hämagglutinin, welches vor dem Einbau in die Viruspartikel durch Wirtsenzyme in zwei Untereinheiten gespalten werden muss, damit die Viren neue Zellen infizieren können.

Für Geflügel nur gering pathogene Stämme weisen ein Hämagglutinin auf, das nur von Enzymen der oberen Atemwege gespalten werden kann. Diese Infektionen bleiben folglich lokal begrenzt. Bestimmte Veränderungen in der Aminosäuresequenz können jedoch zur Spaltung in

einer Vielzahl von Geweben führen, wodurch das Virus alle Organe seines Wirts befallen und zerstören kann. Bislang traten solche Veränderungen, die zur Entstehung hoch pathogener Geflügelpestviren führten, nur bei aviären Influenzaviren der HA-Subtypen H5 und H7 auf.

Probleme mit konventionellen Impfstoffen

Gegen die meist tödlich verlaufende Geflügelpest können die Tiere prinzipiell durch prophylaktische Impfung mit Viren des jeweils entsprechenden HA-Typs wirksam geschützt werden. Da jedoch der Einsatz gering pathogener H5- oder H7-Viren als Lebendimpfstoffe wegen der Mutationsrisiken ausscheidet, werden zur Immunisierung nur abgetötete Influenzaviren verwendet, was die Produktion großer Virusmengen erforderlich macht. Zudem muss jedes einzelne Tier individuell durch Injektion geimpft werden.

Neben dem hohen Zeit- und Kostenaufwand hat die Immunisierung mit abgetöteten Influenzaviren weitere schwerwie-

gende Nachteile. Zum einen wird dadurch die Entstehung und Ausbreitung resistenter Virusstämme begünstigt, zum anderen die Entdeckung von Influenzavirus-Infektionen in den geimpften Beständen erschwert. Aus diesen Gründen wurde die Geflügelpest bislang fast ausschließlich durch die rasche Tötung betroffener Bestände und begleitende Quarantänemaßnahmen bekämpft. Diese Methode erwies sich in der Vergangenheit meist als äußerst wirkungsvoll. Allerdings sind vergleichbare Maßnahmen in ärmeren Regionen der Erde weder technisch durchführbar noch sozial vertretbar. Auch bei uns wird über Alternativen, zumindest für akute Gefahrensituationen, nachgedacht.

Neue Wege durch Gentechnik

Die neuen Möglichkeiten der Gentechnik können dazu beitragen, einige der erwähnten Risiken und Nachteile einer Schutzimpfung gegen die klassische Geflügelpest zu beseitigen. Hühner können z. B. mit so genannten Spalt- oder Nukleinsäure-Vakzinen, die nur das Hämaggluti-

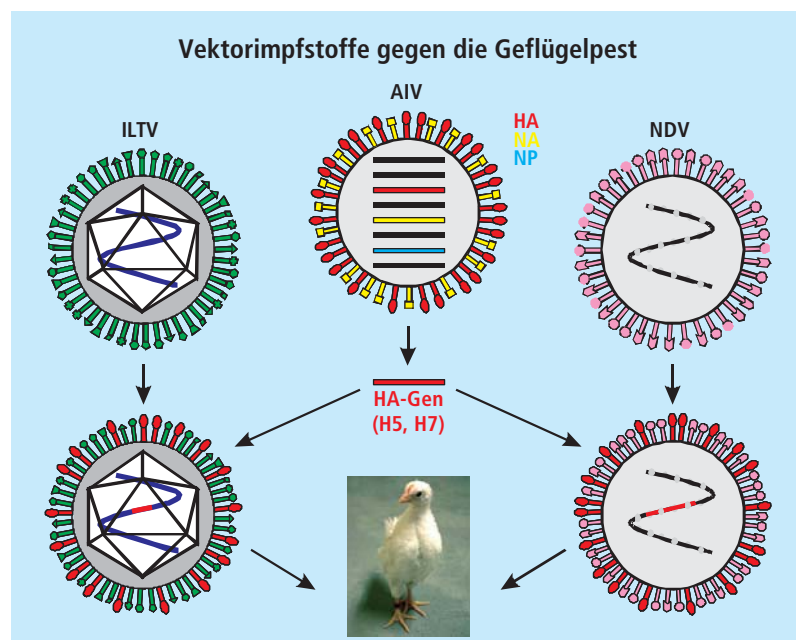


Abb. 1: Schemazeichnung des Vogelgrippe-Virus (AIV). Zwei der acht RNS-Moleküle (HA und NA) codieren für Proteine, die in der Hüllmembran eingelagert sind. Zur Herstellung von Vektorimpfstoffen wurden die HA-Gene hoch pathogener AIV-Isolate in die Erbsubstanz apathogener ILTV- (links) oder NDV-Stämme (rechts) eingefügt. Um die Eignung der daraus resultierenden Viren für die Impfung zu testen, wurden Hühner per Augentropfen immunisiert.

nin bzw. die dafür kodierende Erbinformation enthalten, gegen Geflügelpest geschützt werden. Inaktivierte Influenzaviren wären dann nicht mehr nötig. Leider ist aber die Produktion dieser Impfstoffe relativ aufwändig und der Impfstoff müsste weiter individuell verabreicht werden.

Andere Infektionskrankheiten des Geflügels, wie die Geflügelpocken, die atypische Geflügelpest („Newcastle disease“) oder die infektiöse Laryngotracheitis der Hühner, werden hingegen seit langem mit

Lebendvirus-Impfstoffen bekämpft. Da die durch zahlreiche Zellkulturpassagen oder mittels Gentechnik entstandenen Impfviren zwar nicht mehr krankmachend, aber durchaus noch vermehrungsfähig sind, können sie bereits in relativ geringen Dosen eine schützende Immunität vermitteln. Deshalb liegt es nahe, solche Impfviren so zu verändern, dass sie auch das Hämagglutinin des Influenzavirus produzieren. Auf diese Weise könnte sowohl ein Immunschutz gegen die entsprechende

Krankheit als auch ein Schutz gegen die Geflügelpest erreicht werden.

In Mittelamerika und Ostasien wurden bereits Impfstoffe entwickelt und im Feld eingesetzt, die aus abgeschwächten Geflügelpockenviren bestehen, in die das Hämagglutinin H5 eines aviären Influenzavirus eingefügt wurde. Die Arbeiten am Friedrich-Loeffler-Institut konzentrieren sich dagegen auf die Nutzung von Impfviren gegen „Newcastle disease“ (NDV) und infektiöser Laryngotracheitis (ILT),

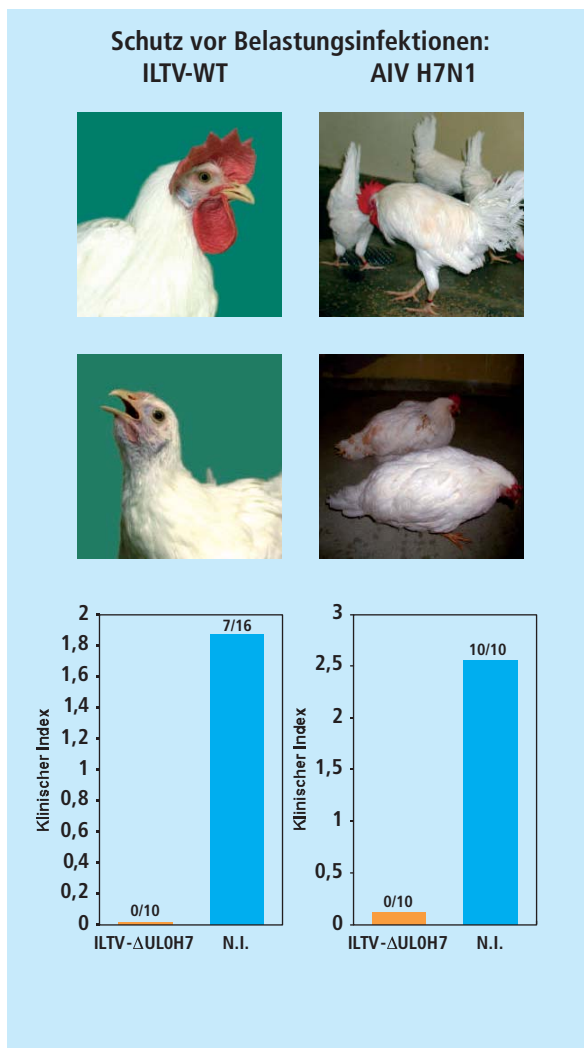


Abb. 2: Hühner, die mit einer Hämagglutinin-exprimierenden ILTV-Mutante geimpft wurden, waren sowohl gegen den ILTV-Virus als auch gegen den Geflügelpestvirus (AIV H7N1) gut geschützt (obere Bilder, links und rechts), während nicht immunisierte Kontrolltiere schwer erkrankten bzw. starben (untere Bilder). Der in den Diagrammen dargestellte klinische Index beschreibt die über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Infektion beobachteten Krankheitssymptome (linkes Diagramm: ILTV; rechtes Diagramm: AIV. N.I. = nicht immunisiert). Außerdem sind die Mortalitätsraten bezogen auf die Gesamtanzahl angegeben.

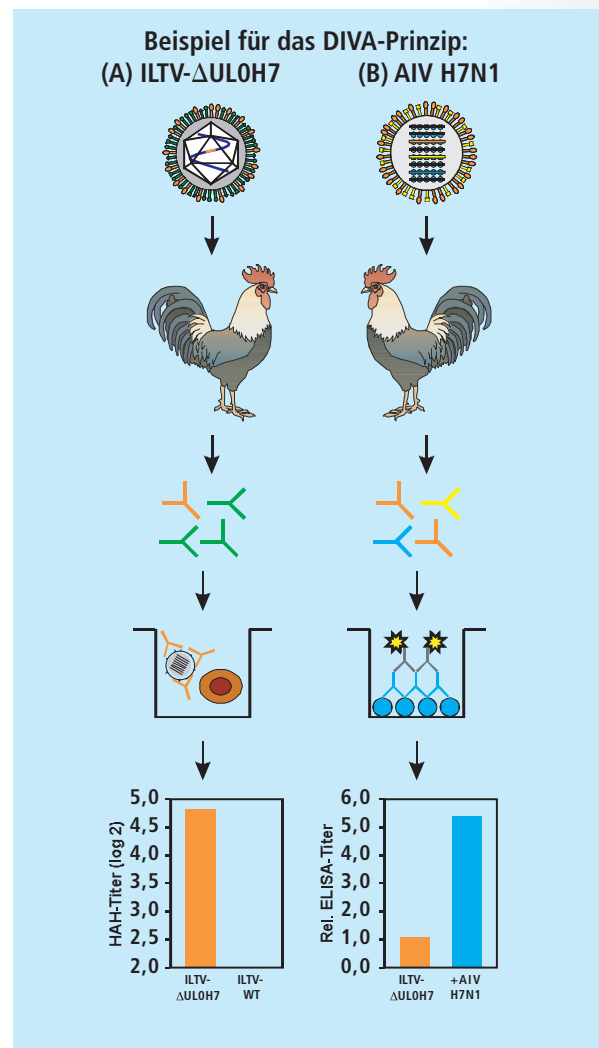


Abb. 3: Mit dem neu entwickelten Markerimpfstoff ILTV- Δ ULOH7 immunisierte Hühner (links) bilden neben ILTV-spezifischen Antikörpern (grün) nur solche gegen das Hämagglutinin von AIV (rot). Diese können durch Hemmtests nachgewiesen werden. Dagegen bilden mit Geflügelpestviren (AIV H7N1) infizierte Tiere zusätzlich Antikörper gegen weitere Influenzavirus-Proteine wie NA (gelb) und NP (blau). Die Diagramme zeigen die durchschnittlichen Antikörpertiter von je 20 infizierten Tieren, wobei die Messwerte als Vielfaches einer Negativkontrolle (= 1) dargestellt sind.

da diese Viren für eine schnelle Applikation über Augentropfen, Aerosol oder Trinkwasser geeignet sind. Dazu wurden die Gene für die Hämagglutinine der Subtypen H5 und/oder H7 so in die Genome der jeweiligen Viren integriert, dass die Virusvermehrung nicht signifikant beeinträchtigt wurde (Abb. 1). Während für NDV ein gebräuchlicher Impfstamm verwendet wurde, wurde die Pathogenität des verwendeten ILTV-Vektors durch gezieltes Entfernen eines Virulenzgens verringert. Durch das Vorschalten geeigneter Promotor-Sequenzen wurde außerdem gewährleistet, dass die Fremdgene in Proteine übersetzt wurden.

Tierversuche zeigten, dass Hühner, die mit den hergestellten Virus-Rekombinanten geimpft wurden, gegen Infektion mit pathogenen NDV- oder ILTV-Stämmen geschützt waren und nicht erkrankten. Darüber hinaus waren die geimpften Tiere auch gegen Geflügelpestviren der entsprechenden HA-Typen weitestgehend immun (Abb. 2). Somit könnten bei der Bekämpfung der Geflügelpest gentechnisch veränderte NDV- oder ILTV-Vektorvakzinen eine Alternative zu inaktivierten Influenzavirus-Impfstoffen darstellen.

Unterscheidung zwischen Impfung und Infektion möglich

Die neuen Impfstoffe zeichnen sich durch einen weiteren, entscheidenden Vorteil aus. Kein bisher verfügbarer Grippeimpfstoff verhindert die Infektion, die Vermehrung des Virus oder die Virusausscheidung – sie verhindern lediglich eine klinische Erkrankung der Tiere. So können geimpfte Tiere zu Virusträgern werden und das Virus verbreiten. Um solche Tiere zu eliminieren, ist eine sichere Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren notwendig.

Während konventionell geimpfte Tiere Antikörper gegen mehrere Influenzavirusproteine bilden, induzieren die Markerimpfstoffe ausschließlich Antikörper gegen das Hämagglutinin (Abb. 3). Dies ermöglicht die gewünschte Unterscheidung durch Einsatz geeigneter Antikörper-Nachweistests ('DIVA' = Differenzierung infizierter von vakzinierter Tieren). In einem Hämagglutinations-Hemmtest wer-

H5N1 in Deutschland – eine kurze Chronologie

Nachdem Anfang 2006 in Südeuropa erste Fälle von Vogelgrippe aufgetreten waren, erreichte der Erreger Mitte Februar Deutschland: Am 16.2.2006 bestätigte das FLI, dass zwei auf der Insel Rügen tot aufgefundene Schwäne mit dem hoch pathogenen Influenzavirus H5N1/Asien infiziert waren. Die Fälle mehrten sich, und einige Tage später erreichte die Vogelgrippe das angrenzende Festland. Bis Anfang März wurde H5N1 in toten Wildvögeln in sechs Bundesländern gefunden (Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein, Baden-Württemberg, Bayern, Brandenburg und Niedersachsen). Infiziert waren vor allem Schwäne, Wildenten und Kanadagänse, aber auch Greifvögel, eine Silbermöwe und ein Kormoran. Seit dem 17.2.2006 gilt für Hausgeflügel bundesweit eine Stallpflicht. Am 28.2. bestätigte das FLI eine H5N1-Infektion bei einer auf Rügen verendeten Katze, Anfang März kamen zwei weitere Katzen – ebenfalls aus dem Zentrum des Seuchengebietes auf Rügen – hinzu. Am 9.3. wurde der Erreger bei einem Steinmarder von der Insel Rügen festgestellt – weltweit der erste Fall. Anfang April ist der Erreger erstmals in Deutschland in einem sächsischen Geflügelbetrieb aufgetreten.

Aktuelle Informationen finden Sie auf den Seiten des FLI unter www.fli.bund.de



Foto: dpa

den HA-spezifische Antikörper nachgewiesen. Dieser Test beruht darauf, dass Influenzaviren – bedingt durch die namensgebende Eigenschaft des Hämagglutinins – eine Verklumpung roter Blutzellen bewirken. Durch die Bindung von HA-spezifischen Antikörpern an das Virus geht diese Eigenschaft verloren, was mit bloßem Auge erkennbar ist (Abb. 3A).

Der spezifische Nachweis von Antikörpern gegen andere Influenzavirusproteine, zum Beispiel das Nukleoprotein (NP), gelingt mit einem anderen Testverfahren (ELISA). Hierbei bindet gentechnisch hergestelltes Influenza-Nukleoprotein NP-spezifische Antikörper, was durch eine Enzymreaktion nachgewiesen werden kann (Abb. 3B).

Hühner, die mit unseren Markerimpfstoffen immunisiert wurden, bildeten erwartungsgemäß nur Antikörper gegen Influenza-HA (Abb. 3A). Nach Infektion mit Influenzaviren traten dagegen zusätzlich auch NP-spezifische Antikörper auf (Abb. 3B). Somit würde die Erkennung Influenzavirus-infizierter Tiere durch eine Schutzimpfung gegen die Geflügelpest nicht mehr beeinträchtigt, da Infektionen mit Influenzaviren auch in geimpften Beständen nachweisbar blieben.

Dieser Nachweis wäre außerdem unabhängig vom HA- und NA-Typ des Erregers, da die Aminosäuresequenz des Nukleoproteins innerhalb der Influenza A Viren stark konserviert ist.

Praxistests stehen noch aus

Bevor diese Vektor-Impfstoffe zugelassen und auf den Markt gebracht werden können, sind noch umfangreiche Tierexperimente unter praxisnahen Bedingungen nötig. Insbesondere bleibt die Eignung zur Massenapplication zu prüfen. Hier sehen wir durch die Möglichkeit der Impfung über Spray, Augentropfen oder das Trinkwasser eine leichte Erreichbarkeit der Tiere auch in großen Haltungen – ein entscheidendes Plus für die praktische Anwendung.

Weiterhin ist zu überprüfen, ob auch andere für die Geflügelpest empfängliche Vogelarten auf diese Weise immunisiert werden können. Da sich die Aminosäuresequenz des Hämagglutinins der aktuellen H5N1 Viren aus Asien an einigen Positionen von der des von uns verwendeten H5-Proteins unterscheidet, könnte hier der Impfschutz geringer ausfallen. Daher sind wir gegenwärtig dabei, das HA-Gen aktueller asiatischer Geflügelpestviren in unsere Vektoren einzufügen.

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Korrespondierender Autor: Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter, Friedrich-Loeffler-Institut, 17493 Insel Riems.

E-Mail: thomas.mettenleiter@fli.bund.de