



Stellungnahme der ZKBS zur Bewertung der Influenza A Virus Mutante „Delta NS1“

Das RP Gießen bat um Risikobewertung und Einstufung der Influenza A-Virus Mutante „Delta NS1“ (delNS1) sowie um die Einstufung gentechnischer Arbeiten, bei denen mit diesem Virus umgegangen wird.

Einführung

Influenza A-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Ihr Genom besteht aus 8 RNA-Segmenten negativer Polarität, die für 10 virale Proteine kodieren (Hämagglutinin, HA, Neuraminidase, NA, Nukleoprotein, NP, Matrixproteine: M1 und M2, Polymerase Proteine: PB1, PB2 und PA, Nichtstrukturproteine: NS1 und NS2). Die Viren replizieren im Respirationstrakt des infizierten Individuums. Sie zeigen eine hohe genetische Variabilität, die auf der hohen Mutationsfrequenz und der Fähigkeit zur genetischen Reassortierung beruht. Die Anhäufung von Punktmutationen in den beiden Glykoproteinen HA und NA führt zu einer Antigendrift. Neue Driftvarianten sind verantwortlich für das Auftreten von Epidemien und regional begrenzten Ausbrüchen. Bei gleichzeitiger Infektion von zwei Virusvarianten kann es zum Neuarrangement unter den zweimal 8 Genomsegmenten kommen. Dieses Phänomen, der sog. Antigen shift, führt zur Entstehung neuer Subtypen (z.B. seit 1957 H2N2, seit 1968 H3N2, seit 1977 Wiederauftauchen von H1N1).

Influenzaviren werden aerogen übertragen, die Kontagiosität ist hoch. Die Erkrankungen reichen von symptomarmen bis zu schweren toxischen Verläufen mit tödlichem Ausgang.

Segment 8 kodiert für die beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, deren Nukleotidsequenzen in 221 bp überlappen. Am N-Terminus tragen beide Polypeptide dieselben 10 Aminosäuren. Nach dieser Sequenz zeigt die mRNA von NS2 eine Intron-Deletion von 472 Nukleotiden, die mRNA von NS1 ist kolinear zur viralen RNA. Nach der Spleißgrenze bei Nukleotid 528 liegen die Kodiersequenzen für NS1 und NS2 auf verschiedenen Leserahmen. NS1 wird kurz nach der Infektion synthetisiert und akkumuliert im Nukleus. NS2 wird in der späten Phase der Infektion gebildet und erscheint ebenfalls im Nukleus.

Während des Infektionsverlaufs hat das NS1 Protein, ein RNA-bindendes Protein, Anteil an verschiedenen regulatorischen Prozessen: es inhibiert die Polyadenylierung der mRNA des Wirts, den nuklearen Export und das Splicing der pre-mRNA, es beeinflusst die Aktivität der viralen RNA Polymerase und interagiert mit Proteinen der Wirtszelle. Außerdem hemmt es die Interferon vermittelte antivirale Immunantwort über eine Hemmung der Proteinkinase PKR.

Bewertung des Virus

Das Influenza-Virus A/PR/8/34 „Delta NS1“ gehört zum Subtyp H1N1. Die Deletion im NS1 Leserahmen ist so gesetzt, dass der NS2 Leserahmen noch intakt ist. Damit ist das Gen deletiert, das der Aktivität des Interferons entgegen wirkt. Als Folge ist die Replikation stark eingeschränkt und das Virus kann nicht mehr auf normalen Zellkulturen (z.B. MDCK) vermehrt werden. In Interferon-defizienten Zellen (z.B. Vero) ist es anzüchtbar. Im Tierversuch ist delNS1 apathogen, jedoch ist das Virus für transgene Mäuse, denen der



Interferon alpha Rezeptor fehlt, virulent (Virology **252**, 324 (1998); PNAS **97**, 4309 (2000)). Durch Transfektion von MDCK-Zellen mit dem NS1 Gen ist der Defekt des infizierenden deINS1 komplementierbar (PNAS **97**, 12289 (2000)).

Aus den o.g. Gründen kann das Gefährdungspotenzial des mutierten Influenza Virus deINS1 als geringer angesehen werden als das des Wildtypvirus. Eine Herabstufung der Risikogruppe wird jedoch nicht empfohlen, denn zum gegenwärtigen Zeitpunkt können noch keine Aussagen zu der Attenuierung der Mutante gemacht werden. Außerdem kann die Möglichkeit der akzidentellen Doppelinfection einer Zelle mit einem zirkulierenden Wildtypvirus und dem mutierten Virus nicht ausgeschlossen werden. Dabei kann es mit niedriger Frequenz zu einer Reassortierung der Segmente kommen und ein Gemisch von Viren entstehen, die entweder das mutierte oder das Wildtyp Segment 8 enthalten können. Auch ist es möglich, dass die für Hämagglutinin- und Neuraminidase-kodierenden Segmente, die aus deINS1 kommen, in koinfizierende Wildtypviren eingebaut werden. Das Virusgemisch wäre der Risikogruppe 2 zuzuordnen.

Diese Einstufung wurde von der ZKBS auf ihrer 103. Sitzung am 04.09.2001 einstimmig verabschiedet.