

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten mit rekombinanten Influenza-A-Viren

Influenza-A-Viren (FLUAV) gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie verfügen über ein negativ orientiertes RNA-Genom, welches auf acht Segmente verteilt ist. Ursprünglich wurde angenommen, dass das virale Genom für zehn Proteine kodiert. In den letzten Jahren wurden jedoch weitere sieben Translationsprodukte beschrieben, die aus der Verwendung alternativer Startkodons bzw. Leserahmen oder durch alternatives Spleißen entstehen. Die biologische Relevanz und die Funktion dieser Translationsprodukte sind noch nicht vollständig geklärt [1].

Innerhalb der Spezies FLUAV werden die Viren anhand ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen unterteilt. Aktuell sind 18 HA- und 11 NA-Varianten bekannt, die in verschiedenen Kombinationen auftreten können (Bezeichnung HxNy) [2; 3]. Die Viren weisen ein breites Wirtsspektrum auf und können sowohl Säugetiere als auch Vögel infizieren, wobei Wasservögel wahrscheinlich das natürliche Reservoir (mit Ausnahme der Fledermaus-assoziierten FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11) darstellen. FLUAV weisen ein hohes zoonotisches Potenzial auf und sind in der Lage, sich auch dauerhaft an neue Wirte anzupassen [2]. Die hohe Anpassungsfähigkeit beruht zum einen auf einer vergleichsweise hohen Mutationsfrequenz und zum anderen auf der Fähigkeit ganze Genomsegmente zwischen verschiedenen FLUAV austauschen zu können (Reassortierung) [2; 4]. Das durch FLUAV induzierte Krankheitsbild kann je nach Subtyp und Wirt variieren und kann sich von weitgehend asymptomatisch bis hin zu einer schweren Erkrankung mit tödlichem Verlauf erstrecken. Daher werden FLUAV differenziert nach Subtyp und Stamm der Risikogruppe 2, 3 oder 4 zugeordnet, wobei es sich bei FLUAV der Risikogruppe 4 bislang ausschließlich um Viren handelt, die im Rahmen von Forschungsvorhaben erzeugt wurden [5; 6]. Bezüglich des Genomaufbaus unterscheiden sich die Viren der verschiedenen Risikogruppen jedoch nur geringfügig. Es gibt keine Gene, welche ausschließlich bei FLUAV einer bestimmten Risikogruppe vorzufinden sind. Die unterschiedlichen Eigenschaften und Gefährdungspotenziale ergeben sich durch Mutationen und Sequenzvariationen in multiplen viralen Genen. Dabei ist zu beachten, dass die für das Gefährdungspotenzial relevanten Eigenschaften bei FLUAV meist durch mehrere virale Gene definiert werden (polygenisch determinierte Virulenz). Innerhalb verschiedener Gene wurden dabei Mutationen und Sequenzmotive identifiziert, die mit einer erhöhten Virulenz assoziiert sind [7]. Allerdings ist hier zu beachten, dass die biologische Bedeutung solcher Mutationen/Sequenzmotive in Abhängigkeit des FLUAV-Subtyps, Virus-Stammes und der Wirtsspezies beträchtlich variieren kann [7; 8].

Aufgrund der polygenisch determinierten Virulenz, der genetischen Variabilität sowie dem breiten Wirtsbereich ergeben sich einige Besonderheiten, die sowohl bei der Antragsstellung als auch bei der Bewertung von gentechnischen Arbeiten mit FLUAV zu berücksichtigen sind. Im Folgenden werden allgemeine Hinweise und Bewertungskriterien zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten zusammengefasst.

1. Hinweise zur Angabe der verwendeten Spenderorganismen

Für eine differenzierte Bewertung einer gentechnischen Arbeit ist die genaue Angabe der verwendeten Spender- und Empfängerorganismen notwendig. Im Fall von FLUAV beinhaltet dies

die Angabe der verwendeten Subtypen. Die Angabe der Risikogruppe allein (z. B. „Influenzaviren der Risikogruppe 2“) reicht nicht aus. Gibt es innerhalb der verwendeten Subtypen zudem Varianten oder Stämme verschiedener Risikogruppen (z. B. H1N1: sowohl Virus der Spanischen Grippe von 1918, Risikogruppe 3, als auch saisonale Viren der Risikogruppe 2), ist kenntlich zu machen, welche Varianten oder Stämme verwendet werden. Es ist darüber hinaus anzugeben, ob das HA des zu verwendenden Stammes eine monobasische oder polybaische Spaltstelle besitzt.

Bei den im Folgenden beschriebenen Bewertungskriterien unterscheidet die ZKBS zwischen humanpathogenen und nicht-humanpathogenen FLUAV. Zu den humanpathogenen FLUAV zählen hierbei insbesondere humane Viren der Subtypen H1N1, H2N2, H3N2 und von ihnen abgeleitete Laborstämme sowie bestimmte Stämme der aviären Subtypen H5N1, H5N6, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2 und H10N8.

2. Einstufung von rekombinanten FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11

Die RNA neuartiger FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11 wurden erstmals in den Jahren 2009 und 2010 in rektalen Abstrichen verschiedener südamerikanischer Fledermausspezies nachgewiesen. Die Seroprävalenz von Antikörpern gegen diese Viren betrug bis zu 50 %. Obwohl der Nachweis viraler RNA in Leber, Darm, Lunge und Niere auf eine systemische Infektion hinweist, ist keine Erkrankung der infizierten Tiere beschrieben [9].

Die meisten Proteine der Fledermaus-assoziierten FLUAV weisen eine enge Verwandtschaft zu denen anderer FLUAV-Subtypen auf. Ausgenommen hiervon sind HA und NA. Diese besitzen zwar eine Proteinstruktur, welche vergleichbar mit der der entsprechenden Proteine anderer Subtypen ist. Sie haben jedoch im Gegensatz zu den HA- und NA-Proteinen anderer Subtypen keine hämagglutinierende Eigenschaft bzw. Neuraminidase-Aktivität. Entsprechend wurde für die Oberflächenproteine der Subtypen H17N10 und H18N11 die Bezeichnung HA- bzw. NA-*like* (HL bzw. NL) vorgeschlagen. Ein weiterer Unterschied zu typischen HA anderer Subtypen ist, dass HL keine Affinität gegenüber Sialinsäure-haltigen Rezeptoren aufweist, an die Influenzaviren typischerweise binden. Der virale Rezeptor der Fledermaus-assoziierten FLUAV ist bisher unbekannt [10]. Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass der Zelltropismus dieser Viren sehr begrenzt ist. So konnten von mehr als 30 getesteten etablierten Säugerzelllinien und Hühnerfibroblasten bisher lediglich die Hundezelllinien MDCK II und RIE 1495 sowie in geringem Umfang die humanen Krebszelllinien U-87 MG und SK-MEL-28 infiziert werden. Die Transkription der viralen RNA durch den viralen Polymerasekomplex in Anwesenheit des Nukleoproteins ist hingegen in verschiedenen aviären und Säugerzelllinien möglich, darunter auch solche des Menschen [11].

Ko-Infektionen und Experimente mit einem Reverse-Genetik-System belegen, dass eine Reassortierung i. d. R. lediglich zwischen den Subtypen H17N10 und H18N11, nicht jedoch mit den anderen Subtypen möglich ist. Diese Inkompatibilität wird zum einen der Spezifität des Nukleoproteins der Fledermaus-assoziierten FLUAV für das Verpackungssignal dieser Viren, zum anderen aber auch einer partiellen Inkompatibilität zwischen den Proteinen des Polymerasekomplexes und dem Nukleoprotein zugeschrieben. Ein Austausch eines Teils der kodierenden Region des HL und/oder NL ist hingegen möglich, sofern die Verpackungssignale innerhalb der nicht-kodierenden Regionen und den 5'- und 3'-Enden der kodierenden Region erhalten bleiben. Mit diesem Ansatz wurde bereits eine Chimäre mit den internen Genen eines FLUAV des Subtyps H17N10 und dem HA und NA des Maus-adaptierten Stammes A/SC35M (H7N7) erzeugt. Diese Chimäre zeigte einen im Vergleich zum Fledermaus-assoziierten Virus erweiterten Zelltropismus, war jedoch im Gegensatz zum Stamm A/SC35M für Mäuse apathogen [10; 12].

2.1. Kriterien für die Bewertung von Mutanten der FLUAV-Subtypen H17N10 und H18N11

FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11 weisen einen engen Zelltropismus auf und können in nur wenigen der bisher getesteten Zellkultursysteme replizieren. Zudem sind sie bisher nicht mit einer Pathogenität für den Menschen oder Tiere assoziiert. Auch bei Austausch der kodierenden Region des HL war eine Mutante des Subtyps H17N10 zwar infektiös, jedoch apathogen für Mäuse. Es gibt demnach zurzeit keine Hinweise darauf, dass die Veränderung von Fledermaus-assoziierten FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11 der Risikogruppe 2 das Gefährdungspotenzial dieser Viren signifikant erhöhen könnte. Mutanten dieser FLUAV sind mit den folgenden Ausnahmen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen:

- a) Werden mit dem Ziel einer Erweiterung des Zelltropismus Teile der kodierenden Region des HL **und** NL durch die entsprechenden Abschnitte des HA und NA von FLUAV der Risikogruppe 2 ersetzt **und** wird anschließend versucht, die mutierten FLUAV durch serielle Passagierung an andere Säuger oder Vögel zu adaptieren, sind die resultierenden Mutanten im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.
- b) Werden mit dem Ziel einer Erweiterung des Zelltropismus Teile der kodierenden Region des HL **und** NL durch die entsprechenden Bereiche des HA und NA von FLUAV der Risikogruppe 3 ersetzt, sind die resultierenden Mutanten unabhängig von einer weiteren Adaptation im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

Hinweis: Ergeben sich aus den durchgeführten Experimenten Erkenntnisse, dass das Gefährdungspotenzial einzelner Mutanten über dem eines Organismus der Risikogruppe 2 liegen könnte, oder liegen dem Projektleiter entsprechende Daten vor, wird empfohlen, die Arbeiten zunächst auszusetzen und eine **Einzelfallbewertung** bei der ZKBS einzuholen.

2.2. Kriterien für die Bewertung von Reassortanten mit FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11

Bisherige Daten weisen darauf hin, dass eine Reassortierung zwischen Fledermaus-assoziierten FLUAV des Subtyps H17N10 oder H18N11 und FLUAV anderer Subtypen nicht oder nur in seltenen Fällen (z. B. Reassortierung mit dem M-Genomsegment von FLUAV der Subtypen H1N1 und H3N2) möglich ist. Insbesondere der Austausch des HA-Genomsegments eines Fledermaus-assoziierten FLUAV gegen das entsprechende Genomsegment eines anderen FLUAV scheint nicht möglich. Eine Erweiterung des eingeschränkten Zelltropismus von Fledermaus-assoziierten FLUAV durch Reassortierung ist daher wenig wahrscheinlich. Dementsprechend ist derzeit nicht davon auszugehen, dass eine Reassortierung der unveränderten Genomsegmente von FLUAV des Subtyps H17N10 und/oder H18N11 der Risikogruppe 2 und/oder FLUAV der Risikogruppe 2 oder 3 anderer Subtypen zu einer signifikanten Erhöhung des Gefährdungspotenzials führt. Mit der folgenden Ausnahme sind solche Reassortanten der **Risikogruppe 2** zuzuordnen:

Werden Reassortanten gebildet, bei denen das HA-, NA- **und** NP-Genomsegment von FLUAV der Risikogruppe 3 und wenigstens ein Genomsegment von Fledermaus-assoziierten FLUAV der Risikogruppe 2 stammt, sind diese im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

3. Einstufung von rekombinanten FLUAV der übrigen Subtypen

Im Gegensatz zur Risikobewertung von Mutanten und Reassortanten von FLUAV der Subtypen H17N10 und H18N11 ist bei FLUAV der übrigen Subtypen keine weitgehend allgemeingültige Einstufung möglich. Vielmehr müssen für ihre Bewertung die genaue Art der Veränderung sowie die Eigenschaften der Spenderviren berücksichtigt werden.

3.1. Kriterien für die Bewertung von FLUAV-Mutanten

Bereits das Einfügen von wenigen Mutationen bzw. kurzen Nukleinsäureabschnitten kann das Gefährdungspotenzial von FLUAV signifikant verändern. Dies führt dazu, dass bestimmte FLUAV-Mutanten vorsorglich einer höheren Risikogruppe zugeordnet werden. Bislang sind nicht alle molekularen Faktoren bekannt, die das Gefährdungspotenzial von FLUAV definieren, jedoch werden das Oberflächenprotein HA sowie die Proteine des Polymerasekomplexes (PB1, PB2, PA und ggf. ihre akzessorischen Proteine) als die Faktoren angesehen, die maßgeblich das Gefährdungspotenzial bestimmen.

3.1.1. Mutation des Genomsegments des Hämagglutinins

Das Oberflächenprotein HA hat entscheidenden Einfluss auf Wirtsbereich, Zelltropismus und Transmissibilität. Veränderungen innerhalb des HA-Genomsegments können daher das Gefährdungspotenzial von FLUAV beeinflussen.

3.1.1.1. Mutation des HA-Genomsegments von FLUAV der Risikogruppe 2

Wird das HA-Genomsegment von FLUAV der Risikogruppe 2 verändert, sind die resultierenden Mutanten in den nachfolgenden Fällen vorsorglich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen:

- a) Es werden basische Aminosäuren an der Spaltstelle des HA eingefügt, so dass dieses von ubiquitären Wirtszellproteasen gespalten werden kann.

oder

- b) Es werden Mutationen eingefügt (z. B. innerhalb der Rezeptorbindungsstelle), die eine Adaptation an den Menschen darstellen und/oder die Virulenz für oder die Transmissibilität zwischen Säugern erhöhen oder eine dieser Wirkungen zum Ziel haben.

oder

- c) Es werden Nukleinsäureabschnitte des HA-Genomsegments von nicht-humanpathogenen FLUAV durch homologe Nukleinsäureabschnitte humanpathogener FLUAV ersetzt. Ausgenommen hiervon ist der Austausch gegen Nukleinsäureabschnitte der sehr gut charakterisierten Laborstämme A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) und A/WSN/1933 (H1N1).

Werden heterologe subgenomische Nukleinsäureabschnitte z. B. anderer Virusspezies eingefügt, die den Zelltropismus oder das Wirtspektrum der Viren erweitern können, sind die Mutanten im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

Alle übrigen HA-Mutanten von FLUAV der Risikogruppe 2 sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

Hinweis: Eine auf der Fachliteratur basierende Liste mit Mutationen, die Punkt b) erfüllen, ist auf der Homepage der ZKBS (www.zkbs-online.de) zur Verfügung gestellt.

3.1.1.2. Mutation des HA-Genomsegments von FLUAV der Risikogruppe 3

Wird das HA-Genomsegment von FLUAV der Risikogruppe 3 verändert, sind die resultierenden Mutanten mit den folgenden Ausnahmen der **Risikogruppe 3** zuzuordnen:

- a) Wird durch Mutation eine polybasische Spaltstelle in eine monobasische Spaltstelle umgewandelt, ist die Mutante der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.
- b) Ist das Ziel der Veränderung eine Attenuierung, kann im **Einzelfall** durch die ZKBS geprüft werden, ob die Mutante ggf. in die Risikogruppe 2 herabgestuft werden kann.
- c) Einige Stämme der aviären FLUAV können schwere Erkrankungen im Menschen verursachen. Diese Viren weisen in der Regel keine oder nur eine sehr geringe Transmissibilität zwischen Menschen auf. Werden in diese Viren Mutationen eingeführt, die darauf

abzielen, die Transmissibilität zwischen Säugern zu erhöhen, sind die erzeugten Mutanten vorsorglich der **Risikogruppe 4** zuzuordnen [6].

3.1.2. Mutation der Genomsegmente des Polymerasekomplexes

Der trimere Polymerasekomplex besteht aus den Proteinen PB1, PB2 und PA und spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Virulenz sowie bei der Adaptation an einen neuen Wirt. Veränderungen an den für die Proteine des Komplexes kodierenden Genomsegmenten können somit das Gefährdungspotenzial von FLUAV entscheidend beeinflussen.

3.1.2.1. Mutation der PB1-, PB2- und PA-Genomsegmente von FLUAV der Risikogruppe 2

Werden die Genomsegmente des Polymerasekomplexes von FLUAV der Risikogruppe 2 verändert, sind die resultierenden Mutanten grundsätzlich vorsorglich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen. Ausgenommen hiervon ist das Einfügen von Reportergenen oder technischen Sequenzen (z. B. *tags*) sowie die Veränderung der Verpackungssignale, da davon auszugehen ist, dass das Einfügen bzw. Verändern dieser Elemente das Gefährdungspotenzial nicht erhöht. Ebenfalls ausgenommen von einer vorsorglichen Einstufung in die Risikogruppe 3 sind Mutanten der sehr gut charakterisierten Laborstämme A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) und A/WSN/1933 (H1N1). Da diese Stämme aufgrund ihrer Passagierungsgeschichte nur eine sehr geringe Pathogenität für den Menschen aufweisen, ist nicht davon auszugehen, dass sich ihr Gefährdungspotenzial durch das Einfügen von Punktmutationen über das eines Organismus der **Risikogruppe 2** hinaus erhöht.

Kann für Mutanten anderer FLUAV der Risikogruppe 2 dargelegt werden, dass die eingefügte Mutation (bei Mehrfachmutationen in der spezifischen Kombination) nicht zu einer Steigerung der Replikationseffizienz in humanen Lungenzellen oder einer anderen relevanten Säugerzelllinie (z. B. MDCK) oder der Virulenz in einem relevanten Tiermodell führt, entfällt die vorsorgliche Hochstufung. Solche Mutanten sind ebenfalls der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

Hinweis: Das Erfüllen der genannten Bedingung kann durch Verweis auf die Fachliteratur sowie durch experimentelle Daten belegt werden. Eine auf der Fachliteratur basierende Liste mit Mutationen, die die genannte Bedingung erfüllen, ist auf der Homepage der ZKBS (www.zkbs-online.de) zur Verfügung gestellt. Werden experimentelle Daten vorgelegt, müssen diese den im Anhang aufgeführten Kriterien genügen.

3.1.2.2. Mutation der PB1-, PB2- und PA-Genomsegmente von FLUAV der Risikogruppe 3

Werden die Genomsegmente der Proteine des Polymerasekomplexes von FLUAV der Risikogruppe 3 verändert, sind die resultierenden Mutanten mit der unten genannten Ausnahme der **Risikogruppe 3** zuzuordnen. Werden Veränderungen eingefügt, die gezielt die Virulenz steigern sollen, können ggf. zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen wie z. B. das Duschen und der Kleidungswechsel bei Verlassen des Labors erforderlich sein.

Ist das Ziel der Veränderung eine Attenuierung, kann im **Einzelfall** durch die ZKBS geprüft werden, ob die Mutante ggf. in die Risikogruppe 2 herabgestuft werden kann.

3.1.3. Mutation der übrigen Genomsegmente

Die Proteine des Polymerasekomplexes sowie das HA werden als die Faktoren angesehen, die maßgeblich das Gefährdungspotenzial von FLUAV definieren. Daher wird davon ausgegangen, dass Veränderungen der M-, NA-, NP- und NS-Genomsegmente von FLUAV außer in den nachfolgend genannten Fällen nicht zu einer Erhöhung der Risikogruppe gegenüber dem unveränderten Ausgangsvirus führen.

- a) Werden Veränderungen, die die Virulenz im Säuger steigern oder steigern sollen (z. B. durch eine Resistenzvermittlung gegenüber humanen antiviralen Effektoren) in FLUAV

der Risikogruppe 2 eingefügt, sind die resultierenden Mutanten vorsorglich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.

oder

- b) Werden Veränderungen, die eine Resistenz gegenüber zugelassenen antiviralen Wirkstoffen vermitteln oder vermitteln sollen in FLUAV der Risikogruppe 2 oder 3 eingeführt, ist im **Einzelfall** durch die ZKBS zu prüfen, ob die Zuordnung zu einer höheren Risikogruppe erforderlich ist. Ausgenommen hiervon ist die Mutation der sehr gut charakterisierten Laborstämme A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) und A/WSN/1933 (H1N1).

Hinweis: Eine auf der Fachliteratur basierende Liste mit Mutationen, die Punkt a) oder b) erfüllen, ist auf der Homepage der ZKBS (www.zkbs-online.de) zur Verfügung gestellt.

3.2. Kriterien für die Bewertung von FLUAV-Reassortanten

Der Austausch von Genomsegmenten zwischen verschiedenen FLUAV führt zum Entstehen von Reassortanten, die sich in ihren Eigenschaften und ihrem Gefährdungspotenzial von ihren Ausgangsviren unterscheiden können. Daher wird bei der Bewertung von Reassortanten die Risikogruppe der Spenderviren zwar berücksichtigt, stellt jedoch nicht das alleinige Bewertungskriterium dar. Vielmehr ist für die Bewertung von entscheidender Bedeutung, welche Genomsegmente ausgetauscht werden sollen und welche biologischen Eigenschaften die Spenderviren aufweisen.

3.2.1. Reassortierung zwischen FLUAV der Risikogruppe 2

Bei der Reassortierung zwischen FLUAV der Risikogruppe 2 kann es ggf. zur Bildung von Reassortanten kommen, die ein erhöhtes Gefährdungspotenzial (Risikogruppe 3) aufweisen. Dies kann insbesondere dann der Fall sein, wenn durch Reassortierung ein Wirtswechsel (von Tier zu Mensch) oder eine systemische Infektion ermöglicht wird. Nachfolgend aufgeführte Reassortierungen sind daher wie folgt zu bewerten:

- a) Werden Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppe 2 gebildet, wobei eines oder mehrere der PB1-, PB2-, PA- und/oder HA-Genomsegmente ausgetauscht werden, so dass die Reassortante wenigstens eine an den Menschen adaptierende Sequenzvariation erhält, die im Empfängervirus nicht vorhanden war, sind die resultierenden Reassortanten im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

Hiervon ausgenommen sind Reassortanten mit sechs oder mehr Genomsegmenten der sehr gut charakterisierten Laborstämme A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) und A/WSN/1933 (H1N1).

Als adaptierende Sequenzvariationen gelten insbesondere solche, die die Virulenz für oder die Transmissibilität zwischen Säugern steigern oder die Bindung an den humanen, α 2,6-verlinkten Rezeptortyp verstärken können.

Als Empfängervirus wird hierbei das Virus angesehen, von dem die Reassortante die Mehrzahl der Genomsegmente erhält. Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Genomsegmente sind entsprechend mehrere Viren als Empfänger zu berücksichtigen.

- b) Wird ein HA-Genomsegment mit einer polybasischen Spaltstelle auf FLUAV der Risikogruppe 2 übertragen, sind die resultierenden Reassortanten der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.

Alle übrigen Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppe 2 sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

Hinweis: Bei der Beschreibung der geplanten gentechnischen Arbeit ist anzugeben, ob an den Menschen adaptierende Sequenzvarianten, die im Empfängervirus nicht vorlie-

gen, oder eine polybasische Spaltstelle übertragen werden. Fehlt eine solche Angabe, werden die entstehenden Reassortanten vorsorglich der **Risikogruppe 3** zugeordnet. Eine auf der Fachliteratur basierende Liste mit Sequenzvariationen, die Punkt a) erfüllen, ist auf der Homepage der ZKBS (www.zkbs-online.de) zur Verfügung gestellt.

3.2.2. Reassortierung mit FLUAV der Risikogruppe 3

Werden Reassortanten hergestellt, bei denen auch FLUAV der Risikogruppe 3 als Spenderviren verwendet werden, werden diese wie folgt bewertet:

- a) Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppe 3 sind grundsätzlich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.
- b) Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppe 3 und FLUAV der Risikogruppe 2, bei denen wenigstens eines der PB1-, PB2-, PA- oder HA-Genomsegmente vom Virus der Risikogruppe 3 stammt, sind vorsorglich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen, sofern wenigstens eines der Ausgangsviren humanpathogen ist.
- c) Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppe 3 und FLUAV der Risikogruppe 2, bei denen keines der PB1-, PB2-, PA- und HA-Genomsegmente vom Virus der Risikogruppe 3 stammt, sind im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.
- d) Reassortanten zwischen nicht-humanpathogenen FLUAV der Risikogruppe 3 und nicht-humanpathogenen FLUAV der Risikogruppe 2, sind unabhängig von den ausgetauschten Genomsegmenten im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

4. Bewertung von Arbeiten mit gentechnisch veränderten FLUAV

Arbeiten mit gentechnisch veränderten FLUAV sind entsprechend der Risikogruppe der Viren der **Sicherheitsstufe 2, 3 oder 4** zuzuordnen.

Abschließende Hinweise:

Es wird darauf hingewiesen, dass bei einer vorsorglichen Einstufung von FLUAV-Mutanten oder -Reassortanten in die **Risikogruppe 3** oder **4** experimentelle Daten nachgereicht werden können, die zu einer Neubewertung und ggf. Herabstufung der gentechnisch veränderten Viren führen können.

Werden Reassortanten gebildet, in die anschließend Mutationen eingebracht werden, ist zunächst die Reassortante allein zu bewerten. Ausgehend von deren Risikogruppe können die Mutationen abschließend gemäß Punkt 3.1. bewertet werden.

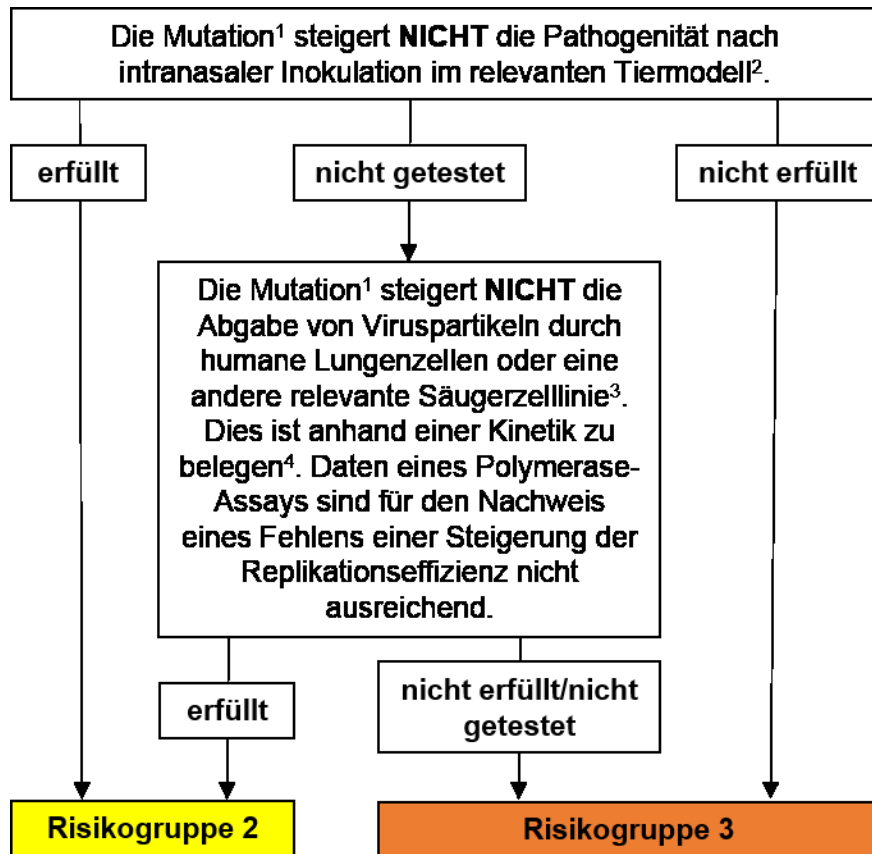
Literatur

1. **Vasin AV, Temkina OA, Egorov VV, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI** (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* **185**:53-63.
2. **Short KR, Richard M, Verhagen JH, van Riel D, Schrauwen EJ, van den Brand JM, Mänz B, Bodewes R, Herfst S** (2015). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *One Health.* **1**:1-13.
3. **Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF** (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* **22**(4):183-91.

4. **Lombardo T, Chiapponi C, Baioni L, Cinotti S, Ferrari M** (2015). Protein mutations following adaptation of avian influenza viruses in different biological systems. *Res Vet Sci.* 103:176-8.
5. **ZKBS** (2015). Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von Influenzaviren als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV, Az.: 6790-05-02-29.
6. **ZKBS** (2013). Empfehlung der ZKBS zur Einstufung von gentechnischen Arbeiten mit hochpathogenen aviären Influenza A-Viren (HPAIV), die das Potenzial einer effizienten Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren besitzen, Az.: 45310.0108.
7. **Schrauwen EJ, de Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA** (2014). Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(4):479-90.
8. **Jagger BW, Memoli MJ, Sheng ZM, Qi L, Hrabal RJ, Allen GL, Dugan VG, Wang R, Digard P, Kash JC, Taubenberger JK** (2010). The PB2-E627K Mutation Attenuates Viruses Containing the 2009 H1N1 Influenza Pandemic Polymerase. *mBio.* 1(1): e00067-10.
9. **Mehle A** (2014). Unusual influenza A viruses in bats. *Viruses.* 6(9):3438-49.
10. **Ciminski K, Thamamongood T, Zimmer G, Schwemmle M** (2017). Novel insights into bat influenza A viruses. *J Gen Virol.* 98(10):2393-400.
11. **Moreira ÉA, Locher S, Kolesnikova L, Bolte H, Aydillo T, García-Sastre A, Schwemmle M, Zimmer G** (2016). Synthetically derived bat influenza A-like viruses reveal a cell type- but not species-specific tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* pii: 201608821.
12. **Juozapaitis M, Aguiar Moreira É, Mena I, Giese S, Riegger D, Pohlmann A, Höper D, Zimmer G, Beer M, García-Sastre A, Schwemmle M** (2014). An infectious bat-derived chimeric influenza virus harbouring the entry machinery of an influenza A virus. *Nat Commun.* 5:4448.

Anhang

Punkt 3.1.2.1 kann durch Vorlage von Literaturdaten oder unveröffentlichten Daten belegt werden. Hierzu sind der zuständigen Landesbehörde oder der ZKBS eine entsprechende Publikation oder experimentelle Daten, die den in der Abbildung aufgeführten Anforderungen genügen, zur Bewertung vorzulegen.



¹im identischen genetischen Hintergrund und bei Mehrfachmutationen in ihrer spezifischen Kombination

²z. B. Maus oder Frettchen

³z. B. MDCK

⁴Die Zahl der Messpunkte und der Endpunkt der Kinetik sind in geeigneter Weise zu wählen.

**Einstufungshilfe für Influenza-A-Virus-Mutanten und -Reassortanten
gemäß der
„Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten
mit rekombinanten Influenza-A-Viren“
(Az. 45310.0113, aktualisiert Dezember 2019)**

In diesem Dokument stellt die Geschäftsstelle der ZKBS in der Fachliteratur beschriebene Aminosäure-Punktmutationen und -Deletionen bzw. Sequenzvarianten zusammen, die bestimmte Bewertungskriterien der allgemeinen Stellungnahme zu gentechnischen Arbeiten mit Influenza-A-Viren (FLUAV) erfüllen. Die Listen werden regelmäßig aktualisiert und sind nicht als abschließend zu betrachten. Ein Abgleich zwischen den in einer gentechnischen Arbeit zu verwendenden Mutanten oder Reassortanten mit den aktuellen Listen ersetzt daher nicht die individuelle Gefährdungsbeurteilung der Arbeit durch den Projektleiter.

zu 3.1.1.1. Mutationen im HA-Genomsegment von FLUAV der Risikogruppe 2

Die im Folgenden aufgeführten Aminosäure-Punktmutationen bzw. -Deletionen erfüllen das unter 3.1.1.1. b) genannte Kriterium. FLUAV mit einer oder mehreren dieser (Kombinationen von) Mutationen sind daher vorsorglich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.

Substitution (H3-Nummerierung)¹	beschriebener Effekt	Referenz
Asn21X ²	erhöhte Virulenz im Säuger	[1]
Glu83Lys + Ser128Pro	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Glu83Lys + Arg171Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ser125Asn	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[6]
Ser128Pro + Arg171Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ser137Ala	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[11]
Gly143Arg + Arg171Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ile155Thr + Δ 129 ³	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[10]
Asn158X ²	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[8, 9]
Ser159Asn	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[6]
Thr160X ²	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[6, 7, 9]
Asn186Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2, 3]
Asp187Gly	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[12]

Glu190Gly	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[12]
Thr192Ile	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[11]
Lys193Arg	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[6]
Gln196Arg/His	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[2, 10, 12]
Asn197Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ser205Thr	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[44, 45]
Val214Ile	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[10]
Asp225Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[5]
Gln226Leu	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[3, 4]
Ser227Asn	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[3, 12]
Gly228Ser	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[3, 4]
Glu255Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[12]

¹Basierend auf dem vollständig prozessierten Protein; die Aminosäuren des N-terminalen Signalpeptids sind nicht berücksichtigt; aufgrund von Insertionen und Deletionen kann die tatsächliche Position innerhalb des HA eines spezifischen Stammes, insbesondere solcher anderer HA-Subtypen, ggf. von der angegebenen Position abweichen. Eine Konvertierungstabelle einiger Aminosäurepositionen innerhalb des HA der Subtypen H1pdm, H3, H5, H7 und H9 ist in Burke DF, Smith DJ (2014), *PLoS One*. 9(11):e112302 veröffentlicht. Ein *tool* zur Konvertierung zwischen allen HA-Subtypen steht auf der Internetseite der Influenza Research Database (www.fludb.org) zur Verfügung.

²X: jede beliebige Aminosäure, die zum Verlust der N-Glykosylierungsstelle (Asn-X-Ser/Thr) führt

³ Δ 129: Deletion der Aminosäure 129 im H5-Subtyp; im H3-Subtyp ist die äquivalente Aminosäure natürlicherweise deletiert

zu 3.1.2.1. Mutation der PB1-, PB2- und PA-Genomsegmente von FLUAV der Risikogruppe 2

Die im Folgenden aufgeführten Aminosäure-Punktmutationen erfüllen das unter 3.1.2.1. genannte Kriterium. FLUAV mit einer oder mehreren dieser (Kombinationen von) Mutationen sind daher der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

Substitution ¹	beschriebener Effekt	Referenz
PB1		
Asp2Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Val3Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Asn4Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Pro5Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Thr6Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Leu7Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Leu8Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger; verringerte Virulenz im Säuger	[49, 51, 52]
Phe9Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]

Leu10Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Lys11Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Val12Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Pro13Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
Ala14Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[51, 52]
PB2		
Lys627Glu	verringerte Replikationseffizienz im Säuger; verringerte Virulenz im Säuger	[37]
Asn701Asp	verringerte Virulenz im Säuger	[39]
PA		
Arg638Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[53; 54]
Trp706Y ²	verringerte Replikationseffizienz im Säuger; verringerte Virulenz im Säuger	[49, 52]

¹Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe www.fludb.org); Aufgrund von Insertionen und Deletionen kann die tatsächliche Position innerhalb der Proteine eines spezifischen Stammes ggf. von der angegebenen Position abweichen.

²jede beliebige Aminosäure mit anderer Ladung oder Hydrophobizität (d.h. nicht-konservative Aminosäuren)

zu 3.1.3. Mutation der übrigen Genomsegmente

a) Die im Folgenden aufgeführten Aminosäure-Punktmutationen bzw. -Deletionen erfüllen das unter 3.1.3. a) genannte Kriterium. FLUAV mit einer oder mehreren dieser (Kombinationen von) Mutationen sind daher vorsorglich der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.

Substitution ¹	beschriebener Effekt	Referenz
M1		
Asn30Asp + Thr215Ala	erhöhte Virulenz im Säuger	[24]
Ile43Met	erhöhte Virulenz im Säuger	[25]
Thr139Ala	erhöhte Virulenz im Säuger	[23]
NA		
Δ49-68	erhöhte Virulenz im Säuger	[26]
Δ53-60	erhöhte Virulenz im Säuger	[46]
Asn58X ²	erhöhte Virulenz im Säuger	[46]
Asp248Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[57]
Asn365X ²	erhöhte Virulenz im Säuger	[23]
NP		
Gly16Asp	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[27, 28]

Arg100Val	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[27, 28]
Val100Ile	erhöhte Virulenz im Säuger	[44]
Ile133Leu	erhöhte Virulenz im Säuger	[44]
Leu283Pro	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[27, 28]
Phe313Tyr/Val	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[27, 28]
Ile373Thr	erhöhte Virulenz im Säuger	[44]
Lys470Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[29]
NS1		
Pro42Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[33]
Gly45Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[56]
Δ80-84	erhöhte Virulenz im Säuger	[34]
Asp92Glu	erhöhte Virulenz im Säuger	[55]
Leu103Phe + Ile106Met	erhöhte Virulenz im Säuger	[30]
Val178Ile	erhöhte Virulenz im Säuger	[58]
Pro212Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[58]
RSKV227-230ESEV ³	erhöhte Virulenz im Säuger	[31, 32]

¹Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe www.fludb.org) bzw. der N1-Konsensussequenz; Aufgrund von Insertionen und Deletionen kann die tatsächliche Position innerhalb der Proteine eines spezifischen Stammes ggf. von der angegebenen Position abweichen.

²X: jede beliebige Aminosäure, die zum Verlust der N-Glykosylierungsstelle (Asn-X-Ser/Thr) führt

³Austausch des human-typischen Arg-Ser-Lys/Glu-Val-Motifs gegen das aviär-typische Glu-Ser/Pro-Glu-Val-Motiv

b) Die im Folgenden aufgeführten Aminosäure-Punktmutationen erfüllen das unter 3.1.3. b) genannte Kriterium. FLUAV mit einer oder mehreren dieser (Kombinationen von) Mutationen sind daher im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

Substitution ¹	beschriebener Effekt	Referenz
M2		
Leu26Phe	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin ²	[13]
Val27Ala	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin ²	[13, 14]
Ala30Pro/Thr	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin ²	[13, 14]
Ser31Asn	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin ²	[13, 14]

Gly34Glu	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin ²	[13, 14]
NA		
Val116Ala	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[15, 17]
Ile117Val	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[18]
Glu119Ala/Gly	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir	[15, 18]
Glu119Val	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[15]
Gln136Leu/Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[15, 19]
Asp151Glu	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[16]
Arg156Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir	[20]
Asp199Asn/Glu/Gly	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[21, 22]
Ile223Val	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[22]
Ile223Arg	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir	[15]
Arg225Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[16]
Ser247Asn	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[17]
His253Tyr	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[15]
His275Tyr	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Peramivir	[15, 18, 22]
Glu277Asp	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[16]
Arg293Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[15]
Asn295Ser	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Peramivir	[15, 18, 22]

¹Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe www.fludb.org) bzw. der N1-Konsensussequenz; aufgrund von Insertionen und Deletionen kann die tatsächliche Position innerhalb der Proteine eines spezifischen Stammes ggf. von der angegebenen Position abweichen.

²in Deutschland nicht zugelassen

zu 3.2.1. Reassortierung zwischen FLUAV der Risikogruppe 2

Die im Folgenden aufgeführten Sequenzvarianten erfüllen das unter 3.2.1. a) genannte Kriterium. Werden eine oder mehrere der Sequenzvarianten übertragen, sind die Reassortanten daher im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

Variante ¹	beschriebener Effekt	Referenz
HA		
Asn21X ²	erhöhte Virulenz im Säuger	[1]
Glu83Lys + Ser128Pro	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Glu83Lys + Arg171Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ser125Asn	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[6]
Ser128Pro + Arg171Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ser137Ala	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[11]
Gly143Arg + Arg171Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ile155Thr + Δ 129 ³	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[10]
Asn158X ²	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[8, 9]
Ser159Asn	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[6]
Thr160X ²	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[6, 7, 9]
Asn186Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2, 3]
Asp187Gly	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[12]
Glu190Gly	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[12]
Thr192Ile	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[11]
Lys193Arg	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[6]
Gln196Arg/His	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[2, 10, 12]
Asn197Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[2]
Ser205Thr	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[44, 45]
Val214Ile	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[10]
Asp225Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[5]
Gln226Leu	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[3, 4]
Ser227Asn	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[3, 12]
Gly228Ser	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[3, 4]
Glu255Lys	verbesserte Bindung an α 2,6-Glykane	[12]
PB1		
Asp622Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[43]
Pro708Ser	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[50]

PB1-F2 Asn66Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[40]
PB2 Asp9Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[38]
Glu158Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[47]
Ala199Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[38]
Asp256Gly	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger	[35]
Ile283Met + Lys526Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[60]
Lys389Arg	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger	[59]
Ala588Val	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[61]
Gln591Arg/Lys	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[36]
Val598Thr/Ile	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[59]
Glu627Lys	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[35, 38]
Asp701Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[39]
PA Thr85Ile	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger	[42]
Thr97Ile	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[62]
Lys142Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[38]
Ser224Pro + Asn383Asp	erhöhte Virulenz im Säuger	[63]
Leu336Met	erhöhte Virulenz im Säuger	[42]
Ile353Arg	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[64]
Lys356Arg	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[41]
Ser421Ile	erhöhte Virulenz im Säuger	[38]
PA-X 252 Aminosäurevariante ³	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[48]
R195K	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[65]
K206R	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[65]
P210L	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[65]

¹Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe www.fludb.org) bzw. der H3-Konsensussequenz; aufgrund von Insertionen und Deletionen kann die tatsächliche Position innerhalb der Proteine eines spezifischen Stammes ggf. von der angegebenen Position abweichen.

²X: jede beliebige Aminosäure, die zum Verlust der N-Glykosylierungsstelle (Asn-X-Ser/Thr) führt

³Volllängenvariante mit 191 Aminosäuren der PA-Domäne und 61 Aminosäuren der X-Domäne

Literatur

1. **Deshpande KL et al.** (1987). Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(1):36-40.
2. **Yamada S et al.** (2006). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature.* **444**(7117):378-82.
3. **Chutinimitkul S et al.** (2010). In vitro assessment of attachment pattern and replication efficiency of H5N1 influenza A viruses with altered receptor specificity. *J Virol.* **84**(13):6825-33.
4. **Connor RJ et al.** (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* **205**(1):17-23.
5. **Goka EA et al.** (2014). Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Arch Virol.* **159**(12):3167-83.
6. **Wang W et al.** (2010). Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *J Virol.* **84**(13):6570-7.
7. **Imai M et al.** (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature.* **486**(7403):420-8.
8. **Herfst S et al.** (2012). Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* **336**(6088):1534-41.
9. **de Vries RP et al.** (2014). Hemagglutinin receptor specificity and structural analyses of respiratory droplet-transmissible H5N1 viruses. *J Virol.* **88**(1):768-73.
10. **Watanabe Y et al.** (2011). Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog.* **7**(5):e1002068.
11. **Yang ZY et al.** (2007). Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science.* **317**(5839):825-8.
12. **Chen LM et al.** (2012). In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. *Virology.* **422**(1):105-13.
13. **Ison MG** (2011). Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr Opin Virol.* **1**(6):563-73.
14. **Astrahan P et al.** (2011). Resistance characteristics of influenza to amino-adamantyls. *Biochim Biophys Acta.* **1808**(2):547-53.
15. **McKimm-Breschkin JL** (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses.* **Suppl 1**:25-36.
16. **Yen HL et al.** (2006). Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol.* **80**(17):8787-95.
17. **Boltz DA et al.** (2010). Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic. *J Gen Virol.* **91**(Pt 4):949-59.
18. **Ilyushina NA et al.** (2010). Effect of neuraminidase inhibitor-resistant mutations on pathogenicity of clade 2.2 A/Turkey/15/06 (H5N1) influenza virus in ferrets. *PLoS Pathog.* **6**(5):e1000933.
19. **Hurt AC et al.** (2010). Assessing the development of oseltamivir and zanamivir resistance in A(H5N1) influenza viruses using a ferret model. *Antiviral Res.* **87**(3):361-6.

20. **Ilyushina NA et al.** (2012). Decreased neuraminidase activity is important for the adaptation of H5N1 influenza virus to human airway epithelium. *J Virol.* **86**(9):4724-33.
21. **Ghedini E et al.** (2011). Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J Infect Dis.* **203**(2):168-74.
22. **Pizzorno A et al.** (2011). Generation and characterization of recombinant pandemic influenza A(H1N1) viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *J Infect Dis.* **203**(1):25-31.
23. **Brown EG et al.** (1999). Genetic analysis of mouse-adapted influenza A virus identifies roles for the NA, PB1, and PB2 genes in virulence. *Virus Res.* **61**(1):63-76.
24. **Fan S et al.** (2009). Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology* **384**(1):28-32.
25. **Nao N et al.** (2017). A Single Amino Acid in the M1 Protein Responsible for the Different Pathogenic Potentials of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains. *PLoS One.* 2015 Sep 14;10(9):e0137989.
26. **Zhou H et al.** (2009). The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One* **4**(7):e6277.
27. **Mänz B et al.** (2013). Pandemic influenza A viruses escape from restriction by human MxA through adaptive mutations in the nucleoprotein. *PLoS Pathog.* **9**(3):e1003279.
28. **Deeg CM et al.** (2016). In vivo evasion of MxA by avian influenza viruses requires human signature in the viral nucleoprotein. *J Exp Med.* **214**(5):1239-1248.
29. **Chen L et al.** (2017). Amino Acid Substitution K470R in the Nucleoprotein Increases the Virulence of H5N1 Influenza A Virus in Mammals. *Front Microbiol.* **8**:1308.
30. **Spesock A et al.** (2011). The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins. *J Virol.* **85**(14):7048-58.
31. **Soubies SM et al.** (2010). Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J Virol.* **84**(13):6733-47.
32. **Jackson D et al.** (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(11):4381-6.
33. **Jiao P et al.** (2008). A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol.* **82**(3):1146-54.
34. **Long JX et al.** (2008). Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes.* **36**(3):471-8.
35. **Manzoor R et al.** (2009). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol.* **83**(4):1572-8.
36. **Yamada S et al.** (2010). Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog.* **6**(8):e1001034.
37. **Bogs J et al.** (2011). Reversion of PB2-627E to -627K during replication of an H5N1 Clade 2.2 virus in mammalian hosts depends on the origin of the nucleoprotein. *J Virol.* **85**(20):10691-8.
38. **Kim JH et al.** (2010). Role of host-specific amino acids in the pathogenicity of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J Gen Virol.* **91**(Pt 5):1284-9.
39. **Li Z et al.** (2005). Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol.* **79**(18):12058-64.
40. **Conenello GM et al.** (2007). A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* **3**(10):1414-21.
41. **Xu G et al.** (2016). Prevailing PA Mutation K356R in Avian Influenza H9N2 Virus Increases Mammalian Replication and Pathogenicity. *J Virol.* **90**(18):8105-14.
42. **Bussey KA et al.** (2011). PA residues in the 2009 H1N1 pandemic influenza virus enhance avian influenza virus polymerase activity in mammalian cells. *J Virol.* **85**(14):7020-8.
43. **Feng X et al.** (2015). Glycine at Position 622 in PB1 Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Virus in Mice. *J Virol.* **90**(4):1872-9.

44. **Otte A et al.** (2015). Adaptive Mutations That Occurred during Circulation in Humans of H1N1 Influenza Virus in the 2009 Pandemic Enhance Virulence in Mice. *J Virol.* **89**(14):7329-37.
45. **Otte A et al.** (2016). Evolution of 2009 H1N1 influenza viruses during the pandemic correlates with increased viral pathogenicity and transmissibility in the ferret model. *Sci Rep.* **6**:28583.
46. **Park S et al.** (2017). Adaptive mutations of neuraminidase stalk truncation and deglycosylation confer enhanced pathogenicity of influenza A viruses. *Sci Rep.* **7**(1):10928.
47. **Zhou B et al.** (2011). PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza A viruses in mice. *J Virol.* **85**(1):357-65.
48. **Gao H et al.** (2015). Twenty amino acids at the C-terminus of PA-X are associated with increased influenza A virus replication and pathogenicity. *J Gen Virol.* **96**(8):2036-49.
49. **Mänz B et al.** (2011). Disruption of the viral polymerase complex assembly as a novel approach to attenuate influenza A virus. *J Biol Chem.* **286**(10):8414-24.
50. **Choi WS et al.** (2017). Rapid acquisition of polymorphic virulence markers during adaptation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in the mouse. *Sci Rep.* **7**:40667.
51. **Perez DR et al.** (2001). Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol.* **75**(17):8127-36.
52. **He X et al.** (2008). Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature.* **454**(7208):1123-6.
53. **Fodor E et al.** (2003). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol.* **77**(8):5017-20.
54. **Lukarska M et al.** (2017). Structural basis of an essential interaction between influenza polymerase and Pol II CTD. *Nature.* **541**(7635):117-121.
55. **Seo SH et al.** (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med.* **8**(9):950-4.
56. **Kaewborisuth C et al.** (2017). G45R on nonstructural protein 1 of influenza A virus contributes to virulence by increasing the expression of proinflammatory cytokines in mice. *Arch Virol.* **162**(1):45-55.
57. **Kim WJ et al.** (2019). Pathogenicity of the H1N1 influenza virus enhanced by functional synergy between the NPV100I and NAD248N pair. *PLoS One.* **14**(5):e0217691.
58. **Wang S et al.** (2018). Identification of two residues within the NS1 of H7N9 influenza A virus that critically affect the protein stability and function. *Vet Res.* **49**(1):98.
59. **Hu M et al.** (2017). PB2 substitutions V598T/I increase the virulence of H7N9 influenza A virus in mammals. *Virology.* **501**:92-101.
60. **Wang X et al.** (2017). Synergistic effect of PB2 283M and 526R contributes to enhanced virulence of H5N8 influenza viruses in mice. *Vet Res.* **48**(1):67.
61. **Xiao C et al.** (2016). PB2-588 V promotes the mammalian adaptation of H10N8, H7N9 and H9N2 avian influenza viruses. *Sci Rep.* **6**:19474.
62. **Song MS et al.** (2009). The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model. *J Virol.* **83**(23):12325-35.
63. **Song J et al.** (2015). Synergistic Effect of S224P and N383D Substitutions in the PA of H5N1 Avian Influenza Virus Contributes to Mammalian Adaptation. *Sci Rep.* **5**:10510.
64. **Hu J et al.** (2013). The PA-gene-mediated lethal dissemination and excessive innate immune response contribute to the high virulence of H5N1 avian influenza virus in mice. *J Virol.* **87**(5):2660-72.
65. **Sun Y et al.** (2020). An R195K Mutation in the PA-X Protein Increases the Virulence and Transmission of Influenza A Virus in Mammalian Hosts. *J Virol.* **94**(11):e01817-19.