

## **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](http://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](http://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](http://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,  $\alpha$ 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](http://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.

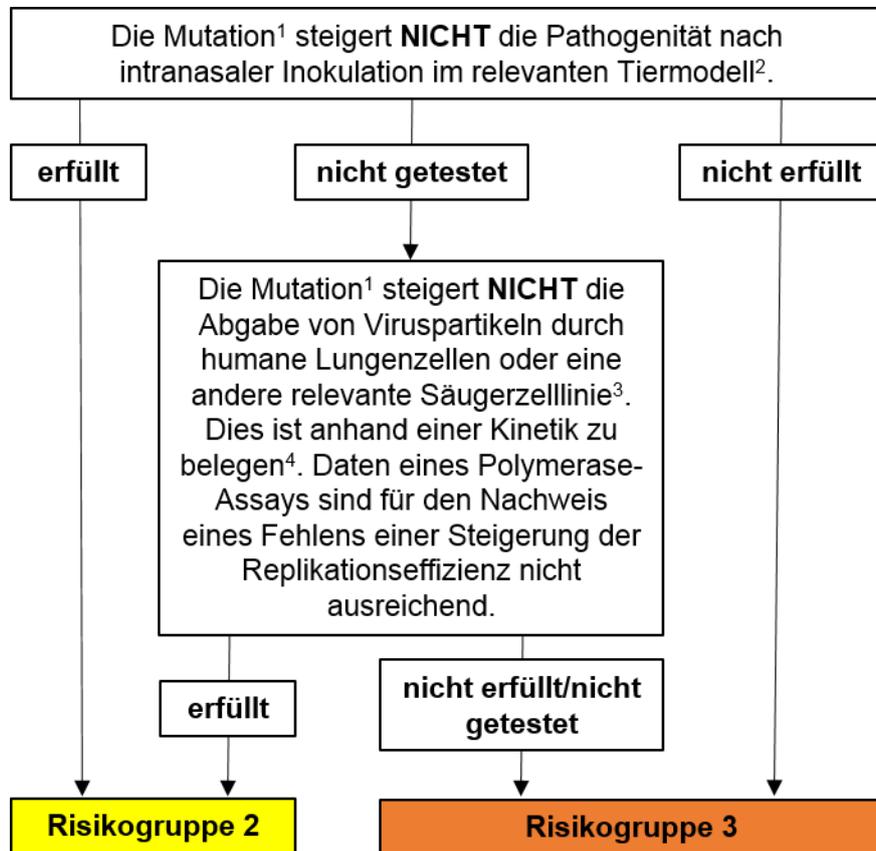
### Literatur

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.



<sup>1</sup>im identischen genetischen Hintergrund und bei Mehrfachmutationen in ihrer spezifischen Kombination

<sup>2</sup>z. B. Maus oder Frettchen

<sup>3</sup>z. B. MDCK

<sup>4</sup>Die 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) <sup>1</sup>	beschriebener Effekt	Referenz
Asn21X <sup>2</sup>	erhöhte Virulenz im Säuger	[1]
His34Gln	erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[2]
Glu83Lys + Ser128Pro	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Glu83Lys + Arg171Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Ser119Arg	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Ser125Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[5]
Asn133Asp	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[6]

<sup>1</sup> Basierend 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 des *Bacterial And Viral Bioinformatics Resource Center* (<https://www.bv-brc.org/>) zur Verfügung.

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

Ser128Pro + Arg171Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Leu129Val + Ala134Val	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[7]
$\Delta$ 133 <sup>3</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[8]
Ser137Ala	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[9]
Lys141Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Gly143Arg + Arg171Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Asp145Gly/Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Ile155Thr + $\Delta$ 129 <sup>4</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[10]
Asn158X <sup>2</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[11, 12]
Ser159Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[5]
Thr160X <sup>2</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[5, 12–15]
Asp176Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[16]
Asn186Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3, 17]
Asp187Gly	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[18]
Thr197Pro + Met237Leu	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[19]
Glu190Gly	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[18]
Thr192Ile	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[9]
Lys193Arg	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[5]
Gln196Arg/His	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[3, 10, 18]
Asn197Lys/Asp	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3, 20]
Ser205Thr	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[21, 22]
Val214Ile	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[10]
Asp225Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[23]
Gln226Leu	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[17, 24]
Leu226Gln	erhöhte Virulenz im Säuger	[25]
Ser227Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[17, 18]
Gln227Met	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Gly228Ser	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[17, 24]

<sup>3</sup>  $\Delta$ 133: Deletion der Aminosäure 133 im H5 und H1-Subtyp; im H3-Subtyp ist die äquivalente Aminosäure natürlicherweise deletiert

<sup>4</sup>  $\Delta$ 129: Deletion der Aminosäure 129 im H5-Subtyp; im H3-Subtyp ist die äquivalente Aminosäure natürlicherweise deletiert

Arg238Ile	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[26]
Arg246Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Glu255Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[18]
Leu331Ile + Gly453Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[27]
Leu428Met	erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern, erhöhte Virulenz im Säuger	[28]

### 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 <sup>5</sup>	beschriebener Effekt	Referenz
<b>PB1</b>		
Asp2Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Val3Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Asn4Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Pro5Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Thr6Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Leu7Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Leu8Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger; verringerte Virulenz im Säuger	[29–31]
Phe9Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Leu10Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Lys11Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Val12Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Pro13Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
Ala14Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[29, 30]
<b>PB2</b>		
Arg209Lys	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[32]

<sup>5</sup> Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe <https://www.bv-brc.org/>); Aufgrund von Insertionen und Deletionen kann die tatsächliche Position innerhalb der Proteine eines spezifischen Stammes ggf. von der angegebenen Position abweichen.

<sup>6</sup> jede beliebige Aminosäure mit anderer Ladung oder Hydrophobizität (d. h. nicht-konservative Aminosäuren)

Glu282Ser	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[33]
Lys627Glu	verringerte Replikationseffizienz im Säuger; verringerte Virulenz im Säuger	[34]
Asn701Asp	verringerte Virulenz im Säuger	[35]
<b>PA</b>		
Asp164Ala	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[36]
Glu165Ala	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[36]
Glu166Ala	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[36]
Thr173Ala	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[36]
Phe176Ala	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[36]
Glu199Lys	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[32]
Glu206Lys	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[37]
Arg638Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger	[38, 39]
Trp706Y <sup>6</sup>	verringerte Replikationseffizienz im Säuger; verringerte Virulenz im Säuger	[30, 31]

### 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 <sup>7</sup>	beschriebener Effekt	Referenz
<b>M1</b>		
Asn30Asp + Thr215Ala	erhöhte Virulenz im Säuger	[40]
Thr37Ala	erhöhte Virulenz im Säuger	[41]
Ile43Met	erhöhte Virulenz im Säuger	[42]
Thr139Ala	erhöhte Virulenz im Säuger	[43]
<b>NA</b>		
Δ49-68	erhöhte Virulenz im Säuger	[44]
Δ53-60	erhöhte Virulenz im Säuger	[45]
Asn58X <sup>2</sup>	erhöhte Virulenz im Säuger	[45]
Asp248Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[46]

<sup>7</sup> Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe <https://www.bv-brc.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.

Asp272Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[47]
Ser319Phe	erhöhte Virulenz in Säuger	[48]
Asn365X <sup>2</sup>	erhöhte Virulenz im Säuger	[43]
Ser430Gly	keinen Einfluss auf NA Aktivität; verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[48]
<b>NP</b>		
Gly16Asp	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[49, 50]
Arg100Val	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[49, 50]
Val100Ile	erhöhte Virulenz im Säuger	[21]
Ile133Leu	erhöhte Virulenz im Säuger	[21]
Leu283Pro	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[49, 50]
Phe313Tyr/Val	erhöhte MxA/Mx1-Resistenz; erhöhte Virulenz im Säuger	[49, 50]
Gln357Lys	erhöhte Virulenz im Säuger	[51]
Ile373Thr	erhöhte Virulenz im Säuger	[21]
Lys470Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[52]
<b>NS1</b>		
Pro42Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[53]
Gly45Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[54]
$\Delta$ 80-84	erhöhte Virulenz im Säuger	[55]
Asp92Glu	erhöhte Virulenz im Säuger	[56]
Leu103Phe + Ile106Met	erhöhte Virulenz im Säuger	[57]
Val178Ile	erhöhte Virulenz im Säuger	[58]
Pro212Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[58]
NS1(1-217)	erhöhte Virulenz im Säuger	[59]
RSKV227-230ESEV <sup>8</sup>	erhöhte Virulenz im Säuger	[60, 61]

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 <sup>7</sup>	beschriebener Effekt	Referenz
---------------------------	----------------------	----------

<sup>8</sup> Austausch des human-typischen Arg-Ser-Lys/Glu-Val-Motifs gegen das aviär-typische Glu-Ser/Pro-Glu-Val-Motiv

<b>M2</b>		
Leu26Phe	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin <sup>9</sup>	[62]
Val27Ala	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin <sup>9</sup>	[62, 63]
Ala30Pro/Thr	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin <sup>9</sup>	[62, 63]
Ser31Asn	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin <sup>9</sup>	[62, 63]
Gly34Glu	verringerte Sensitivität gegenüber Amantadin und Rimantadin <sup>9</sup>	[62, 63]
<b>NA</b>		
Glu104Val + Thr133Ile	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[64]
Val116Ala	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[65, 66]
Ile117Val	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[67]
Glu119Ala/Gly	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir	[65, 67]
Glu119Asp	verringerte Sensitivität gegenüber Laninamivir <sup>9</sup> , Peramivir und Zanamivir	[68, 69]
Glu119Val	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[65]
Gln136Arg	verringerte Sensitivität Peramivir und Zanamivir	[70]
Gln136Leu/Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[65, 71]
Asp151Glu	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[72]
Arg156Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir	[73]
Asp199Asn/Glu/Gly	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[74, 75]
Ile223Val	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[75]
Ile223Arg	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir	[65]
Arg225Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[72]
Ser247Asn	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[66]
His253Tyr	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[65]

<sup>9</sup> in Deutschland nicht zugelassen

His275Tyr	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Peramivir	[65, 67, 75]
Glu277Asp	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Zanamivir	[72]
Arg293Lys	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir	[65]
Asn295Ser	verringerte Sensitivität gegenüber Oseltamivir und Peramivir	[65, 67, 75]
Pro458Thr	verringerte Sensitivität gegenüber Laninamivir <sup>9</sup> , Oseltamivir, Peramivir und Zanamivir	[76]
<b>PA</b>		
Ile38Ser/Thr	verringerte Sensitivität gegenüber Baloxavirmarboxil	[77–81]
E198K	verringerte Sensitivität gegenüber Baloxavirmarboxil	[82]
E199D	verringerte Sensitivität gegenüber Baloxavirmarboxil	[32, 83]

### 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 <sup>10</sup>	beschriebener Effekt	Referenz
<b>HA</b>		
Asn21X <sup>2</sup>	erhöhte Virulenz im Säuger	[1]
His34Gln	erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[2]
Glu83Lys + Ser128Pro	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Glu83Lys + Arg171Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Ser119Arg	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Ser125Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[5]
Asn133Asp	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[6]
Ser128Pro + Arg171Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Leu129Val + Ala134Val	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[7]
$\Delta$ 133 <sup>3</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[8]

<sup>10</sup> Nummerierung basierend auf einem Referenzstamm (siehe <https://www.bv-brc.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.

Ser137Ala	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[9]
Lys141Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Gly143Arg + Arg171Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3]
Asp145Gly/Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Ile155Thr + $\Delta$ 129 <sup>4</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[10]
Asn158X <sup>2</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[11, 12]
Ser159Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[5]
Thr160X <sup>2</sup>	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern	[5, 12–15]
Asp176Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[16]
Asn186Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3, 17]
Asp187Gly	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[18]
Thr197Pro + Met237Leu	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[19]
Glu190Gly	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[18]
Thr192Ile	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[9]
Lys193Arg	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[5]
Gln196Arg/His	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[3, 10, 18]
Asn197Lys/Asp	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[3, 20]
Ser205Thr	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[21, 22]
Val214Ile	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[10]
Asp225Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[23]
Gln226Leu	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[17, 24]
Leu226Gln	erhöhte Virulenz im Säuger	[25]
Ser227Asn	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[17, 18]
Gln227Met	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Gly228Ser	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[17, 24]
Arg238Ile	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane; erhöhte Virulenz im Säuger	[26]
Arg246Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[4]
Glu255Lys	verbesserte Bindung an $\alpha$ 2,6-Glykane	[18]
Leu331Ile + Gly453Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[27]
Leu428Met	erhöhte Transmissibilität zwischen Säugern, erhöhte Virulenz im Säuger	[28]
<b>PB1</b>		

Asp622Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[84]
Pro708Ser	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[85]
<b>PB1-F2</b>		
Asn66Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[86]
<b>PB2</b>		
Asp9Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[87]
S155N	erhöhte Virulenz im Säuger	[88]
Glu158Gly	erhöhte Virulenz im Säuger	[89]
M172	erhöhte Virulenz im Säuger	[90]
Ala199Ser	erhöhte Virulenz im Säuger	[87]
R251K	erhöhte Virulenz im Säuger	[91]
Asp256Gly	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger	[92]
Ile283Met + Lys526Arg	erhöhte Virulenz im Säuger	[93]
D309N	erhöhte Virulenz im Säuger	[28]
Lys389Arg	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger	[94]
T431M	erhöhte Virulenz im Säuger	[90]
Y448N	erhöhte Virulenz im Säuger	[90]
P453S	erhöhte Virulenz im Säuger	[90]
Ala588Val	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[95]
Gln591Arg/Lys	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[96]
Val598Thr/Ile	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[94]
Glu627Lys	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[92, 87]
Asp701Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[35]
<b>PA</b>		
S49Y + D347G	erhöhte Virulenz im Säuger	[88]
Thr85Ile	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger	[97]
Thr97Ile	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[98]
Lys142Asn	erhöhte Virulenz im Säuger	[87]
Ser224Pro + Asn383Asp	erhöhte Virulenz im Säuger	[99]
M311I	erhöhte Virulenz im Säuger	[100]
Leu336Met	erhöhte Virulenz im Säuger	[97]

A343S	erhöhte Virulenz im Säuger	[100]
Ile353Arg	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[101]
Lys356Arg	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[102]
Ser421Ile	erhöhte Virulenz im Säuger	[87]
<b>PA-X</b> 252 Aminosäurevariante <sup>11</sup>	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[103]
R195K	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[104]
K206R	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[104]
P210L	erhöhte Replikationseffizienz im Säuger; erhöhte Virulenz im Säuger	[104]

## Literatur

1. **Deshpande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG** (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. **Shelton H, Roberts KL, Molesti E, Temperton N, Barclay WS** (2013). Mutations in haemagglutinin that affect receptor binding and pH stability increase replication of a PR8 influenza virus with H5 HA in the upper respiratory tract of ferrets and may contribute to transmissibility. *J Gen Virol* **94**(Pt 6):1220–9.
3. **Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y** (2006). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**(7117):378–82.
4. **Liu Y, Li S, Sun H, Pan L, Cui X, Zhu X, Feng Y, Li M, Yu Y, Wu M, Lin J, Xu F, Yuan S, Huang S, Sun H, Liao M** (2020). Variation and Molecular Basis for Enhancement of Receptor Binding of H9N2 Avian Influenza Viruses in China Isolates. *Front Microbiol* **11**
5. **Wang W, Lu B, Zhou H, Suguitan AL, Cheng X, Subbarao K, Kemble G, Jin H** (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.
6. **Fan M, Liang B, Zhao Y, Zhang Y, Liu Q, Tian M, Zheng Y, Xia H, Suzuki Y, Chen H, Ping J** (2022). Mutations of 127, 183 and 212 residues on the HA globular head affect the antigenicity, replication and pathogenicity of H9N2 avian influenza virus. *Transbound Emerg Dis* **69**(4):e659–e670.
7. **Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, Sangma C, Suzuki Y, Ungchusak K, Louisirrotchanakul S, Lerdsamran H, Pooruk P, Thitithanyanont A, Pittayawonganon C, Guo**

<sup>11</sup> Vollängenvariante mit 191 Aminosäuren der PA-Domäne und 61 Aminosäuren der X-Domäne

- C-T, Hiramatsu H, Jampangern W, Chunsutthiwat S, Puthavathana P** (2007). An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol* **81**(18):9950–5.
8. **Ni F, Kondrashkina E, Wang Q** (2018). Determinant of receptor-preference switch in influenza hemagglutinin. *Virology* **513**:98–107.
  9. **Yang Z-Y, Wei C-J, Kong W-P, Wu L, Xu L, Smith DF, Nabel GJ** (2007). Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science* **317**(5839):825–8.
  10. **Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, Kawashita N, Mizuike R, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Takagi T, Suzuki Y, Ikuta K** (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):1-19.
  11. **Herfst S, Schrauwen EJA, Linster M, Chutinimitkul S, Wit E de, Munster VJ, Sorrell EM, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Fouchier RAM** (2012). Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* **336**(6088):1534–41.
  12. **Vries RP de, Zhu X, McBride R, Rigter A, Hanson A, Zhong G, Hatta M, Xu R, Yu W, Kawakami Y, Haan CAM de, Wilson IA, Paulson JC** (2014). Hemagglutinin receptor specificity and structural analyses of respiratory droplet-transmissible H5N1 viruses. *J Virol* **88**(1):768–73.
  13. **Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawakami Y** (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.
  14. **Linster M, van Boheemen S, Graaf M de, Schrauwen EJA, Lexmond P, Mänz B, Bestebroer TM, Baumann J, van Riel D, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Matrosovich M, Fouchier RAM, Herfst S** (2014). Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell* **157**(2):329–39.
  15. **Zhang J, Wang X, Chen Y, Ye H, Ding S, Zhang T, Liu Y, Li H, Huang L, Qi W, Liao M** (2023). Mutational antigenic landscape of prevailing H9N2 influenza virus hemagglutinin spectrum. *Cell Rep* **42**(11):1–17.
  16. **Xu N, Wang X, Cai M, Tang X, Yang W, Lu X, Liu X, Hu S, Gu M, Hu J, Gao R, Liu K, Chen Y, Liu X, Wang X** (2023). Mutations in HA and PA affect the transmissibility of H7N9 avian influenza virus in chickens. *Vet Microbiol* **287**:1–15.
  17. **Chutinimitkul S, van Riel D, Munster VJ, van den Brand JMA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Wit E de** (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.
  18. **Chen L-M, Blixt O, Stevens J, Lipatov AS, Davis CT, Collins BE, Cox NJ, Paulson JC, Donis RO** (2012). In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. *Virology* **422**(1):105–13.
  19. **Liu K, Guo Y, Zheng H, Ji Z, Cai M, Gao R, Zhang P, Liu X, Xu X, Wang X, Liu X** (2023). Enhanced pathogenicity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in mammals by hemagglutinin mutations combined with PB2-627K. *Virol Sin* **38**(1):47–55.
  20. **Jang S-G, Kim Y-i, Casel MAB, Choi JH, Gil JR, Rollon R, Kim E-H, Kim S-M, Ji HY, Park DB, Hwang J, Ahn J-W, Kim MH, Song M-S, Choi YK** (2024). HA N193D substitution in the HPAI H5N1 virus alters receptor binding affinity and enhances virulence in mammalian hosts. *Emerg Microbes Infect* **13**(1):1–20.
  21. **Otte A, Sauter M, Daxer MA, McHardy AC, Klingel K, Gabriel G** (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.
  22. **Otte A, Marriott AC, Dreier C, Dove B, Mooren K, Klingen TR, Sauter M, Thompson K-A, Bennett A, Klingel K, van Riel D, McHardy AC, Carroll MW, Gabriel G** (2016). Evolution of

2009 H1N1 influenza viruses during the pandemic correlates with increased viral pathogenicity and transmissibility in the ferret model. *Sci Rep* **6**:1–10.

23. **Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE** (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.
24. **Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC** (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**(1):17–23.
25. **Ma L, Zheng H, Ke X, Gui R, Yao Z, Xiong J, Chen Q** (2024). Mutual antagonism of mouse-adaptation mutations in HA and PA proteins on H9N2 virus replication. *Viol Sin* **39**(1):56–70.
26. **Tang J, Zou S-M, Zhou J-F, Gao R-B, Xin L, Zeng X-X, Huang W-J, Li X-Y, Cheng Y-H, Liu L-Q, Xiao N, Wang D-Y** (2024). R229I substitution from oseltamivir induction in HA1 region significantly increased the fitness of a H7N9 virus bearing NA 292K. *Emerg Microbes Infect* **13**(1):1–15.
27. **Xu G, Wang F, Li Q, Bing G, Xie S, Sun S, Bian Z, Sun H, Feng Y, Peng X, Jiang H, Zhu L, Fan X, Qin Y, Ding J** (2020). Mutations in PB2 and HA enhanced pathogenicity of H4N6 avian influenza virus in mice. *J Gen Virol* **101**(9):910–20.
28. **Hu J, Hu Z, Wei Y, Zhang M, Wang S, Tong Q, Sun H, Pu J, Liu J, Sun Y** (2022). Mutations in PB2 and HA are crucial for the increased virulence and transmissibility of H1N1 swine influenza virus in mammalian models. *Vet Microbiol* **265**:1–9.
29. **Perez DR, Donis RO** (2001). Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol* **75**(17):8127–36.
30. **He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z, Liu Y** (2008). Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**(7208):1123–6.
31. **Mänz B, Götz V, Wunderlich K, Eisel J, Kirchmair J, Stech J, Stech O, Chase G, Frank R, Schwemmler M** (2011). Disruption of the viral polymerase complex assembly as a novel approach to attenuate influenza A virus. *J Biol Chem* **286**(10):8414–24.
32. **Hickerson BT, Adams SE, Barman S, Miller L, Lugovtsev VY, Webby RJ, Ince WL, Donnelly RP, Ilyushina NA** (2022). Pleiotropic Effects of Influenza H1, H3, and B Baloxavir-Resistant Substitutions on Replication, Sensitivity to Baloxavir, and Interferon Expression. *Antimicrob Agents Chemother* **66**(4):1-18.
33. **Banerjee S, De A, Kedia N, Bhakta K, Wang L, Bhattacharjee B, Mondal A** (2022). The Species-Specific 282 Residue in the PB2 Subunit of the Polymerase Regulates RNA Synthesis and Replication of Influenza A Viruses Infecting Bat and Nonbat Hosts. *J Virol* **96**(5):1-21.
34. **Bogs J, Kalthoff D, Veits J, Pavlova S, Schwemmler M, Mänz B, Mettenleiter TC, Stech J** (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.
35. **Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K** (2005). Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* **79**(18):12058–64.
36. **Maier HJ, Kashiwagi T, Hara K, Brownlee GG** (2008). Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology* **370**(1):194–204.
37. **Cao M, Jia Q, Li J, Zhao L, Zhu L, Zhang Y, Li S, Deng T** (2024). Naturally occurring PAE206K point mutation in 2009 H1N1 pandemic influenza viruses impairs viral replication at high temperatures. *Viol Sin* **39**(1):71–80.
38. **Fodor E, Mingay LJ, Crow M, Deng T, Brownlee GG** (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.
39. **Lukarska M, Fournier G, Pflug A, Resa-Infante P, Reich S, Naffakh N, Cusack S** (2017). Structural basis of an essential interaction between influenza polymerase and Pol II CTD. *Nature* **541**(7635):117–21.

40. **Fan S, Deng G, Song J, Tian G, Suo Y, Jiang Y, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H** (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.
41. **Wang C, Qu R, Zong Y, Qin C, Liu L, Gao X, Sun H, Sun Y, Chang K-C, Zhang R, Liu J, Pu J** (2022). Enhanced stability of M1 protein mediated by a phospho-resistant mutation promotes the replication of prevailing avian influenza virus in mammals. *PLoS Pathog* **18**(7):1-28.
42. **Nao N, Kajihara M, Manzoor R, Maruyama J, Yoshida R, Muramatsu M, Miyamoto H, Igarashi M, Eguchi N, Sato M, Kondoh T, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Takada A** (2015). A Single Amino Acid in the M1 Protein Responsible for the Different Pathogenic Potentials of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains. *PLoS One* **10**(9):1-13.
43. **Brown EG, Bailly JE** (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.
44. **Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, Zhu J, Li Y, Zhang A, Yu Z, Ye Z, Chen H, Jin M** (2009). The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS ONE* **4**(7):1-8.
45. **Park S, Il Kim J, Lee I, Bae J-Y, Yoo K, Nam M, Kim J, Sook Park M, Song K-J, Song J-W, Kee S-H, Park M-S** (2017). Adaptive mutations of neuraminidase stalk truncation and deglycosylation confer enhanced pathogenicity of influenza A viruses. *Sci Rep* **7**(1):1–14.
46. **Kim W-J, Hur K-Y, Park HW, Lee S-W, Yoo J-Y** (2019). Pathogenicity of the H1N1 influenza virus enhanced by functional synergy between the NPV100I and NAD248N pair. *PLoS ONE* **14**(5):1-19.
47. **Zhang J, Wang X, Ding S, Ma K, Jiang Y, Guo Y, Zhang T, Liu Y, Li H, Liao M, Qi W** (2022). Key amino acid position 272 in neuraminidase determines the replication and virulence of H5N6 avian influenza virus in mammals. *iScience* **25**(12):1–22.
48. **Scheibner D, Salaheldin AH, Bagato O, Zaeck LM, Mostafa A, Blohm U, Müller C, Eweas AF, Franzke K, Karger A, Schäfer A, Gischke M, Hoffmann D, Lerolle S, Li X, Abd El-Hamid HS, Veits J, Breithaupt A, Boons G-J, Matrosovich M, Finke S, Pleschka S, Mettenleiter TC, Vries RP de, Abdelwhab EM** (2023). Phenotypic effects of mutations observed in the neuraminidase of human origin H5N1 influenza A viruses. *PLoS Pathog* **19**(2):1–32.
49. **Mänz B, Dornfeld D, Götz V, Zell R, Zimmermann P, Haller O, Kochs G, Schwemmler M** (2013). Pandemic influenza A viruses escape from restriction by human MxA through adaptive mutations in the nucleoprotein. *PLoS Pathog* **9**(3):1-16.
50. **Deeg CM, Hassan E, Mutz P, Rheinemann L, Götz V, Magar L, Schilling M, Kalfass C, Nürnberger C, Soubies S, Kochs G, Haller O, Schwemmler M, Staeheli P** (2017). In vivo evasion of MxA by avian influenza viruses requires human signature in the viral nucleoprotein. *J Exp Med* **214**(5):1239–48.
51. **Zhu W, Feng Z, Chen Y, Yang L, Liu J, Li X, Liu S, Zhou L, Wei H, Gao R, Wang D, Shu Y** (2019). Mammalian-adaptive mutation NP-Q357K in Eurasian H1N1 Swine Influenza viruses determines the virulence phenotype in mice. *Emerg Microbes Infect* **8**(1):989–99.
52. **Chen L, Wang C, Luo J, Li M, Liu H, Zhao N, Huang J, Zhu X, Ma G, Yuan G, He H** (2017). Amino Acid Substitution K470R in the Nucleoprotein Increases the Virulence of H5N1 Influenza A Virus in Mammals. *Front Microbiol* **8**:1308.
53. **Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H** (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.
54. **Kaewborisuth C, Kaplan B, Zanin M, Finkelstein D, Webby RJ, Lekcharoensuk P** (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.
55. **Long J-X, Peng D-X, Liu Y-L, Wu Y-T, Liu X-F** (2008). Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes* **36**(3):471–8.

56. **Seo SH, Hoffmann E, Webster RG** (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**(9):950–4.
57. **Spesock A, Malur M, Hossain MJ, Chen L-M, Njaa BL, Davis CT, Lipatov AS, York IA, Krug RM, Donis RO** (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.
58. **Wang S, Zhang L, Zhang R, Chi X, Yang Z, Xie Y, Shu S, Liao Y, Chen J-L** (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):1–14.
59. **Blaurock C, Blohm U, Luttermann C, Holzerland J, Scheibner D, Schäfer A, Groseth A, Mettenleiter TC, Abdelwhab EM** (2021). The C-terminus of non-structural protein 1 (NS1) in H5N8 clade 2.3.4.4 avian influenza virus affects virus fitness in human cells and virulence in mice. *Emerg Microbes Infect* **10**(1):1760–76.
60. **Soubies SM, Volmer C, Croville G, Loupias J, Peralta B, Costes P, Lacroux C, Guérin J-L, Volmer R** (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.
61. **Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA** (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.
62. **Ison MG** (2011). Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr Opin Virol* **1**(6):563–73.
63. **Astrahan P, Arkin IT** (2011). Resistance characteristics of influenza to amino-adamantyls. *Biochim Biophys Acta* **1808**(2):547–53.
64. **Tamura D, Nguyen HT, Sleeman K, Levine M, Mishin VP, Yang H, Guo Z, Okomo-Adhiambo M, Xu X, Stevens J, Gubareva LV** (2013). Cell culture-selected substitutions in influenza A(H3N2) neuraminidase affect drug susceptibility assessment. *Antimicrob Agents Chemother* **57**(12):6141–6.
65. **McKimm-Breschkin JL** (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses* **7 Suppl 1**:25–36.
66. **Boltz DA, Douangneun B, Phommachanh P, Sinthasak S, Mondry R, Obert C, Seiler P, Keating R, Suzuki Y, Hiramatsu H, Govorkova EA, Webster RG** (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.
67. **Ilyushina NA, Seiler JP, Rehg JE, Webster RG, Govorkova EA** (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):1-11.
68. **Gubareva LV, Sleeman K, Guo Z, Yang H, Hodges E, Davis CT, Baranovich T, Stevens J** (2017). Drug Susceptibility Evaluation of an Influenza A(H7N9) Virus by Analyzing Recombinant Neuraminidase Proteins. *J Infect Dis* **216**(4):S566-S574.
69. **L'Huillier AG, Abed Y, Petty TJ, Cordey S, Thomas Y, Bouhy X, Schibler M, Simon A, Chalandon Y, van Delden C, Zdobnov E, Boquete-Suter P, Boivin G, Kaiser L** (2015). E119D Neuraminidase Mutation Conferring Pan-Resistance to Neuraminidase Inhibitors in an A(H1N1)pdm09 Isolate From a Stem-Cell Transplant Recipient. *J Infect Dis* **212**(11):1726–34.
70. **Meijer A, Rebelo-de-Andrade H, Correia V, Besselaar T, Drager-Dayal R, Fry A, Gregory V, Gubareva L, Kageyama T, Lackenby A, Lo J, Odagiri T, Pereyaslov D, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Wang D, Wong S, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC** (2014). Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Res* **110**:31–41.
71. **Hurt AC, Lowther S, Middleton D, Barr IG** (2010). Assessing the development of oseltamivir and zanamivir resistance in A(H5N1) influenza viruses using a ferret model. *Antiviral Res* **87**(3):361–6.

72. **Yen H-L, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA** (2006). Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol* **80**(17):8787–95.
73. **Ilyushina NA, Bovin NV, Webster RG** (2012). Decreased neuraminidase activity is important for the adaptation of H5N1 influenza virus to human airway epithelium. *J Virol* **86**(9):4724–33.
74. **Ghedin E, Laplante J, DePasse J, Wentworth DE, Santos RP, Lepow ML, Porter J, Stellrecht K, Lin X, Operario D, Griesemer S, Fitch A, Halpin RA, Stockwell TB, Spiro DJ, Holmes EC, St George K** (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.
75. **Pizzorno A, Bouhy X, Abed Y, Boivin G** (2011). Generation and characterization of recombinant pandemic influenza A(H1N1) viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *J Infect Dis* **203**(1):25–31.
76. **Lloren KKS, Kwon JJ, Choi W-S, Jeong JH, Ahn SJ, Choi YK, Baek YH, Song M-S** (2019). In Vitro and In Vivo Characterization of Novel Neuraminidase Substitutions in Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Identified Using Laninamivir-Mediated In Vitro Selection. *J Virol* **93**(6):1–14.
77. **Govorkova EA, Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Presser LD, Patel MC, Huang W, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Rattigan A, Brown SK, Samaan M, Subbarao K, Wong S, Wang D, Webby RJ, Yen H-L, Zhang W, Meijer A, Gubareva LV** (2022). Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018-2020. *Antiviral Res* **200**:1–29.
78. **Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, Noshi T, Yamaguchi H, Kawai M, Kawaguchi K, Uehara T, Shishido T, Naito A, Cusack S** (2018). Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep* **8**(1):1–15.
79. **Chesnokov A, Patel MC, Mishin VP, De La Cruz, Juan A, Lollis L, Nguyen HT, Dugan V, Wentworth DE, Gubareva LV** (2020). Replicative Fitness of Seasonal Influenza A Viruses With Decreased Susceptibility to Baloxavir. *J Infect Dis* **221**(3):367–71.
80. **Kiso M, Yamayoshi S, Kawaoka Y** (2023). Efficacy of favipiravir against influenza virus resistant to both baloxavir and neuraminidase inhibitors. *J Antimicrob Chemother* **78**(7):1649–57.
81. **Lee LY, Zhou J, Koszalka P, Frise R, Farrukee R, Baba K, Miah S, Shishido T, Galiano M, Hashimoto T, Omoto S, Uehara T, Mifsud EJ, Collinson N, Kuhlbusch K, Clinch B, Wildum S, Barclay WS, Hurt AC** (2021). Evaluating the fitness of PA/I38T-substituted influenza A viruses with reduced baloxavir susceptibility in a competitive mixtures ferret model. *PLoS Pathog* **17**(5):1-24.
82. **Takizawa N, Momose F** (2022). A novel E198K substitution in the PA gene of influenza A virus with reduced susceptibility to baloxavir acid. *Arch Virol* **167**(7):1565–70.
83. **Atim G, Tugume T, Ukuli QA, Erima B, Mubiru A, Kibuuka H, Mworozzi E, McKenzie P, Turner JCM, Walker D, Jeevan T, Webster RG, Jones J, Webby RJ, Ducatez MF, Wabwire-Mangen F, Byarugaba DK** (2022). Genetic Evolution of Avian Influenza A (H9N2) Viruses Isolated from Domestic Poultry in Uganda Reveals Evidence of Mammalian Host Adaptation, Increased Virulence and Reduced Sensitivity to Baloxavir. *Viruses* **14**(9):1–22.
84. **Feng X, Wang Z, Shi J, Deng G, Kong H, Tao S, Li C, Liu L, Guan Y, Chen H** (2016). Glycine at Position 622 in PB1 Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Virus in Mice. *J Virol* **90**(4):1872–9.
85. **Choi W-S, Baek YH, Kwon JJ, Jeong JH, Park S-J, Kim Y-i, Yoon S-W, Hwang J, Kim MH, Kim C-J, Webby RJ, Choi YK, Song M-S** (2017). Rapid acquisition of polymorphic virulence markers during adaptation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in the mouse. *Sci Rep* **7**:1–13.
86. **Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P** (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.

87. **Kim JH, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y** (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.
88. **Guo Y, Bai X, Liu Z, Liang B, Zheng Y, Dankar S, Ping J** (2023). Exploring the alternative virulence determinants PB2 S155N and PA S49Y/D347G that promote mammalian adaptation of the H9N2 avian influenza virus in mice. *Vet Res* **54**(1):1–17.
89. **Zhou B, Li Y, Halpin R, Hine E, Spiro DJ, Wentworth DE** (2011). PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza viruses in mice. *J Virol* **85**(1):357–65.
90. **Xu C, Xu B, Wu Y, Yang S, Jia Y, Liang W, Yang D, He L, Zhu W, Chen Y, Yang H, Yu B, Wang D, Qiao C** (2020). A Single Amino Acid at Position 431 of the PB2 Protein Determines the Virulence of H1N1 Swine Influenza Viruses in Mice. *J Virol* **94**(8):1-18.
91. **Cai M, Zhong R, Qin C, Yu Z, Wen X, Xian J, Chen Y, Cai Y, Yi H, Gong L, Zhang G** (2020). The R251K Substitution in Viral Protein PB2 Increases Viral Replication and Pathogenicity of Eurasian Avian-like H1N1 Swine Influenza Viruses. *Viruses* **12**(1):1–13.
92. **Manzoor R, Sakoda Y, Nomura N, Tsuda Y, Ozaki H, Okamatsu M, Kida H** (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.
93. **Wang X, Chen S, Wang D, Zha X, Zheng S, Qin T, Ma W, Peng D, Liu X** (2017). Synergistic effect of PB2 283M and 526R contributes to enhanced virulence of H5N8 influenza viruses in mice. *Vet Res* **48**(1):1–14.
94. **Hu M, Yuan S, Zhang K, Singh K, Ma Q, Zhou J, Chu H, Zheng B-J** (2017). PB2 substitutions V598T/I increase the virulence of H7N9 influenza A virus in mammals. *Virology* **501**:92–101.
95. **Xiao C, Ma W, Sun N, Huang L, Li Y, Zeng Z, Wen Y, Zhang Z, Li H, Li Q, Yu Y, Zheng Y, Liu S, Hu P, Zhang X, Ning Z, Qi W, Liao M** (2016). PB2-588 V promotes the mammalian adaptation of H10N8, H7N9 and H9N2 avian influenza viruses. *Sci Rep* **6**:19474.
96. **Yamada S, Hatta M, Staker BL, Watanabe S, Imai M, Shinya K, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Ozawa M, Watanabe T, Sakabe S, Li C, Kim JH, Myler PJ, Phan I, Raymond A, Smith E, Stacy R, Nidom CA, Lank SM, Wiseman RW, Bimber BN, O'Connor DH, Neumann G, Stewart LJ, Kawaoka Y** (2010). Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog* **6**(8):1-11.
97. **Bussey KA, Desmet EA, Mattiaccio JL, Hamilton A, Bradel-Tretheway B, Bussey HE, Kim B, Dewhurst S, Takimoto T** (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.
98. **Song M-S, Pascua PNQ, Lee JH, Baek YH, Lee O-J, Kim C-J, Kim H, Webby RJ, Webster RG, Choi YK** (2009). The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model. *J Virol* **83**(23):12325–35.
99. **Song J, Xu J, Shi J, Li Y, Chen H** (2015). Synergistic Effect of S224P and N383D Substitutions in the PA of H5N1 Avian Influenza Virus Contributes to Mammalian Adaptation. *Sci Rep* **5**:1–17.
100. **Guo Y, Sun T, Bai X, Liang B, Deng L, Zheng Y, Yu M, Li Y, Ping J** (2023). Comprehensive analysis of the key amino acid substitutions in the polymerase and NP of avian influenza virus that enhance polymerase activity and affect adaptation to mammalian hosts. *Vet Microbiol* **282**
101. **Hu J, Hu Z, Song Q, Gu M, Liu X, Wang X, Hu S, Chen C, Liu H, Liu W, Chen S, Peng D, Liu X** (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.
102. **Xu G, Zhang X, Gao W, Wang C, Wang J, Sun H, Sun Y, Guo L, Zhang R, Chang K-C, Liu J, Pu J** (2016). Prevailing PA Mutation K356R in Avian Influenza H9N2 Virus Increases Mammalian Replication and Pathogenicity. *J Virol* **90**(18):8105–14.

103. **Gao H, Sun H, Hu J, Qi L, Wang J, Xiong X, Wang Y, He Q, Lin Y, Kong W, Seng L-G, Pu J, Chang K-C, Liu X, Liu J, Sun Y** (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.
104. **Sun Y, Hu Z, Zhang X, Chen M, Wang Z, Xu G, Bi Y, Tong Q, Wang M, Sun H, Pu J, Iqbal M, Liu J** (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):1–20.