

Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie,
Pharmazie, Altensteinstr. 23a, 14195 Berlin

Das Präsidium
Rechtsamt der Freien Universität Berlin (RA)
Referat RA I 2
z.H. Frau Zmuda
Kaiserswerther Str. 16-18
14195 Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie,
Pharmazie
Institut für Chemie und Biochemie
- SupraFAB -

Dr. Katharina Achazi
Altensteinstr. 23a
14195 Berlin

Telefon +49 30 838-59145
Fax +49 30 838-53357
E-Mail katharina.achazi@fu-berlin.de
Internet www.fu-berlin.de

Bearb.-Zeichen
Bearbeiter/in

Berlin, 05.07.2002

Gen-Anlage 92/14

Betreiber: Freie Universität Berlin –Das Präsidium– (Körperschaft des öffentl. Rechts)
Standort: FB BIO/CH/PHA, Institut für Chemie & Biochemie, SupraFAB
Altensteinstr. 23a, 14195 Berlin
PL: Frau Dr. Katharina Achazi, Frau Dr. Stefanie Wedepohl, Herr Dr. Daniel
Lauster, Prof. Dr. Christian Freund, Dr. Dennis Nürnberg
BBS: Herr Dr. Bernhard Loll
AG Leiter: Herr Univ.-Prof. Dr. Rainer Haag

Anzeige weiterer gentechnischer Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 in der Gen-Anlage 92/14 (S2)

Sehr geehrte Frau Zmuda,

wie telefonisch besprochen, möchten wir weitere gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 in der Gen-Anlage 92/14 am Standort Altensteinstr. 23a (SupraFAB) anzeigen. Der Titel der Arbeit lautet „Bindungscharakterisierung und Infektionshemmungsstudien von Influenza A Viren (Reassortanten) zur Entwicklung von antiviralen Entryinhibitoren“.

Die Formblätter A, GA, GS, GE und GO sowie relevante Publikationen sind dieser Email angefügt und enthalten eine genauere Beschreibung der geplanten Arbeiten. Die Arbeiten werden unter der Verantwortung von Dr. Achazi und Dr. Lauster durchgeführt. Das Formblatt A geht Ihnen ebenfalls in doppelter Ausführung mit Originalunterschriften per Post zu.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Katharina Achazi
(PL Gen-Anlage 92/14)



Dr. Daniel Lauster
(PL Gen-Anlage 92/14)

**ANZEIGE, ANMELDUNG ODER ANTRAG AUF GENEHMIGUNG
NACH DEM GENTECHNIKGESETZ IN DEN
SICHERHEITSTUFEN 2 BIS 4**

1. Betreiber:

1.1 Name, Vorname:

Bei Institutionen: Bezeichnung; Name, Vorname der vertretungsberechtigten Person

Bei Gesellschaften: Firma, Rechtsform, Sitz der Gesellschaft, Name/n, Vorname/n des/der Geschäftsführer/s; ggf. Kopie des Handelsregisterauszugs beifügen.

Freie Universität Berlin - Das Präsidium - (Körperschaft des öffentlichen Rechts)

1.2 Anschrift, Telefon:

Kaiserswerther Str. 16-18, 14195 Berlin

1.2.1 Ansprechpartner/in für Rückfragen:

Name: RA I 2, Frau Zmuda

E-Mail: rechtsamt@fu-berlin.de

Tel.-Nr.: 030-838 73712

Fax-Nr.: 030-838 473702

1.3 Gebühren

Ist der Betreiber als gemeinnützig anerkannt?

Ja

Nein

Wenn **ja**, bitte Nachweis beifügen, sofern noch nicht vorliegend.

Wenn **nein**, Investitionskosten der Anlage angeben:

€ keine

Ist der Betreiber Eigentümer der genutzten Räume?

Ja

Nein

Ist der Betreiber Mieter der genutzten Räume?

Ja

Nein

2. Gentechnische Anlage

2.1 Bezeichnung der Anlage (Institut, Klinik, Abteilung, Arbeitsgruppe):

Gen-Anlage 92/14

FB Biologie, Chemie, Pharmazie, Institut für Chemie und Biochemie, SupraFAB
Forschungsbau, Sprecher des Forschungsgebäude SupraFAB (z.Zt. Rainer Haag,
Professor)

2.2 Standort der Anlage:

Gebäudebezeichnung: SupraFAB Forschungsbau

Straße, Haus-Nr.: Altensteinstr. 23 a

PLZ: 14195

Ort: Berlin

3. Anzeige / Anmeldung / Genehmigung einer gentechnischen Anlage / Arbeit

3.1 Gentechnische Anlage

- Errichtung / Betrieb einer gentechnischen Anlage
- Errichtung / Betrieb eines Teils einer gentechnischen Anlage
- Wesentliche Änderung der Lage, Beschaffenheit oder des Betriebs einer gentechnischen Anlage (siehe Punkt 3.3)
- Weitere gentechnische Arbeiten in einer höheren Sicherheitsstufe als die von der Anlagengenehmigung bzw. Anmeldung bisher umfassten gentechnischen Arbeiten (siehe Punkt 3.4)

S2	Anmeldung <input type="checkbox"/>	<i>optional:</i> Genehmigung <input type="checkbox"/>
S3	Genehmigung <input type="checkbox"/>	
S4	Genehmigung <input type="checkbox"/>	

Bitte Formblätter S, AL (und/oder AP, AG oder AT), GA, GS, GE, GV, GO, sowie M - soweit erforderlich¹ - beifügen.

3.2 Weitere gentechnische Arbeiten (siehe Punkt 3.4)

S2	Anzeige <input checked="" type="checkbox"/>	<i>optional:</i> Genehmigung <input type="checkbox"/>
S3	Genehmigung <input type="checkbox"/>	
S4	Genehmigung <input type="checkbox"/>	

Bitte Formblätter S, GA, GS, GE, GV, GO, sowie M - soweit erforderlich¹ - beifügen.

3.3 Bei wesentlichen Änderungen der Anlage zusätzlich:

3.3.1 Anmeldung oder Genehmigung der Anlage erfolgte bei:

Behörde:
 Aktenzeichen:
 Datum:

¹ Sofern die Sachkunde von Projektleiter bzw. BBS bereits in einem früheren Verfahren nach GenTG nachgewiesen wurde, ist die erneute Einreichung des Formblattes **S** entbehrlich. Für Arbeiten im Laborbereich bitte **AL** ausfüllen, für Arbeiten im Produktionsbereich (Arbeiten in weitgehend geschlossenen Systemen, Fermentern) bitte **AP** ausfüllen, für Arbeiten mit Tieren/im Tierhaltungsbereich bitte **AT** ausfüllen, für Arbeiten im Gewächshaus/Klimakammer bitte **AG** ausfüllen. Wurde für die Anlage bereits in einem früheren Verfahren ein Formblatt **AL**, **AP**, **AG** oder **AT** eingereicht, ist dessen erneute Einreichung für weitere gentechnische Arbeiten entbehrlich. Ist der Spender- bzw. Empfängerorganismus oder der Vektor in der Liste der Geschäftsstelle der ZKBS aufgeführt, ist die Einreichung des Formblattes **GS** bzw. **GE** oder **GV** entbehrlich. Formblatt **M** bitte nur bei gentechnischen Arbeiten mit humanpathogenen Organismen beifügen.

3.3.2 Beschreibung der beabsichtigten Änderung im Sinne von § 8 Abs. 4 GenTG:

3.4 Bei weiteren Arbeiten zusätzlich:

3.4.1 Anmeldung oder Genehmigung der Anlage erfolgte bei:

Behörde: Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
Aktenzeichen: Erstanmeldung: IC43 - 92/14; S2-Hochstufung: IV C 23 - 92/14-1
Datum: Erstanmeldung: 05.03.2014; S2-Hochstufung: 09.06.2022

3.4.2 Erklärung des Projektleiters/der Projektleiterin:

Genehmigungsverfahren: Haben sich die Angaben nach § 10 Abs. 2 S. 2 Nr. 1 bis 3 GenTG geändert? Ja Nein

Wenn ja, beschreiben Sie bitte die Änderungen:

Anzeigeverfahren: Haben sich die Angaben nach § 10 Abs. 2 S. 2 Nr. 1 bis 3 und 6 GenTG geändert? Ja Nein

Wenn ja, beschreiben Sie bitte die Änderungen:

Die Unterschrift des Projektleiters / der Projektleiterin auf vorliegendem Formblatt deckt die i. S. von § 10 Abs. 3 Satz 2 Nr. 2 GenTG (für Genehmigungsverfahren) bzw. § 12 Abs. 2a Satz 1 Nr. 2 GenTG (für Anzeigeverfahren) geforderte Erklärung ab.

3.4.3 Sind Änderungen der sicherheitsrelevanten Einrichtungen und Vorkehrungen vorgesehen? Ja Nein

Wenn ja, bitte beschreiben Sie diese:

3.4.4 Haben sich im Hinblick auf die Abfall- und Abwasserentsorgung Änderungen gegenüber den in einem früheren Verfahren (siehe Punkt 3.4.1) gemachten

Angaben zu den Sicherheitsmaßnahmen (Formblatt AL, AG, AT, AP) ergeben?

Ja Nein

Wenn **ja**, beantworten Sie bitte je nach Anlagenart in den entsprechenden Formblättern AL und/oder AP, AG oder AT die Fragen zur Abwasser- und Abfallbehandlung in „II. Spezielle Angaben“.

4. Projektleiter/in und Beauftragte/r für die Biologische Sicherheit (BBS)

4.1 Projektleiter/in:

Name: Achazi

Titel: Dr.

Vorname: Katharina

E-Mail: katharina.achazi@fu-berlin.de

Tel.-Nr.: 030-838 59145

Wurde die Sachkunde bereits nachgewiesen?

Ja Nein

Wenn **ja**:

Behörde (Bezeichnung, Bundesland): LAGeSo

Aktenzeichen: IC43-92/14

Datum: 05.03.2014

Wenn **nein**, Formblatt S und Nachweise beifügen.

Ist der/die Projektleiter/in betriebszugehörig?

Ja Nein

4.1.1 Ggf. weitere Projektleiter/innen für den von diesem Antrag umfassten Antragsgegenstand:

Name: Lauster

Titel: Dr.

Vorname: Daniel

E-Mail: daniel.lauster@fu-berlin.de

Tel.-Nr.: 030-838 66286

Wurde die Sachkunde bereits nachgewiesen?

Ja Nein

Wenn **ja**:

Behörde (Bezeichnung, Bundesland): LAGeSo

Aktenzeichen: IVC23-92/14

Datum: 19.05.2021

Wenn **nein**, Formblatt S und Nachweise beifügen.

Ist der/die Projektleiter/in betriebszugehörig?

Ja Nein

Wenn mehrere Projektleiter genannt werden, geben Sie bitte an, welche Aufgaben den einzelnen Projektleitern obliegen:

Dr. Lauster und Dr. Achazi betreuen das Porjekt beide, so dass eine Vertretung gegeben ist.

4.2 BBS:

Name: Loll

Titel: Dr.

Vorname: Bernhard

E-Mail: loll@chemie.fu-berlin.de

Wurde die Sachkunde bereits nachgewiesen? Ja Nein

Wenn ja:

Behörde (Bezeichnung, Bundesland): LAGeSo

Aktenzeichen: IC43-92/14

Datum: 05.03.2014

Wenn nein, Formblatt S und Nachweise beifügen.

Ist der/die BBS betriebszugehörig? Ja Nein

Wenn nein, bitte erklären, in welcher Weise eine sachgerechte Erfüllung der in § 31 GenTSV bezeichneten Aufgaben sichergestellt ist.

4.2.1 Ist ein Ausschuss für Biologische Sicherheit bestellt? Ja Nein

Wenn ja, welche Aufgaben obliegen dem in diesem Formblatt genannten BBS?

	Name	Ort, Datum	Unterschrift
Betreiber bzw. gesetzliche/r Vertreter des Betreibers	Freie Universität Berlin Das Präsidium Die Kanzlerin Andrea Güttner Stellvertreterin der Kanzlerin		
Projektleiter/in	Dr. Katharina Achazi	Berlin, 05.07.2022	
BBS	Dr. Bernhard Loll	Berlin, 05.07.2022	
weitere Projektleiter/innen	Dr. Daniel Lauster	Berlin, 05.07.2022	

Der Anzeige / Anmeldung bzw. dem Antrag auf Genehmigung ist ein Verzeichnis aller ausgefüllten Formblätter und sonstiger Unterlagen beizufügen.

ANGABEN ZU DEN VORGEGEHENEN GENTECHNISCHEN ARBEITEN

1. Titel:

Bindungscharakterisierung und Infektionshemmungsstudien von Influenza A Viren (Reassortanten) zur Entwicklung von antiviralen Entryinhibitoren

2. Beschreibung der vorgesehenen gentechnischen Arbeiten

(Zweck und Zielsetzung, Arbeitsschritte, maximal zu verwendendes Kulturvolumen; bitte Fließschemata beifügen, aus denen sich die Erzeugung der gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und die wesentlichen Arbeitsschritte der gentechnischen Arbeit entnehmen lassen)

Für Bindungs- und Inhibitionsstudien von Influenza A Viren sollen zwei bekannte, reassortierte Virusstämme verwendet werden:

1. X31: A/Aichi/2/68 (H3N2) natürlich reassortiert mit internen Segmenten von A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), Publikation: Kilbourne ED, Bull.Org.mon.Santé, 1969.
2. LP-H5N1: A/Teal/Germany/Wv632/2005 (LP H5N1; HA und NA Genen von LP A/Teal/Germany/Wv632/2005, rekombinant reassortiert mit A/WSN/1933 (H1N1)), Erzeugung aus 8-Plasmidsystem: E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, R.G. Webster, A Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 6108–13

Diese Viren werden nicht genetisch verändert, sollen aber für Infektionsstudien an Zelllinien (siehe Formblatt GE) oder humanen Primärzellen (negativ für HIV, HCV & HBV) zur Erprobung von Bindungshemmern verwendet werden. Des Weiteren werden die Viren in embryonierten Hühnereiern (nur X31) oder permissive Zelllinien (z.B. MDCK-II Zellen) vermehrt. Virusisolate werden in kleinen Portionen bei -80°C gelagert.

Ziel der Arbeiten ist die Bindungscharakterisierung an Zelloberflächen (Erythrocyten, Säugerzelllinien, Hühnerzelllinien oder humanen/-nicht humanen Primärzellen) im Bezug zur Spezifität von HA (Hämagglutinin) und NA (Neuraminidase) gegenüber verschiedener Rezeptoroberflächen. Dabei soll die Infektionskinetik (Bindung, Aufnahme, Replikation) in Gegenwart und Abwesenheit von Bindungsinhibitoren getestet werden. Aus diesen Arbeiten sollen neue antivirale Wirkstoffe, die die Infektion von Zellen hemmen, abgeleitet werden.

Arbeitsschritte:

1. Infektion von Säugerzelllinien oder embryonierten Hühnereiern (siehe Formblatt GE und GO) mit den Reassortanten X31 bzw. LP-H5N1 (siehe Formblatt GS) zur Gewinnung von Virusstocks (X31 und LP-H5N1)
2. Infektion von Zellen (siehe Formblatt GE und GO) mit X31 bzw. LP-H5N1 (siehe Formblatt GS) in Gegenwart/Abwesenheit von Bindungsinhibitoren

3. Eigene Risikobewertung und Einschätzung der Sicherheitsstufe

(differenziert nach verwendeten Spenderorganismen, zu übertragender DNA, Empfängerorganismen, Vektoren, biologischen Sicherheitsmaßnahmen und allen entstehenden GVO).

Für den Fall, dass Organismen/GVO oder Vektoren verwendet werden sollen, die in der Liste der Geschäftsstelle der ZKBS aufgeführt oder bereits durch die ZKBS eingestuft sind, bitte Organismen bzw. Vektoren lediglich bezeichnen und ggf. das Aktenzeichen der ZKBS-Einstufung angeben. In diesem Fall entfällt das Ausfüllen der entsprechenden Formblätter GS, GE oder GV.

Die oben genannten Influenza A Stämme sind laut TRBA 462 als FLUAV, LPAIV der Risikogruppe (RG) 2 zugeordnet. Von der ZKBS wurden diese Stämme nicht gesondert bewertet (AR Kennzeichnung). Es handelt sich jedoch um Reassortanten zweier Influenza-Stämme der RG 2 (siehe unten Publikationen oben), die über natürliche Reassortierung (X31) oder gentechnische Herstellung aus Plasmiden (LP-H5N1) erzeugt wurden. In beiden HA-Typen liegt eine monobasische Schnittstelle vor. Die Wildtypen sind daher als niedrig-pathogen eingestuft (RG 2).

HA aus A/Teal/Germany/Wv632/2005:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADF65091.1>

HA aus A/Aichi/2/68:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA24269.1>

Da das Influenzavirus eine Lipidhülle besitzt, ist es gegenüber lipidlöslicher Desinfektionsmittel sehr instabil. Die im Hygieneplan dieser gentechnischen Anlage vorgesehenen Desinfektionsmittel sind daher sehr effektiv. Eine natürliche Infektion erfolgt aerogen oder über Schmierinfektion, weswegen eine persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Brille, Handschuhe) und Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 oder wenn unvermeidbar nicht unter einer Sterilbank gearbeitet werden kann, eine FFP2 Atemschutzmaske verwendet werden muss (nur möglich bei Arbeiten mit geringen Virusmengen). Alle Arbeiten werden nur in der genannten gentechnischen Anlage durchgeführt. Abfälle und beendete Arbeiten (infizierte Zellen) werden über Autoklavieren inaktiviert. Infizierte Zellen (hier als GVO 1 deklariert) werden zu keiner Zeit gelagert. Dies ist auch nicht möglich, da die Zellen durch die Infektion zerstört werden (lytische Viren). Darüber hinaus können Influenzaviren ihr Genom (8-fach segmentiert, (-)ssRNA) nicht stabil ins Wirtszellgenom integrieren (nicht persistent). Die Sicherheitsanforderungen bei den Experimenten sind daher von den genannten Influenzaviren bestimmt, da die entstehenden GVOs (infizierte Zellen) nicht überlebensfähig sind.

Die Arbeiten mit diesen Reassortanten sollten aus den oben genannten Gründen unter der Sicherheitsstufe 2 stattfinden.

ANGABEN ZUM SPENDERORGANISMUS¹**CHARAKTERISIERUNG DES SPENDERORGANISMUS UND DER ZU ÜBERTRAGENDEN NUKLEINSÄUREN****1. Eigenschaften des Spenderorganismus****1.1 Vollständiger Name, taxonomischer Name**

Bei Mikroorganismen sowie Zellkulturen (i. S. von § 3 Nr. 1 und 2 GenTSV) Ursprung und Stammbezeichnung angeben; für Viren Genkarte - soweit bekannt - beifügen (Kopien **relevanter** Literaturauszüge beifügen):

Influenza A Virusreassortanten

a) LP-H5N1: A/Teal/Germany/Wv632/2005 (LP H5N1; HA und NA Genen von LP A/Teal/Germany/Wv632/2005, rekombinant reassortiert mit internen Segmenten (PB1, PB2, PA, NP, M1+M2, NS1+NEP) aus A/WSN/1933 (H1N1)), Literatur: Kilbourne ED, Bull.Org.mon.Santé, 1969.

b) X31: A/Aichi/2/68 (H3N2) natürlich reassortiert mit internen Segmenten (PB1, PB2, PA, NP, M1+M2, NS1+NEP) von A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), Literatur: Bogs J et al., PlosOne, 2010

1.2 Der Spenderorganismus ist eingestuft in die Risikogruppe1 2 3 4

– gemäß Einstufung in der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten²

– gemäß Einstufung der ZKBS in einer allgemeinen Stellungnahme

Bitte Titel und Datum der Stellungnahme angeben:

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten mit rekombinanten Influenza-A-Viren (Az. 45310.0113, 2019) Abschnitt 3.2.1 .

– gemäß Einstufung in den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (bitte spezifizieren)

TRBA 460 Einstufung von Pilzen

TRBA 462 Einstufung von Viren

TRBA 466 Einstufung von Bakterien

TRBA 464 Parasiten

TRBA 468 Zelllinien

¹ Bei Verwendung mehrerer Spenderorganismen ist jeweils ein gesondertes Formblatt GS auszufüllen.

Spenderorganismus ist derjenige Organismus, aus dem die Sequenzinformation ursprünglich stammt. Bei Verwendung von Spenderorganismen, die in der Liste der Geschäftsstelle der ZKBS genannt sind, entfällt das Ausfüllen eines Formblattes GS.

² Die Liste wird regelmäßig gemäß § 6 GenTSV vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Bundesanzeiger veröffentlicht.

- gemäß Eingruppierung / Zuordnung des Organismus durch Dritte (z. B. BG RCI, DSMZ, ATCC)
bitte spezifizieren:

- gemäß eigener Einstufung anh. der Kriterien aus Anlage 1 Nr. 1 GenTSV
Begründen Sie bitte die Einstufung in eine Risikogruppe und fügen Sie relevante Fachliteratur bei:

1.3 Ist eine pathogene, mutagene, toxische oder allergene Wirkung des Organismus für Menschen oder eine pathogene Wirkung für Tiere oder Pflanzen bekannt?

Ja Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben (z. B. verursachte Krankheiten, Pathogenitätsmechanismen, Virulenz; relevante Literatur beifügen):

Influenza A Viren verursachen Krankheiten bei Menschen, Schweinen, Pferden und Vögeln.

Übertragung über Schmierinfektion oder Aerosole. Infektion der oberen/unteren Atemwege möglich. Infektionen durch Influenza A Viren können eine Grippe auslösen. Die beiden Reassortanten können sich nur in Säugerzellen mit der spezifischen Rezeptorausstattung (X31: 2,6 Sialyllactosamine (häufig im Mensch), LP-H5N1: 2,3 Sialyllactosamine (sehr gering im Mensch) vermehren. Da das LP-H5N1 sehr schwach an humane Rezeptoren bindet, ist ein Infektionsrisiko von Menschen sehr gering. Literatur:

1. Klinische Symptomatik nach Influenza-Infektion. Robert Koch-Institut, 19. Januar 2018; abgerufen am 17. Juni 2019.

2. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C (August 2016). "Human Influenza Virus Infections". Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 37 (4): 487–500. doi:10.1055/s-0036-1584801.

Eine mutagene oder allergene Wirkung von Influenzaviren bei Mensch, Tier oder Pflanzen ist nicht bekannt.

1.4 Wird während der gentechnischen Arbeit mit dem Spender umgegangen?

Ja

Nein

1.5 Regelmäßige Überprüfung der Identität und Reinheit des benutzten Organismus

Angewendete Methoden:

Plaque assay, PCR, Hämagglutinationstest, Immunofärbung.

2. Eigenschaften der zu übertragenden Nukleinsäuren

2.1 Beschreibung der zu übertragenden Nukleinsäuren und ihres Informationsgehaltes

(z. B. Zytokingene, Strukturgene, Onkogene, Toxine; auch regulatorische Sequenzen angeben; **relevante** Literatur beifügen):

X31 Reassortierung:

Es handelt sich um ganze virale Influenza Genome, die in eukaryotische Zellen durch Infektion natürliche Reassortierung erzeugt und selektiert wurden (Kilbourne ED, Bull.Org.mon.Santé, 1969). Die Spenderorganismen waren: A/Aichi/2/68 (H3N2) für HA/NA natürlich reassortiert mit internen Segmenten (PB1, PB2, PA, NP, M1+M2, NS1+NEP) von A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). BEI Ressourcen betreut von ATCC: <https://www.beiresources.org/Catalog/animalviruses/NR-3483.aspx>

Das HA in X31 des Typs H3 (A/Aichi/2/68) besitzt eine monobasische Schnittstelle und hat eine Rezeptorspezifität gegenüber 2,6 Sialylactosamin. Siehe Gensequenz:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA24269.1>

LP-H5N1 Reassortierung:

Ursprüngliche Herstellung aus pHW2000 (siehe ZKBS-Datenbank) 8-Plasmidsystem (E. Hoffmann, . Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, R.G. Webster, A Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 6108–13) durch Transfektion von Säugerzellen und Erhalt von A/Teal/Germany/Wv632/2005 (LP H5N1; HA und NA Genen von LP A/Teal/Germany/Wv632/2005, rekombinant reassortiert mit internen Segmenten (PB1, PB2, PA, NP, M1+M2, NS1+NEP) aus A/WSN/1933 (H1N1)). Siehe auch Bogs J et al., PlosOne, 2010

Das HA in LP-H5N1 des Typs H5 (A/Teal/Germany/Wv532/2005) besitzt eine monobasische Schnittstelle und hat eine Rezeptorspezifität gegenüber 2,3 Sialylactosamin. Siehe Gensequenz:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADF65091.1>

2.2 Werden die zu übertragenden Nukleinsäuren aus einem GVO gewonnen?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte Beschreibung des GVO (vollständige systematische Bezeichnung, Stammbezeichnung, ggf. Stammsammlungsnummer angeben; in welchem Vektor liegt das Gen vor?):

siehe 2.1, es handelt sich um Reassortanten

Der GVO ist eingestuft in die Risikogruppe

1

2

3

4

– gemäß Einstufung in einer früheren Arbeit

Aktenzeichen:

Datum:

– gemäß eigener Einstufung anhand der Kriterien gemäß Anlage 1 Nr.2 GenTSV (bitte begründen)

2.3 Reinheits- und Charakterisierungsgrad der zu übertragenden Nukleinsäuren (z. B. genomisch, PCR-, gelgereinigtes oder synthetisches Fragment; molekulare Charakterisierung z.B. anhand von Sequenzdaten etc.)

PCR und anschließend gelgereinigtes Fragment, Mol. Charakterisierung anhand von Sequenzdaten PCR

2.4 Besitzen die zu übertragenden Nukleinsäuren bzw. die kodierten Produkte ein pathogenes, toxisches oder allergenes Potenzial?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte beschreiben:

Genomsegmentspender von X31 (siehe oben) stammen aus zwei natürlich reassortieren Wildypinfluenzaviren und sind ihrerseits als RG2 definiert. Die pHW2000 Plasmide zur Erzeugung der LP-H5N1 Reassortante besitzen kein pathogenes Potential. Die aus der Transfektion erzeugte Reassortante besitzt ein pathogenes Potential (siehe 1.3.)

Direkte toxische oder allergene Wirkungen sind nicht bekannt.

ANGABEN ZUM EMPFÄNGERORGANISMUS¹

I. CHARAKTERISIERUNG DES EMPFÄNGERORGANISMUS

1. Vollständiger Name, taxonomischer Name

Bei Mikroorganismen sowie Zellkulturen (i. S. von § 3 Nr. 1 und 2 GenTSV) Ursprung und Stammbezeichnung angeben; bei Viren Genkarte - soweit bekannt - beifügen; bei attenuierten Organismen Angaben zu den molekularen Grundlagen der Attenuierung, soweit bekannt (Kopien relevanter Literaturauszüge beifügen).

MDCK (ATCC® CCL-34): epitheliale Nierenzelllinie aus dem Hund
A549 (ATCC® CCL-185): menschliche Lungenepithelzelllinie
16HBE14o (Sigma Aldrich SCC150): humane bronchiale Epithelzellen.
Calu-3 (ATCC® HTB-55): menschliche Lungen-Adenokarzinom
BHK-21 (ATCC® CCL-10): Baby Hamster Nierenzellen
CHO-K1 (ATCC® CCL-61): Chinese Hamster Epithelzellen
293T [HEK 293T] (ATCC® CRL-3216): humane embryonale Nierenzellen,
Vero (ATCC® CCL-81): epitheliale Nierenzellen, Afrikanische grüne Meerkatze
Vero C1008 [Vero E6] (ATCC® CRL-1586): epitheliale Nierenzellen, Afrikanische Grüne Meerkatze
Hela (ATCC® CCL-2): humanes Cervixkarzinom

Embryonisierte Hühnereier (Gallus)

Primäre humane respiratorische Epithelzellen aus der Charité Berlin Biobank (getestet: frei von HIV, HCV & HBV)

2. Der Empfängerorganismus ist eingestuft in die Risikogruppe

1 2 3 4

- gemäß Einstufung in der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten²

- gemäß Einstufung der ZKBS in einer allgemeinen Stellungnahme

Bitte Titel und Datum der Stellungnahme angeben:

Stellungnahme der ZKBS zur Vermehrung von gentechnisch veränderten Viren der Risikogruppen 2-4 in eukaryonten Zellen und in Tieren Az. 6790-10-11 vom Januar 1993

ZKBS Stellungnahme (Az. 6790-10-03), Aktualisierung vom Dezember 2009, Stand Mai 2010: Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten

¹ Bei Verwendung mehrerer Empfängerorganismen bzw. bei Zellhybriden ist jeweils ein gesondertes Formblatt GE auszufüllen. Bei Verwendung von Empfängerorganismen, die in der Liste der Geschäftsstelle der ZKBS genannt sind, entfällt das Ausfüllen eines Formblattes GE.

² Die Liste wird regelmäßig gemäß § 6 GenTSV vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Bundesanzeiger veröffentlicht.

- gemäß Einstufung in den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (bitte spezifizieren)

TRBA 460 Einstufung von Pilzen
TRBA 462 Einstufung von Viren
TRBA 466 Einstufung von Bakterien
TRBA 464 Parasiten
TRBA 468 Zelllinien

- gemäß Eingruppierung / Zuordnung des Organismus durch Dritte (z. B. BG RCI, DSMZ, ATCC) bitte spezifizieren:

- gemäß eigener Einstufung anh. der Kriterien aus Anlage 1 Nr. 1 GenTSV
Begründen Sie bitte die Einstufung in eine Risikogruppe und fügen Sie **relevante** Fachliteratur bei.

3. Sind Empfängerorganismus und Spenderorganismus taxonomisch verwandt?

Ja Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben (z. B. Selbstklonierung):

4. Ist bekannt, ob der Empfängerorganismus Plasmide, Phagen oder Viren enthält, die für die Sicherheitseinstufung von Bedeutung sind?

Ja Nein

Wenn **ja**, bitte erläutern. Insbesondere nähere Angaben zu Art, Mobilisierbarkeit, Wirtsspezifität, Vorhandensein von Genen, die Resistenz bewirken:

5. **Ist bekannt, ob der Empfängerorganismus Organismen abgibt, die für die Sicherheitseinstufung von Bedeutung sind?**

Ja

Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben (insbesondere zu Art und Risikogruppe der abgegebenen Organismen):

6. **Ist der Empfängerorganismus bereits gentechnisch verändert?**

Ja

Nein

Wenn **ja**, für diesen Organismus ein Formblatt GO ausfüllen und dem Formblatt GE beiheften; ggf. Literatur beifügen.

293T (siehe ZKBS Zelliniendatenbank)

16HBE14o (siehe ZKBS Zelliniendatenbank)

7. **Regelmäßige Überprüfung der Identität und Reinheit des benutzten Organismus**

Angewendete Methoden:

Bezug von kommerziellen Quellen oder Zellbank der Charité. Phänotypische Charakterisierung per Mikroskop und maximale Passagierzahl von 20. Dann Vernichtung und Rückgriff auf Ausgangsstock.

II. **ANGABEN ZU MÖGLICHEN AUSWIRKUNGEN DES ORGANISMUS AUF MENSCH UND UMWELT**

Falls der Empfängerorganismus in einer der in Nr. I.2 aufgeführten Listen in Risikogruppe 1 eingestuft wurde, ist das Einreichen des Abschnitts II des Formblattes GE mit den Unterlagen entbehrlich.

1. Gesundheitliche Erwägungen

1.1 Ist eine pathogene, mutagene, toxische oder allergene Wirkung des Organismus für Menschen oder eine pathogene Wirkung für Tiere oder Pflanzen bekannt?

Ja

Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben (z. B. verursachte Krankheiten, Pathogenitätsmechanismen, Virulenz; ggf. Literatur beifügen):

Wenn **nein**, weiter bei Frage Nr. 2.2.

1.2 Wie wird der Organismus übertragen?

Durch:

- direkten oder indirekten Kontakt mit der verletzten oder unverletzten Haut oder Schleimhaut
- Aerosole und Staub über den Atemtrakt
- Wasser oder Lebensmittel über den Verdauungstrakt
- Biss, Stich oder Injektion, über die Keimbahn bei tierischen Überträgern (Überträger angeben)
- andere Möglichkeiten (z. B. diaplazentar, bitte ausführlich erläutern)

1.3 Besteht die Möglichkeit der Übertragung von Krankheitserregern durch den Organismus?

Ja

Nein

1.4 Ist die Mindestinfektionsdosis bei Applikation des Organismus bekannt?

Ja

Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

1.5 Sind Therapeutika, Impfstoffe und/oder andere wirksame Methoden zur Verhütung und Behandlung von Infektionen mit dem Organismus verfügbar?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

1.6 Bitte machen Sie Angaben zur Widerstandsfähigkeit des Organismus
(Überleben des Organismus bzw. Erhalt der Vermehrungs- und Infektionsfähigkeit unter relevanten Bedingungen)

2. Umwelterwägungen

2.1 Angaben zur epidemiologischen Situation

2.1.1 Wirtsbereich des Organismus:

2.1.2 Vorkommen und Verbreitung des Organismus:

2.1.3 Vorkommen (Nichtvorkommen) und Verbreitung von tierischen oder pflanzlichen Wirtsorganismen sowie Überträgern für den Organismus:

2.1.4 Rolle von lebenden Überträgern und Organismenreservoirs:

2.1.5 Ausmaß der natürlichen Resistenz bei Mensch und Tier gegen den Organismus:

2.1.6 Ausmaß der erworbenen Immunität (z. B. durch stille Feiung und Impfung):

2.1.7 Resistenz von Pflanzen (natürliche oder durch Züchtung bedingte):

2.2 Kann der Organismus seine Erbinformation auf einen anderen Organismus übertragen?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

2.3 Gibt es Wechselwirkungen zu anderen und Auswirkungen auf andere Organismen in der Umwelt (einschließlich voraussichtlicher konkurrierender oder symbiotischer Eigenschaften)?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben, wenn nein, bitte kurze Begründung:

2.4 Ist mit einer Beteiligung des Organismus an Umweltprozessen (wie Stickstofffixierung oder pH-Regelung) zu rechnen?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

2.5 Sind geeignete Bedingungen zur Besiedlung der Umwelt durch den Organismus zu erwarten?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben, wenn nein, bitte kurze Begründung:

2.6 Welche Informationen über reproduktive Zyklen des Empfängerorganismus, einschließlich der Fähigkeit, Überlebensstrukturen wie Samen, Sporen oder Sklerotien zu bilden, sind vorhanden?

2.7 Besitzt der Organismus sicherheitsrelevante physiologische und/oder genetische Merkmale?

(z. B. Identifizierungsmerkmale, Auxotrophien, Empfindlichkeit / Resistenz gegenüber Antibiotika, Defektmutationen)

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN ORGANISMUS (GVO)

Ähnliche GVO können in einem Formblatt GO zusammengefasst werden.

I. CHARAKTERISIERUNG DES GVO

1. Bezeichnung des GVO:

Mit reassortierten Influenzaviren infizierte Zellen (siehe Formblatt GE)

2. Beschreibung des GVO (ggf. Kopien **relevanter** Literaturauszüge, insbesondere von Primärliteratur, beifügen):

Etablierte Zelllinien (MDCK, A549, 16HBE14o, Calu-3, BHK-21, CHO-K1, Vero, Vero E6, Hela, Hühnerembryonen, Primärzellen: siehe Formblatt GE), die eine Replikation mit reassortierten Influenza A Viren (X31, LP-H5N1) ermöglichen: siehe Formblatt GE

Aus der Virusinfektion resultierenden GVO (Influenzaviren + Zielorganismen/-Zellen)

2.1 Angabe des Empfängerorganismus:

Immortalisierte Zelllinien, Primärzellen und embryonierte Hühnereier (siehe Formblatt GE) der RG 1.

2.2 Ausführliche Beschreibung der gentechnischen Veränderung einschließlich des Verfahrens zur Einführung des Vektors/Inserts in den Empfängerorganismus oder des Verfahrens, das zur Erzielung der betreffenden gentechnischen Veränderung angewandt wird:

Es werden nur transient gentechnisch veränderte Organismen erzeugt, da virale Genome aus Influenza A Viren nicht stabil in das Genom der Zielorganismen integriert werden. Die eukaryotischen Zielorganismen werden lediglich zur Replikation von Virusmaterial und Testung von antiviralen Substanzen verwendet und nach Ende des Experiments über Autoklavieren inaktiviert.

2.3 Angabe aller übertragenen Nukleinsäuren (einschließlich der Herkunft des genetischen Materials, ggf. Identität des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und deren Funktion:

Vollständige Virusgenome aus X31 und LP-H5N1 durch Infektion der Zielzellen.

LP-H5N1: A/Teal/Germany/Wv632/2005 (LP H5N1; HA und NA Genen von LP A/Teal/Germany/Wv632/2005, rekombinant reassortiert mit internen Segmenten (PB1, PB2, PA, NP, M1+M2, NS1+NEP) aus A/WSN/1933 (H1N1))

X31: A/Aichi/2/68 (H3N2) natürlich reassortiert mit internen Segmenten (PB1, PB2, PA, NP, M1+M2, NS1+NEP) aus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

2.4 Vorangegangene gentechnische Veränderung des Inserts:

Die viralen Genomsegmente der beiden beantragten Viren wurde nicht verändert. Es wurden lediglich Gensegmente ausgetauscht/reassortiert (siehe Bezeichnung 2.3).

2.5 Art und Herkunft ggf. verwendeter Vektoren:

Das X31-Virus wurde über natürliche Rekombination erzeugt und wurde in embryonierten Hühnereiern vermehrt. Bei dem Arbeitsmaterial handelt es sich um Allantoisflüssigkeit. Das LP-H5N1 wurde über ein rekombinantes 8-Plasmidsystem (siehe oben) erzeugt. Das geerntete Virus kann auf Säugerzellen direkt vermehrt werden. Siehe auch Formblatt GS zu X31 und LP-H5N1

2.6 Der GVO wird eingestuft in die Risikogruppe

1

2

3

4

2.7 Risikobewertung des GVO:

Wenn Sie unter Berücksichtigung der Kombination der verschiedenen Nukleinsäuren ein anderes Risikopotential des GVO als das des Empfängerorganismus erwarten, dann füllen Sie bitte auch **Abschnitt II** des Formblattes GO aus.

Die durch Influenzaviren infizierten Zellen stellen kein Risiko für Mensch, Tier und Pflanzen dar. Die Empfängerorganismen sind alle der Risikogruppe 1 zugeordnet und erhöhen die Risikogruppe der Zielorganismen nicht. Lediglich die neu entstehenden Influenzavirus(klone) aus infizierten Zellen definieren die Sicherheitsmaßnahmen (RG2-Erreger, BSL2/S2 Labor). Siehe die Beschreibungen in Formblatt GS bezüglich der Reassortanten.

2.8 Wie liegt die übertragene Nukleinsäure im GVO vor (episomal oder integriert, Angaben zur Lokalisierung der Veränderung im Genom und, wenn episomal

vorliegend, Angabe zur Genkopienzahl, Möglichkeit einer Aktivierung/Deaktivierung von Wirtsgenen durch die Einfügung)?

Episomal: Da die Spendergene aus den Influenzaviren nur transient in den Zellen vorliegen, kann über die Kopienzahl der einzelnen Gene nach Infektion keine Aussage gemacht werden.

2.9 Werden biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 7 und § 8 GenTSV angewendet?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte erläutern:

3. Angaben zur Stabilität der gentechnisch veränderten Merkmale des GVO (z. B. ist der Verlust der Merkmale sicherheitsrelevant?):

Mit den beschriebenen Reassortanten (siehe Formblatt GS) infizierte Säugerzellen sind nicht stabil sondern werden durch die Infektion lysiert bzw. werden nach Beendigung der Arbeit direkt vernichtet (autoklaviert). Die entstehenden Viren (in Formblatt GS beschriebene Reassortanten) sind selber genomstabil und werden nicht weiter verändert.

4. Beschreiben Sie bitte ausführlich die Ihnen verfügbaren Techniken zur Erfassung, Identifizierung und Überwachung des GVO:

Zur Identifizierung sind folgende Techniken verfügbar: PCR, Immunofluoreszenzfärbung sowie Elektronenmikroskopie. Abfälle werden direkt inaktiviert bzw. autoklaviert. Die Lagerung wird in einer Datenbank dokumentiert.

II. ANGABEN ZU MÖGLICHEN AUSWIRKUNGEN DES GVO AUF MENSCH UND UMWELT

1. Gesundheitliche Erwägungen

1.1 Ist eine pathogene, mutagene, toxische, allergene oder sensibilisierende Wirkung des GVO für Menschen oder eine pathogene Wirkung für Tiere oder Pflanzen zu erwarten?

Ja

Nein

Wenn nein, bitte kurze Begründung (danach weiter bei Frage Nr. 2.1):

Die transient mit Influenzaviren infizierten Zellen in Kultur stellen keine Gefahr für Mensch, Tiere oder Pflanzen dar. Allein die aus diesen Zellen freigesetzten Viren sind in dieser Hinsicht zu berücksichtigen (RG 2, siehe Formblatt GS).

Wenn ja, bitte nähere Angaben (z. B. verursachte Krankheiten, Pathogenitätsmechanismen, Virulenz; Wirtsbereich, Vergleich des GVO zum Spender- oder Emp-

fängerorganismus in bezug auf diese Eigenschaften; mögliche Änderung des Infektionsweges oder der Gewebsspezifität; ggf. **relevante** Literatur beifügen):

Siehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

1.2 Wie wird der GVO (möglicherweise) übertragen?

Durch:

- direkten oder indirekten Kontakt mit der verletzten oder unverletzten Haut oder Schleimhaut
- Aerosole und Staub über den Atemtrakt
- Wasser oder Lebensmittel über den Verdauungstrakt
- Biss, Stich oder Injektion, über die Keimbahn bei tierischen Überträgern (Überträger angeben)
- andere Möglichkeiten (z. B. diaplazentar, bitte ausführlich erläutern)

Siehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

1.3. Ist die Mindestinfektionsdosis bei Applikation des GVO bekannt?

Ja

Nein

Entfällt

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

sSiehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

1.4. Sind Therapeutika, Impfstoffe und/oder andere wirksame Methoden zur Verhütung und Behandlung von Infektionen mit dem Organismus verfügbar?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

Siehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

2. Umwelterwägungen

2.1 Kann der GVO seine Erbinformation auf einen anderen Organismus übertragen?

Ja

Nein

Wenn ja, bitte nähere Angaben:

sSiehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

- 2.2 Ist mit Wechselwirkungen zu anderen und Auswirkungen auf andere Organismen in der Umwelt (einschließlich voraussichtlicher konkurrierender oder symbiotischer Eigenschaften) im Falle einer unbeabsichtigten Verbreitung des GVO in der Umwelt zu rechnen?**

Ja Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung:

Siehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

- 2.3 Ist mit einer Beteiligung des GVO an Umweltprozessen (wie Stickstofffixierung oder pH-Regelung oder anderen biogeochemischen Prozessen) zu rechnen?**

Ja Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

Siehe Begründung II.1. Relevant sind einzig die freigesetzten Influenzaviren (siehe Formblatt GS)

- 2.4 Liegen geeignete Bedingungen zur Besiedlung der Umwelt durch den GVO vor?**

Ja Nein

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung:

Es handelt sich entweder um an Zellkulturbedingungen angepasste immortalisierte Zelllinien oder um primäre Zellkulturen, die außerhalb des Isolationsorganismus nur sehr begrenzt lebensfähig sind. Die embryonierten Hühnereier sind bei der Virusvermehrung stark beeinträchtigt und nicht überlebensfähig. Vor der Virusernte werden die Embryonen per einfrieren getötet.

- 2.5 Welche Informationen über reproduktive Zyklen des GVO, einschließlich der Fähigkeit, Überlebensstrukturen wie Samen, Sporen oder Sklerotien zu bilden, sind vorhanden?**

Reproduktion durch Zellteilung. Keine Ausbildung von Samen, Sporen oder Sklerotien

- 2.6 Welche sicherheitsrelevanten physiologischen und/oder genetischen Merkmale besitzt der GVO (z. B. Identifizierungsmerkmale, Auxotrophien, Empfindlichkeit / Resistenz gegenüber Antibiotika, Defektmutation)?**

keine sicherheitsrelevanten Merkmale

Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Carry Virulence Determinants beyond the Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site

Jessica Bogs¹, Jutta Veits¹, Sandra Gohrbandt¹, Jana Hundt¹, Olga Stech¹, Angele Breithaupt², Jens P. Teifke², Thomas C. Mettenleiter¹, Jürgen Stech^{1*}

1 Institute of Molecular Biology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany, **2** Institute of Infectology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany

Abstract

Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) originate from avirulent precursors but differ from all other influenza viruses by the presence of a polybasic cleavage site in their hemagglutinins (HA) of subtype H5 or H7. In this study, we investigated the ability of a low-pathogenic avian H5N1 strain to transform into an HPAIV. Using reverse genetics, we replaced the monobasic HA cleavage site of the low-pathogenic strain A/Teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1) (TG05) by a polybasic motif from an HPAIV (TG05_{poly}). To elucidate the virulence potential of all viral genes of HPAIV, we generated two reassortants carrying the HA from the HPAIV A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) (R65) plus the remaining genes from TG05 (TG05-HA_{R65}) or in reversed composition the mutated TG05 HA plus the R65 genes (R65-HA_{TG05poly}). In vitro, TG05_{poly} and both reassortants were able to replicate without the addition of trypsin, which is characteristic for HPAIV. Moreover, in contrast to avirulent TG05, the variants TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly} are pathogenic in chicken to an increasing degree. Whereas the HA cleavage site mutant TG05_{poly} led to temporary non-lethal disease in all animals, the reassortant TG05-HA_{R65} caused death in 3 of 10 animals. Furthermore, the reassortant R65-HA_{TG05poly} displayed the highest lethality as 8 of 10 chickens died, resembling “natural” HPAIV strains. Taken together, acquisition of a polybasic HA cleavage site is only one necessary step for evolution of low-pathogenic H5N1 strains into HPAIV. However, these low-pathogenic strains may already have cryptic virulence potential. Moreover, besides the polybasic cleavage site, the additional virulence determinants of H5N1 HPAIV are located within the HA itself and in other viral proteins.

Citation: Bogs J, Veits J, Gohrbandt S, Hundt J, Stech O, et al. (2010) Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Carry Virulence Determinants beyond the Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site. PLoS ONE 5(7): e11826. doi:10.1371/journal.pone.0011826

Editor: Linqi Zhang, Tsinghua University, China

Received: February 22, 2010; **Accepted:** July 5, 2010; **Published:** July 27, 2010

Copyright: © 2010 Bogs et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Forschungssofortprogramm Influenza of the German government (FSI 2.44) and European Commission [SSPE-CT-2006-44372 (Innflu)]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juergen.stech@fli.bund.de

Introduction

Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) are the causative agents of fowl plague [1,2] which causes devastating economic losses in gallinaceous poultry. In addition, several HPAIV strains are able to infect humans and, therefore, are considered as potential precursors for future influenza pandemics [3]. For infection, the envelope glycoprotein hemagglutinin (HA) precursor HA0 requires proteolytic cleavage by cellular proteases into the two subunits HA1 and HA2. Mammalian and low-pathogenic avian influenza A viruses (LPAIV) carry an HA cleavage site with a monobasic motif susceptible to trypsin-like proteases which confine viral replication to the respiratory or gastrointestinal tract. In contrast, HPAIV possess a polybasic HA cleavage site cleavable by furin [4,5], which is ubiquitous and thus supports systemic viral replication. This polybasic HA cleavage site is the prime virulence determinant of HPAIV [6,7,8] which originate from LPAIV precursors [4,9,10,11,12,13,14,15,16]. Acquisition of a furin recognition motif was shown to result from different events such as recombination of the HA gene with 28S ribosomal RNA [17] or with sequences encoding other viral

proteins like the nucleoprotein (NP) gene of an unrelated virus [15] or the HA and matrix protein genes (M) from the same virus [16]. An alternative proposed mechanism is polymerase slippage on template regions with stable secondary structures [13,14]. In mammalian influenza viruses, virulence determinants have been attributed to the HA [18,19,20,21,22], NA [18,23], NS1 [24, 25,26,27,28], NP and polymerase proteins [18,29,30,31,32, 33,34]. In HPAIV, beside the polybasic HA cleavage site, the caspase cleavage motif in the M2 protein and deletions within the NA stalk region were associated with increased virulence [35,36,37,38,39,40]. Furthermore, introduction of the NS gene from an H5N1 HPAIV into an H7N1 fowl plague strain rendered it virulent for mice [41]. Recently, we demonstrated that the acquisition of a polybasic cleavage site by an LPAIV H3N8 strain is not sufficient for immediate transformation into an HPAIV, and that additional virulence determinants other than the polybasic HA cleavage site are required [42]. However, it remained to be analyzed whether H5 or H7 LPAIV, which are considered HPAIV precursors, have to undergo further evolutionary changes prior to or after acquisition of a polybasic cleavage site. Therefore, we addressed in this study the question whether a polybasic

cleavage site engineered into the HA of an H5N1 LPAIV leads to immediate transformation into an HPAIV. To elucidate the virulence potential of all viral genes of H5N1 HPAIV in chicken further, we generated two H5N1 reassortants carrying an HPAIV HA plus the remaining LPAIV genes, or, in reversed composition, the LPAIV HA with engineered polybasic cleavage site plus the HPAIV genes.

Results

Generation of Recombinant Viruses

As parental strains we used a recent H5N1 LPAIV isolated in Germany in 2005, A/Teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1) [43] as well as the first HPAIV H5N1 isolate derived from the outbreak in wild swans on the island of Rügen in February 2006, A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) [44]. First, plasmid-based reverse genetics systems were established for both strains, resulting in the recombinant viruses TG05 (this study) and R65 [45], respectively. To introduce a polybasic HA cleavage site into TG05 (H5N1), we replaced its monobasic HA cleavage site with a polybasic motif from HPAIV A/Duck/Shanghai/13/01 (H5N1) by site-directed mutagenesis and used this plasmid for generation of the mutant TG05_{poly}. Considering possible structural constraints within the HA of the parental TG05, we also adapted the amino acids adjacent to the cleavage site to those from the HA of A/Duck/Shanghai/13/01 (H5N1) (Table 1). Furthermore, we rescued two reassortants carrying the HA from HPAIV R65 plus the remaining seven genes from TG05 (TG05-HA_{R65}), or, in reversed composition, the mutated TG05 HA plus the remaining R65 genes (R65-HA_{TG05poly}). Remarkably, we could not rescue a mutant of TG05 with the polybasic cleavage site region from R65 suggesting structural impairments of the mutated HA.

TG05_{poly} has in-vitro properties of an HPAIV

To address the question whether the HA cleavage site mutant and the two reassortants are dependent on trypsin for multicycle replication, we performed plaque assays. Whereas the parental TG05 required exogenous trypsin for plaque formation, all the viruses with a polybasic HA cleavage site, TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly}, yielded plaques independent of trypsin (Fig. 1). Proteolytic HA cleavage was analyzed by immunoblotting. Corresponding to plaque assays, the HA0 precursor of TG05 remained uncleaved in the absence of trypsin in contrast to HA0 of TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly} (Fig. 2), which were cleaved into the HA1 and HA2 fragments. The HA0 cleavage was incomplete in all viruses studied. Multicycle growth kinetics of TG05 showed a strong dependence on exogenous trypsin as the virus failed to replicate efficiently in the absence of trypsin. TG05_{poly} replicated both in the presence and in the absence of trypsin, although with a delay compared with the other viruses. However, both reassortant viruses TG05-HA_{R65} and R65-HA_{TG05poly} replicated to high titers

irrespective of trypsin (Fig. 3). In summary, these results demonstrate that TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly} undergo multicycle replication in the absence of trypsin in contrast to their parent virus TG05 and, thus, display HPAIV phenotypes in-vitro.

Pathogenicity in chicken

To investigate the virulence of TG05, TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly} in chicken, 10 animals each were infected with 10⁵ pfu of the respective virus oculonasally, and observed daily for clinical symptoms for 10 days (Table 2 and Fig. 4). In contrast to the low-pathogenic parental virus TG05 which proved to be completely innocuous as expected, the HA cleavage site mutant TG05_{poly} and the two reassortants TG05-HA_{R65} and R65-HA_{TG05poly} were pathogenic in chicken to an increasing degree. Infection with TG05_{poly} led to temporary non-lethal disease in all animals (predominantly mild symptoms such as ruffled feathers, depression or diarrhea mainly from day 3 to 6). After inoculation with TG05-HA_{R65} 3 of 10 animals died, whereas R65-HA_{TG05poly} displayed the highest lethality as 8 of 10 infected chickens died, thus exhibiting the phenotype of a natural HPAIV (Table 2).

Organ tropism and tissue lesions in chicken

On day 4 post inoculation, samples from cerebellum, cerebrum, lung, nose, trachea, caecum, duodenum, kidney, and pancreas from three (TG05, TG05_{poly} and TG05-HA_{R65}) and four (R65-HA_{TG05poly}) additionally infected birds per group were removed and investigated for viral spread in organs and the extent of lesions in affected tissues. No influenza virus antigen or histomorphological lesions were found in organs of TG05 infected birds. In one of the three TG05_{poly}-inoculated birds, single positive neurons, pneumocytes II, endothelial cells, lymphocytes, and macrophages could be detected in cerebrum, lung, nasal conchae, trachea, caecum, and duodenum. Furthermore, in one TG05-HA_{R65}-infected bird, small clusters of infected cells were present in cerebellum and cerebrum suggesting that already the introduction of the R65 HA facilitates neurotropism.

All four R65-HA_{TG05poly}-infected birds exhibited larger and more intensely stained clusters of infected cells within cerebellum, cerebrum, and nasal mucosae; several birds displayed single positive cells in lung, trachea, caecum, duodenum, kidney, and pancreas. After infection with the recombinant HPAIV R65 [45], the picture of infected cells appeared more intense (Table 3, Fig. 5). These results demonstrate a broader organ tropism of R65-HA_{TG05poly}-inoculated birds compared with TG05_{poly}-inoculated birds demonstrating the relevance of the other viral genes for systemic spread.

On day 10 post inoculation, organs were removed from four surviving birds each of the TG05, TG05_{poly} and TG05-HA_{R65}-infected groups. No antigen was detectable in tissues of these birds, except for a few positive neurons and glial cells in the cerebellum from one TG05-HA_{R65}-infected bird, and in the cerebrum from

Table 1. Generated viruses and their HA cleavage sites.

Abbreviation	Description	HA Cleavage Site
TG05	A/Teal/Germany/Wv632/05 (H5N1) recombinant, monobasic cleavage site	GPRNVPQKET - - - R/G
TG05 _{poly}	Recombinant TG05 with polybasic cleavage site from A/Duck/Shanghai/13/01 (H5N1)	GLRNTPQRRRRKKR/G
TG05-HA _{R65}	Reassortant from TG05 with HA gene from A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1)	GLRNSPQGERRRKKR/G
R65-HA _{TG05poly}	Reassortant from R65 with HA gene from TG05 _{poly}	GLRNTPQRRRRKKR/G

doi:10.1371/journal.pone.0011826.t001

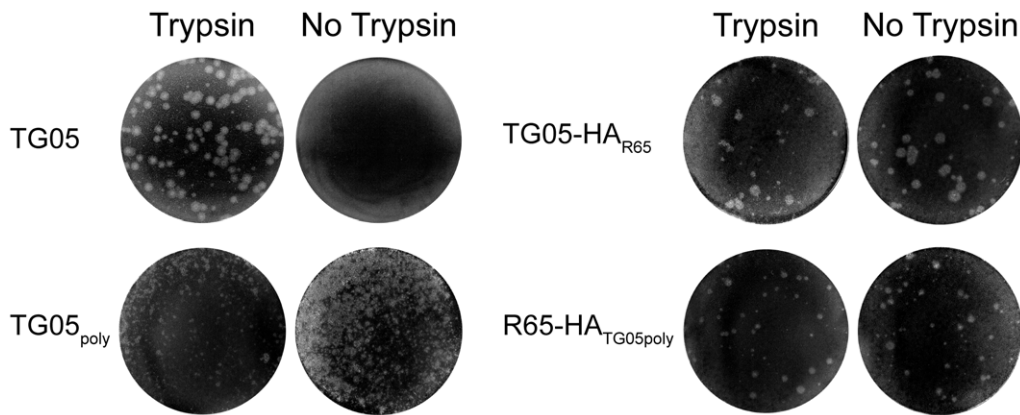


Figure 1. Multicycle replication in-vitro. Plaque assays of TG05 in comparison with TG05_{poly}, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly} on MDCK cells in the presence and in the absence of trypsin. doi:10.1371/journal.pone.0011826.g001

two surviving R65-HA_{TG05poly}-infected animals, as well as inflammatory cells in the nasal mucosa from one of those birds, demonstrating the recovery of the animals (Table S1).

Taken together, the presence of influenza virus antigen corresponded to degeneration and necrosis of the affected tissues accompanied by lymphocytic and histiocytic infiltration. Extent of organ tropism and severity of lesions corroborate with the course of disease. In HPAIV, viral neurotropism can be facilitated by the HA gene solely and systemic spread is mediated also by the internal protein genes.

Discussion

Influenza virus virulence is a polygenic trait which had been established by generating reassortants neurovirulent for mice from two apathogenic strains, and reassortants apathogenic in chicken from two virulent strains [46,47]. Furthermore, reassortment studies based on two H5N1 HPAIV strains revealed that the exchange of the HA, NP, M2 or NS1 proteins resulted in increased mortalities and expanded tissue tropism in chicken. Moreover, replacement of the PB2 or PB1 proteins led to decreased replication in tissues and, consequently, a decrease in

virulence [48]. These findings can be attributed to involvement of these proteins in virulence or to constraints of gene segment exchanges by reassortment in HPAIV. However, the prime determinant of virulence is the polybasic HA cleavage site [6,7,8] as its conversion into a monobasic motif invariably resulted in loss of virulence [7]. On the other hand, introduction of such a polybasic motif into the HA cleavage site of a low-pathogenic H3N8 strain did not lead to transformation into an HPAIV indicating the existence of additional virulence determinants in the HA and/or the other viral proteins [42].

To shed more light on virulence determinants required for evolution of HPAIV which, in nature, derive from low-pathogenic precursors of subtypes H5 or H7 [4,9,10,11,12,13,14,15,16], we addressed the question whether a low-pathogenic avian strain of the H5N1 subtype would transform into a highly pathogenic strain after introduction of a polybasic HA cleavage site. For that purpose, we replaced the monobasic HA cleavage site from TG05 by a polybasic motif from the HPAIV A/Duck/Shanghai/13/01 (H5N1) resulting in the mutant TG05_{poly}. Remarkably, attempts to obtain a similar mutant with the HA cleavage site of HPAIV R65 were not successful indicating structural incompatibilities with the TG05 HA.

Although TG05_{poly} was able to replicate in the absence of trypsin in cell-culture, and, thus, exhibits the in-vitro phenotype of

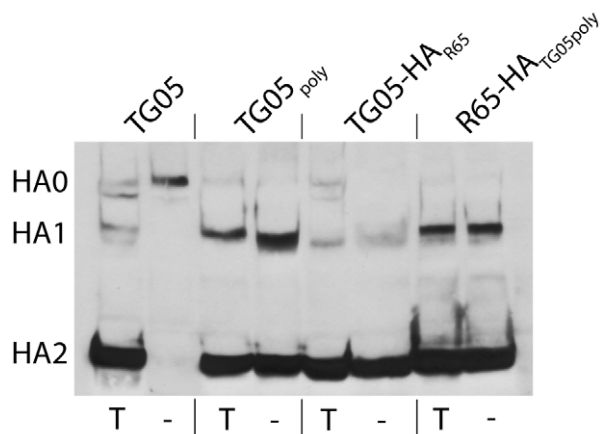


Figure 2. Proteolytic HA activation. Western blots of DF-1 cell lysates infected with TG05, TG05_{poly}, TG05-HA_{R65} or R65-HA_{TG05poly} at multiplicity of infection of 0.1 incubated in the presence (T) and in the absence (-) of trypsin. doi:10.1371/journal.pone.0011826.g002

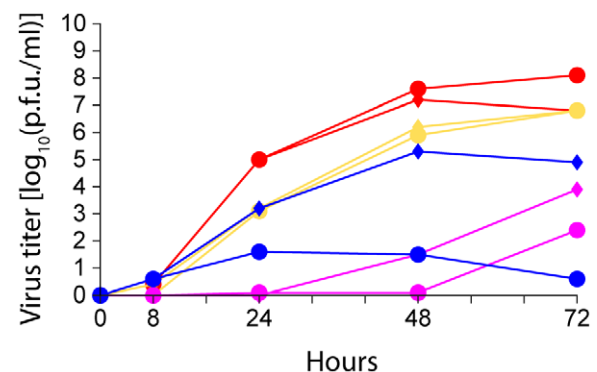


Figure 3. Growth kinetics. DF-1 cells were inoculated with TG05 (blue), TG05_{poly} (magenta), TG05-HA_{R65} (yellow), and R65-HA_{TG05poly} (red) at multiplicity of infection 10⁻³ in the presence (diamonds) and in the absence (circles) of trypsin. doi:10.1371/journal.pone.0011826.g003

Table 2. Virulence in chickens.

Virus	Clinical Score	Morbidity	Mortality
TG05	0.0	0/10	0/10
TG05 _{poly}	0.5	10/10	0/10
TG05-HA _{R65}	0.9	8/10	3/10
R65-HA _{TG05poly}	2.1	10/10	8/10

Clinical score, morbidity, and mortality after 10 days observation following oculonasal infection.

doi:10.1371/journal.pone.0011826.t002

an HPAIV, this mutant caused only temporary mild disease in chicken and, accordingly, could be detected only in isolated single cells accompanied with minor lesions in affected organs. These observations differ from those obtained by the H3N8 polybasic cleavage site mutants generated from the LPAIV A/Duck/Ukraine/1/1963 which caused considerably less symptoms in chicken [42] compared with TG05_{poly} indicating that the low-pathogenic H5N1 strain already carried cryptic virulence determinants. Correspondingly, repeated air sac inoculation of a low-pathogenic H5N3 isolate in 1-day-old-chickens did not lead to high virulence for 4-to-6-week-old chickens, whereas only two further passages in brain yielded an HPAIV [49].

To demonstrate the existence of virulence determinants besides the polybasic cleavage site in the HA or in other genes of H5N1 HPAIV, we generated two reassortants, TG05-HA_{R65} carrying the HA from the HPAIV R65 plus the remaining seven genes from TG05 and, in reverse gene constellation, R65-HA_{TG05poly} composed of the mutated TG05 HA plus the other R65 genes. Whereas TG05-HA_{R65} already had a lethality of 30%, R65-HA_{TG05poly} caused a lethality of 80%, displaying the phenotype of a “natural” HPAIV. These findings indicate that in H5N1 HPAIV the HA gene alone provides for a certain level of virulence, whereas the complete viral genetic background influences pathogenicity to a major extent.

Compared with the very broad organ tropism of the HPAIV R65 in chicken [50], the mutant TG05_{poly} and the two reassortants TG05-HA_{R65} and R65-HA_{TG05poly} displayed generally less viral spread in organs and less extensive lesions in

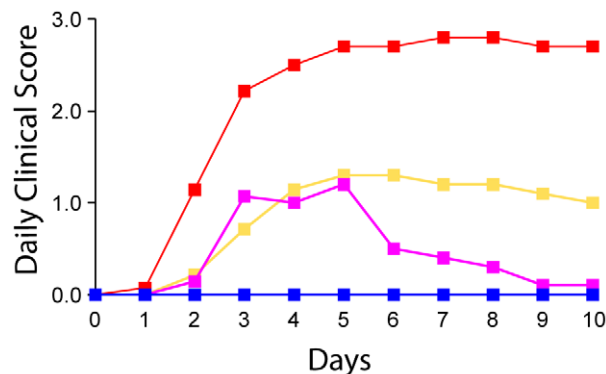


Figure 4. Virulence in chicken. Daily clinical score after oculonasal inoculation with 10^5 pfu of TG05 (blue), TG05_{poly} (magenta), TG05-HA_{R65} (yellow) or R65-HA_{TG05poly} (red). The birds were observed for 10 days for clinical signs and classified as healthy (0), ill (1), severely ill (2), or dead (3); the daily clinical score was calculated from the sum of individual clinical scores from all birds divided by the number of animals per group (10 chickens).

doi:10.1371/journal.pone.0011826.g004

surrounding tissues. However, spread and lesions increased with the two reassortants from which R65-HA_{TG05poly} exhibited the phenotype of an authentic HPAIV. This finding again emphasizes the relevance of HA and the other viral genes for virulence. Moreover, all birds which had viral antigen detectable in inner organs, i.e. those infected by TG05_{poly}, TG05-HA_{R65} or R65-HA_{TG05poly} also exhibited a neuronal infection. Thus, the presence of the HPAIV R65 HA alone in a LPAIV background suffices for viral neurotropism which is considered pivotal for the fatal course of fowl plague [51,52,53].

Previous studies on HPAIV strains revealed that (1) removal of the polybasic HA cleavage site results in a drastic decrease in pathogenicity [7]; (2) virulence is a multigenic trait as reassortants derived from HPAI strains can be attenuated [46], two LPAI strains can reassort to a highly virulent virus [47] and reassortants with exchanged HA, NP, M or NS, PB2 or PB1 gene have an altered virulence [48]; (3) NA stalk deletion leads to a certain increase in virulence in an LPAIV [40]; and (4) NS1 can increase virulence of an HPAIV further [41]. Most of these studies started from HPAIV and measured a decline in pathogenicity, which demonstrates that the identified alterations were required for full expression of virulence, or resulted from reassortment events which are prone to incompatibilities. No study so far addressed the question whether acquisition of a polybasic cleavage site is sufficient to transform a LPAIV H5 precursor into a highly pathogenic H5 virus. However, knowledge on this problem is most relevant, since it is required for development of a science-based assessment of the risk of HPAIV emergence from LPAIV field strains. Therefore, we introduced a polybasic HA cleavage site into the low-pathogenic H5N1 strain TG05, a potential HPAI precursor virus, in order to model the early evolution of HPAIV. This approach complements the current knowledge on the relative importance of virulence determinants and HPAIV evolution from the opposite point of view.

Taken together, acquisition of a polybasic HA cleavage site is only one necessary step for evolution of H5N1 HPAIV from low-pathogenic precursor strains, which may already have cryptic virulence potential. Moreover, besides the polybasic HA cleavage site, additional virulence determinants of HPAIV are located within the HA itself and in the other viral proteins. Knowledge of these virulence factors is crucial for an assessment of the risk of transformation of any LPAIV to HPAIV which is highly relevant for the control of notifiable LPAIV H5 or H7 infections in poultry.

Material and Methods

Ethics Statement

The animal experiments were evaluated by the responsible ethics committee of the State Office for Agriculture, Food Safety and Fishery in Mecklenburg-Western Pomerania (LALFF M-V) and gained governmental approval (registration number LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-018/07).

Cells and Viruses

Human embryonic kidney 293T [32] and Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells [32] were maintained in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS). Chicken fibroblast cells (DF-1) were cultured in ISCOVES DMEM containing 10% FCS in the absence of antibiotics. The low-pathogenic avian influenza A virus A/Teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1) (TG05) was isolated from a healthy green winged teal (*Anas crecca*) [43]. The sequences of cloned viral genes have been submitted to Genbank (accession numbers CY061882-9). A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) (R65) was isolated from a dead swan during the HPAIV outbreak

Table 3. Organ tropism and tissue lesions on day 4.

4 dpi		Cerebellum	Cerebrum	Lung	Nose	Trachea	Caecum	Duodenum	Kidney	Pancreas
TG05	IHC IHC positive cell types	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
	HE histo-pathology	none	none	none	lymphohistiocytic rhinitis	none	None	none	none	none
TG05 _{poly}	IHC	-/-/-	+/-/-	+/-/-	+/-/-	+/-/-	+/-/-	+/-/-	-/-/-	-/-/-
	IHC positive cell types		neurons, glial cells	lymphocytes, pneumocytes II	endothelium, macrophages	endothelium, macrophages, lymphocytes	serosal endothelium, lymphocytes, macrophages	serosal endothelium, macrophages		
	HE histo-pathology	none	neuropil vacuolisation (mild edema), glial cell proliferation	edema, focal parabronchial necrosis	mixed cellular rhinitis; comb. skin necrosis, dermatitis, epidermal necrosis	mixed cellular tracheitis	serositis	serositis	none	none
TG05-HA _{R65}	IHC	++/-/-	++/-/-	-/-/-	++/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
	IHC positive cell types	neurons, glial cells, ependymal cells	neurons, glial cells, ependymal cells		glandular epithelium, lymphocytes, macrophages					
	HE histo-pathology	neuronal degeneration	lymphocytic encephalitis, neuronal degeneration, glial cell proliferation	mild edema	glandular epithelial degeneration, lymphohistiocytic rhinitis; comb. dermatitis	none	none	none	none	parenchymal degeneration
R65-HA _{TG05poly}	IHC	++/+/+/+	++/+/+/+	-/+/+/+	++/+/+/+	+/+/+/+	-/-/+/+	-/+/+/+	-/+/-/-	-/+/-/++
	IHC positive cell types	neurons, glial cells, ependymal cells	neurons, glial cells, ependymal cells	macrophages, lymphocytes, pneumocytes II, endothelium	epithelial cells (glands, skin, feather follicle, nasal conchae); glial cells (N. trigeminus), lymphocytes, macrophages,	endothelium, muscle cells, lymphocytes, macrophages	endothelium, lymphocytes, macrophages	lymphocytes, macrophages	tubular epithelium, macrophages, lymphocytes	macrophages, acinar cells
	HE histo-pathology	neuronal degeneration	neuronal necrosis, neuronal degeneration, glial cell proliferation, multifocal	mild edema; BALT: lymphocyte necrosis and heterophil infiltration, interstitial pneumonia	mixed cellular necrotizing rhinitis with epithelial proliferation and hemorrhage, blood vessel necrosis, serocellular crusts, dermatitis	lymphohisto-cytic tracheitis	GALT: lymphocyte necrosis with heterophil infiltration	none	none	acinar necrosis, mixed cellular pancreatitis

Immunohistochemical detection (IHC) of influenza virus nucleoprotein antigen and HE staining of organs from chickens after intranasal inoculation.
doi:10.1371/journal.pone.0011826.t003

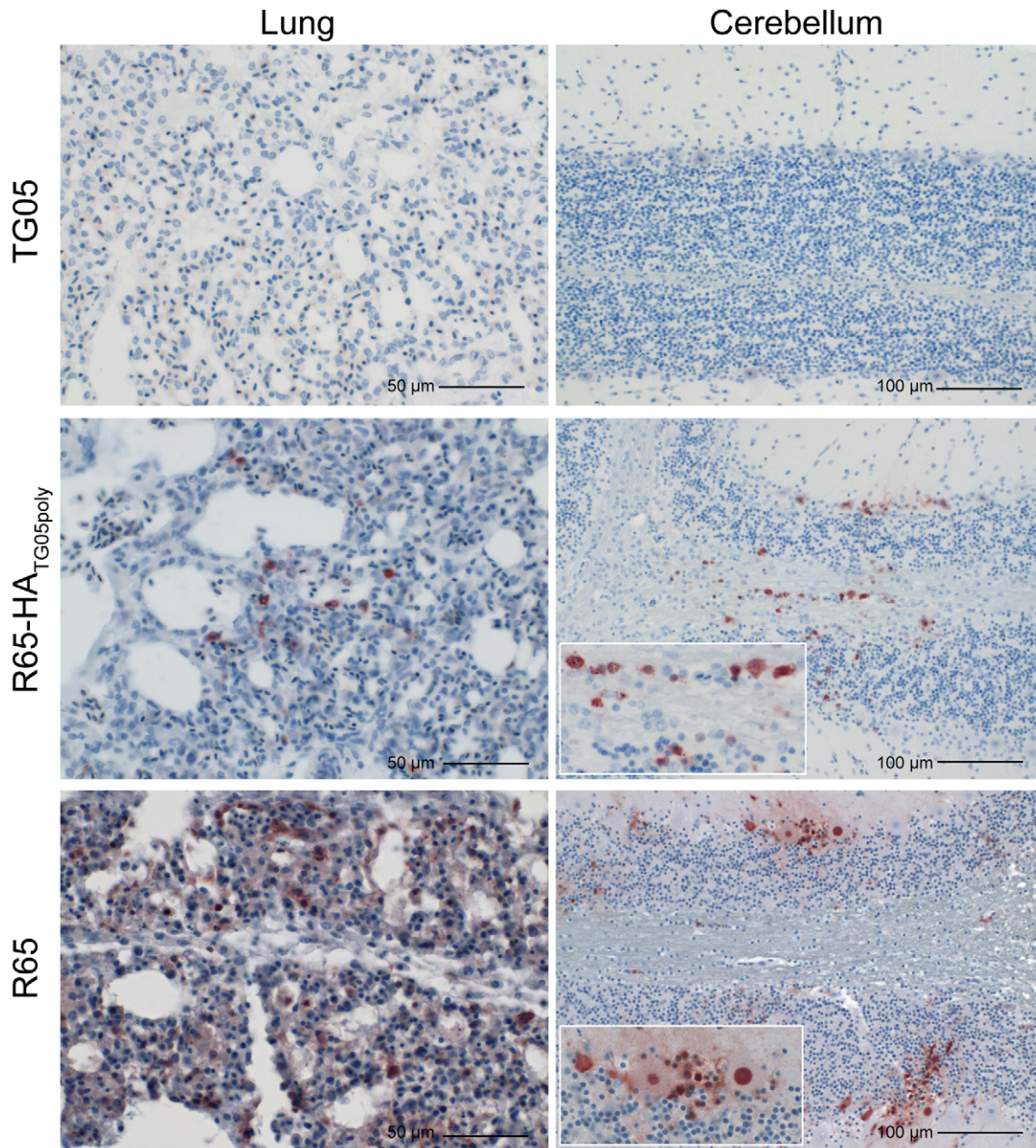


Figure 5. Viral organ tropism in chicken. Immunohistochemical detection of influenza A virus nucleoprotein (brown) in lung and cerebellum from chickens sacrificed on day 4 post inoculation with 10^5 pfu of TG05 or R65-HA_{TG05poly}, and from moribund chickens sacrificed on day 2 post inoculation with 10^6 TCID₅₀ R65.

doi:10.1371/journal.pone.0011826.g005

in Rügen, Germany, 2006 (Genbank accession numbers DQ464354-DQ464361) [44]. Both native viruses were propagated in 11-day-old embryonated chicken eggs.

Generation of recombinant viruses

Viral genes from TG05 were cloned into the plasmid pHWSccdB as described in [45]. Site-directed mutagenesis of the HA cleavage site region was performed by the QuikchangeTM protocol (primer sequences available upon request). All recombinant viruses were rescued essentially as described [32] with the addition of plasmids expressing the polymerase proteins and the nucleoprotein genes from A/PR/8/34 (H1N1) (a kind gift from

Peter Palese) except for R65-HA_{TG05poly}. The recombinant R65 [45] differs from the native isolate [44] by 4 nucleotide exchanges in the PB2 gene (DQ464357); C1009T corresponding to the amino acid replacement L329F, in the PB1 gene (DQ464361): A1603G and G1604T corresponding to the amino acid replacement S527V, and in the HA gene (DQ464354): C1737T in non-coding region. TG05 was propagated in embryonated eggs, all other recombinant viruses were grown on MDCK cells. Gene composition and HA cleavage site of the generated viruses were verified by sequencing of amplicons from reverse transcription-PCR (data not shown). All viruses with polybasic HA cleavage site were handled under BSL3+ conditions.

Plaque assay and growth curves

Plaque assays were performed on MDCK cells as described previously [54] with 400 μ l inoculum either in the presence of 2 μ g/ml N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin (Sigma, Taufkirchen, Germany), or in the absence of trypsin. For determination of growth curves, DF-1 cells were inoculated at a multiplicity of infection of 10^{-3} in the presence of 1 μ g/ml TPCK-treated trypsin or in the absence of any exogenous protease. From two independent experiments, supernatants were harvested at 0, 8, 24, 48, and 72 h post inoculation and resulting infectious virus was titrated by plaque assay on MDCK cells in the presence of trypsin.

Western blots

DF-1 cells were infected at a multiplicity of infection of 0.1 in the presence of either 1.0 μ g/ml TPCK-treated trypsin or no exogenous protease in ISCOVES DMEM and 0.2% bovine serum albumin (BSA) (MP Medicals, Heidelberg) until a cytopathic effect appeared (48 h for TG05, TG05-HA_{R65}, and R65-HA_{TG05poly}; 7 d for TG05_{poly}). Cells were lysed with 4 \times Laemmli buffer [55] containing 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) and were inactivated by heating at 95°C for 5 min. Lysates were separated on a 10%-SDS polyacrylamide gel and electrotransferred to a nitrocellulose membrane. For detection of HA, a polyclonal rabbit antibody to the HA protein from A/Chicken/Vietnam/P41/2005 (H5N1), expressed by a vaccinia virus vector [56], (1:20,000; incubated 1 h at room temperature) and as secondary antibody a rabbit-specific goat immunoglobulin G fragment conjugated with horseradish peroxidase (1:10,000; 1 h at room temperature, Biovision, USA) were used. Antibody binding was visualized by chemiluminescence (Supersignal West Pico Chemiluminescence Kit from Pierce, Bonn).

Animal experiments

Ten 2-week-old White Leghorn specific-pathogen-free chickens per group were infected oculonasally with 10^5 PFU per animal. Each bird was observed daily for 10 days for clinical signs and classified as healthy (0), ill (1) (exhibiting one of the following: respiratory symptoms, depression, diarrhea, cyanosis, edema, or central nervous symptoms), severely ill (2) (severe or more than one

of the previously mentioned symptoms), or dead (3) as described previously [57]. When birds are too sick to eat or drink, they are killed humanely and scored as dead to the next observation day [57].

Histopathology and immunohistochemistry

Samples from cerebellum, cerebrum, lung, nose, trachea, caecum, duodenum, kidney, and pancreas of additionally infected chicken were taken on day 4 and 10 post infection, formalin-fixed and processed for paraffin-wax-embedding according to standardized procedures. Immunohistochemical detection of influenza A virus nucleoprotein (NP) and hematoxylin eosin staining was performed as described [58].

For R65 [45], samples from cerebellum and lung were taken on day 2 from two 3-week old chickens infected oculonasally with 10^6 TCID₅₀/animal.

Supporting Information

Table S1 Organ tropism and tissue lesions on day 10. Immunohistochemical detection (IHC) of influenza virus nucleoprotein antigen and HE staining of organs from chickens after intranasal inoculation.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011826.s001 (0.04 MB DOC)

Acknowledgments

We thank E. Hoffmann and R. G. Webster for the pHW2000 plasmid and Peter Palese for the pCAGGS(PR8)-PB2, -PB1, -PA, and -NP expression plasmids. We are very grateful to A. Globig and T. Harder for providing us with influenza A virus A/Teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1), to Mikhail Matrosovich for the gift of MDCK cells and to Cindy Meinke, Kathrin Müller, Anne Brandenburg, Thorsten Arnold, Georg Bauer, and Gerda Busch for very skillful technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JV OS TM JS. Performed the experiments: JB JV SG JH AB. Analyzed the data: JB JV AB JT TM JS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB SG JH OS JS. Wrote the paper: JB AB JT TM JS.

References

- Schaefer W (1955) Vergleichende seroimmunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und der klassischen Geflügelpest. *Z Naturforsch* 10b: 81–91.
- Swayne DE (2007) Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis* 51: 242–249.
- Peiris JS, de Jong MD, Guan Y (2007) Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* 20: 243–267.
- Garten W, Klenk HD (1999) Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 7: 99–100.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, et al. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11: 2407–2414.
- Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R (1979) The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95: 197–207.
- Horimoto T, Kawaoka Y (1994) Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 68: 3120–3128.
- Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, et al. (1996) Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 40: 425–437.
- Garten W, Klenk H-D (2008) Cleavage Activation of the Influenza Virus Hemagglutinin and Its Role in Pathogenesis In: Klenk H-D, Matrosovich MN, Stech J, eds. *Avian Influenza*. Basel: Karger. pp 156–167.
- Kawaoka Y, Webster RG (1985) Evolution of the A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus. *Virology* 146: 130–137.
- Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, et al. (1995) Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213: 223–230.
- Rohm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Suss J, Webster RG (1995) Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology* 209: 664–670.
- Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML (1996) Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol* 77(Pt 7): 1493–1504.
- Perdue ML, Garcia M, Senne D, Fraire M (1997) Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 49: 173–186.
- Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, et al. (2004) Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis* 10: 693–699.
- Pasick J, Handel K, Robinson J, Copps J, Ridd D, et al. (2005) Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J Gen Virol* 86: 727–731.
- Khatchikian D, Orlich M, Rott R (1989) Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* 340: 156–157.
- de Wit E, Munster VJ, van Riel D, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, et al. (2009) Molecular determinants of adaptation of HPAI H7N7 viruses to efficient replication in the human host. *J Virol*.

19. Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG (1984) Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology* 139: 303–316.
20. Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, et al. (2004) Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431: 703–707.
21. Pappas C, Aguilar PV, Basler CF, Solorzano A, Zeng H, et al. (2008) Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3064–3069.
22. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solorzano A, et al. (2007) A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 315: 655–659.
23. Matsuoka Y, Swayne DE, Thomas C, Rameix-Welti MA, Naffakh N, et al. (2009) Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. *J Virol* 83: 4704–4708.
24. Fernandez-Sesna A, Marukian S, Ebersole BJ, Kaminski D, Park MS, et al. (2006) Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol* 80: 6295–6304.
25. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, 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: 1146–1154.
26. Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, et al. (2006) The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol* 80: 11115–11123.
27. Lipatov AS, Andraesky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg JE, et al. (2005) Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol* 86: 1121–1130.
28. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG (2002) Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* 8: 950–954.
29. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, et al. (2004) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1356–1361.
30. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840–1842.
31. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, et al. (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12: 1203–1207.
32. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, et al. (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18590–18595.
33. Salomon R, Franks J, Govorkova EA, Ilyushina NA, Yen HL, et al. (2006) The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* 203: 689–697.
34. Snyder MH, Buckler-White AJ, London WT, Tierney EL, Murphy BR (1987) The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian-human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys. *J Virol* 61: 2857–2863.
35. Baigent SJ, McCauley JW (2001) Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 79: 177–185.
36. Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, et al. (2001) Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol* 146: 963–973.
37. Deshpande KL, Naeve CW, Webster RG (1985) The neuraminidases of the virulent and avirulent A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza A viruses: sequence and antigenic analyses. *Virology* 147: 49–60.
38. Hoffmann E, Stech J, Leneva I, Krauss S, Scholtissek C, et al. (2000) Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *J Virol* 74: 6309–6315.
39. Zhimov OP, Klenk HD (2009) Alterations in caspase cleavage motifs of NP and M2 proteins attenuate virulence of a highly pathogenic avian influenza virus. *Virology* 394: 57–63.
40. Munier S, Larcher T, Cormier-Aline F, Soubieux D, Su B, et al. (2010) A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens. *J Virol* 84: 940–952.
41. Ma W, Brenner D, Wang Z, Dauber B, Ehrhardt C, et al. (2010) The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J Virol* 84: 2122–2133.
42. Stech O, Veits J, Weber S, Deckers D, Schroer D, et al. (2009) Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *J Virol* 83: 5864–5868.
43. Starick E, Beer M, Hoffmann B, Staubach C, Werner O, et al. (2008) Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. *Vet Microbiol* 128: 243–252.
44. Weber S, Harder T, Starick E, Beer M, Werner O, et al. (2007) Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. *J Gen Virol* 88: 554–558.
45. Stech J, Stech O, Herwig A, Altmepfen H, Hundt J, et al. (2008) Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res* 36: e139.
46. Rott R, Orlich M, Scholtissek C (1976) Attenuation of pathogenicity of fowl plague virus by recombination with other influenza A viruses nonpathogenic for fowl: nonexclusive dependence of pathogenicity on hemagglutinin and neuraminidase of the virus. *J Virol* 19: 54–60.
47. Scholtissek C, Vallbracht A, Flehmig B, Rott R (1979) Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. II. Highly neurovirulent recombinants derived from non-neurovirulent or weakly neurovirulent parent virus strains. *Virology* 95: 492–500.
48. Wasilenko JL, Lee CW, Sarmento L, Spackman E, Kapczynski DR, et al. (2008) NP, PB1, and PB2 viral genes contribute to altered replication of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *J Virol* 82: 4544–4553.
49. Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, et al. (2001) Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passing in chickens. *J Virol* 75: 4439–4443.
50. Pfeiffer J, Pantin-Jackwood M, To TL, Nguyen T, Suarez DL (2009) Phylogenetic and biological characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses (Vietnam 2005) in chickens and ducks. *Virus Res* 142: 108–120.
51. Kalthoff D, Breithaupt A, Teifke JP, Globig A, Harder T, et al. (2008) Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerg Infect Dis* 14: 1267–1270.
52. Klopffleisch R, Werner O, Mundt E, Harder T, Teifke JP (2006) Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Vet Pathol* 43: 463–470.
53. Perkins LE, Swayne DE (2001) Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol* 38: 149–164.
54. Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG (1999) Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol* 73: 1878–1884.
55. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
56. Pavlova SP, Veits J, Keil GM, Mettenleiter TC, Fuchs W (2009) Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. *Vaccine* 27: 773–785.
57. Alexander DJ (2008) Chapter 2.3.4. Avian influenza. In: Vallat B, ed. *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed: OIE.
58. Kalthoff D, Breithaupt A, Helm B, Teifke JP, Beer M (2009) Migratory status is not related to the susceptibility to HPAIV H5N1 in an insectivorous passerine species. *PLoS One* 4: e6170.

Future Influenza Vaccines and the Use of Genetic Recombinants *

EDWIN D. KILBOURNE ¹

Genetic recombination of influenza viruses provides the possibility of immediate reassortment and combination of genes and gene products in a single step. Thus, genetic variants with desirable attributes for vaccine production can be produced by deliberate genetic manipulation of viruses rather than by the empirical "hit or miss" methods of the past. Recombination of a high-yield laboratory strain (A0/PR/8) with a low-yield Hong Kong virus (Aichi strain) produced a high-yield recombinant virus (X-31) of Hong Kong antigenicity suitable for vaccine production. It is proposed that a prefabricated "library" of recombinants might anticipate the mutations which may arise in the future and also that live virus vaccines of greater stability may be produced by recombination of new and old viruses.

It is important to appreciate that influenza vaccines of the past and present are, in fact, empirically selected genetic viral variants with desirable properties; i.e., optimal growth characteristics, "attenuation" of virulence, thermal stability and requisite antigenicity. Selection of these variants from uncloned viral stocks of variable history has usually been hit or miss and unsystematic by such empirical methods as, for example, mouse-lung passage to increase viral yield in chick embryos.

Obviously, it is more sensible to attempt a correlation of identifiable genetic attributes (markers) of the virus with desirable vaccine properties. Then one can proceed to manipulate the virus genetically to select optimal clones: (1) by screening of multiple viral clones, (2) by chemically induced mutation and/or selection through environmental pressures (e.g., *ts* mutants), or (3) by genetic recombination of viruses.

* This investigation was conducted in part under the auspices of the Commission on Influenza, Armed Forces Epidemiological Board, and was supported in part by the US Army Medical Research and Development Command, Department of the Army, under Research Contract No. DA-17-69-C-9137; in part by US Public Health Service Research Grant AI-09304 from the National Institutes of Allergy and Infectious Diseases; in part by the Health Research Council of the City of New York under Contract No. U-1023.

¹ Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine of The City University of New York, New York, N.Y. 10029, USA.

Recombination is analogous to sexual reproduction in its potential for reassortment and recombination of genes and gene products. Thus, the deliberate mating of 2 or more viruses, each bearing a desired trait, can be effected and an appropriate progeny virus can be selected without need for tedious "adaptation" until appropriate mutants, if any, become manifest. It is predictable that recombination, with its reassortment of genes, will lessen the probability of expression of any polygenic characteristic, such as virulence which is dependent on combinations of genes. Therefore, a kind of "instant attenuation" can be provided by recombination of a wild type with established laboratory strains of lesser virulence and a virus of the required antigenicity can then be selected out [e.g., Ax Vir1 Vir2 Vir3 (virulent) × A2 Avir1 Avir2 Avir3 → Ax Avir1 Vir2 Avir3 (avirulent)]. However, new phenotypes can arise with recombination so that the possibility of increased virulence cannot be excluded. For example, a recombinant of A0/NWS and A2/RI/5⁺ viruses, X-7, acquired a capacity to elute from erythrocytes that was not characteristic of either parental virus (Laver & Kilbourne, 1966). Recombination of genes had conferred on this hybrid the highly active neuraminidase of the A2 strain together with the relatively weak red-cell binding capacity of A0/NWS virus, so that its phenotype with respect to red-cell interaction was a new pattern of enhanced dissociation or elution from the cells. However, in this instance, the

virulence of X-7 in any of 3 test systems was intermediate between that of its parents.

IMPLICATIONS OF RECOMBINATION FOR PRODUCTION OF LIVE VIRUS VACCINES

If, as seems likely, live virus vaccines assume more importance in the control of influenza, then the vexing problem of maintaining optimal infectiousness for man may be met by the provision of chick-embryo-adaptive genes from laboratory strains of virus in concert with those wild-type viral genes coding for the desired new antigen. Thus, the apparently inevitable de-adaptation to man coincident to adaptation of new viruses to an alien host (the chick embryo) might be circumvented by lessening the wild-type strain's requirement for an evolutionary flux of mutants as it strives to survive in the new host.

RAPID PRODUCTION OF HIGH-YIELDING VACCINE VIRUS

The control of influenza depends upon the availability of vaccine. Paradoxically (and predictably), at those times when vaccine is most needed (i.e., when new mutants appear) the new viruses available for vaccine production, because of their limited passage in the egg, are usually not suitable. It should be appreciated that not only is a 4-fold-8-fold difference in titre reflected by a proportionately greater egg requirement and hence manufacturing expense, but it may determine whether or not the small manufacturer can risk undertaking vaccine production at all. Therefore, any method that aids in the enhancement of influenza virus yields is potentially important.

The principle was clearly established 10 years ago that recombination of a low-yielding (A2) strain with a standard laboratory strain (A0/PR/8) could lead to the rapid emergence of recombinant virus with the desired (A2) antigenicity and the growth characteristics and haemagglutination titre of the older adapted strain (Kilbourne & Murphy, 1960). These experiments were conducted 2 years after the major A2 mutation of 1957, by which time higher-titre vaccine strains had become available, so that the results of these studies were not useful at that time.

When a strain of Hong Kong virus first became available to our laboratory on 20 September 1968 we immediately embarked on a similar experiment, again using A0/PR/8 as the growth-conferring

parent. In less than 2 weeks a Hong Kong-like virus of increased titre had been isolated and within a month it had been recloned, checked for antigenicity and genetic stability and made available for distribution. Although low yields of virus still plagued vaccine manufacturers at that time, no great enthusiasm greeted the appearance of the recombinant, which exceeded the titre of standard Aichi strains by 4-fold-6-fold. At least one reason for this fact was the history of monkey kidney passage of the particular Hong Kong strain which had been employed as a parent, but the lateness of the hour (it was then mid-October) also dampened the interest of most manufacturers, some of whom had almost completed production.

Because it seemed important to reaffirm the principle of 1959, and to apply the genetic tool of hybridization for the first time to artificial immunization, recombination of a Hong Kong strain of unimpeachable pedigree (the Aichi vaccine strain provided by the Division of Biologics Standards) was again carried out, again with A0/PR/8 as the other parent. Recombination was effected by simultaneous inoculation of chick embryos with heat-inactivated Aichi and infective A0/PR/8. Subsequent selection depended upon (1) suppression of the parental or recombinant virus of A0 serotype with specific antiserum and (2) limiting diluting passage to permit the emergence of Hong Kong-like virus of good growth potential. This interaction and selection can be symbolized as: $HKg \times A0G \rightarrow HKg + A0G + HKG + A0g$, if G indicates good growth capacity and g the reverse. This hypothetical virus mixture + A0 antiserum $\rightarrow HKg + HKG$; the latter can be expected to emerge at high dilution passage with screening dependent upon viral yield (i.e., HA titre). Again, a high-yielding recombinant, X-31, was obtained. In the accompanying table the properties of this virus are compared with the viruses from which it was derived. The yield of haemagglutinating virus is similar to the A0/PR/8 while antigenic analysis by any of 4 different techniques identified the envelope protein as identical with Hong Kong virus. Of particular note is the confirmation of earlier studies (Kilbourne & Murphy, 1960) that enhanced growth capacity was associated with predominantly spherical viral morphology. Thus, a convenient biophysical marker may identify the traits associated with high-yielding virus.

The virus X-31 is now in pilot commercial production and by the time this report has been published it will have been tested for antigenicity in

PROPERTIES OF X-31 AND PARENTAL VIRUSES

Virus	Antigens ^a		Yield in eggs (HA titre)	Optimal growth at 35°C	Viral morphology	Elution from erythrocytes ^b
	Haemagglutinin	Neuraminidase				
PR/8	PR/8	PR/8	8 192	+	Spherical	+
HK ^c	HK	HK	256	-	Filamentous	-
X-31	HK	HK	8 192	+	Spherical	+

^a Antigenic characterization defined by haemagglutination inhibition, neuraminidase inhibition, plaque inhibition and plaque-size reduction.

^b First noted by Dr Geoffrey Schild.

^c HK = Division of Biologics Standards 5th-egg-passage Aichi strain—no monkey kidney passage.

man in volunteer challenge experiments and in field trials.

Other potential applications of recombination to vaccine production include: (1) Establishment of a "library" of prefabricated recombinants in an attempt to anticipate recombination in nature of antigens presently known and which may lead to the evolution of new variants. For example, combination of the haemagglutinin of A/Equi-2/63 (cross-reactive with the haemagglutinin of Hong Kong virus) and the neuraminidase of a recent A2 strain (e.g., A2/Texas/68) identical to the HK enzyme (Schulman & Kilbourne, 1969) can be expected to yield a virus very like Hong Kong in antigenicity. We are at present trying to produce such a recombinant as an exercise in "retrospective anti-

ipation". (2) The strains stored in the "library" should include pedigreed high-yield parental viruses ready for recombination with new strains (human or animal), as they evolve, to effect their rapid "adaptation" to the vaccine-producing host system. (3) Repeated recombination may reveal new antigens; as envelope polypeptides coded by the reassorted genes are put together in differing contexts, new avidity, reactivity or even new antigenicity may emerge. The markedly changed reactivity of the A0 neuraminidase in combination with the haemagglutinin of A/Equi-1 virus illustrates this point (Kilbourne, 1968).

Whether or not recombination is the mechanism of evolution of new strains in nature, the same trick can be used in the laboratory to the detriment of influenza and the benefit of man.

ACKNOWLEDGEMENTS

The able technical assistance of Barbara Pokorny and Jan Meisels is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Kilbourne, E. D. (1968) *Science*, **160**, 74
 Kilbourne, E. D. & Murphy, J. S. (1960) *J. exp. Med.*, **111**, 387
 Laver, W. G. & Kilbourne, E. D. (1966) *Virology*, **30**, 493
 Schulman, J. L. & Kilbourne, E. D. (1969) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **63**, 326