



Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit:

Gentechnische Arbeiten mit dem Sindbis-Virus- und dem Semliki-Forest-Virus-Expressionssystem

1. Das Sindbis-Virus- und das Semliki-Forest-Virus-Expressionssystem

1.1. Allgemeine Einführung

SIN und SFV

Das Sindbis-Virus (SIN) und das Semliki-Forest-Virus (SFV) gehören zur Familie der *Togaviridae*, Genus *Alphavirus*. Sie verfügen über ein ikosaedrisches Nukleokapsid, welches eine einzelsträngige lineare RNA positiver Polarität als Genom enthält und von einer Lipid-Membran mit viralen Hüllproteinen umgeben ist. Die Viren sind weit verbreitet und werden von Mücken übertragen, SIN von der Gattung *Aedes*, SFV von der Gattung *Culex*. Beide Virusarten können beim Menschen fieberhafte Erkrankungen auslösen. Bei SIN kann die Krankheit mit dem Auftreten von Ausschlag und Arthritis verbunden sein. Das ursprüngliche SFV-Isolat L10 ist neurovirulent für Mäuse, das SFV-Isolat A7 hingegen ist avirulent [1;2]. Generell gelten diese Viren als schwach pathogen, aber es wurde auch von einem Todesfall berichtet, der durch eine Laborinfektion mit SFV verursacht wurde [3]. *In vitro* haben die Viren ein breites Wirtsspektrum, welches Zellen von Insekten, Vögeln und Säugern umfasst. Die meisten Vertebratenzellen werden lytisch infiziert, in Insektenzellen verläuft die Infektion in der Regel persistent [2]. Gemäß Bekanntmachung nach § 5 Absatz 6 GenTSV sind SIN und SFV der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Bei den viralen Genomen handelt es sich um (+)-Strang-RNA. Sie weisen am 5'-Ende eine CAP-Struktur auf, sind am 3'-Ende polyadenyliert und haben ohne die terminalen Strukturen eine Länge von 11703 nt (49S RNA) bei SIN und 11442 nt (42S RNA) bei SFV. Die genomischen RNAs enthalten zwei offene Leserahmen, einen für die Nichtstrukturproteine und einen für die Strukturproteine. An den Enden sowie zwischen den beiden Leserahmen befinden sich untranslatierte Nukleotidsequenzen (UT), die für die Replikation und Translation essenziell sind. Das Verpackungssignal ψ liegt innerhalb des Leserahmens der Nichtstrukturproteine (Abb. 1) [2;4;5].

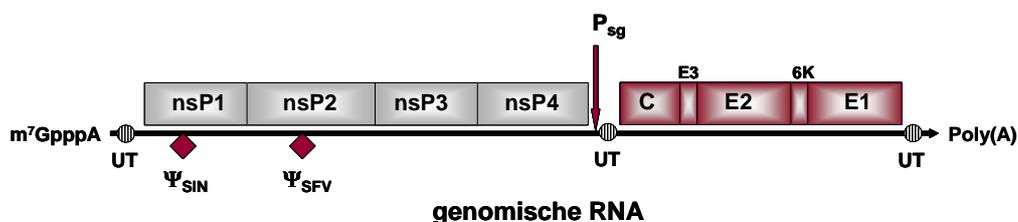


Abb. 1: Genomkarte von SIN und SFV

m⁷GpppA: Cap-Struktur; ψ : Verpackungssignal; nsP1-nsP4: Nichtstrukturproteine; P_{sg}: Lage des subgenomischen Promotors; C: Kapsidprotein; E1, E2, E3, 6K: Glykoproteine; Poly(A): Polyadenylierung; UT: untranslatierte Region.

Zwischen den beiden Leserahmen befindet sich der interne Promotor (subgenomischer Promotor, P_{sg} oder 26S-Promotor) der (-)-Strang-RNA.

SIN- und SFV-Replikationszyklus

Nach Infektion einer Zelle dient das virale Genom direkt als mRNA. Von ihr werden zuerst die viralen Nichtstrukturproteine nsP1-4 als Polyprotein translatiert. Dieses Vorläuferprotein wird über die Proteaseaktivität von nsP2 zu den einzelnen Nichtstrukturproteinen nsP1, nsP2, nsP3 und nsP4 prozessiert. Die vier Proteine zeigen folgende Funktionen: Methyl- und Guanyltransferase bei nsP1, Protease und RNA-Helikase bei nsP2, nsP3 ist ein Phosphoprotein mit noch ungeklärter Funktion und nsP4 die Polymerase. Die Nichtstrukturproteine aggregieren zur Replikase und schreiben das (+)-Strang-Genom in komplementäre (-)-Strang-RNA um. Der (-)-Strang dient als *template* für die Herstellung genomischer *full-length* RNA, und über den internen subgenomischen Promotor zur Herstellung der subgenomischen 26S RNA. Die Replikation der viralen RNAs findet im Zytoplasma statt. [6-8].

Auch die subgenomische RNA wird in ein Polyprotein translatiert, welches nach Proteolyse schließlich zum Kapsidprotein C, den Glykoproteinen E1, E2 und E3 und dem Protein 6K prozessiert wird. C ist eine Autoprotease, die sich selbst vom Rest der Strukturproteine abspaltet. Das Kapsidprotein erkennt und bindet an das Verpackungssignal ψ . Über diese Bindung wird das virale RNA-Genom zum Nukleokapsid verpackt. Das Verpackungssignal ist auf dem SIN-Genom innerhalb des nsP1-Leserahmens [4] und auf dem SFV-Genom innerhalb des nsP2-Leserahmens lokalisiert [5]. E1 ist zu Beginn der Infektion für die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran verantwortlich. Es bildet zusammen mit E2 Heterodimere aus, von denen jeweils drei einen „Spike“ in der viralen Hülle formen. E2 interagiert beim Zusammenbau der Viren mit dem Nukleokapsid. E3 ist ein Leader-Protein und bleibt mit E2 zunächst als Vorläuferprotein (PE2 oder p62) verbunden. Erst beim Zusammenbau des neuen Viruspartikels wird dieses Vorläuferprotein von einer zellulären Protease gespalten. Im Gegensatz zu SFV wird in der viralen Hülle von SIN kein E3 gefunden. Beide Viren sind jedoch in der Lage, auch das ungespaltene Vorläuferprotein in die Virushülle einzubauen. Seine proteolytische Spaltung ist aber Voraussetzung für die weitere Infektiosität [9;10]. 6K ist ein *leader*-Protein und für den Zusammenbau des Viruspartikels von Bedeutung. Die neuen Viruspartikel werden von der infizierten Zelle durch Knospung abgegeben [2].

1.2. Gentransfer mithilfe SIN- und SFV-abgeleiteter Vektoren

Grundsätzlich werden drei Typen von SIN- oder SFV-abgeleiteten Vektor-Systemen unterschieden.

- Die Vektoren verfügen über *cis*-regulatorische Nukleotidsequenzen für die Replikation und einen Promotor für die Expression des heterologen Gens. Sie benötigen über eine Helferfunktion die Nichtstrukturproteine für die Replikation der RNA und die Expression des heterologen Gens sowie die Strukturproteine zur Erzeugung viraler Partikel.
- Die Doppelpromotor-Vektoren enthalten neben dem Leserahmen für die Nichtstrukturproteine sowohl den Leserahmen der Strukturproteine als auch eine Insertionsstelle für ein heterologes Gen. Die späten Gene wie auch das heterologe Gen stehen jeweils unter Kontrolle eines subgenomischen Promotors. Diese Vektoren sind replikationskompetent und können neu hergestellte RNA zu Viruspartikeln verpacken.
- Bei der dritten Gruppe von Vektoren wird vom ursprünglichen, viralen Genom der Leserahmen der Strukturproteine durch das heterologe Gen ersetzt. Das verbleibende rekombinante RNA-Genom mit dem Leserahmen der Nichtstrukturproteine kann zwar noch replizieren, aber es werden keine neuen viralen Partikel ausgebildet. Die Verpackung der Replikons und Ausbildung von Vektorpartikeln erfolgt nur, wenn die viralen Strukturproteine über eine Helferfunktion zur Verfügung gestellt werden.

Da der dritten Gruppe von Vektoren die größte Bedeutung zukommt, wird im Rahmen dieser allgemeinen Stellungnahme lediglich auf diese Gruppe von Vektoren im Detail eingegangen.

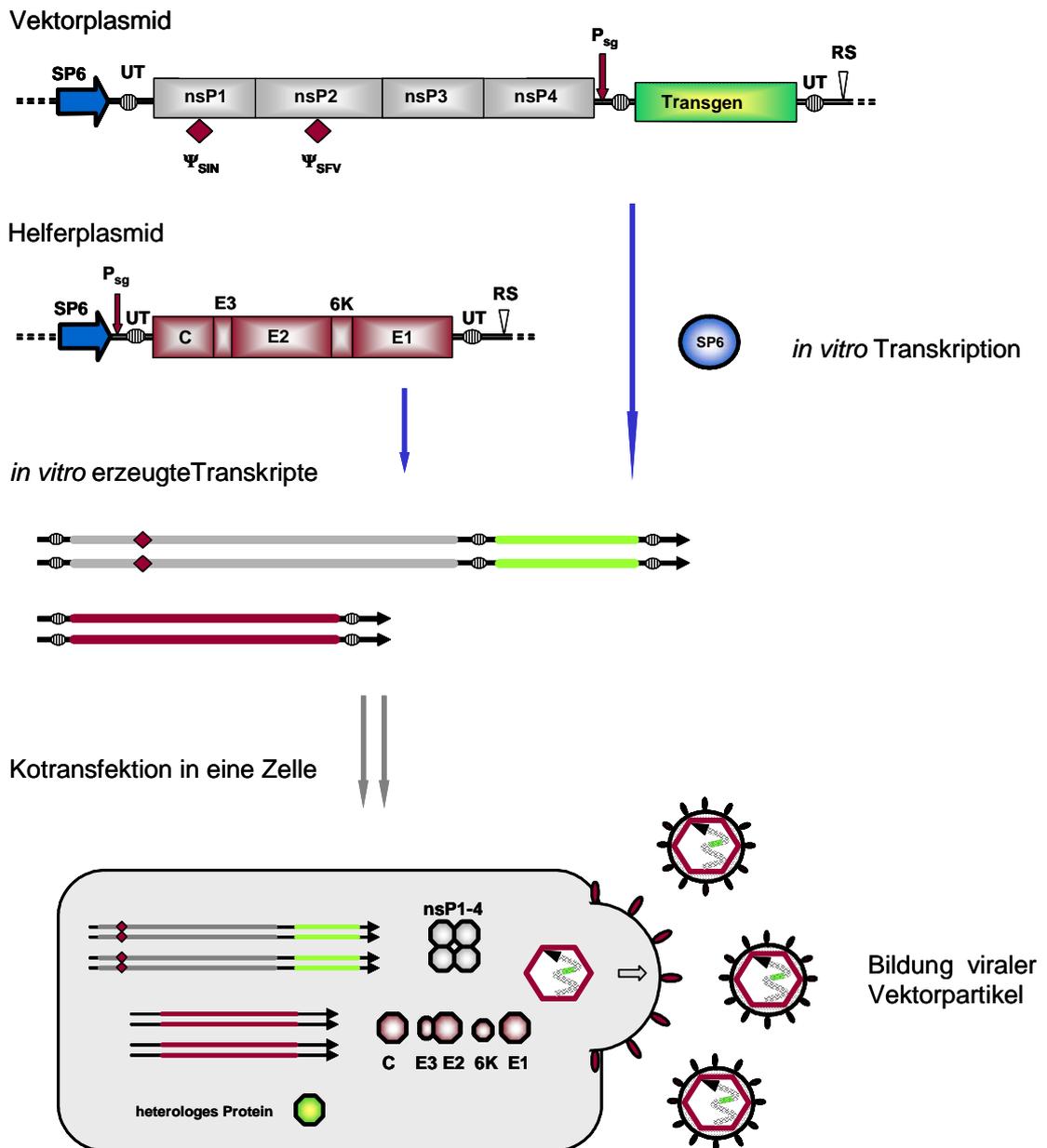


Abb. 2: Herstellung von SIN- und SFV-Vektorpartikeln

Im Vektorplasmid und im Helferplasmid befinden sich die viralen Leserahmen unter Kontrolle des SP6-Promotors (SP6). In den Plasmiden liegen darüber hinaus die für die Replikation in *E. coli* K12 notwendigen Funktionen wie das Ampicillin-Resistenzgen und der bakterielle Replikationsursprung vor. Die Plasmidsequenzen sind in der Abbildung lediglich durch eine gestrichelte Linie angedeutet. Über eine Restriktionsschnittstelle (RS) werden die Plasmide linearisiert und anschließend mithilfe der SP6-Polymerase (SP6) *in vitro* transkribiert. Die *in vitro* transkribierten RNAs werden in eine eukaryote Zelle kotransfiziert, wo die Replikation der RNA und die Expression der viralen Proteine und des heterologen Proteins erfolgt. Die Vektor-RNA wird mithilfe der Strukturproteine zu replikationsdefekten, viralen Vektorpartikeln verpackt.

Weitere Abkürzungen siehe Abb. 1.

Erzeugung viraler Vektorpartikel

Zur Herstellung solcher viraler Vektorpartikel wird der Leserahmen der viralen Nichtstrukturproteine als cDNA unter Kontrolle eines Promotors des Bakteriophagen SP6 gestellt und in ein pUC-abgeleitetes Plasmid eingebaut (Abb. 2). Diese cDNA enthält auch die viralen *cis*-regulatorischen Elemente für die Replikation und Translation sowie den viralen subgenomischen Promotor vor der Insertionsstelle für das heterologe Gen. Zur Linearisierung des Plasmidkonstruktes liegt hinter der viralen cDNA eine Restriktionsschnittstelle. Mithilfe der SP6-Polymerase wird *in vitro* Vektor-RNA (Replikon und Transgen) erzeugt, die in eine Wirtszelle transfiziert wird. Dort werden die Nichtstrukturproteine und das heterologe Protein gebildet. Die Nichtstrukturproteine replizieren die Vektor-RNA und die subgenomische RNA. Zur Verpackung der Vektor-RNA zu viralen Vektorpartikeln werden die Strukturproteine von einer kotransfizierten Helfer-RNA, translatiert. Die Helfer-RNA wird ebenfalls *in vitro* von einem linearisierten Plasmid, in dem die cDNA des Leserahmens der Strukturproteine unter Kontrolle des SP6-Promotors vorliegt, transkribiert. Es gibt aber auch Helferzelllinien, die die Strukturproteine konstitutiv exprimieren [11]. Das Kapsidprotein erkennt das Verpackungssignal ψ auf der Vektor-RNA und bildet gemeinsam mit der Vektor-RNA das Nukleokapsid. An der Zytoplasmamembran wird das Nukleokapsid von einer Lipid-Membran, in welcher die Glykoproteine E2 und E3 als Spikes eingelagert sind, umhüllt und durch Knospung von der Zelle abgegeben (Abb. 2). Sind die *cis*-regulatorischen Sequenzen gegenüber dem Wildtyp-Virus unverändert [12;13] und werden Vertebratenzellen verwendet, kommt es nach wenigen Tagen zur Zytolyse.

Alternativ können die cDNA mit den Genen für die Nichtstrukturproteine und dem Transgen unter Kontrolle eines Pol II-Promotors stehen. Das Gleiche gilt für die cDNA mit den Genen der Strukturproteine. Im Unterschied zu dem oben beschriebenen System werden die Vektor- und Helfer-RNA von der Wirtszelle selbst hergestellt.

Mit den replikationsdefekten, viralen Vektorpartikeln können weitere Wirtszellen infiziert werden, um dort das heterologe Gen zu exprimieren. Neue Viruspartikel entstehen dann normalerweise nicht, da im Vektor oder der Wirtszelle keine Gene von Strukturproteinen vorhanden sind. Auch diese Wirtszelle stirbt häufig nach wenigen Tagen ab, wenn die *cis*-regulatorischen Sequenzen im Vektor-Genom gegenüber dem viralen Wildtyp-Genom unverändert sind und es sich um eine Vertebratenzelle handelt.

Prototyp-Plasmide

Prototyp-Plasmide, die cDNA des Replikons enthalten, sind pSINrep5 oder pSFV1-3. Die cDNA der Strukturproteine ist auf den Prototyp-Helferplasmiden pDH-BB („defective helper“) oder pSFV-Helper1 kodiert [14;15] Diese Plasmide enthalten den SP6-Promotor zur *in vitro* Transkription der viralen Funktionen. pDLTRSIN- β -gal oder pDCMVSIN- β -gal sind Prototyp-Plasmide, die die cDNA der Replikons unter Polymerase II-Promotor-Kontrolle enthalten. Prototyp-Plasmide, bei denen die cDNA der Strukturproteine unter Polymerase II-Promotor-Kontrolle steht, sind pDLTR-dInsPSIN oder pDCMV-dInsPSIN [16].

1.3. Biologische Sicherheit der SIN- und SFV-abgeleiteten Vektoren

SIN- oder SFV-abgeleitete Vektoren zeichnen sich aufgrund ihres breiten Wirtsspektrums, der raschen Expression des übertragenen Gens sowie der hohen Expressionsrate aus. Darüber hinaus haben sie den Vorteil, dass sie sich teilende aber auch ruhende Zellen infizieren und ihr RNA-Genom im Zytoplasma der Wirtszelle ohne DNA-Zwischenschritt replizieren. Normalerweise haben diese Vektoren eine kurze Expressionsphase und zytolytisches Potenzial.

Der Sicherheit SIN- oder SFV-abgeleiteter Vektorsysteme wird besondere Aufmerksamkeit gewidmet weil es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten gibt [17-19].

Gestaltung der Helferplasmide

In der Regel werden replikationsdefekte SIN- oder SFV-abgeleitete Vektorpartikel hergestellt und verwendet. Bei diesen Vektoren ist der Replikationsdefekt eine sicherheitsrelevante Eigenschaft. So konzentrierten sich die ersten Untersuchungen auf die Möglichkeit einer Rekombination zwischen der transfizierten Vektor-RNA und der kotransfizierten Helfer-RNA. In Experimenten mit Nukleotidsequenzen entsprechend den Vektor- und Helfer-RNAs der SIN-Vektoren wurde gezeigt, dass nach Kotransfektion verschiedener deletierter oder mutierter defekter SIN-RNAs replikationskompetente Viren freigesetzt wurden. Die RNA-Genome dieser Viren sind durch Rekombination zwischen den kotransfizierten RNAs entstanden und waren teilweise sogar länger als das Wildtypgenom [20].

Um die Entstehung infektiöser, replikationskompetenter Viren zu vermeiden, wurde in das SFV-abgeleitete Helferplasmid (pSFV-Helfer1, Abb. 3a) eine Dreifachmutation an der proteolytischen Spaltstelle von p62 eingeführt. Die entstehenden, viralen Vektorpartikel sind nicht infektiös, weil sie ungespaltenes p62 in die Hülle einbauen (pSFV-Helfer2, Abb. 3b). Erst durch eine Aktivierung mit α -Chymotrypsin werden die viralen Vektorpartikel in einen infektiösen Zustand überführt [21]. Hierdurch sollte verhindert werden, dass im Falle einer Rekombination zwischen den RNAs die entstehenden Viren infektiös sind und sich vermehren können. Jedoch wurden sowohl bei SFV- als auch bei SIN-Strukturproteinen mit Mutationen der proteolytischen Spaltstelle von p62 bzw. PE2 Suppressormutationen („second site escape mutations“) beobachtet [9], die zu infektiösen Revertanten führten.

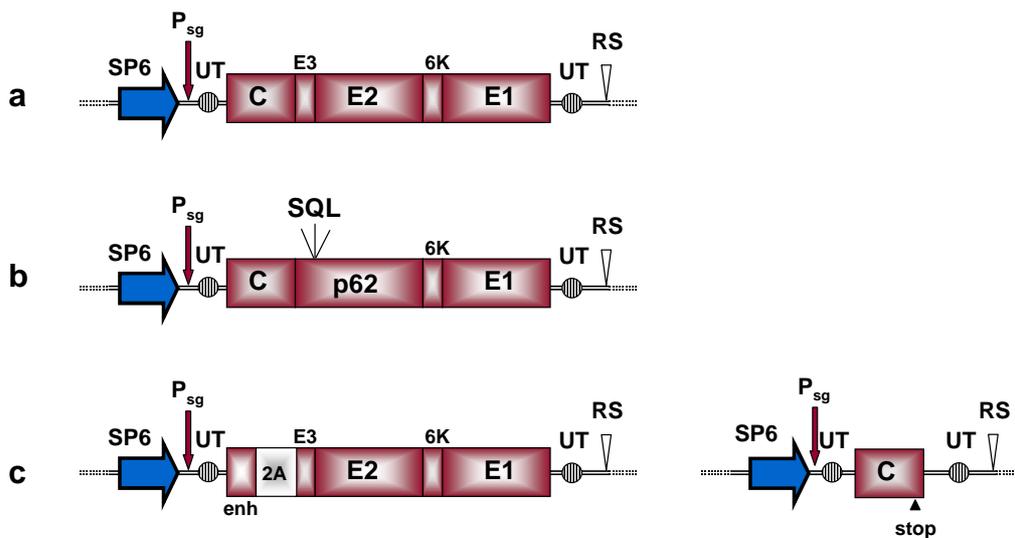


Abb. 3: Entwicklung von SFV-abgeleiteten Helferplasmiden

- Das Helferplasmid enthält die Wildtyp-Strukturproteingene (pSFV-Helfer1).
- Im Helferplasmid sind die drei Arginin-Reste an der proteolytischen Spaltstelle von p62 mutiert (SQL) (pSFV-Helfer2).
- Die Gene der Strukturproteine C und E3-E2-6K-E1 liegen auf zwei unabhängigen Helfer-Genomen vor („two-helper-system“).
stop: Mutation im Kapsidgen;
enh: Translationsenhancer des Kapsidproteins; 2A: 2A Autoprotease des Maul- und Klauenseuche-Virus.

Weitere Abkürzungen siehe Abb. 1 und 2.

Allgemein treten Suppressormutationen nur selten auf. Ebenso sind Rekombinationen zwischen den kotransfizierten RNAs seltene Ereignisse, sodass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten beider Ereignisse bei einem RNA-Molekül äußerst gering ist. Trotzdem führte die weitere Entwicklung der SFV-Helferplasmide zur Aufteilung der Leserahmen des Kapsidproteins und der Spike-Proteine E3-E2-6K-E1 auf zwei unabhängige Helfer-RNAs („two-helper RNA system“, Abb. 3c). Für eine effiziente Translation wurde der Translationsenhancer (enh) vom Kapsidprotein vor die Spike-Proteine E3-E2-6K-E1 gestellt. Um ihn dann zur korrekten Bildung der Spike-Proteine wieder zu entfernen, wurde zwischen den Proteinen E3-E2-6K-E1 und dem Translationsenhancer die 2A Autoprotease des Maul- und Klauenseuche-Virus eingeführt (2A). In dem auf der zweiten RNA liegenden Leserahmen des Kapsidproteins wurde durch eine Mutation (stop) die Autoprotease-Aktivität des Kapsidproteins ausgeschaltet, wodurch eine weitere Verbesserung der Sicherheit erzielt wird [22]. Bei den so erzeugten viralen Vektorpartikeln ist nicht von einer Rekombination zwischen den RNAs zu vollständiger infektiöser RNA auszugehen.

Kapsid-unabhängige Verpackung des Replikons durch virale Hüllproteine

Der erste Schritt bei der Bildung umhüllter RNA-Viren und davon abgeleiteter Vektorpartikel ist die intrazelluläre Zusammenlagerung von genomischer RNA oder Vektor-RNA und den Kapsidproteinen zum Nukleokapsid. Dieser Vorgang wird über das Verpackungssignal ψ auf der RNA vermittelt. Erst über eine Wechselwirkung zwischen dem Nukleokapsid und den viralen Hüllproteinen kommt es zum Zusammenbau des viralen Partikels.

Jedoch liegen auch Berichte über Verpackungsmechanismen bei SFV-abgeleiteten Vektoren vor, die von diesem Prinzip abweichen. So wurde beobachtet, dass Zellen nach Infektion mit einem eigentlich replikationsdefekten SFV-Vektor, der das Gen des Glykoproteins des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV-G) überträgt, replizierende Virus-ähnliche Partikel abgeben. Diese Virus-ähnlichen Partikel enthalten das SFV-Replikon und eine Membranhülle mit VSV-G [23], sind aber kleiner als SFV- oder VSV-Partikel. In diesem Bericht wird auch die Entstehung von solchen replizierenden Partikeln erwähnt, wenn mithilfe des SFV-Vektors das Glykoprotein des Rabies-Virus exprimiert wird. Die von diesen Partikeln in Zellkulturen gebildeten Plaques waren kleiner als nach VSV-G-Expression, was bedeutet, dass die Vermehrungsfähigkeit in Abhängigkeit des exprimierten viralen Hüllproteins unterschiedlich ausfällt. Auch in einem anderen Bericht wurde die Entstehung von replizierenden Virus-ähnlichen Partikeln beschrieben. Hier exprimierte der verwendete SFV-Vektor das Hüllprotein des murinen Leukämievirus [24].

Somit kann bei eigentlich replikationsdefekten SIN- oder SFV-abgeleiteten Vektoren nicht ausgeschlossen werden, dass replizierende Virus-ähnliche Partikel ausgebildet werden, wenn als Transgen das Gen eines viralen Hüllproteins übertragen wird.

2. Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit dem Sindbis-Virus- und dem Semliki-Forest Virus-Expressionssystem

Gefährdungspotenzial gentechnischer Arbeiten mit E. coli K12

Gentechnische Arbeiten mit *E. coli* K12-Derivaten, die Vektorplasmide einschließlich eines weiteren subgenomischen Nukleinsäureabschnitts oder die Helferplasmide enthalten, sind nach dem Stand von Wissenschaft und Technik ohne Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt.

Gefährdungspotenzial von Zellen mit viralem Replikon

Für die Sicherheitsbewertung von Zellen, auf welche Vektor-RNA übertragen wurde, ist die Möglichkeit der Entstehung viraler oder Virus-ähnlicher Partikel von Bedeutung. Hierbei ist

unerheblich, ob die Vektor-RNA als *in vitro* transkribierte RNA übertragen wurde (SP6-Kontrolle) oder ob sie erst nach Übertragung von cDNA in der Zelle transkribiert wird (Pol II-Kontrolle). Solange in der Zelle kein virales Hüllprotein exprimiert wird, können weder replikationskompetente noch replikationsdefekte Viruspartikel gebildet werden. Der Umgang mit solchen Zellen ist nach dem Stand von Wissenschaft und Technik ebenfalls ohne Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt, sofern das heterologe Protein kein Gefährdungspotenzial aufweist.

Bei den erwähnten Zellen wird davon ausgegangen, dass es sich um Zellen der Risikogruppe 1 handelt. Werden Zellen verwendet, die durch Infektion mit einem Mikroorganismus ein erhöhtes Gefährdungspotenzial aufweisen, ist dieses in die Risikobewertung einzubeziehen. Sind die Zellen mit Viren infiziert oder enthalten sie virale Hüllproteine, ist darüber hinaus eine Wechselwirkung mit diesen Viren bzw. Hüllproteinen zu berücksichtigen.

Gefährdungspotenzial der viralen Vektorpartikel

Bei Verwendung von Helfer-RNA mit vollständigem und unverändertem Leserahmen der Strukturproteine kann in den mit Vektor-RNA kotransfizierten Zellen die Entstehung replikationskompetenter, infektiöser Viren nicht ausgeschlossen werden. Die entsprechenden Arbeiten bergen daher ein geringes Risiko für den Menschen und die Umwelt.

Bei Verwendung von Helfer-RNA mit einer Dreifach-Mutation der proteolytischen Spaltstelle des E3/E2-Vorläuferproteins wird beim Umgang mit den viralen Vektorpartikeln vor und nach ihrer Aktivierung durch die Behandlung mit α -Chymotrypsin nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt ausgegangen. Die Vektorpartikel sind zwar nach ihrer Aktivierung infektiös, aber können sich nach einmaliger Infektion von Zellen nicht weiter ausbreiten.

Ist die Helferfunktion auf zwei Helfer-RNAs verteilt, ist davon auszugehen, dass die viralen Vektorpartikel replikationsdefekt sind, sofern kein virales Hüllprotein exprimiert wird. Die Infektion mit replikationsdefekten SIN- bzw. SFV-Vektoren führt normalerweise zur Zytolyse der infizierten Zelle. Auch wenn es nicht zur Lyse der infizierten Zelle kommt, wird die Vektor-RNA nicht in den Zellkern eingeschleust. Die entsprechenden Arbeiten bergen daher kein Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt.

Gefährdungspotenzial des Transgens

Bei viralen Vektoren mit dem Gen eines viralen Hüllproteins als Transgen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese viralen Hüllproteine auch in die Vektorhülle eingebaut werden oder selbst die Vektor-RNA verpacken. In diesen Fällen können nach Infektion weiterer Zellen Virus-ähnliche replizierende Partikel ausgebildet werden. Diese Partikel sowie die damit infizierten Zellen können ein geringes Gefährdungspotenzial aufweisen. Hiervon ausgenommen ist die Expression des Hüllproteins muriner ecotroper Retroviren (nicht Lake Casitas Virus) sowie die Expression des Hüllproteins der aviären Retroviren des Subtyps A und B, da diese Hüllproteine ohne Gefährdungspotenzial und sehr labil sind, und sich ihr Wirtsbereich auf Mäuse und Ratten oder Vögel begrenzt.

3. Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit dem Sindbis-Virus- und dem Semliki-Forest-Virus-Expressionssystem

Im Folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten mit dem SIN- und SFV-Expressionssystem zusammengefasst. Die Kriterien gelten für gentechnische Arbeiten mit SIN- oder SFV-Vektoren, die ein Transgen ohne pathogenes Potenzial übertragen. Sollen Prion-Proteine, Proteine mit transformierendem Potenzial oder Toxine exprimiert werden, ist eine Einzelfallbewertung erforderlich.

Hinweise

- a. Bei den bewerteten Vektorplasmiden handelt es sich um pBR-Derivate, die als cDNA das Verpackungssignal ψ , die *cis*-regulatorischen Sequenzen für Replikation und Translation der viralen RNA, dem Leserahmen der Nichtstrukturproteine und den subgenomischen Promotor von SIN oder SFV enthalten. Sie verfügen darüber hinaus über eine Insertionsstelle für das heterologe Gen und Restriktionsschnittstellen zur Linearisierung des Plasmids. Zur Expression des viralen Replikons und des heterologen Gens enthalten die Vektoren entweder einen Promotor zur *in vitro* Transkription oder einen Polymerase II-Promotor.
- b. Die bewerteten Helferplasmide sind ebenfalls pBR-Derivate, die als cDNA *cis*-regulatorische Sequenzen für die Replikation und Translation der RNA sowie den Leserahmen eines oder mehrerer Strukturproteine von SIN oder SFV enthalten. Ihnen fehlt ein Verpackungssignal. Zur Expression der Helfer-RNA besitzen die Plasmide entweder einen Promotor zur *in vitro* Transkription oder einen Polymerase II-Promotor.
- c. In den Kriterien wird von der Einführung von Vektor-RNA oder von Helfer-RNA in Zellen gesprochen. Dies kann entweder durch Einführung *in vitro* transkribierter RNA oder durch Übertragung von Plasmiden mit den genannten Funktionen als cDNA unter Kontrolle eines Polymerase II-Promotors erfolgen.
- d. Von den besonderen Kriterien zur Expression viraler Hüllproteine, sind das Hüllprotein muriner ecotroper Retroviren (nicht Lake Casitas Virus) sowie das Hüllprotein der aviären Retroviren des Subtyps A und B ausgenommen.
- e. Mit den rekombinanten, replikationsdefekten SIN- bzw. SFV-Vektoren infizierte Tiere und Zelllinien geben nur dann rekombinante, replikationsdefekte SIN- bzw. SFV-Vektorpartikeln ab, wenn
 - von einer Kontamination mit replikationskompetenten, infektiösen Viren auszugehen ist,
 - oder die rekombinanten Vektoren ein virales Hüllprotein exprimieren und Virus-ähnliche Partikel ausbilden.

Die Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit den infizierten Zellen oder Tieren richten sich daher nach der Risikogruppe des rekombinanten SIN- bzw. SFV-Vektorpartikels. Die infizierten Tiere werden selbst aber nicht zu GVO.

Tiere, die mit rekombinanten, replikationsdefekten SIN- bzw. SFV-Vektorpartikeln infiziert werden, bei denen nicht von einer Kontamination mit replikationskompetenten Viren auszugehen ist, sind keine GVO und auch nicht in der Lage, GVO abzugeben. Die Tiere sind für eine gewisse Zeit Träger von GVO der Risikogruppe 1.

Übertragung von SIN- bzw. SFV-abgeleiteten Vektorplasmiden oder Helferplasmiden auf *E. coli* K12

- 3.1. *E. coli* K12 und seine Derivate einschließlich der o.g. Vektor-Plasmide mit subgenomischen viralen oder zellulären Nukleinsäureabschnitten oder der o.g. Helferplasmide sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 1**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

Einführung der Vektor-RNA in eukaryote Zellen

- 3.2. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 einschließlich Vektor-RNA mit einem subgenomischen viralen (Ausnahme: Hüllproteingen) oder zellulären

Nukleinsäureabschnitt sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 1**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

- 3.3. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 einschließlich Vektor-RNA mit dem Gen eines viralen Hüllproteins können replikationskompetente, infektiöse Virus-ähnliche Partikel abgeben. Diese Zellen sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 2**. Diese Einstufung ist unabhängig vom Vorhandensein getrennt oder verändert vorliegender SIN- bzw. SFV-Strukturproteine. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

Hinweis: Wenn gezeigt wird, dass keine Virus-ähnlichen, replizierenden Partikel gebildet werden, trifft das unter 3.2. genannte Kriterium zu.

- 3.4. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 2 einschließlich Vektor-RNA mit einem subgenomischen viralen oder zellulären Nukleinsäureabschnitt sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 2**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

Erzeugung SIN- bzw. SFV-abgeleiteter Vektorpartikel

- 3.5. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 einschließlich Vektor-RNA mit einem subgenomischen viralen oder zellulären Nukleinsäureabschnitt, die zusätzlich einen vollständigen Leserahmen von unveränderten SIN- bzw. SFV-Strukturproteinen enthalten, können replikationskompetente, infektiöse Vektorpartikel abgeben. Diese Zellen sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 2**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.6. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 einschließlich Vektor-RNA mit einem subgenomischen viralen (Ausnahme: Hüllproteingen) oder zellulären Nukleinsäureabschnitt, die zusätzlich SIN- bzw. SFV-Strukturproteine mit einer dreifach Mutation der proteolytischen Spaltstelle des E3-E2-Vorläuferproteins enthalten, können replikationskompetente, aber nicht infektiöse Vektorpartikel abgeben. Diese Zellen sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 1**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.7. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 einschließlich Vektor-RNA mit einem subgenomischen viralen (Ausnahme: Hüllproteingen) oder zellulären Nukleinsäureabschnitt, die zusätzlich das Gen für das Kapsidprotein C getrennt von den anderen SIN- bzw. SFV-Strukturproteinen enthalten, können infektiöse, aber replikationsdefekte Vektorpartikel abgeben. Diese Zellen sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 1**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.8. Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 einschließlich Vektor-RNA mit einem viralen Hüllprotein geben möglicherweise infektiöse und replikationskompetente Virus-ähnliche Partikel ab. Auch nach den unter 3.6. und 3.7. beschriebenen Bedingungen Diese Zellen sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 2**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

Umgang mit SIN- bzw. SFV-Vektorpartikeln

- 3.9.** Virale Vektorpartikel, die wie unter **3.5.** und **3.8.** beschrieben erzeugt wurden, sind infektiös und enthalten möglicherweise auch replikationskompetente Viren. Die so erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- Hinweis:** Wenn gezeigt wird, dass keine replikationskompetenten viralen oder Virus-ähnlichen Partikel vorliegen, treffen die unter **3.10.** und **3.11** genannten Kriterien zu.
- 3.10.** Virale Vektorpartikel, die wie unter **3.6.** beschrieben erzeugt wurden, sind vor einer Behandlung mit α -Chymotrypsin nicht infektiös und nach der Behandlung mit α -Chymotrypsin nicht in der Lage sich auszubreiten. Die so erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.11.** Virale Vektorpartikel, die kein Hüllprotein exprimieren, die wie unter **3.7.** beschrieben erzeugt wurden, sind infektiös, aber replikationsdefekt. Die so erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

Infektion eukaryoter Zellen mit viralen Vektorpartikeln

- 3.12.** Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1, die mit den unter **3.9.** beschrieben viralen Vektorpartikeln infiziert wurden, können replikationskompetente virale oder Virus-ähnliche Partikel der Risikogruppe 2 abgeben. Die so erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.13.** Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1, die mit den unter **3.11.** beschrieben viralen Vektorpartikeln infiziert wurden, geben keine replizierenden viralen Partikel ab. Die so erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.14.** Eukaryote Zellen der Risikogruppe 1, die mit den unter **3.10.** beschrieben aktivierten viralen Vektorpartikeln infiziert wurden, können virale Partikel der Risikogruppe 1 abgeben. Die so erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.15.** Eukaryote Zellen der Risikogruppe 2 infiziert mit den unter **3.9.**, **3.10.** oder **3.11.** beschrieben viralen Vektorpartikeln, sind gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 2**. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

Literatur:

- [1] Atkins G.J., Sheahan B.J., Liljestrom P. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *J Gen Virol* 1999 Sep;80 (Pt 9):2287-97.
- [2] Strauss J.H., Strauss E.G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 1994 Sep;58(3):491-562.
- [3] Willems W.R., Kaluza G., Boschek C.B., et al. Semliki forest virus: cause of a fatal case of human encephalitis. *Science* 1979 Mar 16;203(4385):1127-9.
- [4] Frolova E., Frolov I., Schlesinger S. Packaging signals in alphaviruses. *J Virol* 1997 Jan;71(1):248-58.
- [5] White C.L., Thomson M., Dimmock N.J. Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. *J Virol* 1998 May;72(5):4320-6.
- [6] Kim K.H., Rumenapf T., Strauss E.G., Strauss J.H. Regulation of Semliki Forest virus RNA replication: a model for the control of alphavirus pathogenesis in invertebrate hosts. *Virology* 2004 May 20;323(1):153-63.
- [7] Merits A., Vasiljeva L., Ahola T., Kaariainen L., Auvinen P. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J Gen Virol* 2001 Apr;82(Pt 4):765-73.
- [8] Salonen A., Vasiljeva L., Merits A., Magden J., Jokitalo E., Kaariainen L. Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J Virol* 2003 Feb;77(3):1691-702.
- [9] Heidner H.W., McKnight K.L., Davis N.L., Johnston R.E. Lethality of PE2 incorporation into Sindbis virus can be suppressed by second-site mutations in E3 and E2. *J Virol* 1994 Apr;68(4):2683-92.
- [10] Salminen A., Wahlberg J.M., Lobigs M., Liljestrom P., Garoff H. Membrane fusion process of Semliki Forest virus. II: Cleavage-dependent reorganization of the spike protein complex controls virus entry. *J Cell Biol* 1992 Jan;116(2):349-57.
- [11] Polo J.M., Gardner J.P., Ji Y., et al. Alphavirus DNA and particle replicons for vaccines and gene therapy. *Dev Biol (Basel)* 2000;104:181-5.
- [12] Agapov E.V., Frolov I., Lindenbach B.D., Pragai B.M., Schlesinger S., Rice C.M. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 27;95(22):12989-94.
- [13] Perri S., Driver D.A., Gardner J.P., et al. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that establish persistent replication in host cells. *J Virol* 2000 Oct;74(20):9802-7.
- [14] Bredenbeek P.J., Frolov I., Rice C.M., Schlesinger S. Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J Virol* 1993 Nov;67(11):6439-46.
- [15] Liljestrom P., Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* 1991 Dec;9(12):1356-61.
- [16] Dubensky T.W., Jr., Driver D.A., Polo J.M., et al. Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer. *J Virol* 1996 Jan;70(1):508-19.
- [17] Lundstrom K., Schweitzer C., Rotmann D., Hermann D., Schneider E.M., Ehrenguber M.U. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett* 2001 Aug 31;504(3):99-103.
- [18] Lundstrom K. Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy. *Technol Cancer Res Treat* 2002 Feb;1(1):83-8.
- [19] Rheme C., Ehrenguber M.U., Grandgirard D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. *Exp Physiol* 2005 Jan 1;90(1):45-52.
- [20] Weiss B.G., Schlesinger S. Recombination between Sindbis virus RNAs. *J Virol* 1991 Aug;65(8):4017-25.

- [21] Berglund P., Sjoberg M., Garoff H., Atkins G.J., Sheahan B.J., Liljestrom P. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N Y)* 1993 Aug;11(8):916-20.
- [22] Tubulekas I., Liljestrom P. Suppressors of cleavage-site mutations in the p62 envelope protein of Semliki Forest virus reveal dynamics in spike structure and function. *J Virol* 1998 Apr;72(4):2825-31.
- [23] Smerdou C., Liljestrom P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J Virol* 1999 Feb;73(2):1092-8.
- [24] Rolls M.M., Webster P., Balba N.H., Rose J.K. Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 1994 Nov 4;79(3):497-506.