

Zw. 22.11.20

**Sicherheitseinstufung
gentechnischer Arbeiten**

**Landesamt für Gesundheit
und Soziales – Berlin**

1. Zusammenfassung

1.1 Nr. der Anlage: 92/14
Nr. der Arbeit: 92/14-3

1.2 Projektleiter: Frau Dr. Katharina Achazi
Herr Dr. Daniel Lauster

1.3 Betreiber: Freie Universität Berlin

1.4 Thema der gentechnischen Arbeit

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

1.5 Kurzfassung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeiten ist die Bindungscharakterisierung von Influenza-A-Viren (FLUAV) an Zelloberflächen verschiedener Zelltypen. Es wird unter anderem die Bindungsspezifität des Hämagglutinins (HA) und der Neuraminidase (NA) an Erythrozyten, Säuger-, Hühnerzelllinien oder humanen und nicht humanen Primärzellen untersucht. Dies erfolgt durch Charakterisierung der Infektionskinetik (Bindung, Aufnahme, Replikation) in Gegenwart und Abwesenheit von Bindungsinhibitoren. Grundlegende Intention dabei ist die Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe, die eine FLUAV-Infektion hemmen oder unterbinden können.

Dazu werden in dieser Arbeit zwei rekombinant erzeugte Reassortanten von Influenza-A-Virusstämmen X31 (H3N2) und LP-H5N1 (H5N1) verwendet. Diese rekombinanten replikationskompetenten FLUAV-Reassortanten werden mithilfe des 8-Plasmid-Systems, erstmals beschrieben von Hoffmann *et al.*¹, hergestellt. Die erforderlichen Nukleinsäuresequenzen der FLUAV liegen jeweils auf dem bidirektionalen Plasmid pHW2000 vor. Von diesem werden die komplementären RNA-Segmente jeweils unter der Kontrolle eines Polymerase I-Promotors in negativ-Strang-Orientierung und jeweils unter der Kontrolle eines Polymerase II-Promotors in positiv-Strang-Orientierung transkribiert. Somit werden die viralen RNA-Segmente als auch die viralen Proteine gebildet. Vermehrt werden die erzeugten FLUAV in embryonierten Hühnereiern oder permissiven Zelllinien wie z. B. MDCK-II Zellen.

1.6 Einschätzung der Sicherheitsstufe durch den Antragssteller

Sicherheitsstufe 2

¹ E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka, G Hobom, RG.Webster (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(11): 6108-6113

2. Bewertung der vorgesehenen Arbeiten

2.1 Risikogruppen der Spenderorganismen

gemäß § 5 Absatz 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 1 und 2 GenTSV

- 2.1.1 humanes Influenza-A-Virus (FLUAV)
A/Aichi/2/1968 (H3N2)

Risikogruppe 2

Es liegt die komplementäre Nukleinsäuresequenz der Genom-segmente HA (monobasische Spaltstelle) und NA vor.

- 2.1.2 niedrig pathogenes aviäres Influenza-A-Virus (FLUAV)
A/teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1)

Risikogruppe 2

Es liegt die komplementäre Nukleinsäuresequenz der Genom-segmente HA (monobasische Spaltstelle) und NA vor.

- 2.1.3 humanes Influenza-A-Virus (FLUAV) - Laborstamm -
A/WSN/1933 (H1N1)

Risikogruppe 2

Es liegt die komplementäre Nukleinsäuresequenz aller Genom-segmente vor.

- 2.1.4 humanes Influenza-A-Virus (FLUAV) - Laborstamm -
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

Risikogruppe 2

Es liegt die komplementäre Nukleinsäuresequenz aller Genom-segmente vor.

2.2 Risikogruppen der Empfängerorganismen

gemäß § 5 Absatz 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 1 und 2 GenTSV

2.2.1 etablierte Zelllinien

humane Zelllinien:

HEK 293T von HEK 293 Zellen abgeleitete schnellwachsende Variante, exprimieren ein temperatursensitives SV40-T-Antigen

HeLa Zellen eines humanen Zervixkarzinoms, enthalten ins Genom integriert ca. 10 bis 50 Kopien subgenomischer HPV 18 DNA

Calu-3 humane Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie

A549 humane Lungenkarzinomzellen

16HBE14o humane Bronchialepithelzelllinie, immortalisiert mit einem ori-defekten SV40-Plasmid

nicht humane Zelllinien:

Vero Nierenzelllinie der grünen Meerkatze

Vero E6 auch VeroC100 genannt; epitheliale Nierenzelllinie der grünen Meerkatze; Subklon der Zelllinie Vero

MDCK Nierenzelllinie eines Hundes; heterogene Zelllinie, ermöglicht die Vermehrung von verschiedenen Viren

MDCK II mehrfach passagierte MDCK-Zelllinie

BHK-21 embryonale Hamster-Nierenzelllinie

CHO-K1 Eierstockkrebs-Zelllinie eines chinesischen Hamsters, Subklon der Zelllinie CHO

Risikogruppe 1

zur Infektion mit rekombinanten replikationskompetenten Influenza-A-Viren
oder
zur Transfektion mit einer Kombination von Plasmiden abgeleitet von

pHW2000

bidirektionaler Expressions- und Transkriptionsvektor von FLUAV-Proteinen und viraler RNA:
[ColE1-Derivat (*ori*, *bla*); vorfrüher hCMV-Promotor des humanen Cytomegalievirus und muriner RNA-Polymerase I-Terminator; Polylinker; humaner RNA-Polymerase I-Promotor (auf Gegenstrang); *poly(A)*-Signal des bovinen Wachstumshormongens]

die jeweils ein RNA-Segment der FLUAV gemäß 2.1 enthalten

2.2.2 primäre Zellen

primäre humane respiratorische Epithelzellen aus einer Biobank, entnommen von klinisch unauffälligen Spendern und nachweislich frei von HIV, HCV und HBV oder nicht humane Primärzellen von symptomfreien Nagetieren aus veterinärmedizinisch überprüften Beständen

Risikogruppe 1

zur Infektion mit rekombinanten replikationskompetenten Influenza-A-Viren

2.3 Risikogruppen der gentechnisch veränderten Organismen (GVO)

gemäß § 5 i. V. m. Anlage 1 Nr. 1 und 2 GentSV

2.3.1 etablierte Zelllinien der Risikogruppe 1

Zellen gemäß 2.2.2 in Verbindung mit einer Kombination mehrerer **pHW2000** Plasmide mit komplementären Nukleinsäuresequenzen jeweils der Genomsegmente

- HA, NA von A/Aichi/2/1968 (H3N2) und die übrigen von A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
- HA, NA von A/teal/Germany/Wv632/2005 (H5N1) und die übrigen von A/WSN/1933 (H1N1)

zur Herstellung der FLUAV X31 bzw. LP-H5N1

Risikogruppe 2

2.3.2 rekombinante replikationskompetente Influenza-A-Viren

abgegeben von den Verpackungsansätzen gemäß 2.3.1

Risikogruppe 2

Begründung

zu 2.3.1 und 2.3.2:

Etablierte Zelllinien der Risikogruppe 1 werden mit einer Kombination von Plasmiden transfiziert, welche die komplementäre Nukleinsäuresequenz je eines FLUAV-Genomsegments eines Influenza-A-Virus der Risikogruppe 2 enthalten. Die resultierenden rekombinanten Reassortanten verfügen gegenüber den Ausgangsviren nicht über eine gesteigerte Replikationseffizienz oder Virulenz im Säuger und weisen keine Verringerung der Sensitivität gegenüber antiviralen Wirkstoffen auf. Von einer Änderung des Zelltropismus oder Wirtsspektrums ist ebenfalls nicht auszugehen.

Die transfizierten Zellen geben rekombinante replikationskompetente Influenza-A-Viren ab. Es ist nicht davon auszugehen, dass das Gefährdungspotential der rekombinanten replikationskompetenten Influenza-A-Viren das der Wildtyp-Influenza-A-Viren der Risikogruppe 2 überschreitet. Das Gefährdungspotential der Viren bestimmt das Gefährdungspotential der transfizierten Zellen. Die transfizierten Zellen sind somit ebenso wie die rekombinanten replikationskompetenten Viren der Risikogruppe 2 zuzuordnen.

2.3.3 Infizierte Zelllinien und Primärzellen

Zelllinien gemäß 2.2.1 oder primäre Zellen gemäß 2.2.2, jeweils in Verbindung mit den rekombinanten replikationskompetenten Influenza-A-Viren gemäß 2.3.2

Risikogruppe 2

Begründung

Zellen der Risikogruppe 1 werden mit rekombinanten replikationskompetenten Influenza-A-Viren der Risikogruppe 2 infiziert und geben diese ab. Das Gefährdungspotential der rekombinanten Reassortanten bestimmt das Gefährdungspotential der infizierten Zellen. Die infizierten Zellen sind somit der Risikogruppe 2 zuzuordnen.

2.4 Einstufung der gentechnischen Arbeit

gemäß § 10 GenTSV (Arbeiten mit Mikroorganismen)

2.4.1 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.1

Sicherheitsstufe 2

Begründung

Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 1, Spender sind Organismen der Risikogruppen 1 und 2. Die Empfänger geben gentechnisch veränderte Organismen der Risikogruppe 2 ab. Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten gemäß einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 GenTSV nicht das Gefährdungspotential von Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine gentechnisch veränderten Organismen einer höheren Risikogruppe ab.

2.4.2 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.2

Sicherheitsstufe 2

Begründung

Die gentechnisch veränderten Organismen sind rekombinante replikationskompetente Influenza-A-Viren der Risikogruppe 2.

2.4.3 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.3

Sicherheitsstufe 2

Begründung

Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 1, Spender sind Organismen der Risikogruppe 2. Die Empfängerorganismen werden mit gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 2 infiziert.

Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten gemäß einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 GenTSV nicht das Gefährdungspotential von Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine gentechnisch veränderten Organismen einer höheren Risikogruppe ab.

- 2.4.4 Arbeiten mit embryonierten Hühnereiern, die mit den rekombinanten replikationskompetenten Influenza-A-Viren gemäß 2.3.2 infiziert wurden

Sicherheitsstufe 2

Begründung:

Organismen der Risikogruppe 1 werden mit gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 2 infiziert und geben diese ab. Die embryonierten Hühnereier sind Träger von GVO; es entsteht kein neuer GVO.

2.5 Sicherheitsmaßnahmen

gemäß Anlage 2 Teil A GenTSV (Laborbereich)

zu 2.4

Stufe 2

Weitere Maßnahmen: Keine

Hinweise:

1. Gemäß § 21 Absatz 3 und Absatz 5 GenTG hat der Betreiber unverzüglich der zuständigen Gentechnikbehörde jedes Vorkommnis mitzuteilen, das nicht dem erwarteten Verlauf der gentechnischen Arbeit entspricht, oder wenn ihm zu der gentechnischen Arbeit neue Informationen über Risiken für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt bekannt werden.
2. Sofern Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 nicht unter der Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt werden können, was ausschließlich für Arbeiten mit geringen Volumina statthaft ist, ist zusätzlich zur persönlichen Schutzausrüstung eine FFP2-Atmenschutzmaske zu tragen.

Auf folgende Stellungnahmen der ZKBS wird verwiesen:

- Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten mit rekombinanten Influenza-A-Viren; Az. 45310.0113, Stand Dezember 2021
- Einstufungshilfe für Influenza-A-Virus-Mutanten und -Reassortanten gemäß der Stellungnahme mit dem Az. 45310.0113, Stand Dezember 2021
- Risikobewertung von Influenzaviren als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV; Az. 6790-05-02-29, November 2015
- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten; Az. 6790-10-03, Aktualisierung vom Dezember 2009, Stand Mai 2010

Die allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS können unter der Internetadresse www.zkbs-online.de abgerufen werden.

Berlin, den 15.11.2022

