



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

Gentechnische Arbeiten mit SV40 als Spenderorganismus

1. Beschreibung des Simian Virus 40 (SV40)

1.1. Allgemeine Einführung

Die natürlichen Wirte von SV40 sind Affen, insbesondere Asiatische Makakken und Rhesus-Affen. Nahezu alle erwachsenen Rhesus-Affen sind mit SV40 infiziert. In seinem natürlichen Wirt verursacht SV40 keine klinischen Symptome. Eine Infektion von Affenzellen verläuft produktiv, Nagerzellen sind nicht-permissiv, menschliche Zellen sind semipermissiv für die SV40-Replikation [1, 6].

Das ikosaedrische SV40 Virion enthält ein zirkuläres, doppelsträngig kovalent geschlossenes Genom von 5243 Bp mit einem bidirektionalen Replikationsursprung (ori) und einer frühen und einer späten Gen-Region (s. Abb.). Das Genom liegt im Virion von Wirtszellhistonen verpackt vor. Die frühe und die späte Transkription beginnen in der Nähe des Replikationsursprungs und verlaufen divergent. Die frühe Region kodiert für zwei Tumorantigene, das kleine t-Antigen und das große T-Antigen, deren kodierende Regionen teilweise überlappen und die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Die späte Region kodiert für die Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3, wobei die kodierenden Regionen von VP2 und VP3 dem gleichen Leseraster angehören [1, 7].

Die Rolle des kleinen t-Antigens ist noch nicht geklärt, für die produktive Infektion scheint es nicht erforderlich zu sein, und über transformierendes Potential verfügt es nicht [1, 9].

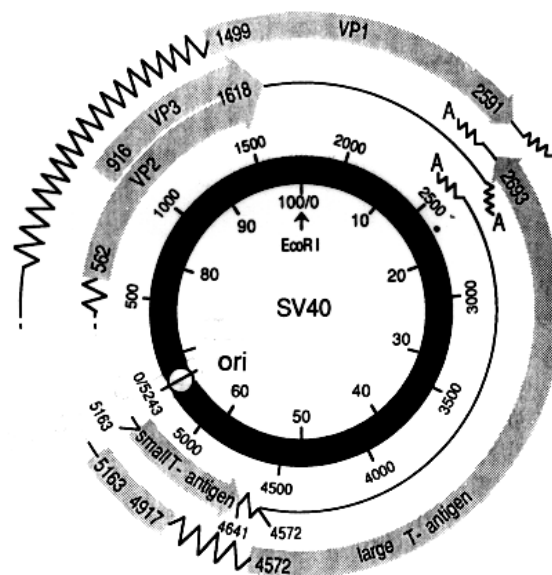
Das große T-Antigen ist ein multifunktionales Phosphoprotein. Es ist im Zellkern der infizierten Wirtszelle lokalisiert und bindet an spezifische DNA-Sequenzen im SV40-ori sowie an eine Reihe zellulärer Proteine. Als biochemische Eigenschaften weist es unter anderem ATPase- und DNA-Helikase-Aktivitäten auf. In permissiven Zellen ist es als Komplex mit der Wirtszell-DNA-Polymerase an der viralen DNA-Replikation beteiligt, in nicht-permissiven Zellen kann es durch Bindung der Tumorsuppressorproteine pRb und p53 die unkontrollierte Zellproliferation hervorrufen. In-vitro kann die Expression des T-Antigens in primären menschlichen Zellen die Seneszenz der Zellen um 30 bis 40 Passagen verzögern, in seltenen Fällen erfolgt eine Immortalisierung, wobei das Gen des T-Antigens in das Wirtszellgenom integriert wird [1, 7, 9, 10].

Nieren von Rhesusaffen können latent mit SV40 infiziert sein. Als Verunreinigung in Zellkulturen von Affennieren wurde SV40 schließlich um 1960 entdeckt. Diese Entdeckung rief aus zwei Gründen Besorgnis hervor:

1. SV40 war eine nicht erkannte und weit verbreitete Kontamination in viralen Impfstoffen (Poliomyelitis-Impfstoff, Adenovirus-Impfstoff), die auf Affennierenzellen hergestellt wurden und die zwischen 1955 und 1963 weltweit Millionen von Personen verabreicht

wurden. Allein in den USA wurde 98 Millionen Personen kontaminierter Poliomyelitis-Impfstoff injiziert, 10 000 Personen erhielten ihn oral, 100 000 Personen wurde kontaminierter Adenovirus-Impfstoff injiziert [6].

- SV40 hat onkogenes Potential. Nach Injektion in neugeborene Hamster kann es Tumore verursachen. Sein immortalisierendes Potential für menschliche Zellen wurde in-vitro dokumentiert [1, 7, 9, 10].



Genomkarte von SV40 mit Replikationsursprung, den frühen und späten Genen

Die relativen Karteneinheiten (0-100), die Nucleotidpositionen sowie der Replikationsursprung (ori) sind gekennzeichnet. Die fünf Virus-kodierten Proteine werden durch schattierte Pfeile dargestellt; nicht-translatierte mRNA-Bereiche werden durch gerade Linien gekennzeichnet. Introns sind als Wellenlinien abgebildet, Wellenlinien mit A markieren das 3'-Ende des PolyA-Segments (nach Fields, B.N. and Knipe, D.M. (1990). Virology, 2. Raven Press, New York).

Somit kam SV40 als Verursacher menschlicher Erkrankungen in Betracht. Insbesondere wurde dem Schicksal dieses geimpften Personenkreises erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet.

SV40-verwandte humanpathogene Papovaviren wie z.B. das neurotrope JC-Virus, welches progressive multifokale Leukoencephalopathie (PML) verursachen kann [2], oder das BK-Virus, dessen Beteiligung an Erkrankungen noch nicht geklärt ist [3], wurden beschrieben. Aber es gibt nur spärliche Hinweise auf ein humanpathogenes Potential von SV40 [6]. Papovaviren mit hoher Homologie zu SV40, die keine JCV sind, wurden aus einigen Patienten mit progressiver multifokaler Leukoencephalopathie [4] isoliert. Ein SV40-verwandtes Virus wurde aus einem menschlichen Melanom [5] isoliert. SV40-ähnliche DNA-Sequenzen wurden ferner in Ependymomen und Choroid-Plexus-Tumoren von Kindern [8] sowie in menschlichen Mesotheliomen [11] gefunden. Ein statistisch signifikanter Hinweis auf eine erhöhte Inzidenz von Tumoren liegt jedoch bisher nicht vor. Da aber erst in jüngerer Zeit wieder ein Bericht über einen Nachweis von DNA-Sequenzen, die mit SV40-DNA übereinstimmen, in menschlichen Tumoren [11] veröffentlicht wurde, erscheint der Zeitraum nach der Impfstoffkontamination immer noch zu kurz,

um zum derzeitigen Zeitpunkt das humanpathogene Potential von SV40, insbesondere seine Beteiligung an menschlichen Tumoren, abschließend zu bewerten. Eine Verursachung akuter oder häufiger Erkrankungen mit nur kurzer Latenz kann dagegen ausgeschlossen werden.

1.2. Gentechnische Arbeiten mit SV40

SV40 wird häufig als Modellsystem für eukaryote DNA-Replikation herangezogen, weil sich seine DNA im Kern der infizierten Wirtszelle als „Minichromosom“ repliziert und sich dabei der Proteine der Wirtszelle für die Replikation und für das „chromatin assembly“ bedient. Darüberhinaus sind seine immortalisierenden/transformierenden Eigenschaften für eine ganze Reihe primärer Zellen verschiedener Spezies, einschließlich des Menschen, nicht nur das Werkzeug zur Etablierung von Zelllinien, sondern sie sind auch als Gegenstand von Untersuchungen zur Ursache der zellulären Proliferationskontrolle wissenschaftlich von großer Bedeutung.

Zunehmend wird anstelle einer Infektion von Zellen mit Virus entweder das SV40-Genom oder nur noch das Gen des großen T-Antigens oder ein anderer subgenomischer Nukleinsäureabschnitt übertragen. Zur Vorbereitung der Transfektion von Zellkulturen werden bei gentechnischen Arbeiten mit SV40 als Spenderorganismus sowohl das vollständige Genom als auch subgenomische Nukleinsäureabschnitte in pBR-abgeleitete Vektoren inseriert und in *E. coli* K12-Derivate eingeführt. Die amplifizierten rekombinanten Plasmide werden dann in Säugerzellen transfiziert und dort zur Expression gebracht.

Für *in-vitro*-Untersuchungen wird auch häufig ein subgenomischer Nukleinsäureabschnitt in einem *E. coli* K12-Derivat exprimiert.

2. Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit SV40 als Spenderorganismus

Bei der Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten zur Übertragung vollständiger Genome von SV40, auch wenn diese durch Vektorsequenzen unterbrochen sind, auf *E. coli* K12-Derivate oder auf eukaryote Zellen, wird das Gefährdungspotential von SV40 vollständig in die Risikobetrachtung einbezogen, wenn die SV40-Genome im gentechnisch veränderten Organismus (GVO) extrachromosomal vorliegen. Damit wird bei permissiven oder semipermissiven Zellen der Möglichkeit der Ausbildung infektiöser Viruspartikel Rechnung getragen. Bei anderen Empfängerorganismen, die selbst nicht das Virus vermehren können, wird die Möglichkeit der Übertragung des SV40-Genoms auf menschliche Zellen nach Inhalation von GVO-haltigen Aerosolen bei der Risikobewertung in Betracht gezogen, da nach Übertragung des SV40-Genoms auf menschliche Zellen mit der Entstehung infektiöser Viruspartikel zu rechnen ist, die sich im menschlichen Organismus ausbreiten können. Somit ist bei den genannten gentechnischen Arbeiten ein geringes Risiko für den Menschen nicht auszuschließen.

Bei subgenomischen Nukleinsäureabschnitten, die für Kapsidproteine oder für das kleine t-Antigen kodieren, ist nicht von einem Gefährdungspotential für den Menschen auszugehen.

Liegt das Gen des großen T-Antigen in Verbindung mit Promotoren, die in Säugerzellen wirksam sind, vor, ist von einem geringen Gefährdungspotential für den Menschen auszugehen. Bei gentechnischen Arbeiten mit dem Gen des großen T-Antigens wird aber diesem Gefährdungspotential wirksam begegnet, wenn das dabei verwendete Vektor-Empfänger-System einer biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht. Ebenso wird nicht von einem Gefährdungspotential ausgegangen, wenn das Gen des großen T-Antigens im Genom eines Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 integriert vorliegt.

Liegt das Gen des großen T-Antigens mit Promotoren vor, die in Säugerzellen nicht wirksam sind, oder liegt es ohne Promotoren vor, ist nicht von einem Gefährdungspotential für den Menschen auszugehen.

3. Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit SV40 als Spenderorganismus

Im folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten mit SV40 als Spenderorganismus zusammengefaßt.

- 3.1.** Wird ein subgenomischer oder ein subgenischer Nukleinsäureabschnitt von SV40 in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential), und ist dieser nicht in der Lage, die fehlenden SV40-Sequenzen zu komplementieren, so ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, falls das Vektor-Empfänger-System einer biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.2.** Wird ein subgenomischer Nukleinsäureabschnitt von SV40, der für das große T-Antigen kodiert und unter Kontrolle von in Säugerzellen wirksamen Promotoren steht, in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential), und liegt dieser Nukleinsäureabschnitt von SV40 extrachromosomal vor, so ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, es sei denn, das Vektor- Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.3.** Wird ein subgenomischer Nukleinsäureabschnitt von SV40, der für das große T-Antigen kodiert und nicht unter Kontrolle von in Säugerzellen wirksamen Promotoren steht, in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential), und liegt dieser Nukleinsäureabschnitt von SV40 extrachromosomal vor, so ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, auch wenn das Vektor-Empfänger-System keiner biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.4.** Wird ein subgenomischer Nukleinsäureabschnitt von SV40, der für das große T-Antigen kodiert, in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential), der nicht in der Lage ist, die fehlenden SV40-Sequenzen zu komplementieren, und integriert der Nukleinsäureabschnitt von SV40 in das Wirtsgenom, ist der gentechnisch veränderte Organismus unabhängig von der Expressionskontrolle des T-Antigens der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, auch wenn das Vektor-Empfänger-System keiner biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

- 3.5. Wird ein subgenomischer Nukleinsäureabschnitt von SV40, der für Kapsid-Proteine oder für das kleine t-Antigen kodiert, oder der einen subgenomischen Nukleinsäureabschnitt darstellt, in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential), und ist dieser nicht in der Lage, die fehlenden SV40-Sequenzen zu komplementieren, ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, auch wenn das Vektor-Empfänger-System keiner biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.6. Wird die gesamte genomische Information von SV40 in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential), und liegt das SV40-Genom extrachromosomal vor, so ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, auch wenn es sich bei dem Vektor-Empfänger-System um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.7. Wird die gesamte genomische Information von SV40 in einen nicht-permissiven Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt (auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotential) und integriert das SV40-Genom in das Wirtschromosom, so ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, auch wenn das Vektor-Empfänger-System keiner biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.8. Werden Empfängerorganismen der Risikogruppe 1 mit verschiedenen unter 3.1. genannten Plasmiden kotransfiziert und besteht die Möglichkeit, daß durch Rekombination der Nukleinsäuren SV40-Virionen ausgebildet werden können, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

4. Literatur

- [1]. Fields, B.N. and Knipe, D.M. (1990). *Virology*, 1, 2. Raven Press, New York
- [2]. Padgett, B.L., Walker, D.J., zur Rhein, G.M., et al. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257 - 1260.
- [3]. Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V. et.al. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253 - 1257.
- [4]. Weiner, L.P., Herndon, R.M., Narayan, O., Johnson, R.T., Shah, K., Rubinstein, L.J., Preziosi, T.J., and Conley, F.K. (1972). Isolation of virus related to SV40 from patients with progressive multifocal leucoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.* Vol 286, No. 8 385 - 390.
- [5]. Soriano, F., Shelburne, C.E. and Gökçen, M. (1974). Simian virus 40 in a human cancer. *Nature* 249: 421 - 424.
- [6]. Shah, K., and Nathanson, N. (1976). Human exposure to SV40: Review and comment. *Am. J. Epidemiol.* 103: 1 - 11.
- [7]. Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Ysebaert, M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273: 113 - 120.
- [8]. Bergsagei, D.J., Finegold, M.J., Butel, J.S., Kupsky, W.J., Garcea, R.L. (1992). DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N. Engl. J. Med.* Vol 305, No. 25: 988 - 993.
- [9]. Manfredi, J.J., and Prives, C. (1994). The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 65 - 83.
- [10]. Bryan, T.M., and Reddel, R.R. (1994). SV40-induced immortalization of human cells. *Critical reviews in Oncogenesis* 5: 331 - 357.
- [11]. Carbone, M., Pass, H.I., Rizzo, P., Marinetti, M.R., Di Muzio, M., Mew, D.J.Y., Levine, A.S., and Procopio, A. (1994). Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 9: 1781 - 1790.