Az. 6790-05-02-41 Aktualisierung vom Juni 2015

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung gentechnisch veränderter Baculoviren gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Baculoviren

Baculoviren kommen in der Natur verbreitet vor und infizieren Lepidoptera-Raupen [1]. In der Landwirtschaft werden sie als Insektizide eingesetzt [2]. Es sind umhüllte Viren mit einem doppelsträngigen, zirkulären DNA-Genom von 80-180 Kbp. Transkription, DNA-Replikation und Bildung des Nukleokapsides erfolgen im Kern der infizierten Wirtszelle. Während der produktiven Infektion in permissiven Zellen erfolgt keine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom [3]. Charakteristisch für den Infektionszyklus ist die Ausbildung zweier unterschiedlicher Virionphänotypen: zum frühen Zeitpunkt der Infektion, ab 6-8 h nach Infektion, wird das *budded virus* (BV) an der Zytoplasmamembran gebildet und zum späten Zeitpunkt, ab 18 h nach Infektion, das *occlusion-derived virus* (ODV) im Zellkern. BV ist infektiös in Zellkultur und vermittelt im infizierten Tier die Übertragung von Zelle zu Zelle. Sein Eintritt in die Wirtszelle erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Das virale GP64 ist ein Membranfusionsprotein und bei BV für das virale *budding*, den Viruseintritt in die Zelle und die Übertragung von Zelle zu Zelle essenziell [4]. ODV sind ebenfalls umhüllt und außerdem von einer kristallinen Matrix eingeschlossen. Diese wird von dem späten viralen Protein Polyhedrin gebildet. Im Darm der Raupe wird die Matrix aufgelöst und die Viren gelangen durch direkte Membranfusion an der Zelloberfläche in die Darmzellen des Wirtstieres [1].

Da Baculoviren auch als Pestizid Einsatz finden, wurden Wechselwirkungen mit Nicht-Zielorganismen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Baculoviren auch von Vertebratenzellen, einschließlich humanen Zellen [2], aufgenommen werden. Jedoch wird in diesen Zellen das virale Genom weder exprimiert noch repliziert [5, 6] und somit auch keine neuen Viruspartikel ausgebildet. In Säugerzellen, die mit dem Wildtyp-Virus inokuliert wurden, konnten keine zytogenetischen Auswirkungen auf die Chromosomen der Wirtszelle wie Chromosomen-Aberrationen und Schwester-Chromatiden-Austausche festgestellt werden [7]. Mithilfe von *Southern-Blot*-Hybridisierungen wurde eine lediglich transiente Verweildauer der viralen DNA von 24-48 h in humanen sowie Affen- und Hamsterzelllinien gezeigt [5].

Baculoviren werden gemäß § 5 Abs. 1 und Abs. 6 i. V. m. Anhang I Nr. 1 GenTSV als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Gentechnisch veränderte Baculoviren

Rekombinante Baculoviren haben für die Expression heterologer Proteine in Insektenzellen große Bedeutung erlangt [8-12]. Das hierfür in der Regel eingesetzte und am besten charakterisierte Baculovirus ist das *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Die Genomsequenz der meist verwendeten Klone 6 und E2 ist vollständig sequenziert und umfasst ca. 133,9 kbp [13]. Rekombinante AcMNPV können von Säugerzellen über Endozytose oder Phagozytose aufgenommen werden. Bei der Aufnahme scheint das Membranfusionsprotein GP64 eine entscheidende Rolle zu spielen, da eine effiziente Aufnahme von anderen, mit diesem Glykoprotein pseudotypisierten Viren, für humane und nicht-humane Primatenzellen beschrieben ist [14]. AcMNPV-spezifische Promotoren werden in Säugerzellen nicht erkannt. Liegt das eingebrachte Transgen jedoch unter Expressionskontrolle von in Säugerzellen aktiven Promotoren und Terminatoren vor, werden neben den frühen viralen auch die heterologen Gene transient exprimiert [8-12]. Ein vollständiger viraler Replikationszyklus kann in der Säugerzelle jedoch nicht ablaufen, so dass keine viralen Partikel gebildet und abgege-

BVL_FO_05_4100_402_V1.0

ben werden [8]. Die eingebrachte baculovirale DNA gelangt zwar in den Zellkern der transduzierten Zelle, eine Integration erfolgt jedoch nur bei entsprechendem Selektionsdruck [12, 14].

In der Regel werden heterologe Gene in die für die virale Replikation nicht essenziellen Gene für Polyhedrin- bzw. p10 eingefügt. Es können dabei bis zu 38 kb fremder DNA aufgenommen werden [16]. Die Expression des Transgens unterliegt dann der Kontrolle insektenspezifischer Promotoren. Zur Herstellung rekombinanter AcMNPV wurden anfänglich die heterologen Gene über homologe Rekombination in das AcMNPV-Genom eingefügt. Im Jahr 1993 wurde eine Methode beschrieben, nach der über spezifische Transposition das fremde Gen von einem Spender-Plasmid auf klonierte AcMNPV-DNA („bacmid") in *E. coli* DH10 übertragen wird. Das „bacmid" ist eine rekombinante baculovirale DNA, die in *E. coli* als Plasmid replizieren kann und für Lepidoptera-Zellen infektiös ist. Sie enthält ein mini-F-Replikon, einen Antibiotika-Resistenzmarker und die Zielnukleinsäuresequenz *att*Tn7 des Transposons Tn7. Eine Expressionskassette mit dem heterologen Gen unter regulatorischer Kontrolle des Polyhedrin- oder p10-Promotors und des SV40-Polyadenylierungssignals, die vom linken und rechten Ende von Tn7 flankiert wird und auf dem Spender-Plasmid liegt, kann in *E. coli* dann in die *att*Tn7-Stelle des „bacmid" transponiert werden, wenn die Transpositionsfunktion von Tn7 *in trans* durch ein Helfer-Plasmid zur Verfügung gestellt wird. Diese Methode wurde als Bac-to-Bac-System bezeichnet [17] und in der Folge weiter entwickelt. Um rekombinante Baculoviren für die Genexpression in Säugerzellen zu optimieren, wurden beispielsweise Vektorsysteme entwickelt, die zwei Expressionskassetten gleichzeitig auf AcMNPV-DNA übertragen, wobei eine Kassette das heterologe Gen von Interesse enthält und die zweite das Gen eines Glykoproteins, welches zur effizienten Transduktion von Säugerzellen in die virale Hülle eingebaut wird, wie z. B. das Glykoprotein von VSV-G [18]. Ein weiterer Ansatz verfolgt die gezielte Expression eines Transgens in der Säugerzelle. Das Transgen unterliegt dabei der Expressionskontrolle eines RNA-Polymerase-II-spezifischen Promotors, wie z. B. SV40-Promotor oder humanes *Cytomegalovirus major immediate early promotor* (hCMV-MIE), und des SV40-Polyadenylierungssignals (BacMam-Technologie [9, 19]).

Risikobewertung

Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die ein heterologes Gen ohne Gefährdungspotenzial exprimieren, werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anhang 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet. Dabei ist es nicht relevant, welcher Promotor die Expression des Proteins kontrolliert.

Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die ein heterologes Gen mit neoplastisch transformierendem Potenzial in Säugerzellen exprimieren können, werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anhang 1 Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Rekombinante AcMNPV mit unveränderter oder pseudotypisierter Hülle, die ein sonstiges heterologes Gen mit Gefährdungspotenzial exprimieren, bedürfen einer Einzelfallbewertung.

Begründung

Obwohl Baculoviren in der Landwirtschaft als Pestizid eingesetzt werden und von humanen und zahlreichen tierischen Zellen aufgenommen werden, sind keine schädlichen Auswirkungen auf Mensch oder Tiere (Ausnahme: Lepidoptera-Larven) festgestellt worden. Nach Pseudotypisierung mit heterologen Glykoproteinen kann von einer erhöhten Effizienz der Virusaufnahme ausgegangen werden. Die übertragene DNA ist aber lediglich für Lepidoptera-Zellen infektiös.

Ist das heterologe Gen ohne pathogenes Potenzial, erhöht sich das Gefährdungspotenzial des rekombinanten AcMNPV gegenüber Wildtyp-Baculoviren nicht. Die virale DNA repliziert nicht und wird nicht in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Expression ist lediglich transient.

Handelt es sich bei dem Transgen jedoch um ein Gen mit neoplastisch transformierendem Potenzial und unterliegt dessen Expression der Kontrolle eines in Säugerzellen aktiven Promo-

BVL_FO_05_4100_402_V1.0

tors, kann bei einer akzidentellen Exposition des Experimentators nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die rekombinanten Baculoviren von einzelnen Zellen aufgenommen werden und es dort zur Expression des Transgens kommt. Die Expression könnte zu einer Transformation der transduzierten Zelle führen. Die Übertragung eines solchen Gens ist mit einem erhöhten Gefährdungspotenzial verbunden. Um diesem entgegenzuwirken, werden Maßnahmen der Sicherheitsstufe 2 für den Umgang mit den rekombinanten Partikeln empfohlen. Zur Vermeidung einer nasalen oder oralen Aufnahme durch direkten Kontakt wird zudem das Tragen eines Mund- und Nasenschutzes empfohlen.

Literatur

1. Fields' Virology Fifth Edition 2007, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
2. Volkman LE, Goldsmith PA (1983). In Vitro Survey of *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl Environ Microbiol*. **45**:1085-1093.
3. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA (1992). Baculovirus expression vectors: a laboratory manual, edited by W.H.F. Co, New York
4. Hefferon KL, Oomens AG, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW (1999) Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**:455-68.
5. Tjia ST, zu Altenschildesche GM, Doerfler W (1983). *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology* **125**:107-17.
6. Gröner A, Granados RR, Burand JP (1984). Interaction of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* with two nonpermissive cell lines. *Intervirology* **21**:203-9.
7. Miltenburger HG, Reimann R (1980). Viral pesticides: biohazard evaluation on the cytogenetic level. *Dev Biol Stand*. **46**: 17-22.
8. Kost TA, Condreay JP (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*. **20**:173-80.
9. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*. **23**:567-75.
10. Condreay JP, Kost TA (2007). Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets*. **8**:1126-31.
11. Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE (2002). Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Mol Ther*. **6**:5-11.
12. Chen CY, Lin CY, Chen GY, Hu YC (2011). Baculovirus as a gene delivery vector: Recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnol Adv*. **29**:618-631.
13. Maghodia AB, Jarvis DL, Geisler C (2014). Complete Genome Sequence of the *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus* Strain E2. *Genome Announc.* 11;**2**(6):e01202-14.
14. Oomens AG, Wertz GW (2004). The baculovirus GP64 protein mediates highly stable infectivity of a human respiratory syncytial virus lacking its homologous transmembrane glycoproteins. *J Virol*. **78**:124-35.
15. Merrihew RV, Clay WC, Condreay JP, Witherspoon SM, Dallas WS, Kost TA (2001). Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. *J Virol*. **75**:903-9.
16. Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith RC, *et al*. (2001). A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther.* **8**:846-54.
17. Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*. **67**:4566-79.

18. El-Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Koenderink JB, Russel FG (2007). Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J Pharmacol Exp Ther*. **320**:229-35.

19. Boyce FM, Bucher NL (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*. **93**(6):2348-52.

BVL_FO_05_4100_402_V1.0