

## **Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten mit rekombinanten Influenza-A-Viren**

Influenza-A-Viren (FLUAV) gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie verfügen über ein negativ orientiertes RNA-Genom, welches sich auf 8 Segmente verteilt. Ursprünglich wurde angenommen, dass das virale Genom für 10 Proteine kodiert, allerdings wurden in den letzten Jahren weitere 7 Translationsprodukte beschrieben, die aus der Verwendung alternativer Startkodons bzw. Leserahmen oder durch alternatives Spleißen entstehen. Die biologische Relevanz und die Funktion dieser Translationsprodukte sind jedoch noch nicht vollständig geklärt [1]. Innerhalb der Spezies FLUAV werden die Viren anhand ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen unterteilt. Aktuell sind 18 HA- und 11 NA-Subtypen bekannt, die in verschiedenen Kombinationen auftreten können (Bezeichnung HxNy) [2, 3]. Die Viren weisen ein breites Wirtsspektrum auf und können sowohl Säugetiere als auch Vögel infizieren, wobei Wasservögel wahrscheinlich das natürliche Reservoir (mit Ausnahme der Fledermaus-Influenzaviren H18 und H17) darstellen. FLUAV weisen ein hohes zoonotisches Potenzial auf und sind in der Lage, die Speziesbarriere zu überwinden und sich auch dauerhaft an neue Wirte anzupassen [2]. Die hohe Anpassungsfähigkeit beruht zum einen auf einer vergleichsweise hohen Mutationsfrequenz, zum anderen auf der Fähigkeit, ganze genomische Segmente zwischen verschiedenen FLUAV austauschen zu können (Reassortierung) [2, 4]. Das durch FLUAV induzierte Krankheitsbild kann je nach Subtyp und Wirt variieren und kann sich von weitgehend asymptomatisch bis hin zu einer schweren Erkrankung mit tödlichem Verlauf erstrecken. Daher werden FLUAV differenziert nach Subtyp und Stamm der Risikogruppe 2, 3 oder 4 zugeordnet, wobei es sich bei FLUAV der Risikogruppe 4 bislang ausschließlich um Viren handelt, die im Rahmen von Forschungsvorhaben erzeugt wurden [5, 6]. Bezüglich des Genomaufbaus unterscheiden sich die Viren der verschiedenen Risikogruppen jedoch nur geringfügig. Es gibt keine Gene, welche ausschließlich bei FLUAV einer bestimmten Risikogruppe vorzufinden sind. Die unterschiedlichen Eigenschaften und Gefährdungspotenziale ergeben sich durch Mutationen und Sequenzvariationen in multiplen viralen Genen. Dabei ist zu beachten, dass die für das Gefährdungspotenzial relevanten Eigenschaften bei FLUAV meist durch mehrere virale Gene definiert werden (polygenisch determinierte Virulenz). Innerhalb verschiedener Gene wurden dabei Mutationen und Sequenzmotive identifiziert, die mit einer erhöhten Virulenz assoziiert sind [7]. Allerdings ist hier zu beachten, dass die biologische Bedeutung solcher Mutationen/Sequenzmotive in Abhängigkeit des FLUAV-Subtyps, Virus-Stamms und der Wirtsspezies beträchtlich variieren kann [7, 8].

Aufgrund der polygenisch determinierten Virulenz, der genetischen Variabilität sowie dem breiten Wirtsbereich ergeben sich Besonderheiten, die sowohl bei der Antragsstellung als auch bei der Bewertung von gentechnischen Arbeiten mit FLUAV zu berücksichtigen sind. Im Folgenden werden allgemeine Hinweise und Bewertungskriterien zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten zusammengefasst.

### **1. Hinweise zur Angabe der verwendeten Spenderorganismen**

Für eine differenzierte Bewertung einer gentechnischen Arbeit mit FLUAV ist die genaue Angabe der verwendeten Spender- und Empfängerorganismen notwendig. Im Fall von FLUAV ist dies die Angabe der verwendeten Subtypen. Die Angabe der Risikogruppe allein (z. B. „Influenzaviren der Risikogruppe 2“) reicht nicht aus. Gibt es innerhalb der verwendeten Sub-

typen zudem Varianten oder Stämme mit abweichenden Risikogruppen (z. B. H1N1: Spanische Grippe von 1918 vs. saisonale Viren), ist kenntlich zu machen, welche Varianten oder Stämme verwendet werden. Bei der Bewertung von FLUAV unterscheidet die ZKBS zudem zwischen humanen, humanpathogenen, aviären und Säuger-adaptierten Viren.

- humane FLUAV:  
FLUAV, die in der menschlichen Population zirkulieren, bzw. bei denen der Mensch den Hauptwirt darstellt.
- humanpathogene FLUAV:  
FLUAV, die bereits im Menschen nachgewiesen wurden bzw. dort eine Erkrankung verursacht haben. Dabei kann es sich sowohl um humane als auch um animale Viren handeln.
- an Säuger adaptierte FLUAV:  
FLUAV, deren Hauptwirt ein Säugetier darstellt oder die durch Passage oder durch gentechnische Veränderungen an die Replikation im Säuger angepasst wurden.
- aviäre FLUAV:  
Viren, bei denen Vögel den natürlichen Wirt darstellen. Innerhalb der aviären Viren der Subtypen H5 und H7 wird zudem zwischen niedrig- und hochpathogenen aviären Viren unterschieden (LPAIV und HPAIV) [9].

## 2. Kriterien für die Bewertung in das FLUAV-Genom eingefügter Mutationen und subgenomischer Nukleinsäureabschnitte

Bereits das Einfügen von wenigen Mutationen bzw. kurzen Nukleinsäureabschnitten kann das Gefährdungspotenzial von FLUAV signifikant verändern. Dies führt dazu, dass bestimmte gentechnische Arbeiten mit FLUAV vorsorglich einer höheren Sicherheitsstufe zugeordnet werden. Bislang sind nicht alle molekularen Faktoren bekannt, die das Gefährdungspotenzial von FLUAV definieren, jedoch werden die Gene des Polymerasekomplexes (PB2, PB1, PA und ggf. ihre akzessorischen Genprodukte) sowie das Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) als die Faktoren angesehen, die maßgeblich das Gefährdungspotenzial bestimmen.

### 2.1. Veränderungen an Genen des Polymerasekomplexes

Der trimere Polymerasekomplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Virulenz sowie bei der Adaptation an einen neuen Wirt. Veränderungen an diesen Genen können somit das Gefährdungspotenzial und die daraus resultierende Sicherheitsstufe entscheidend beeinflussen.

#### 2.1.1. Veränderungen an Genen des Polymerasekomplexes von FLUAV der Risikogruppe 2

Werden die Gene des Polymerasekomplexes von FLUAV der Risikogruppe 2 verändert, wird grundsätzlich eine vorsorgliche Höherstufung der Arbeiten in die **Sicherheitsstufe 3** empfohlen. Kann jedoch dargelegt werden, dass nachfolgende Punkte eingehalten werden, wird eine Einstufung in die Risikogruppe 2 empfohlen:

- (a.) Es werden keine subgenomischen Nukleinsäureabschnitte von Genen von FLUAV einer höheren Risikogruppe eingefügt.
- (b.) Es werden die Polymerase-Gene eines niedrigpathogenen aviären FLUAV (LPAIV) der Risikogruppe 2 verändert, aber die Veränderungen vermitteln keine weitgehende Adaptation an die Replikation im Menschen.

- (c.) Es werden die Polymerase-Gene von an Säuger adaptierten FLUAV der Risikogruppe 2 verändert, aber die Veränderungen führen nicht zu einer Steigerung der Virulenz im Säuger.
- (d.) Es werden die Polymerase-Gene von humanpathogenen FLUAV der Risikogruppe 2 verändert, aber die Veränderungen führen nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Replikationseffizienz in humanen Zellen.

## **Hinweis**

Bei der Beschreibung der geplanten gentechnischen Arbeit sind die erwarteten Auswirkungen der gentechnischen Veränderungen bezüglich der Punkte 2.1.1 (a) - (d) mit Verweis auf die Fachliteratur und/oder experimentellen Daten darzulegen. Sind die Auswirkungen der gentechnischen Veränderungen bezüglich der oben genannten Punkte unklar oder werden diese im Antrag nur unzureichend dargestellt, werden für Arbeiten mit FLUAV der Risikogruppe 2, in welche Veränderungen in die Gene des Polymerasekomplexes eingefügt werden, gemäß § 7 Abs. (1a) GenTG vorsorglich Maßnahmen der Sicherheitsstufe 3 empfohlen. Ausgenommen hiervon ist das Einfügen von Reportergenen oder technischen Sequenzen (z. B. *tags*), da davon auszugehen ist, dass das Einfügen dieser Elemente das Gefährdungspotenzial nicht erhöht.

Weiterhin wird darauf hingewiesen, dass bei einer vorsorglichen Einstufung der gentechnischen Arbeiten in die Sicherheitsstufe 3 experimentelle Daten nachgereicht werden können, die zu einer Neubewertung und ggf. Herabstufung der gentechnisch veränderten Viren führen können.

### **2.1.2. Veränderungen an Genen des Polymerasekomplexes von FLUAV der Risikogruppe 3**

Werden die Gene des Polymerasekomplexes von FLUAV der Risikogruppe 3 verändert, sind grundsätzlich Maßnahmen der Sicherheitsstufe 3 einzuhalten. Werden Veränderungen eingefügt, die gezielt die Virulenz steigern sollen, können ggf. zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen wie z. B. das Duschen und der Kleidungswechsel bei Verlassen des Labors erforderlich sein. Ist das Ziel der Veränderung eine Attenuierung, wird im Einzelfall geprüft, ob ggf. eine geringere Sicherheitsstufe ausreichend ist.

## **2.2. Veränderungen des Hämagglutinin-Gens**

Das Oberflächenprotein HA hat entscheidenden Einfluss auf Wirtsbereich, Zelltropismus und Transmissibilität. Veränderungen am HA können daher das Gefährdungspotenzial von FLUAV beeinflussen. Daher wird empfohlen, diese im Einzelfall durch die ZKBS bewerten zu lassen.

### **2.2.1. Veränderungen des Hämagglutinin-Gens von FLUAV der Risikogruppe 2**

Wird das HA von FLUAV der Risikogruppe 2 verändert, wird in nachfolgenden Fällen eine vorsorgliche Höherstufung der gentechnischen Arbeiten in die **Sicherheitsstufe 3** empfohlen:

- (a.) Es werden basische Aminosäuren an der Spaltstelle des HA eingefügt, so dass dieses von ubiquitären Wirtszellproteasen gespalten werden kann (unabhängig vom Subtyp oder Stamm des zu verändernden Virus).
- (b.) Es wird das HA eines humanpathogenen FLUAV der Risikogruppe 2 verändert und es werden Veränderungen eingefügt, die den Zell- oder Organtropismus der Viren signifikant

erweitern können (z. B. Insertion von vollständigen oder partiellen Oberflächenproteingenen von anderen Viren).

- (c.) Es handelt sich um animale FLUAV der Risikogruppe 2, in die Veränderungen eingefügt werden, die eine Adaptation an den Menschen darstellen oder die Transmissibilität zwischen Menschen erhöhen (z. B. signifikante Erhöhung der Bindungsaffinität an solche Rezeptoren, die im menschlichen Respirationstrakt dominant sind).
- (d.) Es werden subgenomische Nukleinsäureabschnitte von humanpathogenen FLUAV der Risikogruppe 3 eingefügt.

### **2.2.2. Veränderungen des Hämagglutinin-Gens von FLUAV der Risikogruppe 3**

Arbeiten, bei denen das HA von FLUAV der Risikogruppe 3 gentechnisch verändert wird, werden wie folgt bewertet:

- (a.) Bei Veränderungen des Hämagglutinin-Gens von FLUAV der Risikogruppe 3 werden generell Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3 empfohlen. Handelt es sich bei den zu verändernden Viren um HPAIV oder um das neuartige aviäre Virus des Subtyps H7N9, ist zudem Punkt 2.2.2.(b.) zu beachten. Ist das Ziel der Veränderung eine Attenuierung, wird im Einzelfall geprüft, ob ggf. eine geringere Sicherheitsstufe ausreichend ist.
- (b.) Einige Stämme der hochpathogenen aviären Influenza-A-Viren (HPAIV) sowie das neuartige aviäre Influenza-A-Virus vom Subtyp H7N9 können schwere Erkrankungen im Menschen verursachen. Diese Viren weisen in der Regel keine oder nur eine sehr geringe Transmissibilität zwischen Menschen auf. Gentechnische Arbeiten, die eine Erhöhung der Transmissibilität dieser Viren zwischen Säugern zum Ziel haben, werden daher vorsorglich der **Sicherheitsstufe 4** zugeordnet [6, 9].

### **2.3. Veränderung an sonstigen Genen**

Die Gene des Polymerasekomplexes sowie des HA werden als die Faktoren angesehen, die maßgeblich das Gefährdungspotenzial von FLUAV definieren. Daher wird davon ausgegangen, dass Veränderungen in den übrigen Genen von FLUAV i. d. R. nicht zu einer Erhöhung der erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen gegenüber dem unveränderten Ausgangsvirus führen. Wenn die Veränderung jedoch eine gezielte Erhöhung der Virulenz oder eine Resistenzvermittlung gegenüber humanen antiviralen Effektoren darstellt, wird im Einzelfall geprüft, ob eine höhere Sicherheitsstufe erforderlich ist.

## **3. Kriterien für die Bewertung von Reassortanten**

Der Austausch von genomischen Segmenten zwischen verschiedenen FLUAV führt zum Entstehen von Reassortanten, die sich in ihren Eigenschaften und ihrem Gefährdungspotenzial von ihren Ausgangsviren unterscheiden können. Daher wird bei der Bewertung von Reassortanten die Risikogruppe der Spenderviren zwar berücksichtigt, stellt jedoch nicht das alleinige Bewertungskriterium dar. Vielmehr sind für die Bewertung die Art des ausgetauschten Segmentes sowie die biologischen Eigenschaften der Spenderviren von entscheidender Bedeutung.

### **3.1.1. Reassortierung zwischen FLUAV der Risikogruppe 2**

Bei der Reassortierung zwischen FLUAV der Risikogruppe 2 kann es ggf. zur Bildung von Reassortanten kommen, die ein erhöhtes Gefährdungspotenzial (Risikogruppe 3) aufweisen.

Dies kann insbesondere dann der Fall sein, wenn durch Reassortierung ein Wirtswechsel (von Tier zu Mensch) ermöglicht wird. Daher wird empfohlen, nachfolgend aufgeführte Reassortierungen durch die ZKBS im Einzelfall bewerten zu lassen:

- (a.) Es werden Reassortanten zwischen humanpathogenen und animalen FLUAV der Risikogruppe 2 gebildet, wobei eines oder mehrere der Segmente PB1, PB2, PA und/oder HA ausgetauscht werden.
- (b.) Es werden Reassortanten zwischen unterschiedlichen FLUAV der Risikogruppe 2 gebildet und es werden Segmente ausgetauscht, die in identischer Form auch bei Viren der Risikogruppe 3 vorzufinden sind.

### 3.1.2. Reassortierung mit FLUAV der Risikogruppe 3

Werden Reassortanten hergestellt, bei denen auch FLUAV der Risikogruppe 3 als Spender verwendet werden, werden diese wie folgt bewertet:

- (a.) Werden Reassortanten zwischen unterschiedlichen FLUAV der Risikogruppe 3 gebildet, sind die gentechnischen Arbeiten grundsätzlich der **Sicherheitsstufe 3** zuzuordnen.
- (b.) Werden Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppe 3 und FLUAV der Risikogruppe 2 gebildet, werden die Arbeiten vorsorglich der **Sicherheitsstufe 3** zugeordnet, wenn in der entstehenden Reassortante eines oder mehrere der Segmente PB1, PB2, PA und/oder HA vom Virus der Risikogruppe 3 stammen.  
Enthält die Reassortante keines der oben genannten Segmente eines Spenders der Risikogruppe 3 oder findet der Austausch zwischen Viren ohne Humanpathogenität statt, kann im Einzelfall geprüft werden, ob Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 ausreichend sind. Hierfür ist im Antrag kenntlich zu machen, welche Segmente ausgetauscht werden.

### Hinweis

Ist das Ziel einer gentechnischen Arbeit die Bildung von Reassortanten zwischen FLUAV der Risikogruppen 2 und 3, und werden im Antrag nicht die Art und Anzahl der ausgetauschten Segmente definiert (z. B. ‚Herstellung von 6+2-Reassortanten‘), werden alle entstehenden Reassortanten vorsorglich der Risikogruppe 3 zugeordnet.

### Literatur

1. **Vasin AV, Temkina OA, Egorov VV, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI** (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* **185**:53-63.
2. **Short KR, Richard M, Verhagen JH, van Riel D, Schrauwen EJ, van den Brand JM, Mänz B, Bodewes R, Herfst S** (2015). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *One Health.* **1**:1-13.
3. **Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF** (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* **22**(4):183-91.
4. **Lombardo T, Chiapponi C, Baioni L, Cinotti S, Ferrari M** (2015). Protein mutations following adaptation of avian influenza viruses in different biological systems. *Res Vet Sci.* **103**:176-8.
5. **ZKBS** (2015). Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von Influenzaviren als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV, Az.: 6790-05-02-29.
6. **ZKBS** (2013). Empfehlung der ZKBS zur Einstufung von gentechnischen Arbeiten mit hochpathogenen aviären Influenza A-Viren (HPAIV), die das Potenzial einer effizienten Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren besitzen, Az.: 45310.0108.

7. **Schrauwen EJ, de Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA** (2014). Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **33**(4):479-90. Epub 2013 Sep 29.
8. **Jagger BW, Memoli MJ, Sheng ZM, Qi L, Hrabal RJ, Allen GL, Dugan VG, Wang R, Digard P, Kash JC, Taubenberger JK** (2010). The PB2-E627K Mutation Attenuates Viruses Containing the 2009 H1N1 Influenza Pandemic Polymerase. *mBio.* **1**(1): e00067-10.
9. **ZKBS** (2015). Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung hochpathogener aviärer Influenzavirus-A-Stämme der Subtypen H5 und H7 und davon abgeleiteter Laborstämme gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV, Az.: 6790-05-02-34.