

**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von  
*Human alphaherpesvirus 1 5dl1.2*  
als Spender- oder Empfängerorganismus  
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

**Allgemeines**

Das *Human alphaherpesvirus 1* (auch *Herpes simplex virus 1*, HSV-1) ist ein Vertreter der Familie *Herpesviridae* und ein global verbreitetes obligates Pathogen des Menschen. Experimentell können jedoch auch andere Spezies wie Hasen und Nagetiere infiziert werden.

Das Virus hat ein doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von 152 kbp mit einer langen und einer kurzen einmalig vorkommenden Region (*unique long*, UL, und *unique short*, US), die jeweils von invertierten Einheiten wiederholter Sequenzen (*repeat*) flankiert sind [1].

Das Virus wird meistens bereits in der Kindheit über direkten Kontakt oder Tröpfchen akquiriert [1, 2]. Aber auch schon in der Schwangerschaft oder während der Geburt ist eine Übertragung möglich. Eine weitere Ansteckungsquelle sind sexuelle Kontakte junger Erwachsener [1]. Dementsprechend liegt die Seroprävalenz für HSV-1 bei Erwachsenen in Deutschland bei über 90 % [3]. Das Virus verbleibt nach der Erstinfektion latent in den dorsalen Hinterwurzelganglien und kann reaktiviert werden. Häufigstes Symptom der Infektion sind Lippenbläschen; daneben können auch Läsionen der Haut, Augen und Genitalschleimhäute auftreten. In seltenen Fällen kann es zu einer systemischen Ausbreitung kommen, wobei eine Replikation im zentralen Nervensystem schwere neurologische Schädigungen wie die HSV-Enzephalitis zur Folge haben kann [1]. Bei Neugeborenen kann es zu einer disseminierten Herpesinfektion oder einer Herpesinfektion des Zentralen Nervensystems kommen. Diese Erkrankungen gehen auch bei Behandlung mit hoch dosiertem Aciclovir mit einer Letalität von 29 bzw. 4 % einher [4]. Gemäß § 5 Abs. 6 i. V. m. Anhang I GenTSV ist HSV-1 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Die Deletionsmutante 5dl1.2 basiert auf dem Wildtypstamm KOS. Aus seinem Genom wurden der Promotor, der Transkriptionsstart sowie die 786 5'-terminalen Nukleotide des Gens *UL54* durch eine 1,2 kb große Deletion des *Bam*HI-*Sall*-Fragments (bp 113.323 – 114.518) entfernt. Dem durch *UL54* kodierten *infected cell protein 27* (ICP27) fehlen somit 262 Aminosäuren (aa) des N-Terminus sowie die transkriptionsaktivierenden Elemente [5].

ICP27 wurde zunächst als Transaktivator viraler und zellulärer Promotoren beschrieben, wird jedoch seit einiger Zeit eher als Faktor bei der posttranskriptionellen Regulation von RNA-Spleißen, -Export, -Stabilität und -Translation beschrieben [6]. ICP27 weist mehrere Kernlokalisationssignale auf, deren stärkstes die aa 110-137 umfasst. Zudem enthalten die aa 110-152 des N-Terminus von ICP27 ein Nukleoluslokalisationssignal. HSV-1-Mutanten, in deren Ge-

nom eines der beiden Motive deletiert wurde, replizierten nicht effizient in Vero-Zellen [7]. Zudem enthält der N-Terminus von ICP27 ein Kernexportsignal und eine Arginin- und Glyzinreiche Region (aa 138-152), die eine Anlagerung an die RNA ermöglicht [8]. Diese Domänen wurden durch die Deletion der ersten 262 aa entfernt. Diese Deletion führt dazu, dass ICP27 nicht mehr gebildet wird. In der Folge ist die Expression weiterer Gene von 5dl1.2 verändert: Die Expression der frühen Gene für ICP6 und ICP8 ist verstärkt, während die der späten ( $\gamma$ 1-)Gene für pgB, gB, ICP5 und ICP25 reduziert ist. Die sehr späten ( $\gamma$ 2-)Genprodukte ICP19 und ICP20, welche durch das Gen *UL47* exprimiert werden und Bestandteil des Teguments sind, werden nicht exprimiert. Zudem ist die DNA-Synthese von 5dl1.2 im Vergleich zum Wildtyp um 82 % reduziert [5].

5dl1.2 repliziert nicht in Vero-Zellen. 18 Stunden nach Infektion mit 2,5 *plaque forming units* (pfu) pro Zelle konnten < 10 pfu/ml nachgewiesen werden, während der Wildtyp  $1,8 \times 10^8$  pfu/ml produzierte [5]. Bei einer hohen *multiplicity of infection* (MOI) von 10 und zu einem späten Zeitpunkt zeigten mit 5dl1.2 infizierte Vero-Zellen Anzeichen zytopathischer Effekte (Zellrundung und -ablösung) [9]. Ein zytopathischer Effekt (Verlust von unterstützenden Zellen, Verklumpen von neuronalen Zellkörpern und Rückzug der neuronalen Prozesse) wurde auch für andere ICP27-deletierte HSV-1-Viren, in deren Genom zusätzlich *UL55* ganz und *UL56* teilweise deletiert worden waren, bei einer MOI von 10 und einer länger andauernden Infektion von sieben Tagen in Zellkulturen von Hinterwurzelganglien gezeigt [10]. In Zellkulturen von Cochlea-Neuronen zeigte eine MOI von 0,045 bis 4,5 jedoch keinen zytopathischen Effekt [11]. In einem weiteren Paper wurde die Zytotoxizität von 5dl1.2 für Zellkulturen von kortikalen Neuronen anhand der Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium bestimmt. Diese nimmt zu, wenn Zellen lysieren, war jedoch für 5dl1.2 minimal [12]. Die Infektion mit 5dl1.2 verbessert in Zellkulturen von Cochlea- und kortikalen Neuronen das Überleben der Zellen, während sie bei kultivierten Astrozyten und nicht-neuronalen Zellen der Cochlea eher dazu führt, dass die Zellen absterben [13]. Ebenso wie der Wildtyp hemmt 5dl1.2 den Natriumstrom in kultivierten Neuronen [14].

In der Forschung wird 5dl1.2 als Helfervirus zur Verpackung von HSV-Amplikons genutzt, wobei der entstehende Überstand sowohl Amplikon- als auch 5dl1.2-Partikel enthält. Zellkulturen von Neuronen, die mithilfe 5dl1.2-verpackter Amplikons infiziert wurden, zeigten keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu nicht infizierten Neuronen [15]. Bei Mäusen, denen ein 5dl1.2-verpacktes Amplikon in das Gehirn injiziert wurde, wurden keine Toxizitäten beschrieben [9]. Ratten, denen  $4 \times 10^4$  pfu eines 5dl1.2-verpackten, LacZ-exprimierenden Amplikons ins Gehirn injiziert wurden, wiesen nur minimale Schäden an der Injektionsstelle auf, die mit denen einer 10 % Saccharose-Injektion (Negativkontrolle) vergleichbar waren [16]. In einer anderen Studie hingegen wies das Gehirn von Ratten, denen  $9 \times 10^3$  pfu eines 5dl1.2-verpackten, LacZ-exprimierenden Amplikons ins Gehirn injiziert worden waren, Gewebeschäden in der Nähe der Injektionsstelle auf, die nicht auf den Vorgang der Injektion zurückzuführen waren [17].

## Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird *Human alphaherpesvirus 1 5dl1.2* als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

## Begründung

Das ICP27-defiziente *Human alphaherpesvirus 1 5dl1.2* repliziert nicht auf Vero-Zellen und hat keinen bzw. nur einen minimalen zytopathischen Effekt auf neuronale Zellen. Bei Mäusen

und Ratten, denen das Virus direkt ins Gehirn injiziert wurde, waren weitestgehend keine Anzeichen für eine Neurotoxizität erkennbar. Überdies ist nicht davon auszugehen, dass im Rahmen von Laborarbeiten für den Experimentator die Gefahr einer intrakraniellen Infektion besteht.

## Hinweis

Bei der Herstellung der Deletionsmutante 5dl1.2 auf ICP27-komplementierenden Zelllinien besteht die Möglichkeit der Entstehung replikationskompetenter HSV-1-Partikel durch homologe Rekombination. Es ist somit sicherzustellen, dass diese Zelllinien nur den *UL54*-Leserahmen, nicht jedoch den *UL54*-Promotorbereich enthalten.

## Literatur

1. **Roizman B et al.** (2013). Herpes Simplex Viruses. In: Fields Virology, 6th edition, pp. 1823-97 (Knipe DM, Howley PM, eds.-in-chief), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
2. **Whitley RJ** (2006). Herpes simplex encephalitis: Adolescents and adults. *Antiviral Res* **71**: 141-8.
3. **Modrow S et al.** (2003). Herpesviren. In: Molekulare Virologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
4. **Kimberlin DW** (2004). Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev* **17**(1):1-13.
5. **McCarthy AM et al.** (1989). Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J Virol* **63**(1): 18-27.
6. **Ote I et al.** (2010). The Varicella-Zoster IE4 protein: A conserved member of the herpesviral mRNA export factors family and a potential alternative target in antiherpetic therapies. *Biochem Pharmacol* **80**: 1973-80.
7. **Mears WE et al.** (1995). Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the Herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J Virol* **69**: 935-47.
8. **Sandri-Goldin RM** (2006). The functions and activities of herpes simplex virus protein ICP27, a multifunctional regulator of gene expression. In: Alpha Herpesviruses: Molecular and cellular biology, pp. 65-83 (RM Sandri-Goldin, ed), Caister Academic Press, Norfolk.
9. **Fotaki ME et al.** (1997). Tetracycline-responsive gene expression in mouse brain after amplicon-mediated gene transfer. *Gene Ther* **4**: 901-8.
10. **Lilley C et al.** (2001). Multiple immediate-early gene-deficient herpes simplex virus vectors allowing efficient gene delivery to neurons in culture and widespread gene delivery to the central nervous system in vivo. *J Virol* **75**: 4343-56.
11. **Garrido JJ et al.** (1996). Using herpes simplex virus type 1 (HSV-1) mediated gene transfer to study neurotrophins in cochlear neurons. *Int J Dev Biol Suppl* **1**:149S-50S.
12. **Lim F et al.** (1996). Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques* **20**: 460-9.
13. **Garrido JJ et al.** (1999). Differential effects on the survival of neuronal and non-neuronal cells after infection by herpes simplex virus type 1 mutants. *J Neurovirol* **5**: 280-8.
14. **White BH et al.** (2001). HSV-1 helper virus 5dl1.2 suppresses sodium currents in amplicon-transduced neurons. *J Neurophysiol* **87**: 2149-57.
15. **Wang KC et al.** (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**: 941-4.
16. **Carlezon Jr. WA et al.** (1997). Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science* **277**: 812-4.
17. **Fraefel C et al.** (1996). Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neuronal cells. *J Virol* **70**:7190-7.