

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von Vacciniavirus DIs
als Spender- oder Empfängerorganismus
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Das Vacciniavirus DIs stammt vom Stamm DIE ab, einem an die Chorioallantoismembran des Huhnes angepassten Dermovacciniavirusstamm, der bis 1981 in Japan zur Pockenimpfung genutzt wurde [1–3]. DIE selbst wurde vom Stamm Dairen I abgeleitet, der 1942 aus einer an Pocken erkrankten Person in Japan isoliert worden war. DIE wurde durch 35 Passagen auf Kaninchenhautzellen, einer Zwischenpassage auf Kaninchenhodenzellen und einer 72-stündigen Kultivierung auf der Chorioallantoismembran zwölf Tage alter Hühnereier gewonnen [1]. Der Stamm DIs entstand durch 13 serielle Passagen von jeweils einem Tag in Hühnereiern [2]. DIs ist durch die Passagierung im Vergleich zu DIE deutlich attenuiert [3, 2]. Auf primären Affenleberzellen zeigte DIs einen moderaten zytopathischen Effekt. Auf L-Zellen (Mausfibroblasten) replizierte sowohl DIs als auch DIE, sofern eine große Menge viraler Partikel zur Infektion verwendet worden war [2]. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass DIs auf Hühnerembryofibroblasten (CEF) repliziert, nicht jedoch auf den Säugerzelllinien HeLa, CV-1 (Affennierenzellen), RK13 (Kaninchennierenzellen) und CHO (Hamsteroovarienzellen) [3]. *In vivo* zeigte DIs keine Pathogenität in Kaninchen, Hühnern, Mäusen und Meerschweinchen [2, 4]. Bei Inokulation von Javaneraffen (zwei Tiere) über die Haut (mittels Skarifikation, Multiple-Pressure-Methode oder intradermal, $1,5 \times 10^5$ plaque forming units, pfu) war DIs immunogen und es kam zur Pustelbildung an der Einstichstelle und leichtem Fieber an Tag fünf bis sechs nach Inokulation (p. i.). Ein mit DIE inokulierte Affe hatte ebenfalls Pusteln und zeigte an Tag vier bis sechs p. i. Fieber [4]. Bei intrathalamischer Inokulation von DIs in drei verschiedenen Dosierungen (2×10^8 , 2×10^7 oder 2×10^6 pfu) an neun Javaneraffen blieben die meisten Tiere klinisch unauffällig. Zwei Tiere, die die höchste Dosis erhalten hatten, zeigten an Tag sechs und sieben p. i. reversible Lähmungen und Augenzittern. Tiere, die mit den Stämmen CV1, Ikeda, Lister (Elstree), EM63 und HYBH inokuliert worden waren, starben nach einem bis drei Tagen. Die mit DIs inokulierten Tiere wurden nach zehn bis 14 Tagen euthanasiert und wiesen leichte bis moderate Läsionen der Hirnhaut und des Plexus choroideus auf [5]. In einer weiteren Studie war DIs nach intrazerebraler Inokulation in Javaneraffen nicht pathogen, während mit Lister (Elstree), Ikeda oder IHD inokulierte Tiere starke Symptome zeigten und nach wenigen Tagen starben. Histologisch waren jedoch auch bei den mit DIs inokulierten Tieren leichte Anzeichen einer Entzündung der weichen Hirnhaut zu erkennen, virale Partikel konnten aus dem Gehirn und Rückenmark jedoch nicht isoliert werden [6].

Die Attenuierung von DIs geht auf eine Deletion von insgesamt 15,4 kbp zurück, wodurch 19 potentielle *open reading frames* (ORF) partiell oder komplett deletiert werden. Die Deletion betrifft die linke terminale Region des Genoms mit den Genen C9 bis K5L und ist vermutlich durch eine homologe Rekombination zwischen zwei 16 bp langen, fast identischen

Nukleinsäureabschnitten entstanden. Unter den deletierten Genen sind zwei für Proteine mit bekannter Funktion für den Wirtstropismus (*C7L* und *K1L*) und das Gen *K3L*, ein Interferon-Resistenzgen [3, 7]. Die 15,4 kbp Deletion wurde in vier Regionen aufgeteilt (D1 = 3,1 kbp; D2 = 5,9 kbp; D3 = 3,3 kbp; D4 = 5,1 kbp), die anschließend einzeln oder in Kombination wieder in DIs eingebracht wurden. Dabei zeigte sich, dass *C7L* keine Rolle für den Wirtstropismus von DIs zu spielen scheint, während *K1L* und weitere Bereiche aus der Deletionsregion 2 für den Wirtstropismus verantwortlich sind. Wurden alle vier Deletionsregionen wieder in DIs eingefügt, replizierte das entstandene Virus gut in CEF sowie in den Säugerzelllinien HeLa, CV-1 und RK13, jedoch mit etwas geringeren Titern als DIE. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass im Genom von DIs noch weitere attenuierende Mutationen vorliegen [3].

Die D2-Region enthält die Gene *C3L* und *N1L*. Diese sind für die Virulenz des Vacciniavirus von Bedeutung. *C3L* kodiert für das *complement control protein*, welches an die Komplementproteine C3b und C4b bindet und so den klassischen und den alternativen Komplement-Signalweg inhibiert, während die genaue Funktion des *N1L*-Genprodukts nicht klar ist [8, 9]. Die Deletion in DIs ist größer als die *host range gene region*-Deletion von NYVAC, einem der **Risikogruppe 1** zugeordneten Copenhagen-Stamm. In NYVAC sind die Gene *C7L* bis *K1L* deletiert. Zusätzlich sind im Genom von NYVAC die sechs Gene *J2R*, *I4L*, *A56R*, *A26L* und *B13R/B14R* deletiert [10]. Im Genom des Modified Vacciniavirus Ankara (MVA), einem durch Passagierung gewonnenen apathogenen Vacciniavirus der **Risikogruppe 1**, ist das Gen *K1L* ebenfalls deletiert, während das Gen *C7L* noch vorhanden ist. *K1L* ist in MVA jedoch nicht alleine für dessen Tropismus verantwortlich [3]. MVA weist insgesamt Deletionen von 31 kbp auf, die Attenuierung beruht jedoch nicht allein auf diesen Deletionen [3, 11, 12].

Empfehlung

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

Begründung

Das Vacciniavirus DIs ist im Vergleich zum Ausgangsstamm DIE stark attenuiert und repliziert nicht in den meisten Säugerzelllinien. Im Tiermodell wurden keine oder leichte und selbstlimitierende Symptome beobachtet, die im Vergleich zu Wildtypstämmen oder dem Ausgangsvirus DIE deutlich attenuiert waren.

Hinweis

Um eine mit dem Ausgangsstamm DIE vergleichbare Vermehrungsfähigkeit wiederherzustellen, müssen mehrere der deletierten Gene/Regionen in DIs eingeführt werden. Die für die Attenuierung von DIs verantwortlichen viralen Funktionen sowie die zellulären Funktionen, die die Virusreplikation in permissiven Zellen ermöglichen, sind nur teilweise bekannt. Aus diesem Grund ist bei gentechnischen Arbeiten mit DIs als Empfängerorganismus analog zur „Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA“ (aktualisierte Fassung vom November 2018, Az. 6790-10-74) zu prüfen, ob sich die Insertion von Nukleinsäureabschnitten bei der Herstellung eines rekombinanten DIs auf die Attenuierung auswirkt.

Daher empfiehlt die ZKBS, die Risikobewertung rekombinanter DIs wie für rekombinante MVA beschrieben (Az. 6790-10-74) vorzunehmen.

Auf folgende Stellungnahmen wird hingewiesen:

- Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA (aktualisierte Fassung vom November 2018, Az. 6790-10-74)
- Stellungnahme der ZKBS zum Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren (aktualisierte Fassung vom April 2014, Az. 6790-10-04)
- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten, bei denen Gene für immunmodulierende Proteine in das Genom replikationskompetenter Mikroorganismen integriert werden (Aktualisierung von April 2019, Az. 6790-03-05)

Literatur

1. **Tagaya I** (1954). Studies on vaccinia hemagglutinin. I. On the production of vaccinia hemagglutinin in the developing chick embryo. *Jpn J Med Sci Biol* **7**(1):39–48.
2. **Tagaya I, Kitamura T, Sano Y** (1961). A new mutant of dermopoxvirus. *Nature* **192**:381–2.
3. **Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M, Miyamura T** (2002). Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* **302**(2):433–44.
4. **Kitamura T, Kitamura Y, Tagaya I** (1967). Immunogenicity of an attenuated strain of vaccinia virus on rabbits and monkeys. *Nature* **215**(5106):1187–8.
5. **Morita M, Aoyama Y, Arita M, Amona H, Yoshizawa H, Hashizume S, Komatsu T, Tagaya I** (1977). Comparative studies of several vaccinia virus strains by intrathalamic inoculation into cynomolgus monkeys. *Arch Virol* **53**(3):197–208.
6. **Tagaya I, Amano H, Komatsu T, Uchida N, Kodama H** (1974). Supplement to the pathogenicity and immunogenicity of an attenuated vaccinia virus, strain DIs, in cynomolgus monkeys. *Jpn J Med Sci Biol* **27**(4):215–28.
7. **Jacobs BL, Langland JO, Kibler KV, Denzler KL, White SD, Holechek SA, Wong S, Huynh T, Baskin CR** (2009). Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res* **84**(1):1–13.
8. **Cheltsov AV, Aoyagi M, Aleshin A, Yu EC-W, Gilliland T, Zhai D, Bobkov AA, Reed JC, Liddington RC, Abagyan R** (2010). Vaccinia virus virulence factor N1L is a novel promising target for antiviral therapeutic intervention. *J Med Chem* **53**(10):3899–906.
9. **Meseda CA, Kuhn J, Atukorale V, Campbell J, Weir JP** (2014). Glycosylated and nonglycosylated complement control protein of the lister strain of vaccinia virus. *Clin Vaccine Immunol* **21**(9):1330–8.
10. **Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet J-C, Cox WI, Davis SW, van der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, Languet B, Paoletti E** (1992). NYVAC: A highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**(1):217–32.
11. **Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG** (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**(2):365–96.
12. **Meisinger-Henschel C, Späth M, Lukassen S, Wolferstätter M, Kachelriess H, Baur K, Dirmeier U, Wagner M, Chaplin P, Suter M, Hausmann J** (2010). Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice. *J Virol* **84**(19):9907–19.