

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von gentechnischen Arbeiten zur Expression von Prion-Proteinen

1 Einführung

Der Begriff „Prion“ (von *proteinaceous infectious particle*) bezeichnet kleine infektiöse Proteinpartikel [1]. Er wurde geprägt in den 80er Jahren des 20ten Jahrhunderts für den Auslöser der Erkrankung Scrapie bei Schafen, die durch die Ablagerung von fehlgefalteten Formen des Prion-Proteins (PrP) im Gehirn verursacht wird. PrP in ihrer fehlgefalteten Form werden als Scrapie-PrP (PrP^{Sc}) im Gegensatz zu PrP in ihrer nicht-pathologischen, zellulären Form (PrP^C) bezeichnet. Die Ablagerung von PrP^{Sc} im Gehirn führt zu einer spongiformen Enzephalopathie, die sich beim Schaf in Verhaltens- und Gangstörungen sowie starkem Juckreiz äußert. PrP^{Sc} können die Fehlfaltung anderer PrP^C zu PrP^{Sc} induzieren und wie infektiöse Agenzien wirken. Ähnliche transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE), die ebenfalls auf Fehlfaltungen von PrP beruhen, sind auch bei anderen Säugetieren bekannt, wie die Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind, die *chronic wasting disease* (CWD) bei Hirschartigen, die Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Katzen, die *transmissible mink encephalopathy* (TME) bei Nerzen und verschiedene Formen der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD), der *fatal familial insomnia* (FFI), des Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms (GSS) oder der Erkrankung Kuru beim Menschen. Auch bei diesen Erkrankungen wird das PrP in seiner krankheitsverursachenden, fehlgefalteten Form als PrP^{Sc} bezeichnet. Prion-Erkrankungen beim Menschen können sporadisch auftreten aufgrund der spontanen Bildung von fehlgefalteten PrP^{Sc} (wie bei sCJD), erblich bedingt sein (wie bei fCJD) oder auf Infektionen zurückgehen (wie bei vCJD). Auch Gewebe aus neuropathologischen Läsionen sporadisch oder erblich bedingter TSE-Fälle ist üblicherweise infektiös. Prion-Erkrankungen schreiten nach dem Auftreten erster Symptome üblicherweise rasch voran und sind immer tödlich.

Das humane PrP ist ein Glykoprotein, das durch das Gen *PRNP* kodiert wird und 253 Aminosäuren (AS) umfasst. Das unreife PrP besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid (AS 1 – 22), einer globulären Domäne mit drei α -Helices und einem kurzen Abschnitt mit antiparalleler β -Faltblatt-Struktur sowie einem C-terminalen Signalpeptid (AS 231 – 253) für die Verankerung des Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) in der Zellmembran. Außerdem befindet sich im N-terminalen Teil der globulären Domäne (AS 51 – 91) eine Region von Oktapeptid-*repeats*. Im PrP^{Sc} wird die Konformation der globulären Domäne durch β -Faltblätter bestimmt. Diese Fehlfaltung führt zur Konformationsänderung weiterer PrP^C und der Bildung von Protofibrillen, aus denen Amyloidfibrillen gebildet werden, die sich im Nervengewebe ablagern. PrP^{Sc} sind Protease-resistent und sehr widerstandsfähig gegenüber den meisten physikalischen und chemischen Methoden zur Inaktivierung von Krankheitserregern.

Es sind jeweils eine oder mehrere Punktmutationen bekannt, die den Ausbruch von CJD, GSS oder FFI begünstigen. Das Fehlen oder die Insertion zusätzlicher Oktapeptid-*repeats* kann ebenfalls die Wahrscheinlichkeit von PrP-Erkrankungen erhöhen. Auch die Verkürzung des Proteins kann dazu führen, dass sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass das PrP^C zu einer pathogenen Form konvertiert. Es wurde gezeigt, dass die Stabilität von PrP^C mit verkürztem C-Terminus (Abbruch an AS 224, 225, 226, 227 oder 228) geringer ist und dass sie nach Denaturierung und Schütteln bei hohen Drehzahlen mit größerer Wahrscheinlichkeit zu Amyloid-Fibrillen konvertierten [2].

Hinweis:

Neben Erkrankungen, die von der Ablagerung von fehlgefalteten PrP^{Sc} hervorgerufen werden, existieren weitere neurodegenerative Erkrankungen, für die ein Zusammenhang mit Ablagerungen fehlgefalteter Proteine untersucht wird. Beispiele hierfür sind die Parkinson-Erkrankung, die mit Ablagerungen des Proteins α -Synuclein in Verbindung gebracht wird, und die Alzheimer-Erkrankung, bei der ein Zusammenhang mit Aggregaten des Tau-Proteins vermutet wird. Die vorliegende ZKBS-Stellungnahme beschränkt sich auf Empfehlungen zu gentechnischen Arbeiten zur Klonierung und Expression von PrP und PrP-Varianten.

1.1 Übertragung von PrP-Erkrankungen

TSE werden durch orale Aufnahme von PrP^{Sc} ausgelöst. Dies ist z. B. bei Kuru, BSE und vCJD erwiesen [3–5]. Daneben erfolgten Infektionen aber auch durch intravenöse und intraperitoneale Injektion, Spritzer ins Auge, Hornhaut- oder Dura-Mater-Transplantationen, die Verwendung von PrP^{Sc}-kontaminierten Instrumenten in der Neurochirurgie, Wurzelkanalbehandlungen, intraokulare Injektion und Transfusion von kontaminierten Blutprodukten [6–11]. CWD wird direkt von Tier zu Tier übertragen wie z. B. durch den Kontakt mit PrP^{Sc}-kontaminierten Ausscheidungen (Blut, Speichel, Urin, Milch) anderer Tiere [12, 13]. Auch infizierte, klinisch kranke Mäuse und Hamster scheiden PrP^{Sc} über den Kot bzw. Körperflüssigkeiten aus [14, 15]. In Versuchen mit Mäusen wurde eine Scrapie-ähnliche Erkrankung durch die Vernebelung bzw. Inhalation von Hirnhomogenat klinisch kranker Mäuse hervorgerufen [16]. Auch für CWD wird diskutiert, dass die Erkrankung ggf. über Aerosole übertragen wird [17].

Im Zusammenhang mit Tätigkeiten im Labor ist ein vCJD-Fall nach einer Stichverletzung beim Umgang mit dem Hirnmaterial transgener Mäuse dokumentiert, die das humane PrP exprimierten und mit BSE-Material infiziert worden waren [18]. Bei einem weiteren Labor-assoziierten vCJD-Fall, bei dem mit BSE-infiziertem und humanem vCJD-Hirnmaterial gearbeitet wurde, ist die Infektionsroute unklar [19].

Generell ist eine Übertragung über Spezies-Grenzen hinweg nicht ausgeschlossen (z. B. bei BSE), aber weniger wahrscheinlich als zwischen Individuen der gleichen Spezies. Dies geht wahrscheinlich auf Unterschiede in der PrP-Aminosäuresequenz und damit der Konformation der PrP zurück [20, 21].

Die Inkubationszeit von TSE-Erkrankungen beträgt mehrere Jahre bis Jahrzehnte. Im Fall der Labor-assoziierten Infektion, bei der der Zeitpunkt der Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit assoziiert wurde, traten erste Krankheitssymptome 7,5 Jahre später auf [18].

1.2 Nicht-infektiöse PrP-Varianten

Neben den infektiösen Prion-Erkrankungen wie BSE, vCJD und Scrapie existieren auch nicht-infektiöse Prion-Erkrankungen. Diese werden ebenfalls durch die Ablagerung von PrP-Aggregaten ausgelöst, sind jedoch ausschließlich durch eine erbliche Disposition bedingt. Sie werden nicht zwischen verschiedenen Individuen übertragen.

Ein Beispiel für eine PrP-Variante, die eine solche Erkrankung auslöst, ist die PrP-Variante Y163X, die auf den Austausch eines Tyrosinocodons an Position 163 des Proteins gegen ein Stopp-Kodon zurückgeht. Aufgrund dessen fehlt dem PrP der GPI-Anker zur Verankerung des PrP in der Zellmembran. Beim Menschen verursacht diese PrP-Variante eine genetisch bedingte, degenerative Neuropathologie, deren frühe Symptome Durchfall und sensorische Einschränkungen sind. In den späteren Phasen der Erkrankung mehren sich kognitive Einschränkungen und epileptische Anfälle. Nach dem Tod der Erkrankten wurden PrP-Ablagerungen nicht nur im Gehirn der Erkrankten, sondern auch in peripheren Organen wie dem Zwölffingerdarm, der Leber, der Lunge, der Niere und in Blutgefäßen und Nervenbahnen des Rückenmarks nachgewiesen, was für andere PrP-Erkrankungen untypisch ist. Transgenen Mäusen (n = 24), die das humane *PRNP*-Gen exprimieren und deren murines *PRNP*-Ortholog deletiert ist, wurde Hirnmaterial eines erkrankten Verstorbenen mit der PrP-Variante Y163X intrazerebral injiziert. Die Mäuse erkrankten im Beobachtungszeitraum von 600 Tagen nicht und wiesen keine Prion-Ablagerungen im Gehirn auf. Es handelt sich demnach mit großer Wahrscheinlichkeit um eine nicht-infektiöse Prionerkrankung [22].

1.3 Methoden zum Nachweis des Fehlfaltungspotentials von PrP

Das Auslösen der Umfaltung anderer PrP durch ein fehlgefaltetes PrP wird als *seeding* bezeichnet. Die Infektion von Versuchstieren mit infektiösem Material zur Untersuchung des *seeding*-Potentials bestimmter PrP-Varianten stellt eine vergleichsweise aufwändige Methode dar, u. a. weil die Inkubationszeit der TSE-Erkrankungen sehr lang ist. Das *seeding*-Potential kann jedoch auch mit *in vitro*-Methoden untersucht werden, wie der quantitativen Detektion mit hochsensitiven Zelllinien [23, 24]. Die sensitivsten *in vitro*-Methoden stellen die *protein misfolding cyclic amplification* (PMCA) und die *real-time quaking-induced conversion* (RT-QuIC) dar. Bei der PMCA wechseln sich Inkubations- und Ultraschallzyklen ab, wobei das Ausgangsmaterial Hirngewebe oder Rückenmarksflüssigkeit ist [25]. Die RT-QuIC ist methodisch ähnlich, wobei statt der Ultraschallzyklen Schüttelzyklen durchgeführt werden. Beide Methoden sind ausreichend sensitiv, um die *seeding*-Aktivität von PrP^{Sc} in Blutplasma, Gehirnflüssigkeit und Nasenausscheidungen nachzuweisen [26].

1.4 Inaktivierung von PrP^{Sc}

PrP^{Sc} sind gegenüber klassischen Desinfektionsmitteln bzw. -methoden sehr widerstandsfähig. Zu ihrer vollständigen Inaktivierung ist es erforderlich, thermische, chemische oder Kombinationen aus thermischen und chemischen Inaktivierungsverfahren anzuwenden.

Die Verbrennung wird als sicherste Methode zur Vernichtung von kontaminierten Abfällen betrachtet. Außerdem können PrP^{Sc} durch Autoklavieren bei einer von 121 °C auf 134 °C erhöhten Temperatur bei einem Druck von mind. 3 bar und einer von 20 min auf 30 bis 60 min verlängerten Haltezeit inaktiviert werden [27].

Die Inaktivierung durch den Zusatz von Chemikalien kann durch Behandlung mit Detergenzien und Essigsäure, mit H₂O₂-Dampf oder -Gasplasma sowie Radiofrequenz-Gas-Plasma erfolgen. Außerdem werden PrP^{Sc} durch Guanidinthiocyanat (> 3 M), Peressigsäure (0,2 %) und einer Mischung von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Essigsäure (2 % + 1 %) inaktiviert (zusammengefasst in [28]).

Zu den geeigneten Kombinationsverfahren gehört die Behandlung in hochkonzentrierter Natriumhydroxid- oder Natriumhypochloritlösung gefolgt von Autoklavieren bei 121 °C für 30 min [29]. Alkalische Hydrolyse unter hohem Druck und hoher Temperatur (in sog. Digestern) ist ebenfalls wirksam [30, 31]. Bei den angewandten Kombinationsverfahren ist zu beachten, dass die Verfahren aufgrund der hohen Salzkonzentrationen ggf. stark korrosiv auf die Oberflächen der verwendeten Geräte wirken können.

2 Empfehlungen

2.1 **Bewertung gentechnischer Arbeiten zur Klonierung und Expression von unveränderten *PRNP*-Genen**

Die Klonierung und Expression von Nukleinsäureabschnitten, die für unveränderte PrP kodieren, ist eine gentechnische Arbeit der **Sicherheitsstufe 1**, da das unveränderte *PRNP*-Gen ein zelluläres Gen ohne Gefährdungspotential ist.

Varianten ohne N- oder C-terminale Signalsequenzen (reife Form des PrP) oder Varianten mit Epitop-*tags* oder GFP-Fusionen, deren für das reife PrP kodierende Nukleinsäuresequenz nicht verändert ist, werden wie unveränderte bzw. nicht-mutierte PrP bewertet. Es ist nicht davon auszugehen, dass die Fusion mit Epitopen oder anderen Proteinen grundsätzlich das *seeding*-Potential erhöht. Es wurde gezeigt, dass transgene Mäuse, die PrP exprimieren, die mit einem myc-Epitop fusioniert sind, keine lokomotorischen Auffälligkeiten zeigen und auch ansonsten während einer Beobachtungszeit von mehr als zwei Jahren klinisch unauffällig sind [32]. Maus-PrP fusioniert mit dem EGFP-Protein (PrP-EGFP) konvertierte nach Infektion der Mäuse mit Maus-PrP^{Sc} nicht zu PrP^{Sc}-EGFP, vermutlich weil das mit 238 AS vergleichsweise große GFP eine starre Struktur hat, die die Konversion verhindert [33].

2.2 **Bewertung gentechnischer Arbeiten zur Klonierung und Expression von mutierten *PRNP*-Genen**

In der europäischen Richtlinie 2000/54/EG über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (zuletzt aktualisiert durch die Richtlinie 2019/1833 vom 24. Oktober 2019 zur Änderung der Anhänge I, III, V und VI der Richtlinie 2000/54/EG) werden die „Agencien“ der CJD (einschließlich vCJD-Variante), der BSE und anderer verwandter tierischer TSE, der GSS und der Kuru der **Risikogruppe 3**** zugeordnet.

Das Agens der Traberkrankheit (Scrapie) wird der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Der Begriff „Agens“ bezieht sich dabei auf die jeweiligen PrP^{Sc}.

Für die erstmals in den späten 1960er Jahren in Nordamerika beschriebene Erkrankung CWD ist noch nicht vollständig geklärt, ob sie auf den Menschen übertragbar ist. Javaneraffen konnten weder oral noch intrazerebral mit CWD infiziert werden [34]. Frühere Berichte zeigten, dass transgene Mäuse, die das humane *PRNP*-Gen exprimierten, im Gegensatz zu transgenen Mäusen mit dem Wapiti-Prionen, nicht suszeptibel für CWD waren [35–37]. Es wurde jedoch in PMCA-assays gezeigt, dass Hirnhomogenat aus CWD-kranken Tieren die Fehlfaltung humaner PrP^C zu PrP^{Sc} auslösen kann [38, 39], und dass die intrazerebrale Verabreichung dieser PrP^{Sc} in transgene Mäuse mit humanem *PRNP*-Gen eine neurodegenerative Erkrankung auslöst [38, 39]. Neuere Untersuchungen zeigen auch, dass transgene Mäuse mit humanem *PRNP*-Gen nach intrazerebraler Verabreichung von Hirnhomogenat CWD-kranker Weißwedelhirsche neurodegenerative Symptome zeigten. Nach der Verabreichung des Hirnhomogenats einer erkrankten Maus zeigten sowohl weitere Mäuse mit humanem *PRNP*-Gen als auch Rötelmäuse die gleiche Pathologie. Nicht nur Hirn-, sondern auch Fäzeshomogenate enthielten infektiöse PrP. Dies wurde durch dadurch belegt, dass Fäzeshomogenate verschiedener Mäuse *seeding*-Aktivität im RT-QuIC-assay zeigten und dass sowohl Mäuse als auch Rötelmäuse nach intrazerebraler Inokulation von Fäzeshomogenat erkrankten. Wie CWD-kranken Tiere scheiden also auch diese Versuchstiere infektiöse PrP^{Sc} aus [40]. Eine Infektiosität für den Menschen ist in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse und auch in Anbetracht der ggf. jahrzehntelangen Inkubationszeit nicht auszuschließen. Daher werden infektiöse CWD-PrP^{Sc} genauso wie andere für den Menschen infektiöse TSE-Agenzien vorsorglich der **Risikogruppe 3**** zugeordnet.

Bestimmte PrP-Sequenzvarianten haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, ihre Konformation zu infektiösen PrP^{Sc} zu verändern. Dies verdeutlichen z. B. die erblich bedingten TSE-Erkrankungen, die auf einzelnen Aminosäureaustauschen beruhen. Aus diesem Grund ist das Gefährdungspotential gentechnischer Arbeiten zur Expression solcher PrP im Vergleich zur Expression unveränderter PrP grundsätzlich erhöht. Das Gefährdungspotential gentechnischer Arbeiten zur Expression von mutierten PrP wird durch den Spenderorganismus des PrP und die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass GVO mit mutierten *PRNP*-Genen den Menschen besiedeln oder infizieren können.

Nicht alle Mutationen erhöhen jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc}. Die Wahrscheinlichkeit der Induktion einer Fehlfaltung kann im Tiermodell durch intrazerebrale Injektion oder durch die Anwendung von Methoden wie der PMCA oder RT-QuIC abgeschätzt werden. Ist experimentell bzw. durch Literaturdaten belegt, dass das Fehlfaltungspotential mutierter PrP nicht erhöht ist, können gentechnische Arbeiten zur Expression solcher PrP wie gentechnische Arbeiten mit WT-PrP bewertet werden. Sie werden der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet.

2.2.1 Bewertung gentechnischer Arbeiten zur Klonierung und Expression von mutierten PRNP-Genen in Empfängerorganismen, die den Menschen nicht dauerhaft besiedeln

Die rekombinante Expression von PrP in pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen führt zunächst zur Bildung von PrP^C. Eine spontane Konversion von rekombinant exprimierten, mutierten PrP^C zu infektiösen PrP^{Sc} der **Risikogruppen 2 oder 3**** während der rekombinanten Expression in pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen wurde in den letzten Jahrzehnten der Prionforschung trotz vieler Versuche nicht erreicht, weder für Wildtyp- noch für mutierte PrP [41]. Zwei besondere Fälle werden im übernächsten Absatz beschrieben. Um ausgehend von rekombinant exprimierten PrP infektiöse PrP^{Sc} zu erhalten, sind nach der Aufreinigung und Konzentration der PrP im Regelfall weitere experimentelle Schritte wie die PMCA nötig. Unterstützend können dabei so genannte Ko-Faktoren, darunter Polyanionen oder Phospholipide, wirken. In der Regel wird ohne Methoden wie PMCA o. ä. zusätzlich infektiöses *seed*-Material benötigt.

Zusammengefasst ist nach heutigem Stand bei der Expression von PrP in pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen und bei Standardaufreinigungsverfahren der dort exprimierten Wildtyp- und mutierten Prionproteine nicht davon auszugehen, dass in den GVO spontan infektiöse PrP^{Sc} gebildet werden. Von einer Gefährdung des Experimentators durch die GVO selbst ist nicht auszugehen, da die verwendeten GVO primäre humane Zellen nicht effizient transduzieren oder dauerhaft besiedeln können. Eine Gefährdung durch die akzidentelle Aufnahme von gereinigten Nukleinsäureabschnitten in Form pro- oder eukaryotischer Expressionsvektoren ist vernachlässigbar, wenn beim Umgang mit den Nukleinsäureabschnitten entsprechende Sicherheitsmaßnahmen ergriffen werden. Grundsätzlich ist die Aufnahme freier DNA in primäre Körperzellen sehr ineffizient. Eine nachfolgende Integration der DNA in das Genom ist ein sehr seltenes Ereignis. Sollten dennoch nach erfolgter Integration in ihr Genom einzelne Zellen mutierte *PRNP*-Gene exprimieren, ist es wenig wahrscheinlich, dass innerhalb der Lebensspanne der Zellen infektiöse PrP^{Sc}-Formen gebildet werden. Auch ist die Bildung infektiöser PrP^{Sc}-Formen im Menschen grundsätzlich ein langsamer Prozess. So treten bei erblich bedingten Prion-Erkrankungen wie z. B. der fCJD Symptome erst nach Jahrzehnten mit fortgeschrittenem Lebensalter auf, obwohl alle Körperzellen die mutierten PrP ggf. auch in hoher Konzentration bilden. Andererseits führen ererbte Krankheitsmutationen im Menschen mit sehr hoher Penetranz zur Erkrankung und letztlich zum Tod des Patienten. Um die wenn auch sehr wenig wahrscheinliche Aufnahme und Expression solcher Mutantenallele im Experimentator nahezu auszuschließen, werden für den Umgang mit effizienten eukaryontischen Expressionsvektoren mit Nukleinsäureabschnitten für ggf. im Menschen krankheitsverursachende PrP-Mutanten (mutierte PrP aus dem Menschen, dem Rind oder Hirschartigen) zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen empfohlen (s. Ende dieses Abschnitts und Abschnitt 2.4). Dies gilt insbesondere bei Verwendung effizienter Transfektionsreagenzien.

In den letzten Jahrzehnten wurde nur von zwei PrP-Varianten berichtet, die nach Aufreinigung und Konzentration ohne die Durchführung weiterer Schritte wie Ultraschallbehandlung eine Fehlfaltung zu Fibrillen durchlief. Eine murine PrP-Variante, die die AS 23 bis 144 umfasste (entspricht einer pathologischen PrP^{Sc}-Form bei GSS), konvertierte im Gegensatz zu einem Wildtyp-PrP^C aus den AS 23 bis 230 *in vitro* nach Aufreinigung und Inkubation in Phosphatpuffer zu Fibrillen. Die intrazerebrale Verabreichung dieser Fibrillen rief bei Mäusen die Bildung von Proteinase-K-resistenten PrP^{Sc} hervor und führte zur spongiformen Degeneration des Hirngewebes und zum Tod der Versuchstiere. Bei dieser PrP-Variante handelt es sich um die

einzigste PrP-Variante, die bereits nach Inkubation in Pufferlösung ohne weitere denaturierende Schritte oder Harnstoffzugabe im Tiermodell eine Prion-Pathologie hervorrief [42]. Eine weitere PrP-Variante des Schafes mit einer Deletion von sieben Aminosäuren im C-Terminus ($\Delta 190 - 196$) konvertierte bei Expression in einer Kaninchenzelllinie zu Proteinase-K-resistenten PrP^{Sc}. Diese konnte die Konversion weiterer PrP $\Delta 190 - 196$ anstoßen, nicht jedoch die Konversion von Wildtyp-PrP, was auf Konformationsunterschiede der PrP zurückgeführt wird [43].

Ein geringes Gefährdungspotential ist bei hohem Expressionsniveau dieser oder ähnlicher PrP-Varianten mit Deletionen im C-Terminus nicht vollständig auszuschließen. Für andere PrP-Varianten wurde eine solche spontane Konversion ohne physikalisch-chemische Vorbehandlung bzw. nur bei Expression in rekombinanten Expressionssystemen nicht gezeigt. Ein geringes Gefährdungspotential ist bei der Expression von PrP-Varianten mit Deletionen im C-Terminus nicht auszuschließen, so dass die GVO der **Risikogruppe 2** zugeordnet werden. Belegten Literatur- oder experimentelle Daten jedoch, dass eine Konversion solcher PrP-Varianten unter den in [42] genannten Bedingungen nicht eintritt, können die GVO der **Risikogruppe 1** zugeordnet werden.

Sollten weitere neuartige rekombinante Mutanten mit unbekannter Wirkung auf Mensch oder Tier generiert werden, die ohne experimentelle Induktion einer Fehlfaltung Anzeichen einer erhöhten Proteinase-K-Resistenz zeigen, müssen gentechnische Arbeiten zur Expression solcher mutierter PrP vorsorglich solange in **Sicherheitsstufe 2** eingestuft werden, bis ein fehlendes *seeding*-Potential für eine Umfaltung der PrP *in vitro* (z. B. im PMCA-assay) nachgewiesen wurde, oder aber eine spontane Infektion und Erkrankung durch die Verabreichung des mutierten PrP allein in geeigneten Tiermodellen ausgeschlossen wurde.

Gentechnische Arbeiten zur Klonierung und Expression von mutierten *PRNP*-Genen (außer den oben genannten PrP-Varianten) in Empfängerorganismen, die den Menschen nicht dauerhaft besiedeln können wie z. B. *E. coli* K12, *E. coli* BL21 oder Zellkultursysteme, haben kein Gefährdungspotential und sind der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen. Für Expressionsvektoren, deren genregulatorische Elemente eine effiziente Expression in humanen Zellen erlauben und hohe Proteinspiegel ggf. im Menschen krankheitsverursachender PrP (mutierte PrP aus dem Menschen, dem Rind oder Hirschartigen) erzeugen können, empfiehlt die ZKBS folgende zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen:

- Tragen einer Schutzbrille
- Tragen von Einmalhandschuhen
- Tragen eines Mund- und Nasenschutzes
- Diese Arbeiten sollten nicht von Menschen mit Barrierestörungen der Haut durchgeführt werden.

Wie in Anlage 2 Teil a Nr. 1 b. Nr. 5 der GenTSV vorgegeben, sollen spitze oder scharfe Gegenstände nur verwendet werden, wenn es unbedingt erforderlich ist.

Hinweis:

Wie oben dargestellt, ist im Regelfall nicht davon auszugehen, dass innerhalb der zur Expression der Prione genutzten GVO fehlgefaltete PrP mit infektiösem Potential gebildet werden. Eine Fehlfaltung ist jedoch nach Aufreinigung der PrP und weiterer Prozessierung wie PMCA oder *seeding* mit infektiösem Material nicht auszuschließen. Beim Umgang mit aufgereinigten Proteinen handelt es sich nicht um gentechnische Arbeiten. Unabhängig von der Einstufung

der gentechnischen Arbeiten selbst sind bei der Weiterverarbeitung von PrP zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen erforderlich (s. Abschnitt 2.4). Gemäß „Beschluss 603 des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS): Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) assoziierten Agenzien in Laboratorien“ ist die Überführung von aufgereinigtem, nativem Säuger-PrP „in eine Amyloid-ähnliche oder Proteinase-K-resistente Form“ eine gezielte Tätigkeit nach Biostoffverordnung, bei der geeignete Sicherheitsmaßnahmen zur Dekontamination von Oberflächen und Inaktivierung von Abfällen zu ergreifen sind [27].

2.2.2 Bewertung gentechnischer Arbeiten zur Expression von mutierten PRNP-Genen in Empfängerorganismen, die den Menschen dauerhaft besiedeln können

Bei gentechnischen Arbeiten mit GVO mit mutierten PRNP-Genen, die sich dauerhaft im Menschen vermehren können (z. B. *E. coli*-Stämme außer Laborstämmen wie *E. coli* K12-Stämmen), kann eine langfristige Expression von PrP mit ggf. erhöhter Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung nicht mit hinreichender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, falls die GVO den Menschen besiedeln. Auch die Menge gebildeten PrP ist ggf. nicht gering.

Solche GVO, die mutierte PRNP-Gene des Schafes exprimieren, werden entsprechend der Risikogruppe ihres TSE-Agens der **Risikogruppe 2** zugeordnet, da sie ein geringes Gefährdungspotential haben. Bei der Übertragung von Nukleinsäureabschnitten für mutierte PrP aus der Maus, der Rötelmaus oder dem Goldhamster ist von einem geringen Gefährdungspotential für die jeweilige Spezies auszugehen (**Risikogruppe 2**). Für den Experimentator besteht aufgrund der Speziesbarriere nach heutigem Stand kein Gefährdungspotential.

Werden PrP von Hirschartigen, dem Menschen oder dem Rind exprimiert, sind die GVO entsprechend der Risikogruppe der TSE-Agenzien der **Risikogruppe 3**** zuzuordnen, da für diese PrP keine oder nur eine niedrige Speziesbarriere besteht bzw. nicht auszuschließen ist, dass die Speziesbarriere überwunden werden kann. Die Fehlfaltung der PrP zu infektiösen PrP^{Sc} und die Konversion weiterer endogener PrP kann nicht ausgeschlossen werden.

Die gentechnischen Arbeiten werden den entsprechenden Sicherheitsstufen zugeordnet.

2.2.3 Bewertung gentechnischer Arbeiten zur Übertragung von mutierten PRNP-Genen mit viralen Vektoren

Bei der Bewertung gentechnischer Arbeiten zur Übertragung von PRNP-Genen ist neben der Aktivität der zur Expression der Gene verwendeten Promotoren der Wirtsbereich der Viren zu berücksichtigen.

2.2.3.1 Übertragung von mutierten PRNP-Genen mit baculoviralen Vektoren

Rekombinante baculovirale Vektoren werden zur Expression heterologer Proteine sowohl in Insektenzellen als auch in Säuger-Zelllinien genutzt. Häufig wird hierfür das *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) genutzt. AcMNPV-spezifische Promotoren

wie der Polyhedrinpromotor werden in Säugerzellen nicht erkannt. Zur Expression in Säugerzelllinien werden daher andere, in diesen Zellen aktive, Promotoren und Terminatoren verwendet.

Die *PRNP*-Gene können entweder in *E. coli*-K12-Stämmen durch spezifische Transposition aus einem Klonierungsvektor mit Bacmid-Systemen oder *in vitro* durch homologe Rekombination zwischen dem Baculovirusgenom und einem Klonierungsvektor kloniert werden. Gentechnische Arbeiten zur Klonierung in die Vektoren sind wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben zu bewerten. Es handelt sich um gentechnische Arbeiten der **Sicherheitsstufe 1**.

Das Gefährdungspotential der baculoviralen Vektorpartikel zur Übertragung von mutierten *PRNP*-Genen wird durch den Promotor bestimmt, unter dessen Kontrolle sie stehen: Steht das mutierte *PRNP*-Gen unter der Kontrolle von AcMNPV-spezifischen Promotoren, wird das Gen selbst nach einer zufälligen Aufnahme durch den Experimentator nicht exprimiert [44–46]. Baculovirale Vektorpartikel, die das *PRNP*-Gen unter der Kontrolle von AcMNPV-spezifischen Promotoren tragen, werden daher der **Risikogruppe 1** zugeordnet. Steht das mutierte *PRNP*-Gen dagegen unter der Kontrolle von Promotoren, die in Säugerzellen aktiv sind, kann bei einer akzidentellen Exposition des Experimentators nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die rekombinanten baculoviralen Partikel von einzelnen Zellen aufgenommen werden und es dort vorübergehend zur Expression des Transgens kommt. Von einer dauerhaften Expression ist jedoch nicht auszugehen, da die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass die baculovirale DNA ins Wirtsgenom integriert. Wegen der geringen Wahrscheinlichkeit der dauerhaften Expression der mutierten *PRNP*-Gene haben die beschriebenen gentechnischen Arbeiten ein geringes Gefährdungspotential. Die baculoviralen Partikel sind demnach der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

Insekten- oder Säugerzellen, die mit baculoviralen Partikeln mit mutierten *PRNP* transduziert wurden, exprimieren mutierte PrP. Von einer Konversion der PrP^C zu infektiösen PrP^{Sc} in Zellkultur ist jedoch nicht auszugehen (s. Abschnitt 2.2.1). Baculoviral transduzierte Insekten- oder Säugerzelllinien, die mutierte PrP exprimieren, sind daher nach Abschluss der Transduktion der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.

Die gentechnischen Arbeiten werden den entsprechenden Sicherheitsstufen zugeordnet.

2.2.3.2 Übertragung von mutierten *PRNP*-Genen mit retroviralen Vektoren

Retrovirale Vektoren werden zum stabilen Gentransfer in Säugerzellen genutzt. Meist werden γ -retrovirale oder lentivirale Vektorsysteme genutzt.

Zur Herstellung der Vektorpartikel werden zunächst in *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen Transfervektoren mit dem zu übertragenden Transgen und je nach Vektorsystem weitere Verpackungsvektoren kloniert. γ -retrovirale Vektorpartikel werden erzeugt, indem Transfervektoren in Verpackungszelllinien transfiziert werden, in denen bereits Nukleinsäureabschnitte der erforderlichen Struktur- und Nichtstrukturproteine vorliegen. Von den Verpackungszelllinien werden γ -retrovirale Vektorpartikel gebildet und abgegeben, die zur Transduktion von Zielzellen genutzt werden können. Lentivirale Vektorpartikel werden üblicherweise hergestellt, indem der Transfervektor und zwei bis vier weitere Expressionsplasmide mit Nukleinsäureabschnitten für die erforderlichen lentiviralen Struktur- und Nichtstrukturproteine sowie virale Hüllproteine in Zelllinien transfiziert werden, die zur Produktion der Vektorpartikel genutzt werden.

Der Wirtsbereich der retroviralen Vektorpartikel hängt vom verwendeten Hüllprotein ab. Er wird entweder durch die verwendete Verpackungszelllinie (γ -retrovirale Vektorsysteme) oder die verwendeten Expressionsplasmide mit dem Gen für das Hüllprotein bestimmt. Während ecotrope murine γ -retrovirale Vektorpartikel einen engen Wirtsbereich haben und nur Mäuse- und Rattenzelllinien transfizieren können, erstreckt sich der Wirtsbereich von xeno- oder amphotropen γ -retroviralen und von lentiviralen Vektorpartikeln auch auf den Menschen.

Replikationsdefekte, rekombinante Vektorpartikel werden grundsätzlich der Risikogruppe 1 (ecotrope γ -retrovirale Vektorpartikel) oder der Risikogruppe 2 zugeordnet (ampho- und xenotrope γ -retrovirale sowie lentivirale Vektorpartikel). Mit diesen Vektorpartikeln transduzierte Zellkulturen der Risikogruppe 1 werden grundsätzlich der Risikogruppe 1 zugeordnet (s. auch Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrundeliegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Stabile und transiente Genexpression mithilfe γ -retroviraler und lentiviraler Vektoren, aktualisiert Februar 2020, Az. 6790-10-41).

Die Klonierung von retroviralen Transfervektoren mit mutierten *PRNP*-Genen in *E. coli* K12-Derivaten wird wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben bewertet.

Ecotrope, γ -retrovirale Vektorpartikel mit mutierten *PRNP*-Genen werden der **Risikogruppe 1** zugeordnet, da sie den Menschen nicht infizieren können. Zudem ist ihre Stabilität gering, so dass nicht von einer Gefährdung für die Umwelt auszugehen ist.

Im Gegensatz dazu können ampho- und xenotrope, ggf. pseudotypisierte γ -retrovirale sowie lentivirale Vektorpartikel humane Zellen transduzieren, so dass diese mutierte PrP exprimieren. Aus solchen Transduktionsereignissen kann ggf. auch eine langfristige PrP-Expression resultieren und mutierte PrP können ggf. mit höherer Wahrscheinlichkeit zu PrP^{Sc} konvertieren. Das Gefährdungspotential dieser Vektorpartikel wird durch den Spenderorganismus des *PRNP*-Gens bestimmt. Außerdem ist zu beachten, dass retrovirale Partikel durch Pseudotypisierung ggf. auf zusätzlichen Wegen, z. B. über die Luft übertragen werden können. Dies ist für retrovirale Partikel nicht auszuschließen, die mit einem Hüllprotein eines Virus mit Zelltropismus für Lungenepithelzellen pseudotypisiert wurden. Amphotrope bzw. pseudotypisierte γ -retrovirale Partikel einschließlich lentiviraler Partikel, die das mutierte *PRNP*-Gen von Nagern oder Schafen übertragen, werden daher der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Amphotrope bzw. pseudotypisierte γ -retrovirale Partikel einschließlich lentiviraler Partikel, die das mutierte *PRNP*-Gen des Menschen, von Rindern oder Hirschartigen übertragen, werden der **Risikogruppe 3**** zugeordnet, bzw. der **Risikogruppe 3**, wenn die Vektorpartikel mit dem Hüllprotein eines Virus mit Zelltropismus für Lungenepithelzellen pseudotypisiert sind.

Das Gefährdungspotential von eco-, ampho- oder xenotropen Verpackungszelllinien, die mit Transfervektoren mit mutierten *PRNP*-Genen transfiziert wurden, wird durch das Gefährdungspotential der abgegebenen retroviralen Vektorpartikel bestimmt.

Mit den retroviralen Vektorpartikeln transduzierte Zielzellen werden nach Abschluss der Transduktion wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben bewertet.

Die gentechnischen Arbeiten sind den entsprechenden Sicherheitsstufen zuzuordnen.

2.2.4 Bewertung gentechnischer Arbeiten mit transgenen Tieren, die Wildtyp- oder mutierte PrP exprimieren

Bei gentechnischen Arbeiten mit transgenen Tieren, die mutierte PrP ggf. aus anderen Spenderorganismen exprimieren, ist zu beachten, dass eine Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} nicht auszuschließen ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz z. B. zur Zellkultur in den Tieren die meist noch unbekannteren Ko-Faktoren oder Bedingungen vorliegen können, die die Fehlfaltung begünstigen. Die für die Fehlfaltung der PrP bestimmter Spenderorganismen erforderlichen Ko-Faktoren stehen jedoch nicht in jedem Tiermodell zur Verfügung. So ist es nicht gelungen, ein Mausmodell zu erzeugen, bei denen humane Wildtyp- oder mutierte PrP fehlfalten [47]. Mäuse sind auch, im Gegensatz zu Rötelmäusen, resistent gegen eine Infektion mit humanen, genetisch bedingten CJD-PrP [48].

Transgene Versuchstiere, die klinische Symptome einer neurodegenerativen Erkrankung zeigen, können infektiöse PrP^{Sc} über Körperausscheidungen abgeben. Studien mit erkrankten Tieren belegen zudem, dass mit dem Auftreten der ersten klinischen Symptome infektiöse Prione über Körperausscheidungen wie beispielsweise Fäzes und Urin abgegeben werden können. Die beschriebenen erkrankten Tiere hatten sich entweder in freier Wildbahn (Hirschartige) bzw. Zuchtbetrieben (Schafe) infiziert oder es handelte sich um Versuchstiere (Hamster und Mäuse), denen über verschiedene Infektionswege infektiöses Material verabreicht worden war [14, 15, 40, 49, 50]. In einem Fall wurde auch beschrieben, dass eine transgene Maus, die das humane PrP überexprimierte, nach intrazerebraler Verabreichung von Hirnhomogenat eines CWD-kranken Weißwedelhirsches bereits vor Symptombeginn PrP über den Fäzes abgab, die im RT-QuIC-assay *seeding*-Aktivität zeigten [40]. Außerdem ist zu beachten, dass selbst transgene Tiere, die Wildtyp-Prionproteine exprimieren, auch ohne Inokulation mit infektiösem Material erkranken können. So ist der Literatur zu entnehmen, dass transgene Mäuse, die Wildtyp-Prionproteine aus Hamster und Schaf exprimieren, in Abhängigkeit vom Alter der transgenen Mäuse und der Expressionsstärke der Prionproteine spontane Prion-ähnliche neurodegenerative Erkrankungen ausbilden, die zum Tod der Tiere führen. Es wurden jedoch keine Ablagerungen von PrP^{Sc} (Amyloid-Plaques) beobachtet [51]. Tiere einer anderen Mauslinie, die das Wildtyp-Maus-*PRNP*-Gen überexprimieren, erkrankten ebenfalls an einer Neuropathologie, deren Symptome denen von TSE-Erkrankungen ähneln [52].

Aus diesem Grund ist für die Bewertung gentechnischer Arbeiten mit PrP-exprimierenden transgenen Tieren zum einen ausschlaggebend, aus welchem Spenderorganismus das exprimierte *PRNP*-Gen stammt, da dies das Gefährdungspotential und die Infektiosität für Menschen und Tiere mitbestimmt. Zum anderen ist zu beachten, ob eingefügte Mutationen im *PRNP*-Gen die Wahrscheinlichkeit einer Konversion zu PrP^{Sc} und damit der Abgabe infektiöser PrP^{Sc} erhöhen.

Transgene Versuchstiere, die Wildtyp-*PRNP*-Gene anderer Spenderorganismen exprimieren, werden der **Risikogruppe 1** zugeordnet. Abhängig von der Expressionsstärke der *PRNP*-Gene, z. B. bedingt durch eine erhöhte Kopienzahl des Transgens, kann zwar ggf. eine Neuropathologie ausgelöst werden, die auch von einer Aggregation und Ablagerung von PrP begleitet sein kann [52], die Bildung Protease-resistenter PrP-Formen wurde jedoch nicht beobachtet. Darüber hinaus führte die intrazerebrale Injektion von Hirnmaterial von Mäusen, die Wildtyp-*PRNP*-Gen exprimierten und frühzeitig Symptome einer Neuropathologie zeigten, in Mäuse des selben Genotyps nicht dazu, dass sich die Inkubationszeit der Neuropathologie

signifikant verkürzte [52]. Von einer Bildung und Abgabe infektiöser PrP^{Sc} ist daher bei Mäusen, die Wildtyp-*PRNP*-Gene exprimieren, nicht auszugehen [51, 52].

Bei Versuchen mit transgenen Tieren, die mutierte *PRNP*-Gene exprimieren, kann die spontane Fehlfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} und die Abgabe infektiöser PrP^{Sc} unter bestimmten Umständen nicht ausgeschlossen werden. Falls davon auszugehen ist oder auch erwartet werden kann (z. B. aufgrund entsprechender Berichte in der wissenschaftlichen Literatur), dass die transgenen Versuchstiere infektiöse PrP^{Sc} bilden und abgeben, werden die Versuchstiere entsprechend der Risikogruppe des infektiösen PrP^{Sc} des Spenderorganismus eingestuft (Nager und Schaf: **Risikogruppe 2**; Rind, Hirschartige und Mensch: **Risikogruppe 3****), auch wenn sie klinisch unauffällig sind.

In folgenden Fällen wird jedoch nicht davon ausgegangen, dass infektiöse PrP^{Sc} gebildet und abgegeben werden, so dass auch transgene Versuchstiere, die mutierte *PRNP*-Gene exprimieren, der **Risikogruppe 1** zugeordnet werden:

- Es werden mutierte PrP exprimiert, für die belegt ist, dass im verwendeten Tiermodell keine frühzeitige Neuropathologie auftritt,
- es werden mutierte PrP exprimiert, für die belegt ist, dass im verwendeten Tiermodell zwar eine frühzeitige Neuropathologie auftritt, jedoch keine infektiösen PrP^{Sc} bzw. PrP^{Sc} mit *seeding*-Aktivität abgegeben werden oder
- es werden humane *PRNP*-Gene in Mäusen exprimiert (s. o., keine Fehlfaltung zu erwarten [47]).

Bei der Inaktivierung der für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufen 2 und 3 eingesetzten Käfige und Materialien sind die unter Punkt 2.4 beschriebenen Vorgaben zu beachten.

2.3 Bewertung gentechnischer Arbeiten, bei denen GVO mit infektiösen PrP^{Sc} infiziert werden

Das Gefährdungspotential von Arbeiten, bei denen mit Material umgegangen wird, das infektiöse PrP enthält, wird durch das Gefährdungspotential der PrP bestimmt. Je nach Spenderorganismus sind Sicherheitsmaßnahmen der Stufen 2 (Nager-, Schaf-PrP) oder 3 einzuhalten (bovines, cervides oder humanes PrP). Dies betrifft z. B. die Verwendung von PrP^{Sc}-infizierten Zelllinien oder Versuche mit infizierten Tieren.

2.4 Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten mit mutierten PrP

Bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 sind zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen nur für den Umgang mit Nukleinsäureabschnitten erforderlich, bei denen mit Expressionsvektoren umgegangen wird, deren genregulatorische Elemente eine effiziente Expression in humanen Zellen erlauben und hohe Proteinspiegel ggf. im Menschen krankheitsverursachender PrP (mutierte PrP aus dem Menschen, dem Rind oder Hirschartigen) erzeugen können.

Bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufen 2 und 3 zur Expression von mutierten Prionogenen aus dem Menschen, dem Rind oder Hirschartigen, bei denen nicht auszuschließen

ist, dass die Konversionswahrscheinlichkeit erhöht ist, empfiehlt die ZKBS ebenfalls, zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen zu treffen.

Die zusätzlichen Sicherheitsmaßnahmen umfassen

- das Tragen einer Schutzbrille
- das Tragen von Einmalhandschuhen
- und das Tragen eines Mund- und Nasenschutzes (bei pseudotypisierten retroviralen Vektoren mit Wirtstropismus für humane Lungenepithelzellen und anderen luftübertragbaren Vektorsystemen wie adenovirale oder AAV-Vektoren: Atemschutz der Klasse P3).
- Diese Arbeiten sollten nicht von Menschen mit Barrierestörungen der Haut durchgeführt werden.

Wie in Anlage 2 Teil a Nr. 1 b. Nr. 5 der GenTSV vorgegeben, sollen spitze oder scharfe Gegenstände nur verwendet werden, wenn es unbedingt erforderlich ist.

Für den Umgang mit aufgereinigtem PrP mit Mutationen, bei denen nicht auszuschließen ist, dass die Fehlfaltungswahrscheinlichkeit erhöht ist, sowie für gentechnische Arbeiten, bei denen mit infektiösen PrP^{Sc} der Risikogruppen 2 und 3** umgegangen wird bzw. solche entstehen können, einschließlich der Arbeiten mit transgenen Tieren, die infektiöse PrP^{Sc} abgeben können, empfiehlt die ZKBS außerdem grundsätzlich, den „Beschluss 603 des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS): Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) assoziierten Agenzien in Laboratorien“ zu beachten [27]. Dieser gibt konkrete Empfehlungen zu technischen, organisatorischen und persönlichen Schutzmaßnahmen, die bei Tätigkeiten mit TSE-assoziierten Agenzien in diagnostischen und Forschungslaboratorien zu beachten sind, z. B. zur Dekontamination der Oberflächen und Inaktivierung von Abfällen.

3 Literatur

1. **Prusiner SB** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**(4542):136–44.
2. **Kovač V, Hafner-Bratkovič I, Čurin Šerbec V** (2016). Anchorless forms of prion protein - Impact of truncation on structure destabilization and prion protein conversion. *Biochem Biophys Res Commun* **481**(1-2):1–6.
3. **Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP** (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**(9528):2068–74.
4. **Hilton DA** (2006). Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt–Jakob disease. *J Pathol* **208**(2):134–41.
5. **Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, Ryan JB, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR, Wells GA** (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* **382**(6594):779–88.
6. **Head MW, Ironside JW** (2012). Review: Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol Appl Neurobiol* **38**(4):296–310.

7. **Kimberlin RH, Walker CA** (1978). Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J Comp Pathol* **88**(1):39–47.
8. **Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D** (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **290**(12):692–3.
9. **Fraser H** (1982). Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* **295**(5845):149–50.
10. **Scott JR, Foster JD, Fraser H** (1993). Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease. *Vet Microbiol* **34**(4):305–9.
11. **Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will R** (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**(9407):417–21.
12. **Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hays SA, Hayes-Klug J, Seelig DM, Wild MA, Wolfe LL, Spraker TR, Miller MW, Sigurdson CJ, Telling GC, Hoover EA** (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314**(5796):133–6.
13. **Mathiason CK, Hays SA, Powers J, Hayes-Klug J, Langenberg J, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hoover EA** (2009). Infectious prions in pre-clinical deer and transmission of chronic wasting disease solely by environmental exposure. *PLoS One* **4**(6):e5916.
14. **Safar JG, Lessard P, Tamgüney G, Freyman Y, Deering C, Letessier F, DeArmond SJ, Prusiner SB** (2008). Transmission and Detection of Prions in Feces. *J Infect Dis* **198**(1):81–9.
15. **Chen B, Morales R, Barria MA, Soto C** (2010). Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nat Methods* **7**(7):519–20.
16. **Haybaeck J, Heikenwalder M, Klevenz B, Schwarz P, Margalith I, Bridel C, Mertz KD, Zirdum E, Petsch B, Fuchs TJ, Stitz L, Aguzzi A** (2011). Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS Pathog* **7**(1):e1001257.
17. **Denkers ND, Seelig DM, Telling GC, Hoover EA** (2010). Aerosol and nasal transmission of chronic wasting disease in cervidized mice. *J Gen Virol* **91**(Pt 6):1651–8.
18. **Brandel JP, Vlaicu MB, Culeux A, Belondrade M, Bougard D, Grznarova K, Denouel A, Plu I, Bouaziz-Amar E, Seilhean D, Levasseur M, Haïk S** (2020). Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Diagnosed 7.5 Years after Occupational Exposure. *N Engl J Med* **383**(1):83–5.
19. **Watson N, Brandel JP, Green A, Hermann P, Ladogana A, Lindsay T, Mackenzie J, Pocchiari M, Smith C, Zerr I, Pal S** (2021). The importance of ongoing international surveillance for Creutzfeldt–Jakob disease. *Nat Rev Neurol* **17**(6):362–79.
20. **Collinge J** (2012). Cell biology. The risk of prion zoonoses. *Science* **335**(6067):411–3.
21. **Bett C, Fernández-Borges N, Kurt TD, Lucero M, Nilsson KPR, Castilla J, Sigurdson CJ** (2012). Structure of the β 2- α 2 loop and interspecies prion transmission. *FASEB J* **26**(7):2868–76.
22. **Mead S, Gandhi S, Beck J, Caine D, Gallujipali D, Carswell C, Hyare H, Joiner S, Ayling H, Lashley T, Linehan JM, Al-Doujaïly H, Sharps B, Revesz T, Sandberg MK, Reilly MM, Koltzenburg M, Forbes A, Rudge P, Brandner S, Warren JD, Wadsworth JDF, Wood NW, Holton JL, Collinge J** (2013). A novel prion disease associated with diarrhea and autonomic neuropathy. *N Engl J Med* **369**(20):1904–14.
23. **Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, Huor A, Lacroux C, Andréoletti O, Vilette D** (2011). A Simple, Versatile and Sensitive Cell-Based Assay for Prions from Various Species. *PLoS One* **6**(5):e20563.
24. **Edgeworth JA, Jackson GS, Clarke AR, Weissmann C, Collinge J** (2009). Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9):3479–83.
25. **Saborio GP, Permanne B, Soto C** (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**(6839):810–3.

26. **Caughey B, Orrú CD, Wilham JM, Vascellari S, Raymond GJ** (2012). Prion-seeded conversion of recombinant PrP: implications for prion biology and diagnostics. *Prion* **6**:11–2.
27. **Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe** (2011). Beschluss 603 Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) assoziierter Agenzien in TSE-Laboratorien. <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/Beschluss-603.html>. Besucht am 26.01.2022.
28. **Rutala WA, Weber DJ** (2010). Guideline for disinfection and sterilization of prion-contaminated medical instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol* **31**(2):107–17.
29. **WHO** (2000). WHO infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies: report of a WHO consultation, Geneva, Switzerland, 23-26 March 1999. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66707>. Besucht am 26.01.2022.
30. **Murphy RG, Scanga JA, Powers BE, Pilon JL, Vercauteren KC, Nash PB, Smith GC, Belk KE** (2009). Alkaline hydrolysis of mouse-adapted scrapie for inactivation and disposal of prion-positive material. *J Anim Sci* **87**(5):1787–93.
31. **Taylor DM, Fernie K, McConnell I** (1997). Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Vet Microbiol* **58**(2-4):87–91.
32. **Rutishauser D, Mertz KD, Moos R, Brunner E, Rülcke T, Calella AM, Aguzzi A** (2009). The Comprehensive Native Interactome of a Fully Functional Tagged Prion Protein. *PLoS One* **4**(2):e4446.
33. **Barmada SJ, Harris DA** (2005). Visualization of Prion Infection in Transgenic Mice Expressing Green Fluorescent Protein-Tagged Prion Protein. *J Neurosci* **25**(24):5824–32.
34. **Race B, Williams K, Orrú CD, Hughson AG, Lubke L, Chesebro B** (2018). Lack of Transmission of Chronic Wasting Disease to *Cynomolgus* Macaques. *J Virol* **92**(14):e00550-18.
35. **Kong Q, Huang S, Zou W, Vanegas D, Wang M, Wu D, Yuan J, Zheng M, Bai H, Deng H, Chen K, Jenny AL, O'Rourke K, Belay ED, Schonberger LB, Petersen RB, Sy MS, Chen SG, Gambetti P** (2005). Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci* **25**(35):7944–9.
36. **Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sigurdson CJ, Glatzel M, O'Malley C, Powell C, Asante EA, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JDF, Collinge J** (2010). Chronic wasting disease prions are not transmissible to transgenic mice overexpressing human prion protein. *J Gen Virol* **91**:2651–7.
37. **Tamgüney G, Giles K, Bouzamondo-Bernstein E, Bosque PJ, Miller MW, Safar JG, DeArmond SJ, Prusiner SB** (2006). Transmission of Elk and Deer Prions to Transgenic Mice. *Journal of virology* **80**(18):9104.
38. **Barria MA, Balachandran A, Morita M, Kitamoto T, Barron R, Manson JC, Knight R, Ironside JW, Head MW** (2014). Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. *Emerg Infect Dis* **20**(1):88–97.
39. **Wang Z, Qin K, Camacho MV, Cali I, Yuan J, Shen P, Greenlee J, Kong Q, Mastrianni JA, Zou W-Q** (2021). Generation of human chronic wasting disease in transgenic mice. *Acta Neuropathol Commun* **9**(1):158.
40. **Hannaoui S, Zemlyankina I, Chang SC, Arifin MI, Béringue V, McKenzie D, Schatzl HM, Gilch S** (2022). Transmission of cervid prions to humanized mice demonstrates the zoonotic potential of CWD. *Acta Neuropathol* **144**(4):767–84.
41. **Supattapone S** (2020). Cofactor molecules: Essential partners for infectious prions. *Prog Mol Biol Transl Sci* **175**:53–75.
42. **Choi J-K, Cali I, Surewicz KA, Kong Q, Gambetti P, Surewicz WK** (2016). Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(48):13851–6.

43. **Munoz-Montesino C, Larkem D, Barbereau C, Igel-Egalon A, Truchet S, Jacquet E, Nhiri N, Moudjou M, Sizun C, Rezaei H, Béringue V, Dron M** (2020). A seven-residue deletion in PrP leads to generation of a spontaneous prion formed from C-terminal C1 fragment of PrP. *J Biol Chem* **295**(41):14025–39.
44. **Pennock GD, Shoemaker C, Miller LK** (1984). Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol Cell Biol* **4**(3):399–406.
45. **Tjia ST, Altenschildesche GM zu, Doerfler W** (1983). Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology* **125**(1):107–17.
46. **Boyce FM, Bucher NL** (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6):2348–52.
47. **Watts JC, Prusiner SB** (2017). Experimental Models of Inherited PrP Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**(11).
48. **Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, Cartoni C, Ingrosso L, Boyle A, Galeno R, Sbriccoli M, Lipp H-P, Bruce M, Pocchiari M, Agrimi U** (2006). Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* **2**(2):e12.
49. **Bessen RA, Shearin H, Martinka S, Boharski R, Lowe D, Wilham JM, Caughey B, Wiley JA** (2010). Prion Shedding from Olfactory Neurons into Nasal Secretions. *PLOS Pathogens* **6**(4):e1000837.
50. **Gough KC, Maddison BC** (2010). Prion transmission. Prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* **4**(4):275–82.
51. **Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang S-L, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB** (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* **76**(1):117–29.
52. **Jackson GS, Linehan J, Brandner S, Asante EA, Wadsworth JDF, Collinge J** (2022). Overexpression of mouse prion protein in transgenic mice causes a non-transmissible spongiform encephalopathy. *Sci Rep* **12**(1):17198.