

## **Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus**

Seit der Entwicklung verschiedener Reverse-Genetik-Systeme können die Genome einer Vielzahl von Viren einfach *in vitro* verändert und entsprechende Viruspartikel in Zellkulturen hergestellt werden. Zu diesem Zweck wird die virale genomische DNA bzw. eine DNA-Kopie (cDNA) der viralen genomischen RNA in einen geeigneten Vektor integriert. Das resultierende Plasmid oder von ihm *in vitro*-transkribierte RNA kann anschließend in für das Virus susceptible Zellkulturen oder Wirtsorganismen eingebracht werden. In den Zellen kommt es daraufhin zur Bildung und Abgabe rekombinanter replikationskompetenter Viruspartikel. Ggf. ist hierfür die zusätzliche Anwesenheit von Helferplasmiden oder -viren erforderlich.

Die Amplifikation der Plasmide erfolgt typischerweise in Derivaten des K12-Stammes von *Escherichia coli* der **Risikogruppe 1**. Gemäß § 5 Abs. 2 GenTSV ist bei Übertragung des Genoms eines Spenderorganismus der Risikogruppe 2 bis 4 das Gefährdungspotenzial des Spenderorganismus vollständig in die Risikobewertung des resultierenden gentechnisch veränderten Organismus (GVO) einzubeziehen. Der GMO ist damit mindestens der Risikogruppe des Spenderorganismus zuzuordnen. Hiervon kann gemäß § 7 Abs. 1 GenTSV nur dann nach unten abgewichen werden, wenn das verwendete Vektor-Empfängersystem die Anforderungen an biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 8 GenTSV erfüllt.

Maßgeblich für die Bewertung des Gefährdungspotenzials von *E. coli* K12-Derivaten, die durch Plasmide transformiert wurden, die ein Virusgenom oder dessen cDNA enthalten, ist die Möglichkeit, dass diese GMO eine virale Infektion in Mensch, Tier oder Pflanze verursachen könnten. Eine Bildung von Viruspartikeln in *E. coli* kann ausgeschlossen werden, da in diesen eukaryotische Wirtsfaktoren fehlen, die für die Expression und Verpackung der viralen Genome essenziell sind. Daher ist nicht von einer direkten Infektion durch virushaltige Kulturüberstände von *E. coli* auszugehen. Demgegenüber ist grundsätzlich jedoch eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf eukaryotische Zellen und ein damit einhergehender Start des viralen Replikationszyklus denkbar. Entsprechend ist im Zuge der Risikobewertung von Arbeiten mit den genannten GMO zunächst die Wahrscheinlichkeit einer solchen Plasmidübertragung abzuschätzen. In einem zweiten Schritt sind dann die spezifischen Replikationseigenschaften des klonierten Virusgenoms, welche durch seine Art und Polarität maßgeblich mitbestimmt werden, in die Risikobewertung einzubeziehen.

Bei Prokaryoten ist der Austausch von DNA zwischen nahe verwandten Spezies ein natürlicher Vorgang, der von spezialisierten Proteinen verschiedener Sekretionssysteme ermöglicht wird. Eine gezielte DNA-Übertragung von Prokaryoten auf Eukaryoten ist hingegen ein in der Natur äußerst seltenes Ereignis, welches nur für wenige Prokaryoten, z. B.

---

<sup>1</sup> Verweise auf die Gentechnik-Sicherheitsverordnung aktualisiert (Februar 2021)

*Agrobacterium tumefaciens*, beschrieben ist und das von speziellen Mobilisierungsfaktoren vermittelt wird. Es gibt zurzeit keine Belege dafür, dass eine DNA-Übertragung von *E. coli* auf Eukaryoten in der Natur stattfinden kann [1]. Hiervon unabhängig zeichnen sich *E. coli*-Sicherheitsstämme durch einen Defekt ihres Sekretionssystems aus. Auf den verwendeten Plasmiden dürfen zudem keine Mobilisierungsfaktoren bzw. deren Erkennungssequenzen kodiert sein, wenn die Plasmide als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt werden sollen. Bei Nutzung eines als biologische Sicherheitsmaßnahme anerkannten Vektor-Empfängersystems ist daher nicht von einer gezielten Plasmidübertragung von *E. coli* auf eukaryotische Zellen auszugehen. *In vitro*-Untersuchungen zeigten jedoch, dass es auch bei Nutzung solcher Sicherheitsstämme zu einer unspezifischen, möglicherweise durch Phagozytose oder Membranfusion vermittelten, Plasmidübertragung auf Kulturen von Säugerzellen kommen kann. Beinhaltet das Plasmid die genomische DNA bzw. cDNA eines Virus, kann es hierbei zum Start einer Infektion kommen. Ein solches Ereignis ist jedoch äußerst selten. So führte in einer Studie die 4-stündige Inkubation mit  $4 \times 10^9$  *E. coli* HB 101, die ein pBR322-abgeleitetes Plasmid mit drei direkt hintereinander klonierten Kopien des linearisierten Genoms des DNA-Virus *Simian virus 40* (SV40) enthielten, zu einem einzigen Infektionsereignis in  $10^7$  Zellen der Affenzelllinie CV1 [2]. Ebenso zeigten sich nach 24-stündiger Inkubation von  $2,5 \times 10^6$  Zellen der Affenzelllinie BGM mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* JW1106 mit einem pBR322-Derivat mit der cDNA des Poliovirus zehn Infektionsereignisse. Die cDNA des Plusstrang-RNA-Virus stand hierbei nicht unter der Kontrolle eines Promotors. Es muss demnach zu einer Initiation der Transkription viraler genomischer RNA an einem kryptischen Promotor innerhalb des Vektorrückgrats gekommen sein. Wurde ein eukaryotischer Promotor vor die cDNA kloniert, stieg die Infektionshäufigkeit um den Faktor 10 [3]. Zu einer möglichen Übertragung von *E. coli*-Plasmid-DNA auf Pflanzenzellen liegen keine Informationen vor.

Da bei Arbeiten mit *E. coli* Aerosole entstehen können, die die Bakterien enthalten, kann eine Plasmidübertragung auf Zellen des Experimentators nach Inhalation entsprechender Aerosole als äußerst seltenes Ereignis nicht ausgeschlossen werden. Ebenso kann eine Aufnahme von *E. coli* und ihrer Plasmide durch Tiere bzw. deren Zellen nach einem Austrag der Bakterien in die Umwelt nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Eine (mechanische) Übertragung von Plasmid-DNA aus *E. coli* auf Pflanzenzellen scheint hingegen wenig wahrscheinlich. Von einer dauerhaften Etablierung von K12-abgeleiteten *E. coli*-Sicherheitsstämmen in der Umwelt ist nicht auszugehen, da *E. coli* K12 spätestens nach drei Wochen nicht mehr in der Umwelt oder dem Verdauungstrakt verschiedener Tiere nachgewiesen werden konnte [4].

## Hinweis

Bei den im Folgenden aufgeführten Bewertungen wird davon ausgegangen, dass sowohl das als Empfängerorganismus eingesetzte *E. coli* K12-Derivat der **Risikogruppe 1** als auch der verwendete Vektor die Anforderungen an biologische Sicherheitsmaßnahmen erfüllen.

Soll ein Empfängerorganismus oder ein Vektor verwendet werden, der die in § 8 Abs. 1 bzw. 2 GenTSV genannten Anforderungen an Teile einer biologischen Sicherheitsmaßnahme nicht erfüllt, wie z. B. ein *E. coli* B-Stamm oder ein binärer Vektor basierend auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*, ist der GVO in der Regel derselben Risikogruppe zuzuordnen, wie das replikationskompetente Virus, dessen Genom auf den Empfängerorganismus übertragen wird.

## Hinweis zu Virusgenomen mit Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen

In *E. coli* wird die virale genomische (c)DNA durch bakterielle DNA-Polymerasen amplifiziert. Die (c)DNA unterliegt somit den bakteriellen DNA-Korrekturmechanismen. Eine Etablierung zufälliger Mutationen innerhalb der viralen (c)DNA ist daher als sehr selten anzusehen. Eine

DNA- oder RNA-Amplifikation durch virale Polymerasen, die aufgrund fehlender Nukleaseaktivität zu hohen Mutationsraten führen kann, erfolgt in *E. coli* nicht. Eine Reversion von ggf. gezielt in die genomische (c)DNA eines Virus eingeführten Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in *E. coli* ist, sofern ein DNA-Rekombinationsereignis auszuschließen ist, daher wenig wahrscheinlich. Darüber hinaus ist nicht davon auszugehen, dass ggf. in *E. coli* entstandene Punktmutationen, Insertionen oder geringumfängliche Deletionen zu einem Wachstumsvorteil für *E. coli* oder der bevorzugten Amplifikation mutierter Plasmide führen. Eine Anreicherung von zufällig mutierten Plasmiden ist daher nicht zu erwarten. Für die nachfolgend beschriebene Bewertung der transformierten *E. coli* ist somit die Risikogruppenzuordnung der beabsichtigten Virusmutanten zu beachten.

## **Bewertung**

### Pflanzenviren

Es gibt gegenwärtig keine Literaturdaten, die darauf hindeuten, dass eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf Pflanzenzellen in der Natur oder im Labor möglich ist. Eine durch *E. coli* vermittelte Infektion einer Wirtspflanze ist daher unabhängig von Art und Polarität des im Plasmid enthaltenen Virusgenoms nicht zu erwarten. Pflanzenviren mit einer Pathogenität für den Menschen oder Tiere sind nicht beschrieben. Die transformierten *E. coli* K12-Derivate besitzen demnach kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt. *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die genomische DNA bzw. cDNA eines Pflanzenvirus enthalten, sind unabhängig von der Risikogruppe des Pflanzenvirus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt.

### Animale Viren mit Plusstrang-RNA-Genom

Bei Viren mit Plusstrang-RNA-Genom (z. B. Flavi-, Picorna- und Alphaviren) stellt die genomische RNA eine mono- oder bicistronische mRNA dar, von der mindestens die sogenannten Nichtstrukturproteine in Form eines Polyproteins translatiert werden. In diesem sind alle Enzymaktivitäten und viralen Ko-Faktoren enthalten, die für die Genomreplikation und ggf. Transkription weiterer subgenomischer mRNAs notwendig sind. Die Prozessierung des Polyproteins in die einzelnen Proteineinheiten erfolgt durch zelluläre Proteasen oder durch Proteasen, die ebenfalls im Polyprotein enthalten sind. Damit ist die genomische RNA von Plusstrang-RNA-Viren auch bei anfänglicher Abwesenheit viraler Proteine für suszeptible Zellen infektiös. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es bei einer Übertragung eines Plasmids mit der genomischen cDNA eines Plusstrang-RNA-Virus auf den Experimentator oder ein suszeptibles Wirtstier aufgrund der im Plasmid vorliegenden klonierten oder kryptischen Promotoren zu einer Infektion kommt. Das Gefährdungspotenzial der durch solche Plasmide transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 1** richtet sich nach der Risikogruppe des Virus, dessen genomische cDNA enthalten ist. Ist in dem Plasmid die cDNA eines Plusstrang-RNA-Virus der **Risikogruppe 1** oder **2** enthalten, sind die transformierten *E. coli* entsprechend der Risikogruppe des Virus der **Risikogruppe 1** bzw. **2** zuzuordnen. Ist in dem Plasmid die cDNA eines Plusstrang-RNA-Virus der **Risikogruppe 3** oder **3\*\*** enthalten, sind die transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Bei dieser Einstufung wird berücksichtigt, dass eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf eukaryotische Zellen ein äußerst seltenes Ereignis ist. Dem hierdurch begründeten geringen Gefährdungspotenzial der gentechnischen Arbeit wird mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 ausreichend entgegengewirkt. Das bisher einzige bekannte Plusstrang-RNA-Virus der **Risikogruppe 4** ist das *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), welches primär als Tierpathogen bei

verschiedenen Huftieren auftritt. Die Einstufung in die **Risikogruppe 4** trägt der sehr hohen Kontagiosität des Virus und der großen wirtschaftlichen Relevanz einer möglicherweise hieraus folgenden Epizootie in diesen Wirtstieren Rechnung. Der geringen Wahrscheinlichkeit eines Austrags von *E. coli* in die Umwelt und einer anschließenden Übertragung von Plasmid-DNA auf ein Wirtstier kann mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 ausreichend entgegengewirkt werden. *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die genomische FMDV-cDNA enthalten, sind daher der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Werden in Zukunft weitere Plusstrang-RNA-Viren der **Risikogruppe 4** zugeordnet, sind die *E. coli* mit Plasmiden mit der cDNA der entsprechenden Viren im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

### Animale Retroviren

Die in Plasmide klonierte cDNA von Retroviren entspricht in der Regel dem retroviralen Provirus. Dieses enthält in seinen terminalen nicht kodierenden Regionen eine Promotorsequenz für die zelluläre RNA-Polymerase II. Wird Plasmid-DNA auf eine suszeptible Wirtszelle übertragen, kommt es demnach zur Transkription viraler mRNA und zur Initiation des viralen Replikationszyklus. Das Gefährdungspotenzial der durch solche Plasmide transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 1** richtet sich nach der Risikogruppe des Retrovirus, dessen genomische cDNA enthalten ist. Ist in dem Plasmid die cDNA eines Retrovirus der **Risikogruppe 1** oder **2** enthalten, sind die transformierten *E. coli* entsprechend der Risikogruppe des Virus der **Risikogruppe 1** bzw. **2** zuzuordnen. Ist in dem Plasmid die cDNA eines Retrovirus der **Risikogruppe 3\*\*** enthalten, sind die transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Bei dieser Einstufung wird berücksichtigt, dass eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf eukaryotische Zellen ein äußerst seltenes Ereignis ist. Dem hierdurch begründeten geringen Gefährdungspotenzial der gentechnischen Arbeit wird mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 ausreichend entgegengewirkt.

### Animale Viren mit Minusstrang-RNA-Genom, außer Kolmioviren

Im Gegensatz zur Situation bei Plusstrang-RNA-Viren können vom Genom von Minusstrang-RNA-Viren (z. B. Filo-, Paramyxo- und Rhabdoviren) aufgrund seiner zur mRNA entgegengesetzten Polarität keine Proteine translatiert werden. Zu Beginn des typischerweise zytoplasmatischen Replikationszyklus muss daher zunächst mRNA transkribiert werden. Dieser Schritt wird, außer für Viren der Familie *Kolmioviridae* (siehe unten), von einer viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und ihren (viralen) Ko-Faktoren katalysiert. Zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerasen können diese Funktion aufgrund ihrer Lokalisation im Zellkern und ihrer Spezifität für DNA-Matrizen nicht ausführen. Das Genom von Minusstrang-RNA-Viren mit nicht-segmentiertem Genom (Ordnung *Mononegavirales*) ist daher nur im Komplex mit der viralen RNA-Polymerase (L), dem viralen Nukleoprotein (N bzw. NP) und dem viralen Phosphoprotein (P bzw. VP35) sowie ggf. weiteren viralen oder nicht-viralen Proteinen infektiös. Die für die Transkription und virale Genomreplikation essenziellen Proteine L und N/NP sind an den entgegengesetzten Enden des Virusgenoms kodiert. Dazwischen liegt eine variable Anzahl zusätzlicher offener Leserahmen, in denen u. a. das Phosphoprotein und die Hüllproteine kodiert sind. Alle Viren der Ordnung *Mononegavirales* transkribieren mehrere subgenomische monocistronische mRNAs. Polyproteine mit allen für die RNA-Synthese notwendigen Enzymaktivitäten und viralen Ko-Faktoren werden von Minusstrang-RNA-Viren nicht kodiert. Auch die vollständige antigenomische RNA (cRNA) ist daher in Abwesenheit von L, N/NP und P/VP35 nicht infektiös.

Kommt es zur Übertragung eines Plasmids mit der genomischen cDNA eines Minusstrang-RNA-Virus, wäre diese nur dann infektiös, wenn es gleichzeitig zur Transkription der genomischen RNA oder der cRNA sowie aller mRNAs käme, die für Proteine des Replikationskomplexes kodieren. Obwohl dies unter Nutzung mehrerer Promotoren wenigstens im Einzelfall technisch möglich ist [5], ist ein solcher Ansatz in der Praxis ungebräuchlich. Bei den typischen Reverse-Genetik-Systemen für Minusstrang-RNA-Viren werden Plasmide eingesetzt, bei denen die Transkription der genomischen RNA oder der cRNA von einem Phagen- oder eukaryotischen Promotor kontrolliert wird. Die mRNAs der Proteine des Replikationskomplexes werden über separate Expressionsplasmide bereitgestellt. Die zufällige Anwesenheit mehrerer kryptischer Promotoren innerhalb der viralen Genomsequenz (wenigstens *upstream* von P und L sowie ggf. N) ist wenig wahrscheinlich. Werden Plasmide verwendet, die lediglich einen Promotor enthalten, ist nicht von einer Initiation einer Infektion durch eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf für das Virus susceptible Zellen auszugehen. Die *E. coli* besitzen demnach kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt. *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die genomische cDNA eines Minusstrang-RNA-Virus unter Kontrolle eines einzigen Promotors enthalten, sind mit der untenstehenden Ausnahme unabhängig von der Risikogruppe des Virus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt.

Werden Plasmide verwendet, die für die gleichzeitige Transkription der genomischen RNA bzw. cRNA und subgenomischen mRNAs mehrere Promotoren enthalten, richtet sich das Gefährdungspotenzial der transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 1** nach der Risikogruppe des Minusstrang-RNA-Virus, dessen genomische cDNA enthalten ist. Ist in einem solchen Plasmid die cDNA eines Minusstrang-RNA-Virus der **Risikogruppe 1** oder **2** enthalten, sind die transformierten *E. coli* entsprechend der Risikogruppe des Virus der **Risikogruppe 1** bzw. **2** zuzuordnen. Ist in einem solchen Plasmid die cDNA eines Minusstrang-RNA-Virus der **Risikogruppe 3** oder **3\*\*** enthalten, sind die transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Bei dieser Einstufung wird berücksichtigt, dass eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf eukaryotische Zellen ein äußerst seltenes Ereignis ist. Dem hierdurch begründeten geringen Gefährdungspotenzial der gentechnischen Arbeit wird mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 ausreichend entgegengewirkt. Ist in einem solchen Plasmid die cDNA eines Minusstrang-RNA-Virus der **Risikogruppe 4** enthalten, sind die transformierten *E. coli* im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten.

### Kolmioviren

Die Familie *Kolmioviridae* umfasst gegenwärtig acht Gattungen, von denen die bekannteste, die Gattung *Deltavirus*, die Hepatitis-D-Viren 1 bis 8 (HDV1-8) in acht separaten Spezies beinhaltet. Weitere HDV-ähnliche Viren wurden vor kurzem identifiziert und den übrigen sieben Gattungen zugeordnet. HDV haben ein zirkuläres einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität. Aufgrund umfassender Komplementarität bildet sich jedoch ein stabförmiger RNA-Doppelstrang aus. Die HDV-Genome enthalten kein Gen für eine eigene RNA-Polymerase. Die Transkription sowie Genomreplikation erfolgt im Zellkern und wird durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II katalysiert, wobei möglicherweise auch die DNA-abhängige RNA-Polymerase I und/oder III beteiligt sind. Ein Plasmid, das drei hintereinanderliegende Kopien eines HDV-Genoms enthielt, führte in humaner Zellkultur zur Transkription und Genomreplikation. Die genomische RNA wurde darüber hinaus prozessiert und zirkularisiert. Der eukaryotische Promotor im Plasmid kontrollierte die Transkription des genomischen Minusstrangs [6]. Es ist nicht auszuschließen, dass es bei einer Übertragung eines Plasmids mit der cDNA des ggf. Überlänge-genoms von HDV oder HDV-ähnlichen Viren der

**Risikogruppe 2** auf den Experimentator oder ein susceptibles Wirtstier mithilfe der im Plasmid vorliegenden klonierten oder kryptischen Promotoren zum Start der Transkription und Genomreplikation kommt. *E. coli* der **Risikogruppe 1**, die durch solche Plasmide transformiert wurden, besitzen demnach ein geringes Gefährdungspotenzial und sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

#### Animale Viren mit DNA-Genom, außer Polyoma-, Papilloma-, Asfar- und Pockenviren

DNA-Viren mit einzel- (z. B. Parvoviren), doppel- (z. B. Herpes- und Adenoviren) oder partiell-doppelsträngigem (Hepadnaviren) Genom nutzen die im Zellkern lokalisierte zelluläre RNA-Polymerase II oder in Ausnahmefällen die ebenfalls dort lokalisierte zelluläre RNA-Polymerase III für die Transkription ihrer (frühen) mRNAs. Ausgenommen hiervon sind lediglich die Viren der Familien *Asfarviridae* und *Poxviridae* (siehe unten), die für eigene Transkriptionsenzyme, einschließlich einer RNA-Polymerase, Capping-Enzymen und einer PolyA-Polymerase, kodieren. Die Genome der übrigen Viren enthalten Promotorsequenzen, an die die entsprechenden zellulären Polymerasen binden können. Wird Plasmid-DNA auf eine susceptible Wirtszelle übertragen, kommt es demnach zur Transkription viraler mRNAs und zur Initiation des viralen Replikationszyklus (mit Einschränkungen bei Viren der *Polyomaviridae* und *Papillomaviridae*, siehe unten). Das Gefährdungspotenzial von *E. coli* der **Risikogruppe 1**, die durch Plasmide mit der DNA des ggf. Überlänge-genoms eines DNA-Virus transformiert wurden, richtet sich mit den untenstehenden Ausnahmen nach der Risikogruppe des jeweiligen Virus. Ist in dem Plasmid die DNA eines DNA-Virus der **Risikogruppe 1** oder **2** enthalten, sind die transformierten *E. coli* entsprechend der Risikogruppe des Virus der **Risikogruppe 1** bzw. **2** zuzuordnen. Ist in dem Plasmid die DNA eines DNA-Virus der **Risikogruppe 3** oder **3\*\*** enthalten, sind die transformierten *E. coli* der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Bei dieser Einstufung wird berücksichtigt, dass eine Plasmidübertragung von *E. coli* auf eukaryotische Zellen ein äußerst seltenes Ereignis ist. Dem hierdurch begründeten geringen Gefährdungspotenzial der gentechnischen Arbeit wird mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 ausreichend entgegengewirkt.

#### Polyoma- und Papillomaviren

Polyoma- und Papillomaviren besitzen ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom. Soll die DNA dieser Viren in ein Plasmid kloniert werden, muss das Genom demnach künstlich unterbrochen werden. Die im Plasmid vorliegende lineare Form des Virusgenoms ist nicht infektiös. Um Zellen *in vitro* zu infizieren wird daher zunächst ein Restriktionsverdau durchgeführt, der das linearisierte Virusgenom von den übrigen Plasmidsequenzen trennt. Anschließend wird eine *in vitro*-Ligation vorgenommen. Die zirkuläre virale DNA ohne Fremdsequenzen ist bei einer anschließenden Transfektion in susceptible Zellen infektiös. Bei einer akzidentellen Übertragung von Plasmid-DNA von *E. coli* auf eukaryotische Zellen ist nicht zu erwarten, dass es an beiden Enden der viralen DNA zu einem Doppelstrangbruch kommt, bei dem zudem keine essenziellen viralen DNA-Abschnitte verloren werden. Eine anschließende Zirkularisierung des linearen Virusgenoms ist ebenso nicht zu erwarten. Die *E. coli* besitzen demnach kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt. *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die genomische DNA eines Polyoma- oder Papillomavirus in einfacher Kopie enthalten, sind unabhängig von der Risikogruppe des Virus der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt.

## Asfar- und Pockenviren

Asfar- und Pockenviren replizieren im Zytoplasma infizierter Wirtszellen. Entsprechend sind in ihrem Genom sowohl RNA- als auch DNA-Polymerasen sowie für diese notwendige Ko-Faktoren kodiert. In Abwesenheit viraler Proteine, insbesondere der viralen RNA-Polymerase, die aus mehreren Untereinheiten besteht, ist die virale genomische DNA nicht infektiös. Eine Transkription durch zelluläre RNA-Polymerasen findet nicht statt. Die zufällige Anwesenheit mehrerer kryptischer Promotoren für zelluläre RNA-Polymerasen innerhalb der Virus-DNA, die eine Expression aller für die Initiation einer Infektion notwendigen viralen Proteine ermöglichen, ist wenig wahrscheinlich. *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die genomische DNA eines Pockenvirus der **Risikogruppe 1, 2 oder 3** oder des *African swine fever virus* (ASFV) der **Risikogruppe 4** enthalten, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern es sich bei dem Vektor-Empfängersystem um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt. Die Weltgesundheitsorganisation empfiehlt keine gentechnischen Arbeiten mit der vollständigen oder großen Teilen der genomischen DNA des *Variola virus* (VARV) der **Risikogruppe 4** durchzuführen. Diese Empfehlung gilt insbesondere für Arbeiten, die darauf ausgerichtet sind, replikationskompetente Viruspartikel herzustellen [7]. *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die genomische VARV-DNA enthalten, sind der **Risikogruppe 4** zuzuordnen.

## **Abschließende Hinweise**

Beim Umgang mit *E. coli*, die durch Plasmide transformiert wurden, die die DNA eines onkogenen Virus enthalten, sind zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen gemäß der „Stellungnahme der ZKBS: Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potential eingeführt wurden“ (Az. 6790-10-36, aktualisiert Dezember 2014) einzuhalten.

Diese Stellungnahme ersetzt die folgenden allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS:

- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12 mit cDNA des vollständigen Genoms eines Retrovirus (Az. 6790-10-89, Dezember 2007)
- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Escherichia coli* K12 mit genomischer DNA von Papillomviren (Az.6790-10-102, April 2011)
- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Escherichia coli* K12 mit der cDNA des vollständigen Genoms des SARS-Coronavirus (Az. 6790-10-97, geänderte Fassung vom Juli 2017)

## **Literatur**

1. **Lacroix B, Citovsky V** (2016). Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. *MBio* **7**(4):e00863-16.
2. **Schaffner W** (1980). Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2163–7.
3. **Heitmann D, López-Piña JM** (1993). Frequency and conditions of spontaneous plasmid transfer from *E. coli* to cultured mammalian cells. *BioSystems* **29**:37–48.
4. **Kruczek I, Strauch E, Levin A** (1996). Biologische Sicherheitsmaßnahmen. *Bundesgesundheitsblatt* **39**:4–10.

5. **Peeters B, Leeuw O de** (2017). A single-plasmid reverse genetics system for the rescue of non-segmented negative-strand RNA viruses from cloned full-length cDNA. *J Virol Methods* **248**:187–90.
6. **Kuo MY, Chao M, Taylor J** (1989). Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol* **63**(5):1945–50.
7. **World Health Organization** (2016). WHO Recommendations concerning the distribution, handling and synthesis of variola virus DNA. Revised 13 January 2016. <https://www.who.int/csr/disease/smallpox/variola-virus-dna/en/>.