

Entwurf



Das Schreiben von [REDACTED] vom: 07.10.2025

sowie die dazugehörigen Unterlagen wurden vorgelegt und geprüft.

	Name	Ort, Datum	Unterschrift
Betreiber bzw. gesetzliche/r Vertreter des Betreibers	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover - der Präsident - [REDACTED] [REDACTED]	Hannover, 13.10.25	[REDACTED]
Leitung wissenschaftliche Administration und Biosicherheit	[REDACTED] [REDACTED]	Hannover, 8.10.25	[REDACTED]
BBS	[REDACTED]	Hannover, 8.10.25	[REDACTED]



Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Virologie,
Zentrum für Infektionsmedizin, Bünteweg 17, 30559 Hannover

Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hannover
Dez. Strahlenschutz, Gentechnik,
Gesundheits- und Sozialwesen
Freundallee 9a
30173 Hannover

Institut für Virologie
Zentrum für Infektionsmedizin

Bünteweg 17
30559 Hannover

Ihre Nachricht vom
11.09.2023

Ihr Zeichen
H 000090840-119

Datum
Hannover, 07.10.2025

Ergänzungsanzeige Az. 40654/4/52/4/7

Sehr geehrte Damen und Herren,

im Rahmen der genehmigten gentechnischen Arbeiten mit dem Az. 40654/4/52/4/7 zur Herstellung eines attenuierten Monkeypoxvirus (MPXV) möchten wir hiermit eine Änderung des genetischen Inaktivierungsverfahrens für das virale Thymidinkinase-(TK)-Gen anzeigen.

1. Ausgangszustand (genehmigt):

In der ursprünglichen Planung war vorgesehen, das TK-Gen durch gezielten Einbau eines BAC-Vektors in den TK-Genlokus des Vaccinia-Genoms zu deletieren und damit funktionell zu inaktivieren. Die BAC-Kassette sollte zusätzlich als Klonierungsplattform dienen.

2. Zusätzliche Methode zur Deletion des TK Gens (neu):

Statt des Einbaus des BAC-Vektors in das TK-Gen soll nun ein anderes MPXV-BAC als in der ZKBS-Stellungnahme (AZ 45110.2243) als MPXV-BAC als Basis dienen. In diesem MPXV-BAC wurde der BAC-Vektor in einen alternativen, nicht-essentiellen Lokus zwischen den Genen G1L und I8R eingebaut. Dieser Bereich ist für die virale Replikation entbehrlich und wird in der Literatur häufig für die Integration von Fremd-DNA verwendet.

Die Deletion des TK-Gens soll nun basierend auf dem MPXV-BAC durch die zweistufige, markerlose Red-Rekombination in Escherichia coli gemäß Tischer et al., 2006 erfolgen.

3. Begründung der Änderung:

Die Verlagerung der BAC-Kassette in den G1L-I8R-Lokus ermöglicht eine stabilere Integration ohne Beeinträchtigung des ursprünglichen Deletionsziels.

Die Verwendung der Red-Rekombination erlaubt eine präzisere und effizientere Herstellung einer markerlosen TK-Deletion, was sowohl aus regulatorischer als auch aus biosicherheitsrelevanter Sicht vorteilhaft ist.

Die biologische Sicherheit des Endprodukts bleibt unverändert, da weiterhin eine vollständige Deletion des viralen TK-Gens vorliegt.

4. Einstufung der Änderung:

Die Änderung betrifft ausschließlich den technischen Ablauf der gentechnischen Manipulation und hat keine Auswirkung auf die Risikobewertung des Endprodukts. Das hergestellte Virus bleibt ein TK-defizientes MPXV, das gemäß der ursprünglichen Begründung weiterhin in Sicherheitsstufe 3 einzuordnen ist.

Wir bitten um Bestätigung des Eingangs dieser Änderungsanzeige und um Rückmeldung, ob für diese Erweiterung ein eigenständiger Antrag erforderlich ist. Für Rückfragen oder ergänzende Informationen stehen wir selbstverständlich zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

[REDACTED]

ANGABEN ZU DEN VORGESEHENEN GENTECHNISCHEN ARBEITEN

1. Titel:

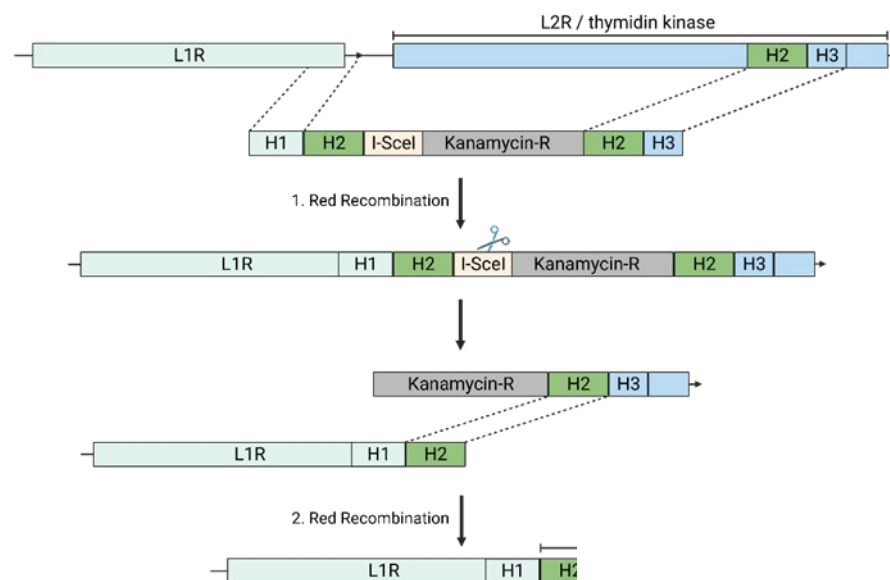
Deletion des TK-Gens in MPXV-BAC-klonierten viralen Sequenzen in E. coli und anschließende Reaktivierung eines MPXV-TKneg

2. Beschreibung der vorgesehenen gentechnischen Arbeiten

(Zweck und Zielsetzung, Arbeitsschritte, maximal zu verwendendes Kulturvolumen; ggf. Fließschema beifügen)

1. Deletion des TK-Gen im MPXV-BAC (=MPXV-YAC_BAC_I8RG1L, siehe ZKBS AZ 45110.2243)

Die Deletion des TK-Gens im MPXV-BAC Genom (clade Ia, Ib, clade IIa, clade IIb) soll durch die Methode der en passant Mutagenese durchgeführt werden. Die en passant Mutagenese basiert auf Red-Rekombinationen (Tischer et al., BioTechniques 2006, doi 10.2144/000112096) und erlaubt eine markerlose Modifikation von in E.coli als BAC-klonierten Sequenzen. Mit dieser Methode ist es möglich, Punktmutationen herzustellen, Sequenzen zu deletieren sowie Sequenzbereiche (z.B. Expressionakassetten, Reportergene) zu inserieren. Damit ist es möglich, eine Mutagenese durchzuführen, ohne am Ende eine Antibiotika-Resistenz zu hinterlassen.



Schema der en passant Mutagenese zu

Zunächst wird über PCR die homologe Sequenz zur Deletion des TK Gens synthetisiert. Dieses PCR-Fragment, das final die flankierenden homologen Sequenzen zum TK-Gen, die Deletion des TK-Gens sowie die Kanamycin-Resistenz als Selektionsmarker enthält, wird final zusammen mit dem MPXV-BAC in die E. coli-Bakterien (GS1783) eingebracht. Zur Synthese dieses PCR-Fragmentes werden zunächst forward und reverse Primer synthetisiert, die die gewünschte Deletion des TK Gens um 50 bp links und rechts flankierend abdecken. Darüber hinaus wird jeweils an den forward und den reverse Primer die Sequenz H1 und H2 aus dem PEPkan synthetisiert. Dadurch ergibt sich das PCR-Fragment H1H2-*I*SceI-KanamycinR_H2H3. Diese Sequenz wird zusammen mit dem MPXV-BAC in GS1783-E. coli-die λ -Red-Rekombinase exprimieren elektroporiert. Durch homologe Rekombination wird in einer ersten Rekombination die Kanamycin-Kassette ins Zielgen (TK) eingebaut. Nach Selektion auf Kanamycin erfolgt die zweite Rekombination durch die Expression der *I*-SceI-Endonuklease durch Arabinose-Zugabe. Dies erzeugt einen Doppelstrangbruch im TK-Gen erzeugt, so dass eine zweite homologe Rekombination zwischen den identischen Sequenzen ermöglicht. Dadurch wird die Kanamycin-Kassette wieder entfernt und nur die gewünschte Deletion zurückbleibt. Die GS1783-E.coli unterstützen diesen Vorgang, da sie sowohl die Red-Rekombinase als auch *I*-SceI kontrolliert exprimieren können. Nach Abschluss wird der MPXV_BAC_I8RG1L_TKneg isoliert und die Deletion durch PCR, Restriktionsanalyse oder Sequenzierung überprüft. Auf diese Weise kann gezielt mehr als 70% des TK-Gens entfernt werden, ohne dass Kanamycin zurückbleibt.

Für die Mutagenese sind Kulturvolumina von 1 ml üblich.

2. Reaktivierung des MPXV-Virus aus dem BAC

Diese MPXV_BAC_TKneg DNA wird dann im nächsten Schritt durch ein Helfervirus reaktiviert. Da Pockenviren alle für den Replikationszyklus notwendigen Enzyme selbst kodieren und diese Genusübergreifend erkannt werden, kann man eine Pockenvirus-DNA durch ein anderes Pockenvirus wieder aktivieren. Dazu setzen wir das Fowlpockenvirus ein, ein Avipockenvirus, das nur in aviären Zellen wachsen kann. Dazu infiziert man eine Säugetierzelle mit dem Fowlpoxvirus, das Fowlpoxvirus kann in die Zelle eindringen, auch den Lebenszyklus starten und somit auch die Enzyme exprimieren aber keine neuen Virionen bilden. Gleichzeitig mit der Infektion wird die Affenpocken-DNA in die Zelle transfiziert und diese DNA kann dann mit Hilfe der von dem Fowlpoxvirus exprimierten Enzymen wieder einen Replikationszyklus starten und so können wir dann auf den Zellen einzelne Virusplaques des infektiösen Affenpockenvirusklon detektieren und ernten und weiter amplifizieren. MPXV_BAC_TKneg wird jeweils in BHK-21 oder Vero (beides ZKBS bekannte Zelllinien) transfiziert. Gleichzeitig werden die Zellen mit dem Helfervirus Fowlpox infiziert und MPXV auf den erzeugten YAC/BAC-Systemen reaktiviert. Nach 48h wird das reaktivierte MPXV_BAC_TKneg geerntet und anschließend auf MA-104 Zellen amplifiziert. Die reaktivierten Viren werden mittels PCR regelmäßig kontrolliert und unter BSL-3 Bedingungen gehandhabt.

3. Entfernung des BAC-Vektor im reaktivierten Virus

Nach erfolgreicher Reaktivierung des Virus aus dem BAC-Vektor verbleibt die BAC-Sequenz im Virusgenom. Um auszuschließen dass die BAC-Sequenz als Teil des viralen Genoms einen Einfluss auf die Replikation sowie die Infektiosität des reaktivierten Virus hat möchten wir den BAC-Sequenz entfernen. Dies erfolgt durch das gut etablierte Cre/loxP-System welches die BAC-Sequenz flankiert. Zur

Aktivierung des Cre/loxP-Systems und der daraus folgenden Entfernung der BAC Sequenz kommen folgende Methoden in Frage:

I. Amplifikation des reaktivierten Virus in BHK21-Cre Zellen:

Bei den BHK21-Cre Zellen (siehe GO_BHK21-Cre) handelt es sich um eine GVO Zelllinie der Risikogruppe 2 welche wir von einem Kooperation Partner erhalten haben. Hier wurde mittels Lentiviraler Vektoren der 3. Generation die Sequenz für die Cre-Rekombinase aus der T1-Phage im Zellgenom inseriert. Die Bildung der Cre-Rekombinase in den Zellen wird durch Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin aktiviert. Durch Amplifikation des bereits zuvor aus dem MPXV_YAC-BAC_TKneg reaktivierten Virus auf den BHK21-Cre Zellen schaltet die gebildete Cre-Rekombinase den BAC-Vektor aus. Anschließend wird auf die Bildung von MPXV typischen Plaques sowie auf das Fehlen des GFP-Marker Gens aus dem BAC-Sequenz selektiert. Die Amplifikation erfolgt bis zur gewünschten Reinheit über mehrere Passagen auf den BHK21-Cre Zellen. Anschließend wird das Virus wie gewohnt auf geeigneten Zellen amplifiziert, mittels PCR kontrolliert und für Versuche eingesetzt.

II. Reaktivierung in BHK21-Cre Zellen:

Hierfür wird die Reaktivierung des Virus aus dem MPXV_BAC_TKneg direkt in den unter I. genannten BHK21-Cre Zellen durchgeführt. Entsprechend des unter 2. beschriebenen Ablaufs werden die BHK21-Cre zuerst mit einem Helfervirus (Fowlpox) infiziert und anschließend mit dem MPXV_BAC_TKneg transfiziert. Zeitgleich erfolgt ein Medium Wechsel zu einem Doxycyclin beinhaltendem Medium um die Cre-Rekombinase in den Zellen zu aktivieren. Durch diese Methode sollte das Virus direkt ohne BAC-Sequenz reaktiviert werden. Auch hierbei wird auf die Bildung von MPXV typischen Plaques sowie auf das Fehlen des GFP-Marker Gens aus dem BAC-Sequenz selektiert. Die Amplifikation erfolgt bis zur gewünschten Reinheit über mehrere Passagen auf den BHK21-Cre Zellen. Anschließend wird das Virus wie gewohnt auf geeigneten Zellen amplifiziert, mittels PCR kontrolliert und für Versuche eingesetzt.

III. Transfektion der Wirtszelle mit Cre-Plasmid:

Bei dieser Methode wird eine, für das reaktivierte Virus geeignete Wirtszelle, mit dem zuvor wie unter 2 beschriebenen, bereits zuvor aus dem MPXV_BAC_TKneg reaktivierten Virus infiziert und gleichzeitig mit dem Cre-Plasmid (pcDNA3_Flag-Cre.1, siehe GV-Formular_pcDNA3_Flag-Cre.1) transfiziert. Die Cre-Sequenz wird im Cytoplasma abgelesen und die Cre-Rekombinase synthetisiert. Hierdurch wird die BAC-Sequenz bei der Amplifikation des reaktivierten Virus ausgeschaltet und das Virus ohne BAC-Sequenz vermehrt wird. Auch hierbei wird auf die Bildung von MPXV typischen Plaques sowie auf das Fehlen des GFP-Marker Gens aus dem BAC-Sequenz selektiert. Die Amplifikation erfolgt bis zur gewünschten Reinheit über mehrere Passagen auf den geeigneten Zellen. Anschließend wird das Virus wie gewohnt mittels PCR kontrolliert und für Versuche eingesetzt.

IV. Transfektion/Infektion mit Cre-Plasmid:

Als weitere Möglichkeit kann das Virus direkt aus dem MPXV_YAC-BAC_TKneg oder MPXV_YAC-BAC_I8RG1L mit dem unter I. genannten Cre-Plasmid (pcDNA3_Flag-Cre.1) zusammen in eine geeignete Wirtszellen transfiziert werden, welche ebenfalls mit dem Helfervirus (Fowlpox) infiziert werden. Die Cre-Sequenz wird im Cytoplasma abgelesen und die Cre-Rekombinase synthetisiert. Hierdurch wird die

BAC-Sequenz bei der Amplifikation des reaktivierten Virus ausgeschaltet und das Virus direkt ohne BAC-Sequenz reaktiviert und vermehrt. Auch hierbei wird auf die Bildung von MPXV typischen Plaques sowie auf das Fehlen des GFP-Marker Gens aus dem BAC-Sequenz selektiert. Die Amplifikation erfolgt bis zur gewünschten Reinheit über mehrere Passagen auf den geeigneten Zellen. Anschließend wird das Virus wie gewohnt mittels PCR kontrolliert und für Versuche eingesetzt.

An dieser Stelle möchten wir drauf hinweisen das vermutlich bereits einen der oben genannten Methoden zielführend für die Entfernung des BAC-Kassette aus dem MPXV_YAC-BAC_TKneg oder MPXV_YAC-BAC_I8RG1L sein wird. In einzelnen Fällen können aber die Erfolge der oben genannten vier Methoden variieren abhängig von verwendetem BAC-Konstrukt, Virus und verwendeter Zelllinie.

4. Ausblick und Versuchsziel

Nach ausführlicher Untersuchung der reaktivierten Viren in Wachstumskurven und mittels PCR möchten wir langfristig das attenuierte MPXV in Tierversuchen im Mausmodell auf Basis der Mauslinie CAST/Eij, einem Mausmodell für Affenpocken einsetzen, um eine mögliche Verwendung des attenuierten Virus zur Immunisierung zu gewinnen. Neben einer möglichen Verwendung als Impfstoff lassen sich weitreichende Erkenntnisse zur Verwendung unserer Methode für zukünftig ausbrechende Viren gewinnen. Hiermit wäre eine Methode etabliert die in kürzester Zeit infektiöse Klonen von Viren möglich macht, welche durch die Verwendung sowohl für die Entwicklung von Nachweistest möglich wäre, als auch für eine Vereinfachte Untersuchung einzelner Gene und der Herstellung attenuierter Versionen.

3. Eigene Risikobewertung und Einschätzung der Sicherheitsstufe

(differenziert nach verwendeten Spenderorganismen, zu übertragender DNA, Empfängerorganismen, Vektoren, biologischen Sicherheitsmaßnahmen und allen entstehenden GVO).

Für den Fall, dass Organismen oder Vektoren aus der Liste der Geschäftsstelle der ZKBS oder bereits eingestufte und bekannte GVO verwendet werden, bitte Organismen bzw. Vektoren bezeichnen. In diesem Fall entfällt das Ausfüllen der entsprechenden Formblätter GS, GE oder GV.

Bei den GVO handelt es sich um *E. coli* K12 Derivate, die BAC-Klone viraler Sequenzen replizieren. Die viralen Sequenzen werden in *E. coli* nicht exprimiert, so dass sie keine (patho)-physiologische Veränderung der Bakterien darstellen.

Bei dem pEPKan Vektor handelt es sich um den der ZKBS bekannten Vektor (ZKBS AZ: xxx) .

Monkeypoxvirus-Gesamtklone brauchen zur Rekonstitution ein Helfervirus (fowlpoxvirus) und sind als DNA an sich nicht infektiös. Daher werden die entsprechenden *E. coli* Klone in die Risikogruppe 1 eingestuft.

ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN ORGANISMUS (GVO)

Ähnliche GVO können in **einem** Formblatt GO zusammengefaßt werden.

I. CHARAKTERISIERUNG DES GVO

1. Bezeichnung des GVO:

Escherichia coli mit chromosomal integrierten Expressionskassetten für das Red-Rekombinationssystem und die I-SceI-Homingendonuklease.

2. Beschreibung des GVO (ggf. Kopien relevanter Literaturauszüge, insbesondere von Primärliteratur, beifügen)

Der *E. coli*-Stamm GS1783 ist ein K12-Derivat, bei dem eine lambda-Prophage sowie eine Arabinose induzierbare Expressionskassette für die Homingendonuklease I-SceI in die *bioA*-Region des bakteriellen Chromosomes integriert ist.

2.1 Angabe des Empfängerorganismus:

Derivate von *E. coli* K12 (GS1783).

2.2 Ausführliche Beschreibung der gentechnischen Veränderung einschließlich des Verfahrens zur Einführung des Vektors/Inserts in den Empfängerorganismus oder des Verfahrens, das zur Erzielung der betreffenden gentechnischen Veränderung angewandt wird:

Die viralen Sequenzen des TK-Gen in MPXV sollen mit Hilfe gerichteter markerloser Mutagenese (en passant Mutagenese) deletiert werden. Später werden nicht-infektiöse Monkeypoxvirus-Gesamtgenome (MPXV-BAC-TKneg) in suszeptible Zellen (z.B. MA-104, BHK-21cre) transfiziert und reaktiviert mittels Helfervirus (Fowlpoxvirus).

2.3 Angabe aller übertragenen Nukleinsäuren (einschließlich der Herkunft des genetischen Materials, ggf. Identität des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und deren Funktion:

Die MPXV-TK Gen Sequenz im MPXV-BAC wird mit Hilfe des pEPkan_TKneg in *E.coli* GS1783 deletiert. Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde nach Abschluss der Mutagenese durch homologe Rekombination entfernt. Es verbleiben keine Antibiotikaresistenzgene im finalen Konstrukt, siehe Formblatt GA.

2.4 Vorangegangene gentechnische Veränderung des Inserts:

Herstellung des *E. coli* Stammes GS1783 (durch Greg Smith, s. Ref.).

2.5 Art und Herkunft ggf. verwendeter Vektoren:

E. coli-Plasmid pST76K_SR von M. Messerle (s. Ref. und 2.3)

2.6 Der GVO wird eingestuft in die Risikogruppe

1 ☒

2 ☐

3 ☐

4 ☐

2.7 Risikobewertung des GVO:

Wenn Sie unter Berücksichtigung der Kombination der verschiedenen Nukleinsäuren ein anderes Risikopotential des GVO als das des Empfängerorganismus erwarten, dann füllen Sie bitte auch **Abschnitt II** des Formblattes GO aus.

- 2.8 Wie liegt die übertragene Nukleinsäure im GVO vor** (episomal oder integriert, Angaben zur Lokalisierung der Veränderung im Genom und, wenn episomal vorliegend, Angabe zur Genkopienzahl, Möglichkeit einer Aktivierung/Deaktivierung von Wirtsgenen durch die Einfügung)?

Die auf den GVO übertragenen viralen Nukleinsäuren liegen episomal als BAC vor. Dies sind low-copy Plasmide, die in 1-10 Kopien repliziert werden. Die pUC-Derivate sind high-copy Plasmide, die in mehreren 1000 Kopien vervielfältigt werden. Eine Wechselwirkung von viralen Sequenzen auf *E. coli* Wirtsgene ist unwahrscheinlich.

- 2.9 Werden biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 6 i.V. mit Anhang II GenTSV angewendet?**

Ja ☒

Nein ☐

Wenn **ja**, bitte erläutern:

Wir verwenden *E. coli* K12-Derivate für alle Manipulationen.

- 3. Angaben zur Stabilität der gentechnisch veränderten Merkmale des GVO** (z.B. ist der Verlust der Merkmale sicherheitsrelevant?):

Aufgrund vorheriger Erfahrungen mit BAC-Klonen von großen DNA-Viren, incl. MDV-1, EHV-1, VZV (Ref), ist eine hohe Stabilität zu erwarten. Die veränderten Merkmale sind sicher durch genetische Methoden und Antibiotika-Resistenzmuster nachweisbar. Der Verlust der Merkmale ist NICHT sicherheitsrelevant.

- 4. Beschreiben Sie bitte ausführlich die Ihnen verfügbaren Techniken zur Erfassung, Identifizierung und Überwachung des GVO:**

Nach Manipulation werden die entsprechenden Genomabschnitte mittels PCR überprüft und sequenziert. Außerdem unterstehen die Insertionen einer ständigen funktionellen Kontrolle, da sie für das *en passant*-Mutagenesesystem genutzt werden.

II. ANGABEN ZU MÖGLICHEN AUSWIRKUNGEN DES GVO AUF MENSCH UND UMWELT

1. Gesundheitliche Erwägungen

- 1.1 Ist eine pathogene, mutagene, toxische, allergene oder sensibilisierende Wirkung des GVO für Menschen oder eine pathogene Wirkung für Tiere oder Pflanzen zu erwarten?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **nein**, bitte kurze Begründung (danach weiter bei Frage Nr. 2.1):

Wenn ja, bitte nähere Angaben (z.B. verursachte Krankheiten, Pathogenitätsmechanismen, Virulenz; Wirtsbereich, Vergleich des GVO zum Spender- oder Empfängerorganismus in bezug auf diese Eigenschaften; mögliche Änderung des Infektionsweges oder der Gewebsspezifität; ggf. relevante Literatur beifügen):

1.2 Wie wird der GVO (möglicherweise) übertragen?

Durch:

- direkten oder indirekten Kontakt mit der verletzten oder unverletzten Haut oder Schleimhaut

☐

- Aerosole und Staub über den Atemtrakt

☐

- Wasser oder Lebensmittel über den Verdauungstrakt ☐
- Biß, Stich oder Injektion, über die Keimbahn bei tierischen Überträgern
(Überträger angeben) ☐
- andere Möglichkeiten (z.B. diaplazentar, bitte ausführlich erläutern) ☐

1.3 Ist die Mindestinfektionsdosis bei Applikation des GVO bekannt?

Ja ☐ Nein ☐ Entfällt ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

1.4 Sind Therapeutika, Impfstoffe und/oder andere wirksame Methoden zur Verhütung und Behandlung von Infektionen mit dem Organismus verfügbar?

Ja ☒ Nein ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

Potentielle *E. coli*-Infektionen können leicht antibiotisch behandelt werden.
Dies ist allerdings bei der Verwendung von K12-Derivaten kaum relevant.

2. Umwelterwägungen

2.1 Kann der GVO seine Erbinformation auf einen anderen Organismus übertragen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2.2 Ist mit Wechselwirkungen zu anderen und Auswirkungen auf andere Organismen in der Umwelt (einschließlich voraussichtlicher konkurrierender oder symbiotischer Eigenschaften) im Falle einer unbeabsichtigten Verbreitung des GVO in der Umwelt zu rechnen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung.

2.3 Ist mit einer Beteiligung des GVO an Umweltprozessen (wie Stickstofffixierung oder pH-Regelung oder anderen biogeochemischen Prozessen) zu rechnen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2.4 Liegen geeignete Bedingungen zur Besiedlung der Umwelt durch den GVO vor?

Ja ☐

Nein ☒

unbekannt ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung.

Verwendung von K12-Derivaten.

2.5 Welche Informationen über reproduktive Zyklen des GVO, einschließlich der Fähigkeit, Überlebensstrukturen wie Samen, Sporen oder Sklerotien zu bilden, sind vorhanden?

Der GVO ist nur unter Laborbedingungen überlebensfähig und bildet KEINE Überlebensstrukturen aus.

2.6 Welche sicherheitsrelevanten physiologischen und/oder genetischen Merkmale besitzt der GVO (z.B. Identifizierungsmerkmale, Auxotrophien, Empfindlichkeit / Resistenz gegenüber Antibiotika, Defektmutation)?

Während der Herstellung des GVO wird ein Kanamyzin-Resistenzgen verwendet, welches allerdings nach erfolgreicher *shuttle*-Mutagenese nicht mehr vorliegt. Außerdem sind K12-Derivate physiologisch steng an optimale Laborbedingungen gebunden.

ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN ORGANISMUS (GVO)

Ähnliche GVO können in **einem** Formblatt GO zusammengefasst werden.

I. CHARAKTERISIERUNG DES GVO

1. Bezeichnung des GVO:

pCC1BAC-his3-PmH5-eGFP_I8RG1L_TKneg (pBAC_TKneg) in E. coli

2. Beschreibung des GVO (ggf. Kopien **relevanter** Literaturauszüge, insbesondere von Primärliteratur, beifügen):

siehe GA

2.1 Angabe des Empfängerorganismus:

Kompetente E.Coli (DH10B, GS1783 oder vergleichbar)

2.2 Ausführliche Beschreibung der gentechnischen Veränderung einschließlich des Verfahrens zur Einführung des Vektors/Inserts in den Empfängerorganismus oder des Verfahrens, das zur Erzielung der betreffenden gentechnischen Veränderung angewandt wird:

siehe GA

2.3 Angabe aller übertragenen Nukleinsäuren (einschließlich der Herkunft des genetischen Materials, ggf. Identität des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und deren Funktion:

1. pCC1Bac_his3_PmH5GFP_I8RG1L_MPXV
2. TKneg_Sequenz (H1H2-IScl_Kan-H2H3,)

2.4 Vorangegangene gentechnische Veränderung des Inserts:

Siehe Formblatt GV 1

2.5 Art und Herkunft ggf. verwendeter Vektoren:

Hefe (YAC), E.coli (BAC)

2.6 Der GVO wird eingestuft in die Risikogruppe

1 ☒

2 ☐

3 ☐

4 ☐

2.7 Risikobewertung des GVO:

Wenn Sie unter Berücksichtigung der Kombination der verschiedenen Nukleinsäuren ein anderes Risikopotential des GVO als das des Empfängerorganismus erwarten, dann füllen Sie bitte auch **Abschnitt II** des Formblattes GO aus.

Die Transformation dient einzig der Deletion des TK Gens im erstellten Plasmid, es findet KEINE Replikation des MPXV-Virus statt. Die Kanamycin-Resistenzkassette wird nach Abschluss der Mutagenese durch homologe Rekombination entfernt. .

2.8 Wie liegt die übertragene Nukleinsäure im GVO vor (episomal oder integriert, Angaben zur Lokalisierung der Veränderung im Genom und, wenn episomal vorliegend, Angabe zur Genkopienzahl, Möglichkeit einer Aktivierung/Deaktivierung von Wirtsgenen durch die Einfügung)?

episomal

2.9 Werden biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 7 und § 8 GenTSV angewendet?

Ja ☒

Nein ☐

Wenn **ja**, bitte erläutern:

Alle Arbeiten erfolgen unter den für S1 GVO's erforderlichen Bedingungen entsprechend GenTSV.

3. Angaben zur Stabilität der gentechnisch veränderten Merkmale des GVO (z. B. ist der Verlust der Merkmale sicherheitsrelevant?):

stabil

4. Beschreiben Sie bitte ausführlich die Ihnen verfügbaren Techniken zur Erfassung, Identifizierung und Überwachung des GVO:

PCR, Restriktionsverdau

II. ANGABEN ZU MÖGLICHEN AUSWIRKUNGEN DES GVO AUF MENSCH UND UMWELT

1. Gesundheitliche Erwägungen

1.1 Ist eine pathogene, mutagene, toxische, allergene oder sensibilisierende Wirkung des GVO für Menschen oder eine pathogene Wirkung für Tiere oder Pflanzen zu erwarten?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **nein**, bitte kurze Begründung (danach weiter bei Frage Nr. 2.1):

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben (z. B. verursachte Krankheiten, Pathogenitätsmechanismen, Virulenz; Wirtsbereich, Vergleich des GVO zum Spender- oder Empfängerorganismus in Bezug auf diese Eigenschaften; mögliche Änderung des Infektionsweges oder der Gewebsspezifität; ggf. relevante Literatur beifügen):

Die Eigenschaften von E.coli werden durch die Insertation der erstellten pBAC_TKneg Konstrukte nicht beeinflusst. Dem entsprechend geht kein besonderes Risiko mit der Herstellung und Arbeit mit dem oben genannten GVO einher.

1.2 Wie wird der GVO (möglicherweise) übertragen?

Durch:

- direkten oder indirekten Kontakt mit der verletzten oder unverletzten Haut oder Schleimhaut ☐
- Aerosole und Staub über den Atemtrakt ☐
- Wasser oder Lebensmittel über den Verdauungstrakt ☐
- Biss, Stich oder Injektion, über die Keimbahn bei tierischen Überträgern (Überträger angeben) ☐
- andere Möglichkeiten (z. B. diaplazentar, bitte ausführlich erläutern) ☐

1.3 Ist die Mindestinfektionsdosis bei Applikation des GVO bekannt?

Ja ☐

Nein ☐

Entfällt ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

1.4 Sind Therapeutika, Impfstoffe und/oder andere wirksame Methoden zur Verhütung und Behandlung von Infektionen mit dem Organismus verfügbar?

Ja ☐

Nein ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2. Umwelterwägungen

2.1 Kann der GVO seine Erbinformation auf einen anderen Organismus übertragen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2.2 Ist mit Wechselwirkungen zu anderen und Auswirkungen auf andere Organismen in der Umwelt (einschließlich voraussichtlicher konkurrierender oder symbiotischer Eigenschaften) im Falle einer unbeabsichtigten Verbreitung des GVO in der Umwelt zu rechnen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung:

Nein, da die Eigenschaften von E.coli nicht beeinflusst werden.

2.3 Ist mit einer Beteiligung des GVO an Umweltprozessen (wie Stickstofffixierung oder pH-Regelung oder anderen biogeochemischen Prozessen) zu rechnen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2.4 Liegen geeignete Bedingungen zur Besiedlung der Umwelt durch den GVO vor?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung:

Alle aus dem Laborbereich herausgehenden festen und flüssigen Abfälle sowie alle Materialien werden entsprechend dekontaminiert.

2.5 Welche Informationen über reproduktive Zyklen des GVO, einschließlich der Fähigkeit, Überlebensstrukturen wie Samen, Sporen oder Sklerotien zu bilden, sind vorhanden?

keine

- 2.6 Welche sicherheitsrelevanten physiologischen und/oder genetischen Merkmale besitzt der GVO** (z. B. Identifizierungsmerkmale, Auxotrophien, Empfindlichkeit / Resistenz gegenüber Antibiotika, Defektmutation)?

GFP markiert

ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN ORGANISMUS (GVO)

Ähnliche GVO können in **einem** Formblatt GO zusammengefasst werden.

I. CHARAKTERISIERUNG DES GVO

1. Bezeichnung des GVO:

MPXV_BAC-I8RG1L_TKneg (MPXV_TKneg)

2. Beschreibung des GVO (ggf. Kopien **relevanter** Literaturauszüge, insbesondere von Primärliteratur, beifügen):

siehe GA

2.1 Angabe des Empfängerorganismus:

MA-104, BHK-21, Vero, CAST/Eij (Maus)

2.2 Ausführliche Beschreibung der gentechnischen Veränderung einschließlich des Verfahrens zur Einführung des Vektors/Inserts in den Empfängerorganismus oder des Verfahrens, das zur Erzielung der betreffenden gentechnischen Veränderung angewandt wird:

siehe GA

2.3 Angabe aller übertragenen Nukleinsäuren (einschließlich der Herkunft des genetischen Materials, ggf. Identität des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und deren Funktion:

1. MPXV_BAC-I8RG1L, 2. pEPkan_TK-, 3. MPXV_BAC_I8RG1L_Tkneg

2.4 Vorangegangene gentechnische Veränderung des Inserts:

Deletion TK-Gen mehr als 70%

2.5 Art und Herkunft ggf. verwendeter Vektoren:

E.coli (BAC), GS1783 (MPXV_BAC_I8RG1L_TKneg),

2.6 Der GVO wird eingestuft in die Risikogruppe

1 ☐

2 ☐

3 ☒

4 ☐

2.7 Risikobewertung des GVO:

Wenn Sie unter Berücksichtigung der Kombination der verschiedenen Nukleinsäuren ein anderes Risikopotential des GVO als das des Empfängerorganismus erwarten, dann füllen Sie bitte auch **Abschnitt II** des Formblattes GO aus.

MPXV_BAC_TKneg attenuiert,

2.8 Wie liegt die übertragene Nukleinsäure im GVO vor (episomal oder integriert, Angaben zur Lokalisierung der Veränderung im Genom und, wenn episomal vorliegend, Angabe zur Genkopienzahl, Möglichkeit einer Aktivierung/Deaktivierung von Wirtsgenen durch die Einfügung)?

Das TK-Gen ist zu mind 70% deletiert. Die Kanamycin-Kassette wurde nach erfolgreicher Deletion durch zweite homologe Rekombination wieder entfernt. Es verbleiben keine Fremdsequenzen

2.9 Werden biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 7 und § 8 GenTSV angewendet?

Ja ☒

Nein ☐

Wenn **ja**, bitte erläutern:

alle Arbeiten erfolgen unter BSL-3 Bedingungen

3. Angaben zur Stabilität der gentechnisch veränderten Merkmale des GVO (z. B. ist der Verlust der Merkmale sicherheitsrelevant?):

stabil, MPXV_BAC_TKneg: attenuiert

4. Beschreiben Sie bitte ausführlich die Ihnen verfügbaren Techniken zur Erfassung, Identifizierung und Überwachung des GVO:

PCR, Sequenzierung

II. ANGABEN ZU MÖGLICHEN AUSWIRKUNGEN DES GVO AUF MENSCH UND UMWELT

1. Gesundheitliche Erwägungen

1.1 Ist eine pathogene, mutagene, toxische, allergene oder sensibilisierende Wirkung des GVO für Menschen oder eine pathogene Wirkung für Tiere oder Pflanzen zu erwarten?

Ja ☒

Nein ☐

Wenn **nein**, bitte kurze Begründung (danach weiter bei Frage Nr. 2.1):

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben (z. B. verursachte Krankheiten, Pathogenitätsmechanismen, Virulenz; Wirtsbereich, Vergleich des GVO zum Spender- oder Empfängerorganismus in Bezug auf diese Eigenschaften; mögliche Änderung des Infektionsweges oder der Gewebsspezifität; ggf. relevante Literatur beifügen):

Das Affenpockenvirus weist eine lange Inkubationszeit von 5-21 Tagen auf. Nach dieser Zeit treten üblicherweise als erstes unspezifische Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und geschwollenen Lymphknoten auf (Prodromalstadium). Typischerweise wird 1-3 Tage nach dem Fieber von charakteristischen Hautveränderungen wie Ausschlag und Pusteln berichtet (Hautmanifestation), die sich in vorangegangenen Ausbrüchen auf Gesicht und Extremitäten konzentriert haben (11). Dieser Verlauf erklärt sich aus der Pathogenese des Affenpockenvirus, welches sich nach der initialen Infektion an der Eintrittspforte vermehrt, durch eine erste Virämie in die inneren Organe ausbreitet und dort repliziert und sich dann durch eine zweite Virämie in der Haut manifestiert (12).

1.2 Wie wird der GVO (möglicherweise) übertragen?

Durch:

- direkten oder indirekten Kontakt mit der verletzten oder unverletzten Haut oder Schleimhaut ☒
- Aerosole und Staub über den Atemtrakt ☒
- Wasser oder Lebensmittel über den Verdauungstrakt ☐
- Biss, Stich oder Injektion, über die Keimbahn bei tierischen Überträgern (Überträger angeben) ☒
- andere Möglichkeiten (z. B. diaplazentar, bitte ausführlich erläutern) ☐

1.3 Ist die Mindestinfektionsdosis bei Applikation des GVO bekannt?

Ja ☐

Nein ☒

Entfällt ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

1.4. Sind Therapeutika, Impfstoffe und/oder andere wirksame Methoden zur Verhütung und Behandlung von Infektionen mit dem Organismus verfügbar?

Ja ☒

Nein ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

Impfung

2. Umwelterwägungen

2.1 Kann der GVO seine Erbinformation auf einen anderen Organismus übertragen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2.2 Ist mit Wechselwirkungen zu anderen und Auswirkungen auf andere Organismen in der Umwelt (einschließlich voraussichtlicher konkurrierender oder symbiotischer Eigenschaften) im Falle einer unbeabsichtigten Verbreitung des GVO in der Umwelt zu rechnen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung:

Prinzipiell ist ein Genaustausch mit hier endemischen Orthopockenviren (z.B. Kuhpockenviren) möglich. Dieses Ereignis wird jedoch unter Nicht-Laborbedingungen, wie bei einer unbeabsichtigten Freisetzung, als unwahrscheinliches Ereignis angesehen, da die zu replizierenden Genome nicht nur in demselben Individuum vorliegen müssen, sondern auch in der gleichen Zelle vorliegen müssen und der Tatsache, dass die viral Pocken-DNA nicht infektiös ist.

2.3 Ist mit einer Beteiligung des GVO an Umweltprozessen (wie Stickstofffixierung oder pH-Regelung oder anderen biogeochemischen Prozessen) zu rechnen?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

2.4 Liegen geeignete Bedingungen zur Besiedlung der Umwelt durch den GVO vor?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte kurze Begründung:

Nach derzeitigem Wissensstand ist ein Überleben von MPXV in bei uns vorkommenden Nagetierwirten und damit in der Umwelt nicht möglich, so dass auch eine Besiedlung und Überleben des GVOs in der Umwelt als unwahrscheinlich angesehen wird.

2.5 Welche Informationen über reproduktive Zyklen des GVO, einschließlich der Fähigkeit, Überlebensstrukturen wie Samen, Sporen oder Sklerotien zu bilden, sind vorhanden?

bekannte MPXV Eigenschaften

2.6 Welche sicherheitsrelevanten physiologischen und/oder genetischen Merkmale besitzt der GVO (z. B. Identifizierungsmerkmale, Auxotrophien, Empfindlichkeit / Resistenz gegenüber Antibiotika, Defektmutation)?

MPXV_BAC_TKneg attenuiert

ANGABEN ZUM VEKTOR¹

1. Es handelt sich um

- ☐ ein **Virus**/einen **Phagen**; Bezeichnung:
- ☐ ein **Viroid**; Bezeichnung:
- ☐ ein bakterielles **Plasmid**; Bezeichnung:
- ☒ ein **anderes Vektorsystem**; **Bezeichnung und nähere Angaben** (z. B. Cosmid, Phasmid, YAC):

pEPkan

2. Charakterisierung des Vektors (Vektorkarte mit Angabe der funktionellen Elemente bitte gesondert beifügen.)

Hinweis:

*Die folgenden Angaben entfallen bei Verwendung von kommerziell erhältlichen Vektoren, wenn die Produktinformation die in Nr. 2.1 bis 2.5 abgefragten Angaben enthält. In diesem Fall bitte die Produktinformation (Katalogseite etc.) einschließlich **Vektorkarte** beifügen.*

Wenn der kommerziell erhältliche Vektor verändert wurde, bitte nur die zutreffenden nachfolgenden Punkte ausfüllen.

2.1 Bezeichnung des Ursprungsvektors, von dem bei der Konstruktion des Vektors ausgegangen wurde:

pEPkan (DOI: 10.1007/978-1-60761-652-8_30)

2.2 Bezeichnung und Herkunft des Replikons:

2.3 Bezeichnung, Herkunft und Funktion von Genen sowie deren regulatorischen Elementen (z. B. Promotoren, Enhancer, Terminationssequenzen):

Backbone pcDNA3

Kanamycin Resistenz) Selektion: Kanamycin-Resistenz,
I Scl Erkennungssequenz / Endonuklease CScript,

2.4 Bezeichnung und Herkunft der Gene, die für Selektionszwecke benutzt werden können:

Kanamycin Resistenz

¹Bei Verwendung mehrerer Vektoren ist jeweils ein gesondertes Formblatt GV auszufüllen.

Bei Verwendung von Vektoren, die in der *Vektoren-Liste der ZKBS-Geschäftsstelle* genannt sind (z. Zt. verfügbar auf der Homepage des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit), entfällt das Ausfüllen eines Formblattes GV.

2.5 Bezeichnung und Herkunft weiterer vorhandener Leserahmen:

3. Sonstige Angaben

3.1 Angaben zu Wirtsspezifitäten:
repliziert Bakterien (E.coli)

3.2 Angaben zur Mobilisierbarkeit:
nein

3.3 Angaben zur Co-Transfer-Rate:
/

3.4 Ist ein eigenes Transfer-System vorhanden?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

3.5 Besteht die Möglichkeit des Transfers durch endogene Helferviren?

Ja ☐

Nein ☒

Unbekannt ☐

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben:

3.6 Besitzt der Vektor eine eigenständige Infektiosität?

Ja ☐

Nein ☒

Wenn **ja**, bitte nähere Angaben. Wenn **nein**, bitte begründen:

3.7 Hat der Vektor ein tumorigenes Potential?

Ja ☐

Nein ☒

Unbekannt ☐

Wenn **ja**, bitte angeben, um welches es sich handelt: