

## **Stellungnahme der ZKBS**

### **Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potential eingeführt wurden**

#### **Einführung**

In dieser Stellungnahme wird eine Risikobewertung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) vorgenommen, in die Nukleinsäureabschnitte mit transformierendem Potential eingeführt wurden.

Nukleinsäureabschnitte mit diesen Eigenschaften können bei Versuchstieren nach Injektion oder nach Applikation auf Hautläsionen zur Entwicklung von malignen Tumoren führen. Für experimentelle Arbeiten mit solchen Nukleinsäureabschnitten hat die ZKBS daher im September 1991 eine „Stellungnahme der ZKBS: Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit onkogenem Potential“ (Az. 6790-10-01) ausgesprochen.

Diese Stellungnahme ergänzt die oben genannte vom September 1991 um eine Risikobewertung des Umgangs mit GVO, in die Nukleinsäureabschnitte mit transformierendem Potential eingeführt wurden, und aktualisiert die „Stellungnahme der ZKBS zur Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte eingeführt wurden, welche für Proteine mit genregulatorischer Funktion kodieren“ (Az. 6790-10-36) vom Februar 1996.

#### **Bewertung der ZKBS**

Werden

- Nukleinsäureabschnitte, die für Proteine mit transformierendem Potential für Säugerzellen kodieren und unter der Kontrolle von Promotoren stehen, die in Säugerzellen aktiv sind, oder
- nicht-kodierende RNA (z. B. siRNA, shRNA, miRNA) bzw. nicht-kodierende DNA-Abschnitte, die über die stabile Deregelation zellulärer Faktoren transformierende Wirkung ausüben

in Empfängerorganismen der Risikogruppe 1 (z. B. Bakterienzellen oder etablierte Zelllinien) eingeführt, werden die erzeugten GVO in die Risikogruppe 1 eingestuft, falls die Vektor-Empfänger-Systeme als biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 7 GenTSV anerkannt sind.

---

<sup>1</sup> Redaktionelle Änderung: Entfernung des Hinweises auf Stellungnahme Az. 6790-10-34 (seit Dezember 2022 außer Kraft)

Werden solche Nukleinsäureabschnitte in primäre Zellen eingeführt, so werden die GVO in die Risikogruppe 1 eingestuft, wenn die primären Zellen in die Risikogruppe 1 eingestuft sind und die verwendeten Vektoren die Bedingungen des § 8 Abs. 2 GenTSV erfüllen.

Gentechnische Arbeiten mit den oben genannten GVO sind der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen und unter Einhaltung von Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 1 durchzuführen. Beim Umgang mit solchen GVO sind die gleichen Vorsichtsmaßnahmen für den Personenschutz einzuhalten, die auch für den Umgang mit Nukleinsäuren mit onkogenem Potential erforderlich sind (s. Stellungnahme der ZKBS, Az. 6790-10-01):

1. Bei Arbeiten mit Nukleinsäuren mit dem o. g. Gefährdungspotential sollen Einmalhandschuhe getragen werden.
2. Der Gebrauch von scharfen, spitzen oder zerbrechlichen Laborgegenständen soll nach Möglichkeit vermieden werden.
3. Arbeitsplatz und Laborgeräte, die mit diesen Nukleinsäuren in Berührung kommen, sollen nach Beendigung der Tätigkeit sorgfältig gereinigt werden.
4. Laborabfälle, die solche Nukleinsäuren enthalten, sollen durch Autoklavieren oder chemisch denaturiert werden
5. Personen mit erheblichen Hautverletzungen (offene Ekzeme, Wunden und Infektionen) oder mit einer ausgeprägten Verrucosis (Warzenausbildung) sollten keine Arbeiten mit diesen Nukleinsäuren durchführen.

Diese zusätzlichen Sicherheitsmaßnahmen sind nicht erforderlich, wenn es sich bei den Empfängerorganismen um etablierte Zelllinien oder primäre Zellen der Risikogruppe 1 handelt und die übertragenen Nukleinsäureabschnitte im Wirtsgenom integriert und nicht stabil episomal vorliegen.

Handelt es sich beim verwendeten Vektor-Empfänger-System nicht um eine biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Abs. 1 und 2 GenTSV, ist die Einstufung der GVO in eine Risikogruppe im Einzelfall zu prüfen, soweit die Einstufung nicht anhand der u. g. Stellungnahmen erfolgen kann.

## **Begründung**

GVO, in die die oben beschriebenen Nukleinsäuren eingeführt wurden, könnten dann ein Gefährdungspotential für den Menschen beinhalten, wenn diese Nukleinsäuren auf Körperzellen übertragen würden und sie dort persistieren und ggf. exprimiert werden. Bei akzidenteller Aufnahme von GVO durch Inhalation, Ingestion, Injektion oder bei Kontakt mit der verletzen Haut wäre eine Übertragung von Nukleinsäuren auf Zellen des Menschen auf zwei Wegen prinzipiell denkbar:

- a) es erfolgt ein DNA-Transfer von den GVO auf die Körperzellen durch Zell-Zell-Kontakte, Mikrovesikel bzw. durch Zellfusionen, oder
- b) die GVO werden lysiert und freie DNA wird von den Körperzellen aufgenommen.

zu a) DNA-Transfer von GVO auf Körperzellen

Ein direkter Nukleinsäure-Transfer von *Escherichia coli* K12 auf Körperzellen unter *in vivo* Bedingungen ist nicht bekannt. Außerdem kann sich *E. coli* K12 nicht im Körper etablieren und wird durch körpereigene Abwehrmechanismen wie Komplementreaktion bzw. Phagozytose schnell eliminiert.

Eine Übertragung von Nukleinsäuren aus eukaryoten Zellen setzt Zellfusion voraus. Diese kann zwar *in vitro* experimentell herbeigeführt werden, unter *in vivo* Bedingungen ist die Fusion von Körperzellen mit eukaryoten Zellen jedoch nur bei zusätzlicher Anwesenheit von hierfür spezifischen Agenzien möglich, die im Körpergewebe nicht vorkommen. Somit ist nicht davon auszugehen, dass unter

Normalbedingungen eine direkte Übertragung der Nukleinsäuren von GVO auf Körperzellen stattfindet.

zu b) Aufnahme freier DNA aus lysierten GVO:

Eukaryote Zellen können Nukleinsäuren aus ihrer Umgebung aufnehmen. Dies ist sowohl in der Zellkultur als auch unter *in vivo* Bedingungen gezeigt worden. Allerdings ist die Effizienz der Aufnahme durch Säugerzellen *in vitro* gering und erfordert die Konzentrierung der DNA sowie besondere experimentelle Konditionen. Die aufgenommene Nukleinsäure existiert *in vivo* in der Regel nur vorübergehend in den Zellen. Darüber hinaus ist unter *in vivo* Bedingungen zu erwarten, dass extrazelluläre Nukleasen die Verfügbarkeit freier Nukleinsäuren rasch deutlich verringern. Es ist daher nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass Nukleinsäuren, welche nach Lyse aus GVO freigesetzt werden, *in vivo* von Körperzellen aufgenommen werden, dort persistieren und ggf. exprimiert werden können.

Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der unter a) bzw. b) genannten Ereignisse wird bei Beachtung der empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für den Personenschutz, die auch beim Umgang mit Nukleinsäuren mit onkogenem Potential empfohlen wurden, als sehr gering erachtet.

Zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen werden für episomale Plasmide auf Grund ihrer relativ geringen Größe und hohen Kopienzahl und einer dadurch bedingten möglichen erhöhten Übertragbarkeit empfohlen. Beim Umgang mit eukaryoten Zelllinien oder primären Zellen mit ins Genom stabil integrierten exprimierbaren transformierenden Nukleinsäuren sind obige Vorsichtsmaßnahmen nicht erforderlich, da eine Übertragung aus dem chromosomalen Kontext weniger wahrscheinlich ist.

Weitere Informationen spezifisch für die jeweiligen gentechnischen Arbeiten sind in den im Folgenden genannten Allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS zu finden:

- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten, bei denen Zytokingene und Apoptose-regulierende Gene in replikationskompetente Mikroorganismen integriert werden (Az. 6790-03-05)
- Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten viralen Partikeln, die einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen (Az. 6790-10-83)
- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren (Az. 6790-10-41)