



## **Stellungnahme der ZKBS zur Notwendigkeit einer Arbeitsplatzbeprobung bei gentechnischen Arbeiten mit amphotropen, replikationsdefekten Retroviren, die vom Murinen Leukämie-Virus (MLV) abgeleitet sind**

Im Rahmen eines Verwaltungsstreitverfahrens wurde die ZKBS gebeten, sich mit der Frage auseinanderzusetzen, ob die im Labor tätigen Mitarbeiter bei der Durchführung einer bestimmten gentechnischen Arbeit gesundheitlichen Risiken ausgesetzt sind, die daraus resultieren, dass eine Infektion mit humanpathogenen GVO nicht mit ausreichender Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Das Thema der Arbeit lautet:

„Herstellung und Verwendung amphotroper, replikationsdefekter retroviraler Vektoren zum Transfer eines Genes auf humane und nicht-humane Zellen“

Anlässlich einer bundesweit durchgeführten Umfrage bei Genehmigungsbehörden bezüglich einer geforderten Arbeitsplatzbeprobung wurde die ZKBS von den Genehmigungsbehörden gebeten, die Antworten den Landesbehörden als Allgemeine Stellungnahme zugänglich zu machen, da es sich um sicherheitsrelevante Aspekte handelt, die für alle Bundesländer relevant sind.

Im Einzelnen soll zu nachstehenden Fragen Stellung genommen werden:

Frage 1: Entstehen bei den durchgeführten Forschungsarbeiten amphotrope MLV-abgeleitete Retroviren, die in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren?

**Es entstehen bei diesen gentechnischen Arbeiten vermehrungsunfähige, MLV-abgeleitete Retroviren, die unter experimentellen Bedingungen menschliche Zellen infizieren können.**

### Erläuterung

Bei den hier durchgeführten gentechnischen Arbeiten werden jeweils zwei verschiedene Plasmid-Vektoren in eine humane Verpackungszelle eingeführt. Dadurch werden der Zelle die genetischen Informationen übergeben, die eine Produktion vermehrungsunfähiger viraler Partikel und deren Abgabe in den Zellkulturüberstand ermöglichen. Diese Partikel sind vom Murinen Leukämie-Virus abgeleitet und zeichnen sich durch eine Hülle aus, welche ein amphotropes Wirtsspektrum aufweist. Mit Hilfe ihrer Hüllproteine können virale Partikel an

spezifische Rezeptoren, die in die Zellmembranen von Zellen eingelagert sind, binden. Amphotrope MLV-Partikel binden dabei an einen Natrium-abhängigen Phosphat-Symporter (Pit2), der sowohl in murinen als auch in menschlichen Zellmembranen vorliegt [1,2]. Eine Infektion von menschlichen Zellen durch amphotrope murine Viren ist unter Zellkulturbedingungen möglich. Da die viralen Partikel vermehrungsunfähig sind, werden keine neuen Viruspartikel ausgebildet. Bei Infektionen, die zu einer genomischen Integration aber nicht zu einer Virusvermehrung führen, spricht man von einer Transduktion.

Frage 2: Bejahendenfalls: Entstehen bei den konkreten Forschungsarbeiten humanpathogene GVO in einer Konzentration, die ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen?

**Es entstehen bei diesen Forschungsarbeiten GVO, die nicht humanpathogen sind und die nicht in einer Konzentration vorliegen, die ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen.**

#### Bewertungsgrundlagen

Als Grundlage zur Beantwortung der Frage werden sowohl das Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (IfSG) als auch die Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) herangezogen:

Im Sinne des § 2 IfSG ist eine Infektion als Aufnahme eines Krankheitserregers und seine nachfolgende Entwicklung oder Vermehrung im menschlichen Organismus definiert und ein Krankheitserreger ein vermehrungsfähiges Agens (Virus, Bakterium, Pilz, Parasit) oder ein sonstiges biologisches transmissibles Agens, das bei Menschen eine Infektion oder übertragbare Krankheiten verursachen kann. Mit dem Begriff humanpathogen wird die Spezifität eines Krankheitserregers für den Menschen beschrieben.

Der Anhang I der GenTSV beschreibt allgemeine Kriterien, die der Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten zu Grunde liegen. Unter Punkt 2. des Abschnittes „Informationen über den gentechnisch veränderten Organismus (GVO)“ wird auch die Pathogenität des GVO für den abwehrgesunden Menschen betrachtet. Neben der krankheitsauslösenden Invasivität und Virulenz des GVO werden u.a. Übertragbarkeit, Infektionsdosis, Wirtsbereich, Möglichkeit des Überlebens außerhalb des menschlichen Wirtes, Anwesenheit von Überträgern und Mitteln der Verbreitung, biologische Stabilität, Allergenität und Toxizität als Bewertungskriterien gelistet.

**Murine Retroviren sind nicht humanpathogen.**

#### Erläuterung

Die bei diesen gentechnischen Arbeiten hergestellten viralen Partikel sind vom Murinen Leukämie-Virus (MLV) abgeleitet.

Murine Retroviren gehören zur Familie der Gammaretroviren mit C-Typ-Morphologie. Sie infizieren die Zellen der Maus. Bestandteil des Infektionszyklus der Retroviren ist die zufällige Integration der retroviralen DNA in das Wirtszellgenom. Je nach Integrationsort sind replikationskompetente Retroviren in Einzelfällen in der Lage, Proto-Onkogene der Wirtszelle zu aktivieren und Neoplasien zu erzeugen. Des Weiteren sind Rekombinationen zwischen Wirtsgenom und der retroviralen DNA möglich, so dass Retroviren entstehen, die Zellen transformieren können und somit zur Ausbildung von Leukämien führen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind murine Retroviren mit einer amphotropen Wirtsspezifität in die Risikogruppe 2 eingestuft worden. Natürlich vorkommende Infektionen des Menschen mit murinen Retroviren sind nicht beschrieben. Eine Studie zur Pathogenität amphotroper Retroviren, durchgeführt mit Rhesusaffen, weist auf eine Apathogenität für immunkompetente Primaten hin, auch wenn es zur Integration viraler Genomabschnitte in das Genom von Lymphknotenzellen kam [4]. Die Tiere bildeten keine Lymphome aus und entwickelten keine Leukämie, obwohl die Volumina virushaltiger Lösungen (mit insgesamt durchschnittlich  $11,5 \times 10^7$  vermehrungsunfähigen und  $7,2 \times 10^7$  vermehrungsfähigen Viruspartikeln), die den Tieren in dieser Studie intravenös appliziert worden sind, sehr groß waren und 12-22% des eigenen Blutvolumens entsprachen.

Das angeborene Immunsystem der Säuger stellt eine erste Barriere für Pathogene innerhalb eines Organismus dar. So werden murine Retroviren bei Säugetieren einer anderen Spezies von deren Komplementsystem erkannt und inaktiviert [5,6]. Des Weiteren besitzen Säugerzellen eine Reihe von Faktoren, sogenannte Restriktionsfaktoren, die die Infektion einer Zelle blockieren können (Rezeptorblockade), die Replikation von Retroviren nach Penetration der Zellmembran behindern (Trim5alpha) oder die Aktivierung retroviraler Elemente im Genom verhindern (Deaminasen, Zink-Finger-Proteine, microRNA, siRNA) [7].

**Die hergestellten GVO sind vermehrungsunfähig. Sie verursachen keine krankheitsverursachende humane Infektion.**

#### Erläuterung

Die eingangs genannte gentechnische Arbeit beinhaltet die Herstellung und Verwendung vermehrungsunfähiger retroviraler Partikel zum Gentransfer eines ABC-Transporters. Die genetischen Informationen zur Herstellung der viralen Partikel wurden dabei auf jeweils zwei Plasmide verteilt [8]. Auf dem einen Vektor-Plasmid (pCLampho) sind die Informationen zur Herstellung eines genomfreien MLV-Partikels kodiert. Mithilfe des zweiten Vektor-Plasmids wird eine genetische Information (Vektor-Genom) für das „Protein von Interesse“ (hier: ein ABC-Transporter) übertragen, die in die MLV-Partikel verpackt werden kann. Die Plasmide werden gemeinsam in eine Zelle eingeführt. Es werden amphotrope MLV-Partikel mit der genetischen Information für einen ABC-Transporter hergestellt. Das Virus-Partikel ist unter geeigneten Bedingungen in der Lage an eine Pit2-Rezeptor-Zellmembran zu binden, mit ihr zu fusionieren und das Vektor-Genom mit der genetischen Information für den ABC-

Transporter in die Zelle zu entlassen. Das Vektor-Genom ist so konstruiert, dass seine Information an einer zufälligen Stelle im Zellgenom integriert wird, wenn sich die Zelle teilt. Der ABC-Transporter kann dann durch diese Zellen hergestellt werden. Es handelt sich dabei um einen Proteinkomplex, der sich in Zellmembranen einlagert, um einen Substrattransfer durch die Membran zu ermöglichen. Die genetischen Informationen für diese Proteine sind ohne Gefährdungspotenzial. Virale Partikel können von der Zelle nicht generiert werden, da hierfür keine genetischen Informationen vorliegen. Die amphotropen MLV-Partikel sind vermehrungsunfähig. Das verwendete Plasmid-System ist durch spezielle Sicherheitsvorkehrungen (Entfernen des Verpackungssignales, verändertes Startsignal des Gag-Glykoproteins, SIN-LTR) so konstruiert, dass nicht von einem Auftreten vermehrungsfähiger Leukämie-Viren in der Verpackungszelllinie ausgegangen werden muss. Entsprechende Experimente bestätigen diese Annahme [9].

Nach o. g. Definition im IfSG ist eine krankheitsauslösende Infektion durch die replikationsdefekten Retroviren nicht gegeben, da nach der Aufnahme durch die Zelle keine Entwicklung oder Vermehrung eines Virus stattfindet. Es wird lediglich eine genetische Information ohne Gefährdungspotenzial übertragen.

**Vermehrungsunfähige retrovirale Vektoren werden in gentherapeutischen Studien eingesetzt. In speziellen Versuchsansätzen kann die Anwendung in der Ausbildung von Leukämie resultieren.**

#### Erläuterung

Retrovirale Vektoren stellen aufgrund ihrer genomintegrierenden Eigenschaften einen möglichen Ansatz zur Übertragung bzw. Korrektur eines Gens im menschlichen Genom dar. Sie finden weltweit in 20,7% der durchgeführten gentherapeutischen Studien Verwendung [10]. Ein hierbei diskutiertes Risiko ist die Insertionsmutagenese. Das bedeutet, dass sich die Integration negativ auswirkt. Dies wurde in der klinischen Gentherapie in spezifischen Situationen beobachtet. Sowohl bei Gentherapie-Studien zur Behandlung von SCID-X1 als auch zur Behandlung der chronischen Granulomatose fanden Insertionen statt, die in einer Reihe von Fällen [17, 18] zur Aktivierung von Onkogenen führten und dadurch in der Ausbildung von Leukämie bzw. eines Myelodysplastischen Syndroms resultierten. Da diese Insertionseffekte jeweils nur mit den jeweiligen Studien assoziiert auftraten, wird von einem ursächlichen Kontext zwischen Krankheitsbild, Gentransfervektoren, -bedingungen und transferiertem Gen ausgegangen [11].

**Die Bedingungen der klinischen Gentherapie sind nicht mit den Forschungsarbeiten in einer gentechnischen Anlage vergleichbar.**

#### Erläuterung

Bei Forschungsarbeiten in gentechnischen Anlagen werden nur geringe Mengen an retroviralen Vektoren hergestellt und in Laborexperimenten verwendet. Unter optimalen Kulturbedingungen werden für dieses MLV-abgeleitete Vektorsystem Titer von ca.  $1 \times 10^6$  Viruspartikel/ml Zellkulturüberstand erreicht [9]. Mit MLV-abgeleiteten Partikeln werden zelllinienabhängig Transduktionsraten von 20%-60% in Zellkulturen angegeben.

Aufgrund der genomintegrierenden Eigenschaften werden rekombinante, MLV-abgeleitete Retroviren mit amphotropem Wirtstropismus in die Risikogruppe 2 eingestuft [12]. Dementsprechend werden bei der Durchführung der gentechnischen Arbeiten Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 gemäß Anhang III A GenTSV eingehalten.

Unter anderen werden folgende Maßnahmen gefordert:

8. *Bei Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen können, muß sichergestellt werden, dass diese nicht in den Arbeitsbereich gelangen (Durchführung der Arbeit unter einer Sicherheitswerkbank..., Benutzen von Geräten, bei denen keine Aerosole freigesetzt werden, das Tragen geeigneter Schutzausrüstung...).*
11. *GVO dürfen nur in verschlossenen und gegen Bruch geschützten...Behältern transportiert werden.*
13. *Alle Arbeitsflächen sind nach Beendigung der Tätigkeiten zu desinfizieren.*
18. *GVO sind dicht verschlossen und sicher aufzubewahren.*

Zum Vergleich: Bei den klinischen Gentherapien zur Behandlung von SCID-X1 wurden den Patienten 30-150ml Knochenmark entnommen, daraus hämatopoetische Stammzellen isoliert und mithilfe von Zytokinen zur Teilung angeregt. Diese Zellkultur wurde mit einem Überstand inkubiert, der die rekombinanten MLV-Partikel enthielt. Nach einem dreimaligen Wechsel des retroviralen Überstandes wurden die Zellen weiter kultiviert, um für die Therapie ausreichende Mengen an transduzierten Zellen zu erhalten. Den Patienten wurden  $1,4-3,8 \times 10^7$  Zellen/kg Körpergewicht rücktransfundiert [16, 17]. Bei  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Zellkultur und 60kg Körpergewicht wurden durchschnittlich 150ml der Zellenkultur benötigt.

Im Falle eines akzidentellen Kontaktes einer Person mit virushaltigem Kulturüberstand im Labor ist von so geringen Mengen Viruspartikeln auszugehen, dass eine unbeabsichtigte Transduktion ausgeschlossen werden kann.

### **Retrovirale Partikel sind nicht über den Luftweg übertragbar und physikalisch instabil.**

#### Erläuterung

Die rekombinanten, replikationsdefekten Retroviren sind nicht über den Luftweg übertragbar. Für eine Transduktion ist der direkte Kontakt von Zellen mit virushaltigen Flüssigkeiten vonnöten.

Es können nur sich teilende Zellen transduziert werden. Die teilungsfähigen Zellen der Haut befinden sich in der Basallamina, der mehrere Schichten keratinisierter, teilungsunfähiger Zellen aufliegen, so dass eine Transduktion hier nur bei einer Verletzung möglich ist.

Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften werden die viralen Partikel leicht inaktiviert. So sind sie beispielsweise sehr temperaturlabil. Die infektiöse Halbwertszeit in Kulturmedium beträgt bei 4°C 6 Stunden, bei 37°C 3,5-9 Stunden. Bei einer Temperatur von 65°C sind die Partikel nach 30 min inaktiviert. Sie können zwar bei -70°C gelagert werden; das Auftauen reduziert den Titer jedoch um 30-50%.

Des Weiteren werden die Partikel durch 0,1%ige Detergenzien, durch Chloroform oder Phenol, 1%ige Bleiche, 70% Ethanol, durch pH-Werte von weniger als 6.5 oder höher als 9.0 oder durch UV-Licht inaktiviert. Entsprechende Anweisungen zur Desinfektion/ Inaktivierung sind in den Betriebsanweisungen der Betreiber gelistet.

Frage 3: Welche Nachweisverfahren bestehen, um Arbeitsbereiche auf das Vorliegen von humanpathogenen GVO zu untersuchen?

**Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt eine Methode dar, spezifische DNA-Abschnitte nachzuweisen. Es kann keine Aussage zum Vorhandensein und zur Anzahl infektiöser Viruspartikel getroffen werden.**

#### Erläuterung

Vom Unterausschuss Methodensammlung der Bund-Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) wurde auf Grundlage einer PCR eine quantitative Nachweismethode von Lentiviren entwickelt [13]. Lentiviren sind Retroviren (RNA-Genom). Der Nachweis zielt auf einen Teil der genetischen Information, nämlich das Verpackungssignal, der kennzeichnend dafür ist, dass die infizierte Zelle die virale Erbinformation erneut in virale Partikel verpackt, sofern die Voraussetzungen zur Bildung eines Partikels gegeben sind. Nach Isolierung der RNA aus der Wischprobe wird die RNA in eine DNA umgeschrieben und mithilfe spezifischer Oligonukleotide (Primer) die Nukleotidsequenz des Verpackungssignales vervielfältigt, wodurch eine Zuordnung zum Virus möglich ist. RNA ist im Vergleich zu DNA instabiler. Die Bestimmungsgrenze des Testverfahrens für die spezifische RNA liegt durch die aufwendige Probenbearbeitung bei 2600 Kopien/Wischprobe. Die Ergebnisse eines in Deutschland durchgeführten Ringversuches zum Nachweis retroviraler RNA lässt aufgrund hoher Abweichungen zwischen den durchgeführten Versuchen keine Aussage zu quantitativen Kontaminationen zu. Einzig eine qualitative Aussage zum Vorhandensein retroviraler RNA ist möglich [14]. Durch dieses Verfahren kann die Erbinformation des Virus nachgewiesen werden. Ob diese nackt oder in einem Viruspartikel verpackt auf dem Arbeitsplatz vorliegt, kann nicht bestimmt werden. Weiterhin ist es nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, falls ein Viruspartikel vorliegt, ob dieses in eine Zelle eindringen kann. Für den Nachweis von Murinen Leukämie-Viren existiert bisher kein standardisiertes Nachweisverfahren. Sollte die quantitative PCR als Methode zum Prüfen auf das Vorhandensein der MLV-Partikel genutzt

werden, gelten die für den Lentiviren-Nachweis angesprochenen Probleme in gleicher Weise.

Frage 4: Wird von den Aufsichtsbehörden der Bundesländer bei vergleichbaren Forschungsarbeiten eine Beprobung der Arbeitsbereiche auf das Vorliegen von humanpathogenen GVO verlangt?

**Von den Aufsichtsbehörden der Bundesländer wird mit einer Ausnahme keine Arbeitsplatzbeprobung verlangt.**

#### Erläuterung

Die Geschäftsstelle der ZKBS hat bei den Aufsichtsbehörden der Länder eine Abfrage zur Auflage einer Arbeitsplatzbeprobung bei vergleichbaren Arbeiten durchgeführt. Mit einer Ausnahme (beklagte Landesbehörde) wird von keiner der befragten Landesbehörden eine solche Anordnung oder eine nachträgliche Auflage erteilt.

#### Literatur:

- [1] Miller DG, Edwards RH, Miller AD (1994) Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. PNAS USA 91:78-82
- [2] Battini JL, Rodrigues P, Müller R, Danos O, Heard JM (1996) Receptor-binding properties of a purified fragment of the 4070A amphotropic Murine Leukemia Virus envelope glycoprotein. JVirol. 70 (7): 4387-4393
- [3] Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung ecotroper C-Typ Retroviren der Maus, (Az. 6790-10-41, April 1996)
- [4] Cornetta K, Moen RC, Culver K, Morgan RA, McLachlin JR, Sturm S, Selegue J, London W, Blaese M and Anderson WF (1990) Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. Hum. Gene Ther. 1 (1): 15-30
- [5] Rother RP, Squinto SP, Mason JM and Rollins SA (1995) Protection of retroviral vector particles in human blood through complement inhibition. Hum Gene Ther 6: 429-235
- [6] Pansiero MN, Wysocki CA, Nader K, Kikuchi GE (1996) Development of amphotropic murine retrovirus vectors resistant to inactivation by human serum. Hum Gene Ther 7 (9): 1095-1101
- [7] Fields Virology 5th Edition (2007) Lippincott Williams & Wilkins
- [8] RetroMax-System-Instruction Manual-IMGENEX
- [9] Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM (1996) The pCL Vector System: rapid production of helper-free, high titer, recombinant retroviruses. JVirol. 70 (8): 5701-5705
- [10] The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site  
<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

- [11] Fehse B (2007) Insertionsmutagenese – Implikationen und Möglichkeiten der Vermeidung. Schwerpunktprogramm 1230 der DFG
- [12] Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren (Az. 6790-10-41, Oktober 2007)
- [13] Methodensammlung der LAG (2009) Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA mittels Real time RT-PCR.
- [14] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (April 2009) Ringversuch „Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1) RNA“-Ergebnisbericht
- [15] Levy, JA (1995) The Retroviridae. Plenum Press, NY
- [16] Hacein-Bey-Abina, S *et al.* (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *New Engl J Med* 346 (16): 1186-1193.
- [17] Hacein-Bey-Abina, S *et al.* (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *New Engl J Med* 363 (4): 355-364.
- [18] <http://www.asgct.org/UserFiles/XSCIDstatement.pdf>