

Stellungnahme der ZKBS zum Einbringen rekombinanter DNA in Tiere

I.

In jüngster Zeit wird rekombinante DNA in Tiere direkt eingebracht, beispielsweise zur Immunisierung gegen Mikroorganismen oder in Vorversuchen für genetische Therapieverfahren. Die angewandten Methoden umfassen intramuskuläre Injektion rekombinanter DNA in Kochsalzlösung, intravenöse Injektion rekombinanter DNA mittels Liposomen, Beschießen von Epidermis oder anderen Organen mit Goldpartikeln, die mit rekombinanter DNA beschichtet sind u.a.. Bei jedem dieser Verfahren kann davon ausgegangen werden, daß es zur Aufnahme der rekombinanten DNA durch einige somatische Zellen des Tieres kommt. Dieses ist Voraussetzung für das Ziel der Verfahren, nämlich die Expression der eingebrachten Nukleinsäureabschnitte in somatischen Zellen. Zu den genannten Verfahren liegen bisher keine umfassenden Erkenntnisse vor, die Aussagen darüber erlauben, ob die eingebrachte DNA nur Zellen im Zielgewebe (z.B. Muskelzellen) trifft, ob auch andere Zellen betroffen sein können und ob die eingebrachte DNA stabil in die Chromosomen von Zellen integriert wird. Es bleibt insoweit offen, ob die eingebrachte DNA - wenn auch ggf. nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit - vom Tier weitergegeben werden kann.

II.

Von einem Gefährdungspotential ist bei der Anwendung der o.g. Verfahren an Tieren unter den folgenden Bedingungen nicht auszugehen:

- Einbringen von Nukleinsäureabschnitten aus Säugetieren in Tiere der Risikogruppe 1 (nicht-infiziert)
- Einbringen von viralen Nukleinsäureabschnitten, die für Virusstrukturproteine kodieren, in Tiere der Risikogruppe 1 (nicht-infiziert)

Bei Anwendung der genannten Methoden ist vorläufig nicht davon auszugehen, daß stabile Integration in Keimbahnzellen stattfindet. Es liegen bisher keine Publikationen vor, die eine abweichende Annahme rechtfertigen. Arbeiten, die nicht die Veränderung von Keimbahnzellen zum Ziel haben, sind daher nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials anzusehen. Die ZKBS empfiehlt jedoch vorläufig, die Versuchstiere nicht zu Züchtungszwecken zu verwenden.

Falls das Ziel solcher Arbeiten die stabile Integration der eingebrachten DNA in Keimbahnzellen, d.h. die Erzeugung transgener Tiere ist, so sind diese Arbeiten als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gemäß GenTG anzusehen.

III.

Eine Prüfung und Bewertung sicherheitsrelevanter Aspekte hält die ZKBS insbesondere dann für erforderlich, wenn in Tiere Nukleinsäureabschnitte eingebracht werden, die in diesen Tieren die Entstehung neuer Organismen (z.B. Viren) erwarten lassen.

Dieses kann besonders dann zutreffen, wenn

- virale oder bakterielle Nukleinsäureabschnitte in solche Tiere eingebracht werden, die aufgrund von Infektion oder genetischer Veränderung Mikroorganismen der Risikogruppe 2 - 4 abgeben, und wenn
- vollständige Virusgenome eingebracht werden

Diese Arbeiten sind ebenfalls als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gemäß GenTG anzusehen.

Begründungen zur Stellungnahme der ZKBS zum Einbringen rekombinanter DNA in Tiere vom Juli 94

Auf der 13. Sitzung (9/94) des UA Vollzug/Fachfragen des Länderausschusses Gentechnik wurde die ZKBS aufgefordert,

(i) die in der o.g. Stellungnahme geäußerte Auffassung, daß stabile Integration in Keimbahnzellen nach Einbringen rekombinanter DNA in Tiere nicht stattfindet, weitergehend zu begründen sowie

(ii) den Abschnitt III der Stellungnahme eindeutiger zu formulieren und hier auch Tiere einzubeziehen, die nach Einbringen rekombinanter DNA Mikroorganismen der Risikogruppe 1 abgeben.

Zu (i) nimmt die ZKBS wie folgt Stellung:

Zu den in der Stellungnahme vom Juli 94 genannten Verfahren des Einbringens rekombinanter DNA in Tiere liegen bereits vorläufige Erkenntnisse vor, die Aussagen darüber erlauben, ob die eingebrachte DNA nur Zellen im Zielgewebe (z.B. Muskelzellen) trifft, ob auch andere Zellen betroffen sein können und ob die eingebrachte DNA stabil in die Chromosomen von Zellen integriert wird.

Von Wolff et al. wurde berichtet, daß rekombinante Plasmide nach Injektion in die Muskulatur von Mäusen episomal verbleibt und nicht in Chromosomen integriert. Dieselbe Beobachtung machten Acsadi et al. für Herzmuskulatur der Ratte. Mehrere Arbeitsgruppen stellten fest, daß Injektion in nicht-muskuläre Gewebe (z.B. Milz, Niere, Leber) von Nagern nicht zu messbarer Expression bzw. mindestens 100-1000x schwächerer Expression als im Muskel führte (siehe Fynan et al.). Nach Injektion in die Epidermis von Mäusen verbleibt die eingebrachte DNA an der Injektionsstelle (Raz et al.). Untersuchungen darüber, ob nach Anwendung der o.g. Methoden auch Keimbahnzellen betroffen sind, liegen bisher nicht vor. Jedoch zeigten Vorversuche für genetische Therapieverfahren von Wagner et al., daß nach Einbringen von DNA-Polylysin-Adenoviruspeptid-Komplexen die eingeführte DNA in Keimbahnzellen nicht nachzuweisen ist.

Die o.g. experimentellen Befunde werden durch die Tatsache gestützt, daß bis heute als hinreichend effiziente Methode zur Erzeugung in der Keimbahn veränderter d.h. transgener Tiere ausschließlich die Injektion von DNA in befruchtete Oozyten existiert. Die Etablierung anderer Methoden war nicht erfolgreich. So konnte z.B. die von Lavitrano et al. publizierte Erzeugung transgener Mäuse durch Absorption von DNA durch Spermien nicht wiederholt werden, obwohl dieses von vielen Arbeitsgruppen versucht wurde (siehe z.B. Brinster et al.). Veröffentlichungen, die die Injektion rekombinanter DNA oder Beschießen von Tieren mit Goldpartikeln, die mit rekombinanter DNA beschichtet sind, als Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere beschreiben, gibt es bis heute nicht, obwohl diese Methoden seit mindestens 5 Jahren bekannt sind.

Insgesamt ist bei Anwendung der o.g. Methoden bisher davon auszugehen, daß die Wahrscheinlichkeit der Weitergabe eingebrachter DNA durch die Versuchstiere zumindest sehr gering ist. Es liegen bisher keine Publikationen vor, die eine abweichende Annahme rechtfertigen.

Im Übrigen hat die ZKBS in der Stellungnahme zum Einbringen rekombinanter DNA in Tiere festgestellt, daß Arbeiten, die die stabile Integration der eingebrachten DNA in Keimbahnzellen d.h. die Erzeugung transgener Tiere zum Ziel haben, als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gemäß GenTG anzusehen sind. Hier wären theoretisch auch Versuchsansätze miteinzuschließen, bei denen rekombinante DNA direkt in die Gonaden von Tieren (z.B. durch Injektion oder Beschuß mit Goldpartikeln) eingebracht wird, da hier die Erzeugung transgener Tiere, falls nicht geplant, zumindest billigend in Kauf genommen wird.

Zu (ii): Absatz III besagt, daß das Einbringen rekombinanter viraler DNA in solche Tiere, die aufgrund von Infektion oder genetischer Veränderung Viren abgeben, unter Umständen die Entstehung gentechnisch veränderter Viren erwarten läßt. Sinngemäß gilt das gleiche für das Einbringen rekombinanter bakterieller DNA in solche Tiere, die aufgrund von Infektion Bakterien abgeben. Die ZKBS hält eine Prüfung und Bewertung sicherheitsrelevanter Aspekte insbesondere in den Fällen für erforderlich, in denen die Entstehung neuer Organismen d.h. GVO der Risikogruppen 2 - 4 (z.B. Viren) zu erwarten ist. In Einzelfällen kann sich auch bei Entstehung von GVO der Risikogruppe 1 eine Bewertung sicherheitsrelevanter Aspekte durch die ZKBS als notwendig erweisen.

Literatur

1. Acsadi, G., Jiao, S.S., Jani, A., Duke, D., Williams, P., Chong, W., and Wolff, J.A.
Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo.
NEW BIOLOGIST 3:71-81, 1991.
2. Brinster RL; Sandgren EP; Behringer RR; Palmiter RD
No simple solution for making transgenic mice (letter; comment)
CELL, 59 (2) 239-41 /1989.
3. Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., and Robinson, H.L.
DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations.
PNAS 90:11478-11482, 1993.
4. Lavitrano M; Camaioni A; Fazio VM; Dolci S; Farace MG; Spadafora C
Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice
CELL, 57 (5) 717-23 /1989.
5. RAZ E; CARSON DA; PARKER SE; PARR TB; ABAI AM; AICHINGER G;
GROMKOWSKI SH; SINGH M; LEW D; YANKAUCKAS MA; BAIRD SM; RHODES
GH
INTRADERMAL GENE IMMUNIZATION - THE POSSIBLE ROLE OF DNA UPTAKE IN
THE INDUCTION OF CELLULAR-IMMUNITY TO VIRUSES
PNAS 91:9519-9523,1994.
6. Wagner et al.
Receptor mediated gene transfer: Synthetic virus-like gene delivery systems
Arbeitskreis f. Zellbiologie und biomed. Forschung e.V. BMFT, GBF. Goslar Sept. 94
7. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L.
Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.
SCIENCE 247:1465-1468, 1990.