

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 RNAs (z. B. siRNA, shRNA, miRNA) bzw. nicht-kodierende DNA-Abschnitte, die über die stabile Deregelation zellulärer Faktoren transformierende Wirkung ausüben oder Nukleinsäureabschnitte, die für solche nicht-kodierenden RNAs kodieren,

in Empfängerorganismen der Risikogruppe 1 eingeführt, werden die erzeugten GVO in die Risikogruppe 1 eingestuft, falls es sich bei dem verwendeten Vektor-Empfänger-System um anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 7 Abs. 3 und 5 GenTSV handelt.

¹ ehemaliges Aktenzeichen: 6790-10-36

Informationen dazu, welche Bakterien oder Pilze als Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet sind, werden in der [Datenbank der Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen](#) gesammelt und zur Verfügung gestellt. Zusätzlich können gemäß § 7 Abs. 3 GenTSV primäre Zellen und etablierte Zelllinien als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt sein, wenn sie nicht spontan oder bei der vorgesehenen gentechnischen Arbeit zu einem Organismus regenerieren und keine Kontamination von Mikroorganismen und exogenen Viren enthalten. Informationen zur Testung von primären Zellen auf exogene Viren sind in der Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung genetischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten (Az. 6790-10-03, aktualisiert Dezember 2009, Stand Mai 2010) zusammengefasst. Für etablierte Zelllinien werden Informationen zur Virusabgabe in der [Zelliniendatenbank](#) gesammelt und zur Verfügung gestellt.

Werden solche Nukleinsäureabschnitte in *Escherichia coli* BL21-Stämme eingeführt, so werden die GVO in die Risikogruppe 1 eingestuft, wenn 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 neoplastisch transformierendem 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. Wie in Anlage 2 Teil a Nr. 1 b. Nr. 5 der GenTSV vorgegeben, sollen spitze oder scharfe Gegenstände nur verwendet werden, wenn es unbedingt erforderlich ist.
3. Laborplatz 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. Diese Arbeiten sollten nicht von Menschen mit Barrierestörungen der Haut durchgeführt werden.

Diese zusätzlichen Sicherheitsmaßnahmen sind nicht erforderlich, wenn es sich bei den Empfängerorganismen um etablierte Zelllinien oder primäre Zellen der Risikogruppe 1 handelt und alle 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 oder um *E. coli* BL21-Stämme in Kombination mit Vektoren, die Bedingungen des § 8 Abs. 2 GenTSV erfüllen, 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 verletzter Haut

wäre eine Übertragung von Nukleinsäuren auf Zellen des Menschen auf zwei Wegen prinzipiell denkbar:

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

zu a) Nukleinsäuretransfer von GVO auf Körperzellen

Ein direkter Nukleinsäure-Transfer von *E. coli* K12 und *E. coli* BL21 auf Körperzellen unter *in vivo*-Bedingungen ist nicht bekannt. Außerdem kann sich *E. coli* K12 genau wie *E. coli* BL21 nicht im Körper etablieren und wird durch körpereigene Abwehrmechanismen wie Komplementreaktion bzw. Phagozytose schnell eliminiert. *E. coli* BL21 erfüllt die Anforderungen zur Anerkennung als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme zwar nicht vollständig, da keine Daten zur Vermehrungsfähigkeit außerhalb gentechnischer Anlagen vorliegen. Jedoch handelt es sich bei *E. coli* BL21 um einen gut charakterisierten Stamm, der sich von *E. coli* B ableitet und seit Jahrzehnten in mikrobiologischen Laboren verwendet wird. Zudem ist *E. coli* BL21 eng mit *E. coli* K12 verwandt² und ebenfalls der Phylogruppe A zugeordnet, und ebenso wie dieser apathogen und nicht in der Lage, sich im Körper von Säugern zu etablieren³.

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 Nukleinsäure 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 neoplastisch transformierendem Potential empfohlen wurden, als sehr gering erachtet.

² Studier FW, *et al.* (2009) *J Mol Biol* **394**(4):653-680.

Jeong H, *et al.* (2009) *J Mol Biol* **394**(4):644-652.

³ Chart H, *et al.* (2000) *J Appl Microbiol* **89**(6):1048-1058.

Die zusätzlichen 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 etablierten Zelllinien oder primären Zellen mit ins Genom stabil integrierten 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: Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016)
- Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten viralen Partikeln, die einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen (Az. 6790-10-83, aktualisiert April 2020)
- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Stabile und transiente Genexpression mithilfe γ -retroviraler und lentiviraler Vektoren (Az. 6790-10-41, aktualisiert Februar 2020)
- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrundeliegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentechnische Arbeiten mit von RNA-Viren abgeleiteten Minigenomen, Replikons und virusähnlichen Partikeln zum Einbringen in humane oder tierische Zellen (Az. 45310.0118, Februar 2021)
- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten (Az. 6790-10-03, aktualisiert Dezember 2009, Stand Mai 2010)