

**Stellungnahme der ZKBS:
Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren
mit neoplastisch transformierendem Potenzial**

Im Jahr 1991 wurden in einer Stellungnahme der ZKBS Vorsichtsmaßnahmen aufgestellt, um möglichen Risiken beim Umgang mit sogenannten „Nukleinsäuren mit einem onkogenen Potenzial“ zu begegnen. Anlass waren Untersuchungen, bei denen in Versuchstieren die Entwicklung von malignen Tumoren beobachtet wurde, nachdem den Versuchstieren onkogene Nukleinsäureabschnitte injiziert bzw. auf Hautläsionen appliziert worden waren. Dies ließ sich insbesondere auf die Transformation von Endothelzellen zurückführen [1-5].

Um einer Gefährdung des Laborpersonals durch den Umgang mit diesen Nukleinsäuren entgegen zu wirken, wurden folgende Maßnahmen empfohlen:

1. Bei Arbeiten mit Nukleinsäuren mit dem o. g. Gefährdungspotenzial sollen Einmalhandschuhe getragen werden.
2. Der Gebrauch von scharfen, spitzen oder zerbrechlichen Laborgegenständen soll nach Möglichkeit vermieden werden.
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. Personen mit erheblichen Hautverletzungen (offene Ekzeme, Wunden und Infektionen) oder mit einer ausgeprägten Verrucosis (Warzenausbildung) sollten keine Arbeiten mit diesen Nukleinsäuren durchführen.

Die Empfehlung dieser zusätzlichen Maßnahmen zum Personenschutz bleibt unverändert bestehen.

Die Stellungnahme wird jedoch dahingehend aktualisiert, dass die zu prüfenden Kriterien für die Bewertung eines human-relevanten neoplastisch transformierenden Potenzials von Nukleinsäureabschnitten, einschließlich nicht kodierender RNAs oder DNA-Abschnitte, neu festgelegt werden:

Ein Nukleinsäureabschnitt wird dann als potenziell neoplastisch transformierend für humane Zellen eingestuft, wenn seine

ursächliche Beteiligung an der Entstehung von Tumoren

durch

- eine *in vitro*-Transformation von relevanten Vertebratenzellen, die diese in die Lage versetzen, verankerungsunabhängig zu wachsen,
und / oder
- die Bildung von Tumoren in relevanten Tier-Modellen, insbesondere in Xenograft- oder direkten Vertebraten-Tiermodellen (bspw. Mäuse, Ratten, Zebrafische)

nachgewiesen wurde.

Erläuterung

Die Stellungnahme betrifft ausschließlich kanzerogene Nukleinsäureabschnitte, deren Transkription bzw. Expression allein ausreichend ist, eine neoplastische Transformation in einer humanen Zelle im Fall einer akzidentellen Aufnahme auszulösen. Sie betrifft nicht solche Nukleinsäureabschnitte, die eine Tumorprogression modulieren oder verstärken, diese jedoch nicht auslösen. Beispiele für modulierende Prozesse sind [7, 8, 9]:

- (1) Resistenz gegenüber Apoptosesignalen
- (2) Aufrechterhaltung des Zellteilungssignals und damit eine erhöhte Zellteilungsrate bzw. Immortalisierung
- (3) Genomische Instabilität
- (4) Stabilisierung der Telomere
- (5) die Versorgung der transformierten Zellen über den Blutkreislauf mit Nährstoffen (Angiogenese)
- (6) Invasion in zellfremdes Gewebe (Metastasierung)
- (7) begleitende Entzündungs-vermittelte Prozesse in der sogenannten Mikroumgebung eines Tumors
- (8) Umstellung des zellulären Stoffwechsels von aerober zu anaerober Energieversorgung
- (9) Umgehen der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem

Dabei ist anzumerken, dass ein einzelnes dieser Charakteristika nicht ausreicht, um aus einer gesunden Zelle eine Krebszelle werden zu lassen. Vielmehr ist belegt, dass beispielsweise die Immortalisierung von Zellen nur ein initialer Schritt in der neoplastischen Transformation ist. So ist die Immortalisierung primärer humaner Zellen *in vitro* mithilfe verschiedener Kanzerogene vielfach beschrieben. Morphologische Veränderungen der Zellen, die auf tumorigene Eigenschaften schließen lassen, wurden jedoch erst nach einem zweiten Impuls, beispielsweise durch Infektion mit Retroviren, Bestrahlung oder Inkubation mit chemischen Kanzerogenen induziert [6]. Eine durch Einbringen eines Nukleinsäureabschnittes ausgelöste Immortalisierung in einem Zellkulturmodell kann somit nicht als alleiniges Kriterium für die Einstufung als neoplastisch transformierend gelten.

Für die Zuweisung eines neoplastisch transformierenden Potenzials ist vielmehr der Nachweis erforderlich, dass durch den eingebrachten Nukleinsäureabschnitt in der Zelle ein kontaktunabhängiges Wachstum ausgelöst wird. Wird der Nachweis mithilfe von Zellen oder Zelllinien erbracht, die aus einem Tumorgewebe isoliert oder etabliert worden sind, muss davon ausgegangen werden, dass schon ein oder mehrere transformationsauslösende Signale vorlagen. Daten aus solchen Experimenten können somit nur bedingt Hinweise auf die Wirkung des zuletzt eingebrachten Nukleinsäureabschnittes geben und nicht ausschlaggebend für die Bewertung sein. Maßgeblich für die Bewertung von humanrelevanten Nukleinsäureabschnitten sind Daten auf der Grundlage von relevanten primären Zellen oder immortalisierten Zelllinien, die keine Krebszellen sind und aus Vertebraten isoliert worden sind.

Für Untersuchungen von tumorauslösenden Substanzen bzw. zur Entwicklung und Behandlung von humanen Tumoren werden in der Forschung vielfältige Tierversuchs-Modelle verwendet. Gegenüber anderen Säugetier-Modellen bietet die Maus den Vorteil, dass langjährige Erfahrungen im Einbringen definierter genetischer Veränderungen und in der Untersuchung ihrer Auswirkungen vorliegen. Allgemein werden Krebs-Maus-Modelle generiert, indem mithilfe verschiedenster Techniken im gesamten Tier oder in bestimmten Geweben Onkogene in das zelluläre Genom eingebracht oder vorhandene Onkogene aktiviert werden bzw. Tumorsuppressorgene inaktiviert werden [13].

Neben den direkten Vertebraten-Tiermodellen stellen Xenograft-Transplantationen bei Untersuchungen zur Tumorentstehung und -entwicklung eine „Mensch im Tier-Abbildung“ dar. Hierfür werden humane Tumorzellen in eine andere Spezies eingebracht, sodass eine Ausbildung humaner Tumoren in dem Tier erreicht wird. Im Mausmodell wird dazu in der Regel auf immunsupprimierte Tiere wie Nod-SCID Stämme zurückgegriffen, da das murine Immunsystem in gesunden Tieren insbesondere artfremde Zellen attackieren und somit die Bildung eines humanen Tumors verhindern würde. Immer häufiger werden jedoch auch Untersuchungen mit Xenograft-Modellen in Fischembryonen (*Danio rerio*, *Xiphophorus* sp., *Oryzias latipes*) durchgeführt. Insbesondere für Untersuchungen zu humanen Hauttumoren stellen sie inzwischen sehr gut etablierte Systeme dar [10-12].

Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Verwendung von chemischen oder physikalischen kanzerogenen Faktoren bei gleichzeitigem Umgang mit Nukleinsäuren von Onkogenen ein erhöhtes Risiko darstellen kann.

Literatur

- 1 Ito Y and Evans C (1961). Induction of tumors in domestic rabbits with nucleic acid preparations from partially purified Shope papilloma virus and from extracts of the papillomas of domestic and cottontail rabbits. *J Exp Med* 114:485-500.
- 2 Fleckenstein B, Daniel MD, Hunt R, Werner J, Falk LA, Mulder C (1978). Tumor induction with DNA of oncogenic primate herpesviruses. *Nature* 274:57-59.
- 3 Fung YKT, Crittenden LB, Fadly A, Kung HJ (1983). Tumor induction by direct injection of cloned *v-src* DNA into chickens. *PNAS* 80:353-357.
- 4 Asselin C, Gélinas C, Branton PE, Bastin M (1984). Polyoma middle T antigen requires cooperation from another gene to express the malignant phenotype *in-vivo*. *Mol Cell Biol* 4:755-760.
- 5 Burns PA, Jack A, Neilson F, Haddow S, Balmain A (1991). Transformation of mouse skin endothelial cells *in-vivo* by direct application of plasmid DNA encoding the human T24 *H-ras* oncogene. *Oncogene* 6:1973-1978.
- 6 Rhim JS, Dritschilo A (1991). Neoplastic Transformation in Human Cell Culture: Mechanisms of Carcinogenesis. Humana Press
- 7 Hanahan D and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- 8 Hanahan D and Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- 9 Hanahan D and Coussens LM (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309-322.
- 10 Scharl M, Walter RB (2016). Xiphophorus and Medaka Cancer Models. *Adv Exp Med Biol* 916:531-552.
- 11 Wertman J, Veinotte CJ, Dellaire G, Berman JN (2016). The Zebrafish Xenograft Platform: Evolution of a Novel Cancer Model and Preclinical Screening Tool. *Adv Exp Med Biol* 916:289-314.
- 12 Echin J, Kanki JP, Look AT (2011). Zebrafish as a model for the study of human cancer. *Methods Cell Biol.* 105:309-37.
- 13 Cheon GJ, Orsulic S (2011). Mouse Models of Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 6:95-119.