

Stellungnahme der ZKBS

zur Einstufung gentechnischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten

Definition

Als primäre Zellen werden Zellen bezeichnet, die direkt aus Körperflüssigkeiten oder aus Körpergeweben von vielzelligen Organismen isoliert wurden. Primäre Zellkulturen sind in Kultur genommene primäre Zellen bis zur ersten Passage. Die weiteren Passagen der primären Zellkulturen und davon abgeleitete Strukturen, wie z. B. Organoide, sind unter dem Aspekt der Risikobewertung bis zu einer ausreichenden Charakterisierung wie primäre Zellen zu behandeln. Dient die Kultivierung von primären Zellen der gezielten Anreicherung von Viren, so ist eine Einzelfallbetrachtung vorzunehmen.

Gefährdungspotenzial

Gefährdungen beim Umgang mit Zellkulturen sind möglich, wenn die Kulturen mit Krankheitserregern infiziert oder kontaminiert sind. Es sind jedoch nur wenige Erkrankungsfälle bekannt, die mit dem Umgang mit Zellkulturen im Zusammenhang standen. Beim Umgang mit primären Zellen höherer Organismen ist das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern auf die Beschäftigten aufgrund nicht bekannter Kontaminationen größer als beim Umgang mit meist gut charakterisierten etablierten Zelllinien.

Gemäß der Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten nach § 6 Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) werden Zellen und Zelllinien als Spender- und Empfängerorganismen in die **Risikogruppe 1** eingestuft, wenn sie keine Organismen einer höheren Risikogruppe abgeben. Geben sie Organismen höherer Risikogruppen ab, werden sie in die Risikogruppe dieser Organismen eingestuft.

Allgemein gilt, dass Zellen und Zellkulturen aus höheren Organismen nur unter Verwendung aufwändiger Medien und nur in spezifischen Anzuchtgefäßen in Kultur gehalten werden können. Eine Gefährdung der Umwelt durch Zellen höherer Organismen besteht grundsätzlich nicht, da sie ohne die genannten Kulturbedingungen nicht lebensfähig sind. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Bedingungen der GenTSV für die Einstufung von primären Zellen in die **Risikogruppe 1** in der Regel vorliegen.

Besteht jedoch begründeter Verdacht, dass primäre Zellen oder primäre Zellkulturen übertragbare Krankheitserreger enthalten und abgeben, muss von einem Risiko für die Beschäftigten

¹ ehemaliges Aktenzeichen: 6790-10-03

ausgegangen werden. Die bisherige Erfahrung im Umgang mit diesem Zellmaterial hat gezeigt, dass eine Gefährdung von möglichen Infektionen mit humanpathogenen Viren ausgehen kann. Es gibt bislang keine Hinweise auf eine Gefährdung durch Kontaminationen mit nicht-viralen Pathogenen.

Die Möglichkeit, dass Viren in primären Zellen vorkommen, hängt im Wesentlichen von der Art und dem Gesundheitszustand des Spenderorganismus sowie dem Gewebe bzw. der Körperflüssigkeit ab, aus dem bzw. der das Material entnommen wurde. Damit primäre Zellen in die **Risikogruppe 1** eingestuft werden können, muss daher geprüft werden, ob der Spender frei von Krankheitssymptomen und/oder serologisch negativ für bestimmte Viren ist.

Nachfolgend werden Beispiele als Leitlinie für die differenzierte Risikobewertung primärer Vertebraten-Zellen und -Zellkulturen genannt. Andere Zellen, insbesondere primäre Pflanzenzellen und Insektenzellen, werden im Rahmen dieser Stellungnahme nicht betrachtet.

A. Risikobewertung von primären Vertebratenzellen

Bei der Abschätzung des Gefährdungspotenzials primärer Zellen ist es sinnvoll, zwischen Mensch, anderen Primaten, Chiroptera und sonstigen Vertebraten zu unterscheiden.

1. Humane Zellen

Für die Risikobewertung primärer humaner Zellen kann auf die Erfahrungen der Transfusions- und Transplantations-Medizin zurückgegriffen werden. Es ist bekannt, dass bei Transfusionen/Transplantationen eine hohe Ansteckungsgefahr für den Empfänger besteht, wenn das verwendete Material mit Krankheitserregern kontaminiert ist. Aus diesem Grund wird das Spenderblut mittels serologischer und molekularbiologischer Verfahren u. a. auf die humanpathogenen Viren Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) hin untersucht. Da beim Umgang mit primären Zellen zur Durchführung gentechnischer Arbeiten das Infektionsrisiko im Falle einer Kontamination der primären Zellen mit HIV, HBV oder HCV deutlich niedriger einzustufen ist als das Infektionsrisiko nach Transfusion oder Transplantation, ist es ausreichend, bei klinisch unauffälligen Spendern eine Kontamination mittels serologischer Verfahren auszuschließen. Dies entspricht dem Vorgehen bei der Arbeitsmedizinischen Vorsorgeuntersuchung, bei welcher auch serologische Untersuchungsverfahren trotz diagnostischer Lücke als ausreichend angesehen werden, sofern kein konkreter Verdacht auf eine Exposition bzw. Infektion mit HIV, HBV oder HCV besteht.

Risikobewertung primärer humaner Zellen

- Primäre Zellen aus klinisch unauffälligen Spendern sind in die **Risikogruppe 1** einzuordnen, wenn durch immunologische Tests die Seronegativität des Spenders für HIV, HBV und HCV nachgewiesen ist oder durch andere Verfahren gezeigt ist, dass die Zellen frei von diesen Viren sind. Im Einzelfall, wenn ein begründeter Verdacht auf das Vorhandensein eines bestimmten Virus einer höheren Risikogruppe in den zu verwendenden Zellen besteht, ist das primäre Gewebe auf Abwesenheit dieses Virus zu überprüfen.

- Sind Spender oder Zellen nicht auf Abwesenheit der o. g. Viren überprüft, so sind die primären Zellen – in Anlehnung an die Erfahrung bei der Handhabung diagnostischer Proben in der Medizin – grundsätzlich der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.
- Sind Spender oder Zellen nicht auf Abwesenheit der o. g. Viren überprüft und sind die Zellen nicht permissiv für die o. g. Viren, so können die primären Zellen dann der **Risikogruppe 1** zugeordnet werden, wenn sichergestellt ist, dass sie nicht mit Blut oder Sekreten oder mit für die o. g. Viren permissiven Zellen verunreinigt sind.
- Stammen primäre Zellen aus Gewebe oder Körperflüssigkeiten, bei denen aufgrund von Erkrankungen des Spenders bzw. aufgrund der Art des krankhaft veränderten Gewebes eine Abgabe viraler Erreger zu erwarten ist, erfolgt eine Einstufung des Materials entsprechend der Risikogruppe des Virus.

2. Nicht-humane Primatenzellen

Primaten können Träger viraler Erreger sein, die zwischen den verschiedenen Affenspezies und auch auf den Menschen übertragbar sind (Interspeziesübertragung). Einige dieser übertragbaren Viren persistieren in den Tieren ohne erkennbare Symptome. Erkrankungen treten erst nach der Interspeziesübertragung auf.

Beispielsweise finden sich Retroviren wie Spumaretroviren, Lentiviren (*Lentivirus simimdef*, früher Simian immunodeficiency virus, SIV), *Betaretrovirus maspfimon* (früher Simian retrovirus, SRV) oder *Deltaretrovirus priTlym1*, *Deltaretrovirus priTlym2* bzw. *Deltaretrovirus priTlym3* (früher Primate T-lymphotropic virus 1 – 3, Simian T-lymphotropic virus, STLV) in vielen Affenspezies. In der Regel bleiben die Infektionen unerkannt. Die Infektion von Makaken mit SIV oder SRV kann bei diesen Tieren gelegentlich AIDS-ähnliche Symptome hervorrufen, und eine Infektion mit STLV kann gelegentlich mit einer Lymphoproliferation assoziiert sein. Die Infektion mit Spumaretroviren ist weit verbreitet und verläuft asymptomatisch. Zahlreiche Übertragungen von Spumaretroviren vom Affen auf den Menschen sind beschrieben. Auch diese Übertragungen verliefen asymptomatisch und wurden auch nicht auf weitere Personen übertragen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beim Umgang mit primären Affenzellen, die mit Spumaretroviren kontaminiert sind, nicht von einer Gefährdung des Menschen auszugehen ist.

Simplexvirus macacinealpha1 (früher auch (Herpes-)B-Virus, BV) kommt natürlicherweise in Makaken und wahrscheinlich auch in anderen Altweltaffen vor; die Infektion verläuft jedoch weitgehend asymptomatisch. Bei einer Übertragung auf den Menschen kann die Infektion indes eine tödlich verlaufende Enzephalomyelitis hervorrufen. Die Mehrzahl der freilebenden Tiere sowie der in Tierzucht gehaltenen Makaken und Rhesusaffen ist BV-seropositiv. Diese Tiere sind jedoch meist nicht virämisch, und es ist nicht zu erwarten, dass ihnen entnommenes Gewebe oder Zellen BV abgeben. Mit einer Virusabgabe ist nur bei Verwendung von Zellmaterial aus virämischen Tieren zu rechnen. BV kann aber auch im Affen persistieren, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden, sodass Seronegativität nicht zuverlässig eine BV-Infektion ausschließt.

Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) stellt einen Sonderfall dar. STLV, SIV oder BV wurden bei diesen Neuweltaffen bislang nicht gefunden. Infektionen von Weißbüschelaffen mit Erregern, die vom Menschen auf die Tiere übertragbar sind, führen zu schweren Krankheitsverläufen mit hoher Letalität und werden daher in der Regel rasch festgestellt. Seit den 1960er Jahren werden Weißbüschelaffen in Tierversuchen eingesetzt oder als Haustiere gehalten. Krankheiten, die von diesen Tieren auf den Menschen übertragen werden können, sind nicht bekannt. Als Labortiere zählen sie neben den Rhesusaffen und Javaneraffen zu den am häufigsten eingesetzten Primatenarten, werden allerdings dazu eigens gezüchtet und nicht mehr gefangen.

Risikobewertung primärer Zellen aus nicht-humanen Primaten

- Primäre Zellen, die klinisch unauffälligen, nicht-humanen Primaten aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden, sind aufgrund der weiten Verbreitung interspeziesübertragbarer Viren der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, soweit keine gesonderte Risikobewertung vorgenommen wird.
- Primäre Zellen, die klinisch unauffälligen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) oder Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden und die negativ auf SIV, SRV, STLV (*Deltaretrovirus priTlym1*, -2 und -3) und BV getestet wurden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.

Sind Spender oder Zellen nicht auf Abwesenheit der o. g. Viren überprüft und sind die Zellen nicht permissiv für die o. g. Viren, so können die primären Zellen dann der **Risikogruppe 1** zugeordnet werden, wenn sichergestellt ist, dass sie nicht mit Blut oder Sekreten oder mit für die o. g. Viren permissiven Zellen verunreinigt sind.

- Embryonale Stammzellen aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) oder Javaneraffen (*Macaca fascicularis*), die durch *in vitro*-Fertilisation entwickelten Embryonen von Makaken aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden, die negativ auf SIV, SRV und STLV getestet wurden, werden der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Die primären Zellen können z. B. mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Mitführen geeigneter Kontrollen auf das Vorliegen der genannten Viren getestet werden. Bei primären Zellen aus Rhesus- oder Javaneraffen, die mit BV infiziert sind, und bei denen eine Virämie zum Zeitpunkt der Entnahme der primären Zellen nicht auszuschließen ist, ist die PCR-Testung von Blut bzw. Serum jedoch erforderlich.

- Primäre Zellen, die klinisch unauffälligen Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.
- Für Zellmaterial von nicht-humanen Primaten aus Wildfängen ist eine auf den Einzelfall bezogene Risikoabschätzung vorzunehmen, wobei mindestens von einer Zuordnung in die **Risikogruppe 2** auszugehen ist.

3. Vertebratenzellen (außer Primaten)

In den meisten Fällen werden zur Durchführung gentechnischer Arbeiten Nager (Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen) als Spenderorganismen primärer Zellen verwendet. Darüber hinaus werden primäre Zellen häufig auch aus Nutz- und Haustieren, z. B. aus Rind, Schwein,

Ziege, Schaf, Hund oder Kaninchen sowie aus Amphibien und Vögeln entnommen. Die genannten Tiere können Krankheitserreger, in seltenen Fällen auch humanpathogene Erreger, enthalten. Fledermäuse, die keine Krankheitssymptome zeigen, können beispielsweise mit den humanpathogenen Viren *Lyssavirus hamburg* (früher European bat lyssavirus 1, EBLV-1), *Lyssavirus helsinki* (früher European bat lyssavirus 2, EBLV-2) und *Lyssavirus bokeloh* (früher Bokeloh bat lyssavirus, BBLV) infiziert sein.

Risikobewertung primärer Zellen aus Vertebraten (außer Primaten)

- Primäre Zellen aus Vertebraten (außer Primaten und Chiroptera) sind in die **Risikogruppe 1** einzuordnen, wenn die Tiere keine Krankheitssymptome zeigen. Diese Zuordnung gilt für Tiere aus veterinärmedizinisch überprüften Beständen.
- Primäre Zellen aus Chiroptera, die nachweislich frei von den Lyssaviren EBLV-1, -2 und BBLV sind, werden in die Risikogruppe 1 eingestuft, wenn die Tiere keine Krankheitssymptome zeigen.
- Primäre Zellen aus Chiroptera, die nicht auf die Abwesenheit der o. g. Lyssaviren getestet sind, werden der Risikogruppe 2 zugeordnet.
- Primäre Zellen, die aus Geweben oder Körperflüssigkeiten stammen, bei denen ein begründeter Verdacht auf das Vorliegen viraler Zoonose-Erreger im primären Gewebe besteht, werden entsprechend der Risikogruppe des Erregers eingestuft.

B. Einstufung gentechnischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten

1. Primäre Zellen als Empfängerorganismen

Werden primäre Zellen als Empfängerorganismen verwendet, so sind die gentechnischen Arbeiten in die Sicherheitsstufe einzustufen, die der Risikogruppe der primären Zellen entspricht, sofern die überführten Nukleinsäuren soweit charakterisiert sind, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 GenTSV das Gefährdungspotenzial der verwendeten primären Zellen nicht überschreiten.

2. Primäre Zellen als Spenderorganismen

Im Folgenden wird eine Bewertung gentechnischer Arbeiten vorgenommen, bei denen aus primären Zellen entweder eine genomische Genbank oder eine cDNA-Genbank in *E. coli* K12 angelegt wird.

- 2.1. Primäre Zellen, bei denen ein begründeter Verdacht auf die Infektion mit einem Virus besteht, sind der Risikogruppe des erwarteten Virus zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit solchen Zellen als Spenderorganismen sind wie gentechnische Arbeiten mit dem entsprechenden Virus zu bewerten.
- 2.2. Primäre humane Zellen von klinisch unauffälligen Personen sind in die **Risikogruppe 1** einzuordnen, wenn durch immunologische Tests die Seronegativität der Spenderperson für HIV, HBV und HCV nachgewiesen ist oder durch andere Verfahren gezeigt ist, dass die Zellen frei von diesen Viren sind. Sind Spender oder Zellen nicht auf Abwesenheit der

o. g. Viren überprüft und sind die Zellen nicht permissiv für die o. g. Viren, so können die primären Zellen dann der **Risikogruppe 1** zugeordnet werden, wenn sichergestellt ist, dass sie nicht mit Blut oder Sekreten oder mit für die o. g. Viren permissiven Zellen verunreinigt sind. Primäre Zellen von Chiroptera, die nachweislich nicht die Lyssaviren EBLV-1, -2 und BBLV enthalten, sowie andere primäre Vertebratenzellen (außer aus nicht-humanen Primaten) sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Die Übertragung von Nukleinsäureabschnitten aus solchen Spenderorganismen auf *E. coli* K12 mithilfe von Vektoren, welche die Anforderungen gemäß § 8 Absatz 2 GenTSV erfüllen, ist der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen. Die hierbei erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.

Begründung:

Die primären Zellen und die daraus zu übertragenden Nukleinsäureabschnitte sind ohne Gefährdungspotenzial. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Absatz 1 und 2 GenTSV.

- 2.3. Primäre humane Zellen von klinisch unauffälligen Personen, die nicht auf Abwesenheit von HBV, HIV und HCV geprüft sind, und die für diese Viren permissiv sind oder für die nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie mit Blut oder Sekreten oder mit für die genannten Viren permissiven Zellen verunreinigt sind, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, wenn sie als Spenderorganismen verwendet werden.
- a. Die Übertragung von Nukleinsäureabschnitten aus solchen Spenderorganismen auf *E. coli* K12 mithilfe von Vektoren, welche die Anforderungen gemäß § 8 Absatz 2 GenTSV erfüllen, ist der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen, wenn gemäß der experimentellen Planung davon auszugehen ist, dass entweder keine viralen Nukleinsäureabschnitte oder nur subgenomische Nukleinsäureabschnitte der betreffenden Viren übertragen werden können. Die hierbei erzeugte Genbank ist der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.
 - b. Die Übertragung von Nukleinsäureabschnitten aus solchen Spenderorganismen auf *E. coli* K12 mithilfe von Vektoren, welche die Anforderungen gemäß § 8 Absatz 2 GenTSV erfüllen, ist der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen, wenn gemäß der experimentellen Planung davon auszugehen ist, dass vollständige Genome der betreffenden Viren übertragen werden können. Die hierbei erzeugte Genbank ist gemäß der Allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus (Az. 6790-10-89, November 2019) der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

Begründung:

Primäre Zellen weisen in der Regel kein Gefährdungspotenzial auf. Ein geringes Risiko könnte durch eine Infektion mit den oben genannten Viren gegeben sein, wobei jedoch nur bestimmte humane Zellen wie beispielsweise Hepatozyten oder Zellen des hämatopoetischen Systems für HBV, HCV bzw. HIV permissiv sind. Da aber die Personen oder die aus ihnen isolierten Zellen nicht auf die genannten Viren getestet sind und es sich um Zellen handelt, die permissiv für die o. g. Viren sind oder für die nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie mit Blut oder Sekreten oder mit für die genannten Viren permissiven Zellen verunreinigt sind, werden solche primären Zellen vorsorglich der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Die aus solchen primären Zellen isolierten Nukleinsäureabschnitte sind entweder ausschließlich zellulären Ursprungs oder zellulären und viralen Ursprungs.

- zu a. Es werden entweder ausschließlich zelluläre Nukleinsäureabschnitte oder zelluläre und subgenomische virale Nukleinsäureabschnitte übertragen. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Absatz 1 und 2 GenTSV.
 - zu b. Es werden entweder ausschließlich zelluläre Nukleinsäureabschnitte oder zelluläre Nukleinsäureabschnitte und virale Genome übertragen. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Absatz 1 und 2 GenTSV.
- 2.4. Primäre Zellen, die klinisch unauffälligen, nicht-humanen Primaten (Ausnahmen siehe Abschnitt 2.5) aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden, oder primäre Zellen von Chiroptera, die nicht auf die Abwesenheit der Lyssaviren EBLV-1, -2 und BBLV getestet sind, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.
- a. Die Übertragung von Nukleinsäureabschnitten aus solchen Spenderorganismen auf *E. coli* K12 mithilfe von Vektoren, welche die Anforderungen gemäß § 8 Absatz 2 GenTSV erfüllen, ist dann der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen, wenn gemäß der experimentellen Planung davon auszugehen ist, dass entweder keine viralen Nukleinsäureabschnitte oder nur subgenomische Nukleinsäureabschnitte der betreffenden Viren übertragen werden können. Die hierbei erzeugte Genbank ist der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.
 - b. Die Übertragung von Nukleinsäureabschnitten aus solchen Spenderorganismen auf *E. coli* K12 mithilfe von Vektoren, welche die Anforderungen gemäß § 8 Absatz 2 GenTSV erfüllen, ist der jeweiligen Sicherheitsstufe gemäß der Allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus (Az. 6790-10-89, November 2019) zuzuordnen, wenn gemäß der experimentellen Planung davon auszugehen ist, dass vollständige virale Genome der betreffenden Viren übertragen werden können.

Begründung:

Primäre Zellen weisen in der Regel kein Gefährdungspotenzial auf. Bei primären Zellen aus nicht-humanen Primaten oder ungetesteten Chiropterazellen könnte ein geringes Risiko durch eine interspeziesübertragbare Virusinfektion gegeben sein. Deshalb werden solche primären Zellen vorsorglich der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Die aus solchen primären Zellen isolierten Nukleinsäuren sind entweder ausschließlich zellulären Ursprungs oder zellulären und viralen Ursprungs.

- zu a. Es werden entweder ausschließlich zelluläre Nukleinsäureabschnitte oder zelluläre und subgenomische virale Nukleinsäureabschnitte übertragen. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Absatz 1 und 2 GenTSV.
- zu b. Es werden entweder ausschließlich zelluläre Nukleinsäureabschnitte oder zelluläre Nukleinsäureabschnitte und vollständige virale Genome übertragen. Das

Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Absatz 1 und 2 GenTSV.

Erläuterung zur experimentellen Planung:

- Bei der Spaltung von DNA der Spenderzellen mit einem Restriktionsenzym und Insertion der Restriktionsfragmente in einen Vektor ist zu beachten, dass auch das frei vorliegende Genom eines DNA-Virus wie z. B. HBV durch das Restriktionsenzym geschnitten werden kann. Hierbei können in den Vektor inserierbare subgenomische Nukleinsäureabschnitte oder auch nicht inserierbare Nukleinsäureabschnitte entstehen. Weist das extrachromosomale Genom des DNA-Virus keine Schnittstellen für das betreffende Restriktionsenzym auf, so ist die Übertragung eines vollständigen Virusgenoms mithilfe eines solchen Vektors nicht anzunehmen.
- Zirkuläre virale DNA-Genome (z. B. Polyoma- oder Papillomaviren) können über eine einzelne Schnittstelle für ein Restriktionsenzym verfügen und wären somit als vollständiges Genom übertragbar; sie sind dann jedoch an der Schnittstelle in ihrem genetischen Zusammenhang gestört (siehe dazu auch Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus (Az. 6790-10-89, November 2019)). In das Wirtsgenom integrierte virale DNA, auch ein Provirus, kann – wenn keine internen Schnittstellen für das Restriktionsenzym vorliegen – über Schnittstellen in der flankierenden zellulären DNA vollständig auf den Vektor übertragen werden.
- Bei Herstellung von cDNA-Banken werden Expressionsprodukte von Genen übertragen, sodass bei der Herstellung von cDNA-Banken im Falle einer Virusinfektion der Spenderzellen in der Regel nur von einer Übertragung subgenomischer Nukleinsäureabschnitte auszugehen ist.
- Handelt es sich bei dem erwarteten Virus um ein RNA-Virus wie z. B. HCV oder HIV, so ist die Übertragung des vollständigen viralen Genoms über cDNA nicht auszuschließen, wenn der zur Herstellung des komplementären Stranges eingesetzte Primer seine homologen Sequenzen am 3'-Terminus des Virusgenoms vorfindet und sich die reverse Transkription über die vollständige Länge des viralen Genoms fortsetzt. Im Falle der Erzeugung von cDNA aus dem RNA-Genom von Retroviren ist nicht mit der Entstehung von infektiösen Nukleinsäuren zu rechnen, da keine vollständigen *long terminal repeat*-Regionen vorliegen.

- 2.5. Primäre Zellen, die klinisch unauffälligen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) oder Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden und die negativ auf SIV, SRV, STLV und BV getestet wurden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Embryonale Stammzellen aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) oder Javaneraffen (*Macaca fascicularis*), die durch *in vitro*-Fertilisation entwickelten Embryonen von Makaken aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden, die auf SIV, SRV und STLV getestet wurden und negativ sind, werden der **Risikogruppe 1** zugeordnet. Primäre Zellen, die klinisch unauffälligen Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) aus veterinärmedizinisch kontrollierten Zuchten entnommen wurden, sind ebenfalls der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Die Übertragung von Nukleinsäureabschnitten aus solchen Spenderorganismen auf *E. coli* K12 mithilfe von Vektoren, welche die Anforderungen gemäß § 8 Absatz 2 GenTSV erfüllen, ist der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen. Die hierbei erzeugten gentechnisch veränderten Organismen sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.

Begründung:

Die primären Zellen und die daraus zu übertragenden Nukleinsäureabschnitte sind ohne Gefährdungspotenzial. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 8 Absatz 1 und 2 GenTSV.

- 2.6. Für Zellmaterial von nicht-humanen Primaten aus Wildfängen ist eine auf den Einzelfall bezogene Risikobewertung vorzunehmen, wobei mindestens von einer Zuordnung in die **Risikogruppe 2** auszugehen ist. Werden solche Zellen als Spenderorganismen verwendet, erfolgt die Sicherheitseinstufung im Einzelfall.