

**Dr. Willi Siller**

**Beauftragter für die Biologische Sicherheit der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

Dieser Leitfaden für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten wurde von mir in seiner ursprünglichen Fassung in Band 1 der Materialien und Basisdaten für gentechnisches Arbeiten und für die Errichtung und den Betrieb gentechnischer Anlagen bei der DECHEMA e.V. veröffentlicht. Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministers für Forschung und Technologie unter dem Förderkennzeichen 0319468A gefördert.

## **Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten**

1. [Vorbemerkungen zur Sicherheitseinstufung](#)
2. [Vorgehen bei der Sicherheitseinstufung einer gentechnischen Arbeit](#)
3. [Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Produktionsbereich](#)
  - [3.1 Sicherheitsstufe 1](#)
  - [3.2 Sicherheitsstufe 2](#)
  - [3.3 Sicherheitsstufe 3](#)
  - [3.4 Sicherheitsstufe 4](#)
4. [Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Laborbereich](#)
  - [4.1 Sicherheitsstufe 1](#)
  - [4.2 Sicherheitsstufe 2](#)
  - [4.3 Sicherheitsstufe 3](#)
  - [4.4 Sicherheitsstufe 4](#)
5. [Gentechnische Arbeiten mit Tieren und Pflanzen](#)
  - [5.1 Sicherheitsstufe 1](#)
  - [5.2 Sicherheitsstufe 2](#)
  - [5.3 Sicherheitsstufe 3](#)
  - [5.4 Sicherheitsstufe 4](#)

[Literatur](#)

# 1. Vorbemerkungen zur Sicherheitseinstufung

Alle gentechnischen Arbeiten bedürfen grundsätzlich einer Sicherheitseinstufung zur Festlegung des vorhandenen Gefährdungspotenzials. Die Sicherheitseinstufung ist in jedem Fall durchzuführen, d.h. es handelt sich eigentlich immer um eine Einzelfallentscheidung. Die Grundlagen der Sicherheitseinstufung und nähere Angaben zu ihrer Durchführung werden in den §§ 4 - 7 GenTSV ausgeführt.

Für die Zuordnung gentechnischer Arbeiten in eine der in § 7 des Gentechnikgesetzes (GenTG) genannten Sicherheitsstufen ist eine Gesamtbewertung der für die Sicherheit bedeutsamen Eigenschaften

- der verwendeten Spender- und Empfängerorganismen und, soweit verwendet, der Vektoren sowie
- der erzeugten gentechnisch veränderten Organismen

und der von ihnen ausgehenden Gefährdung für die in § 1 Nr. 1 GenTG genannten Rechtsgüter unter Berücksichtigung der Risikobewertung der Organismen nach § 5 GenTSV und der vorgesehenen biologischen Sicherheitsmaßnahmen nach § 6 GenTSV nötig. Das Zusammenwirken der genannten Eigenschaften und nicht die reine Addition der einzelnen Risikopotenziale ergibt für die gentechnische Arbeit die geforderte Gesamtbewertung. Auf der Basis dieser Bewertung erfolgt die Klassifikation der Arbeit in eine der im Gentechnik-Gesetz beschriebenen Sicherheitsstufen:

*Der **Sicherheitsstufe 1** sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen ist.*

*Der **Sicherheitsstufe 2** sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem geringen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.*

*Der **Sicherheitsstufe 3** sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem mäßigen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.*

*Der **Sicherheitsstufe 4** sind gentechnische Arbeiten zuzuordnen, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem hohen Risiko oder dem begründeten Verdacht eines solchen Risikos für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.*

Die Einstufung der gentechnischen Arbeiten im Produktionsbereich dürfte an der Universität nur von untergeordneter Bedeutung sein, sie soll jedoch aus Gründen der Vollständigkeit ebenfalls kurz angesprochen werden.

## 2. Vorgehen bei der Sicherheitseinstufung einer gentechnischen Arbeit

Um die Sicherheitseinstufung einer gentechnischen Arbeit vornehmen zu können, sollte man das beabsichtigte Projekt in seine Einzelschritte zerlegen und die gehandhabten Organismen gesondert betrachten. Bei der Zuordnung der Spender- bzw. Empfängerorganismen zu Risikogruppen ist es sinnvoll, zunächst zu prüfen, ob die Organismen in die vom Bundesministerium für Gesundheit nach Anhörung der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit im Bundesgesundheitsblatt veröffentlichte Liste "[Risikobewertete Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten](#)" aufgenommen sind. Im positiven Fall kann die Eingruppierung ohne weitere Angaben übernommen werden, da es sich bei den Organismenlisten um vorweggenommene Gutachten handelt [siehe hierzu auch 1; GenTSV § 7, Rdnrn. 47-57]. Auch die Organismenlisten der BG-Chemie [2,3,4,5,7] können herangezogen werden, sie sind jedoch nicht rechtsverbindlich. Im negativen Fall muss eine Risikobewertung der Spender- und Empfängerorganismen gem. § 5 Abs. 1 Satz 1 bzw. Abs. 2 Satz 1 GenTSV durchgeführt werden.

Für die entstehenden gentechnisch veränderten Organismen können solche Listen selbstverständlich nicht präfabriziert werden. In diesem Fall ist die Bestimmung des Gefährdungspotenzials und die Zuordnung zu den Risikogruppen gem. § 5 Abs. 1 Satz 2 bzw. Abs. 2 Satz 2 GenTSV durch die Bewertung der allgemeinen Kriterien nach Anhang I GenTSV heranzuziehen. Aus allen Einzelüberlegungen kann man unter Einbeziehung der einzelnen Abschnitte des § 7 GenTSV die Sicherheitsstufe der Arbeit ermitteln. Für die Vorgehensweise kann das folgende Schema herangezogen werden:

1. Genaue Beschreibung des Projektes mit Zielstellung und einzelnen Klonierungsschritten.
2. Aufstellung sämtlicher Spenderorganismen und Bestimmung der Risikogruppen nach § 5 Abs. 1 Satz 1 i.V.m. Anhang I Nr. 1 GenTSV
  - Soll das gesamte Genom oder nur ein subgenomischer oder subgenischer Teil übertragen werden?
  - Welche Nukleinsäure soll übertragen werden und wofür kodiert sie?
  - Falls es sich um Organismen der Risikogruppe 2-4 handelt: was ist über das Pathogenitätsprinzip und die daran beteiligten Gene bekannt [wird die Pathogenität nur durch ein einzelnes Gen oder Genprodukt (z.B. Toxin) oder durch das Zusammenspiel mehrerer Gene verursacht]?
3. Wird die Nukleinsäure unmittelbar aus dem Spender entnommen oder liegt sie bereits in einem Ausgangsorganismus vor? Gibt es für diesen Ausgangsorganismus bereits eine Stellungnahme der ZKBS. Wenn ja, welcher Risikogruppe ist er zugeordnet?
4. Aufstellung sämtlicher Empfängerorganismen mit Bestimmung der Risikogruppen nach § 5 Abs. 1 Satz 1 i.V.m. Anhang I Nr. 1 GenTSV
5. Aufstellung sämtlicher Vektoren mit Beschreibung und Karte. Zuordnung der Vektoren zu den Empfängern, da beide immer als ein System zu betrachten sind. Welche Vektor-Empfänger-Systeme entsprechen einer biologischen Sicherheitsmaßnahme nach § 6 Abs. 1, 4 und 5 i.V.m. Anhang II Teil A GenTSV?
6. Aufstellung sämtlicher entstehender gentechnisch veränderter Organismen und Bestimmung der Risikogruppen nach § 5 Abs. 1 Satz 2 i.V.m. Anhang I Nr. 2
  - Welche Eigenschaften besitzen die gentechnisch veränderten Organismen? Ist ein Pathogenitätsprinzip übertragen worden? Kann die übertragene Nukleinsäure exprimiert werden, könnte sie nach verbringen in eine menschliche Zelle exprimiert werden?
7. Ermittlung der Sicherheitsstufe der gentechnischen Arbeiten. **Produktionsbereich:** nach § 7 Abs. 2, 4 und 5 GenTSV **Laborbereich:** nach § 7 Abs. 3, 4 und 5 GenTSV

Die allgemeinen Kriterien für die Sicherheitsbewertung von gentechnischen Arbeiten sind in Anhang I GenTSV aufgeführt. In einer Art Fragenkatalog zu Spender-, Empfänger-, gentechnisch verändertem Organismus und Vektor werden die möglichen Auswirkungen der Arbeit auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt hinterfragt.

Im Folgenden sollen die Bewertungskriterien (kursiv) am Beispiel der TNF-Produktion unter Einsatz gentechnisch veränderter *E.coli* K12 erläutert werden, wobei die Fragen 1 a-x nur für den Empfänger-, nicht aber für den Spenderorganismus (Mensch) beantwortet werden:

### 1. Informationen über den (die) Spender- oder Empfängerorganismus(en) bzw. Ausgangsorganismus(en)

- a) *Name und Bezeichnung*: Escherichia coli K12 W3110
- b) *Grad der Verwandtschaft*: E. coli K12 Derivat, durch Mutation erhalten, Genotyp: F<sup>-</sup> Lambda<sup>-</sup>, IN(rrnD-rrnE)1, Stammbaum: Bacteriological Reviews 1972, 525-557.
- c) *Herkunft des (der) Organismus(en)*: American Type Culture Collection Nr. 27325
- d) *Information über reproduktive Zyklen (sexuell/asexuall) des Ausgangsorganismus oder gegebenenfalls des Empfängerorganismus*: Asexuelle Vermehrung
- e) *Angaben über frühere gentechnische Veränderungen*: E.coli K12 W3110 wurde durch klassische Mutationsverfahren (UV-Licht) erhalten, es wurden keine gentechnischen Veränderungen vorgenommen.
- f) *Stabilität des Empfängerorganismus in Bezug auf die einschlägigen genetischen Merkmale*: Der unter 1b beschriebene Genotyp wird stabil weitervererbt.
- g) *Pathogenität des Organismus für abwehrgesunde Menschen und Tiere*: J.Hacker. M.Orth, H.Tschäpe: "Das Problem der Pathogenität von Escherichia coli und seine Bedeutung für die rekombinante DNA- Technologie".
- h) *kleinste infektiöse Dosis*: -
- i) *Toxizität für die Umwelt sowie Toxizität und Allergenität für Menschen*: -
- j) *Widerstandsfähigkeit des Organismus: Überleben des Organismus bzw. Erhaltung der Vermehrungs- und Infektionsfähigkeit von Mikroorganismen unter relevanten Bedingungen*: -
- k) *Kolonisierungskapazität*: -
- l) *Wirtsbereich*: -
- m) *Art der Übertragung, z.B. durch*: -
- n) *Möglichkeit der Übertragung von Krankheitserregern durch den Organismus*: -
- o) *Verfügbarkeit von Therapeutika und/oder Impfstoffen und/oder anderen wirksamen Methoden zur Verhütung und Behandlung*: -
- u) *bedeutende Beteiligung an Umweltprozessen (wie Stickstofffixierung oder pH-Regelung)*: -
- v) *Vorliegen von geeigneten Bedingungen zur Besiedelung der sonstigen Umwelt durch den Organismus*: -
- w) *Wechselwirkung zu anderen und Auswirkungen auf andere Organismen in der Umwelt (einschließlich voraussichtlich konkurrierender oder symbiotischer Eigenschaften)*: -
- x) *Fähigkeit, Überlebensstrukturen zu bilden (wie Samen, Sporen oder Sklerotien) und deren Ausbreitungsmöglichkeiten*. : -

## 2. Informationen über den gentechnisch veränderten Organismus

### 2.1 Beschreibung der gentechnischen Veränderung

- a) *Beschreibung der Veränderung einschließlich des Verfahrens zur Einführung des Vektors/Inserts in den Empfängerorganismus oder des Verfahrens, das zur Erzielung der betreffenden gentechnischen Veränderung angewandt wird:* In den Empfängerorganismus *E.coli* K12 W3110 wurde mittels Transformation (CaCl<sub>2</sub>-Technik) ein Plasmid eingebracht, das die genetische Information für die Expression von humanem Tumor Nekrose Faktor und für eine Tetrazyklin-Resistenz besitzt. Das Plasmid repliziert extrachromosomal in *E.coli* K12 W3110 mit einer Kopienzahl von bis zu 100 Kopien/Zelle.
- b) *Herkunft des genetischen Materials, ggf. Identität des Spenderorganismus/der Spenderorganismen und der Merkmale:* -
- c) *vorangegangene gentechnische Veränderungen des Inserts:* -
- d) *Funktion der betreffenden gentechnischen Veränderung und/oder der neuen Nukleinsäure:* Der kodierende Teil des humanen TNF-Gens wurde mit bakteriellen Expressionssignalen verknüpft und erlaubt so die Proteinsynthese des reifen humanen TNF (157 Aminosäuren) in *E.coli* K12 W3110. Die Tetrazyklin-Resistenz dient als Selektionsmarker für Plasmid enthaltende *E.coli* K12 W3110.
- e) *Art und Herkunft des Vektors:* Als Vektor wurde ein Derivat von pBR322 verwendet (Gene 2, 95-113, 1977), dessen Ampicillin-Resistenz deletiert wurde. In diesen Vektor wurde das humane TNF-Gen, verknüpft mit einem Bakteriophagen T4- Promotor und ribosomaler Bindungsstelle und einem trpA- Transkriptionsterminator, eingebaut. Das Plasmid ist 3269 Basenpaare lang, seine DNS-Primärstruktur ist bekannt.
- f) *Struktur und Menge eines Vektors und/oder einer Nukleinsäure des Spenderorganismus, die noch in der Endstruktur des veränderten Organismus verblieben ist:* Der gentechnisch veränderte Organismus enthält bis zu 100 Kopien des humanen TNF-Gens als Plasmid (extrachromosomal). Als Spenderorganismus diente die menschliche Monozyten-Zelllinie U937 (Int.J.Cancer 17, 565- 577, 1976). Der Empfängerorganismus enthält ausschließlich die für TNF kodierende DNS aus der menschlichen Zelllinie; andere kodierende oder nicht kodierende DNS aus menschlichen Zellen ist nicht vorhanden.
- g) *Stabilität des Organismus in Bezug auf die gentechnisch veränderten Merkmale:* Die genetische Information für humanen TNF ist mit der Information für die Tetrazyklin-Resistenz physisch verknüpft. Deshalb wird durch Züchtung des Produktionsorganismus in Tetrazyklin enthaltendem Nährmedium die genetische Information für beide Merkmale beibehalten und stabil weitervererbt.
- h) *Häufigkeit der Mobilisierung des eingeführten Vektors und/oder Fähigkeit zur Übertragung genetischer Information:* Der verwendete Vektor wurde in seiner Mobilisierbarkeit stark eingeschränkt durch Deletion der Genorte mob und tra. Er besitzt lediglich die nic/bom Region. Die Häufigkeit der Mobilisierung eines pBR322 ist Literatur bekannt und beträgt 10<sup>-12</sup>.
- i) *Höhe der Expression des gentechnisch eingeführten Materials; Messverfahren und Empfindlichkeitsgrad:* Der zur Produktion verwendete *E.coli* K12 W3110/pT4TNFST8rop produziert humanen TNF konstitutiv, d.h. während der gesamten Wachstumsdauer, und biologisch aktiv. Nachweisverfahren für den exprimierten TNF sind:
  - SDS-Gelelektrophorese der rekombinanten *E.coli* K12 W3110 (Empfindlichkeit: 100ng TNF).
  - MonoS-FPLC der aufgeschlossenen *E.coli* (Empfindlichkeit: 10 µg TNF).
  - Zytotoxizität des gereinigten TNF auf Maus-Fibroblasten-Zellen; siehe 2h (Empfindlichkeit: 100pg).
- j) *Ort des eingefügten genetischen Materials (Möglichkeit einer Aktivierung/Deaktivierung von Wirtsgenen durch die Einfügung):* -
- k) *Aktivität des zur Expression gebrachten Proteins:* Der humane TNF wird von *E.coli* K12 W3110 in biologisch aktiver Form synthetisiert; die spezifische Aktivität beträgt 8 x 10<sup>6</sup> units/mg bezogen auf den L929-Test (PNAS USA, 72, 3666-3670, 1975).

## 2.2. Gesundheitliche Erwägungen

- a) *toxische oder allergene Auswirkungen der nicht lebensfähigen Organismen und/oder ihrer Stoffwechselprodukte*: TNF ist oral nicht toxisch. Es wirkt nicht sensibilisierend auf die Haut des Meerschweinchens. Es zeigt keine primäre Hautreizung (Kaninchen, OECD.Test,404). Auch nach Inhalation ist TNF kein hochwirksames Toxin entsprechend der Definition nach § 3 Nr.5 GenTSV
- b) *Produkttrisiken*: -
- c) *Vergleich der Pathogenität des gentechnisch veränderten Organismus mit der des Spender- oder Empfängerorganismus oder ggf. Ausgangsorganismus*: Durch den Besitz des TNF-Gens kann ein *E.coli* nicht pathogen werden.
- d) *Kolonisierungskapazität*: Keine Kolonisierungskapazität des Darms für den gesunden Erwachsenen durch *E.coli* K12.
- e) *bei Pathogenität des Organismus für Menschen, die abwehrgesund sind*: Keine bekannte Pathogenität.

## 2.3. Umwelterwägungen

- a) *Faktoren, die das Überleben, die Vermehrung und die Verbreitung der gentechnisch veränderten Organismen in der Umwelt beeinflussen*: Für *E.coli* K12 wurde die rasche Titer-Reduktion in der belebten Umwelt gezeigt. Die Überlebensfähigkeit im Darm von Säugetieren dürfte bei gleichzeitiger Tetracyclin-Therapie zwar kurzfristig gefördert werden, eine dauerhafte Kolonisierung ist aber nicht zu erwarten.
- b) *verfügbare Techniken zur Erfassung, Identifizierung und Überwachung der gentechnisch veränderten Organismen*: Ein Nachweis ist vorhanden.
- c) *verfügbare Techniken zur Erfassung der Übertragung des gentechnisch eingeführten Materials auf andere Organismen*: Die notwendige Gensonde ist vorhanden.
- d) *bekannte und vorhergesagte Habitate des gentechnisch veränderten Organismus*: Keine spezifisch anderen Habitate als die des *E.coli* K12 W3110.
- e) *Beschreibung der Ökosysteme, auf die der Organismus zufällig verbreitet werden könnte*: Gartenerde, Flusswasser, Klärschlamm, Abfall, Kacheln, Glasoberflächen.
- f) *erwarteter Mechanismus und Ergebnis der Wechselwirkung zwischen dem gentechnisch veränderten Organismus und den Organismen oder Mikroorganismen, die im Fall einer Freisetzung in die Umwelt belastet werden könnten*: Aufgrund des verwendeten Plasmids werden spezifische Wechselwirkungen nicht erwartet.
- g) *bekannte oder vorhergesagte Auswirkungen auf Pflanzen und Tiere, wie Krankheiten hervorrufende Eigenschaften, Infektion, Toxigenität, Virulenz, Überträger der Krankheiten hervorrufenden Eigenschaften, Allergenität, veränderte Muster der Antibiotikaresistenz, veränderter Tropismus, Kolonisierung*: Negative Auswirkungen auf Pflanzen und Tiere können nicht vorhergesagt werden und sind nicht bekannt. Kein Unterschied zum Empfängerorganismus.
- h) *bekannte oder vorhergesagte Beteiligung an biogeochemischen Prozessen*: Vom Empfängerorganismus liegen keine bekannten negativen Auswirkungen vor. Vom TNF ist ein solcher Beitrag nicht zu erwarten.
- i) *Verfügbarkeit von Methoden zur Dekontamination des Gebietes im Falle eines Austretens von Organismen in die Umwelt*: Desinfektionsmethoden sind vorhanden. Im Umweltbereich ist eine Desinfektion wegen der beschriebenen raschen Titerreduktion nach dem Stand der Wissenschaft nicht erforderlich.

### 3. Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Produktionsbereich

Der Produktionsbereich ist dadurch gekennzeichnet, dass in ihm gentechnisch veränderte Organismen vermehrt oder mit ihrer Hilfe Substanzen gewonnen werden, wobei der Umgang mit diesen Organismen in weitgehend geschlossenen Apparaturen stattfindet. Die Sicherheitseinstufung dieser Arbeiten hat nach § 7 Abs. 2 GenTSV zu erfolgen.

In der vom Bundesministerium für Gesundheit veröffentlichten [Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten](#) werden z.Z. noch die Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten zu gewerblichen Zwecken aufgeführt. Diese Auflistung kann für Arbeiten im Produktionsbereich herangezogen werden. Die Organismen werden hierbei in vier Risikogruppen eingeteilt. Die Einstufung der Mikroorganismen in die Risikogruppen 2-4 ist dabei vollkommen übereinstimmend mit denen für Arbeiten im Laborbereich (z.Z. noch "gentechnische Arbeiten zu Forschungszwecken" genannt). Bei der Risikogruppe 1 sind die Anforderungen für die Einstufung im Produktionsbereich jedoch höher (siehe unten). So erklärt sich die Tatsache, dass viele Organismen, die im Laborbereich in die Risikogruppe 1 eingestuft werden, im Produktionsbereich der Risikogruppe 2 zuzuordnen sind. Es sind alle Kriterien des § 7 Abs. 2 Nr. 1 zu berücksichtigen, da es sich nicht um eine vorläufige, wie bei den Arbeiten im Laborbereich, sondern um eine endgültige Bewertung handelt.

#### 3.1 Sicherheitsstufe 1

Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Produktionsbereich sind gemäß § 7 Abs. 2 Nr. 1 GenTSV der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

*a) Die Empfängerorganismen sind*

*aa) Organismen der Risikogruppe 1 nach § 5 Abs. 1 Satz 1 mit experimentell erwiesener oder langer sicherer Verwendung oder mit eingebauten biologischen Sicherheitsmaßnahmen, die ohne Beeinträchtigung der Verwendungsfähigkeit die Überlebens- und Replikationsfähigkeit in der Umwelt begrenzen,*

*bb) eukaryote Zellen, die nicht spontan zu Organismen regenerieren*

*und geben keine Organismen der Risikogruppen 2 - 4 ab,*

*b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren*

*aa) sind gut beschrieben und frei von Nukleinsäuresequenzen mit bekanntem Gefährdungspotenzial,*

*bb) sind in der Größe soweit wie möglich auf die genetischen Sequenzen begrenzt, die zur Erreichung des beabsichtigten Zwecks notwendig sind,*

*cc) erhöhen die Stabilität des Organismus in der Umwelt nicht, soweit dies nicht für die beabsichtigte Funktion erforderlich ist,*

*dd) sind wenig mobilisierbar,*

*ee) übertragen keine Resistenzgene auf andere Mikroorganismen, die diese nicht von Natur aus aufnehmen, wenn eine solche Aufnahme die Anwendung von Heilmitteln zur Kontrolle von Infektionskrankheiten des Menschen oder von Nutztieren in Frage stellen könnte,*

*c) der gentechnisch veränderte Organismus*

*aa) ist unter den gewählten Verwendungsbedingungen (z.B. im Reaktor oder Fermenter) genauso sicher wie der Empfängerorganismus, aber mit begrenzter Überlebens- oder Replikationsfähigkeit und ohne nachteilige Folgewirkungen für die Umwelt,*

*bb) überschreitet nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 und*

*cc) gibt keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen ab; nach dem Stand der Wissenschaft ist nicht zu erwarten, dass der gentechnisch veränderte Organismus Krankheiten bei Menschen, Tieren oder Pflanzen hervorruft;*

Die Voraussetzungen für die Einstufung gentechnischer Arbeiten im Produktionsbereich in die Sicherheitsstufe 1 werden sowohl von den Organismen, die in der vom Bundesministerium für Gesundheit veröffentlichten Liste in die Risikogruppe 1 eingestuft wurden, als auch von den als biologische Sicherheitsmaßnahme anerkannten Organismen erfüllt.

## **3.2 Sicherheitsstufe 2**

Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Produktionsbereich sind der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen, wenn der gentechnisch veränderte Organismus nach § 5 Abs. 1 Satz 2 i.V. mit Anhang I Nr. 2 bis 4 GenTSV für die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 GenTG insgesamt ein geringes Risiko darstellt.

Die Anforderungen an die Empfängerorganismen, an die zu übertragenden Nukleinsäuren sowie an die Vektoren für gentechnische Arbeiten zu gewerblichen Zwecken unterscheiden sich in der Sicherheitsstufe 2 nicht von denen an die Organismen und Vektoren für Arbeiten zu Forschungszwecken. Dies wird in § 7 Abs. 2 Nr. 2 Satz 2 ausdrücklich festgelegt und spiegelt sich auch in der Übereinstimmung in den vom Bundesministerium für Gesundheit veröffentlichten Listen wieder. Dort wird lediglich in der Sicherheitsstufe 1 eine eigene gewerbliche Liste aufgeführt, in den Sicherheitsstufen 2 bis 4 gibt es gemeinsame Listen für Gewerbe und Forschung. Die Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeiten im Produktionsbereich erfolgt entsprechend den Arbeiten im Laborbereich, wobei jedoch nicht nur eine vorläufige Bewertung erforderlich ist. Zu den gewerblichen Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 kommen jedoch noch solche Arbeiten hinzu, die im Laborbereich in die Sicherheitsstufe 1 eingestuft werden, die aber die strengeren Anforderungen an die Sicherheitsstufe 1 im gewerblichen Bereich nicht erfüllen.



### **3.3 Sicherheitsstufe 3**

Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Produktionsbereich sind der Sicherheitsstufe 3 zuzuordnen, wenn der gentechnisch veränderte Organismus nach § 5 Abs. 1 Satz 2 i.V. mit Anhang I Nr. 2 bis 4 GenTSV für die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 GenTG insgesamt ein mäßiges Risiko darstellt. Auch in der Sicherheitsstufe 3 erfolgt die Zuordnung zu der Sicherheitsstufe gem. § 7 Abs. 2 Nr. 2 Satz 2 entsprechend den gentechnischen Arbeiten zu Forschungszwecken, wobei jedoch nicht nur eine vorläufige Bewertung erforderlich ist.

### **3.4 Sicherheitsstufe 4**

Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen zu gewerblichen Zwecken sind der Sicherheitsstufe 4 zuzuordnen, wenn der gentechnisch veränderte Organismus nach § 5 Abs. 1 Satz 2 i.V. mit Anhang I Nr. 2 bis 4 GenTSV für die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 GenTG insgesamt ein hohes Risiko darstellt. Auch hier wäre eine Sicherheitseinstufung entsprechend den gentechnischen Arbeiten zu Forschungszwecken möglich. Es wird jedoch in der amtlichen Begründung zur Gentechnik-Sicherheitsverordnung i.d.F. vom 24.10.1990 darauf hingewiesen, dass nach derzeitigem Kenntnisstand davon ausgegangen werden kann, dass eine gewerbliche Produktion in der Sicherheitsstufe 4 nicht in Betracht kommt. Insofern wären alle Überlegungen zur Sicherheitseinstufung solcher Arbeiten rein hypothetischer Natur.

## **4. Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Laborbereich**

Der Laborbereich ist dadurch gekennzeichnet, dass in ihm in der Regel gentechnisch veränderte Organismen hergestellt werden und mit ihnen weitgehend in labortypischen Geräten umgegangen wird.

Im Folgenden werden die Grundsätze der Einstufung gentechnischer Arbeiten in die 4 Sicherheitsstufen dargelegt. Zunächst werden die im § 7 Abs. 3 genannten formalen Kriterien für die Einstufung gentechnischer Arbeiten in die einzelnen Sicherheitsstufen (**Wortlaut der GenTSV kursiv**) aufgeführt und anschließend, wo erforderlich, für jeden einzelnen Buchstaben erläutert. Die angegebenen Beispiele stammen aus Gutachten der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS). Weitere Beispiele können dem Merkblatt B008 der BG-Chemie [6] entnommen werden.

### **4.1 Sicherheitsstufe 1**

Nach § 7 Abs. 3 Nr. 1 GenTSV sind gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Laborbereich der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

a) Die Empfängerorganismen sind

aa) Organismen der Risikogruppe 1 nach § 5 Abs. 1 Satz 1,

bb) Stämme von Organismenarten der Risikogruppen 2 bis 4, die experimentell erwiesen oder auf Grund langer Erfahrung genauso sicher wie Organismen der Risikogruppe 1 sind und daher entsprechend verwendet werden können,

cc) eukaryote Zellen, die nicht spontan zu Organismen regenerieren,

und geben keine Organismen der Risikogruppen 2 bis 4 ab,

b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgibt,

c) der gentechnisch veränderte Organismus ist bei Verwendung im Reaktor oder Fermenter genauso sicher wie der Empfängerorganismus, aber mit begrenzter Überlebens- oder Replikationsfähigkeit und ohne nachteilige Folgewirkung für die Umwelt;

**a) Die Empfängerorganismen sind**

**- aa) Organismen der Risikogruppe 1 nach § 5 Abs. 1 Satz 1, und geben keine Organismen der Risikogruppen 2 bis 4 ab**

Das Gefährdungspotenzial des gentechnisch veränderten Organismus wird im wesentlichen von den Eigenschaften des Empfängerorganismus und des Spenderorganismus bzw. der übertragenen Nukleinsäure bestimmt. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Empfängerorganismus zu, da dessen Risikopotenzial gem. § 5 Abs. 4 GenTSV normalerweise vollständig in die Abschätzung des Gefährdungspotenzials und damit in die Einstufung in eine Risikogruppe einfließt (Ausnahmen können z.B. die sogenannten "Sternchen-organismen" sein). Der einfachste Fall einer Arbeit der Sicherheitsstufe 1 stellt sich somit wie folgt dar: Empfänger und Spender gehören der Risikogruppe 1 an, der Vektor erfüllt die Bedingungen des § 6 Abs. 5 GenTSV, der gentechnisch veränderte Organismus übersteigt nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 und gibt keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen ab.

**Beispiel:** Thema: Für Ausbildungszwecke soll eine vorhandene, klonierte *Bacillus subtilis* DNA-Sequenz fragmentiert und in *E. coli* K12 kloniert werden.

Spender	<i>Bacillus subtilis</i> (DSM10) ein 40 kb-DNA-Fragment, kloniert in dem cosmid pcos RW 2, liegt vor	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	<i>E. coli</i> K12 (HB101)	<b>Risikogruppe 1</b>

Vektor	pBC (pBluescript-Derivat)	
GVO	<i>E. coli</i> K12 einschließlich des Vektors pBC mit subgenomischen DNA-Fragmenten aus <i>B. subtilis</i> <u>Begründung:</u> subgenomische DNA-Fragmente von <i>B. subtilis</i> ohne pathogenes Potenzial sollen in <i>E. coli</i> K12 kloniert werden. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß Anhang II, Teil A GenTSV	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeit	Spender und Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 1. Der Empfänger ist gemeinsam mit dem verwendeten Vektor als biologische Sicherheitsmaßnahme anerkannt. Es liegen die Voraussetzungen gemäß § 6 Abs. 4 und 5 GenTSV vor. Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung gemäß § 5 Abs. 2 Satz 2 GenTSV nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1.	<b>Sicherheitsstufe 1</b>

**- bb) Stämme von Organismenarten der Risikogruppe 2 bis 4, die experimentell erwiesen oder aufgrund langer Erfahrung genau so sicher wie Organismen der Risikogruppe 1 sind und daher entsprechend verwendet werden können, und keine Organismen der Risikogruppen 2 bis 4 abgeben**

Eine große Zahl von Organismen sind in entsprechenden Auflistungen (z.B. [Organismenliste "Risikobewertete Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten"](#) des Bundesministeriums für Gesundheit oder Merkblätter "Sichere Biotechnologie" der BG Chemie [2, 3, 4, 5, 7]) in Risikogruppen klassifiziert. Innerhalb der in diesen Listen aufgeführten Arten kann es jedoch Stämme unterschiedlichen Risikopotenzials geben. Dieses ist abhängig von den Virulenzfaktoren und den umweltrelevanten Eigenschaften. So sind z.B. spezifische bakterielle Pathogenitätsfaktoren Adhäsine, Invasine, Toxine (Endotoxine, Enterotoxine), Oberflächenstrukturen (wie z.B. O-Antigene oder Kapseln), ein Aufnahmesystem für Eisen und Serum-Resistenzigenschaften. Zumeist sind mehrere dieser Faktoren für die Pathogenität eines Stammes notwendig. Am für die Gentechnik klassischen Modellorganismus, den fakultativ pathogenen *E. coli*-Bakterien wurde dies am besten untersucht [8]. Aufgrund dieser genauen Kenntnis sind in der Liste "Risikobewertete Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten" einige *E. coli* Stämme (enteroinvasive, enteropathogene, enterohämorrhagische, enterotoxische und uropathogene) in die **Risikogruppe 2**, einige jedoch auch in die **Risikogruppe 1** eingestuft. Hier muss vor der Verwendung geprüft werden, ob der Stamm, der benutzt werden soll, Pathogenitätsfaktoren trägt oder nicht (siehe auch Stellungnahme der ZKBS zur [Bewertung des "E. coli TOPP™-Protein-Expressionssystems"](#) und "[zur Einstufung von Escherichia coli C als Spender- und Empfängerorganismus bei gentechnischen Arbeiten zu Forschungszwecken](#)"). Auch von anderen, ansonsten pathogenen Arten können einzelne Stämme der Risikogruppe 1 zugeordnet werden, ohne dass diese in den Listen explizit erwähnt werden. Selbst bei Stämmen von obligat pathogenen Organismen kann dies der Fall sein. Als Beispiel sei der auxotrophe LT2-Stamm von *Salmonella typhimurium* mit der *galE*-Mutation genannt, wie er für den Ames-Test verwendet wird. Hier gibt es mittlerweile auch gentechnisch weiterentwickelte Isolate (z.B. TA 98, TA 100, TA 102), die darüber hinaus ein mutiertes Histidin/Biotin-operon tragen und eine beschädigte Membran besitzen. In der Stellungnahme der ZKBS zur [Einstufung von S. typhimurium LT2-Stämmen](#) werden *S. typhimurium* LT2-Stämme grundsätzlich der **Risikogruppe 2** zugeordnet, alle Stämme mit stabilen Mutationen in den Genen *aroA*-, *galE*-, *cya* und *crp* jedoch der **Risikogruppe 1**. In weiteren Stellungnahmen der ZKBS zur Einstufung von zwei [S. typhimurium-Impfstämmen für Hühner \(Impfstoffe Zoosalaral H bzw. TAD Salmonella vac T\)](#) als Empfängerorganismen und zur Einstufung der [S. typhimurium Stämme MvP101 und MvP103 \(HH104\) mit Mutationen in den Genen sseD bzw. sseC](#) wurden weitere Abstufungen in die **Risikogruppe 1** vorgenommen. In

Stellungnahmen der ZKBS [zur Einstufung von Listeria monocytogenes-Stämmen](#) wurden die Stämme von L. monocytogenes mit Deletionen in den Genen prfA, hly, actA oder actA und plcB in die Risikogruppe 1 eingestuft und [zur Einstufung des Streptococcus pneumoniae Stammes R6](#) wurde dieser als Empfängerorganismus (nicht jedoch als Spender) in die Risikogruppe 1 herabgestuft.

Bei Einsatz eines solchen apathogenen Stammes einer pathogenen Art als Empfängerorganismus kann die Arbeit, falls sich an den anderen Parametern nichts ändert, in die **Sicherheitsstufe 1** klassifiziert werden.

### **- cc) eukaryote Zellen, die nicht spontan zu Organismen regenerieren, und keine Organismen der Risikogruppen 2 bis 4 abgeben**

Die hier getroffene Aussage wurde in Anhang I Teil B Satz 11-14 der Gentechnik-Sicherheitsverordnung i.d.F. vom 24.10.1990 noch näher ausgeführt. Höhere Tiere und Pflanzen als Spender- und Empfängerorganismen werden in die Risikogruppe 1 eingestuft, wenn keine schädlichen Auswirkungen auf die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 GenTG zu erwarten sind. Zellen und Zelllinien als Spender- und Empfängerorganismen werden in Risikogruppe 1 eingestuft, wenn sie keine Organismen einer höheren Risikogruppe abgeben. Enthalten sie Organismen höherer Risikogruppen, werden sie in die Risikogruppe dieser Organismen eingestuft. Sind die Tiere und Pflanzen bzw. Zellen und Zelllinien gentechnisch verändert, werden sie der der gentechnischen Veränderung entsprechenden Risikogruppe zugeordnet.

Beim Einsatz von permanenten Zelllinien als Spender- oder Empfängerorganismus ist die Einstufung der gentechnischen Arbeit aufgrund des vorangehenden Abschnittes relativ einfach. Die etablierten Zelllinien (z.B. CHO, Hela, Balb-3T3 oder SF9) sind zumeist in die Risikogruppe 1 eingestuft. Ist die Zelllinie jedoch in der Lage infektiöse Viruspartikel, z.B. des zur Immortalisierung herangezogenen Virus zu produzieren (NC-37 kann Epstein-Barr-Virus freisetzen und ist in Risikogruppe 2 einzustufen) oder enthält die Zelllinie auf Grund ihrer Herkunft mehrere Kopien des vollständigen Genoms eines pathogenen Virus (z.B. die Zelllinie CaSki, [siehe hierzu Stellungnahme der ZKBS](#)), muss sie entsprechend des Gefährdungspotenzials dieses Virus eingestuft werden. Nähere Informationen zur Einstufung etablierter Zelllinien sind im Merkblatt B004 der BG-Chemie zu finden [2; Kapitel 2.5 und 2.6].

Bei der Verwendung primärer Zellen aus Körperflüssigkeiten oder Körpergeweben vielzelliger Organismen ist die Risikobewertung schwieriger. Gerade beim Einsatz gentechnischer Methoden in der Humanmedizin ist die Verwendung von menschlichem Material unumgänglich. Es wird dabei selbstverständlich auch und gerade Biopsiematerial von Patienten zur direkten Extraktion der cDNA herangezogen oder es werden körpereigene Zellen von Patienten transfiziert. Bei diesem Ausgangsmaterial ist die Frage nach einer Kontamination durch Organismen einer höheren Risikogruppe besonders evident, zumal davon auszugehen ist, dass höhere Tiere (einschließlich Mensch) regelmäßig mit Mikroorganismen und Viren infiziert sind. Aufgrund der Bedeutung dieser Problematik hat die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit sich in einer grundsätzlichen Stellungnahme zur [Risikobewertung von primären Zellen aus Vertebraten](#) geäußert und dabei die Voraussetzung für eine Einstufung primärer humaner Zellen und Zellkulturen in die Risikogruppe 1 festgelegt. Bei humanen Zellen aus klinisch unauffälligen Patienten oder Spendern ist der Nachweis der Seronegativität des Spenders für HIV, HBV und HCV ausreichend. Es kann jedoch auch ein anderes Verfahren zum Nachweis der Virusfreiheit herangezogen werden. Bei begründetem Verdacht auf das Vorhandensein eines bestimmten Virus, ist das primäre Gewebe zusätzlich auf Abwesenheit dieses Virus zu prüfen. Im Falle einer bekannten, klinisch apparenten viralen Infektion des Patienten oder Spenders mit der Möglichkeit einer Abgabe viraler Erreger, muss das Material entsprechend der Risikogruppe des Virus zugeordnet werden. Sind weder Patient noch entnommene Zellen auf die Abwesenheit der oben genannten Viren geprüft, ist das Material unter Einhaltung von Maßnahmen der Sicherheitsstufe 2 zu

verwenden. Entsprechende Einstufungen werden in der Stellungnahme auch für nichthumane Primatenzellen und Vertebratenzellen außer Primaten vorgenommen.

Werden Zellen und Zelllinien als Empfängerorganismen eingesetzt, so fließt ihre Risikogruppe ganz in die Risikobewertung der gentechnischen Arbeit ein. Sollen solche Zellen, insbesondere primäre humane Zellen als Spender von cDNA in den Experimenten genutzt werden, muss die Risikobewertung der gentechnischen Arbeit nicht identisch mit der Risikogruppe des Spenders sein.

Dies soll am folgenden Beispiel erläutert werden, bei dem aufgrund der angewandten Methodik ein Risiko auszuschließen ist:

**Beispiel:** Thema: Charakterisierung des T-Zellrezeptors in HCV-infizierten Patienten

Spender	Menschliches Material mit HCV-Infektion (T-Lymphozyten aus Blut mit HCV kontaminiert)	<b>Risikogruppe 3</b>
Empfänger	<i>E. coli</i> K12	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	PCR 1000 (pBR 322-Derivat)	
GVO	<i>E. coli</i> K12 mit T-Zellrezeptorsequenzen	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeit		<b>Sicherheitsstufe 1</b>

Begründung für die Eingruppierung des GVO und die Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeit: Mit Hilfe spezifischer PCR-Primer werden aus genomischer DNA rearrangierte T-Zellrezeptorsegmente isoliert und sequenziert. Der Spenderorganismus ist zwar der Risikogruppe 3 zugeordnet, bei der benutzten Methodik (genomische DNA, spezifische Primer) kann aber ausgeschlossen werden, dass das HCV-Virus (RNA-Virus ohne reverse Transkriptase und somit ohne DNA-Zwischenstufen) in infektiöser Form aus dem gentechnisch veränderten Organismus entsteht.

Dieses Beispiel, bei dem die angewandte Methode eine Einstufung in die Sicherheitsstufe 1 erlaubt, obwohl der Spenderorganismus in die Risikogruppe 3 eingestuft war, führt zum nächsten Spiegelstrich über:

**zu: b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgibt**

Sind die Spenderorganismen in die Risikogruppen 2 - 4 eingestuft und soll nicht das komplette Genom übertragen werden (z.B. in eine Genbank), so kann die gentechnische Arbeit in die Sicherheitsstufe 1 eingestuft werden, unter der Voraussetzung, dass keine Pathogenitätsfaktoren übertragen werden. Hierbei ist klar, dass es sich um nicht pathogene Teile eines Genoms handelt. Werden lediglich Punktmutationen durchgeführt, zum Beispiel um das humanpathogene oder das toxische Potenzial auszuschalten, so ist dieses nicht ausreichend um die Voraussetzung nach Nr. 1b zu erfüllen.

**Beispiel:** Thema: Untersuchungen zur Stabilität und zum Abbau von mRNA der Antibiotika- Resistenz-Plasmide von *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*

Spender	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>Risikogruppe 2</b>
Ausgangsorganismus	<i>E. coli</i> K12, der die Plasmide pUB 112 mit dem Gen für Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) und pUB 110 mit dem Gen für Kanamycin-Resistenz aus <i>Staphylococcus aureus</i> trägt	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	<i>Bacillus subtilis</i> BD 168	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	pRB 273	
GVO	a) Chloramphenicol acetyltransferase tragendes <i>B. subtilis</i>	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) Kanamycin-Resistenz tragendes <i>B. subtilis</i>	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeit	Die übertragenen subgenomischen Nukleinsäurefragmente sind charakterisiert und ohne Gefährdungspotenzial. Die Risikobewertung kann somit nach § 5 Abs. 3 Satz 2 GenTSV durchgeführt werden. Zusätzlich entspricht das Vektor-Empfänger-System einer biologischen Sicherheitsmaßnahme	<b>Sicherheitsstufe 1</b>

Hinweis: Soll von dem genannten Spenderorganismus *S. aureus* hingegen eine Genbank mit unbekanntem subgenomischen DNA-Fragmenten erstellt werden, wäre diese gentechnische Arbeit in die **Sicherheitsstufe 2** einzustufen. In diesem Fall muss das Gefährdungspotenzial des Spenders nach § 5 Abs. 3 Satz 1 GenTSV vollständig in die Risikobewertung einfließen.

Die Frage der Sicherheitseinstufung subgenomischer Fragmente von Viren, die sich in der Zielzelle replizieren können, wurde zunächst kontrovers gesehen. Solche „Replikons“ wurden bei einigen Viren in die Risikogruppe 1, bei anderen (z.B. HCV) jedoch in die Risikogruppe 2 eingestuft. In einer Empfehlung zur Einstufung flaviviraler Replikons (z.B. HCV, West-Nil Virus, Denguevirus) wurde von der ZKBS eine Vereinheitlichung der Einstufung vorgenommen. Die Arbeiten mit subgenomischen flaviviralen Replikons (mit **Ausnahme** eines subgenomischen **DENV-Replikons** mit den Strukturgenen prM und/oder E, die vermutlich verantwortlich für die Kreuzreaktion der DENV-spezifischen Antikörper sind, welches der **Risikogruppe 2** zugeordnet wird) in Zelllinien werden der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet. Voraussetzung ist, dass nicht die komplette virale genetische Information auf eukaryote Zellen übertragen wird und die Bildung und Abgabe viraler Partikel ausgeschlossen werden kann. Nach allen bisherigen Erkenntnissen geht von diesen viralen subgenomischen Replikons keine Pathogenität aus.

Ist das Pathogenitätsprinzip des Spenders sehr komplex und kann nicht übertragen werden, da die pathogene Wirkung vom gesamten Organismus ausgeht, wie dies z.B. bei eukaryoten Parasiten der Fall ist, können gentechnische Arbeiten ebenfalls in die Sicherheitsstufe 1 klassifiziert werden.

**Beispiel:** Thema: Herstellung einer Genbank von *Onchocerca volvulus* in *E. coli* zur molekularbiologischen Charakterisierung von Antigenen

Spender	<i>Onchocerca volvulus</i> (Filaroidea)	<b>Risikogruppe 2</b>
Empfänger	<i>E. coli</i> K12	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	Lambdavektor	
GVO	<i>E. coli</i> K12 mit genomischen Fragmenten genomischer DNA von <i>O. volvulus</i>	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeit		<b>Sicherheitsstufe 1</b>

Begründung für die Eingruppierung des GVO und die Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeit: Es werden nicht charakterisierte Nukleinsäureabschnitte eines Spenders der Risikogruppe 2 in den Empfängerorganismus überführt. Die pathogene Wirkung des Protozoen *O. volvulus* geht jedoch vom gesamten adulten Organismus aus, und beruht auf Mechanismen, die höchstwahrscheinlich nicht auf Bakterien übertragbar sind. Darüber hinaus entspricht das Vektor-Empfänger-System einer biologischen Sicherheitsmaßnahme.

Hinweis: *O. volvulus* ist in der [Organismenliste "risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten"](#) nur bei Arbeiten mit Überträger/Zwischenwirt in die Risikogruppe 2 eingestuft. Die oben getätigte Aussage gilt jedoch auch für Parasiten, die in jedem Fall in die Risikogruppe 2 eingestuft werden, wie z.B. *Plasmodium falciparum*.

Eine Gruppe von Genen, bei deren Übertragung die Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeit zuweilen Schwierigkeiten bereitet, sind die Onkogene. Unter dem Eindruck von Veröffentlichungen, die von einer karzinogenen Wirkung dieser DNA auf der Haut im Tiermodell berichten, entstand eine Stellungnahme der ZKBS zu [Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit onkogenem Potenzial](#). In dieser ist neben den Maßnahmen zum Personenschutz und den arbeitsmedizinischen Vorsorgemaßnahmen auch eine Liste der entsprechenden Nukleinsäuren enthalten, es wird jedoch nicht auf die Sicherheitseinstufung eingegangen. Im Februar 1996 ergänzte die ZKBS diese Empfehlung um eine Risikobewertung des Umgangs mit gentechnisch veränderten Bakterien, Hefen oder Säugerzellen, in die solche Nukleinsäuren oder andere Nukleinsäuren eingeführt wurden, deren Expression zu einer Deregulation der Transkriptionsaktivität einer Säugerzelle führen ([Bewertung von GVO, in die Nukleinsäuren eingeführt wurden, welche für Proteine mit genregulatorischer Funktion kodieren](#)). Generell kann man sagen, dass alle Arbeiten mit Nukleinsäureabschnitten von Säugerzellen oder deren Viren, die in eine Biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß Anhang II GenTSV oder in primäre Zellen der Risikogruppe 1 eingeführt werden, in der **Sicherheitsstufe 1** durchgeführt werden können, selbst wenn diese für Proteine mit genregulatorischer Funktion kodieren. Es müssen jedoch die Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit onkogenem Potenzial eingehalten werden.

**Beispiel:** Thema: Erstellen einer Genbank aus einer humanen Zervix-Karzinomzelllinie und Klonierung des Gens E6 des humanen Papillomvirus

Spender	Humane Zervixkarzinomzelllinie (Hela), enthält Fragmente des HPV 18 Genoms ins Wirtsgenom integriert	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	<i>E. coli</i> K12	<b>Risikogruppe 1</b>

Vektor	pBR322-Derivat mit CMV-Promotor	
GVO	a) <i>E. coli</i> K12 mit nicht charakterisierten Nukleinsäurefragmenten der Hela-Zelllinie (shot-gun-Klonierung)	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) <i>E. coli</i> K12 mit charakterisiertem E6 Gen in Verbindung mit einem eukaryoten Promotor	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeiten	a) Spender und Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 1. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme. Bei der shot-gun-Klonierung ist es unwahrscheinlich exprimierbare HPV Gene zu erhalten. Wenn überhaupt liegen diese in geringer Kopienzahl vor. Eine Gefährdung der Beschäftigten kann weitgehend ausgeschlossen werden	<b>Sicherheitsstufe 1</b>
	b) Das übertragene Nukleinsäurefragment enthält das Gefährdungspotenzial von HPV. Das Gen ist nachweislich tumorinduzierend und steht unter der Kontrolle eines eukaryoten Promotors. Die Zielzellen der pathogenen Wirkung (Schleimhaut der Beschäftigten) können durch Aerosole erreicht werden. Das Vektor-Empfänger-System entspricht einer biologischen Sicherheitsmaßnahme. Die Wahrscheinlichkeit eines DNA-Transfers von GVO auf Körperzellen oder der Aufnahme freier DNA aus lysierten GVO durch Körperzellen ist unter in vivo Bedingungen gering	<b>Sicherheitsstufe 1</b>

**Achtung:** Diese Einstufung gilt nicht für virale Vektorsysteme der Sicherheitsstufe 1.

Alle Adeno-assoziierten Viren (auch die Serotypen 2, 3 und 5) mit Zellzyklus-regulierenden Genen werden in die Risikogruppe 2 eingestuft und es müssen besondere Sicherheitsmaßnahmen zum Personenschutz eingehalten werden (siehe hierzu die Allgemeine Stellungnahme der ZKBS „[Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Vektoren mit zellzyklus-regulierenden Genen](#)“)

Beim Sindbis-Virus- und dem Semliki Forest-Virus-Expressionssystem hält die ZKBS bei der Expression von Proteinen mit transformierendem Potenzial eine Einzelfallbewertung für erforderlich.

Das Gefährdungspotenzial des gentechnisch veränderten Organismus und der gentechnischen Arbeit wird im Wesentlichen von den Eigenschaften des Empfängerorganismus und der übertragenen Nukleinsäure bestimmt. Lediglich beim Einsatz von Vektoren mit eigenständiger Infektiosität (z.B. virale Vektoren) liegt ein Gefährdungspotenzial durch den Vektor vor. Es war und ist wissenschaftlich nicht begründet, bei Vorliegen eines Spenders, Empfängers und gentechnisch veränderten Organismus der Risikogruppe 1 die Arbeit z.B. nur aufgrund der Mobilisierbarkeit eines Plasmids in eine höhere Sicherheitsstufe einzustufen, zumal die Begriffe begrenzte Wirtsspezifität, geringe Cotransfer-Rate und geringe Mobilisierbarkeit des § 6 Abs. 5 GenTSV nicht genau definiert sind. Aus diesem Grund hatte die ZKBS auch im Falle der Bewertung von Vektoren eine grundsätzliche Stellungnahme abgegeben ([Stellungnahme der ZKBS zur Bewertung von Vektoren bei gentechnischen Arbeiten mit Mikroorganismen zu Forschungszwecken](#)). In ihr wurde klar ausgedrückt, dass der Vektor im Kontext mit dem Empfänger als Vektor-Empfänger-System zu berücksichtigen ist. Dabei konnte der Organismus durchaus Plasmide enthalten, die mobilisierbar sind und/oder einen weiten Wirtsbereich für ihre Replikationsfähigkeit haben, ohne dass dies eine Erhöhung des Gefährdungspotenzials bedeuten musste. Hier seien insbesondere die shuttle-Vektoren aus der Zellkultur erwähnt, die sowohl Replikon und Selektionsmarker für *E. coli* als auch eukaryote Transkriptionssignale und zuweilen ein eukaryotes Replikon tragen.



## Virale Vektoren, die in der Sicherheitsstufe 1 gehandhabt werden können:

Die **retroviralen Vektoren** sind die am häufigsten genutzte virale Vektorgruppe. Sie sind von besonderem Interesse beim Einsatz in der somatischen Gentherapie und deshalb, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der sicheren Anwendung, bestens untersucht und ständig weiterentwickelt. Die ZKBS hat bereits im Juni 1996 eine allgemeine Stellungnahme [zum Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren](#) verfasst. Für die Sicherheitseinstufung der Arbeiten mit retroviralen Vektoren muss man zwischen drei Systemen unterscheiden:

1. Verpackungszelllinien, bei denen aufgrund von Rekombinationsereignissen murine ecotrope (replikationskompetente oder replikationsdefekte) Retroviren entstehen.
2. Verpackungszelllinien, bei denen aufgrund von Rekombinationsereignissen amphotrope replikationskompetente Retroviren, d.h. Viren, die in der Lage sind, sich in infizierten Zellen zu replizieren und weitere Zellen zu infizieren, entstehen.
3. Verpackungszelllinien, bei denen amphotrope replikationsdefekte Retroviren, d.h. Viren, die das rekombinante Genom bei einer einmaligen Infektion in die Wirtszelle einbringen, sich aber nicht replizieren können, entstehen.

Gerade bei den retroviralen Vektoren mit den entsprechenden Plasmiden (z.B. LXS<sub>N</sub> oder pMV-7), Verpackungszelllinien und Empfängerzellen wird besonders deutlich, dass das Vektor-Empfänger-System als Einheit zu betrachten ist. Das Plasmid entspricht zusammen mit *E. coli* einer biologischen Sicherheitsmaßnahme, nicht jedoch mit der Verpackungszelllinie. Die Verpackungszelllinie kann jedoch mit einem anderen Plasmid (ohne retrovirale LTRs) eine biologische Sicherheitsmaßnahme darstellen.

Unter den folgenden Voraussetzungen können **Arbeiten mit retroviralen Vektoren** in die **Sicherheitsstufe 1** klassifiziert werden:

- Es wird eine Verpackungszelllinie auf der Basis des MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) verwendet, die das Insert in ecotrope replikationskompetente oder replikationsdefekte Retroviren verpackt. Die Arbeiten mit diesen Retroviren und mit von ihnen infizierten Zellen der Risikogruppe 1, sofern diese keine Retroviren mit erweitertem Wirtsbereich abgeben, sind der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen.
- Arbeiten mit Zellen der Risikogruppe 1, die mit rekombinanten replikationsdefekten amphotropen Retroviren infiziert wurden, sind der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen, sofern die Zellen den Replikationsdefekt nicht komplementieren und keine Hüllproteine zur Verpackung der Vektor-RNA zur Verfügung stellen (Ausnahme: ecotrope Verpackungszelllinien).

**Achtung:** Der Umgang mit amphotropen (replikationskompetenten und replikationsdefekten) Retroviren einschließlich der Infektion von Zellen der Risikogruppe 1 ist der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

**Beispiel:** Thema: Etablierung von permanenten, neuronalen Zelllinien der Ratte und Immortalisierung menschlicher Stromazellen mit Hilfe retroviraler Vektoren, die die RNA von *t-neu* bzw. das SV40 T-Antigen übertragen

Spender	a) Ratte (neuraler Tumor) für <i>t-neu</i> Gen	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) Affenvirus SV40 für SV40 T-Antigen	<b>Risikogruppe 2</b>

Ausgangsorganismen	<p><i>E. coli</i> K12 einschließlich des Vektors LXS<sub>N</sub> (pBR-Derivat mit 5'- und 3'-LTR des MMLV und dem Neomycinresistenzgen) mit dem Gen für <i>t-neu</i> bzw. für SV40-T-Antigen</p> <p><u>Begründung:</u> Der Empfänger ist ein Organismus der Risikogruppe 1. Die Spender sind Organismen der Risikogruppe 1 bzw. 2. Es werden subgenomische Nukleinsäureabschnitte in den Empfängerorganismus eingeführt, die einen Teil des Gefährdungspotenzials der Spenderorganismen beinhalten. Da das Vektor-Empfänger-System einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gem. Anhang II A GenTSV entspricht, erfolgt eine Herabstufung.</p>	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	<p>a) Verpackungszelllinie psi2</p> <p>b) Verpackungszelllinie GP+AM12</p> <p>c) primäre Rattenzellen</p> <p>d) primäre menschliche Stromazellen, die nachweislich frei von HIV, HBV und HCV sind</p>	<p><b>Risikogruppe 1</b></p> <p><b>Risikogruppe 1</b></p> <p><b>Risikogruppe 1</b></p> <p><b>Risikogruppe 1</b></p>
GVO	<p>a) Verpackungszelllinie psi2 einschließlich des Vektors LXS<sub>N</sub> mit dem Gen für <i>t-neu</i></p> <p>b) ecotrope rekombinante Retroviren abgegeben von GVO a Die Verpackungszelllinie psi 2 ist eine Mauszelllinie mit ins Genom integrierter, defekter proviraler Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)-DNA, der die Signalsequenz zur Verpackung der viralen RNA fehlt. In diese Verpackungszelllinie werden rekombinante, retrovirale Plasmide (5'- und 3'-LTR des MMLV) eingeführt, welche das Neomycin-Resistenzgen und das <i>t-neu</i> Gen enthalten. Die retroviralen Plasmide enthalten neben den 5'- und 3'-LTRs von MMLV Verpackungssignal-Sequenzen, die ermöglichen, dass Transkripte der eingeführten Plasmide in MMLV-Partikel verpackt und von der Zelle als infektiöse, aber replikationsdefekte Viruspartikel abgegeben werden. Die so erzeugten Retroviren sind ecotrop, d.h. sie können nur Nagerzellen infizieren. Die Verpackungszelllinie gibt auch in geringen Mengen ecotrope Wildtyp-MMLV ab, die vermutlich durch Rekombinationsereignisse entstehen. Die verpackte Nukleinsäure enthält ein Onkogen für Nagetiere. Sie liegt in Form von RNA vor und können erst nach Umschreiben in DNA durch reverse Transkriptase ins Wirtsgenom integrieren. Eine solche Übertragung auf den Menschen durch Infektion oder Aerosol ist jedoch nicht zu erwarten.</p> <p>c) Verpackungszelllinie GP+AM12 einschließlich des Vektors LXS<sub>N</sub> mit dem Gen des SV40-T-Antigen</p> <p>d) amphotrope replikationsdefekte Retroviren abgegeben von GVO c Die Verpackungszelllinie GP+AM12 ist eine Mauszelllinie mit ins Genom integrierten</p>	<p><b>Risikogruppe 1</b></p> <p><b>Risikogruppe 1</b></p> <p><b>Risikogruppe 2</b></p> <p><b>Risikogruppe 2</b></p>

voneinander getrennten proviralen Genomabschnitten des MMLV mit den gag/pol Genen bzw. dem env-Gen. Die Signalsequenz zur Verpackung von viraler RNA und die 3'-LTRs fehlen. In diese Verpackungszelllinie werden rekombinante retrovirale Plasmide (5'- und 3'-LTRs von MMLV) eingeführt, welche das Neomycin-Resistenzgen und das Gen des SV40-T-Antigens enthalten. Es entstehen infektiöse, aber replikationsdefekte amphotrope Retroviren. Diese können menschliche Zellen infizieren.

e) primäre Nagerzellen einschließlich des rekombinanten retroviralen Vektors aus dem Überstand der psi2-Verpackungszelle

**Risikogruppe 1**

Der Empfängerorganismus ist ein Organismus der Risikogruppe 1. Die Rattenzellen werden mit ecotropen Retroviren der Risikogruppe 1 infiziert.

f) primäre menschliche Stromazellen einschließlich des rekombinanten retroviralen Vektors aus dem Überstand der GP+AM12-Verpackungs-Zelllinie Risikogruppe 1

**Risikogruppe 1**

Die getesteten menschlichen Stromazellen sind Organismen der Risikogruppe 1. Sie werden mit replikationsdefekten amphotropen Retroviren der Risikogruppe 2 infiziert. Nach Integration als Provirus in das Genom der Empfängerzellen können keine Retroviren mehr abgegeben werden, da die Zellen den Replikationsdefekt nicht komplementieren.

Einstufung der Arbeiten

Umgang mit GVO a) und b)

**Sicherheitsstufe 1**

Umgang mit GVO c) und d)

**Sicherheitsstufe 2**

Umgang mit GVO e) und f)

**Sicherheitsstufe 1**

Nach einer Stellungnahme der ZKBS vom März 1994 [zur Risikobewertung von C-Typ Retroviren der Hühner](#) wird auch ein Teil dieser Retroviren, nämlich die **Geflügel-Leukose-Sarkom-Viren (GLSV), akute Leukämie/Sarkom Viren der Subgruppen A und B** in die **Risikogruppe 1** eingestuft. Arbeiten mit diesen Viren als Vektor können somit, unter Berücksichtigung des Informationsgehalts des Inserts, in die Sicherheitsstufe 1 eingestuft werden.

Weitere gentechnische Arbeiten mit einem viralen Vektorsystem, die in **Sicherheitsstufe 1** eingestuft werden können, sind solche mit **Baculovirus und der Insektenzelllinie SF9**. Bei diesem System vermehren sich die rekombinanten Viren in der Wirtszelle, wobei diese abstirbt. In ein Rekombinationsplasmid mit allen zur Vermehrung in *E. coli* notwendigen Funktionen wird ein Fremdgen vor einen viralen Promotor inseriert. Die flankierenden Sequenzen sind homolog zu viralen Sequenzen. Wird dieses Plasmid in Baculovirus infizierte SF9 Zellen transfiziert, kommt es (über homologe Sequenzen) zur Rekombination des Plasmids mit dem viralen Genom. Da die Arbeitseinstufung in einem solchen Fall von der Risikogruppe des benutzten Virus abhängt, kann, unter Berücksichtigung des Informationsgehalts des Inserts, beim Umgang mit Baculoviren (Risikogruppe 1) in die **Sicherheitsstufe 1** klassifiziert werden.

Arbeiten mit dem **Semliki-Forest-Virus-** und dem **Sindbis-Virus-Expressionssystem** werden ebenfalls z.T. in die **Sicherheitsstufe 1** eingestuft, wenn die rekombinanten Expressionsvektoren bzw. die rekombinanten Viruspartikel Nukleinsäuresequenzen ohne eigenes pathogenes Potenzial (z.B. Prionproteine oder

Proteine mit transformierendem Potenzial) tragen und die Empfängerorganismen der Risikogruppe 1 zuzuordnen sind (siehe Stellungnahme [Gentechnische Arbeiten mit dem Sindbis-Virus- und dem Semliki-Forest Virus-Expressionssystem](#) der ZKBS vom Oktober 2004). Es sind dies im Einzelnen die Übertragung rekombinanter SFV- bzw. Sindbis-Virus-Expressionsvektoren oder Helferplasmide in *E. coli*, die Übertragung der Transkripte rekombinanter SFV- bzw. Sindbis-Virus-Expressionsvektoren in eukaryote Zellen der Risikogruppe 1 sowie die Erzeugung und Verwendung SFV- bzw. SIN- abgeleiteter Vektorpartikel **bei Verwendung des Helferplasmids pSFV-Helper2 oder vergleichbarer Helferplasmide, die an der proteolytischen Spaltstelle von p62 dreifach mutiert sind (Ausnahme: beim Insert handelt es sich um ein virales Hüllprotein).**

**Achtung:** Bei Verwendung der Helferplasmide pSFV-Helper1 bzw. DH-BB kann in den kotransfizierten Zellen eine Rekombination zwischen der RNA des Expressionsvektors und der RNA des Helferplasmids mit Bildung und folgender Amplifikation replikationskompetenter, infektiöser Viruspartikel nicht ausgeschlossen werden. Diese Arbeiten werden der **Sicherheitsstufe 2** zugeordnet. Gleiches gilt für die Verwendung SFV- bzw. SIN abgeleiteter Vektorpartikel bei Verwendung des Helferplasmids pSFV-Helper2 nach deren Aktivierung durch  $\alpha$ -Chymotrypsin.

In ihrer [Stellungnahme zum Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren](#) vom Mai 1997 hat die ZKBS das modifizierte **Vaccinia-Virus Ankara MVA**, das multiple Deletionen von insgesamt 31 kb aufweist und sich nicht auf menschlichen Zellen vermehrt, in die **Risikogruppe 1** eingestuft. Gentechnische Arbeiten mit rekombinanten Vaccinia-Virus MVA, das heterologe Gene enthält, die nicht das Wirtsspektrum verändern und nicht das Gefährdungspotenzial des Vaccinia-Virus Ankara MVA erhöhen, wurden in die **Sicherheitsstufe 1** eingestuft. In einer neuerlichen Stellungnahme speziell zum Vacciniavirus MVA wurde diese Einstufung noch weiter präzisiert ([Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA](#)).

In der Stellungnahme der ZKBS zum Gentransfer mit Hilfe von **Adenovirus Typ 5** (siehe [Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5](#)) werden die rekombinanten, replikationsdefekten Ad5-abgeleiteten Vektoren, bei denen sämtliche adenovirale Gene deletiert sind (sogenannte "Gutless"-Vektoren oder "High Capacity"-Vektoren), und die subgenomische Nukleinsäureabschnitte ohne Gefährdungspotenzial enthalten, der **Risikogruppe 1** zugeordnet, wenn sie auf Helferzelllinien erzeugt wurden, bei denen nicht von einer homologen Rekombination zwischen integrierten Helfergenen und Helfervirus auszugehen, die Verpackung der Helfervirus-DNA minimiert und durch Dichtegradientenzentrifugation der Ad5-abgeleitete Vektor von kontaminierendem Helfervirus abgetrennt ist. **Achtung: Alle anderen Adenoviren Typ 5, auch replikationsdefekte, werden der Risikogruppe 2 zugeordnet.**

In ihrer Stellungnahme [zur Risikobewertung humaner Adeno-assoziiierter Viren](#) hat die ZKBS **die Serotypen 2, 3 und 5** der Adeno-assoziierten Viren in die **Risikogruppe 1** eingestuft, während die Serotypen 1, 4 und 6-11 in die **Risikogruppe 2** eingestuft wurden. Bei den heute verwendeten chimären AAV ist die Sicherheitseinstufung abhängig von den eingesetzten Elementen. Wird lediglich in den Verpackungskonstrukten cap von einem AAV der Risikogruppe 2 eingesetzt, sind die entstehenden AAV immer noch in die Risikogruppe 1 einzustufen.

## Zusammenfassung der wichtigsten Vektor-Empfänger-Systeme in der Sicherheitsstufe 1:

### prokaryote

- *E. coli*: K12 und Derivate, B und Derivate sowie die Einzelstämme MRC1, chi-1776, ATCC 9637, NCIB 8743, CCM 2843, C, ABLE C und ABLE K mit ihren Plasmiden (z.B. pBR322) oder Bakteriophagen (z.B. Lambda gt 10 und 11)
- *Bacillus subtilis* mit seinen Plasmiden (z.B. pUB und pPL)

- *Pseudomonas putida* (z.B. Stamm mt-2 KT 2440 mit den Vektoren pKT262, pKT263 und pKT264)
- *Agrobacterium tumefaciens* mit binärem Plasmid für die Transfektion von Pflanzenzellen (siehe Stellungnahme der ZKBS [zur Einstufung von \*Agrobacterium tumefaciens\*](#))

#### eukaryote

- *Saccharomyces cerevisiae* (haploid und diploid) mit den Vektortypen YIp, YRp, YE<sub>p</sub> und YAC
- etablierte Zelllinien, die keine Organismen höherer Risikogruppen abgeben
- humanes Primärmaterial, das nachweislich frei von HBV, HCV und HIV ist oder von Spendern stammt, die für die genannten Viren seronegativ sind
- primäres Material aus sonstigen Vertebraten, wenn keine Krankheitssymptome vorliegen (Ausnahme Primaten, deren primäre Zellen in die Risikogruppe 2 einzuordnen sind)
- Zellen dicotyler Pflanzen

#### Viren

- ecotrope Verpackungszelllinien (z.B. psi2, PE501, PsiCRE, GP+E86, Bosc23 oder omegaE) in Verbindung mit retroviralen Vektoren (z.B. L<sub>X</sub>SN oder pMV7)
- Verpackungszelllinien ohne retrovirale Vektoren
- Baculovirus mit Insektenzellen
- Geflügel-Leukose-Sarkom-Viren (GLSV), akute Leukämie/Sarkom Viren der Subgruppen A und B
- Semliki-Forest-Virus- und Sindbis-Virus-Expressionssystem bei Verwendung des Helferplasmids pSFV-Helper2 vor der Aktivierung mit  $\alpha$ -Chymotrypsin
- Vaccinia-Virus Ankara MVA (wenn das Insert das Wirtsspektrum nicht verändert)
- Adenovirus Typ 5 (sogenannte "Gutless"-Vektoren oder "High Capacity"-Vektoren) unter definierten Voraussetzungen
- Adeno assoziierte Viren der Serotypen 2, 3 und 5 (wenn das Insert keine zellzyklus-regulierenden Eigenschaften besitzt)

## **4.2 Sicherheitsstufe 2**

Nach § 7 Abs. 3 Nr. 2 GenTSV sind gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Laborbereich der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a) die Empfängerorganismen sind Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine Organismen der Risikogruppen 3 oder 4 ab,*
- b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgibt;*

**zu: a) die Empfängerorganismen sind Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine Organismen der Risikogruppen 3 oder 4 ab**

Ist der Empfängerorganismus ein Organismus der Risikogruppe 2 und gibt keine Organismen der Risikogruppen 3 oder 4 ab, so ist die gentechnische Arbeit in die Sicherheitsstufe 2 einzustufen, da das Gefährdungspotenzial des Empfängerorganismus gem. § 5 Abs. 4 GenTSV vollständig in die Risikobewertung der gentechnisch veränderten Organismen und somit in die Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeit einfließt (Ausnahme siehe unter D).

**zu: b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgibt**

Aus dem Nebensatz ergibt sich, dass bei der Gesamtbewertung der Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeit die Einstufung des gentechnisch veränderten Organismus in die Risikogruppe 2 von ausschlaggebender Bedeutung ist. Die Einstufung in die Risikogruppe 2 ist unter den folgenden Voraussetzungen vorzunehmen:

**A) Der Spenderorganismus ist ein Organismus der Risikogruppe 2 und gibt keine Organismen der Risikogruppen 3 oder 4 ab, und der Empfängerorganismus ist der Risikogruppe 1 zuzuordnen, und**

**- aus dem Spenderorganismus wird ein Genomabschnitt übertragen, der nicht charakterisiert ist**

**Beispiel:** Thema: Erstellen einer Genbank von *Listeria monocytogenes*

Spender	<i>Listeria monocytogenes</i>	<b>Risikogruppe 2</b>
Empfänger	<i>E. coli</i> K12 mit dem Vektor pLSV1	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	pLSV1 ist ein "shuttle"-Vektor für Gram-negative und Gram-positive Bakterien. Der Vektor ist ein pUC18-Derivat mit einem temperatursensitiven ori des Plasmids pE194 aus <i>Staphylococcus aureus</i> und dem Erythromycin-Resistenzgen des Plasmids pIP501 aus <i>Streptococcus agalactiae</i>	
GVO	<i>E. coli</i> K12 einschließlich des obengenannten Vektors mit subgenomischen DNA-Fragmenten aus <i>L. monocytogenes</i> <u>Begründung:</u> Es werden nicht charakterisierte DNA-Sequenzen aus einem Organismus der Risikogruppe 2 in <i>E. coli</i> K12 eingeführt. Eine Expression der Gene in <i>E. coli</i> K12 ist nicht auszuschließen. Der verwendete Vektor ist ausreichend charakterisiert und ohne pathogenes Potenzial	<b>Risikogruppe 2</b>
Einstufung der Arbeit	Der Spenderorganismus ist ein Organismus der Risikogruppe 2, der Empfängerorganismus ist ein Organismus der	<b>Sicherheitsstufe 2</b>

Risikogruppe 1. Die in *E. coli* eingeführten DNA-Sequenzen sind nicht charakterisiert, dürften aber vermutlich nicht stark exprimiert werden. Der verwendete Vektor kann in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien replizieren

- es werden Nukleinsäureabschnitte übertragen, die das Gefährdungspotenzial des Spenderorganismus bestimmen. Hierbei ist durchaus von Bedeutung ob es sich um einen dominierenden Virulenzfaktor handelt, oder um virulenzassoziierte Gene.

**Beispiel:** Thema: Regulation und Expression virulenz-assoziiierter Gene aus Listerien

Spender	<i>Listeria monocytogenes</i> bzw. <i>ivanovii</i>	<b>Risikogruppe 2</b>
Ausgangsorganismus	<i>E. coli</i> K12 mit einzelnen Virulenz-assoziierten Genen aus den o.g. Listerien	
	a) Ausgangsorganismen die Listeriolysingene aus <i>L. monocytogenes</i> und <i>L.ivanovii</i> tragen, da diese die dominierenden Virulenzfaktoren darstellen, (Listeriolysin-negative Mutanten sind avirulent)	<b>Risikogruppe 2</b>
	b) Alle anderen Ausgangsorganismen, die jeweils ein anderes virulenz-assoziiertes Gen enthalten (Gen für das Regulator-protein prfA, das Invasionsprotein p60, eine Phospholipase {plcA oder plcB}, eine Metalloprotease {mpl}, eine Katalase, eine Superoxid-Dismutase und ein vermutlich Aktin-polymerisierendes Enzym {actA})	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	<i>E. coli</i> K12 und Derivate mit den Vektoren pBR322 und pUC18	<b>Risikogruppe 1</b>
GVO	a) <i>E. coli</i> K12 und Derivate einschließlich der genannten Vektoren mit dem Listeriolysin-Gen aus <i>L. monocytogenes</i> oder <i>L. ivanovii</i> Es werden charakterisierte DNA-Sequenzen mit pathogenem Potenzial aus Organismen der Risikogruppe 2 in <i>E. coli</i> K12 eingeführt. Die Vektor-Empfänger-Systeme entsprechen biologischen Sicherheitsmaßnahmen gemäß Anhang II A GenTSV.	<b>Risikogruppe 2</b>
	b) <i>E. coli</i> K12 und Derivate einschließlich der genannten Vektoren mit einem einzelnen Gen aus einem Ausgangsorganismus der Gruppe b. Es werden charakterisierte DNA-Sequenzen aus einem Organismus der Risikogruppe 2, die für sich keine Pathogenität vermitteln können, in <i>E. coli</i> K12 eingeführt. Die Vektor-Empfänger-Systeme entsprechen einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß Anhang II A GenTSV	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeiten	a) Die Spenderorganismen sind Organismen der Risikogruppe 2, die Empfängerorganismen sind	<b>Sicherheitsstufe 2</b>

Organismen der Risikogruppe 1. Die in die Empfängerorganismen eingeführten DNA-Sequenzen sind zwar charakterisiert, stellen jedoch den Hauptvirulenzfaktor der Spenderorganismen dar. Die Empfänger sind gemeinsam mit den verwendeten Vektoren als biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 6 Abs. 4 und 5 GenTSV

b) Die Spenderorganismen sind Organismen der Risikogruppe 2, die Empfängerorganismen sind Organismen der Risikogruppe 1. Die Empfänger sind gemeinsam mit den verwendeten Vektoren als biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 6 Abs. 4 und 5 GenTSV anerkannt. Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 GenTSV nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1.

**Sicherheitsstufe 1**

Hinweis: Sollen mehrere Gene des Virulenzgenclusters von *L. monocytogenes* oder *L. ivanovii* in Kombination bzw. Fusion eingeführt werden, lautet das Ergebnis der vorläufigen Sicherheitsbewertung **Sicherheitsstufe 2**.

- das gesamte Genom des Spenderorganismus wird übertragen.

Diese generelle Forderung, wie sie in § 5 Abs. 3 Satz 1 GenTSV aufgestellt wird, erscheint überzogen und steht im Widerspruch zu dem Nebensatz von Absatz b). Sie ist sicherlich richtig in allen Fällen, bei denen die pathogene Wirkung des Spenders übertragbar ist. Es gibt m.E. jedoch auch Fälle der Übertragung des gesamten Genoms, bei denen der entstehende GVO kein Gefährdungspotenzial darstellt und deshalb als Ergebnis seiner vorläufigen Sicherheitsbewertung die Risikogruppe 1 resultieren kann. Ein Beispiel hierfür ist die bereits zuvor angesprochene Übertragung von DNA aus eukaryotischen Parasiten auf Bakterien. Selbst bei Arbeiten mit dem gesamten Genom ist die Übertragung der Pathogenitätsmechanismen auf die Bakterien sehr unwahrscheinlich. Dies zeigt, dass die Forderung nach einer vorläufigen Sicherheitseinstufung in jedem Einzelfall sinnvoll und berechtigt ist. Das Ergebnis der Einzelfallbetrachtung kann dabei, wie oben gezeigt, durchaus von einer generellen Forderung abweichen. In einem solchen Fall, darf m.E. der Wissenschaftler nicht im Rahmen seiner wissenschaftlichen Verantwortlichkeit die Herabstufung vornehmen. Dies kann nur in Absprache mit der Genehmigungsbehörde bzw. nach Befragung der ZKBS geschehen.

**B)** Aus Absatz **b)** geht jedoch auch hervor, dass Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 klassifiziert werden können, bei denen als Spender Organismen einer höheren Risikogruppe als 2 benutzt werden. Voraussetzung ist dabei, dass der aus dieser Arbeit hervorgehende gentechnisch veränderte Organismus nicht das Gefährdungspotenzial der Risikogruppe 2 überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen einer höheren Risikogruppe abgibt. In diesen Fällen kann eine Herabstufung gem. § 5 Abs. 3 Satz 2 GenTSV vorgenommen werden. Dies trifft insbesondere zu, wenn Teilsequenzen eines Virusgenoms auf Organismen der Risikogruppe 1 übertragen werden, die keine biologische Sicherheitsmaßnahme gem. Anhang II A GenTSV darstellen. Aber auch die Sicherheitsbeurteilung der so genannten "3-Stern-organismen" kann zu einer Einstufung in die Sicherheitsstufe 2 führen (siehe hierzu D).

**C)** Absatz **b)** ermöglicht gleichzeitig auch eine Aussage zu den verwendeten Vektoren. Vorgaben an die Vektoren ergeben sich bei der Einstufung von gentechnischen Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 lediglich aus dem Nebensatz. Zu den bei der Einstufung in die Sicherheitsstufe 1 aufgetauchten Fragen der Mobilisierbarkeit bzw. zum Transfersystem gibt es keine Einschränkungen, auch bei Vorliegen der mob- und tra-Funktion ist die Einhaltung der



Voraussetzungen gewährleistet. Eine indirekte Vorgabe ist jedoch durchaus vorhanden, da der gentechnisch veränderte Organismus das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreiten darf. Es ist somit klar, dass auch die Vektoren frei sein müssen von Nukleinsäuresequenzen, die das Gefährdungspotenzial über die Risikogruppe 2 hinaus erhöhen.

Neben den bereits erwähnten Retroviren und retroviralen Vektoren mit ihren Verpackungszelllinien (**Ausnahme ecotrope Zelllinien, siehe Sicherheitsstufe 1**) gewinnen zunehmend die lentiviralen Vektor-Systeme für die Transformation eukaryoter Zellen an Bedeutung. Hierbei werden ebenfalls in einer Verpackungszelllinie mit Hilfe von HIV- oder FIV-basierten Transfer-Vektoren und nach Kotransfektion mit den Verpackungsvektoren rekombinante, replikationsdefekte Lentiviren hergestellt. Zur Vermeidung der Entstehung replikationskompetenter Viren werden die Struktur und Verpackungssequenzen auf drei Plasmide verteilt. Die gentechnischen Arbeiten mit subgenomischen Nukleinsäureabschnitten der Lentiviren (Rekombinationsplasmide) werden in die **Sicherheitsstufe 1** eingestuft. Die kotransfizierte Verpackungszelllinie und die entstehenden replikationsdefekten Lentiviren werden in die **Risikogruppe 2** eingestuft. Dies gilt auch, wenn die Lentiviren mit retroviralen Hüllglykoproteinen anderer Viren der Risikogruppe 2 pseudotypisiert wurden. Mit den viralen Vektoren infizierte Zellen können in die **Risikogruppe 1** herabgestuft werden, wenn nachgewiesen ist, dass der Medienüberstand frei von Viruspartikeln ist und keine Lentiviren abgegeben werden.

Daneben sind drei weitere Vektor-Systeme für die Transformation eukaryoter Zellen unter der Sicherheitsstufe 2 zu nennen, das Semliki-Forest-Virus bzw. Sindbis-Virus Expressionssystem, das Vaccinia-Virus System und adenovirale Vektoren. Das Prinzip der Klonierung in Semliki-Forest-, Sindbis- und Vaccinia-Viren ist identisch mit dem bei Baculovirus. Es wird ein Rekombinationsplasmid mit dem Fremdgen vor einem viralen Promotor und zu viralen Sequenzen homologen flankierenden Sequenzen benutzt. Nach Transfektion des Plasmids in eine Virus infizierte Zelllinie kommt es während der viralen Replikation über die homologen Sequenzen zu einer Rekombination des Plasmids mit dem viralen Genom. Das rekombinante Virus wird freigesetzt. Da die Verwendung von Semliki-Forest-, Sindbis- und Vaccinia-Virus weit verbreitet ist, hat auch hierzu die ZKBS grundlegende Stellungnahmen abgegeben ([Semliki Forest Virus- und Sindbis Virus-Expressionssystem](#), [Vacciniaviren](#)). Auf die bei diesen Systemen mittlerweile vorliegenden Expressions- und Helferplasmide, die zu einer Einstufung der gentechnischen Arbeiten in die Sicherheitsstufe 1 führen, sei nochmals hingewiesen.

**Beispiel:** Thema: Expression von Graninen in konstitutiv und reguliert sekretierenden Zelllinien

Spender	Mensch	<b>Risikogruppe 1</b>
Ausgangsorganismus	E. coli K12 einschließlich des Vektors pSC11 mit DNA-Sequenzen der humanen Gene für Chromogranin A (hCgA) und B (hCgB)	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	a) humane Zelllinie HuTK <sup>-</sup> infiziert mit Vaccinia-Virus (Stamm WR) mit dem Vektor pSC11: pBR322 ori, P7,5- und P11-Promotor sowie Sequenzen des Thymidin-Kinase-Gens des Vaccinia-Virus, beta-Galactosidase-Gen und Ampicillin-Resistenzgen aus <i>E. coli</i>	<b>Risikogruppe 2</b>
.	b) Rattenzelllinie PC12	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	Der Vektor enthält Sequenzen des Thymidin-Kinase-Gens (TK- Gen) des Vaccinia-Virus, wodurch es zu einer homologen Rekombination mit dem TK-Gen des Vaccinia-Virus kommt.	

Eine Bewertung des rekombinanten Vaccinia-Virus erfolgt anhand der gentechnisch veränderten Organismen.

GVO

a) humane Zelllinie HuTK<sup>-</sup> infiziert mit Vaccinia-Virus des o.g. Vektors mit cDNA-Sequenzen humaner Granin-Gene

**Risikogruppe 2**

Die humanen Zellen sind mit Vaccinia-Virus infiziert und daher der Risikogruppe 2 zuzuordnen. Sie geben nach Rekombination des Virus mit dem transfizierten Vektor gentechnisch veränderte Organismen der Risikogruppe 2 ab. Die Zellen sterben etwa zwei Wochen nach der Infektion ab. Maßgeblich für die Sicherheitsbewertung sind daher rekombinante Vaccinia-Viren.

b) Vaccinia-Virus einschließlich integrierter cDNA-Sequenzen humaner Granin-Gene und dem beta-Galaktosidase- Gen aus E. coli

**Risikogruppe 2**

Gemäß § 3 Nr 3 Satz 1 GenTG entsprechen die rekombinanten Vaccinia-Viren gentechnisch veränderten Organismen. Das Vaccinia-Virus ist ein Organismus der Risikogruppe 2. Die eingeführten Gene sind ohne pathogenes Potenzial. Es ist kein höheres Risikopotenzial des gentechnisch veränderten Organismus als das des Wildtyp-Virus zu erwarten.

c) PC12-Zelllinie infiziert mit den unter b) genannten rekombinanten Vaccinia-Viren

**Risikogruppe 2**

Die Zellen sind mit den unter b) in die Risikogruppe 2 eingestuften rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert und geben diese als infektiöse Viruspartikel wieder ab. Die Zellen sterben etwa zwei Wochen nach der Infektion ab.

Einstufung der Arbeiten

a) und c) Der Spender ist ein Organismus der Risikogruppe 1. Die Empfängerzellen (Risikogruppe 1) sind mit Viren der Risikogruppe 2 infiziert und setzen diese nach Vermehrung frei. Die Zellen sterben nach der Infektion ab. Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 GenTSV nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine GVOs höherer Risikogruppen ab.

**Sicherheitsstufe 2**

b) Der Spender ist ein Organismus der Risikogruppe 1. Der Empfänger ist ein Virus der Risikogruppe 2. Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 GenTSV nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2.

**Sicherheitsstufe 2**

Hinweis: [zum Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren](#) ist eine grundsätzliche Stellungnahme der ZKBS erstellt worden.

Zur Übertragung heterologer Gene und in der somatischen Gentherapie werden häufig adenovirale Vektoren verwendet. Die zu übertragenden Gene werden in einem Rekombinationsplasmid von Ad5-DNA-Sequenzen flankiert, mit deren Hilfe das Gen über homologe Rekombination in ein deletiertes Ad5-Genom eingeführt wird. Die Übertragung findet in der komplementierenden humanen Zelllinie 293 (siehe hierzu [Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5](#)) statt. Diese ist permissiv für die Replikation von Adenoviren und enthält die E1- und E4-Gene von Ad5 im Genom integriert. Durch die konstitutive Expression der E1-Gene ist diese Zelllinie in der Lage, Ad5-Mutanten mit Deletionen in der essentiellen E1-Region zu komplementieren. Das Rekombinationsplasmid mit dem zu übertragenden Gen wird auf 293-Zellen - entweder nachdem diese mit Ad5-E1-Deletionsmutanten infiziert wurden oder als Ko-Transfektion gemeinsam mit der DNA von Ad5-E1-Deletionsmutanten - transfiziert. Die Übertragung des heterologen Gens in das deletierte Ad5-Genom in der den Replikationsdefekt komplementierenden Zelle führt zur Freisetzung rekombinanter replikationsdefekter Ad5-Deletionsmutanten. Werden Zellen die den Replikationsdefekt in der E1-Region nicht komplementieren können, mit den rekombinanten replikationsdefekten Ad5-Deletionsmutanten infiziert, erfolgt keine Produktion infektiöser Virionen. Die gentechnischen Arbeiten mit subgenomischen Nukleinsäureabschnitten von Ad5 (Rekombinationsplasmide) werden gemäß der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu Adenovirus Typ 5 der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet, wenn der Empfängerorganismus die fehlenden Ad5-Sequenzen nicht komplementieren kann. Die Herstellung rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren in einer komplementierenden Zelle (z.B. 293-Zelllinie) sowie die Arbeiten mit den entstandenen Viren sind in die **Sicherheitsstufe 2** einzustufen. Infizierte Zellen der Risikogruppe 1 und Tiere sind, soweit sie den Replikationsdefekt nicht komplementieren können, wieder in die **Sicherheitsstufe 1** einzustufen.

**Beispiel:** Thema: Rekombinante Adenoviren für die Therapie maligner Tumoren.

Rekombinante Adenoviren (Serotyp 5) werden für die antitumorale Therapie verwendet. In Deletionsmutanten des Ad5, die die E1 und die E3 Region des Wildtyp-virus nicht mehr tragen, werden therapeutische Gene einkloniert und mit Hilfe der replikationsdefekten rekombinanten Adenoviren in Tumorzellen eingeschleusst. Ausgangskonstrukte für die Arbeiten sind die Plasmide pTG4656 und pTG9530. Transferiert werden:

- a) Markergene wie das Green fluorescence protein (GFP) oder das LacZ-Gen.
- b) Suizidgene, beispielsweise das bakterielle Cytosindesaminasegen oder HSV-tk.
- c) Genfragmente tumorspezifischer Gene.

Mit den rekombinanten Adenoviren werden zum einen direkte in vivo Transferexperimente in Ratten und Mäusen durchgeführt. Zum anderen werden parallel auch in vitro antigenpräsentierende Zellen (APCs) infiziert.

Spender	A) Mensch	<b>Risikogruppe 1</b>
	B) Qualle Aequoria victoria	<b>Risikogruppe 1</b>
	C) Nager	<b>Risikogruppe 1</b>
	D) E. coli	<b>Risikogruppe 2</b>
	E) HPV	<b>Risikogruppe 2</b>
	F) HSV	<b>Risikogruppe 2</b>

Ausgangsorganismen	a) <i>E. coli</i> K12 mit in pUC-Derivaten klonierten, charakterisierten Fragmenten tumorassoziierter Gene (z.B. Fusionstranskripte, Frameshiftmutanten, E6 und E7)	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) <i>E. coli</i> K12 mit in pUC-Derivaten klonierten Markergenen (GFP, lacZ)	<b>Risikogruppe 1</b>
	c) <i>E. coli</i> K12 mit in pUC-Derivaten klonierten Suizidgenen (z.B. Cytosindesaminase-Gen aus <i>E. coli</i> , tk-Gen aus HSV)	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	a) <i>E. coli</i> K12 mit den Vektoren pTG4656 und pTG9530	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) 293 Zelllinie	<b>Risikogruppe 1</b>
	c) antigenpräsentierende Zellen, human nicht getestet auf HIV, HCV und HBV	<b>Risikogruppe 2</b>
	d) antigenpräsentierende Zellen der Ratte bzw. Maus	<b>Risikogruppe 1</b>
	e) Ratte, Maus	<b>Risikogruppe 1</b>
GVO	a) <i>E. coli</i> K12 einschließlich o.g. Vektoren mit den unter den Ausgangsorganismen aufgeführten Genen bzw. Genfragmenten  Die klonierte Spender-DNA besitzt kein Gefährdungspotenzial, da sie entweder für unbedenkliche Proteine kodiert oder nur in Fragmenten vorliegt. Die Plasmide besitzen kein eigenes Gefährdungspotenzial, da nur Adenoteilsequenzen vorliegen. Die GVO geben keine Organismen der Risikogruppe 2 oder höher ab.	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) 293 Zellen einschließlich der durch homologe Rekombination entstandenen pTG-Plasmide mit den unter den Ausgangsorganismen aufgeführten Genen bzw. Genfragmenten  Die 293 Zellen komplementieren den Replikationsdefekt der Vektoren. Es werden replikationsdefekte, aber infektiöse Adenoviren gebildet. Die GVO sind gemäß III Nr. 3.3 der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zum Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5 in die Risikogruppe 2 einzustufen.	<b>Risikogruppe 2</b>
	c) replikationsdefekte Adenoviren mit den unter den Ausgangsorganismen aufgeführten Genen bzw. Genfragmenten  Die GVO sind gemäß III Nr. 3.7 der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zum Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5 in die Risikogruppe 2 einzustufen.	<b>Risikogruppe 2</b>

d) primäre humane Zellen, infiziert mit den unter 3c) genannten Viren

**Risikogruppe 2**

e) Nagerzellen, infiziert mit den unter 3c) genannten Viren

**Risikogruppe 1**

Die GVO sind gemäß III Nr. 3.9 der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zum Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5 in die Risikogruppe 1 einzustufen.

f) Maus bzw. Ratte, infiziert mit den unter 3c) genannten Viren

**Risikogruppe 1**

Die GVO sind gemäß III Nr. 3.10 der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zum Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5 in die Risikogruppe 1 einzustufen.

Einstufung der Arbeiten

a) Der Empfängerorganismus ist ein Organismus der Risikogruppe 1 nach § 5 Abs. 2 Satz 1 und gibt keine Organismen der Risikogruppen 2-4 ab. Vektor-Empfänger-Systeme entsprechen biologischen Sicherheitsmaßnahmen. Vektoren und aus den Spenderorganismen überführte Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 nicht überschreiten und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgeben.

**Sicherheitsstufe 1**

b) Der Empfängerorganismus ist ein Organismus bis Risikogruppe 2 und gibt keine Organismen der Risikogruppen 3 oder 4 ab. Vektoren und aus den Spenderorganismen überführte Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreiten und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgeben.

**Sicherheitsstufe 2**

c) Der Empfängerorganismus ist ein Organismus bis Risikogruppe 2 und gibt keine Organismen der Risikogruppen 3 oder 4 ab. Vektoren und aus den Spenderorganismen überführte Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreiten und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgeben.

**Sicherheitsstufe 2**

d) Der Empfängerorganismus ist ein Organismus bis Risikogruppe 2. Vektoren und aus den Spenderorganismen überführte Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreiten und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgeben.

**Sicherheitsstufe 2**

e) und f) Die Empfängerorganismen sind Organismen der Risikogruppe 1 nach § 5 Abs. 2 Satz 1 und geben keine Organismen der Risikogruppen 2-4 ab. Vektoren und aus den Spenderorganismen überführte Nukleinsäuren sind

**Sicherheitsstufe 1**

soweit charakterisiert, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 nicht überschreiten und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgeben.

**Achtung:** Die zuvor genannten Sicherheitseinstufungen von Adenoviren gilt für die Übertragung von Nukleinsäuren ohne Gefährdungspotenzial. In der Allgemeinen Stellungnahme „[Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Vektoren mit zellzyklus-regulierenden Genen](#)“ hat die ZKBS Adenoviren und AAV mit zellzyklus-regulierenden Genen ebenfalls in die **Sicherheitsstufe 2** eingestuft, für den Umgang mit solchen Adenoviren jedoch **besondere Maßnahmen zum Personenschutz** festgelegt. Der Begriff der zellzyklus-regulierenden Gene wurde dabei sehr weit gefasst. Er umfasst Gene von Tumorigenen die für das onkogene Potenzial des Virus verantwortlich sind, Gene die maßgeblich an der Entstehung humaner Tumore beteiligt sind, Gene die *in vitro* Säugerzellen transformieren und Gene die im Tierversuch Tumore erzeugen. Somit fallen unter diesen Begriff neben den „Onkogenen“ auch mutierte Suppressorgene und siRNAs.

**D)** Einen Sonderfall bei der Sicherheitseinstufung stellen die sogenannten "Doppelsternorganismen" dar. Bei der Novellierung der Gentechnik-Sicherheitsverordnung wurden die zuvor in einem Anhang aufgeführten Organismenlisten mit deren Zuordnung zu Risikogruppen aus der Rechtsverordnung entfernt. Stattdessen veröffentlicht gem. § 5 Abs. 6 GenTSV das Bundesministerium für Gesundheit in regelmäßigen Abständen eine [Liste "Risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten"](#). Bei der Einstufung in diesen Listen ist das Ministerium an die Arbeitnehmerschutzrichtlinie 93/88 EWG vom 12.10.1993 gebunden. Aus diesem Grunde sind in der im Bundesgesundheitsblatt veröffentlichten Liste einige Organismen mit Sternchen versehen. Hierbei handelt es sich um nicht über die Luft übertragene Organismen der Risikogruppe 3, bei deren Handhabung die Sicherheitsmaßnahmen der Sicherheitsstufe 3 nicht vollständig eingehalten werden müssen. Ein Teil dieser Organismen (z.B. Hepatitis B Virus) war bisher in die Risikogruppe 2 eingestuft. Da die Änderung in der Einstufung auf juristischen, nicht aber auf neuen sicherheitsrelevanten Aspekten beruht, hat die ZKBS in einer [Stellungnahme zu gentechnischen Arbeiten mit dem Hepatitis B Virus \(HBV\) des Menschen](#) gentechnisch veränderte HBV, gentechnisch veränderte Zellen oder Zelllinien, die HBV abgeben, und GVO, die bei der Übertragung vollständiger Genome von HBV in E. coli K12, Saccharomyces cerevisiae oder etablierte Zelllinien der Risikogruppe 1 entstehen, in die Risikogruppe 2 und die Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 eingestuft.

**Beispiel:** Thema: Klonierung von HBV DNA

Spender	Humanes Hepatitis B Virus	<b>Risikogruppe 3*</b>
Empfänger	E. coli K12	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	pBR322-Derivat	
GVO	E. coli K12 mit dem gesamten Genom von HBV	<b>Risikogruppe 2</b>
Einstufung der Arbeit		<b>Sicherheitsstufe 2</b>

Begründung: Gemäß Arbeitnehmerschutzrichtlinie 93/88 EWG vom 12.10.93 zur Änderung der Richtlinie 90/679/EWG ist das humane Hepatitis B Virus (HBV) der Risikogruppe 3\* zugeordnet. Diese Risikobewertung des HBV ist in der Organismenliste "Risikobewertete Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten", die nicht mehr Bestandteil der novellierten Fassung der GenTSV ist und im Bundesgesundheitsblatt publiziert wird, enthalten. Neue sicherheitsrelevante Aspekte, die der ZKBS bisher nicht bekannt waren, lagen dieser Einstufung nicht zugrunde. Die GenTSV sieht für die Risikobewertung von GVO die Risikogruppen 1, 2, 3 und 4, nicht jedoch die Risikogruppe 3\* vor.

Seit Inkrafttreten des GenTG hat die ZKBS die o.g. gentechnischen Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 eingestuft und die Einhaltung von Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 gemäß GenTSV festgelegt, da HBV nicht über den Luftweg übertragen wird und ein wirksamer Impfstoff gegen die HBV-Infektion verfügbar ist. Für die genannten gentechnischen Arbeiten sind Sicherheitsmaßnahmen der Sicherheitsstufe 2 ausreichend. Demzufolge werden auch die o.g. GVO gemäß GenTSV der Risikogruppe 2 zugeordnet und die gentechnischen Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 eingestuft.

Die Stellungnahme der ZKBS zu HBV kann selbstverständlich auch nicht auf andere "3\*\*-Organismen" übertragen werden, es muss in jedem Fall Rücksprache mit der ZKBS gehalten werden bzw. eine neuerliche Stellungnahme eingeholt werden. Dies zeigt sich in zwei weiteren Stellungnahmen der ZKBS zu "3\*\*-Organismen". In der Stellungnahme "[zu gentechnischen Arbeiten mit Immundefizienzviren des Menschen \(HIV-1 und HIV-2\)](#)" werden gentechnisch veränderte HIV in die **Risikogruppe 3**, in der Stellungnahme "[zu gentechnischen Arbeiten mit Immundefizienzviren des Affen \(SIV\)](#)" die gentechnisch veränderten SIV jedoch in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Neben den genannten Viren sind in die Gruppe der 3\*\*-Organismen einige Parasiten eingestuft. Auch hier hat die ZKBS in der Stellungnahme „[zur Einstufung der Parasiten \*Leishmania brasiliensis\*, \*Leishmania donovani\*, \*Plasmodium falciparum\* und \*Trypanosoma brucei rhodesiense\* als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten](#)“ klargestellt, dass die Arbeiten in der **Sicherheitsstufe 2** durchgeführt werden können, wenn nicht vorgesehen ist, mit Überträgern zu arbeiten.

### **4.3 Sicherheitsstufe 3**

Nach § 7 Abs. 3 Nr. 3 GenTSV sind gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen zum Laborbereich der Sicherheitsstufe 3 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a) Die Empfängerorganismen sind Organismen bis Risikogruppe 3 und geben keine Organismen der Risikogruppe 4 ab,*
- b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 3 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 4 abgibt; Ebenfalls der Sicherheitsstufe 3 zuzuordnen sind gentechnische Arbeiten, die darauf gerichtet sind, hochwirksame Toxine herzustellen, wobei biologische Sicherheitsmaßnahmen zur Anwendung kommen. Die Zentrale Kommission für die biologische Sicherheit kann unter Berücksichtigung der Wirkungsweise des hochwirksamen Toxins Empfehlungen aussprechen, welche biologischen Sicherheitsmaßnahmen hierfür im Einzelfall geeignet sind;*

**zu a) die Empfängerorganismen sind Organismen der Risikogruppe 3 und geben keine Organismen der Risikogruppe 4 ab,**

Gentechnische Arbeiten sind in der Regel (Ausnahme können "Sternchenorganismen" wie z.B. HBV sein) in die Sicherheitsstufe 3 einzustufen, wenn der Empfängerorganismus ein Organismus der Risikogruppe 3 ist und keine Organismen der Risikogruppe 4 abgibt.

**zu b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 3 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 4 abgibt;**

Wenn der Spenderorganismus ein Organismus der Risikogruppe 3 ist, sind die Arbeiten in den folgenden Fällen in die Sicherheitsstufe 3 einzustufen (in Analogie zur Einstufung bei der Sicherheitsstufe 2):

- wenn das gesamte Genom des Spenders übertragen werden soll
- wenn der zu übertragende Genomabschnitt nicht charakterisiert ist
- wenn Nukleinsäureabschnitte, die das Gefährdungspotenzial bestimmen, übertragen werden sollen.

Die drei genannten Voraussetzungen gelten unabhängig davon, ob der Empfängerorganismus in die Risikogruppe 1, 2 oder 3 eingestuft ist.

#### **4.4 Sicherheitsstufe 4**

Gentechnische Arbeiten mit Mikroorganismen und Zellkulturen im Laborbereich sind der Sicherheitsstufe 4 zuzuordnen, wenn sie mit einem hohen Risiko oder dem begründeten Verdacht eines solchen Risikos für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt verbunden sind. Hierfür kommen insbesondere Arbeiten mit Viren der Risikogruppe 4 oder defekten Viren dieser Risikogruppe in Gegenwart von Helferviren in Betracht. Die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit gibt unter Berücksichtigung der in den §§ 9 bis 13 und in ihren Anhängen für diese Sicherheitsstufe aufgeführten Beispiele Empfehlungen ab, welche Sicherheitsmaßnahmen im Einzelfall für eine gentechnische Arbeit dieser Stufe erforderlich sind.

Wie auch in der amtlichen Begründung zur Gentechnik-Sicherheitsverordnung (Fassung vom 24.10.1990) aufgeführt, haben der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit bisher keine Anträge auf Arbeiten dieser Sicherheitsstufe vorgelegen. Es fehlen daher bis jetzt die notwendigen Anhaltspunkte, um solche Arbeiten allgemein zu beschreiben und einzuordnen. Ein solches Verfahren ist daher in jedem Einzelfall mit der zuständigen Behörde und der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit abzusprechen. Dies gilt nicht nur für die Einstufung der Arbeit, sondern auch für die einzuhaltenden Sicherheitsmaßnahmen, die auf die speziellen Eigenschaften des betreffenden Virus abzustellen sind.

## **5. Gentechnische Arbeiten mit Tieren und Pflanzen**



Die im folgenden dargestellten Sicherheitseinstufungen beziehen sich auf Verfahren der Veränderung genetischen Materials gem. der Begriffsdefinition des § 3 GenTG. Viele Verfahren zur direkten Einbringung genetischen Materials in Tiere wie z.B. intramuskuläre Injektion rekombinanter DNA fallen jedoch nicht unter diese Definition (siehe hierzu auch [Stellungnahme der ZKBS zum Einbringen rekombinanter DNA in Tiere](#) ).

Ebenfalls nicht eingegangen wird auf Infektionsversuche an Tieren mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen. Bei solchen Versuchen ist die Einstufung der gentechnischen Arbeit primär abhängig von der Risikogruppe der benutzten Mikroorganismen. So geht die ZKBS in einer entsprechenden [Stellungnahme zur Infektion von Tieren mit gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 2](#)) davon aus, dass bei Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 in den meisten Fällen für den Infektionsversuch sogar eine neuerliche Stellungnahme durch die ZKBS entbehrlich ist, da die Einstufung der Mikroorganismen einfach übernommen werden kann. Diese Einstufung wurde jedoch bereits im letzten Kapitel ausführlich besprochen.

## **5.1 Sicherheitsstufe 1**

Die Arbeiten sind der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a) Die Empfängerorganismen sind Tiere oder Pflanzen, von denen keine schädlichen Auswirkungen auf die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz zu erwarten sind,*
- b) virale Vektoren sollen nicht horizontal übertragbar sein*
- c) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus bei gentechnischen Arbeiten nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgibt;*

Höhere Tiere und Pflanzen sind gemäß Anhang I Teil B der GenTSV in der Fassung vom 24.10.1990 in die Risikogruppe 1 eingestuft. Dies bedeutet, dass für die Sicherheitseinstufung der gentechnischen Arbeit in erster Linie das Gefährdungspotenzial der zu übertragenden Nukleinsäure und des eventuell benutzten Vektors heranzuziehen ist. Handelt es sich bei der zu übertragenden Information ebenfalls um Gene von höheren Tieren (hierzu zählt auch der Mensch) oder Pflanzen, so kann die Arbeit, falls keine Vektoren eingesetzt werden in die Sicherheitsstufe 1 klassifiziert werden. Dies trifft bei den zumeist durch Mikroinjektion hergestellten transgenen Tieren zu.

**Beispiel:** Thema: Untersuchung des Proteolipid Protein (PLP)-Transgens in der Mausmutante Jimpy

Spender	Maus, Stamm C57BL/6-J (eine genomische Bank liegt in <i>E. coli</i> K12 vor)	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	a) <i>E. coli</i> K12 mit dem Vektor SuperCos 1	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) Maus Stamm CB6 bzw. Kreuzungen aus CB6 und Jimpy	<b>Risikogruppe 1</b>
GVO	a) <i>E. coli</i> K12 einschließlich des Vektors SuperCos 1 mit dem PLP-Gen der Maus Ein charakterisierter Nukleinsäureabschnitt des Genoms der Maus ohne pathogenes Potenzial wird mittels	<b>Risikogruppe 1</b>

eines Vektors in *E. coli* K12 amplifiziert.

b) Maus einschließlich des PLP-Gens der Maus

Der mit Hilfe des unter a) beschriebenen gentechnisch veränderten Organismus amplifizierte Nukleinsäureabschnitt des Genoms der Maus wird ohne Vektor mittels Mikroinjektion in Zygoten der Maus eingeführt.

**Risikogruppe 1**

Einstufung der Arbeit

Spender- und Empfängerorganismen sind Organismen der Risikogruppe 1, von Ihnen sind keine schädlichen Auswirkungen auf die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 GenTG zu erwarten. Der gentechnisch veränderte Organismus gibt keine gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppen 2-4 ab. Der gentechnisch veränderte Organismus überschreitet nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 GenTSV nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1.

**Sicherheitsstufe 1**

Werden zur Herstellung der transgenen Tiere Vektoren benutzt, so liegt der wesentliche Unterschied zwischen den Sicherheitsstufen 1 und 2 darin, ob der zur Einführung des Gens benutzte Vektor auf das Tier beschränkt bleibt (Sicherheitsstufe 1) oder horizontal übertragbar ist (Sicherheitsstufe 2). Entscheidend für die Einstufung in die Sicherheitsstufe 1 ist also, ob das in die Keimbahn eingeführte Merkmal nur vertikal (auf die Nachkommen) weitergegeben werden kann und damit kontrollierbar bleibt.

Auch die Herstellung transgener Pflanzen unter Verwendung von Spender- und Empfängerorganismen der Risikogruppe 1 wird in die Sicherheitsstufe 1 klassifiziert, wenn keine horizontal übertragbare Vektoren eingesetzt werden. Voraussetzung ist weiterhin, dass auch alle Empfängerorganismen von notwendigen Zwischenschritten in die Risikogruppe 1 gehören. Dies ist z.B. beim Einsatz von *Agrobacterium tumifaciens* und binären "disarmed" Ti-Plasmiden, dem am häufigsten benutzten System zur Übertragung von Genen auf Pflanzen, der Fall (siehe [Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung von \*Agrobacterium tumefaciens\*](#)). Aus der T-Region des binären (repliziert in *E. coli* und *A. tumifaciens*) Ti-Plasmids wurden die tumorinduzierenden Gene deletiert. An der Klonierungsstelle liegt ein in Pflanzen wirksamer Promotor (z.B. von CaMV). Das Plasmid ist mobilisierbar, kodiert aber nicht für eine eigene Transferfunktion.

**Beispiel:** Thema: von Saccharose-Phosphat Synthase (SPS) in Tabak

Spender	<i>Spinacia oleracea</i> (Spinat); Expressionsbibliothek in Phage lambda Zap.II	<b>Risikogruppe 1</b>
Empfänger	a) <i>E. coli</i> K12	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) <i>Agrobacterium tumifaciens</i>	<b>Risikogruppe 1</b>
	c) <i>Nicotiana tabacum</i> (Tabak)	<b>Risikogruppe 1</b>
Vektor	Ti-Plasmid pGV 2260 mit einer pflanzlichen Expressionskassette aus 35S-CaMV-Promotor, Struktur-Gen (SPS) und OCS-Terminator aus <i>A. tumifaciens</i> . Das Plasmid wird in einen ersten Empfänger ( <i>E. coli</i> K12 mit Helferplasmid für die Mobilisierung nach <i>A. tumifaciens</i> ) eingeführt. In Anwesenheit von <i>A. tumifaciens</i> wird das binäre Plasmid dorthin übertragen. Da <i>A. tumifaciens</i> das natürliche Ti-Plasmid mit den Virulenz-Genen	

	enthält, kann die rekombinante T-Region nach Infektion Pflanzenzellen transformieren.	
GVO	a) <i>E. coli</i> K12 mit SPS-Gen	<b>Risikogruppe 1</b>
	b) <i>A. tumifaciens</i> mit SPS-Gen	<b>Risikogruppe 1</b>
	c) <i>Nicotiana tabacum</i> (pflanzliches Gewebe und daraus regenerierte Pflanzen, die frei sind von <i>A. tumifaciens</i> , mit ins Genom integriertem SPS-Gen)	<b>Risikogruppe 1</b>
Einstufung der Arbeit	Sowohl der Spender- als auch alle Empfängerorganismen (auch die der Zwischen-klonierungsschritte) sind Organismen der Risikogruppe 1. Das im ersten Arbeitsschritt benutzte Helferplasmid ermöglicht lediglich den Transfer des Ti-Plasmidvektors aus <i>E. coli</i> in <i>A. tumifaciens</i> . Das natürliche Ti-Plasmid ermöglicht die Übertragung des SPS-Gens auf das pflanzliche Genom. Ein weiterer horizontaler Gentransfer wird durch das Fehlen von <i>A. tumifaciens</i> in den regenerierten Pflanzen vermieden. Die gentechnisch veränderten Organismen überschreiten nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 2 Satz 2 nicht das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 1 und geben keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen ab	<b>Sicherheitsstufe 1</b>

## 5.2 Sicherheitsstufe 2

Die Arbeiten sind der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a) *Die Empfängerorganismen sind Tiere oder Pflanzen, von denen höchstens ein geringes Risiko für die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz zu erwarten ist,*
- b) *Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus bei gentechnischen Arbeiten nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 2 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen höherer Risikogruppen abgibt;*

Die Einstufung von gentechnischen Arbeiten mit Tieren und Pflanzen in die Sicherheitsstufe 2 ist fast immer unter dem Gesichtspunkt der Abgabe von Organismen der Risikogruppe 2 zu sehen. Hierbei sind zwei Gruppen von Experimenten zu unterscheiden:

1. Infektionsversuche an Tieren oder Pflanzen mit gentechnisch veränderten Organismen. Als Beispiel seien Infektionen von Mäusen mit den zuvor erwähnten *Listeria monocytogenes* oder mit Vaccinia-Viren genannt. Da die infizierten Tiere humanpathogene gentechnisch veränderte Bakterien bzw. Viren abgeben können, müssen die Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 klassifiziert werden. Gleiches gilt für die Infektion von Pflanzen mit gentechnisch veränderten pflanzenpathogenen Erregern. Zur Einstufung von Mikroorganismen, die Pflanzenkrankheiten erzeugen können, sei auf die Merkblätter

"Sichere Biotechnologie" der BG-Chemie [2,3,4,5,7] sowie auf die [Stellungnahme der ZKBS zu Kriterien der Bewertung und der Einstufung von Pflanzenviren, phytopathogenen Pilzen und phytopathogenen Bakterien](#) verwiesen.

2. Erzeugung von Tieren, die transgen für vollständige Virusgenome sind. In diesen Fällen sind die transgenen Tiere in die Risikogruppe der Spenderviren einzuordnen. Die gentechnische Arbeit ist in die entsprechende Sicherheitsstufe einzustufen. Somit sind gentechnische Arbeiten, bei denen vollständige Genome von Viren der Risikogruppe 2 auf Tiere übertragen werden, in die Sicherheitsstufe 2 zu klassifizieren, da alle Gene des Virus exprimiert und somit Viruspartikel der Risikogruppe 2 abgegeben werden können.

### **5.3 Sicherheitsstufe 3**

Die Arbeiten sind der Sicherheitsstufe 3 zuzuordnen, wenn sie die folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a) Die Empfängerorganismen sind Tiere oder Pflanzen, von denen höchstens ein mäßiges Risiko für die Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz zu erwarten ist,*
- b) Vektoren und aus dem Spenderorganismus überführte sowie synthetische Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass der gentechnisch veränderte Organismus bei gentechnischen Arbeiten nach einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 2 das Gefährdungspotenzial von Organismen der Risikogruppe 3 nicht überschreitet und keine gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 4 abgibt;*

### **5.4 Sicherheitsstufe 4**

Die Arbeiten sind der Sicherheitsstufe 4 zuzuordnen, wenn für gentechnische Arbeiten im Laborbereich die Voraussetzungen des Absatzes 3 Nr. 4 oder für gentechnische Arbeiten im Produktionsbereich die Voraussetzungen des Absatzes 2 Nr. 2 Buchstabe c erfüllt sind.

## **Literatur**

[1] Eberbach, W.; Lange, P. (1993) Gentechnikrecht C.F.Müller Juristischer Verlag, Heidelberg

Merkblätter "Sichere Biotechnologie" der BG-Chemie,

Jedermann Verlag, Heidelberg

- [2] B004: Eingruppierung von Viren
- [3] B005: Eingruppierung von Parasiten
- [4] B006: Eingruppierung von Bakterien
- [5] B007: Eingruppierung von Pilzen
- [6] B008: Einstufung gentechnischer Arbeiten
- [7] B009: Eingruppierung von Zellkulturen
- [8] Hacker,J.; Ott,M.; Tschäpe,H. (1991) Das Problem der Pathogenität von *Escherichia coli* und seine Bedeutung für die rekombinante DNA-Technologie BIOforum 14, 150-157