

**LGL**

## 6. Fachtagung Gentechnik

in Oberschleißheim  
am 17. November 2015

Band 9 der Schriftenreihe  
Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz

Für eine bessere Lesbarkeit haben wir bei manchen Personenbezeichnungen auf ein Ausschreiben der weiblichen Form verzichtet. Selbstverständlich sind in diesen Fällen Frauen und Männer gleichermaßen gemeint.

Wir danken dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) für die Unterstützung der 6. Fachtagung Gentechnik.

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)  
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131 6808-0  
Telefax: 09131 6808-2102  
E-Mail: [poststelle@lgl.bayern.de](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)  
Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)  
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Druck: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg  
Stand: Juni 2016

Autoren: Alle Manuskripte sind namentlich gekennzeichnet.  
Die Autoren sind für den Inhalt ihrer Manuskripte sowie  
die rechtmäßige Verwendung der Bilddateien selbst  
verantwortlich. Der Inhalt der Manuskripte stellt nicht  
unbedingt die Meinung des Herausgebers dar.

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

PD Dr. Armin Baiker  
Telefon: 09131 6808-5291  
E-Mail: [armin.baiker@lgl.bayern.de](mailto:armin.baiker@lgl.bayern.de)

Dr. Ulrich Busch  
Telefon: 09131 6808-5234  
E-Mail: [ulrich.busch@lgl.bayern.de](mailto:ulrich.busch@lgl.bayern.de)

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit  
alle Rechte vorbehalten

Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

ISSN 1866-7767	Druckausgabe
ISSN 1866-7775	Internetausgabe
ISBN 978-3-945332-61-0	Druckausgabe
ISBN 978-3-945332-62-7	Internetausgabe

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung – auch von Teilen – wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars gebeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung.  
Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter [direkt@bayern.de](mailto:direkt@bayern.de) erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	4
1 Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Anlagen .....	6
2 Betrieb einer „S4-Anlage“ – (fast) 10 Jahre praktische Erfahrungen aus Sicht einer Gentechnikbehörde .....	17
3 Die Einhaltung des Gentechnikgesetzes im Produktionsbereich: Vorstellung einer Insulin-Produktionsanlage .....	29
4 Risikobewertung gentechnischer Arbeiten durch die ZKBS /die ZKBS als Institution.....	40
5 Was ist Synthetische Biologie – und wie wird sie reguliert? .....	46
6 Klinische Prüfung mit GVO-haltigen Prüfpräparaten .....	62
7 Zielgerichtetes Genom-Editieren mit Designer-Nukleasen.....	74
8 Neue Züchtungstechniken bei Pflanzen.....	81
9 Gentransfer durch virale Vektoren .....	90
10 Droplet digital PCR (ddPCR) in der Virusanalytik.....	107

## Vorwort

Sehr geehrte Damen und Herren,  
sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,



das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) veranstaltete am 17. November 2015 an der Dienststelle Oberschleißheim die 6. Fachtagung Gentechnik. Der Schwerpunkt der gut besuchten Tagung lag dabei auf den Tätigkeiten in gentechnischen Anlagen. Zu diesem Thema referierten verschiedene Dozenten aus Behörden, Universitäten sowie der Industrie. Die 6. Fachtagung Gentechnik richtete sich insbesondere an Fachpersonal aus Wissenschaft, Behörden und der Praxis.

Der erste Themenblock der Fachtagung umfasste Vorträge über grundsätzliche Fragen bei gentechnischen Anlagen. Anhand anschaulicher Beispiele wurden technische und organisatorische Sicherheitsmaßnahmen sowie Arbeitssicherheitsmaßnahmen für gentechnische Anlagen vorgestellt und über praktische Erfahrungen im Zusammenhang mit dem (fast) 10-jährigen Betrieb der „S4-Anlage“ in Marburg aus Sicht einer Gentechnikbehörde berichtet. Die Vorstellung einer der weltweit größten Insulinproduktionsanlagen bildete den Abschluss des ersten Themenblocks.

Der zweite Themenblock befasste sich insbesondere mit konkreten Tätigkeiten in gentechnischen Anlagen. Es wurde über die Arbeit der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) und die Grundlagen der Risikobewertung gentechnischer Arbeiten berichtet. Ein Vortrag befasste sich mit den Rechtsgrundlagen für klinische Prüfungen mit GVO-haltigen Prüfpräparaten und der Verwaltungsvereinbarung zwischen dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) und dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Ein weiterer Beitrag widmete sich der Frage, was „Synthetische Biologie“ ist und wie diese in Deutschland reguliert wird. Vorträge zu den aktuellen Themen neuer Züchtungstechniken bei Pflanzen, zielgerichteten Genom-Editierens mit Designer-Nukleasen sowie Gentransfer durch virale Vektoren rundeten den zweiten Themenblock ab.

Der letzte Themenblock befasste sich mit aktuellen Entwicklungen in der Analytik. Die Teilnehmer erhielten einen Überblick über Anwendungen und Datenanalysen im Bereich der *Next Generation Sequencing-* (NGS-) Technologie und dem Einsatz der *droplet digital PCR* (ddPCR) in der Virusanalytik am LGL.

Mein besonderer Dank gilt dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) für die konsequente Förderung wissenschaftlicher Projekte auf dem Gebiet der analytischen Gentechniküberwachung und gentechnischen Sicherheitsforschung sowie für die finanzielle Unterstützung dieser 6. Fachtagung Gentechnik.

Ihnen wünsche ich viel Spaß beim Lesen und wertvolle Hinweise für Ihre Arbeit.

Erlangen, im Juni 2016

Ihr

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Zapf', with a stylized, cursive script.

Dr. Andreas Zapf

*Präsident des Bayerischen Landesamtes für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*

# 1 Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Anlagen

Dipl.-Ing. (FH) Michael Hirsch

Referat KV/5 Sicherheit, Abfall und Umwelt

Universitätsklinikum Regensburg

Eine gentechnische Anlage ist definiert im Gentechnikgesetz (GenTG) §3 Aufzählungspunkt 4:

„Einrichtung, in der gentechnische Arbeiten im Sinne der Nummer 2 im geschlossenen System durchgeführt werden und bei der spezifische Einschließungsmaßnahmen angewendet werden, um den Kontakt der verwendeten Organismen mit Menschen und der Umwelt zu begrenzen und ein dem Gefährdungspotenzial angemessenes Sicherheitsniveau zu gewährleisten“

Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen sind nach Maßgabe des GenTG Sicherheitsstufen zuzuordnen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung GenTSV). Für jede der vier Sicherheitsstufen sind in der GenTSV Sicherheitsmaßnahmen vorgeschrieben.

Generell wird unterschieden zwischen

- technischen,
- organisatorischen und
- Arbeitssicherheitsmaßnahmen.

Außerdem ist vor Beginn der Arbeiten eine Gefährdungsbeurteilung gem. §5 Arbeitsschutzgesetz (ArbSchG) zu erstellen und Schutzmaßnahmen festzulegen, welche ebenfalls technische und organisatorische Maßnahmen, die Bereitstellung von persönlicher Schutzausrüstung oder schlichtweg nur hinweisende Sicherheitstechnik umfassen.

Sehr oft verwendet werden hier Hinweise wie z. B. „Vorsicht Stufe“ oder Schwarz-Gelbe-Bänder, die vor Stolperstellen oder niedrigen Kanten warnen. Die Praxis zeigt,

dass sich Unfälle mit dieser Kennzeichnung nur minimal oder gar nicht vermeiden lassen.

In diesem Exposé werden auszugsweise die vorgeschriebenen Sicherheitsmaßnahmen der GenTSV speziell für Laboratorien beschrieben und die kleinen Fallstricke der täglichen Praxis beleuchtet.

Wie im Arbeitsschutz üblich, werden gemäß der Maßnahmenhierarchie zuerst die technischen und folgend die organisatorischen Sicherheitsmaßnahmen betrachtet: hierzu zählen technische und bauliche Maßnahmen, die ein unbeabsichtigtes Freiwerden der Gentechnisch veränderten Organismen (GVO) begrenzen oder verhindern und das Personal vor möglichen von GVO ausgehenden Gefahren schützen.

Die technischen und baulichen, wie auch organisatorischen Maßnahmen „sind in der Regel so zu gestalten, dass die persönlichen Schutzausrüstungen der Beschäftigten nur als Ergänzung zu diesen Maßnahmen erforderlich sind“ (§9 (3) GenTSV).

Das Gesetz regelt also eindeutig, dass der Beschäftigte geschützt werden muss. Die häufig herrschende Ansicht von Forschungs- oder Arbeitsgruppenleitern, dass unter Einhaltung der vorgeschriebenen Sicherheitsmaßnahmen die Zellkultur vor Verunreinigungen aus der Umgebung geschützt ist, ist daher generell falsch, da diese zum Schutz des Beschäftigten ergriffen werden.

## **1.1 Technische Maßnahmen**

### **1.1.1 Zugang; Türen**

Die GenTSV fordert, dass Türen zu gentechnischen Anlagen geschlossen sind, nach außen aufschlagen und Sichtfenster aufweisen müssen (Abbildungen 1.1 und 1.2; Bildquelle UKR). Ein freier Blick ins Labor vom Gang aus ermöglicht es, verunglückte Personen zu erkennen, ohne das Labor betreten zu müssen.



Abbildung 1.1: Türen in gentechnischen Anlagen sind geschlossen zu halten.



Abbildung 1.2: Türen in gentechnischen Anlagen müssen Sichtfenster aufweisen.

Oftmals werden diese Türen als praktische Halter für Laborkittel verwendet. Um eine scheinbare Trennung von Straßen-, und Laborkleidung zu erreichen, werden an den Türflächen der Gangseite Kleiderhaken angebracht. Das die Kittel eine nicht zulässige Brandlast auf Fluren und Rettungswegen sind, wird dabei gerne außer Acht gelassen.

Bei der Planung muss bereits ein geeigneter Platz für Umkleiden mit berücksichtigt werden.

### 1.1.2 Lüftung

Im Maßnahmenkatalog der GenTSV für die Sicherheitsstufen 1-2 ist eine Lüftungsanlage nicht explizit vorgeschrieben. Die Notwendigkeit einer Lüftungsanlage ergibt sich aus der Umsetzung der Technischen Regeln für Gefahrstoffe (TRGS) 526 – für Laboratorien, wenn in einem Labor ein Gefahrstoff verwendet wird.

Eine ordnungsgemäß funktionierende Lüftungsanlage ist eine Grundvoraussetzung um den Schutz der Mitarbeiter zu gewährleisten. Die wiederkehrende Prüfung gem.

§14 Betriebssicherheitsverordnung (BetrSichV) und damit auch die Kontrolle des Luftwechsels der Lüftungsanlage, findet i.d.R. einmal jährlich durch beauftragtes Fachpersonal statt.

In der Unfallverhütungsvorschrift BGI/GUV-I 850-0 „Sicheres Arbeiten in Laboratorien“ ist im Anhang 3, Punkt 2 „Wiederkehrende Prüfungen im Labor“ eine tägliche Sichtprüfung gefordert. Praxis ist aber leider, dass diese Sichtprüfung nicht durchgeführt und damit auch ein Ausfall der Lüftungsanlage nicht bemerkt wird.

Eine besondere Gefahr geht dabei von zuschaltbaren Lüftungen aus. Generell sollte eine Lüftung nicht zuschaltbar sein. Bei einer Umwandlung von Büro-, oder Lagerräumen in Laboratorien, kann dies aber gerade in älteren Gebäuden vorkommen. Einfache Hilfsmittel, wie leichte Papierstreifen an den Auslässen der Lüftungsanlage ermöglichen eine schnelle Überprüfung der Funktion (siehe Abbildung 1.3, Bildquelle UKR). Klebestreifen zur Blockade der Ein- und Ausschalter für Lüftungsanlagen sind dagegen eher ungeeignet, den dauerhaften Betrieb der Lüftungsanlage sicher zu stellen. (siehe Abbildung 1.4, Bildquelle UKR).



Abbildung 1.3: Papierstreifen an den Auslässen von Lüftungsanlagen ermöglichen eine schnelle Funktionsüberprüfung.



Abbildung 1.4: Klebestreifen zur Blockade der Ein- und Ausschalter für Lüftungsanlagen sind eher ungeeignet, den dauerhaften Betrieb der Lüftungsanlage sicherzustellen.

### 1.1.3 Digestorien und Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke

Die BGI/GUV-I 850-0 fordert ebenfalls die Überprüfung von Digestoren und Mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken vor der Benutzung. Letztere werden gerne als Ablagefläche für gerade nicht benötigte Kartonagen oder die weit über den Tagesbedarf gelagerten Packungen von z.B. Schutzhandschuhen verwendet, was zu einer Einschränkung des Luftstromes innerhalb der Sicherheitswerkbank führt. Deswegen sind die Luftauslässe auf der Sicherheitswerkbank und die Lüftungsschlitze innerhalb der Selbigen unbedingt frei zu halten (Abbildung 1.5, Bildquelle UKR).



Abbildung 1.5: Die Luftauslässe auf der Sicherheitswerkbank und die Lüftungsschlitze in der Selbigen sind unbedingt frei zu halten.



Abbildung 1.6: Durch die Verwendung von aerosoldichten Zentrifugen können Kontaminationen verhindert werden.

## 1.2 Bauliche Maßnahmen

### 1.2.1 Wände, Böden, Arbeitsflächen

Generell ist darauf zu achten, Aerosole nicht im Laboratorium frei zu setzen, um unnötige Dekontaminationen zu vermeiden. Durch die Verwendung von aerosoldichten Gerätschaften wie z.B. aerosoldichten Zentrifugen (Abbildung 1.6, Bildquelle UKR) und das Arbeiten unter dem Digestorium oder der Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank kann eine Kontamination verhindert werden.

Für den Fall einer Kontamination müssen Arbeitsflächen sowie die an die Arbeitsflächen angrenzenden Fußböden und Wandflächen leicht zu reinigen sein. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass die Übergänge Arbeits-, zu Wandfläche und Boden zu Wandfläche regelmäßig Anlass zu Beanstandungen geben. Es ist zweckmäßig, den Bodenbelag in Wannenform auszuführen, um Risse in den sonst benötigten Silikonfugen zu vermeiden (Abbildung 1.7, Bildquelle UKR). Ein besonderes Augenmerk ist bei Kontrollen auf die Silikonfugen an den Übergängen der Arbeits-, zur Wandfläche zu richten (Abbildung 1.8, Bildquelle UKR). Nach einiger Zeit entstehen hier Risse oder Öffnungen. Ein leichtes und effizientes Reinigen oder Dekontaminieren ist dann nicht mehr gewährleistet.



Abbildung 1.7: Es ist zweckmäßig, den Bodenbelag in Wannenform auszuführen, um Risse in den sonst benötigten Silikonfugen zu vermeiden.



Abbildung 1.8: Ein besonderes Augenmerk ist bei Kontrollen auf die Silikonfugen an den Übergängen der Arbeits-, zur Wandfläche zu richten.

### 1.2.2 Waschbecken

Im Bereich der geforderten Waschbecken ist es sinnvoll die benötigten Wasch- und Desinfektionsmittel erreichbar für die Mitarbeiter anzubringen (Abbildung 1.9, Bildquelle UKR). Neben dem Waschbecken ist ein Papierhandtuchspender zu installieren. In der Abbildung ist die Ausführung des Wasserhahnes für die Sicherheitsstufe 2 (Bedienung ohne Handberührung) zu sehen. Es empfiehlt sich bereits bei der Planung einen geeigneten Platz für das Waschbecken und die geforderten Spender für Reinigungs-, Desinfektions-, und Hautpflegemittel zu finden.



Abbildung 1.9: Im Bereich der geforderten Waschbecken ist es sinnvoll, die benötigten Wasch- und Desinfektionsmittel erreichbar für die Mitarbeiter anzubringen.



Abbildung 1.10: Notduschen müssen frei zugänglich sein!

### 1.2.3 Not- und Augenduschen

Not- und Augenduschen sollten an einer schnell und sicher zu erreichenden Stelle eingebaut werden. Die Augendusche ist, meist herausziehbar, am Waschbecken integriert. Aus Kostengründen werden die Wasserschläuche kurz ausgeführt. Sinnvoll ist, dass die Augendusche auch bei am Boden liegenden Personen verwendet werden kann. Personen mit Säure oder einem anderen Gefahrstoff im Auge sind nur schwer zu beruhigen. Daher ist es einfacher die verunfallte Person auf den Boden zu legen und mit der Augendusche das Auge der liegenden Person zu wässern. Daher muss die Augendusche mit einem bis zum Boden reichenden Wasserschlauch installiert werden.

Auf den Gängen montierte Notduschen müssen ebenfalls frei zugänglich sein. Gänge vor Laboratorien werden gerne gesetzeswidrig als „Abstellraum“ genutzt. Daher besteht die Gefahr, die Notdusche nicht benutzen zu können. Besonders unangenehm wird es für die kontaminierte Person wenn sie Gefahr läuft bei der Benutzung der Notdusche zusätzlich noch einen Stromschlag zu erhalten, wenn z.B. in unmittelbarer Nähe Steckdosen montiert sind oder angeschlossene elektrische Geräte aufgestellt sind. (Abbildung 1.10, Bildquelle UKR).

## 1.3 Organisatorische Maßnahmen

### 1.3.1 Kennzeichnung, Aufzeichnungen, Betriebsanweisung, Notfallpläne

Die oben aufgeführten Beispiele und Bilder lassen unschwer erkennen, dass neben den technischen und baulichen Maßnahmen der Ablauf in den gentechnischen Anlagen organisatorisch zu regeln ist.

Auf die Zutrittsbeschränkung zu gentechnischen Anlagen (Abbildung 1.11; Bildquelle UKR) ist an den Zugängen zur gentechnischen Anlage hinzuweisen. Anhang III. A Nr. 1 GenTSV (Abbildung 1.12; Bildquelle UKR) schreibt die anzubringende Kennzeichnung an den Eingangsbereichen der gentechnischen Anlage vor. Zugangstüren müssen als solche noch zu erkennen sein und dürfen nicht als „schwarzes Brett“ für Aushänge missbraucht werden.



Abbildung 1.11: Auf die Zutrittsbeschränkung zu gentechnischen Anlagen ist an den Zugängen hinzuweisen.



Abbildung 1.12: Kennzeichnung an den Eingangsbereichen zur gentechnischen Anlage gemäß Anhang III.A Nr. 1 GenTSV.

Neben den geforderten Aufzeichnungen der gentechnischen Arbeiten müssen Notfallpläne inkl. der Verhaltensregeln im Brandfall und Betriebsanweisungen für das Arbeiten in der Anlage erstellt werden.

Aus dem Internet können Betriebsanweisungen und Notfallpläne heruntergeladen und als Vorlage verwendet werden. Die für die gentechnische Anlage zuständigen Projektleiter, Beauftragte für Biologische Sicherheit und Ersthelfer und deren Telefonnummern, sowie die am Standort geltenden Notfalltelefonnummern müssen in diesen Vorlagen ergänzt bzw. angepasst werden. Häufig wird bei Begehungen festgestellt, dass die verwendeten Vorlagen nicht standortbedingt aktualisiert wurden.

Eine gut durchdachte und ausgearbeitete Betriebsanweisung erleichtert das Anlernen neuer Mitarbeiter und legt das Verhalten im Labor unmissverständlich fest. Diskussionen über verbotene Kaffeetassen im Labor oder das Tragen von Schutzbrillen (gem. BGI/GUV-I 850-0) können damit unter Verweis auf die geltende Betriebsanweisung schnell beendet werden.

Häufig in Frage gestellt oder diskutiert wird auch der Anhang III A Nr.10 GenTSV: „Laborräume sollen aufgeräumt und sauber gehalten werden. Auf den Arbeitstischen sollen nur die tatsächlich benötigten Geräte und Materialien stehen. Vorräte sollen nur in dafür bereitgestellten Räumen oder Schränken gelagert werden.“ Beliebte Ausreden wie: „Ich kann nur 100 Kartons Handschuhe bestellen“ oder „Ich brauche alles ständig was hier im Labor steht“ lässt sich anhand der 2 cm hohen Staubschicht auf den Verpackungen oft nur schwer nachvollziehen. Überfüllte Labortische (Abbildung 1.13; Bildquelle UKR) und Schreibarbeitsflächen (Abbildung 1.14. Bildquelle UKR) stellen eine erhöhte Unfallgefahr bzw. hohe Brandlasten dar und müssen unbedingt vermieden werden.



Abbildung 1.13: Überfüllte Labortische.



Abbildung 1.14: Überfüllte Schreibarbeitsflächen.

## 1.4 Arbeitssicherheitsmaßnahmen

Unter dem Oberbegriff Arbeitssicherheitsmaßnahmen werden im §12 der GenTSV nochmals organisatorische Maßnahmen beschrieben sowie Anforderungen an die Qualifikation der Beschäftigten definiert. Dazu gehören die bereits erwähnten Betriebsanweisungen, Notfallpläne, etc. Eine Arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchung ist den Beschäftigten zu ermöglichen und ein Hygieneplan zu erarbeiten. Anlass für Beanstandungen ist immer wieder der Einsatz und die Verwendung von persönlicher Schutzausrüstung (PSA). Wie überall ist das zur Verfügung stehende Geld knapp. Überlegungen eine PSA von mehreren Personen verwenden zu lassen oder Einmalartikel mehrfach zu verwenden (Abbildung 1.15, Bildquelle UKR), verbietet sich auf Grund der Definition. Persönliche Schutzausrüstung ist nicht teuer und auf den einzelnen Beschäftigten optimiert. Eine Mehrfachverwendung vermindert nicht nur die Schutzwirkung der PSA, sondern ist zudem ein Verstoß gegen die Berufsgenossenschaftliche Regel BGR 195 Benutzung von Schutzhandschuhen.



Abbildung 1.15: Einmalartikel dürfen nicht mehrfach verwendet werden!

Abschließend noch zum §12 Abs.1 GenTSV: Nur für die Tätigkeit ausreichend qualifizierte und unterwiesene Beschäftigte dürfen mit gentechnischen Arbeiten betraut werden. Wichtig ist eine dokumentierte Unterweisung der Mitarbeiter. Vor allem bei mehrsprachigen Teams ist sicherzustellen, dass jeder Beschäftigte die Anweisungen

versteht. Zudem empfiehlt es sich, den Inhalt der Unterweisungen auf den jeweiligen zu Unterweisenden anzupassen. Ein Techniker, der Wartung und Reparatur durchführt, muss nicht im Umgang mit GVO unterwiesen werden.

Die ausreichende Qualifikation kann auf Grund der Ausbildung angenommen werden. Sollten die im Labor Beschäftigten aber nicht gesetzeskonforme Lösungen, wie in Abbildung 1.16 (Bildquelle UKR) zu sehen, realisieren, sollte man die Eignung der Beschäftigten zur Durchführung der Arbeit überdenken.



Abbildung 1.16: Nicht gesetzeskonforme Lagerung von Kartonagen.

Kurz und gut also, der Großteil der zu ergreifenden Sicherheitsmaßnahmen ist bereits in der GenTSV vorgegeben. Die restlichen Maßnahmen sind ganz einfach durch Einsatz des gesunden Menschenverstandes zu finden.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle noch bei den Projektleitern, die durch Umräumen der Laboratorien diese Aufnahmen ermöglicht haben.

## **2 Betrieb einer „S4-Anlage“ – (fast) 10 Jahre praktische Erfahrungen aus Sicht einer Gentechnikbehörde**

Dr. Jens Gerlach

Regierungspräsidium Gießen

### **2.1 Einleitung**

In Deutschland sind aktuell 4 gentechnische Anlagen der Sicherheitsstufe 4 genehmigt, davon wird allerdings nur eine für die Durchführung gentechnischer Arbeiten der Sicherheitsstufe 4 genutzt. Es handelt sich dabei um das Hochsicherheitslabor des Instituts für Virologie der Universität Marburg. Anlässlich des etwa 10 jährigen Bestehens dieser gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 4 wird in diesem Beitrag aus Sicht der zuständigen hessischen Gentechnikbehörde, dem Regierungspräsidium Gießen, ein Resümee zur Genehmigung und dem Betrieb dieser „S4-Anlage“ gezogen.

### **2.2 Kurzvorstellung der gentechnische Anlagen der Sicherheitsstufe 4 in Hessen**

Die gentechnische Anlage ist aus Sicherheitsgründen als ein eigenständiges Gebäude ausgelegt und nur über eine Brücke im 1. Obergeschoß über das benachbart gelegene Institut für Virologie zu betreten (vgl. Abbildung 2.1). Das eigentliche Hochsicherheitslabor ist nach dem „Haus in Haus-Prinzip“ als doppeltes Containment konzipiert. Das primäre, technisch dichte Containment (F90-Edelstahl-Module, Glas G90, alle Durchlässe wie Türen, Fenster und Gasleitungen sind technisch dicht ausgelegt) wird von einem sekundären Containment (ebenfalls F-90/G-90) umgeben.



Abbildung 2.1: Außenansicht des Gebäudes der gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 4 in Marburg.

### **2.2.1 Laborbereich: Unterdruckstaffelung**

Das Hochsicherheitslabor und seine räumliche Umgebung werden im gestaffelten, permanenten Unterdruck betrieben. Aus der Praxis liegen gute Erfahrung für den Betrieb vor: so beträgt der Unterdruckverlust nach 30min weniger als 100Pa, die Dichtigkeit der Anlage nimmt über die Jahre tendenziell eher zu!

### **2.2.2 Einsatzbereitschaft 365/24:**

Das Hochsicherheitslabor ist spiegelsymmetrisch konstruiert – alle sicherheitstechnischen Einrichtungen/Geräte sind redundant vorhanden (vgl. Abbildung 2.2). Jeder der beiden „Anlagenteile“ ist separat nutzbar, d.h. Wartung/Reparatur und Laborarbeiten sind gleichzeitig möglich. Damit wird der Forderung internationaler und nationaler Behörden/Organisationen einer 24-stündigen Einsatzbereitschaft des Labors an 365 Tagen im Jahr Rechnung getragen.

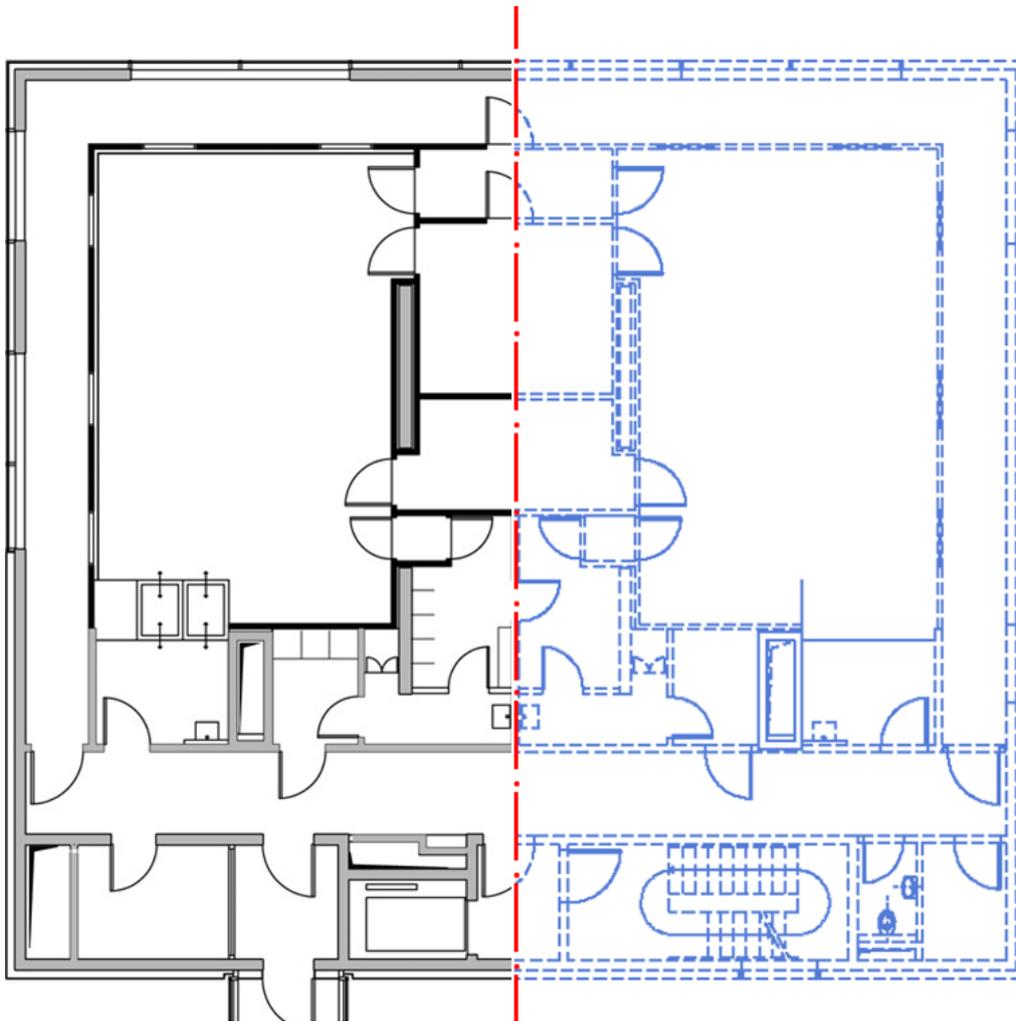


Abbildung 2.2: Grundriss des Hochsicherheitslabors mit Darstellung der spiegelsymmetrischen Konstruktion.

### 2.2.3 Auslastung und Arbeiten

In der gentechnischen Anlage werden fünf gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 4 und vier Projekte der Sicherheitsstufe 3 bearbeitet. Aber auch konventionelle Arbeiten mit sehr hohem Gefährdungspotential (z.B. Diagnostik von Ebola- oder Marburgviren) werden in der gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 4 durchgeführt.

Die „S4-Anlage“ wird intensiv genutzt. Im Jahr werden ca. 2000 „Anzugsstunden“ gezählt, d.h. an allen Werktagen wird ca. 8 Stunden/Tag im Vollschutzbereich gearbeitet. Diese starke, arbeitstägliche Auslastung ist – auch international gesehen - eher

unüblich für Hochsicherheitslabore und unterstreicht die Not- und Zweckmäßigkeit dieser „S4-Anlage“.

## 2.3 Ein gentechnikrechtliche Genehmigungsverfahren für eine S4-Anlage: Was war daran besonders, was haben wir als Gentechnikbehörde daraus gelernt?

### Genehmigungsverfahren zur Errichtung und Betrieb der S4-Anlage der Universität Marburg

Antragstellung gem. § 8 Abs. 1 GenTG auf Errichtung und Betrieb einer S4-Anlage: 18.06.2004



Um Rohbau im Laufe des Genehmigungsverfahrens zu errichten: Antrag auf Teilerrichtung der S4-Anlage (§ 8 Abs. 3 GenTG): 25.7.2005



Genehmigung zur Erstellung des Rohbaus (Teilerrichtungsgenehmigung): 29.08.2005



Erteilung der 2. Teilerrichtung- und der Betriebsgenehmigung: 26. April 2006

Gesamte Verfahrensdauer: 22 Monate



Abbildung 2.3: Darstellung des Ablaufs der Genehmigungsverfahren zur Errichtung und Betrieb der gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 4.

Vom Prinzip her – „verfahrenstechnisch“ - wurde das S4-Genehmigungsverfahren von Seiten des Regierungspräsidiums Gießen wie jedes andere gentechnikrechtliche Genehmigungsverfahren auch geführt (Abbildung 2.3). Aber: es gab sehr viele neue Prüf Aspekte, insbesondere zu den baulich-technischen Sicherheitsmaßnahmen und zur sicheren Organisation des Anlagenbetriebs (Stichwörter Biosafety und Biosecurity). Hier wurde häufig Neuland betreten, da es Standards oder Erfahrungswerte vielfach nicht gab.

Im Genehmigungsverfahren gab es 3 Runden von Behördenbeteiligungen (üblich ist 1 Runde). Neben den Fachbehörden (10) wurden auch das Kompetenzzentrum für hochansteckende Erkrankungen Frankfurt, das Innenministerium, die Polizei und das

hessische LKA beteiligt. Zur baulich-technischen Auslegung und Realisierung wurden 2 externe Gutachter und der TÜV beteiligt. Eine Arbeitsgruppe mit der ZKBS, bestehend aus Mitgliedern der ZKBS, Vertreter der Antragstellerin (Nutzer, Planer, Architekten) und dem Regierungspräsidiums Gießen, begleitete das Verfahren ebenfalls.

Abschließend wurde ein sog. „Qualifizierten Sicherheitskonzept“ erstellt, in dem alle denkbaren Störungsszenarien dargestellt und Antworten gegeben wurden, wie darauf zu reagieren ist.

Die Genehmigung enthält 63 Nebenbestimmungen:

- 11 Bedingungen zum Betrieb der Anlage – diese mussten vor der Aufnahme des Betriebs erfüllt sein
- 41 Auflagen aus dem Bereich Gentechnik
- 11 Auflagen der beteiligten Fachbehörden

Fertigstellung der S4-Anlage im Januar 2007 – Beginn der Prüfphase sog. „Kalter Betrieb“ Dabei wurden die Vorgaben gemäß dem Qualifizierten Sicherheitskonzepts durchgespielt, also z.B. Unfälle, Versagen von relevanten Sicherheitseinrichtungen etc. Außerdem wurden Arbeitsabläufe etabliert und geübt wie z.B. das sichere Ein- und Ausschleusen und alle Arbeiten im Vollschutz (vgl. Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4: Etablieren und üben von Arbeitsabläufen, Durchführung von Übungen im Rahmen des sog. „Kalten Betriebs“.

### 2.3.1 „Heißer Betrieb“ – Aufnahme von gentechnischen Arbeiten

Im Dezember 2007 wurden erste Arbeiten mit konventionellen Erregern der Stufe 4 begonnen. Erste gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 4 wurden im Februar 2008 aufgenommen.

### 2.3.2 Warum lief das Genehmigungsverfahren so vergleichsweise zügig und zielgerichtet ab?

Aus Sicht des Regierungspräsidiums Gießen waren dafür vor allem folgende Gründe maßgeblich:

- Klare interne Organisation und kurze Entscheidungswege auf Seiten der Antragsteller
- Durchdachtes Konzept der S4-Anlage unter Berücksichtigung von Praxiserfahrung aus dem Betrieb von BSL-4-Anlagen außerhalb Deutschlands
- Engagement und Bereitschaft zur Übernahme von Verantwortung bei allen Beteiligten

## 2.4 Welche Erfahrungen macht eine Gentechnikbehörde bei der Überwachung einer S4-Anlage? Welche Besonderheiten gibt es dabei?

Die Behörde kann nicht – wie sonst üblich – im Rahmen ihres Überwachungsauftrags einfach so in die S4-Anlage gehen. Gründe sind die strikten Zugangsregelungen bzw. Zutrittsvoraussetzungen, die obligatorische Nutzung personenbezogener Schutzkleidung (Vollschutz mit externer Luftversorgung) sowie die möglichen Gefährdung bei unerfahrenen Personen. In der hessischen S4-Anlage lassen sich die Arbeitsabläufe allerdings sehr gut durch die Sichtfenster des Umgebungsgangs, der das Hochsicherheitslabor umgibt, überprüfen/beobachten (vgl. Abbildung 2.5). Zudem sind im Kontrollraum der S4-Anlage steuerbare Kameras vorhanden, über die Arbeitsschritte überwacht werden können.



Abbildung 2.5: Beispiele für Beobachtungen durch die Sichtfenster des Umgebungsgangs, der um das eigentliche Hochsicherheitslabor herum läuft.

Hinsichtlich der Kontrolle von Aufzeichnungen, Risikobewertungen und sonstigen Dokumentationen gibt es keine grundsätzlichen Unterschiede beispielsweise zur Überwachung einer S3-Anlage, da die gesetzlichen Anforderungen praktisch identisch sind.

Allerdings ist der Umfang der Prüfunterlagen extrem groß, insbesondere was die technischen Sicherheitsmaßnahmen angeht (ca. 10 Ordner mit aktuellen Prüfprotokollen, Messwerten etc.). Auch die Kontrolle der Einhaltung der Auflagen aus der

Genehmigung ist sehr zeitintensiv. Eine Regelüberwachung vor Ort dauert daher i.d.R. einen ganzen Tag.

Die hessische S4-Anlage wird genehmigungskonform regelmäßig 1x im Jahr für ca. 10 Tage außer Betrieb genommen. In dieser Zeit werden alle notwendigen Wartungs- und Reparaturarbeiten durchgeführt, u.a. auch die Prüfung der Dichtigkeit des Containments über Drucktests, Test der Filterfunktionen, Funktion der Brandmeldeanlage etc.

In dieser Wartungsphase findet immer auch eine Überwachung durch das Regierungspräsidium Gießen statt.

#### **2.4.1 Personenrettungs- und andere Übungen**

Gemäß den Vorgaben aus der Genehmigung sind regelmäßig bestimmte Szenarien als Übungen in und an der S4-Anlage durchzuführen (vgl. Abbildung 2.6). So haben z.B. jährlich alle Zutrittsberechtigten Personen an einer Personenrettungsübung teilzunehmen. Diese Übungen werden von der Gentechnikbehörde ebenfalls beobachtet/überwacht. Für die Gentechnikbehörde ist die Vorbereitung und Durchführung der Überwachung der S4-Anlage mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Da eine intensive fachliche Einarbeitung auf Behördenseite essentiell ist, muss das Regierungspräsidium Gießen „spezielles“ Überwachungspersonal vorhalten, d.h. es ist eine Spezialisierung beim Personal der Gentechnikbehörde hinsichtlich der Anforderungen des Betriebs der S4-Anlage sowie der Prüfparameter erforderlich.



Abbildung 2.6: Eindrücke von Brand- und Personenrettungsübungen in der S4-Anlage.

## 2.5 Praxisccheck: Betrieb der „hessischen“ S4-Anlage :

### 2.5.1 Was läuft gut im Betrieb der „hessischen“ S4-Anlage?

Der Routinebetrieb läuft aus Behördensicht problemlos. Das Anlagenkonzept hat sich in der Praxis bewährt, die baulich-technische Auslegung ist robust und funktioniert gut.

Der Betreiber, die Projektleiter und der BBS sowie die Beschäftigte der S4-Anlage zeigen sich verantwortungsbewusst und agieren professionell.

Positiv ist sicherlich auch, dass die gentechnische Anlage ihren Zweck erfüllt, d.h. sie ist stark ausgelastet und wird intensiv genutzt.

## 2.5.2 Welche Störungen/Probleme gab es bislang im Betrieb der „hessischen“ S4-Anlage?

### 1. Technische Störungen ohne direkten Einfluss auf den sicheren Betrieb des Hochsicherheitslabors

Defekt im Kühlkreislauf eines Durchreicheautoklaven

Defekte Pumpe in der thermischen Inaktivierungsanlage (TIA)

### 2. Beschädigung eines Handschuhs des Vollschutzanzuges – Vorfall mit potentieller Gefährdung

Beim Beladen des Autoklaven wurde durch ein abstehendes Stück Draht an einem Transport-Metallkorb (= für das Autoklavieren von Flüssigkeiten), der äußere, 3. Handschuh des Vollschutzanzuges durchstoßen (Abbildung 2.7). Eine Gefährdung für die betreffende Person bestand aber nicht. Daraufhin wurden folgende Maßnahmen veranlasst: alle Draht-Metallkörbe wurden unverzüglich aus der Anlage entfernt und dürfen nicht mehr verwendet werden.

Das Regierungspräsidium Gießen berät Betreiber von gentechnischen Anlagen in Hessen dahingehend, geeignete Autoklavierbehälter zu verwenden. Gemäß § 28 Abs. 1 GenTG unterrichtete das Regierungspräsidium Gießen das Bundesamt für Verbraucherschutz (BVL) über den Vorfall.

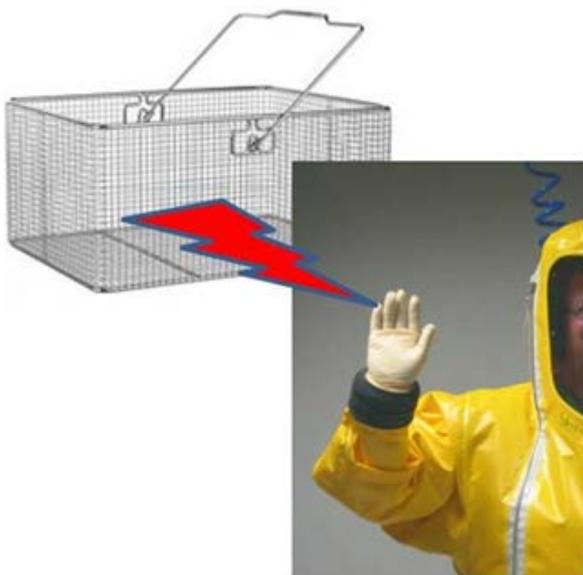


Abbildung 2.7: Beschädigung eines Handschuhs des Vollschutzanzuges durch ein abstehendes Stück Draht.

### **3. Geräteraum der S4-Anlage besteht Drucktest nicht – Vorfall mit potentieller Gefährdung**

Im Rahmen des jährlichen routinemäßigen Drucktest zum Nachweis der geforderten Dichtigkeit des Containments bestand der Geräteraum des Hochsicherheitslabors den Test nicht. Grund war eine Undichtigkeit (etwa 1 x 3 cm große Beschädigung einer Edelstahlplatte des Containments) im Bereich der Rückwand des im Geräteraum betriebenen Laborabzugs.

Ursache für diese Beschädigung war eine Bohrung durch die Seitenwand des Laborabzuges im Zuge des Verlegens eines Starkstromkabel i.R. von Wartungsarbeiten. Der Monteur hat beim Bohren die hinter der Rückwand des Laborabzuges gelegene Edelstahlwand beschädigt. Die betreffende Stelle wurde repariert, ein externer Gutachter bestätigte die fachlich einwandfreie Reparatur und Dichtigkeit. Durchgeführte Drucktests zeigten, dass der Geräteraum nach der Reparatur dicht ist, d.h. die gleiche Dichtigkeit aufweist, wie die übrigen Räume des Containments. Auch in diesem Fall unterrichtete das Regierungspräsidium Gießen gem. § 28 Abs. 1 GenTG das BVL über den Vorfall.

## **2.6 Fazit und Ausblick**

Der Betrieb einer S4-Anlage: was ist aus Sicht des Regierungspräsidiums Gießen dabei wichtig bzw. zu beachten?

- Die Konstruktion und die Auslegung der S4-Anlage müssen vor allem praxisnah sein!
- Weltweit bestehende Anlagenkonzepte und Praxiserfahrungen müssen bei der Planung und dem Bau sowie beim Betrieb der S4-Anlage berücksichtigt werden.
- Auf Seiten des Betreibers der S4-Anlage müssen klare Entscheidungsstränge, Kompetenzen und Finanzmittel vorhanden sein, um ein so ehrgeiziges und aufwändiges Vorhaben wie die Errichtung und den Betrieb einer S4-Anlage stemmen zu können.
- Man braucht engagierte und verantwortliche Personen sowohl auf Seiten der Betreiber/Nutzer der S4-Anlage als auch bei der Gentechnikbehörde.

- Die Gentechnikbehörde muss bereit sein, bei der Genehmigung und der Überwachung von S4-Anlagen neue Wege zu gehen. Sie muss sich zudem klar sein, dass sie dafür personelle Ressourcen für die fachliche Bearbeitung haben und vorhalten muss.
- Um Stör- und Unfälle beherrschen zu können, sollte ein Sicherheitskonzept erstellt werden, in dem alle denkbaren Szenarien beschrieben und die notwendigen Reaktionen vorgegeben sind.
- Alles was man üben kann – Personenrettung, Austritt von GVO, Brand- und andere Schadensfälle – sollte geübt werden.

### **3 Die Einhaltung des Gentechnikgesetzes im Produktionsbereich: Vorstellung einer Insulin-Produktionsanlage**

Dr. Andreas Seiffert-Störiko

Beauftragter für die Biologische Sicherheit (BBS) für die gentechnischen Produktionsanlagen der Firma Sanofi am Standort Frankfurt am Main.

#### **3.1 Einleitung**

Diabetes mellitus ist eine Krankheit, die mit Hilfe biotechnologisch hergestellter Arzneimittel behandelt werden kann. Als Diabetes mellitus bezeichnet man nach der Definition der Nationalen Versorgungsleitlinie Diabetes mellitus Typ 2 (Lit. 1) eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen mit erhöhter Blutzuckerkonzentration (Hyperglykämie) in Folge von Störungen der Insulinsekretion und/oder der Insulinwirkung. Die chronische Hyperglykämie bei Diabetes ist assoziiert mit Langzeitschäden, Funktionsstörungen und Funktionseinschränkungen verschiedener Organe – insbesondere der Augen, Nieren, Nerven und des Herz-Kreislauf-Systems.

Insulin ist ein lebenswichtiges Peptidhormon, das von speziellen Zellen der Bauchspeicheldrüse hergestellt wird und im Körper zusammen mit seinem Gegenspieler Glukagon den Blutzuckerspiegel reguliert. Insulin vermittelt die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Zellen verschiedener Gewebe wie z. B. Muskel-, Fett- und Leberzellen. Typ-2-Diabetes ist durch eine im Laufe des Lebens entstehende Insulinresistenz in Verbindung mit eher relativem als absolutem Insulinmangel gekennzeichnet. Davon unterschieden wird der (seltener) Typ-1-Diabetes, einem genetisch bedingten Autoimmunprozess mit absolutem Insulinmangel. Beide Krankheitsbilder rufen eine diabetische Stoffwechselstörung hervor, die u. a. mit Insulin behandelt wird (Lit. 2).

Das Hormon Insulin war nicht nur das erste Protein, dessen chemische und räumliche Struktur aufgeklärt werden konnte, sondern auch das erste mit Hilfe der Gentechnik hergestellte Arzneimittel.

### 3.2 Molekulare Struktur des Insulinmoleküls

Das menschliche Insulin ist – verglichen z. B. mit Antikörpern – ein relativ kleines Protein aus 51 Aminosäuren, die in zwei Ketten (A- und B-Kette) angeordnet sind. Insuline übernehmen auch in vielen Tieren, etwa Schweine und Rinder, eine vergleichbare Aufgabe wie beim Menschen. Die tierischen Insuline unterscheiden sich geringfügig in ihrer Primärstruktur, also in der Abfolge und Art der Aminosäuren. So sind beim Rinderinsulin drei, beim Schweineinsulin lediglich eine Aminosäure, verglichen mit der menschlichen Struktur, unterschiedlich. Damit sind tierische Insuline Analoga zum menschlichen Insulin und können grundsätzlich von Menschen verwendet werden.

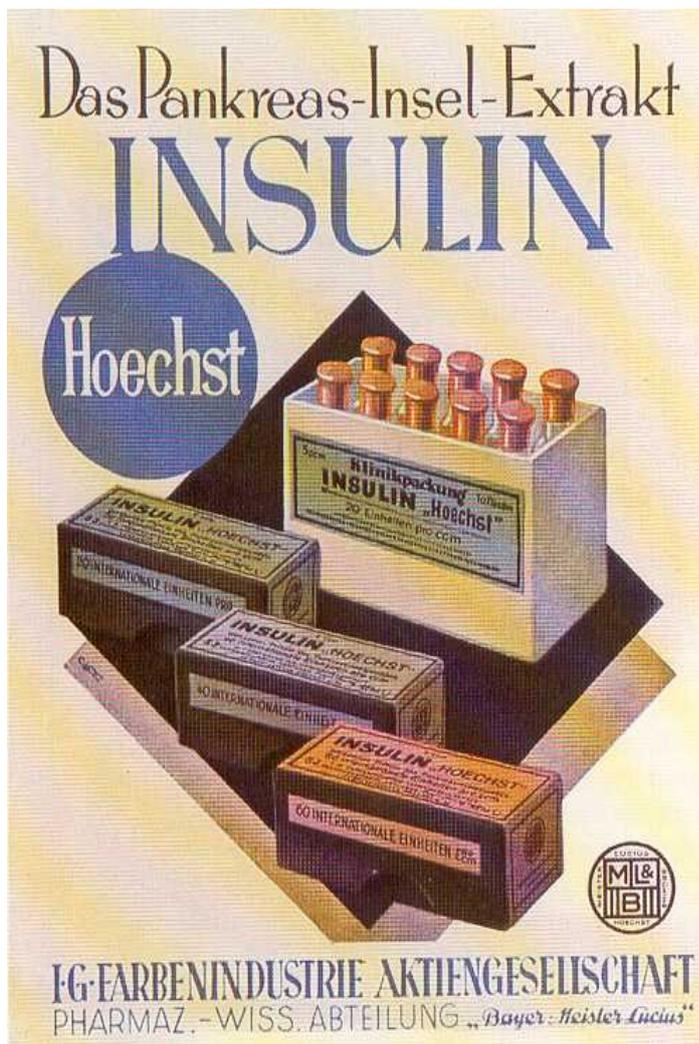


Abbildung 3.1: Werbeplakat der Firma Hoechst AG zur Herstellung eines ersten Präparates gegen Diabetes (1923).

### **3.3 Über 90 Jahre Erfahrungen in der Insulinherstellung**

Schon bald nach der Entdeckung des Insulins und seiner Wirkung beim Menschen 1922 (Lit. 3) begannen bei der damaligen Firma Hoechst AG in Frankfurt am Main die Arbeiten zu seiner Isolierung im Produktionsmaßstab (Lit. 4). Als Ausgangsmaterial dienten Bauchspeicheldrüsen von Schlachttieren (Rinder und Schweine). Da zu diesem Zeitpunkt chromatografische Reinigungen unbekannt waren, konnte das Insulin nur über Säure- bzw. alkoholische Fällungen isoliert werden. Entsprechend verunreinigt waren die damaligen Zubereitungen; das 1923 auf den Markt gebrachte Präparat wurde folgerichtig als Pankreas-Insel-Extrakt bezeichnet (siehe Abbildung 3.1).

Erst in den 1970er-Jahren gelang es, chromatografisch gereinigtes Insulin herzustellen. Da es sich dabei nach wie vor um Insuline tierischer Herkunft handelte, die Nebenwirkungen hatten (z. B. Allergien), wurde 1983 ein semisynthetisches Verfahren entwickelt, um die einzige unterschiedliche Aminosäure des Schweine-Insulins gegen die des menschlichen Insulins auszutauschen.

### **3.4 Notwendigkeit der gentechnischen Herstellung von Insulinen**

Schon Mitte der 1970er-Jahre konnte die Menge an isoliertem Insulin nicht mehr mit der steigenden Anzahl der Diabetiker mithalten.

Aus der Bauchspeicheldrüse eines Schweins wurde damals Insulin in einer Menge ausreichend für die Therapie eines Patienten für eine halbe Woche isoliert. Daraus ergibt sich ein Jahresbedarf von etwa 100 Schweinen pro Patient (Lit. 5). In Deutschland leben derzeit (2015) ca. sechs Millionen Diabetiker (Lit. 6), davon sind ca. 1,8 Millionen insulinpflichtig (Lit. 7). Würden diese mit tierischem Insulin versorgt, müssten jährlich rund 180 Millionen Schweine geschlachtet werden statt der 58 Millionen, die im Jahr 2012 in Deutschland für die Fleischproduktion gezüchtet wurden (Lit. 8). Eine solch gewaltige Anzahl Tiere würde Probleme mit sich bringen, etwa die Entsorgung der anfallenden Gülle oder die Versorgung der Tiere mit entsprechendem Futtergetreide, das in Konkurrenz zur menschlichen Ernährung steht.

Auf Grund der rasch steigenden Patientenzahlen war es bereits seit Mitte der 1970er Jahre notwendig, andere Insulinquellen zu erschließen. Die International Diabetes Federation prognostiziert heute bis 2035 weltweit eine weitere Steigerung um 55 % auf nahezu 592 Millionen Erkrankte (Lit. 9). Die Lösung liegt in der Anwendung der Gentechnik für die Insulinherstellung. Eine rein chemische Insulinherstellung ist nur im analytischen Maßstab möglich ökonomisch sinnvoll.

Zu jedem Protein gibt es eine entsprechende genetische Information, d. h. ein Gen. Das Insulin-Gen war bereits 1979 erfolgreich in das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) eingeschleust worden. Schon bald darauf begannen bei verschiedenen Unternehmen Entwicklungsarbeiten zur gentechnischen Herstellung von Insulin im Produktionsmaßstab, so auch bei der Firma Hoechst AG in Frankfurt am Main.

### **3.5 Historie der Zulassung gentechnischer Arbeiten in Frankfurt am Main**

Auf Grund der erfolgreichen Entwicklung eines Produktionsverfahrens beantragte Hoechst 1984 die Genehmigung einer Versuchsanlage. Der Regierungspräsident genehmigte das Vorhaben 1985 und 1987. Auf Grund heftiger Diskussionen über Chancen und Risiken der Gentechnik verfügte der Hessische Verwaltungsgerichtshof 1988 einen Baustopp.

Erst zehn Jahre später, 1998, konnte diese gentechnische Versuchsanlage in Deutschland in Betrieb genommen werden und die aus Hoechst hervorgegangene Firma Hoechst Marion Roussel begann mit dem Verkauf von Insuman®, dem gentechnisch hergestellten Humaninsulin. Dieses war deutlich besser verträglich als das aus Tieren isolierte Insulin.

Heute hat gentechnisch gewonnenes Humaninsulin das tierische Insulin fast völlig vom Weltmarkt verdrängt. In Deutschland wird es nicht mehr hergestellt, darf aber noch, aus dem Ausland bezogen, verkauft werden.

Es folgte die Entwicklung und Herstellung von Insulin-Analoga, also Insulinmolekülen, die gegenüber dem natürlichen Insulin eine veränderte Aminosäureabfolge aufweisen. Diese gentechnisch veränderten Insuline besitzen gegenüber Humaninsulin vorteilhafte Wirkungsweisen, so etwa das langwirksame Insulin glargin 100 Einhei-

ten/ml (Handelsname Lantus®, 1999), das sehr langwirksame Insulin glargin 300 Einheiten/ml (Handelsname Toujeo®, 2015) und das schnell wirkende Insulin glulisin (Handelsname Apidra®, 2004).

Allen Insulinen ist gemeinsam, dass deren genetische Information in den Produktionsorganismus *E. coli* gelangen muss. Dazu wird das Gen mit Hilfe von Enzymen herausgeschnitten und in Plasmide (ringförmige DNA-Moleküle) wieder eingebaut. Diese Plasmide, auch Vektoren genannt, werden durch die Zellhülle in *E. coli* eingeschleust, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Wirtstamm und Vektor sind immer gleich, lediglich das eingesetzte Insulin-Gen ist geringfügig unterschiedlich. Durch die Anwesenheit des Plasmides sowie durch weitere genetische Veränderungen, die den Wirtstamm das Überleben in der Umwelt erschweren, bezeichnet man diese Organismen auch als gentechnisch verändert (GVO).

### **3.6 Der Insulin-Produktionsbetrieb**

Die Wirkstoffe für diese Insuline werden im Frankfurter Hoechst-Nachfolgeunternehmen Sanofi in verschiedenen Anlagen hergestellt. Die Lantus-Anlage beispielsweise besteht aus mehreren Gebäuden, (Abbildung 3.2), darunter eine Fermentationsanlage, in der die gentechnisch veränderten Bakterien gezüchtet werden.



Abbildung 3.2: Der Lantus-Betrieb der Firma Sanofi im Industriepark Frankfurt am Main. Vorne befindet sich das Verwaltungs- und Laborgebäude, hinten links die Fermentation, in der Bakterien das Insulin produzieren. In den Rohranlagen werden die für die Produktion erforderlichen Rohstoffe und Medien, z. B. Luft, Stickstoff, Ammoniak und Dampf transportiert.

### 3.7 Die eigentliche gentechnische Arbeit, Vorstellung der Fermentationsanlage

Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO), in dem hier beschriebenen Falle die Bakterien der Art *E. coli* (Abbildung 3.3), ist nur in behördlich genehmigten Anlagen erlaubt. Zum Umgang mit GMO zählt bereits die Lagerung, zusätzlich natürlich alle Vermehrungsschritte bis hin zur Abtötung. Für jedes Insulinprodukt gibt es einen eigenen, gentechnisch modifizierten *E. coli*-Stamm, der in speziellen Behältern tiefgefroren gelagert wird. Zu Beginn eines neuen Ansatzes werden die Bakterien aus dem Lager entnommen, aufgetaut und in einen Schüttelkolben überimpft. Dort finden sie neben Nährstoffen auch ideale Wachstumsbedingungen vor, etwa eine optimale Temperatur sowie eine ausreichende Belüftung mit Sauerstoff, sodass sie sich vermehren. Sobald eine bestimmte Zellkonzentration erreicht ist, wird

der Inhalt des Schüttelkolbens in den ersten Fermenter überführt. Auch in dieser Wachstumsstufe geht es nur darum, eine ausreichende Zellmenge für ein erfolgreiches Wachstum im großen Produktionsfermenter zu erreichen. Dort werden die Bakterien zunächst erneut vermehrt. Zu einem bestimmten Zeitpunkt wird ein Induktor zugegeben, eine Chemikalie, die die Bakterien zwingt, das Insulingen abzulesen und den Stoffwechsel auf die Insulinproduktion umzustellen. Die Bakterien vermehren sich nun nicht mehr, sondern bilden große Mengen Fusionsprotein. Dieses Insulinmolekül besteht aus zwei Ketten, die durch ein Peptid miteinander verbunden (fusionsiert) sind. Das Insulinprodukt reichert sich als Einschlusskörper in den Zellen an. Nach ausreichender Bildung werden die Bakterien in einen Behälter überführt und chemisch abgetötet. Durch die Abtötung ist auch die gentechnische Arbeit abgeschlossen. Die sich anschließenden Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte werden ausschließlich mit abgetöteten GVO durchgeführt.



Abbildung 3.3: *E. coli*-Zellen in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme.

### 3.8 Einstufung des Mikroorganismus und Einhaltung des GenTG/GenTSV

Alle gentechnischen Arbeiten müssen bezüglich ihres Risikos, eine Gefahr für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt darzustellen, bewertet und eingestuft werden (Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz, GenTG) § 7).

Zunächst muss die Gefährlichkeit des Produktionsorganismus *Escherichia coli* ohne die eingebrachten Gene in Form einer Risikobewertung für den Fall einer unbeabsichtigten Freisetzung bewertet werden. Dazu kommt eine Risikobewertung des eingebrachten genetischen Materials (Vektor und Spender, in diesem Fall menschliche DNA) und des Spenderorganismus selber. Aus diesen drei Risikobewertungen erfolgt eine Einstufung des Gesamtrisikos der gentechnischen Arbeit (Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik Sicherheitsverordnung, GenTSV) § 4, Grundlagen der Sicherheitseinstufung). Laut Definition im Gentechnikgesetz (§ 7, Sicherheitseinstufung) gelten gentechnische Arbeiten zur Sicherheitsstufe 1, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen ist. Die gentechnische Produktion von Insulinen ist der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet.

Das GenTG verlangt vom Betreiber die Einhaltung bestimmter Maßnahmen, die eine unbeabsichtigte Freisetzung der GVO verhindern. So fordert GenTSV §8, (Allgemeine Schutzpflicht, Arbeitsschutz)

*(2): „Der Betreiber einer gentechnischen Anlage hat ... die erforderlichen Maßnahmen ... zu treffen, um eine Exposition der Beschäftigten und der Umwelt gegenüber dem GVO so gering wie möglich zu halten“ sowie (6) „Maßnahmen zur Abwehr ... hat der Betreiber zu regeln...“*

Bei Sanofi werden die GVO ausschließlich in geschlossenen Anlagen kultiviert. Der offene Arbeitsschritt, das Beimpfen des Schüttelkolbens, wird unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Diese verhindert, dass die Mikroorganismen in die Umgebung gelangen und ebenso, dass unerwünschte Mikroorganismen in den Schüttelkolben geraten.

Alle Arbeitsschritte sind darauf ausgerichtet, dass die Bildung von Aerosolen (feinste Tröpfchen in der Luft) vermieden wird, in denen Bakterien überleben könnten (z. B. Probenahmen aus den Fermentern) nach GenTSV Anhang III (Punkt 8).

Weiterhin verlangt die GenTSV § 8

(3) *„Maßnahmen zur Abwehr unmittelbarer Gefahren sind unverzüglich zu treffen“.*

Dazu zählen Schutzmaßnahmen vor Fermentationsbrühen-Austritt. Hier muss zwischen unterschiedlichen Mengen unterschieden werden: einerseits der Austritt kleinerer (weniger als ein Liter) Leckagen, die umgehend durch Zugabe von Desinfektionsmitteln inaktiviert und aufgewischt werden. Sollte es zu größeren Leckagen kommen (z. B. Riss im Fermenter), so würde die Fermentationsbrühe in einer Auffangwanne, in der die Fermenter stehen, zurückgehalten. Von dort könnte diese in einen Inaktivierungsbehälter gepumpt und dort thermisch abgetötet werden. Der abgetötete GVO darf über Kläranlagen in die Umwelt abgegeben werden.

Die in einer gentechnischen Anlage beschäftigten Mitarbeiter sind regelmäßig zu schulen. Die GenTSV, (§12, Arbeitssicherheitsmaßnahmen) schreibt hierzu vor:

(1) *„Beschäftigte dürfen mit gentechnischen Arbeiten nur beauftragt werden, wenn sie ausreichend qualifiziert und eingewiesen sind“.* Weiterhin folgt (2) *„Der Betreiber hat ... eine Betriebsanweisung zu erstellen, in der die möglichen Gefahren ... sowie die erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen und Verhaltensregeln festgelegt werden“.*

Eine Betriebsanweisung liegt vor und alle Mitarbeiter werden gemäß (3) *„Regelmäßige Schulungen“* jährlich geschult.

Auch zur Abwasser/Abfallbehandlung werden im GenTG Anforderungen gestellt. In GenTSV §13 fordert:

(1) *„Abwasser sowie flüssiger und fester Abfall aus Anlagen, in denen gentechnische Arbeiten durchgeführt werden ... sind unschädlich zu entsorgen.“*

Diese Anforderungen gelten erst ab der Sicherheitsstufe 2. Es ist daher zulässig, flüssige und feste Abfälle ohne besondere Vorbehandlung zu entsorgen. Dennoch werden bei Sanofi diese Abfälle thermisch inaktiviert, bevor sie abgegeben werden. So ist etwa der Fermenter-Innenraum nach der Entleerung noch mit lebenden GVO benetzt. Durch Einleitung von Dampf und damit der Erhitzung des entleerten Fermenters werden die GVO thermisch inaktiviert (>121 °C für 15 Minuten).

Bewachsene Nährmedien, also Agarplatten, die bei der Analyse der Fermentationen anfallen, werden autoklaviert (eine bestimmte Zeit erhitzt) und anschließend als fester Abfall verbrannt.

Diese sowie noch viele weitere Punkte aus dem GenTG bzw. der GenTSV bedeuten eine große Anzahl Sicherheitsschritte, die einen ungefährlichen Umgang mit und eine ungeplante Freisetzung von GVO verhindern.

### **3.9 Sichere und erfolgreiche gentechnische Arzneimittelherstellung**

Das GenTG und deren GenTSV wurde 1990 erstmals verabschiedet und seitdem nahezu jährlich ergänzt bzw. geändert. Bereits 2011 wurde festgestellt, dass sich dessen Existenz bewährt hat (Lit. 10). Die Risiken, die mit der Gentechnik und seinen Anwendungen einhergehen, sind beherrschbar und die Erfolge – in diesem Fall für die Millionen behandelter Patienten weltweit – enorm.

### **3.10 Literatur**

1. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014. Erhältlich unter: [www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de](http://www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de); [Zugriff am 03.02.2016]; DOI: 10.6101/AZQ/000213
2. Häring HU et al. (Hrg.). Diabetologie in Klinik und Praxis. 6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2011
3. Banting, F. and Best, C., The internal secretions of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.*, 1922, 7, 251-266
4. Meichsner, B. und Wirth, U., Insulin – Protein mit langer Geschichte. *Chemie in unserer Zeit*, 2009, 43, 340 – 346.
5. Walsh, G., Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67, 151-159.
6. diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe und Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) (Hrg.). Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2016. Kirchheim Ver-

lag, Mainz 2016. Erhältlich unter:

[http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs\\_und\\_TEXTE/nfomaterial/Gesundheitsbericht\\_2016.pdf](http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs_und_TEXTE/nfomaterial/Gesundheitsbericht_2016.pdf) (Zugriff am 03.02.2016)

7. diabetesDE Deutsche Diabetes Hilfe. Über Diabetes. Diabetes in Zahlen. Erhältlich unter:  
[http://www.diabetesde.org/ueber\\_diabetes/was\\_ist\\_diabetes/diabetes\\_in\\_zahlen/](http://www.diabetesde.org/ueber_diabetes/was_ist_diabetes/diabetes_in_zahlen/) (Zugriff am 03.02.2016)
8. Fleischatlas 2014, Hrsg. Heinrich-Böll-Stiftung und BUND, Seite 21.  
[http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/landwirtschaft/140108\\_bund\\_landwirtschaft\\_fleischatlas\\_2014.pdf](http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/landwirtschaft/140108_bund_landwirtschaft_fleischatlas_2014.pdf) (Zugriff am 03.02.2016)
9. International Diabetes Federation, Annual Report 2015,  
[https://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Atlas\\_Full\\_0.pdf](https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf) (Zugriff am 03.02.2016)
10. Schubert, G., Das Gentechnikrecht – gestern, heute, morgen. *4. Fachtagung zur Gentechnik in Oberschleißheim*, 2011, 5-14.

## **4 Risikobewertung gentechnischer Arbeiten durch die ZKBS /die ZKBS als Institution**

Dr. Ingeborg Kruczek, wiss. Dir. & Prof. a. D.

Leiterin des Referats „Sicherheitsempfehlungen und ZKBS“ am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bis 31. Januar 2016

Am 7. Juni 2016 wird die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS) zum 200. Mal nach Inkrafttreten des Gentechnikgesetzes (GenTG) am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in Berlin zusammen kommen.

Das GenTG trat am 1. Juli 1990 in Kraft, die ZKBS gibt es aber schon viel länger, nämlich seit dem 15. Februar 1978, als die 1. Fassung der „Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren“ in Kraft trat.

Die Aufgaben der ZKBS sind im GenTG festgelegt: sie prüft und bewertet sicherheitsrelevante Fragen nach den Vorschriften des GenTG, gibt hierzu Empfehlungen und berät die Bundesregierung und die Bundesländer in sicherheitsrelevanten Fragen der Gentechnik. Ihre Entscheidungen trifft sie entweder in einem schriftlichen Verfahren oder auf ihren Sitzungen. Die ZKBS arbeitet ehrenamtlich und ist zur Verschwiegenheit verpflichtet.

1978 war das Bundesministerium für Forschung und Technologie zuständig für die Berufung der ZKBS-Mitglieder. 1990, als das GenTG in Kraft trat, war dann das Bundesministerium für Gesundheit (BMG) zuständig für das GenTG und die Berufungen der ZKBS-Mitglieder. Die ZKBS hat eine Geschäftsstelle, welche die ZKBS bei der Wahrnehmung ihrer Aufgaben unterstützt und die zunächst am Robert Koch-Institut eingerichtet war. Im Jahr 2003 ging jedoch die Zuständigkeit vom BMG an das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft über, und die Geschäftsstelle wechselte zum BVL. Mittlerweile nennt sich dieses Ministerium Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL).

1990 setzte sich die ZKBS aus 15 Mitgliedern zusammen, mittlerweile sind es 20, und jedes Mitglied hat einen Stellvertreter. Die Mitglieder der Kommission und ihre

Stellvertreter werden vom BMEL im Einvernehmen mit den Bundesministerien für Bildung und Forschung, für Wirtschaft und Energie, für Arbeit und Soziales, für Gesundheit sowie für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit für die Dauer von drei Jahren berufen. Wiederberufung ist zulässig.

Folgende Bereiche sind gemäß § 4 GenTG in der ZKBS vertreten: 12 Sachverständige der Bereiche Mikrobiologie, 2 x Virologie, Zellbiologie, Genetik, Pflanzenzucht, 2 x Ökologie, Toxikologie, Hygiene und Sicherheitstechnik, sowie 8 Sachkundige der Bereiche Gewerkschaft, Arbeitsschutz, Wirtschaft, Landwirtschaft, Umweltschutz, Naturschutz, forschungsfördernde Organisation und Verbraucherschutz.

Die ZKBS hat einen Vorsitzenden, und zwei stellvertretende Vorsitzende. Bis April 2016 hatte Prof. Dr. Herbert Pfister (Universität Köln) den Vorsitz, seit Mai 2016 Frau Prof. Dr. Sigrun Smola (Universitätsklinikum des Saarlandes). Prof. Dr. Uwe Groß (Universität Göttingen) und Prof. Dr. Pablo Steinbrück (Tierärztliche Hochschule Hannover) sind die stellvertretenden Vorsitzenden.

Die Namen aller Mitglieder und Stellvertreter sind im Internet aufgelistet.

## **4.1 Aufgaben der ZKBS im Einzelnen**

### **4.1.1 Ermittlung einer Risikogruppe**

Zunächst werden die noch unveränderten Mikroorganismen (einschließlich Viren), die bei gentechnischen Arbeiten als Spender- oder Empfängerorganismen verwendet werden, auf der Grundlage ihres Gefährdungspotenzials einer Risikogruppe zugeordnet. Risikogruppe 1 bedeutet kein Gefährdungspotenzial, Risikogruppe 4 bedeutet hohes Gefährdungspotenzial. Kriterien, die für die Einstufung heran gezogen werden, sind im § 5 und im Anhang I der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) festgelegt.

Für Viren sind das im Wesentlichen:

- a. das Wirtsspektrum
- b. die Art der Übertragung
- c. die Widerstandsfähigkeit
- d. die natürliche Virulenz für abwehrgesunde Menschen und Tiere
- e. die Möglichkeit einer Prophylaxe

Zum Beispiel werden ecotrope murine Retroviren der Risikogruppe 1 zugeordnet, da sie ein sehr enges Wirtsspektrum aufweisen: sie infizieren nur Mäuse und Ratten und kommen dort natürlicherweise vor. Sie sind nicht über den Luftweg übertragbar und außerdem sehr instabil. Das Variolavirus wird hingegen wegen der Schwere der Erkrankung (Pocken), die es beim Menschen verursacht, da es über den Luftweg übertragbar ist, da es für ausgerottet erklärt worden ist und da kein Impfstoff mehr zur Verfügung steht, der Risikogruppe 4 zugeordnet.

Das BMEL veröffentlicht regelmäßig nach Anhörung der ZKBS im Bundesanzeiger eine Liste mit Legaleinstufungen von Mikroorganismen nach dem geltenden EG-Arbeitsschutzrecht sowie von Organismen, die den Risikogruppen nach den allgemeinen Kriterien gemäß § 5 GenTSV zugeordnet wurden ("Organismenliste").

#### **4.1.2 Sicherheitsstufe der gentechnischen Arbeit**

Gentechnische Arbeiten werden auf der Grundlage ihres Gefährdungspotenzials gemäß § 7 GenTSV einer von 4 Sicherheitsstufen zugeordnet. Zuständig für gentechnische Arbeiten und Anlagen sind die Landesbehörden. Bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufen 3 und 4 ist die ZKBS immer zu beteiligen, bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 nur dann, wenn die Arbeit nicht mit einer früheren Arbeit, die von der ZKBS bereits bewertet und der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet worden war, vergleichbar ist, bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 nur dann, wenn die Landesbehörde die ZKBS beteiligen möchte. Die ZKBS ordnet in ihrer Stellungnahme die einzelnen Arbeitsschritte einer Sicherheitsstufe zu und empfiehlt geeignete technische und organisatorische Sicherheitsmaßnahmen, um Mensch, Tier und Umwelt vor möglichen Gefahren zu schützen.

Eine Stellungnahme der ZKBS enthält also:

### **Stellungnahme der ZKBS**

Az. / Betreiber / Projektleiter

- Thema der gentechnischen Arbeit
- Projektbeschreibung
- Spenderorganismen und deren Risikogruppen
- Empfängerorganismen und deren Risikogruppen
- Vektoren
- zu erwartende GVO und deren Risikogruppen
- Sicherheitsstufe des jeweiligen Arbeitsschrittes
- erforderliche technische und organisatorische Sicherheitsmaßnahmen

Abstimmungsergebnis / Datum

Diese Stellungnahmen sind vertraulich und werden nur den für gentechnische Arbeiten und Anlagen zuständigen Landesbehörden übermittelt.

Seit 1990 hat die ZKBS 1915 Stellungnahmen (Stand Juni 2016) zu gentechnischen Arbeiten und zu den erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen abgegeben.

#### **4.1.3 Freisetzung**

Die ZKBS gibt auch Stellungnahmen zu beantragten Freisetzungsvorhaben gegenüber dem BVL, welches für Freisetzungsgenehmigungen zuständig ist, ab. Hierbei wird insbesondere geprüft, ob die Freisetzung zeitlich und räumlich begrenzt bleibt.

Jedoch sind seit 2014 keine Freisetzungsanträge mehr gestellt worden.

#### 4.1.4 Öffentlichkeitsarbeit

Die Sitzungen der ZKBS sind nicht öffentlich. Neben den Mitgliedern der ZKBS und ihren Stellvertretern sowie der Geschäftsstelle können die Bundesministerien, die bei der Berufung der ZKBS-Mitglieder beteiligt werden, sowie die für Gentechnik zuständigen Landesbehörden teilnehmen. Die verabschiedeten Stellungnahmen zu gentechnischen Arbeiten sind vertraulich, jedoch werden allgemeine Stellungnahmen und die aktualisierte Organismenliste im Bundesanzeiger veröffentlicht. Ebenso wird jährlich im Bundesanzeiger ein Tätigkeitsbericht der ZKBS veröffentlicht.

Darüber hinaus werden auf der Internetseite des BVL folgende Informationen zur Arbeit der ZBBS zur Verfügung gestellt:

- a. der jährliche Tätigkeitsbericht
- b. die Liste risikobewerteter Mikroorganismen
- c. die allgemeinen Stellungnahmen
- d. Datenbanken zu:
  - eingestuften Mikroorganismen
  - eingestuften Zelllinien
  - Genen, die auf ihr onkogenes Potenzial geprüft worden sind
  - Vektoren
  - *E. coli*-Stämmen
- e. Liste der Namen der Mitglieder der ZKBS und deren Stellvertreter einschließlich der Bereiche, für die sie in die ZKBS berufen worden sind.

Noch befinden sich diese Informationen auf der Internetseite des BVL, jedoch wird derzeit eine eigene Internetseite der ZKBS vorbereitet.

## 4.2 163. Sitzung der ZKBS am 9. November 2010 in Berlin



Abbildung 4.1: Vorsitzender der ZKBS, Prof. Dr. Herbert Pfister, mit Unterstützung durch die Geschäftsstelle (Dr. Ingeborg Kruczek). Foto: BVL.



Abbildung 4.2: Besuch der Landwirtschaftsministerin Ilse Aigner. Fotos: BVL.

## 5 Was ist Synthetische Biologie – und wie wird sie reguliert?

Dr. Swantje Straßheim

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin

### 5.1 Geschichte und Definition

Der Begriff „Synthetische Biologie“ wurde bereits im Jahr 1912 durch den französischen Biophysiker Stéphane Leduc verwendet, der sich zu Beginn des 20. Jahrhunderts mit der Synthese künstlichen Lebens aus unbelebter Materie beschäftigte (Leduc 1912). Etwa seit dem Jahr 2000 wird der Begriff Synthetische Biologie verstärkt genutzt, was direkt mit den Entwicklungen der Gentechnik seit den 1970er Jahren zusammenhängt (Cameron et al. 2014). Auch die Anzahl der Veröffentlichungen unter Verwendung des Begriffs Synthetische Biologie stieg ab dem Jahr 2000 stetig (Abbildung 5.1).

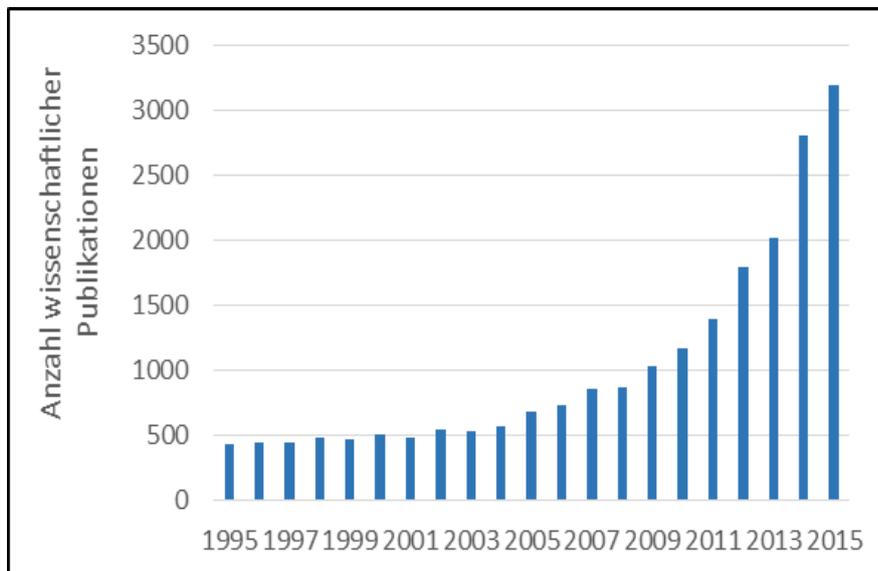


Abbildung 5.1: Anzahl der in PubMed gelisteten Publikationen mit dem Schlagwort „synthetic biology“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Trotz der allgemeinen Popularität des Begriffs Synthetische Biologie in den Publikationen gibt es keine allgemein gültige Definition der Synthetischen Biologie. Allein in Deutschland wurden durch verschiedene Akademien und Kommissionen mehrere Definitionen aufgestellt. So wird die Synthetische Biologie beispielsweise durch die

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die acatech (Deutsche Akademie der Technikwissenschaften) und die Leopoldina (Deutsche Akademie der Naturforscher) in einer gemeinsamen Stellungnahme wie folgt definiert: die Synthetische Biologie „führt ein weites Spektrum an naturwissenschaftlichen Disziplinen zusammen und verfolgt dabei ingenieurwissenschaftliche Prinzipien. Das spezifische Merkmal der Synthetischen Biologie ist, dass sie biologische Systeme wesentlich verändert und gegebenenfalls mit chemisch synthetisierten Komponenten zu neuen Einheiten kombiniert. Dabei können Eigenschaften entstehen, wie sie in natürlich vorkommenden Organismen bisher nicht bekannt sind“ (DFG 2009). In dieser Stellungnahme empfehlen die drei Organisationen ein begleitendes Monitoring der Synthetischen Biologie durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS). Dieses Monitoring wird seit 2010 durch die ZKBS ausgeführt, mit dem Ziel, Entwicklungen der Synthetischen Biologie sachverständig und kritisch zu begleiten und hinsichtlich der biologischen Sicherheit zu bewerten. Die Ergebnisse dieses Monitorings wurden im Jahr 2012 bereits in einem ersten Monitoringbericht zusammengefasst. Die ZKBS definiert in diesem Bericht: das „Ziel der synthetischen Biologie ist es, biologische Einheiten wie z.B. Enzyme, genetische Schaltkreise oder Zellen so zu gestalten, wie sie nicht in der Natur vorkommen“ (ZKBS 2012).

Abgesehen von der unklaren Definition sind sich die meisten Akteure im Bereich der Synthetischen Biologie jedoch darüber einig, welche Forschungsfelder allgemein zur Synthetischen Biologie gezählt werden. Dies sind die folgenden:

- Synthese von Genomen
- genetische Schaltkreise
- maßgeschneiderte Stoffwechselwege
- Xenobiologie
- Erzeugung von Minimalorganismen und Protozellen.

Im Folgenden sollen diese fünf Forschungsfelder vorgestellt werden und auf die Möglichkeiten zur Regulierung für die damit erzeugten Organismen eingegangen werden.

## **5.2 Beschreibung der einzelnen Forschungsfelder und Einordnung in den Kontext des GenTG**

Bisher gibt es weder in Deutschland noch in Europa eine gesetzliche Regelung für die Synthetische Biologie. Vielmehr wird die Regulierung der Synthetischen Biologie über die Freisetzungsrichtlinie (2001/18/EG) und die Systemrichtlinie (2009/41/EG) vorgenommen. Diese beiden Richtlinien wurden in Deutschland in das Gentechnikgesetz (GenTG) umgesetzt. Es stellt sich demnach für jeden der oben genannten Forschungsbereiche die Frage, ob dieser durch das GenTG abgedeckt ist oder ob es Bereiche oder Entwicklungen gibt, die eventuell nicht abgedeckt werden und einer zusätzlichen Regulierung bedürfen. Um durch das GenTG abgedeckt zu werden, muss ein mithilfe der Synthetischen Biologie hergestellter Organismus unter die Definition eines gentechnisch veränderten Organismus (GVO) gemäß GenTG fallen. Darin wird ein GVO als ein „Organismus, mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt“ definiert.

### **5.2.1 Synthese von Genen und Genomen**

Die Popularität der Synthetischen Biologie ist zu einem großen Teil den immer besseren Bedingungen der Gensynthese zu verdanken. Heutzutage können DNA-Sequenzen von 200 bis zu über 2000 Basenpaaren (bp) maßgeschneidert hergestellt werden, wobei im Allgemeinen zunächst Oligonukleotide synthetisiert und anschließend zusammengefügt werden. Durch die verbesserte Technik sinken die Preise für die Synthese eines Gens oder eines Oligonukleotids stetig (Abbildung 5.2), wodurch Gene oder sogar ganze Genome de novo hergestellt werden können.

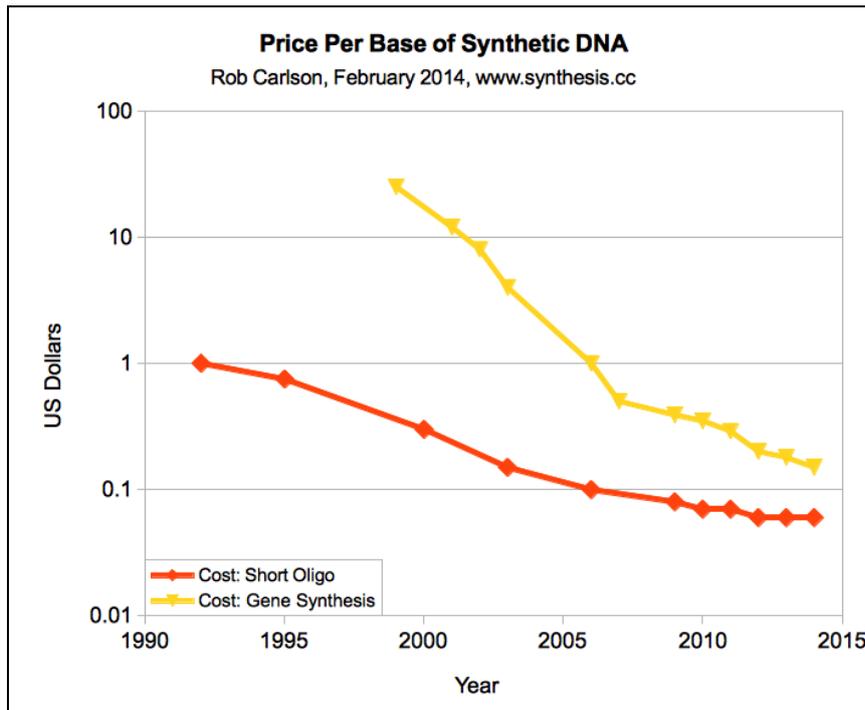


Abbildung 5.2: Entwicklung der Preise für die Synthese von Oligonukleotiden (rot) und Genen (gelb) (Rob Carlton, [www.synthesis.cc](http://www.synthesis.cc)).

Als eine der ersten konnte 2002 die Arbeitsgruppe von Eckard Wimmer ein synthetisches virales Genom ohne Zuhilfenahme einer Nukleinsäurematrize herstellen. Dabei handelte es sich um eine cDNA des 7,5 kb langen Poliovirusgenoms (Cello et al. 2002). Für großes Medieninteresse sorgte ein paar Jahre später die Synthese des bakteriellen *Mycoplasma mycoides*-Genoms und dessen Verpflanzung in eine Zelle der Spezies *Mycoplasma capricolum*, die durch den verantwortlichen Wissenschaftler, Craig Venter, als Erschaffung künstlichen Lebens dargestellt wurde (Gibson et al. 2006). Einen weiteren Schritt auf dem Weg zu künstlichen Genomen stellt das Konsortium Sc2.0 dar, welches aus mehreren Universitäten und Forschungseinrichtungen besteht und sich der Synthese aller Chromosomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verschrieben hat. Das Konsortium konnte bereits erfolgreich das Chromosom III synthetisieren, wobei dessen Größe von 316667 auf 272871 bp reduziert wurde (Annaluru et al. 2014). Dazu wurden nicht kodierende Sequenzen wie Introns, Retrotransposons oder tRNAs entfernt. Zudem wurden 98 loxP-sites eingebracht, die eine spätere Veränderung des Genoms ermöglichen sollen, und alle Amber-Stopp-Kodons entfernt, sodass diese einer neuen (nicht-natürlichen) Aminosäure zugewiesen werden können.

Regulatorisch betrachtet gilt ein Organismus, in den ein synthetisches Genom eingebracht wurde, als GVO gemäß GenTG, da sein genetisches Material verändert wurde und eine solche Veränderung natürlicherweise nicht vorkommt. Die Synthese von Genen oder Genomen dagegen unterliegt nicht dem GenTG, da es sich dabei nicht um einen Organismus handelt. Dieser ist im GenTG als „biologische Einheit, die fähig ist, sich zu vermehren oder genetisches Material zu übertragen, einschließlich Mikroorganismen“ definiert.

### **5.2.2 Genetische Schaltkreise**

Beim Design von genetischen Schaltkreisen machen sich Synthetische Biologen die Prinzipien der Modularisierung und der Standardisierung zu Nutze, um verschiedene genetische Elemente so miteinander zu kombinieren, dass sie verschiedenste physiologische Bedingungen erkennen und mit unterschiedlichen Outputs darauf reagieren. Ein Beispiel sind Biosensoren, die Krebs-spezifische Biomarker erkennen, ihre Expression messen und ggf. die Apoptose der Krebszelle einleiten. Ein solches System wurde 2011 von Xie et al. beschrieben. Die Wissenschaftler konstruierten einen sogenannten classifier, der transient in einer Zelle exprimiert wird und die Expression von sechs endogenen microRNAs misst. Stimmt die Expression mit dem vorgegebenen Profil der HeLa-Zelllinie (Gebärmutterhalskrebs) überein, wird durch den eingebrachten genetischen Schaltkreis die Apoptose der Zelle eingeleitet. Ein Biosensor kann auch zur Überwachung der Produktion eines bestimmten Metabolits genutzt werden. In einem kürzlich veröffentlichten Paper (Rogers & Church 2016) wird ein optogenetischer Biosensor beschrieben, der eine Echtzeit-Überwachung der Synthese von erneuerbarem Plastik ermöglicht. Die Bakterienzelle wird genetisch so verändert, dass sie beispielsweise Glukose zu Muconat, einem erneuerbaren Vorprodukt von Polyethylenterephthalat oder Nylon, umwandeln kann. Die Expression des optogenetischen Biosensors wird solange reprimiert, bis Muconat an den Repressor bindet. Erst dann wird ein fluoreszierender Reporter exprimiert, mithilfe dessen der bestmögliche Produktionsorganismus für Muconat einfach und schnell identifiziert werden kann.

Werden genetische Schaltkreise in Organismen eingebracht, wird deren genetisches Material in einer Art und Weise verändert, wie sie natürlicherweise nicht vorkommt.

Diese Organismen unterliegen demnach klar dem GenTG und können mit dessen Hilfe reguliert werden.

### **5.2.3 Maßgeschneiderte Stoffwechselwege**

Das Design maßgeschneiderter Stoffwechselwege nutzt die Synthese von Genomen, die Entwicklung gut charakterisierter Werkzeuge zur Genexpression sowie die Möglichkeit, die bestmögliche Kombination der genetischen Bauteile mit Computergestützten Programmen zu ermitteln. Dies ermöglicht es, interessante Stoffwechselprodukte oder auch Chemikalien, die normalerweise aus Erdöl hergestellt werden, in Mikroorganismen zu produzieren. So werden beispielsweise Biopolymere wie Poly-3-hydroxybutyrat (P(3HB)) als abbaubarer Ersatz für aus Erdöl hergestelltes Plastik gezielt in *E. coli* produziert (Kelwick et al. 2015). Eines der prominentesten Beispiele für maßgeschneiderte Stoffwechselwege ist sicherlich die Herstellung des anti-Malariamittels Artemisinin. Artemisinin ist ein Sesquiterpen, das natürlicherweise aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) extrahiert wird und effektiv gegen multiresistente Malariaparasiten der Art *Plasmodium falciparum* wirkt. Allerdings ist die Versorgung mit Artemisinin zuweilen unregelmäßig und teuer, weswegen eine synthetisch hergestellte Alternative große Vorteile bietet (Keasling 2012). Bereits vor einigen Jahren gelang es, verschiedene Gene aus *A. annua* und der Hefe *S. cerevisiae* in *Escherichia coli* einzubringen, sodass Acetyl-CoA in Artemisininsäure, ein Vorläuferprodukt von Artemisinin, umgewandelt wird. Artemisininsäure wiederum kann durch einen chemischen Prozess leicht in Artemisinin umgewandelt werden (Ro et al. 2006). Seit 2013 produzierte Sanofi in Zusammenarbeit mit dem Arzneimittelentwicklungsprogramm OneWorld Health von PATH dieses semi-synthetische Artemisinin (Sanofi 2014), verkauft jedoch jetzt die Produktionsanlage, da die Herstellung noch relativ kostenintensiv ist (Peplow 2016).

Ebenso wie genetische Schaltkreise werden beim Design maßgeschneiderter Stoffwechselwege genetische Elemente in das Genom eines bestehenden Organismus eingebracht. Dessen genetisches Material wird daraufhin in einer Art und Weise verändert, wie sie natürlicherweise nicht vorkommt, wodurch ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO) entsteht, der durch das GenTG reguliert werden kann.

#### 5.2.4 Xenobiologie

Die in der Xenobiologie verfolgten Ansätze zielen auf die Schaffung von orthogonalen Systemen ab, die unabhängig von der natürlichen zellulären Maschinerie sind. Dies kann besonders bei einer potentiellen Freisetzung eines xenobiologischen Organismus von Vorteil sein, da ein orthogonales System eine natürliche Firewall darstellt. Zur Herstellung von Orthogonalität werden verschiedene Methoden genutzt. Eine wichtige Methode stellt dabei die Erweiterung des genetischen Codes verbunden mit dem Einfügen nicht kanonischer Aminosäuren dar. Der von fast allen Lebewesen genutzte genetische Code besteht aus Basentriplets, sogenannten Codons. Diese werden in 20 Aminosäuren umgeschrieben, obwohl die Anzahl an Codons deutlich höher als 20 ist. Xenobiologen machen sich diesen Umstand zu Nutze, indem sie bestimmte Codons neu vergeben. Dieser Vorgang wird auch codon recoding genannt und wird häufig bei einem der drei Stopp-Codons Amber (UAG), Opal (UGA) oder Ocker (UAA) genutzt. Mithilfe einer orthogonalen Aminoacyl-tRNA Synthetase (aaRS) und einer zugehörigen tRNA kann anstelle des Stopp-Codons eine nicht-kanonische Aminosäure eingebaut werden (Krishnakumar & Ling 2014). Diese Technik wurde bereits zur Erzeugung von E. coli-Stämmen angewendet, die für ihr Wachstum auf eine synthetische Phenylalanin-abgeleitete Aminosäure angewiesen waren. Dazu wurde das Amber-Stopp-Codon rekodiert und in 22 essentielle Gene in frame eingefügt, sodass deren Expression vom Vorhandensein der synthetischen Aminosäure abhängig war (Rovner et al. 2015). Neue Aminosäuren können jedoch auch anstelle eines sense-Codons eingebaut werden. Dabei wird ein selten genutztes sense-Codon und ebenfalls ein orthogonales tRNA/aaRS-Paar genutzt. Dieser Ansatz wurde bereits bei dem E. coli-Stamm MG1655 umgesetzt, bei dem die 13 am seltensten genutzten Codons in 26 essentiellen Genen (jeweils ein Gen pro Stamm) entfernt und alle weiteren, bis auf die Codons AUG (Met) und UGG (Trp), durch Synonyme ersetzt wurden. Dies führte allerdings zu einem verminderten Wachstum der Bakterien (Lajoie et al. 2013).

Ein anderer Ansatz der Xenobiologie ist die Verwendung eines nicht natürlichen Zuckerrückgrates. Die natürlichen Nukleinsäuren DNA und RNA haben eine eingeschränkte chemische Diversität und sind zudem wenig stabil. Diese mangelnde Stabilität kann durch eine chemische Veränderung des Zuckerrückgrates erhöht werden.

Bei den sogenannten synthetischen Nukleinsäuren (XNAs) wird dazu der Ribofuranose-Ring der DNA/RNA durch verschiedene ähnliche Moleküle ersetzt, sodass beispielsweise Hexitol-Nukleinsäuren (HNA), locked nucleic acids (LNA) oder Threose-Nukleinsäuren (TNA) entstehen. Diese XNAs werden durch spezielle Polymerasen, die durch rationelles Design sowie gezielte Evolution hergestellt wurden, synthetisiert und repliziert (Pinheiro & Holliger 2014). Eine andere Möglichkeit, Orthogonalität in das genetische Material eines Organismus zu bringen, ist die Erweiterung des genetischen Alphabets um ein drittes Basenpaar. Dabei können in vitro neben den Basenpaaren A-T und C-G mehrere unnatürliche Basenpaare eingefügt werden. Vor kurzem wurde dieser Ansatz zum ersten Mal in *E. coli* umgesetzt. Das Bakterium exprimiert exogen einen Nukleotidtriphosphat-Transporter aus einer Alge, der die Aufnahme des nicht-natürlichen Basenpaars d5SICS-dNaM in die Zelle ermöglicht. *E. coli* war dann in der Lage, ein Plasmid, welches d5SICS-dNaM enthält, mit seiner zellulären DNA-Replikationsmaschinerie zu replizieren (Malyshev et al. 2014).

Die Xenobiologie erzeugt gemäß der Definition des GenTG einen GVO, da das genetische Material des jeweiligen Organismus in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommt. Der Begriff „genetisches Material“ kann sich dabei sowohl auf DNA/RNA als auch auf XNAs oder nicht-natürliche Basenpaare beziehen. Auch die Erweiterung des genetischen Codes und der damit verbundene Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren in Proteine beruht auf einer Veränderung des genetischen Materials eines Organismus, was ebenfalls der Definition eines GVO gemäß GenTG entspricht.

### **5.2.5 Minimalorganismen und Protozellen**

Das letzte Forschungsfeld „Minimalorganismen und Protozellen“ befasst sich mit der Herstellung eines sogenannten „Chassis“-Organismus. Dieser soll als selbstreplizierende Einheit mit minimalem Genom für die Produktion von verschiedenen Produkten wie beispielsweise Chemikalien genutzt werden. Bei den Minimalzellen wird dabei ein top down-Ansatz verfolgt, wobei das Genom eines bestehenden Organismus auf die für die Replikation essentiellen Gene reduziert wird. Versuche, die minimale Anzahl an Genen für einen bestimmten Organismus festzustellen, erweisen sich bislang als schwierig bzw. kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen, was vor allem

von den unterschiedlichen Umweltbedingungen abzuhängen scheint (Acevedo-Rocha et al. 2013). So wurde beispielsweise mit verschiedenen experimentellen Techniken für *E. coli* ein Minimalgenom von 620, 303 oder 303 Genen ermittelt (Gerdes et al. 2003; Baba et al. 2006; Kato & Hashimoto 2007), während mit einem mathematischen Modell ein Minimalgenom von 241 Genen vorhergesagt wurde (Shuler et al. 2012).

Regulatorisch gesehen ist die Herstellung eines Minimalorganismus jedoch klar geregelt. Bei einer Reduktion des Genoms wird das genetische Material eines Organismus verändert, sodass der top down-Ansatz unter den Anwendungsbereich des GenTG fällt. Zudem besteht hier eine gute Vergleichbarkeit mit dem Ausgangsorganismus und es ist davon auszugehen, dass die Fitness der entstehenden Organismen im Vergleich zum Wildtyp-Organismus stark reduziert ist.

Protozellen dagegen werden ausgehend von chemischen und biologischen Substanzen in einem bottom up-Ansatz hergestellt. Dieser Ansatz bietet auch die Möglichkeit, die Entstehung des Lebens auf der Erde nachzuvollziehen, indem versucht wird, eine präbiotisch plausible Protozelle zu erzeugen. Eine funktionierende Protozelle ist ein chemisches System mit der Fähigkeit des self-assembly und der Selbstreproduktion. Zudem besitzt sie eine räumliche Abgrenzung von der Umwelt, die Möglichkeit Stoffwechselprozesse und Wachstum zu betreiben sowie eine Form der Informationsspeicherung (Rasmussen et al. 2009). Die Abgrenzung gegenüber der Umwelt wird im Labor zumeist in Form von Vesikeln aus Fettsäuren oder Phospholipiden nachgebaut. Einen ersten Schritt auf dem Weg zur Protozelle stellt dabei die nicht-enzymatische RNA-Replikation in Fettsäurevesikeln dar (Adamala & Szostak 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass alle für die Transkription und Translation nötigen Proteinkomponenten spontan in Liposomen eingeschlossen werden (Stano et al. 2013). In der näheren Zukunft ist jedoch noch nicht mit der Entwicklung einer funktionalen Protozelle zu rechnen.

Solange im Labor nur mit chemischen und biologischen Molekülen (z. B. Nukleinsäuren, Enzymen oder Lipiden) umgegangen wird und keine vermehrungsfähigen Organismen hervorgebracht werden, unterliegen Protozellen nicht dem GenTG. Ein Risiko für die Biosicherheit könnte dagegen eine vermehrungsfähige Protozelle darstellen. Diese Zelle wäre rechtlich gesehen nicht durch die Regularien des GenTG abge-

deckt. Dies ist damit zu begründen, dass bei dieser replikationsfähigen Protozelle kein natürlicher Organismus im Sinne des GenTG verändert wird, sondern ein Organismus ohne natürliches Vorbild hergestellt wird. Aus Sicht der ZKBS könnten replikationsfähige Protozellen die bislang einzige Entwicklung der Synthetischen Biologie darstellen, die nicht dem GenTG unterliegt, sondern möglicherweise einer anderen Regulierung bedarf. Es ist jedoch auch davon auszugehen, dass funktionale Protozellen aufgrund ihres reduzierten Genoms eine begrenzte Fitness besitzen und außerhalb des Labors nur schwer überleben können.

### **5.3 Regulierung der Synthetischen Biologie in der EU**

Wie bereits beschrieben hat auch die Europäische Union (EU) keine spezifische Verordnung zur Regulierung der Synthetischen Biologie. In den letzten Jahren werden von der Europäischen Kommission (EC) jedoch vermehrt Anstrengungen unternommen, sich in diesem neuen Forschungsfeld zu positionieren.

Die EC kann sich bei Themen aus den Bereichen Verbraucherschutz, Gesundheitswesen oder Umwelt Unterstützung durch drei unabhängige Scientific Committees (SC), die sich mit neuen Gesundheitsrisiken, dem Verbraucherschutz sowie Risiken für Gesundheit und Umwelt beschäftigen, holen. 2013 hat die EC diese Komitees gebeten, elf Fragen zur Synthetischen Biologie zu beantworten (European Commission 2013). Die SC haben diese Fragen in drei Stellungnahmen in den Jahren 2014/2015 beantwortet, welche die Themenbereiche „Umfang und Definition der Synthetischen Biologie“ (SCENIHR, SCCS, SCHER 2014), „Methodologische und Sicherheitsaspekte“ (SCENIHR, SCCS, SCHER 2015a) und „Mit der Synthetischen Biologie assoziierte Risiken für Umwelt und Biodiversität sowie Forschungsprioritäten“ behandeln (SCENIHR, SCCS, SCHER 2015b). In ihren Stellungnahmen geben die SC u. a. eine Definition der Synthetischen Biologie ab. Diese lautet: „SynBio is the application of science, technology and engineering to facilitate and accelerate the design, manufacture and/or modification of genetic materials in living organisms“. Wie die SC auch selber in ihren Stellungnahmen bemerken, ist es mithilfe dieser Definition nicht möglich, eine genaue Trennung zwischen der Synthetischen Biologie und der klassischen Gentechnik zu erreichen, da die Definition alle Organismen, Systeme, Materialien, Produkte oder Applikationen abdeckt, die aus dem Einfügen,

Zusammenfügen oder der Änderung des genetischen Materials in einer lebenden Zelle entstehen. Diese fehlende Unterscheidung zwischen Synthetischer Biologie und klassischer Gentechnik ermöglicht laut den SC jedoch, auf die umfangreichen Regularien zur Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) zurückzugreifen. So kommen die Stellungnahmen auch zu dem Schluss, dass bestehende Methoden der Risikobewertung, insbesondere die zur Bewertung von GVO oder von Chemikalien, auf die Synthetische Biologie angewendet werden können. Allerdings geben sie auch zu bedenken, dass einige Entwicklungen der Synthetischen Biologie eine verbesserte Risikobewertung nötig machen werden. Die SC geben als Beispiele für solche Entwicklungen der Synthetischen Biologie die Kombination von genetischen Bausteinen und damit einhergehende neue Interaktionen, die Kombination von Methoden der Risikobewertung für chemische und biologische Bestandteile von Protozellen, die Interaktionen zwischen natürlichen und xenobiologischen Organismen oder auch eine allgemeine Beschleunigung von Prozessen der Gentechnik an.

Um die Sicherheit von mithilfe der Synthetischen Biologie hergestellter Organismen zu gewährleisten, schlagen die SC mehrere Verbesserungen vor, die den wissenschaftlichen und technologischen Fortschritt ermöglichen sollen. So soll

- die Charakterisierung biologischer Bausteine und die Entwicklung von Computergestützten Programmen zur Vorhersage der Eigenschaften von mit Synthetischer Biologie hergestellten Organismen unterstützt,
- die Übermittlung von Daten über gentechnische Veränderungen oder genetische Bausteine vereinfacht und standardisiert,
- die Verwendung von GVOs, die allgemein als sicher gelten, als Vergleichsorganismen in der Risikobewertung gefördert und
- der Austausch von Informationen mit den Risikobewertern unterstützt werden.

## **5.4 Regulierung der Synthetischen Biologie im Rahmen der Biodiversitätskonvention (Convention on Biological Diversity, CBD)**

Bei der CBD handelt es sich um ein völkerrechtliches Abkommen, dessen Ziele die Erhaltung der biologischen Vielfalt, die nachhaltige Nutzung ihrer Bestandteile sowie ein gerechter Vorteilsausgleich aus der Nutzung genetischer Ressourcen sind. Auch Deutschland hat als Vertragspartei die Biodiversitätskonvention unterzeichnet. Die Vertragsstaatenkonferenz (Conference of the Parties, COP) der CBD hat bereits 2010 begonnen, sich mit der Synthetischen Biologie zu beschäftigen. In ihrer Entscheidung X/13 (COP 2010) hat die COP um Informationen zur Synthetischen Biologie gebeten, die anschließend dem Subsidiary Body on Scientific, Technical and Technological Advice (SBSTTA) zur Begutachtung vorgelegt wurden. In einer weiteren Entscheidung (XI/11, COP 2012) hat die COP ihr Sekretariat aufgefordert, die Informationen zusammenzufassen und erneut durch den SBSTTA begutachten zu lassen. Dieses Synthesepapier wurde durch einen öffentlichen peer review-Prozess ergänzt und diente der COP bei ihrem zwölften Treffen als Informationsdokument (SCBD 2015a). Bei diesem Treffen entschied die COP (Entscheidung XII/24, COP 2014), verschiedene Maßnahmen zu erlassen, die den Zusammenhang zwischen der Synthetischen Biologie und der Biodiversität klären sollen. So wurde unter anderem ein online-Forum eingerichtet und eine Expertengruppe (Ad Hoc Technical Expert Group, AHTEG) einberufen, um einerseits die Auswirkungen der Synthetischen Biologie auf die Biodiversität und andererseits die Angemessenheit der bestehenden Methoden zur Risikobewertung zu untersuchen.

Als Ergebnis des online-Forums als auch der AHTEG wurden durch das Sekretariat der CBD zwei Papiere erstellt (SCBD 2015b und 2015c). Das erste fasst die Diskussion des online-Forums sowie weitere bei der CBD eingegangene Informationen zur Synthetischen Biologie zusammen. Im zweiten Papier wird die Diskussion der AHTEG zusammengefasst. Die AHTEG stellte eine eigene operationelle Definition der Synthetischen Biologie auf, in der diese wie folgt definiert wird: „Synthetic biology is a further development and new dimension of modern biotechnology that combines science, technology and engineering to facilitate and accelerate the understanding,

design, redesign, manufacture and/or modification of genetic materials, living organisms and biological systems.” Diese Definition unterscheidet sich insofern von anderen Definitionen, als dass sie auch Komponenten und Produkte der Synthetischen Biologie mit einbezieht. Komponenten werden dabei als Bausteine, die in einem Prozess der Synthetischen Biologie genutzt werden (z. B. ein DNA-Molekül), und Produkte als das Ergebnis eines Prozesses der Synthetischen Biologie (z. B. eine Chemikalie) definiert. Diese können nach Meinung der AHTEG ebenfalls ein potentiell Risiko für die biologische Vielfalt darstellen.

Neben der Definition der Synthetischen Biologie gibt die AHTEG auch mehrere Vorschläge zur Berücksichtigung an den SBSTTA ab, der wiederum Empfehlungen an die COP weitergibt. Einige dieser Vorschläge an den SBSTTA könnten sich auch auf die Regulierung der Synthetischen Biologie im Rahmen der CBD auswirken. So empfiehlt die AHTEG, die von ihr aufgestellte operationelle Definition zu verabschieden, womit auch Komponenten und Produkte in den Geltungsbereich der CBD fallen würden. Die AHTEG verweist allerdings auch auf ihre Feststellung, dass Organismen, die zurzeit oder in der nahen Zukunft mithilfe der Synthetischen Biologie hergestellt werden, lebende modifizierte Organismen (LMOs) im Sinne des Cartagena Protokolls sind. Als Maßnahmen schlägt die AHTEG einen Monitoringprozess vor, wie er in ähnlicher Weise in Deutschland bereits durch die ZKBS vorgenommen wird. Weitere Vorschläge der AHTEG betreffen vor allem eine koordinierte Vorgehensweise bei der Bewertung der Synthetischen Biologie, wobei auch bestehende Prozesse genutzt und online-Tools miteinbezogen werden sollen.

## **5.5 Fazit**

In Deutschland können alle Organismen, die momentan mithilfe der Synthetischen Biologie erzeugt werden, durch das GenTG bewertet und eingestuft werden. Sollten in fernerer Zukunft Protozellen entstehen, die selbstständig replizieren, wären diese nicht vom GenTG abgedeckt und bedürften eventuell einer erweiterten Risikobewertung. Die ZKBS führt ein Monitoring der Synthetischen Biologie durch, um solche oder ähnliche Anwendungen zu identifizieren und auf ihre biologische Sicherheit hin zu bewerten.

Ein ähnlicher Monitoringprozess wird auch auf internationaler Ebene angeregt, z. B. durch die SC der Europäischen Kommission oder die Expertengruppe AHTEG Synthetische Biologie im Rahmen der Biodiversitätskonvention.

## 5.6 Literatur

Acevedo-Rocha CG *et al.* (2013). From essential to persistent genes: a functional approach to constructing synthetic life. *Trends Genet* **29**: 273-9.

Adamala K &, Szostak JW (2013). Nonenzymatic Template-Directed RNA Synthesis Inside Model Protocells. *Science* **342**: 1098-100.

Annaluru N *et al.* (2014). Total synthesis of a functional designer eukaryotic designer chromosome. *Science* **344**: 55-8.

Baba *et al.* (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 2006.0008.

Cameron DE *et al.* (2014). A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol.* **12**: 381-90.

Cello J *et al.* (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* **297**: 1016-8.

Conference of the Parties (2012). Decision XI/11. New and emerging issues relating to the conservation and sustainable use of biodiversity. <https://www.cbd.int/doc/decisions/cop-11/cop-11-dec-11-en.pdf>

Conference of the Parties (2010). Decision X/13. New and emerging issues. <https://www.cbd.int/doc/decisions/cop-10/cop-10-dec-13-en.pdf>

Conference of the Parties (2014). Decision XII/24. New and emerging issues: synthetic biology. <https://www.cbd.int/doc/decisions/cop-12/cop-12-dec-24-en.pdf>

DFG, acatech und Leopoldina (2009). Synthetische Biologie – Stellungnahme. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

European Commission (2013) Request for a joint scientific opinion on Synthetic Biology. Brussel

Gerdes *et al.* (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* **185**:5673-84.

Gibson DG *et al.* (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**: 52-6.

Kato J & Hashimoto M (2007). Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Syst Biol* **3**: 132.

Kelwick R *et al.* (2015). A forward-design approach to increase the production of poly-3-hydroxybutyrate in genetically engineered *Escherichia coli*. *Plos One* **10**: e0117202.

Krishnakumar R & Ling J (2014). Experimental challenges of sense codon reassignment: an innovative approach to genetic code expansion. *FEBS Lett* **588**: 383-8.

Lajoie MJ *et al.* (2013). Probing the limits of genetic recoding in essential genes. *Science* **342**: 361-3.

Leduc S (1912). La biologie synthétique. Études de biophysique, vol. II. Paris: Poinat.

Malyshev *et al.* (2014). A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature* **509**: 385-8.

Peplow M (2016). Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. *Nature* **530**: 398-90.

Pinheiro VB & Holliger P (2014). Towards XNA nanotechnology: new materials from synthetic genetic polymers. *Trends Biotechnol* **32**: 321-8.

Rasmussen *et al.* (2009). A roadmap to protocells. *Protocells: Bridging Nonliving and Living Matter*. 71-100.

Ro DK *et al.* (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**: 940-3.

Rogers JK and Church GM (2016). Genetically encoded sensors enable real-time observation of metabolite production. *Proc Natl Acad Sci USA*. Epub ahead of print.

Rovner *et al.* (2015). Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids. *Nature* **518**: 89-93.

Sanofi (2014). Pressemitteilung.

<http://www.sanofi.de//de/de/download.jsp?file=41AF7CE6-68E8-4EE8-AA17-7700F6059036.pdf>

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks) (2014). Opinion on Synthetic Biology I, Definition. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenih\\_r\\_o\\_044.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_044.pdf)

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks) (2015a), Opinion on Synthetic Biology II, Risk assessment methodologies and safety aspects. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenih\\_r\\_o\\_048.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_048.pdf)

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCHER (Scientific Committee on Health and Environmental Risks) (2015b). Opinion on Synthetic Biology II, Risks to the environment and biodiversity related to synthetic biology and research priorities in the field of synthetic biology. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenih\\_r\\_o\\_050.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_050.pdf)

SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity) (2015a). Synthetic biology, Montreal, Technical Series No. 82, 118 pages.

SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity) (2015b). Updated report and synthesis of views in response to paragraph 7(b) of decision XII/24 on new and emerging issues: synthetic biology. <https://www.cbd.int/doc/meetings/synbio/synbioahteg-2015-01/official/synbioahteg-2015-01-02-en.pdf?download>

SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity) (2015c). Report of the Ad Hoc Technical Expert Group on Synthetic Biology. <https://www.cbd.int/doc/meetings/synbio/synbioahteg-2015-01/official/synbioahteg-2015-01-03-en.pdf?download>

Shuler ML *et al.* (2012). Modeling a minimal cell. *Methods Mol Biol* **881**: 573-610.

Stano P *et al.* (2013). A Remarkable Self Primitive Functional Cells. *Angew Chem* **125**: 13639-42.

Xie Z *et al.* (2011). Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. *Science* **333**: 1307-11.

Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS), (2012). Monitoring der Synthetischen Biologie in Deutschland. [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06\\_Gentechnik/ZKBS/01\\_Allgemeine\\_Stellungnahmen\\_deutsch/01\\_allgemeine\\_Themen/Synthetische\\_Biologie.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=3](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/01_allgemeine_Themen/Synthetische_Biologie.pdf?__blob=publicationFile&v=3)

## **6 Klinische Prüfung mit GVO-haltigen Prüfpräparaten**

Dr. Brigitte Anliker

Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Medizinische Biotechnologie, Langen

Viele Gentherapeutika sowie einige Impfstoffe bestehen aus oder enthalten gentechnisch veränderte Organismen (GVO), was sowohl bei einer Marktzulassung wie auch bei einer klinischen Prüfung speziell berücksichtigt werden muss. So besteht, wie bei jedem anderen Arzneimittel, das zum Beispiel oral oder systemisch verabreicht wird, die Möglichkeit, dass es vom Körper ausgeschieden wird. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit, dass bei GVO-haltigen Arzneimittel nicht nur Abbauprodukte, sondern noch intakte GVO ausgeschieden werden, meistens gering, da die verabreichten GVO in der Regel vom Immunsystem erkannt und inaktiviert werden. Je nach Art des GVO, der verabreichten Dosis, des Verabreichungsweges oder dem Immunstatus der behandelten Personen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen des GVO in die Umwelt gelangen. Aus diesem Grund erfolgt bei einem Zulassungsantrag wie auch bei einem Antrag auf klinische Prüfung mit einem GVO-haltigen Arzneimittel immer eine Bewertung des Risikos für die Umwelt, welche sicherstellen soll, dass mit der klinischen Anwendung keine unververtretbaren Risiken für die Umwelt und Dritte einhergehen.

Bei der Zulassung GVO-haltiger Arzneimittel, welche EU-weit erteilt wird, stellt das zentralisierte Zulassungsverfahren sicher, dass neben der Beurteilung der Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit des Arzneimittels auch eine Umweltverträglichkeitsprüfung gemäß der Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung von genetisch veränderten Organismen in die Umwelt durchgeführt wird [1, 2]. Innerhalb dieses Zulassungsverfahrens, welches von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) koordiniert wird, erfolgen zur Umweltverträglichkeitsprüfung des GVO-haltigen Arzneimittels auch Anhörungen der von den Mitgliedsstaaten gemäß der Richtlinie 2001/18/EG geschaffenen oder benannten Stellen, wie dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in Deutschland [2].

Während also bei der Marktzulassung ein einheitliches Gemeinschaftsverfahren durchgeführt wird, unterscheiden sich jedoch die Anforderungen und Verfahren der

einzelnen EU-Mitgliedsstaaten bei klinischen Prüfungen mit GVO-haltigen Arzneimitteln erheblich. Die Unterschiede gehen soweit, dass einige Mitgliedsstaaten bei klinischen Prüfungen die nationalen Rechtsvorschriften über die Anwendung von GVO in geschlossenen Systemen zu Grunde legen, während andere Mitgliedsstaaten die Rechtsvorschriften über die absichtliche Freisetzung von GVO in die Umwelt oder Sondervorschriften anwenden. Einen guten Überblick über diese komplexe Situation gibt eine Analyse zur Anwendbarkeit der Rechtsvorschriften über die Anwendung von GVO in geschlossenen Systemen bei klinischen Prüfungen, welche von der Europäischen Kommission vor zehn Jahren in Auftrag gegeben wurde [3].

## **6.1 Klinische Prüfung mit GVO-haltigen Arzneimitteln in Deutschland**

In Deutschland wurden die europäischen Richtlinien über die Anwendung von GVO in geschlossenen Systemen sowie über die absichtliche Freisetzung von GVO in die Umwelt überwiegend im Gentechnikgesetz (GenTG) umgesetzt. Nach § 2 Abs. 3 des GenTG fällt die Anwendung von GVO am Menschen allerdings nicht in den Anwendungsbereich des GenTG. Regelungen für klinische Prüfungen mit GVO-haltigen Arzneimitteln finden sich stattdessen im Arzneimittelgesetz (AMG). Danach darf eine klinische Prüfung mit einem Arzneimittel, das aus einem GVO oder einer Kombination von GVO besteht oder solche enthält, nur durchgeführt werden, wenn unvertretbare schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit Dritter und die Umwelt nicht zu erwarten sind (§ 40 Abs. 1 Satz 3 Nr. 2a AMG). Grundlage für diese Beurteilung ist, wie eingangs erwähnt, dass bei einer klinischen Prüfung mit einem GVO-haltigen Arzneimittel eine Umweltverträglichkeitsprüfung durchgeführt wird. Die Details hierzu sind in der Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen (GCP-V) geregelt [4]. Danach sind bei Beantragung einer klinischen Prüfung mit einem GVO-haltigen Prüfpräparat eine Umweltverträglichkeitsprüfung gemäß Anhang II der Richtlinie 2001/18/EG und weitere Informationen gemäß Anhang III dieser Richtlinie vorzulegen (§ 7 Abs. 4 Nr. 3 GCP-V).

Nach § 9 Abs. 4 Satz 3 GCP-V umfasst die Genehmigung einer klinischen Prüfung mit einem GVO-haltigen Prüfpräparat durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) als zu-

ständige Bundesoberbehörde auch die Genehmigung der Freisetzung des GVO im Rahmen der klinischen Prüfung, wobei die Entscheidung hierzu im Benehmen mit dem BVL, welches in Deutschland die zuständige Bundesoberbehörde für die Freisetzungsgenehmigung von GVO ist, erfolgt. Damit zeigen sich gewisse Parallelen zwischen dem zentralisierten Zulassungsverfahren und der Genehmigung einer klinischen Prüfung mit GVO-haltigen Arzneimitteln in Deutschland. So sind die notwendigen Unterlagen zur Umweltverträglichkeitsprüfung weitgehend gleich und in beiden Fällen erfolgt die Bewertung arzneimittelrechtlicher Aspekte und die Umweltverträglichkeitsprüfung parallel innerhalb eines Verfahrens.

## **6.2 Abgrenzung zwischen dem GenTG und der GCP-V**

Die Frage nach der Abgrenzung zwischen dem Anwendungsbereich des GenTG und der GCP-V stellt sich, weil zwar das GenTG die Anwendung von GVO am Menschen ausschließt, jedoch nicht näher definiert, was hierunter zu verstehen ist. Das Gesetz lässt also offen, ob nur die Injektion des GVO-haltigen Arzneimittels als unmittelbare Anwendung des GVO am Menschen vom GenTG ausgenommen ist, oder ob auch vorangehende Vorgänge und Arbeiten, wie beispielsweise die Lagerung des Arzneimittels beim Arzt oder die Vorbereitung des Arzneimittels zur Injektion unter die „Anwendung am Menschen“ subsumiert werden können. Dieselbe Frage stellt sich, wenn dem Prüfungsteilnehmer nach der Verabreichung des GVO-haltigen Arzneimittels Proben entnommen werden, welche den GVO enthalten können. Endet mit der Entnahme dieser Proben die Anwendung des GVO am Menschen und fallen die nachfolgenden Untersuchungen dieser Proben wieder in den Geltungsbereich des GenTG? Tatsächlich wurde bis vor kurzem von den Behörden das Merkmal der Anwendung von GVO am Menschen sehr eng ausgelegt. Die im Rahmen der klinischen Prüfung erteilte Freisetzungsgenehmigung umfasste im Wesentlichen nur die unmittelbare Anwendung des GVO am Menschen, das heißt die Injektion oder anderweitige Verabreichung des GVO-haltigen Arzneimittels, die nachfolgende Entnahme von Proben und die mögliche Ausscheidung des GVO in die Umwelt über Körperflüssigkeiten und Exkrememente der Prüfungsteilnehmer. Alle anderen Arbeiten und Tätigkeiten unterlagen nach Auffassung der Bundesoberbehörden und den meisten für den Vollzug des GenTG zuständigen Landesbehörden weiterhin dem GenTG.

Im Rahmen einer Verwaltungsvereinbarung zwischen dem PEI und dem BVL wurde diese enge Auslegung nun etwas geöffnet. Die Verwaltungsvereinbarung regelt zwar in erster Linie die Aufgabenverteilung zwischen den beiden Bundesoberbehörden und die behördliche Verfahrensweise bei der Bewertung von Anträgen zur Genehmigung klinischer Prüfung mit GVO-haltigen Prüfpräparaten. Gleichzeitig enthält die Vereinbarung aber auch eine neue Festlegung der Vorgänge und Arbeiten mit einem GVO-haltigen Prüfpräparat, welche von der erteilten Genehmigung der klinischen Prüfung umfasst sein können. Da die Folge dieser Einbeziehung in die von der Genehmigung der klinischen Prüfung umfassten Freisetzungsgenehmigung ist, dass solche Tätigkeiten nicht länger als gentechnische Arbeiten gelten und daher keiner weiteren Anzeige-, Anmelde-, oder Genehmigungspflicht nach dem GenTG unterliegen, wurden die für den Vollzug des GenTG zuständigen Landesbehörden in diesen Prozess der Entstehung der Verwaltungsvereinbarung miteinbezogen. Mit Inkrafttreten der Verwaltungsvereinbarung im April 2015 können nun unter der Voraussetzung, dass ein enger räumlicher und zeitlicher Zusammenhang mit der unmittelbaren Anwendung des GVO am Menschen besteht, folgende Vorgänge und Arbeiten von der Genehmigung der klinischen Prüfung umfasst werden:

- Kurzfristige Aufbewahrung des GVO-haltigen Prüfpräparates oder GVO-haltiger Materialien am Prüfzentrum von bis zu 3 Werktagen:

Diese Regelung bezieht sich auf das GVO-haltige Prüfpräparat, Reste des GVO-haltigen Prüfpräparates sowie von potenziell kontaminierten Materialien und Abfällen. Die Zeitspanne von 3 Werktagen lässt sich in begründeten Fällen und unter der Voraussetzung, dass ein enger zeitlicher Zusammenhang mit der unmittelbaren Anwendung des GVO am Menschen bestehen bleibt, verlängern. Eine langfristige Lagerung über mehrere Wochen und Monate, beispielsweise über die gesamte Dauer der klinischen Prüfung, erfüllt diese Voraussetzung im Regelfall nicht mehr.

- Innerbetrieblicher Transport des GVO-haltigen Prüfpräparates oder GVO-haltiger Materialien:

Zusätzlich zur kurzfristigen Aufbewahrung des GVO-haltigen Prüfpräparates und GVO-haltiger Materialien ist auch deren innerbetrieblicher Transport von der Ge-

nehmung der klinischen Prüfung umfasst. Diese Regelung bezieht sich ausschließlich auf den innerbetrieblichen Transport, da der außerbetriebliche Transport den allgemeinen gesetzlichen Regelungen des Gefahrguttransports unterliegt.

- Rekonstitution und Vorbereitung des GVO-haltigen Prüfpräparates zur Verabreichung:

Die Rekonstitution und Aufbereitung des GVO-haltigen Prüfpräparates sowie die sonstige Verwendung zur Vorbereitung der Verabreichung kann von der Genehmigung der klinischen Prüfung unter der Voraussetzung, dass diese Arbeitsschritte keine Herstellungserlaubnis gemäß § 13 Abs. 1 AMG erfordern, umfasst werden. Im Gegensatz dazu verbleiben sämtliche Vorgänge und Arbeiten, die notwendig sind, um das GVO-haltige Prüfpräparat herzustellen und die nach § 13 Abs. 1 AMG einer Herstellungserlaubnis bedürfen, im Geltungsbereich des GenTG und sind als gentechnische Arbeiten gesondert anzeige-, anmelde- oder genehmigungspflichtig. Entsprechende Herstellungsschritte am Prüfzentrum sind hiervon nicht ausgenommen.

- Verabreichung des GVO-haltigen Prüfpräparates und eine mögliche Ausscheidung des GVO:

Die Verabreichung des GVO-haltigen Prüfpräparates als unmittelbare Anwendung des GVO am Menschen und eine mögliche Ausscheidung des verabreichten GVO durch die Prüfungsteilnehmer ist von der Genehmigung der klinischen Prüfung umfasst.

- Rücktransport und Entsorgung von potenziell kontaminierten Materialien und Abfällen:

Potenziell kontaminierte Materialien und Abfälle fallen in der Regel vor allem im Prüfzentrum an. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass auch beim Prüfungsteilnehmer zu Hause potenziell kontaminierte Abfälle entstehen, zum Beispiel wenn die Injektionsstelle über eine gewisse Zeitspanne abgedeckt wird, um eine Verbreitung des GVO in die Umwelt über die Injektionsstelle zu verhindern. Um eine fachgerechte Entsorgung des möglicherweise kontaminierten Abdeckmaterials sicherzustellen, wird dieses üblicherweise von den Prüfungsteilnehmern in verschließbaren Plastik-

beuteln gesammelt und zum Prüfzentrum zurückgebracht. Dieser Rücktransport zum Prüfzentrum, wie auch die fachgerechte Dekontamination und Entsorgung sämtlicher potenziell GVO-kontaminierter Materialien, Abfälle oder Reste des GVO-haltigen Prüfpräparates am Prüfzentrum wird von der Genehmigung der klinischen Prüfung umfasst.

- Entnahme, kurzfristige Aufbewahrung und innerbetrieblicher Transport von Proben der Prüfungsteilnehmer:

Die Entnahme, kurzfristige Aufbewahrung am Prüfzentrum und der innerbetriebliche Transport von Proben der Prüfungsteilnehmer, welche den GVO enthalten können, kann von der Genehmigung der klinischen Prüfung umfasst werden. Wiederum gilt als Richtwert für eine kurzfristige Aufbewahrung eine Dauer von bis zu 3 Werktagen. Jedoch lässt sich auch hier in begründeten Fällen und unter der Voraussetzung, dass ein enger zeitlicher Zusammenhang mit der unmittelbaren Anwendung des GVO am Menschen bestehen bleibt, die Zeitspanne verlängern. Eine langfristige Lagerung über mehrere Wochen und Monate erfüllt aber auch hier diese Voraussetzung nicht mehr.

- Analysen und anderweitige Verwendungen von Proben der Prüfungsteilnehmer:

Einige Analysen und anderweitige Verwendungen von Proben, welche den GVO enthalten können, sind von der Genehmigung der klinischen Prüfung umfasst. Dazu gehören insbesondere labordiagnostische Routine-Untersuchungen, welche nach den Vorgaben des Prüfplans durchgeführt werden, wie auch labordiagnostische Untersuchungen, welche unabhängig von der klinischen Prüfung im Rahmen einer Erkrankung oder eines Notfalls notwendig werden. Von der Genehmigung der klinischen Prüfung ausgenommen sind jene weiterführenden Arbeiten und Untersuchungen mit dem Probenmaterial, welche zu einer erneuten Vermehrung des GVO führen können. Dies trifft insbesondere auf die Untersuchungen zur Biodistribution und Ausscheidung des GVO zu. Dabei wird aber nicht im Einzelnen geprüft, ob die gewählte Methode tatsächlich zu einer Vermehrung des GVO führen kann oder nicht. Vielmehr sind diese Untersuchungen kategorisch ausgeschlossen. Bei anderen weiterführenden

den Arbeiten mit bzw. Untersuchungen an Proben der Prüfungsteilnehmer ist letztlich im Einzelfall zu entscheiden, ob diese unter die Genehmigung der klinischen Prüfung fallen oder nicht.

Mit dieser Auflistung wird auch erkennbar, dass gewisse zusätzliche Informationen von den Antragstellern zur Verfügung gestellt werden müssen, damit die Bundesoberbehörden entscheiden können, welche Bereiche im Umgang mit dem GVO von der Freisetzungsgenehmigung im Rahmen der klinischen Prüfung erfasst werden. Dazu gehören beispielsweise Angaben zur oberen Begrenzung der Zeitspanne, über die das Prüfpräparat und/oder potenziell GVO-haltige Proben der Prüfungsteilnehmer am Studienzentrum gelagert werden, sowie Informationen zu den Sicherheitsvorkehrungen während der Lagerung und des innerbetrieblichen Transports des GVO-haltigen Prüfpräparates, von Resten des GVO-haltigen Prüfpräparates und von potenziell kontaminierten Materialien und Abfällen. Besonders hilfreich ist auch eine tabellarische Zusammenstellung der Analysen und anderweitigen Verwendungen von Proben der Prüfungsteilnehmer, welche keine labordiagnostischen Routine-Untersuchungen darstellen. Weitere Informationen zu den notwendigen Angaben und dem Umfang der Freisetzungsgenehmigung gemäß § 9 Abs. 4 Satz 3 GCP-V befinden sich auch auf der Homepage des PEI [5].

Mit der neuen Festlegung der Vorgänge und Arbeiten, welche nun von der erteilten Freisetzungsgenehmigung im Rahmen der klinischen Prüfung umfasst sein können, ist die Abgrenzung zwischen dem GenTG und der GCP-V nicht mehr so scharf wie vor dem Inkrafttreten der Verwaltungsvereinbarung. Um hier für alle Beteiligten Klarheit zu schaffen, nimmt das PEI einen Hinweis in den Genehmigungsbescheid der klinischen Prüfung auf, welcher die Vorgänge und Arbeiten mit dem GVO-haltigen Arzneimittel auflistet, die nicht von der Freisetzungsgenehmigung im Rahmen der Genehmigung der klinischen Prüfung erfasst sind. Das PEI übermittelt den Bescheid dem Antragsteller und den für den Sponsor und den Leiter der klinischen Prüfung zuständigen Landesbehörden, die für die Überwachung der klinischen Prüfung nach AMG zuständig sind. Gleichzeitig leitet das BVL eine Kopie des Bescheids an die für den Vollzug des GenTG zuständigen und von der klinischen Prüfung betroffenen Landesbehörden weiter. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Landesbehör-

den informiert werden, falls gewisse Bereiche und Arbeiten nach Ansicht der Bundesoberbehörden nicht unter die Freisetzungsgenehmigung im Rahmen der Genehmigung der klinischen Prüfung fallen, und daher im Geltungsbereich des GenTG verbleiben. In diesem Fall obliegt es dem Antragsteller der klinischen Prüfung die zuständigen Landesbehörden zu kontaktieren, um zu klären, ob diese Bereiche gentechnische Arbeiten darstellen, und somit einer gesonderten Anzeige-, Anmelde-, oder Genehmigungspflicht nach dem GenTG unterliegen.

### **6.3 Überblick über therapeutische Ansätze mit GVO-haltigen Arzneimitteln**

Welche GVO werden zurzeit für eine klinische Anwendung getestet oder sind bereits in der EU zugelassen? GVO, die für einen therapeutischen Ansatz in Frage kommen, sind sehr vielfältig. Die Spannweite reicht von genetisch modifizierten autologen Zellen über genetisch modifizierte Bakterien und replikationsdefiziente virale Vektoren bis hin zu genetisch modifizierten onkolytischen Viren. Ein Überblick über die zwischen 2010 und 2015 am PEI eingegangenen Anträge auf klinische Prüfung mit GVO-haltigen Arzneimitteln gibt Tabelle 6.1. Bei einem gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung einer monogenetischen Erbkrankheit kann ein replikationsdefizienter viraler Vektor mit einer funktionalen Gen-Kopie ausgestattet und dem Betroffenen direkt verabreicht werden. Ein Beispiel hierfür ist Glybera®, welches 2012 als erstes Gentherapeutikum in der EU zugelassen wurde [6, 7]. Glybera® ist ein von einem Adeno-assoziierten Virus (AAV) abgeleiteter Vektor mit einer Lipoproteinlipase-Genexpressionskassette, welcher zur Behandlung der extrem seltenen Fettstoffwechselerkrankung Lipoproteinlipase-Defizienz eingesetzt wird. Nach Injektion in die Muskulatur dringt der AAV-Vektor in die Zellen ein und startet die Expression des therapeutischen Proteins, der Lipoproteinlipase. Während der virale Vektor in diesem Fall dem Patienten direkt verabreicht wird, werden bei anderen therapeutischen Ansätzen, beispielsweise bei der Krebs-Immuntherapie mit genetisch modifizierten T-Zellen, den Patienten erst Zellen entnommen, um diese ex vivo mit replikationsdefizienten Vektoren genetisch zu modifizieren. Anschließend werden die modifizierten Zellen dem Patienten reinfundiert [8]. Bei anderen Ansätzen kommen statt replikati-

onsdefizienten viralen Vektoren replikationskompetente Viren zum Einsatz. Ein Beispiel hierfür sind die sogenannten onkolytischen Viren, die Krebspatienten direkt in die Blutbahn oder in den Tumor verabreicht werden. Nach der Verabreichung replizieren die Viren innerhalb der Tumorzellen, was schließlich zur Zellyse führt. Dabei bilden die virale Replikation und die nachfolgende Eliminierung der Tumorzellen die Grundlage dieses Therapieansatzes. Ein solcher Ansatz ist bereits so weit fortgeschritten, dass Ende letzten Jahres mit Imlygic®, einem attenuierten, replikationskompetenten Herpes-Simplex-Virus, das zudem mit einer GM-CSF Genexpressionskassette ausgestattet ist, das erste onkolytische Virus in der EU zur Behandlung einer Subgruppe von Patienten mit metastasierendem Melanom zugelassen wurde [9].

Anzahl Anträge (2010-2015)	Klasse	Parentale Organismen
11	Replikationsdefiziente virale Vektoren	Modifiziertes Vakziniavirus Ankara, Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus
10	Replikationskompetente Viren	Vakziniavirus, Herpes-Simplex-Virus, Vesikuläres Stomatitis-Virus
15	Genetisch modifizierte humane Zellen	Retrovirus, Lentivirus, primäre Patientenzellen
03	Genetisch modifizierte Bakterien	Salmonellen

Tabelle 6.1: Anträge auf klinische Prüfung mit GVO-haltigen Arzneimitteln in Deutschland (2010-15).

## 6.4 Umweltrisikobewertung GVO-haltiger Arzneimittel

Anhand dieser drei Beispiele wird deutlich, dass sich das Umweltrisiko der verschiedenen GVO-haltigen Arzneimittel erheblich unterscheiden kann. Deshalb ist es notwendig, dass das Umweltrisiko für jedes einzelne GVO-haltige Arzneimittel in Abhängigkeit von seinem natürlichem Risikopotential und seiner klinischen Anwendung eingehend überprüft wird. Die Überprüfung hat das Ziel die möglichen direkten, indirekten, sofortigen und späteren schädlichen Auswirkungen eines GVO auf die Umwelt und die Gesundheit Dritter in einem schrittweisen Verfahren systematisch zu evaluieren. Dabei werden in einem ersten Schritt die Merkmale des GVO, welche mögliche schädliche Auswirkungen haben können, identifiziert. Entscheidend dabei sind Merkmale wie die Replikationskompetenz, die Fähigkeit zur latenten Infektion und späteren Reaktivierung, die Pathogenität und die Attenuierung, sowie die Möglichkeit einer Reversion der Attenuierung und die genetischen Stabilität im allgemeinen. Bei diesem ersten Schritt sollen dementsprechend auch nicht nur die Merkmale des GVO betrachtet werden, sondern auch jene, welche durch eine Reversion der Attenuierung oder durch homologe Rekombination neu entstehen könnten. Im zweiten Schritt wird evaluiert, welche möglichen Folgen sich aus den schädlichen Auswirkungen ergeben könnten und wie hoch deren Ausmaß wäre. Dabei wird beispielsweise auch berücksichtigt, wie verbreitet und ausgeprägt die Immunität gegen den parentalen Organismus, von dem der GVO abgeleitet wurde, in der Bevölkerung ist, und ob eine Prophylaxe oder eine Therapieoption bei ungewollter Exposition zur Verfügung steht. Bei der Bewertung der möglichen Folgen ist es zudem wichtig, dass nicht nur die Allgemeinbevölkerung betrachtet wird, sondern insbesondere auch Risikogruppen, wie zum Beispiel stark immunsupprimierte Personen, Schwangere und kleine Kinder, bei denen die Folgen einer Übertragung des GVO deutlich schwerwiegender sein können als bei gesunden Erwachsenen. Schließlich wird im dritten Schritt die Wahrscheinlichkeit, mit der die zuvor identifizierten schädlichen Auswirkungen und deren Folgen eintreten könnten, bewertet. Aus den möglichen Folgen und deren Wahrscheinlichkeiten erfolgt schließlich im vierten Schritt eine erste Risikoabschätzung, und zwar einzeln für jedes identifizierte Merkmal des GVO, welches eine schädliche Auswirkung haben könnte. Wird dabei das Risiko für die Umwelt oder für Dritte als zu hoch und daher als nicht akzeptabel eingestuft, müssen im fünf-

ten Schritt risikominimierende Maßnahmen geprüft werden, welche das Risiko auf ein akzeptables Maß senken. In der Regel zielen solche Maßnahmen darauf ab, dass die Wahrscheinlichkeit des Eintretens der schädlichen Auswirkungen bzw. deren Folgen auf die Umwelt und/oder die Gesundheit Dritter herabgesetzt wird. Beispielsweise kann bei einer entsprechenden Risikobewertung festgelegt werden, dass die Injektionsstelle über eine gewisse Zeitspanne mit einem geeigneten Verband abgedeckt wird, um zu verhindern, dass der GVO über die Injektionsstelle in die Umwelt abgegeben oder auf Dritte übertragen wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch die Ein- und Ausschlusskriterien im Prüfplan sichergestellt wird, dass nur Prüfungsteilnehmer in die klinische Prüfung eingeschlossen werden, welche über die Zeitspanne einer möglichen Ausscheidung des GVO keinen engen Kontakt mit Risikogruppen haben. Unter Berücksichtigung der festgelegten risikominimierenden Maßnahmen wird schließlich in einem letzten Schritt das Gesamtrisiko für die Umwelt und Dritte bewertet.

Weitere Informationen zur Umweltrisikobewertung für GVO-haltige Arzneimittel sowie Angaben, wie die Anforderungen der Richtlinie 2001/18/EG auf die Besonderheiten GVO-haltiger Arzneimittel übertragen werden können, sind auch in einer EMA-Leitlinie [10] und in einem Übersichtsartikel zu finden [11].

## 6.5 Literatur

1. Richtlinie 2001/18/EG: Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 106/1 vom 17.04.2001
2. Verordnung (EG) Nr. 726/2004: Amtsblatt der Europäischen Union L 136/1 vom 30.04.2004
3. Analysis of the applicability of the contained use legislation for clinical trials, 2006, Perseus BVBA: <<http://www.genetherapynet.com/download/EU-analysis-Contained-use.pdf>>
4. Verordnung über die Anwendung der guten klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen vom 09. August 2004, BGBl I Nr. 42: 2081
5. Informationen zur Antragsunterlagen einer klinischen Prüfung mit GVO und der Freisetzungsgenehmigung: <<http://www.pei.de/DE/infos/pu/genehmigung-klinische-pruefung/gvo/klinische-pruefungen-gvo-node.html>>

6. Büning H. (2013). Gene therapy enters the pharma market: The short story of a long journey. *EMBO Mol Med.* 5, 1-3.
7. Melchiorri, D., Pani, L., Gasparini, P., Cossu, G., Ancans, J., Borg, J.J., Drai, C., Fiedor, P., Flory, E., Hudson, I., Leufkens, H.G., Müller-Berghaus, J., Narayanan, G., Neugebauer, B., Pokrotnieks, J., Robert, J.L., Salmonson, T., Schneider, C.K. (2013). Regulatory evaluation of Glybera in Europe – two committees, one mission. *Nat Rev Drug Discov* 12, 719.
8. Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Darcy, P.K. (2013). Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13, 525-41.
9. Amgen. Press release: European commission approves Amgen's IMLYGICTM (talimogene laherparepvec) as first oncolytic immunotherapy in Europe <<http://www.amgen.com/media/news-releases/2015/12/european-commission-approves-amgens-imlygic-talimogene-laherparepvec-as-first-oncolytic-immunotherapy-in-europe/>> (17th Dec. 2015).
10. Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products: EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006.
11. Anliker, B., Longhurst, S., Buchholz, C.J. (2010). Environmental risk assessment for medicinal products containing genetically modified organisms. *Bundesgesundheitsbl* 53, 52-57.

## 7 Zielgerichtetes Genom-Editieren mit Designer-Nukleasen

Dr. Tatjana Cornu

Institut für Zell- und Gentherapie & Centrum für Chronische Immundefizienz  
UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG

### 7.1 Gentherapie

Seit über 10 Jahren wird Gentherapie erfolgreich im Rahmen von klinischen Studien für unheilbare Erbkrankheiten, meist primäre Immundefekte, angeboten [1]. Typischerweise leiden die Immunschwäche-Patienten schon im frühen Alter an wiederkehrenden, schweren Infekten (durch Pilze oder Bakterien), Impfkomplicationen, chronischen Durchfällen oder Gedeihstörungen. Antibiotikatherapien bleiben zum Teil über mehrere Monate ohne Effekt und einige Fälle verlaufen so schwer, dass die Patienten komplett von der Umgebung isolieren werden müssen, da diese Patienten Keime, die für die normale Population harmlos sind, nicht bekämpfen können. Konventionell werden solche Patienten durch eine allogene Stammzelltransplantation behandelt, die jedoch für einige Patienten mit schweren Nebenwirkungen, wie einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion einhergeht. Für andere Patienten können keine passenden Spender gefunden werden, was in besonders schweren Fällen zum Tod der Patienten führt. Für diese Patienten kommen experimentelle Ansätze, wie die Gentherapie, in Frage.

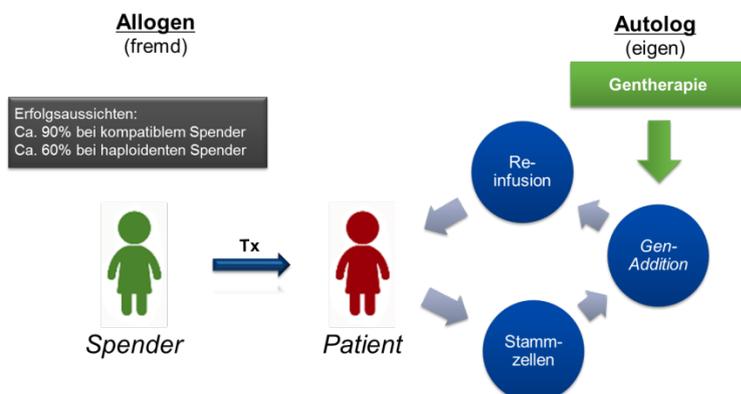


Abbildung 7.1: Prinzip der hämatopoietischen Stammzelltherapie in Kombination mit Gentherapie.

Das Prinzip der Gentherapie bei Immundefekt-Patienten basiert auf der Entnahme autologer (eigener) Blutstammzellen des Patienten, die anschließend ex vivo (außerhalb des Körpers) mit einer gesunden Kopie des defektes Gens ausgestattet werden (Abbildung 7.1). Diese Gen-Addition erfolgt in der Regel durch virale Vektoren, sogenannte Genfähren, die eine gesunde Kopie des Gens stabil in das Erbgut der Blutstammzelle einschleusen. Die genetisch „reparierten“ Blutstammzellen werden abschließend dem Patienten reinfundiert. Bedingt durch die Anwesenheit der gesunden Gen-Kopie kann sich das Immunsystem wieder vollständig entwickeln und somit ein normaler Schutz gegen Krankheitserreger aufgebaut werden. Bei der Gentherapie besteht auch keine Gefahr einer lebensbedrohlichen Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, da die transplantierten Zellen autolog sind, d.h. vom Patienten selbst stammen. Solche Ansätze wurden bislang erfolgreich bei Patienten mit X-SCID (X-chromosomal vererbte Form des schweren kombinierten Immundefekts), ADA-SCID (Adenosindesaminase-Mangel), WAS (Wiskott-Aldrich-Syndrom) und CGD (chronische Granulomatose) angewandt [1]. Einige dieser Erfolge wurden allerdings durch schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (SUE) überschattet: von 93 Patienten, die bislang mit so einer Form der Gentherapie behandelt wurden, entwickelten 16 eine behandelbare Form einer Leukämie und drei verstarben. Diese SUE wurden durch die ungerichtete Integration der gesunden Gen-Kopie in das Erbgut der Blutstammzellen ausgelöst. Die Integration führte zu einer konstitutiven Aktivierung von Proto-Onkogenen, welche schlussendlich die Leukämien verursachte. Durch Verbesserung der eingesetzten Virusvektoren konnte die Aktivierung von zellulären Proto-Onkogenen weitgehend vermieden werden. Seitdem diese optimierten Vektoren eingesetzt werden, sind keine weiteren Patienten an solchen Nebenwirkungen erkrankt. Da das Einschleusen von therapeutischen Genen mittels viraler Vektoren jedoch immer noch zufällig erfolgt, lässt sich ein Restrisiko Proto-Onkogene zu aktivieren oder Tumorsuppressor-Gene zu inaktivieren nicht ausschließen. Des Weiteren lassen sich Erbkrankheiten mit dominantem Erbgang mit einer Gen-Additionsstrategie nicht therapieren. Um die Sicherheit der Gentherapieansätze in Blutstammzellen zu erhöhen und um auch „gain-of-function“-Mutationen zu behandeln, sind deshalb Werkzeuge nötig, die zielgerichtete Veränderungen im Erbgut zulassen. Solche

Werkzeuge stehen heute in der Form von Gen-Scheren, sogenannten Designer-Nukleasen, zu Verfügung.

## 7.2 Gen-Scheren – Werkzeuge für die präzise Genom-Chirurgie

Vor 20 Jahren wurden die ersten maßgeschneiderten Designer-Nukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) genannt, entwickelt [2]. Aufbauend auf der Strukturbestimmung, wie Zinkfinger an DNA binden [3], wurden künstliche Nukleasen generiert, die aus einem DNA-Erkennungsmotiv eines Zinkfinger-Proteins und der katalytischen Untereinheit der FokI-Endonuklease bestanden (Abbildung 7.2). Wie die natürliche FokI-Endonuklease bestehen ZFN aus zwei Untereinheiten, die an der Zielsequenz dimerisieren, um die DNA zu schneiden [4]. Eine ZFN-Untereinheit enthält in der Regel drei bis sechs Zinkfinger-Domänen, wobei jede Domäne im Schnitt drei Nukleotide erkennt. Die Herstellung von ZFN ist allerdings sehr zeitaufwändig und nur wenige Labore bzw. Firmen können ZFN mit ausreichender Spezifität für den therapeutischen Einsatz im Patienten herstellen.

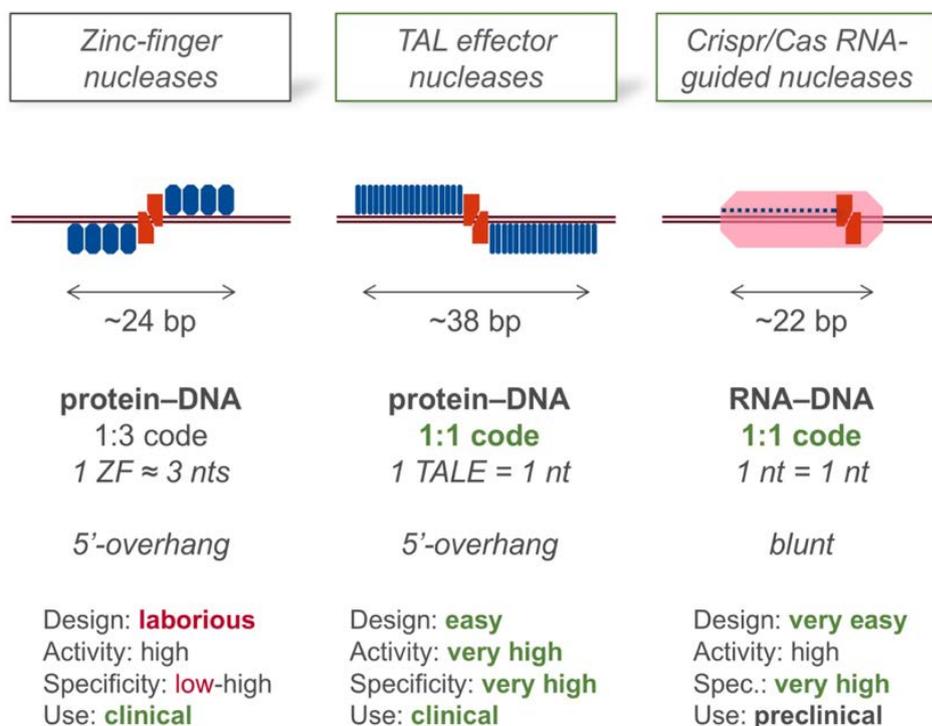


Abbildung 7.2: Hauptklassen von Designer-Nukleasen und ihre biochemischen Eigenschaften.

Im Jahre 2009 erfolgte ein weiterer technologischer Durchbruch. Der Erkennungscode, wie transcription activator-like effectors (TAL-Effektoren) die pflanzenpathogene *Xanthomonas* DNA erkennen, wurde entschlüsselt [5, 6]. TAL-Effektoren binden an spezifische Promotoren des Wirtspflanzengenoms und aktivieren so Gene, welche die bakterielle Infektion begünstigen. Ein prototypischer TAL-Effektor enthält 15 bis 18 hochrepetitive Module, welche die Bindung an die DNA-Zielsequenz vermitteln. Jedes DNA-Bindemodul eines TAL-Effektors erkennt dabei ein spezifisches Nukleotid. Auf der Basis dieses einfachen „1:1-Code“ wurde die Herstellung von maßgeschneiderten TAL-basierten DNA-Bindeproteinen stark vereinfacht. Analog zu ZFN sind die abgeleiteten TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN) dimerisierende Fusionsproteine, die jeweils aus einem TAL-Effektor und einer FokI-Domäne bestehen (Abbildung 7. 2). Im Gegensatz zu ZFN dauert die Herstellung von TALEN lediglich eins bis zwei Wochen. Da in der Regel die Spezifität der TALEN höher ist als die der ZFN [7], stellen sie ein sehr attraktives Werkzeug für die präzise Genom-Chirurgie dar.

2012 folgte der dritte und bislang technologisch nachhaltigste Durchbruch. Mit dem CRISPR/Cas-System wurde eine neue Genom-Editierungsplattform beschrieben [8], die auf dem adaptiven Immunsystem von Bakterien beruht. CRISPR/Cas9 steht für clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein [9]. Dieses System besteht auf einem Protein/RNA-Komplex: das Cas9-Protein ist die DNA-Endonuklease, währenddessen die assoziierte „guide RNA“ (gRNA) die Bindung an die 20-Nukleotid lange Zielsequenz vermittelt. Anders als ZFN und TALEN agiert die CRISPR/Cas-Nuklease als Monomer (Abbildung 7.2). Die Herstellung von diesen RNA-gesteuerten Nukleasen ist noch einfacher als das Design von TALEN und benötigt nur wenige Tage. Ursprünglich war die Spezifität der CRISPR/Cas-Nukleasen den TALEN unterlegen, doch die Weiterentwicklung der Plattform führte zu Designer-Nukleasen mit signifikant erhöhter Spezifität [9].

### **7.3 Applikation**

Das Editieren von Genomen wird für eine Vielfalt an Zwecken genutzt und hat Anwendungen in diversen Gebieten gefunden, welche sowohl die Grundlagenforschung als auch die Biotechnologie und die moderne Medizin umfasst. So wurden in der

Grundlagenforschung eine Vielzahl an neuen Modellorganismen erzeugt, einschließlich Kreuzblütler, Mais, Tabak, Fadenwürmer, Fruchtfliegen, Grillen, Krallenfrösche, Zebrafische, Mäuse, Ratten, Schweine, Rinder und nichtmenschliche Primaten [10]. Gleichzeitig besteht großes Interesse genetisch modifizierte Organismen (GMO), sowohl Pflanzen wie auch Tiere, für die biotechnologische Nutzung herzustellen.

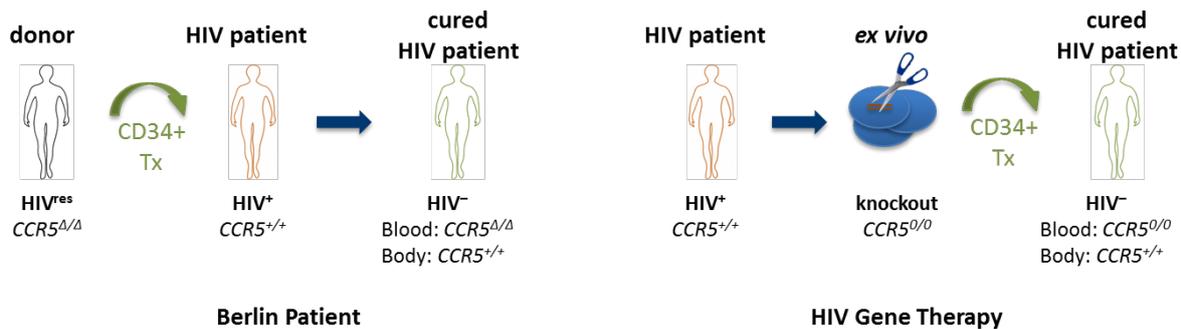


Abbildung 7.3: Prinzip der HIV-Gentherapie mittels Genom-Editierung.

Ein weiteres bedeutsames Gebiet ist die Anwendung dieser Technologie für medizinische Zwecke. Defekte Gene, die z. B. eine Immunschwäche auslösen, können gezielt repariert werden, ohne dass eine extra Gen-Kopie eingeschleust werden muss [11]. Oder aber Zellen lassen sich so modifizieren, dass sie virusresistent werden [12]. So wurde im Jahre 2009 eine klinische Studie initiiert, in der das erste Mal mit ZFN genetisch veränderte Zellen in Patienten eingebracht wurden. Die Studie beruht auf den Schlüssen, die aus der Behandlung des sogenannten „Berlin-Patienten“ gezogen wurden. Verschiedene Studien zeigten, dass eine natürlich vorkommende Mutation im CCR5-Gen, das für einen der beiden HIV-Korezeptoren kodiert, zu einer Resistenz gegen HIV-Infektion führt [13]. Der „Berlin-Patient“ war ein HIV-positiver Patient, der an einer Leukämie erkrankte und eine Stammzelltransplantation benötigte. Die behandelnden Ärzte suchten einen passenden Spender, bei dem die selten vorkommende Mutation CCR5 $\Delta$ 32 homozygot vorlag. Die transplantierten Blutzellen bauen nach Transplantation ein neues Blut- und Immunsystem auf, das Dank der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation resistent gegen HIV war [14]. Mehr als neun Jahre nach Transplantation ist der Patient immer noch virusfrei und er wurde als der erste von HIV geheilte Patient eingestuft (Abbildung 7.3).

In der weltweit ersten Gen-Editierungsstudie führte die Firma Sangamo BioSciences ähnliche Mutationen mit der Hilfe von ZFN in CD4-positive T-Zellen von HIV-Patienten ein. Obwohl sich erwartungsgemäß kein Langzeiterfolg einstellte, da in der Studie nur kurzlebige T-Zellen genetisch verändert wurden, erwies sich die Behandlung als vielversprechend und sicher [15]. Zurzeit läuft eine weitere Studie der Firma an, in der das CCR5-Gen in Blutstammzellen verändert wird, womit eine lebenslang anhaltende HIV-Resistenz erzielt werden könnte (Abbildung 7.3). Weitere Ansätze zur Behandlung der  $\beta$ -Thalassämie, der Sichelzellerkrankheit und auch von Immundefekten nähern sich der klinische Applikation.

Ein grundsätzlicher Aspekt, den es in all diesen Studien zu berücksichtigen gilt, ist die Sicherheit. Die eingesetzten Gen-Scheren müssen hochpräzise sein, um den gewünschten Therapieerfolg ohne Nebeneffekte zu erzielen [16]. Sollte die Spezifität der eingesetzten Designer-Nukleasen nicht ausreichend hoch sein, führt dies unweigerlich zur Schädigung des Genoms, was wiederum zu einer Entartung der genetisch veränderten Zellen führen kann. Zurzeit wird viel Aufwand betrieben, um die Präzision dieser Nukleasen zu verbessern. Die erzielten Erfolge stimmen zuversichtlich, sodass es ist nur eine Frage der Zeit ist, bis die nächste Generationen von Designer-Nukleasen ihren Weg in die Klinik finden werden.

## 7.4 Referenzen

1. Naldini, L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351-360 (2015).
2. Kim, Y.G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1156-1160 (1996).
3. Pavletich, N.P. & Pabo, C.O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809-817 (1991).
4. Smith, J. et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res* 28, 3361-3369 (2000).
5. Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512 (2009).
6. Moscou, M.J. & Bogdanove, A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501 (2009).

7. Mussolino, C. et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Res* 42, 6762-6773 (2014).
8. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012).
9. Tsai, S.Q. & Joung, J.K. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet* 17, 300-312 (2016).
10. Carroll, D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem* 83, 409-439 (2014).
11. Genovese, P. et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* 510, 235-240 (2014).
12. Cornu, T.I., Mussolino, C., Bloom, K. & Cathomen, T. Editing CCR5: a novel approach to HIV gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 848, 117-130 (2015).
13. Liu, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86, 367-377 (1996).
14. Hutter, G. et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360, 692-698 (2009).
15. Tebas, P. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med* 370, 901-910 (2014).
16. Corrigan-Curay, J. et al. Genome editing technologies: defining a path to clinic. *Mol Ther* 23, 796-806 (2015).

## **8 Neue Züchtungstechniken bei Pflanzen**

Dr. Monika Frey

Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Technische Universität München

### **8.1 Einleitung**

Wesentliche Ziele in der Pflanzenzüchtung sind hohe und sichere Ernteerträge und beste Lebensmittelgüte. Klassisch werden diese Merkmale durch Bonitierung in Züchtungsgärten erkannt und entsprechende Pflanzen zur Sortenbildung selektiert. Die mechanistische Grundlage für die erzielte Verbesserung des Saatguts ist dabei zweitrangig. In der Grundlagenforschung liegt der Fokus auf der Erkennung und Charakterisierung wesentlicher Komponenten, die ein Merkmal, einen Phänotyp, beeinflussen. Zugrunde liegen kann u. a. ein Enzym das die Bildung eines bestimmten Inhaltsstoffs katalysiert oder ein regulatorisches Element, das das Expressionsmuster von Genenentwicklungsspezifisch oder abhängig von endogenen oder exogenen Signalen bestimmt. Enzyme und regulatorische Sequenzen kommen innerhalb einer Population in unterschiedlichen Formen vor (Allel-Unterschiede), individuelle Ausprägungen können den Phänotyp positiv oder negativ beeinflussen. Grundlage der Diversität sind Unterschiede der DNA-Sequenz. Diese können leicht durch „High Throughput“-Techniken (Single Nucleotide Polymorphism-Chips, PCR) verfolgt werden. Liegt die Verbindung zwischen Genfunktion(en) und einem züchterischen Merkmal vor, kann/können positive Allele über die Sequenzpolymorphismen gezielt im Züchtungsverlauf erhalten werden. Diese Verfahren wird als „Smart Breeding“ bezeichnet. Züchterisch wertvolle Eigenschaften liegen unter Umständen in einer Pflanzenspecies nicht vor, z. B. die effektive Beta-Carotin-Biosynthese in Reis. Sie können, wenn die molekulare Grundlage bekannt ist, durch Transfer der Gene aus anderen Organismen eingeführt werden (Golden Rice, Beyer et al., 2002).

Ein wesentlicher Faktor für hohe Erträge ist die Pflanzengesundheit. Da insbesondere Pilzbefall eine Kontamination mit Toxinen zur Folge hat, hat die Resistenz gegen mikrobielle Pathogene, unmittelbar auch Einfluss auf die Güte der pflanzlichen Le-

bensmittel. Insektenbefall führt sekundär zu Pilzbefall und beeinflusst ebenfalls die Qualität. Pflanzen schützen sich auf verschiedenen Ebenen gegen Schädlingsbefall. Eine Strategie bildet die chemische Abwehr: Pflanzen synthetisieren toxische Substanzen gegen Pflanzenfresser und mikrobielle Pathogene. Diese Abwehrmetaboliten werden den Sekundären Pflanzenstoffen (Abbildung 8.1) zugerechnet. Am Lehrstuhl für Genetik der Technischen Universität München haben wir die Biosynthese des Abwehrmetaboliten DIMBOA (Abbildung 8.2) in Mais untersucht (Frey et al., 1997).

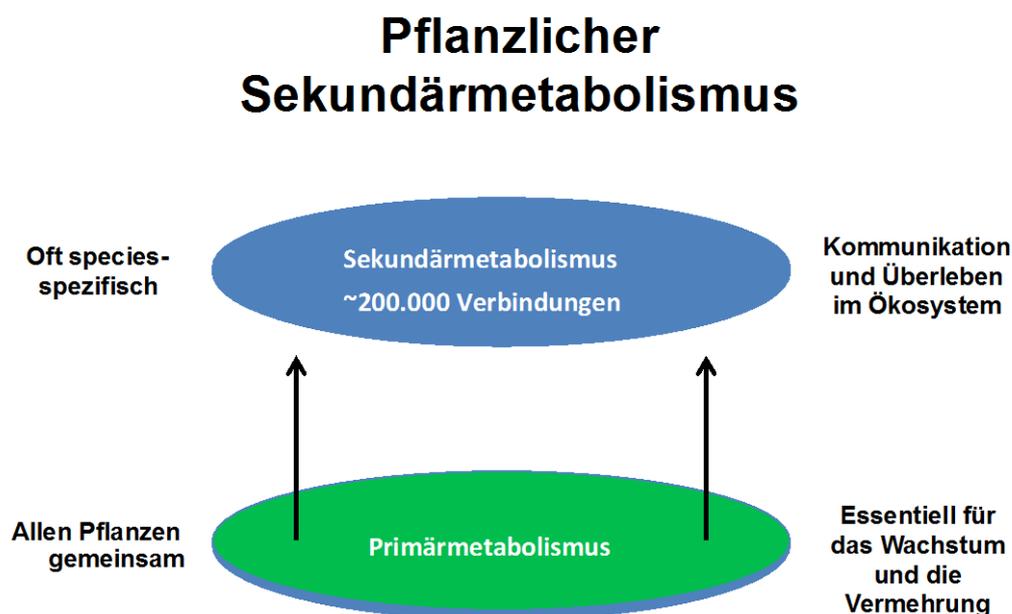


Abbildung 8.1: Pflanzen synthetisieren eine Vielzahl von spezifischen Metaboliten, die wichtig für die Kommunikation im Ökosystem sind. Viele dieser Sekundärmetaboliten haben eine Funktion in der pflanzlichen Abwehr. Die heterogene Verteilung verhindert das Auftreten von generalistischen Schädlingen. Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten basiert auf Substanzen des Primärmetabolismus die das Substrat für spezialisierte Enzyme bilden.

## 8.2 Benzoxazinoide, abwehrrelevante Sekundärmetabolite der Gräser.

Charakteristischerweise synthetisieren Pflanzen eine Vielzahl unterschiedlicher Metaboliten (Abbildung 8.1). Im Gegensatz zu den Primärmetaboliten kommen Sekundärmetaboliten nicht in allen Pflanzen vor sondern sind auf Pflanzenfamilien oder sogar einzelne Species beschränkt. Während eine Mutation in Genen des Primärmetabolismus letal ist, haben Ausfälle im Sekundärmetabolismus zwar Auswirkungen auf die Kommunikation im Ökosystem, führen aber nicht zum Absterben der Pflanze. Für viele pflanzliche Sekundärmetaboliten ist die Funktion als Abwehrchemikalie nachgewiesen. Ein bekanntes Beispiel ist Nikotin. Charakteristische Sekundärmetaboliten-Klasse in der Familie der Gräser sind die Benzoxazinoide (Abbildung 8.2).



Abbildung 8.2: Struktur der vorherrschenden Benzoxazinoide in Keimlingen von Getreiden. In Roggensprossen und in Wildgersten findet man hauptsächlich DIBOA, in Weizen- und Maiskeimlingen DIMBOA. Die Reaktivität des Moleküls beruht auf der N-OH-Gruppe. Glucosylierung zu GDI(M)BOA stabilisiert das Molekül und verringert die Toxizität.

Benzoxazinoide reagieren mit vielen zellulären Komponenten. Um Autotoxizität zu vermeiden werden sie durch Glucosylierung stabilisiert und in der Vakuole gelagert. Wird die Integrität der Zelle zerstört kommt das Glucosid in Kontakt mit der spezifischen Glucosidase, die in Kompartiment Plastiden lokalisiert ist. Dadurch wird das reaktive Aglucon erzeugt. Benzoxazinoide kommen in den Getreiden Weizen, Mais und Roggen, in einzelnen Wildgerste-Arten und manchen Unkrautgräsern vor, nicht aber in Reis und Hafer. Benzoxazinoide werden in Maiskeimlingen in hoher Konzentration gebildet ohne dass ein Pathogen- oder Schädlingsbefall vorliegt. Dadurch ist die junge Pflanze insbesondere gegen Befall durch den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) geschützt. In älteren Pflanzen ist dieser breite Schutz verloren, da die Kon-

zentration des Benzoxazinoids gering ist. In der Folge wird die zweite Brut des Maiszünlers und weitere nicht mehr effektiv kontrolliert. Diese weiteren Vermehrungszyklen erfolgen in südlichen Breiten, in Europa ist dies besonders in Spanien der Fall. Eine Verlängerung der Zeitspanne mit wirksamer Konzentration von Benzoxazinoiden könnte zur Verringerung der Ernteaufträge führen. Wir konnten zeigen, dass die Expressionsdauer des ersten Gens des Stoffwechselwegs essentiell für eine längeren Erhalt des Schutzmechanismus ist (s. u., Zheng et al., 2015).

### **8.3 Biosynthese von Benzoxazinoiden**

Die Biosynthese des im Maiskeimling vorwiegenden Benzoxazinoids GDIMBOA (Abbildung 8.2) wurde in Mais aufgeklärt (Abbildung 8.3, Frey et al., 1997, v. Rad et al., 2001). Für die Biosynthese sind acht Gene (*Bx*-Gene) erforderlich. Diese liegen im Genom benachbart, so dass man von einem Biosynthesegen-Cluster spricht. Das *Bx*-Gen-Cluster war das erste Beispiel einer derartigen Organisation in Pflanzen, inzwischen wurden für mehrere Sekundärmetabolit-Biosynthesen in verschiedenen Pflanzen Clusterbildung gefunden. Es wird spekuliert, dass die Lokalisation der Gene an einem Ort die koordinierte Expression begünstigen könnte. Alle Gene des *Bx*-Gen-Clusters sind in jungen Pflanzen bis etwa 10 Tage nach Keimung hoch aktiv. Danach fällt die Transkriptmenge parallel mit der GDIMBOA-Konzentration im Allgemeinen schnell ab.

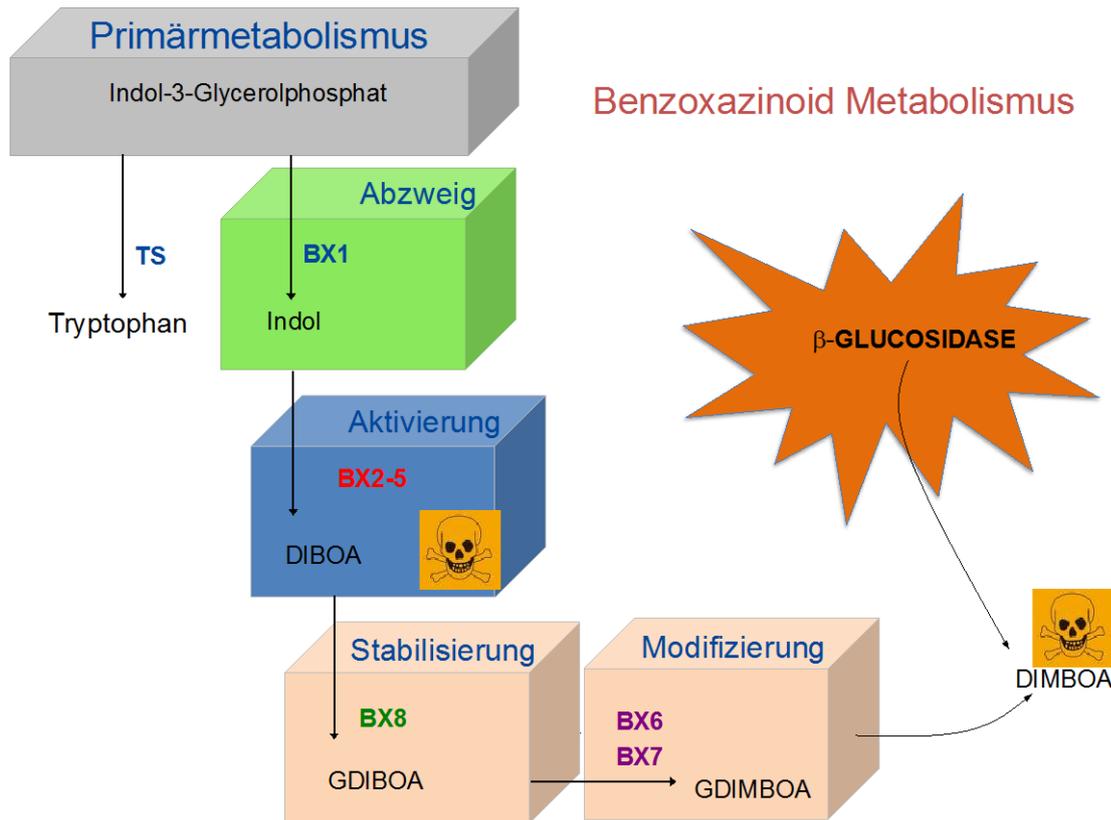


Abbildung 8.3: Benzoxazinoid-Biosynthese in Mais. Ausgangssubstrat der Biosynthese ist Indol-3-Glycerolphosphat (IGP). Im Primärstoffwechsel wird IGP zur Biosynthese von Tryptophan benötigt (TS Tryptophansynthase). Das Verzweigungsenzym BX1 katalysiert die Bildung von Indol. Indol wird von den vier P450-Enzymen BX2-BX5 durch Hydroxylierung in das reaktive DIBOA überführt. Die Glucosyltransferase BX8 stabilisiert das Molekül. In Mais und Weizen erfolgen weitere Modifikationen durch die Oxygenase BX6 und die Methyltransferase BX7. Das entstandene GDIMBOA wird in der Vakuole gelagert. Wenn die Integrität der Zelle zerstört ist, erzeugt die in den Plastiden gelagerte  $\beta$ -Glucosidase das reaktive DIMBOA.

## 8.4 Diversität in der Maispopulation

Innerhalb der Species *Zea mays* findet man eine ungeheure Diversität an Genotypen und resultierenden Phänotypen. Aus dem Pool unterschiedlicher Maislinien wurden 28 Linien („NAM Panel“, Abbildung 8.4) ausgewählt, die rund 85% der Unterschiede in der Gesamtpopulation umfassen (McMullen et al., 2009). Mit großer Wahrscheinlichkeit findet man für jede untersuchte Eigenschaft in dieser Auswahl extreme Ausprägungen. Das Merkmal „Verlängerte hohe Konzentration von GDIMBOA“ wurde in der Linie Mo17 gefunden, dagegen ist die Konzentration in der Linie B73 niedrig (Zheng et al., 2015).

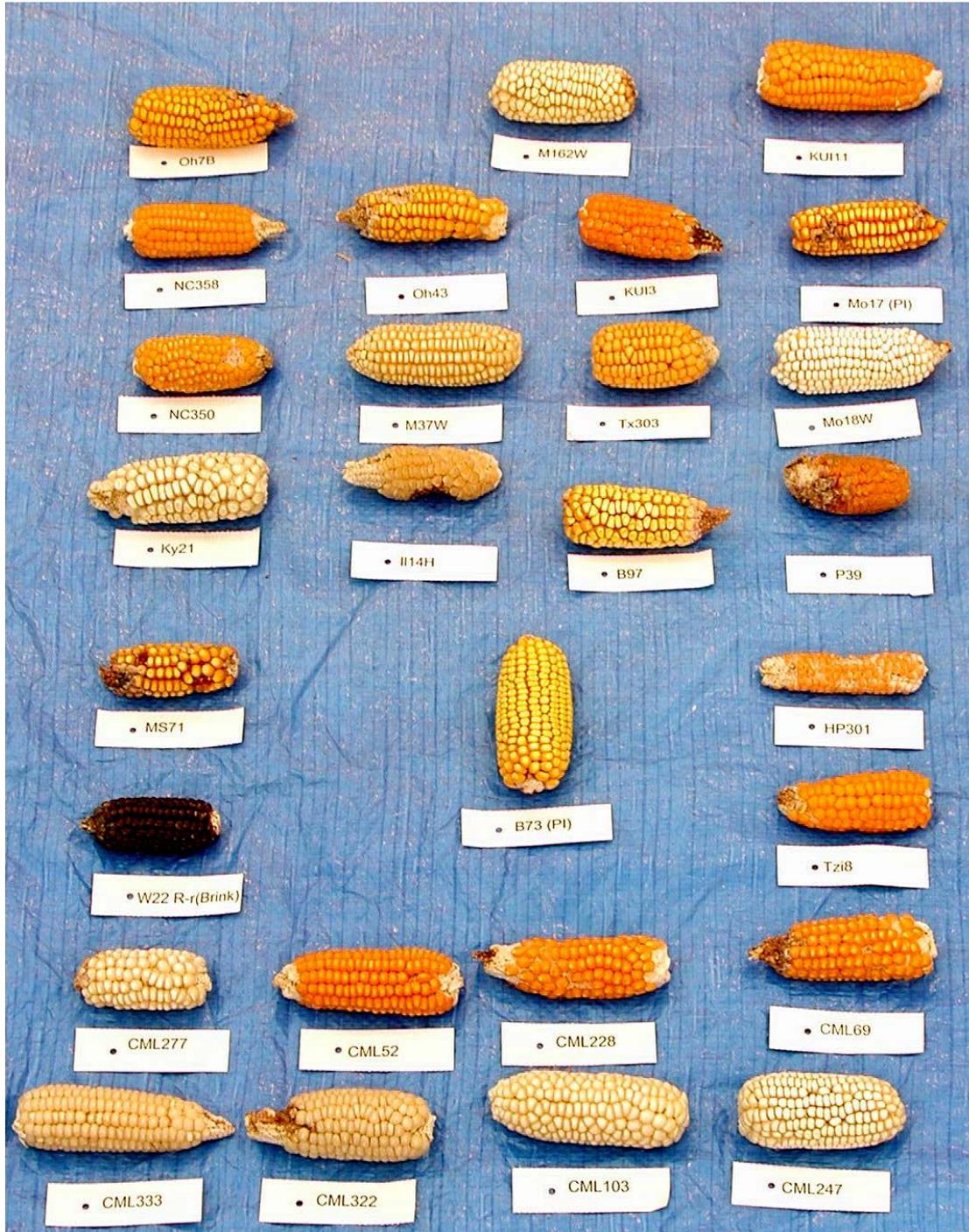


Abbildung 8.4: Diversität in der Maispopulation, Auswahl von 28 Inzuchtlinien („NAM Panel“). Unterschiede bei Kolben und Körnern. (Fotografie Prof. M. D. McMullen).

Über genetische Analyse (Quantitative Trait Loci (QTL)-Kartierung) konnten wir eine regulatorische Sequenz erkennen, die für eine verlängerte Ausprägung des Verzweigungsgens *Bx1* in der Linie Mo17 sorgt. Diese wiederum korreliert mit der hohen späten GDIMBOA-Konzentration in Mo17. Den Beweis, dass die verlängerte Expres-

sion von *Bx1* in der Tat zu erhöhten Benzoxazinoid-Werten in älteren Pflanzen führt, konnten wir durch transgene Expression von *Bx1* zeigen. Dagegen hat die Transkriptionsstärker der anderen *Bx*-Gene keinen offensichtlichen Einfluss auf das Merkmal. Weitere genetische Untersuchungen mit sogenannten Near Isogenic Lines (NILs) zeigten, dass neben der Biosynthese weitere bisher nicht bekannte Mechanismen die späte Benzoxazinoid-Konzentration in Mais beeinflussen. Möglicherweise gibt es Unterschiede in die Lagerungskapazität in der Vakuole oder in der Stabilität der Benzoxazinoide in der älteren Pflanze. Für den Züchter kann aus den Untersuchungsergebnissen der Schluss gezogen werden, dass im Züchtungsprozess hohe späte Expression von *Bx1* fixiert werden sollte und auf dieser Basis die Benzoxazinoid-Konzentration noch erhöht werden kann.

## 8.5 Ausblick

Unsere Ergebnisse aus der Grundlagenforschung haben einen Ansatzpunkt zur Verbesserung des maiseigenen Schutzmechanismus auf Basis des vorhandenen Genpools ergeben. Da wir alle Gene der Biosynthese isoliert und charakterisiert haben, kann der gesamte Biosyntheseweg auch auf Pflanzen übertragen werden, die andere endogene abwehrrelevante Sekundärmetaboliten besitzen (Abbildung 8.5). In wieweit dieses Stapeln von pflanzlichen Abwehrchemikalien von Pflanzen erfolgreich ohne Beeinträchtigung von Wachstum und Entwicklung bewältigt werden kann und ob sich die Resistenz der Pflanze durch den Biosynthesetransfer erhöht, untersuchen wir derzeit in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

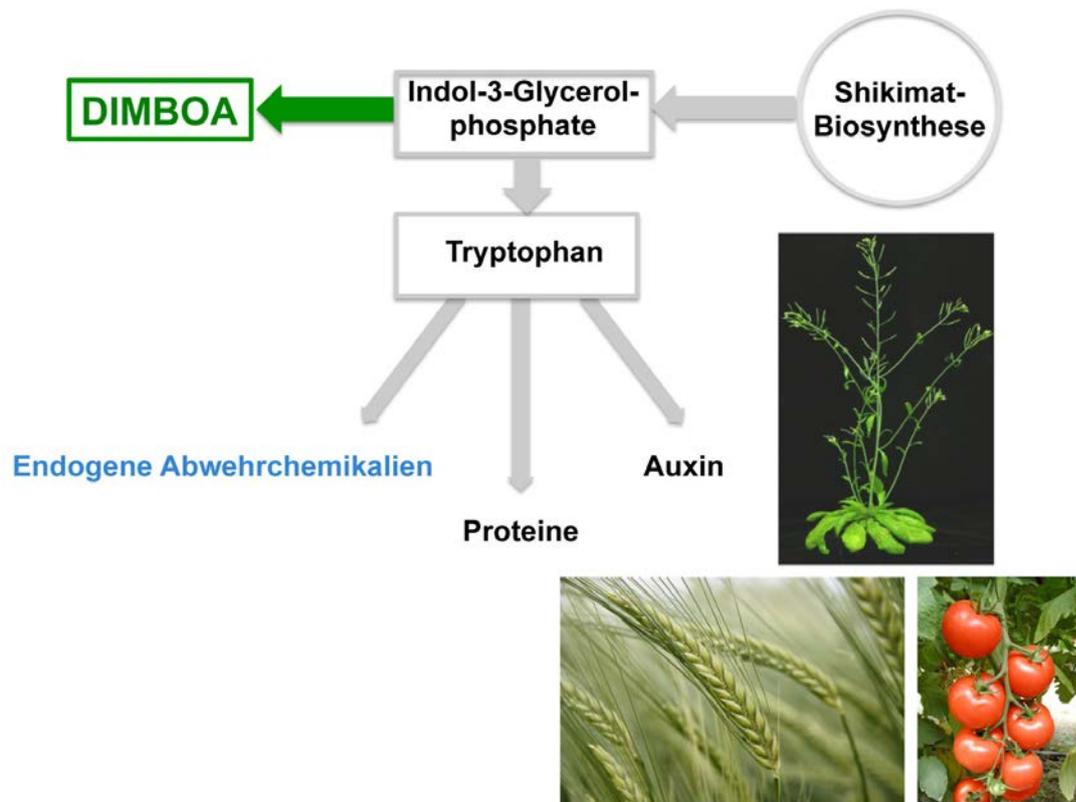


Abbildung 8.5: Transgene Expression der Benzoxazinoid-Biosynthese. Der Abzweig der Benzoxazinoid-Biosynthese erfolgt durch Metabolisierung des in allen Pflanzen vorhandenen Indol-3-Glycerolphosphats. Da alle Gene der DIMBOA-Biosynthese kloniert sind, besteht die Möglichkeit diese pflanzeigene Abwehrchemikalie in anderen Pflanzen zu etablieren. Interaktionen im metabolischen Netzwerk können auftreten. Sie können exemplarisch in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* (oben) untersucht werden.

Die Arbeiten wurden am Lehrstuhl für Genetik unter Leitung von Herrn Prof. Gierl ausgeführt von Dr. Linlin Zheng, Dr. Stefan Lenk unterstützt durch Frau Regina Hüttl und Herrn Peter Dobos. Die Arbeiten wurden finanziert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft über den SFB924.

## 8.6 Literatur

Beyer P, et al. 2002. Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J Nutr.* 132:506S-510S.

Frey M, et al. 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, 277:696-699.

McMullen MD, et al. 2009. Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science* 325:737-40

v. Rad U, et al. 2001. Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J.* 28:633-42

Zheng L, et al. 2015. Prolonged expression of the BX1 signature enzyme is associated with a recombination hotspot in the benzoxazinoid gene cluster in *Zea mays*. *J Exp Bot.* 66:3917-30

## 9 Gentransfer durch virale Vektoren

PD Dr. Armin Baiker<sup>2</sup>, Dr. Thorsten Stellberger<sup>2</sup>, Nina Köhler<sup>2</sup>, Prof. Dr. Anja Ehrhardt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Virologie und Mikrobiologie, Department für Humanmedizin, Fakultät für Gesundheit, Universität Witten/Herdecke

<sup>2</sup>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim

### 9.1 Einleitung

Unter einem Virus versteht man ein submikroskopisches infektiöses Partikel, welches sich durch eine definierte Struktur auszeichnet. Viruspartikel, die außerhalb der Zelle auch als Virionen bezeichnet werden, setzen sich aus einer Nukleinsäure und eine die Nukleinsäure umgebene Proteinschicht (Kapsid) zusammen. Einige Viren sind zusätzlich von einer Virushülle, einer sogenannten Lipidmembran umgeben. Die Nukleinsäure kann als ringförmige, lineare oder segmentierte DNA oder RNA vorliegen, die ebenfalls einzelsträngige oder doppelsträngige Formen mit positiver oder negativer Polarität annehmen können. Das Kapsid kann in verschiedenen Symmetrieformen vorkommen, wobei eine ikosaedrische, helikale, oder komplexe Symmetrie unterschieden werden kann. Die offizielle Einteilung von Viren in Ordnungen (Endung: *-virales*), Familien (Endung: *-viridae*), Unterfamilien (Endung: *-virinae*) und Gattungen (Endung: *-virus*) wird durch das „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ vorgenommen. Hierbei werden die Viren nach Ihren Eigenschaften bezüglich Genomstruktur, Symmetrie des Kapsids, das Vorhandensein einer Hüllmembran, molekularer Zusammensetzung des Virusgenoms, Replikationsstrategie und Virusgröße unterschieden.

Viren sind obligat intrazelluläre Einheiten, die sich nur in lebenden Zellen vermehren können. Der Replikationszyklus von Viren, der mit der Adsorption an die Zielzelle über spezifische Rezeptoren beginnt, kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Nach der Adsorption findet die Penetration statt, die sich bei verschiedenen Vi-

ren unterscheidet (z.B. Transmembrantransport oder rezeptorvermittelte Endozytose). Als nächstes folgt die Freisetzung der Nukleinsäure in der Zelle (*Uncoating*), die dann in einem weiteren Schritt vermehrt wird (Replikation). Zur Replikation und Proteinsynthese nutzt das Virus die Synthesemaschinerien der Wirtszelle. Der produktive Replikationszyklus wird durch den Zusammenbau (*Assembly*) neuer Viruspartikel und deren Freisetzung durch Wirtszelllyse oder Exozytose beendet.

Mit der Einführung der Möglichkeit gentechnische Veränderungen an einem DNA Fragment vorzunehmen (Jackson et al., 1972), dauerte es nicht mehr lange bis zur Herstellung des ersten rekombinanten Virus im Jahre 1976 (Goff & Berg, 1976). Es handelte sich hierbei um ein gentechnisch verändertes Simian Virus 40 (SV40), in welches ein DNA-Fragment des  $\lambda$  Phagen eingebaut wurde. Die Möglichkeit zur Herstellung gentechnisch veränderter Viren war aus verschiedenen Gründen bahnbrechend. Zunächst wurden verschiedenste rekombinante Viren in der Grundlagenforschung eingesetzt. Später wurden diese als Werkzeug für den effizienten Gentransfer (= Vektor) eingesetzt. Im Allgemeinen definiert man diese Vektoren als biologische Träger, die Nukleinsäure-Segmente in eine neue Zelle einschleusen können. Als viralen Vektor bezeichnet man ein gentechnisch verändertes Virus, das fremde Nukleinsäure-Fragmente (zum Beispiel ein therapeutisches Transgen) in eine neue eukaryotische Zelle einführen kann (Abbildung 9.1).

## 9.2 Virale Vektoren

In der Grundlagenforschung können Viren auf Genomebene gentechnisch manipuliert und somit Virusmutanten hergestellt werden. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderung auf die Eigenschaften des Virus können dann untersucht werden. Es handelt sich somit im Gegensatz zu der klassischen Genetik, bei der von dem Phänotypen auf den Genotypen geschlossen wird, um das Prinzip der „reversen Genetik“, in der vom Genotypen ausgehend der Phänotyp untersucht wird.

Das Prinzip der „reversen Genetik“ ist Grundlage für die Entwicklung viraler Vektoren. Theoretisch kann jedes Virus gentechnisch zu einem viralen Vektor umfunktionsiert werden und somit als biologischer Träger zum Einschleusen von Nukleinsäure-Segmente in eine Zielzelle genutzt werden. Virale Vektoren werden in der Grundlagenforschung, der translationalen Forschung und in der Klinik in therapeutischen An-

sätzen eingesetzt. In der Grundlagenforschung werden virale Vektoren dazu genutzt, Transgene und deren Proteinprodukte in fremde Zellen einzuschleusen, um die Auswirkungen dieses Transgen-Produktes auf die Zelle zu beobachten. In der translationalen Forschung und in der Klinik werden virale Vektoren für therapeutische und präventive Ansätze eingesetzt. Hierbei spielen die Gentherapie, Vakzinierungsansätze und das Entwickeln von onkolytischen Viren in der Tumorthherapie eine übergeordnete Rolle. Verschieden Viren sind in der Vergangenheit zu viralen Vektoren umfunktioniert worden und im Folgenden wird auf die drei wichtigsten Vertreter, die in der Gentherapie inklusive klinische Studien eingesetzt werden, eingegangen. Hierbei handelt es sich um virale Vektoren, die auf Retroviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Adenoviren basieren.

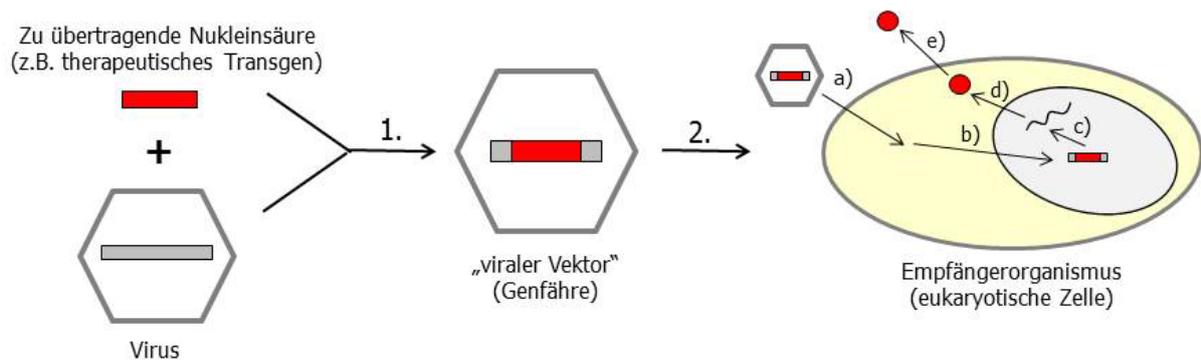


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung der Definition eines viralen Vektors. Ein viralen Vektor (= Genfähre) führt fremde Nukleinsäure-Segmente in eine eukaryotische Zelle (= Empfängerorganismus) ein. Beispielfhaft ist ein DNA-Virus dargestellt. Die zu übertragende Nukleinsäure (z.B. ein therapeutisches Transgen) wird über gentechnische Methoden in das Virusgenom eingebaut. Anschließend wird der virale Vektor produziert (1.) und eine eukaryotische Zelle mit dem Vektor transduziert (2.). Nach der Adsorption an die Zielzelle (a), der Penetration und Freisetzung der Nukleinsäure erfolgt das Einschleusen der rekombinanten DNA in den Nucleolus (b). Es folgt die Transkription des Transgens (c) und die Proteinsynthese (d) des therapeutischen Proteins, welches dann zum Beispiel als sekretorisches Protein gemessen werden kann.

### 9.2.1 Retrovirale Vektoren

Retroviren bilden die Basis für den retroviralen Gentransfer. Die Familia der *Retroviridae* wird in drei Unterfamilien, nämlich *Onkovirinae*, *Lentivirinae* und *Spumavirinae* eingeteilt. Zum Gentransfer werden am häufigsten das Maus-Leukämie-Virus (MLV) (Donoghue et al., 1984) aus der Gruppe der *Onkovirinae* und das Lentivirus (Naldini et al., 1996) aus der Gruppe der *Lentivirinae* eingesetzt.

Das Viruspartikel von Retroviren besteht unter anderem aus zwei identischen einzelsträngigen RNA Molekülen, dem Integrase Protein, dem reverse Transkriptase (RT) Protein und eine Protease. Retroviren sind von einer Hüllmembran mit Glykoproteinen umgeben, die sich von der Zytoplasmamembran der Zelle ableitet. Das RNA-Genom ist abhängig von dem Virustypen sieben bis 12 Kilobasen groß, wodurch eine Verpackungskapazität von fremder DNA von sieben bis zehn Kilobasen gegeben ist. Der Replikationszyklus von Retroviren beginnt mit dem Einschleusen des Virus in die Zielzelle und der obligatorischen RT-Reaktion, in der das RNA-Genom in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Anschließend wird das Genom als Provirus in das Wirtszellgenom integriert und neue Viruspartikel gebildet, die anschließend aus der Zelle ausgeschleust werden.

Im Gegensatz zum natürlichen Replikationszyklus von Retroviren infizieren retrovirale Vektoren die Zielzelle, bilden aber keine Nachkommen, sondern lediglich das Transgenprodukt. Zur Produktion von retroviralen Vektoren (Abbildung 9.2A) werden am häufigsten SV40 T-Antigen exprimierende humane embryonale Nierenzellen (HEK293T-Zellen) eingesetzt. Es werden drei Plasmide, nämlich das Hüllprotein exprimierende Plasmid, das Verpackungsplasmid und das Transgen-tragende Plasmid, flankiert von *long terminal repeats* (LTRs), triple-transfiziert (Salmon & Trono, 2006; Schambach et al., 2009).

Veränderte Oberflächenproteine können über ein Hüllprotein, welches von einem Plasmid kodiert wird und sich in der Zellmembran befindet, in die Virushülle eingebaut werden. Dadurch kann der Zielzelltropismus erweitert werden, was auch als Pseudotypisierung bezeichnet wird. Die zusammengebauten Viruspartikel befinden sich nach dem Ausschleusen aus der Zelle im Zellüberstand und können dann entweder direkt oder über einen Aufkonzentrationsschritt mittels Ultrazentrifugation zur Infektion der gewünschten Zielzelle benutzt werden (Abbildung 9.2A). Nach Integration des Provirus, welches das Transgen enthält, kann das Transgen-Produkt in der Zielzelle gebildet werden. Im Jahre 2004 wurden erstmals Integrase-defiziente Retroviren (*integrase-deficient lentiviral vectors* = IDLVs) (Vargas et al., 2004) konstruiert, die als zirkuläre und nicht-integrierte Genome vorkommen. Somit kann nach der Transduktion eine transiente Transgenexpression erreicht werden. Aufgrund der Tat-

sache, dass diese Vektoren Integrations-defizient sind, kann man davon ausgehen, dass das Risiko der Genotoxizität entscheidend verringert wird.

### **9.2.2 Adeno-assoziierte Viren für den viralen Gentransfer (AAV Vektoren)**

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zu der Familie der *Parvoviridae* und der Unterfamilie der *Parvovirinae*. AAV kann die humane Population infizieren, allerdings konnte bisher keine AAV-Infektion assoziierte Pathogenität nachgewiesen werden. Das Viruskapsid hat einen Durchmesser von 18 bis 26 nm und ist ikosaedrisch aufgebaut. Es umschließt ein einzelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von 4,8 bis 5,6 Kilobasen, welches an beiden Enden von einer *inverted terminal repeat* (ITR)-Sequenz flankiert wird. Das Virusgenom von AAV ist relativ einfach aufgebaut, da es nur *rep* und *cap* Gene für die Replikation und die AAV-spezifischen Kapsidproteine kodiert. Als besondere Eigenschaft von AAV ist zu erwähnen, dass dieses Virus für seine Replikation ein Helfervirus (z.B. Adenovirus oder Herpes-simplex-Virus Typ1) benötigt. Zur Replikation infiziert AAV eine Zelle und in der Gegenwart eines Helfervirus kann das Einzelstrang-Genom repliziert, virale RNA transkribiert, entsprechende Proteine translatiert und die neuen Kapside inklusive Virusgenom im Nukleus zusammengebaut werden. Die fertigen Viruspartikel werden aus der infizierten Zelle freigelassen und können anschließend neue Zellen infizieren.

AAV Vektoren besitzen eine Verpackungskapazität von etwa 4,7 Kilobasen, wodurch nur relativ kleine Transgene transferiert werden können. Zur Produktion von AAV Vektoren (Ayuso et al., 2010) benutzt man HEK293 Zellen als Produktionszelllinie. Hierbei werden drei Plasmide, nämlich das von ITRs flankierte Transgen-enthaltene Plasmid, ein Helferplasmid mit den adenoviralen Helferfunktionen und das Verpackungsplasmid, welches die *rep* und *cap* Gene exprimiert, in die Produktionszelllinie ko-transfiziert (Abbildung 9.2B).

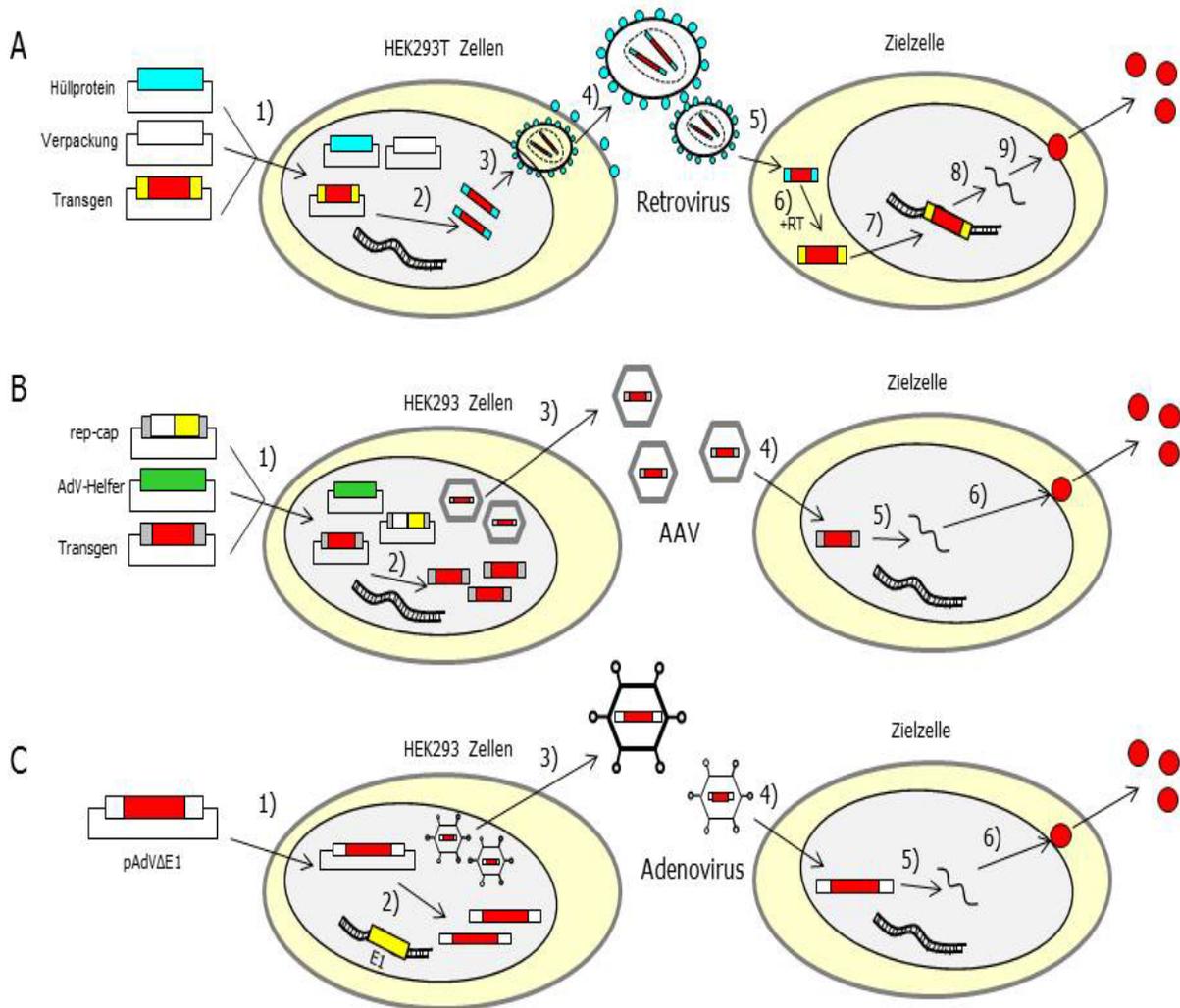


Abbildung 9.2: Produktion von den am häufigsten genutzten viralen Vektoren in der Gentherapie und Transduktion von Zielzellen. Links ist jeweils die Produktion des Vektors und rechts beispielhaft die Infektion einer Zielzelle gezeigt. (A) Zur Produktion von retroviralen Vektoren werden zwei Plasmide, die für das Hüllprotein (blau) und die Verpackungsproteine (weiß) kodieren und ein Plasmid welches das Transgen (rot) flankiert von long terminal repeats (LTRs, gelb) in HEK293T Zellen ko-transfiziert (1). Das zu verpackende Virusgenom wird transkribiert (2), verpackt (3) und der Vektor aus der Zelle ausgeschleust. Der Infektion der Zielzelle (5) folgt die reverse Transkriptase (RT) Reaktion von RNA in DNA (6), welche dann als Provirus inklusive Transgen in das Wirtsgenom integriert (7). Anschließend werden die Transgen-RNA (8) und schließlich das Transgenprodukt als Protein gebildet (9). (B) Zur Produktion von Vektoren basierend auf dem Adeno-assoziierten Virus (AAV) werden ein Plasmid mit den rep und cap Genen (weiß und gelb), ein Plasmid mit den Adenovirus-Helferfunktionen (grün) und ein Plasmid mit den AAV inverted terminal repeats (ITRs, grau) und dem Transgen (rot) in HEK293 Zellen triple-transfiziert (1). Nach der Amplifikation des AAV-Genoms (2), werden die Genome im Nukleus verpackt und aus der Zelle ausgeschleust (3). Nach der Infektion der Zielzelle (4) wird das Transgen transkribiert und das Proteinprodukt zum Beispiel aus der Zelle sekretiert. (C) Zur Produktion von adenoviralen Vektoren wird ein adenovirales Genom, welchem das frühe virale Gen E1 fehlt, in die Produktionszelllinie (HEK293 Zellen) transfiziert (1). Da HEK293 Zellen stabil mit dem frühen adenoviralen Gen E1 transfiziert sind und somit E1 substituieren können, kann das Genom des adenoviralen Vektors repliziert (2), verpackt (3) und ausgeschleust werden (3). Nach Infektion einer Zielzelle (4) wird das Transgen transkribiert und das Transgenprodukt gebildet.

Nachdem das rekombinante Virusgenom amplifiziert wurde und vollständige Viruspartikel zusammengebaut worden sind, können diese aufgereinigt werden. Zur Aufreinigung von AAV Vektoren kann man entweder kommerzielle Säulen verwenden oder, wenn eine größere Menge benötigt wird, aufwendigere Ultrazentrifugationsschritte und chromatographische Verfahren durchführen. Der Vektor kann dann benutzt werden, um das gewünschte Transgen in den entsprechenden Zielzellen einzubringen (Abbildung 9.2B). Es gibt zurzeit neun zur Verfügung stehende AAV-Typen, die einen diversen Zelltropismus aufweisen (Gao et al., 2002). Es sei ebenfalls an dieser Stelle erwähnt, dass nicht nur Einzelstrang-AAV Vektoren erstellt werden können, sondern auch Doppelstrang-AAV Vektoren. Diese haben den Vorteil, dass während der Infektion die Bildung von Doppelstrang-DNA aus Einzelstrang-DNA umgangen werden kann. Allerdings besitzen diese Vektoren im Vergleich zu konventionell genutzten AAV Vektoren nur die halbe Verpackungskapazität für fremde DNA.

### 9.2.3 Adenovirale Vektoren

Mitglieder der Familie *Adenoviridae* bilden die Basis für die Entwicklung von adenoviralen Vektoren. Es wurden bis heute 70 humane und >200 nicht-humane Adenovirustypen identifiziert. Adenoviren zeichnen sich durch ihren breiten Zelltropismus aus. Abhängig vom Adenovirustyp können diese Viren verschiedene selbstlimitierende Erkrankungen mit einem Schwerpunkt auf respiratorische Erkrankungen hervorrufen. Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einem ikosaedrischen Kapsid, in dem sich die doppelsträngige und lineare DNA mit einer Größe von 36 bis 38 Kilobasen (bei humanpathogenen Vertretern) befindet. Das Genom, welches frühe (E1 bis E4) und späte Gene (L1 bis L5) kodiert, wird an beiden Enden von *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert. Nach der Infektion einer Zelle wird das Genom in den Zellkern transportiert, wo die Amplifikation der viralen DNA stattfindet. Nach der Transkription und Translation aller viralen Proteine, werden die viralen Nachkommen im Nukleus zusammengebaut und anschließend aus der Zelle freigesetzt. Eine infizierte Zelle kann bis zu 10.000 Partikel bilden und in die Umgebung freisetzen.

Im Allgemeinen kann man adenovirale Vektoren in replikations-kompetente und replikations-defiziente Vektoren einteilen. Replikations-kompetente Viren werden in der

Virotherapie zur Behandlung von Tumoren eingesetzt und replikations-defiziente Viren für den effizienten Gentransfer. Replikations-defiziente adenovirale Vektoren kann man in verschiedene Generationen von Vektoren einteilen. Adenovirale Vektoren der ersten Generation, die am häufigsten für den Gentransfer eingesetzt werden, fehlt lediglich das frühe Gen E1 und häufig auch das frühe virale Gen E3. In der zweiten Generation adenoviraler Vektoren wurde ein zusätzliches frühes Gen deletiert und der neuesten Generation adenoviraler Vektoren (*high-capacity adenoviral vectors*) (Parks et al., 1996a) fehlen alle viralen Kodierungssequenzen. Hierdurch können adenovirale Vektoren eine Verpackungskapazität von bis zu 36 Kilobasen erlangen. Zur Produktion dieser Vektoren werden HEK293 Zellen eingesetzt und wie in Abbildung 9.2C am Beispiel eines adenoviralen Vektors der ersten Generation schematisch dargestellt, wird hierzu das adenovirale Vektorplasmid mit dem Transgen in die Produktionszelllinie transfiziert. Da HEK293 Zellen stabil mit dem linken Arm eines humanen Adenovirus des Typ 5 transfiziert worden sind, können diese das essentielle adenovirale E1 Gen im Vektorgenom substituieren. Das Vektorgenom wird amplifiziert, gentechnisch veränderte Vektorgenome verpackt und die Viruspartikel werden schließlich aus der Zelle freigesetzt. Wie bei Retroviren, kann entweder der Zellkulturüberstand direkt für die Infektion einer neuen Zelle eingesetzt werden (Abbildung 9.2C) oder die Viruspartikel aufgereinigt werden. Dieses kann entweder mittels kommerziellen Säulen oder über komplexe Ultrazentrifugationsschritte geschehen.

### **9.3 Eigenschaften von den am häufigsten eingesetzten viralen Vektoren und Sicherheitseinstufung**

#### **9.3.1 Eigenschaften von den am häufigsten eingesetzten viralen Vektoren**

Jeder viraler Vektor, der im Gentransfer eingesetzt wird, birgt Vor- und Nachteile bezüglich verschiedener Aspekte. Im Folgenden werden die am häufigsten verwendeten viralen Vektoren (Retroviren, AAV und Adenoviren) mit besonderem Fokus auf deren herausragende positive Eigenschaften und potentielle Nebenwirkungen in therapeutischen Applikationen diskutiert. Hierbei spielen der molekulare Aufbau des Vektors, die Fähigkeit zur somatischen Integration, die Reinheit finaler Vektorpräpa-

rationen und die gegen den Vektor gerichteten Immunantworten eine entscheidende Rolle.

Es sei anfänglich zu erwähnen, dass es zum jetzigen Zeitpunkt keinen „*One for All*“ Vektor für alle Anwendungen gibt. Der Vektor muss der entsprechenden Applikation in der Grundlagenforschung oder der translationalen und klinischen Forschung angepasst werden. Die Ansätze in denen Vektoren in der klinischen Forschung eingesetzt werden, sollten den jeweiligen Bedürfnissen der Erkrankung angepasst werden und bei genetischen Variationen des verantwortlichen genetischen Defektes diesen angepasst werden (personalisierte Medizin).

Als ein wichtiger Aspekt bei der molekularen Entwicklung eines Vektors ist die Verpackungskapazität zu berücksichtigen. AAV Vektoren besitzen mit 4,7 Kilobasen die kleinste Verpackungskapazität, retrovirale Vektoren mit 7-10 Kilobasen eine mittlere und adenovirale Vektoren der ersten Generation eine Verpackungskapazität von 8,2 Kilobasen. Die größte Aufnahmekapazität fremder DNA besitzen *high-capacity adenoviral vectors* mit bis zu 37,2 Kilobasen, da diesen Vektoren alle viralen Kodierungssequenzen fehlen. Bei einem Transgen welches >5 Kilobasen ist, kommen somit retrovirale und adenovirale Vektoren der ersten Generation in Frage und bei Transgenen >10 Kilobasen sollten *high-capacity adenoviral vectors* zum Einsatz kommen.

Weiterhin sollte das Risiko der Genotoxizität genauer beleuchtet werden, also das Beeinflussen von Gene im Wirtsgenom und deren Expressionsprofil nach der Infektion der Zielzelle mit einem viralen Vektor. Vektoren mit der Fähigkeit ihr genetisches Kargo in das Wirtsgenom zu integrieren, wie es zum Beispiel für retro- und lentivirale Vektoren im Rahmen ihres natürlichen Replikationszyklus der Fall ist, haben aufgrund dieser Eigenschaft ein höheres Risiko genotoxische Nebeneffekte hervorzurufen. Aufgrund der Erfahrungen aus klinischen Studien in denen genotoxische Nebeneffekte beobachtet worden sind (Hacein-Bey-Abina et al., 2003), sind inzwischen sicherere Vektorvarianten entwickelt worden. Retrovirale Vektoren wurden inzwischen gentechnisch so manipuliert, dass diese integrations-defizient sind oder präferentiell in spezifische Orte im Wirtsgenom („*safe harbors*“) integrieren (Lombardo et al., 2007). AAV Vektoren persistieren hauptsächlich als extrachromosomale DNA in den transduzierten Zellen, allerdings kann auch eine somatische Integration des

AAV-Vektorgenoms in die Wirtschromosomen nicht ausgeschlossen werden. Ob dieses genotoxische Auswirkungen haben kann, ist noch nicht eindeutig erforscht worden. Adenovirale Vektoren sind im Hinblick auf Genotoxizität als relativ sicher einzustufen, da eine somatische Integration in die Wirtschromosomen nur sehr selten stattfindet.

Gerade für *in vivo* Studien in größeren Tiermodellen und in klinischen Studien in denen der virale Vektor systemisch appliziert wird, muss eine hohe Reinheit der viralen Präparation gewährleistet sein. Für adenovirale Vektoren der frühen Generation, in denen maximal zwei frühe adenovirale Gene fehlen (meist die frühen adenoviralen Gene E1 und E3), ist dieses ohne weiteres möglich. Auch für AAV- und retrovirale Vektoren kann eine Großproduktion von spezialisierten Laboren und Firmen durchgeführt werden. Es sei jedoch erwähnt, dass für eine direkte *in vivo* Applikation bisher nur AAV und adenovirale Vektoren der ersten Generation und keine retrovirale Vektoren eingesetzt worden sind. Letztere werden präferentiell in *ex vivo* Studien eingesetzt, in denen Zellen aus dem Körper entnommen werden (z.B. hämatopoetische Stammzellen) und dann *ex vivo* mit therapeutischer DNA transduziert und genetisch modifiziert werden. Anschließend werden die genetisch modifizierten Zellen in den Körper reimplantiert. Der einzige Vektortyp, der aufgrund seiner komplexen Produktionsverfahren noch nicht seinen Weg in die Klinik gefunden hat, ist der *high-capacity adenoviral vector*.

Als weiterer wichtiger Aspekt zur Beurteilung der Sicherheit von viralen Vektoren ist die induzierte angeborene und adaptive Immunantwort besonders nach systemischer Administration erwähnenswert. Gerade die häufig eingesetzten adenoviralen Vektoren der frühen Generation induzieren eine relativ starke angeborene und adaptive Immunantwort. Ein Grund hierfür liegt darin, dass adenovirale Vektoren sich in den meisten Fällen vom humanen Adenovirus Typ 5 ableiten, der in der Bevölkerung eine hohe Seroprävalenz besitzt. AAV Vektoren sind apathogen und die Immunogenität ist wie bei retroviralen Vektoren als relativ gering einzustufen. Tabelle 9.1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften von retroviralen -, AAV-, und adenoviralen Vektoren.

### 9.3.2 Arbeiten mit viralen Vektoren und Sicherheitseinstufung

Aufgrund ihres Gefährdungspotenzials werden gentechnische Arbeiten in vier Sicherheitsstufen eingeteilt. Die Sicherheitsstufe 1 (S1) weist kein Risiko, die Sicherheitsstufe 2 (S2) ein geringes Risiko, die Sicherheitsstufe 3 (S3) ein mäßiges Risiko und die Sicherheitsstufe 4 (S4) ein hohes Risiko für die menschliche Gesundheit und/oder die Umwelt auf. Gemäß § 4 der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) erfolgt die Risikobewertung der geplanten gentechnischen Arbeiten gemäß der Gesamtbewertung verschiedener Faktoren. Hierzu gehört die Feststellung aller für die Sicherheit bedeutsamen Eigenschaften des gentechnisch veränderten Organismus (GVO), wobei der Empfänger- oder Ausgangsorganismus, das inserierte genetische Material, der Vektor selbst, und der Spenderorganismus eine essentielle Rolle spielen. Ebenfalls werden die Merkmale der gentechnischen Tätigkeit sowie die Schwere und Wahrscheinlichkeit einer Gefährdung beurteilt. Eine Risikoabschätzung für die in diesem Artikel diskutierten viralen Vektoren ist in Tabelle 9.1 erwähnt. Als zusätzliche Hilfsmittel stehen dem Anwender verschiedene Datenbanken zur Verfügung. In diesem Zusammenhang sollten die Datenbank des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und die allgemeinen Stellungnahmen der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) erwähnt werden.

	Retrovirale Vektoren	AAV <sup>(1)</sup> Vektoren	Adenovirale Vektoren
<b>Genetisches Material</b>	RNA	Einzelstrang-DNA Doppelstrang-DNA	Doppelstrang-DNA
<b>Verpackungskapazität</b>	~7-10 Kilobasen	~4,7 Kilobasen	8,2 Kilobasen (37,2 Kilobasen für <i>high-capacity adenoviral vectors</i> <sup>(1)</sup> )
<b>Wirtsspektrum</b>	Breit	Breit	Breit
<b>Somatische Integration</b>	Ja	Selten	Sehr selten
<b>Replikationsfähigkeit</b>	Nein	Nein	Nein (außer für onkolytische Adenoviren)
<b>Immunogenität</b>	Gering	Gering	Hoch (Mittel für <i>high-capacity adenoviral vectors</i> <sup>(1)</sup> )
<b>Anwendungsgebiete</b>	Grundlagenforschung (stabile Zelllinien), Gentherapie	Gentherapie	Gentransfer/Gentherapie Vakzinierung Onkolyse (Virotherapie)
<b>Sicherheitsstufe (S)</b>	S2 <sup>(2)</sup>	S1 <sup>(2)</sup>	S2 <sup>(2)</sup>

Tabelle 9.1. Eigenschaften von den am häufigsten eingesetzten viralen Vektoren und Sicherheitseinstufung. Anmerkungen: <sup>1</sup>Es fehlen alle adenoviralen Kodierungssequenzen, <sup>2</sup>Sicherheitsstufe.

## 9.4 Anwendungen viraler Vektoren und Ausblick

### 9.4.1 Anwendungen von viralen Vektoren

Es gibt vier große Anwendungsgebiete, die für virale Vektoren in Frage kommen: Grundlagenforschung, Impfstoffentwicklung, Gentherapie und Virotherapie (onkolytische Viren).

In der Grundlagenforschung macht man sich vor allem die hohen Transduktionseffizienzen von viralen Vektoren zu Nutze, die häufig für nicht-virale Ansätze mit nackter DNA bedeutend niedriger sind. Generell kann mittels viraler Vektoren eine transiente (Adenoviren und AAV) oder stabile Expression des Transgens (Retroviren) ermöglicht werden. Zusätzlich ist der Einsatz in der Zellkultur (*in vitro*) und im Tiermodell (*in vivo*) möglich. Beispiele für Anwendungen von viralen Vektoren in der Grundlagenforschung sind die Überexpression von Genen, der *Knock-down* von Genen mittels der RNA Interferenz (RNAi) oder der Designer-Nuklease Technologie (z.B. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /Cas9* = CRISPR/Cas9), oder das Protein-*Tagging* durch das Inserieren eines Reportergens wie z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP).

In der Impfstoffentwicklung werden virale Vektoren für die genetische Vakzinierung untersucht. Besondere Aufmerksamkeit erreichten in den letzten Jahren adenovirale Vektoren bei der Entwicklung und Austestung eines Impfstoffes gegen eine Ebolavirusinfektion (Ledgerwood et al., 2015; Rampling et al., 2015) und gegen Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) (Barouch, 2010). In der Gentherapie steht die Behandlung von selteneren genetischen Erkrankungen im Vordergrund. Weltweites Interesse erzeugten erfolgreiche klinische Studien mit lentiviralen Vektoren zur Therapie der metachromatischen Leukodystrophie (Biffi et al., 2013) oder die Behandlung des Wiskott-Aldrich Syndroms (WAS) (Aiuti et al., 2013). AAV Vektoren werden ebenfalls in der Klinik zur Heilung von Blutgerinnungsdefekten ausgetestet. Hier ist vor allem eine kürzlich erfolgreich durchgeführte Studie an Hämophilie B Patienten zu erwähnen. Hierbei wurde dem Patienten ein AAV Vektor mit dem therapeutischen Transgen, welches den Blutgerinnungsfaktor IX exprimiert, appliziert (Nathwani et al., 2011). Große Aufmerksamkeit erregte ebenfalls ein AAV Vektorbasiertes Therapeutikum, welches im Jahre 2012 als erstes Gentherapiemedikament

in Europa zugelassen wurde. Hierbei handelte es sich um Alipogene Tiparvovec (eingetragener Handelsname Glybera<sup>®</sup>) (Haddley, 2013), ein AAV Vektor der zur Behandlung der Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD) eingesetzt werden kann (Kaepfel et al., 2013). LPLD ist eine Erkrankung mit einer sehr seltenen Inzidenz (~1 pro 1.000.000) und beruht auf einem Defekt des Lipoproteinlipase (LPL)-Gens, wodurch die betroffenen Patienten erhöhte Triglyzeridspiegel im Blut aufweisen. Der applizierte AAV Vektor wird intramuskulär aufgenommen und produziert dann LPL.

#### **9.4.2 Optimierungen von viralen Vektoren und Herausforderungen für die Zukunft**

Obwohl die ersten Erfolge seit Einführung der Gentherapie vor etwa 30 Jahren großes Interesse geweckt haben und die Gentherapie wieder auf die Erfolgsspur gebracht haben, sind weitere Optimierungen bezüglich der Wirksamkeit und des Sicherheitsprofils der in der Klinik eingesetzten Vektoren von enormer Wichtigkeit. Die Spezifität der Vektoren für die gewünschten Zelltypen (Tropismus) bei systemischen Applikationen ist ein wichtiges Thema, da unerwünschte Expression des Transgens in Zellen, die für die Behandlung irrelevant sind, zu Nebenwirkungen führen können. Um einen spezifischen Zelltropismus gewährleisten zu können, werden verschiedenen Strategien verfolgt. Zum einen kann die Oberfläche des eingesetzten Vektors genetisch oder chemisch modifiziert werden, oder es können Zelltyp-spezifische Promotoren oder andere genetische Elemente genutzt werden, um eine möglichst gezielte Expression zu erreichen. Die Vorgehensweise wurde für alle in diesem Artikel diskutierten Vektoren (AAV-, lentivirale, und adenovirale Vektoren) verfolgt.

Weiterhin ist es von enormer Wichtigkeit, virale Vektoren die eine natürliche Integrationsfähigkeit aufweisen zu verbessern, da integrierende Vektoren genotoxische Nebeneffekte induzieren können. Auch hier werden verschiedene Strategien verfolgt, um das somatische Integrationsprofil z.B. von lentiviralen Vektoren zu verbessern. Aus diesem Grunde wurden Hybridvektoren untersucht, die die hohen Transduktionseffizienzen von viralen Vektoren mit genetischen Elementen für die spezifische Integration des Transgenes in einen „safe harbor“ im Wirtsgenom kombinieren. Hier ist vor allem das erst kürzlich entwickelte CRISPR/Cas9 System von großem Interesse (Jinek et al., 2012), welches Sequenz-spezifische Genommanipulationen erlaubt

und in Anwesenheit einer entsprechenden Donor-DNA durch homologe Rekombination sogar zur direkten Genreparatur genutzt werden kann. Die CRISPR/Cas9 Maschinerie wurde bereits im Zusammenhang mit AAV-, lentiviralen und adenoviralen Vektoren untersucht.

Ein weiterer Aspekt, der in den nächsten Jahren näher beleuchtet werden sollte, sind die gegen den Vektor gerichteten angeborenen und adaptierten Immunantworten besonders nach systemischer Applikation eines viralen Vektors. Hier spielen die eingesetzte virale Dosis und der eingesetzte virale Serotyp eine wichtige Rolle. Der Wechsel zu einem anderen Serotyp mit einer niedrigeren Seroprävalenz in der Bevölkerung kann zu einer abgeschwächten Immunantwort führen und somit zu verringerten Vektor-assoziierten Nebeneffekten. Als alternativen Ansatz zur Abschwächung der Immunantworten gegen den applizierten viralen Vektor werden ebenfalls „*shielding*“ Strategien verfolgt. Hierbei wird der Vektor mit einer Substanz eingehüllt, damit dieser im optimalen Falle nicht mehr von Immunzellen erkannt wird.

Die letzten Jahre haben gezeigt, dass die Weiterentwicklung der gängigen Vektortechnologien sowohl auf die Grundlagen- als auch auf die translationale und klinische Forschung einen großen Einfluss hatten. Die Zukunft wird zeigen, inwieweit sich die einzelnen Vektortechnologien für die einzelnen Anwendungen durchsetzen werden oder ob andere virale Vektoren, die nicht in diesem Artikel diskutiert wurden, eine größere Rolle spielen werden.

## 9.5 Literatur

Aiuti, A., Biasco, L., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341(6148): 1233-1235.

Appaiahgari, M. B. and Vrati, S. (2015). Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther* 15(3): 337-351.

Ayuso, E., Mingozzi, F., et al. (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* 10(6): 423-436.

Barouch, D. H. (2010). Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS* 5(5): 386-390.

Biffi, A., Montini, E., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341(6148): 1233-1235.

Boehme, P., Stellberger, T., et al. (2015). Standard free droplet digital polymerase chain reaction as a new tool for the quality control of high-capacity adenoviral vectors in small-scale preparations. *Hum Gene Ther Methods* 26(1): 25-34.

Bustin, S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29(1): 23-39.

Bustin, S. A., Benes, V., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622.

Donoghue, D. J., Anderson, C., et al. (1984). Transmission of the polyoma virus middle T gene as the oncogene of a murine retrovirus. *Nature* 308(5961): 748-750.

Edelstein, M. (2015). *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. Retrieved 24.11.2015, from <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.

Gao, G. P., Alvira, M. R., et al. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11854-11859.

Goff, S. P. and Berg, P. (1976). Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9(4 PT 2): 695-705.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644): 415-419.

Haddley, K. (2013). Alipogene tiparovec for the treatment of lipoprotein lipase deficiency. *Drugs Today (Barc)* 49(3): 161-170.

Heid, C. A., Stevens, J., et al. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10): 986-994.

Higuchi, R., Fockler, C., et al. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11(9): 1026-1030.

Jackson, D. A., Symons, R. H., et al. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(10): 2904-2909.

Jager, L., Hausl, M. A., et al. (2009). A rapid protocol for construction and production of high-capacity adenoviral vectors. *Nat Protoc* 4(4): 547-564.

Jinek, M., Chylinski, K., et al. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816-821.

Kaepfel, C., Beattie, S. G., et al. (2013). A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* 19(7): 889-891.

Ledgerwood, J. E., Sullivan, N. J., et al. (2015). Chimpanzee Adenovirus Vector Ebola Vaccine--Preliminary Report. *N Engl J Med* 373(8): 776.

Lombardo, A., Genovese, P., et al. (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25(11): 1298-1306.

Naldini, L., Blomer, U., et al. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259): 263-267.

Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365(25): 2357-2365.

Palmer, D. and Ng, P. (2003). Improved System for Helper-Dependent Adenoviral Vector Production. *Mol Ther* 8(5): 846-852.

Parks, R. J., Chen, L., et al. (1996a). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13565-13570.

Parks, R. J., Chen, L., et al. (1996b). A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24): 13565-13570.

Rampling, T., Ewer, K., et al. (2015). A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine - Preliminary Report. *N Engl J Med*.

Salmon, P. and Trono, D. (2006). Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 4: Unit 4 21.

Schambach, A., Swaney, W. P., et al. (2009). Design and production of retro- and lentiviral vectors for gene expression in hematopoietic cells. *Methods Mol Biol* 506: 191-205.

Schiedner, G., Morral, N., et al. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18(2): 180-183.

Sykes, P. J., Neoh, S. H., et al. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13(3): 444-449.

Vargas, J., Jr., Gusella, G. L., et al. (2004). Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 15(4): 361-372.

Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9236-9241.

Wilson, J. M. (2015). A Call to Arms for Improved Vector Analytics! *Hum Gene Ther Methods* 26(1): 1-2.

6. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 17. November 2015

ZKBS Stellungnahme (Az.: 6790-10-28). Gentransfer mit Adenovirus Typ 5.

## 10 Droplet digital PCR (ddPCR) in der Virusanalytik

Dr. Thorsten Stellberger<sup>1</sup>, Prof. Dr. Anja Ehrhardt<sup>2</sup>, Dr. Lars Gerdes<sup>1</sup>, Dr. Patrick Gürtler<sup>1</sup>, PD Dr. Armin Baiker<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),  
Oberschleißheim

<sup>2</sup>Institut für Virologie und Mikrobiologie, Fakultät für Gesundheit - Department für  
Humanmedizin, Universität Witten/Herdecke

### 10.1 Einleitung

#### 10.1.1 Entwicklungsstufen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der 1. Generation der PCR spricht man von der einfachen Endpunkt-PCR, bei der ein bestimmter DNA-Abschnitt vermehrt und anschließend per Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird. Die Bestimmung der Menge an in die PCR-Reaktion eingesetzter DNA (genauer gesagt Ziel-DNA Kopien) wurde, abgesehen von der sogenannten „limiting dilution“-PCR (Sykes et al., 1992), welche das Prinzip der digitalen PCR vorwegnahm, erst mit der Erfindung der quantitativen real-time PCR (qPCR, 2. PCR-Generation) praktikabel. Die Amplifikation der Ziel-DNA wird dabei in Echtzeit durch die Verwendung von Hydrolysesonden oder von interkalierenden Farbstoffen verfolgt (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996). Der Zeitpunkt (PCR-Zyklus), bei dem das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen in ein exponentiell steigendes Signal übergeht und den Schwellenwert (Threshold) schneidet, wird als sogenannter Cq-Wert (cycle of quantification, nach Bustin et al., 2009) bezeichnet und ist proportional zu der initial vorhandenen Ziel-DNA-Menge (s. Abbildung 10.1). Der Cq-Wert kann im Vergleich mit einer Standardreihe bekannter Konzentrationen zur absoluten Quantifizierung herangezogen werden. Der Vergleich mit einem Referenzgen ermöglicht zudem eine relative Quantifizierung von beispielsweise mRNA-Transkripten, wodurch Veränderungen der Genexpression gemessen werden können

(Bustin, 2002). Bei der digitalen PCR (dPCR) spricht man von der 3. PCR-Generation. Hier wird der Reaktionsansatz in so viele Teilreaktionen unterteilt, dass Partitionen mit und ohne Ziel-DNA entstehen (Vogelstein & Kinzler, 1999). Die PCR wird anschließend, analog zur qPCR, mit Sonden oder interkalierenden Farbstoffen durchgeführt. Im Gegensatz zur qPCR, wo das Fluoreszenzsignal bei jedem Zyklus gemessen, und dessen Anstieg in „Echtzeit“ verfolgt wird, wird bei der dPCR die Messung meist nur am Endpunkt durchgeführt (s. Abbildung 10.2A-E). Die Partitionen sind entweder „positiv“ (eine oder mehrere Kopien in der Teilreaktion) oder „negativ“ (keine Ziel-DNA in der Teilreaktion). Aufgrund dieser zwei möglichen Aussagen, „1“ (positiv) und „0“ (negativ), spricht man bei der Methode von einer „digitalen“ PCR.

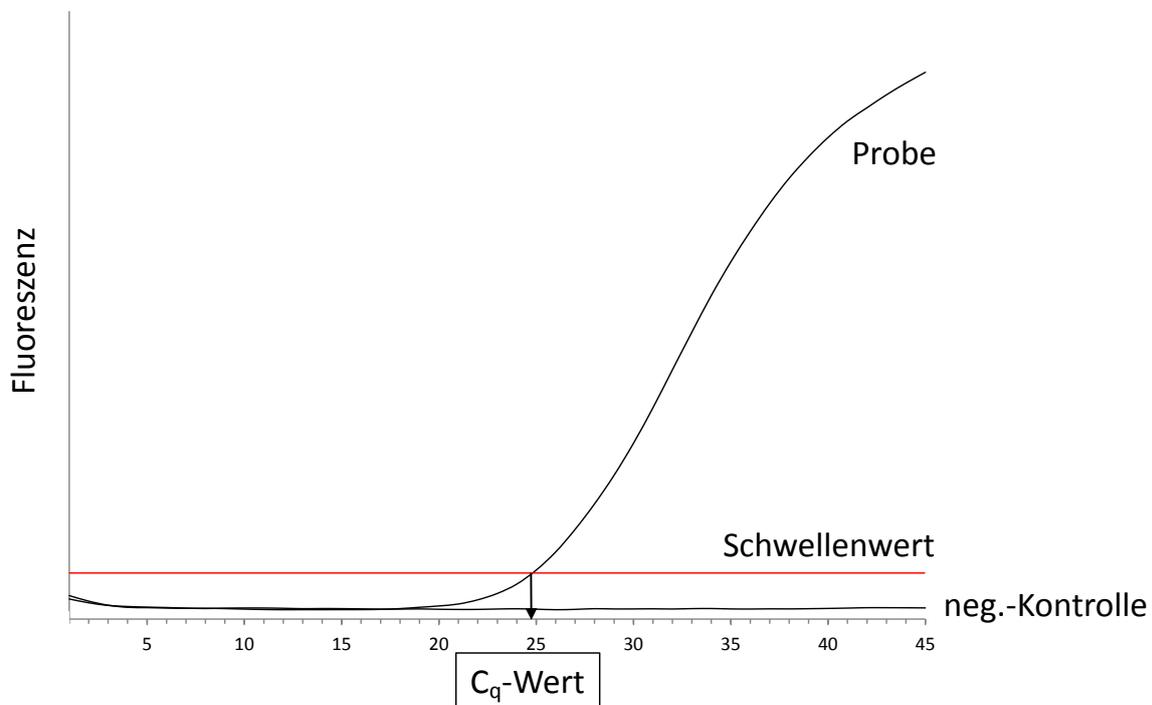


Abbildung 10.1: Amplifikationskurve einer qPCR. Der C<sub>q</sub>-Wert entspricht dem Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der Probe den Schwellenwert (rote Linie) überschreitet.

Die ursprüngliche Anzahl von DNA-Kopien in einer Probe wird aus dem Anteil positiver Teilreaktionen von der Gesamtanzahl an Teilreaktionen berechnet. Dabei müssen das eingesetzte Probenvolumen und ggf. durchgeführte Verdünnungen berücksichtigt werden. Abhängig von der Ziel-DNA-Menge in der Probe variiert die Wahrscheinlichkeit, dass sich 1, 2, 3 oder mehr Ziel-DNA-Kopien in einer positiven Teilre-

aktion befinden. Dies wird statistisch durch eine Poisson-Korrektur bei der Auswertung der dPCR korrigiert (s. Abbildung 10.2F).

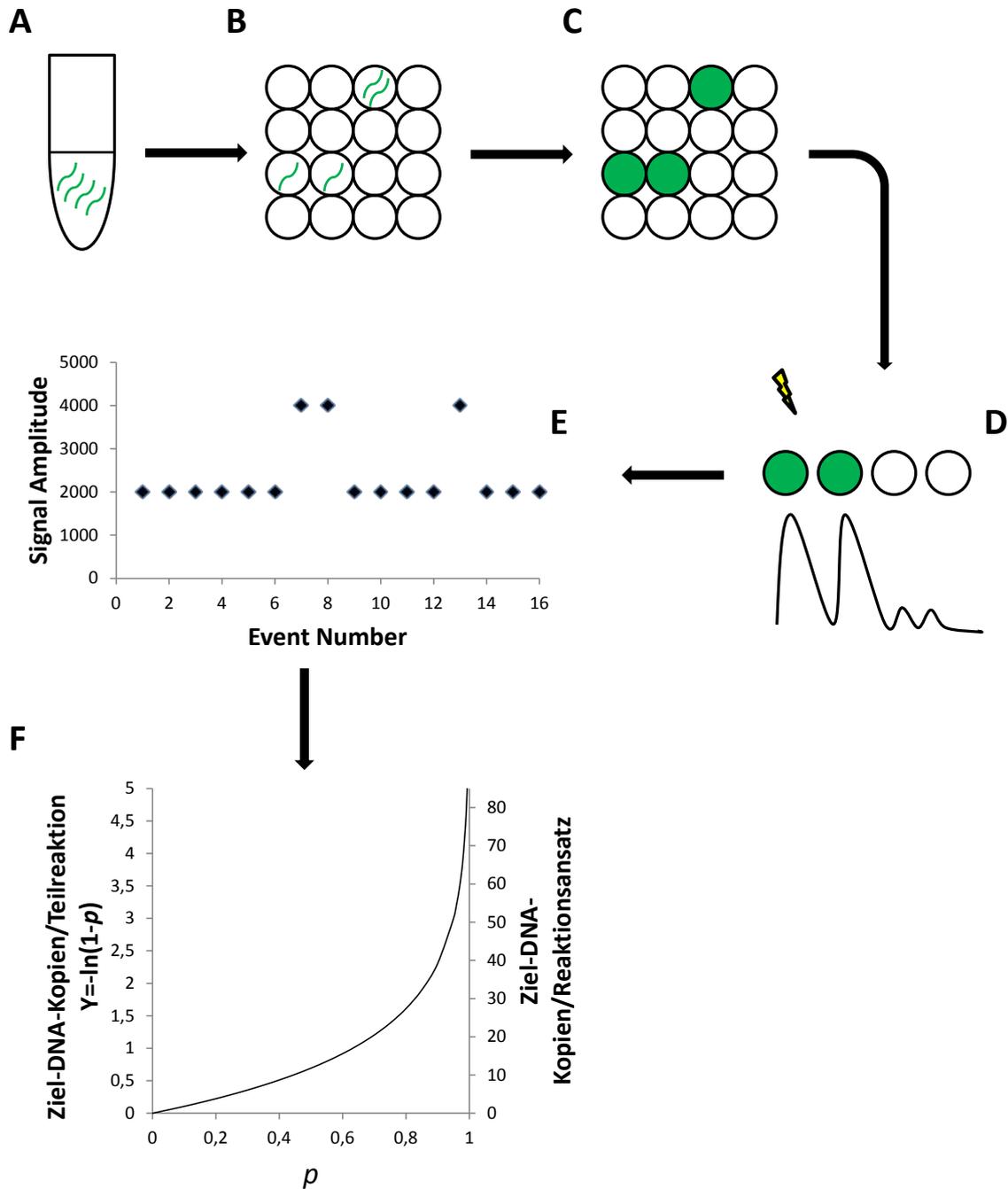


Abbildung 10.2: Schematischer Ablauf der digitalen PCR. A: Der Reaktionsansatz wird in viele (hier zur Veranschaulichung 16) Teilreaktionen verteilt. B: Die Ziel-DNA (grüne Linien) verteilt sich zufällig auf die Teilreaktionen. C: Die PCR-Reaktion wird zum Endpunkt durchgeführt. Somit entstehen positive und negative Partitionen. D: Das Fluoreszenzsignal jeder Teilreaktion wird gemessen und (E) gezählt. F: Die Ausgangsmenge an Ziel-DNA wird über eine angenommene Poisson-Verteilung korrigiert.

Die technische Umsetzung der Partitionierung des PCR-Ansatzes unterscheidet derzeit zwei dPCR-Prinzipien. Zum einen die Unterteilung mittels mikrofluidischer Chips, welche das eingesetzte Reaktionsvolumen und die Anzahl an Teilreaktionen vorgeben, und zum anderen durch Erzeugung einer Wasser-in-Öl-Emulsion. Letztere wird aufgrund der generierten Tröpfchen als „*droplet digital PCR*“, kurz ddPCR, bezeichnet. Bei der ddPCR wird der PCR-Mix in eine große Zahl Tröpfchen bekannten und konstanten Volumens aufgeteilt. Aus der Anzahl auswertbarer Tröpfchen wird im Nachhinein das Gesamt-Reaktionsvolumen berechnet.

## **10.2 Digitale PCR als Werkzeug zur Qualitätskontrolle Adenoviraler Vektorpräparationen**

### **10.2.1 Adenovirale Vektoren**

Adenovirale Vektoren sind die am häufigsten in klinischen Studien verwendeten Gentherapie-Vektoren (Edelstein, 2015). In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Reihe adenoviraler Vektorgenerationen entwickelt, sogenannte helferabhängige adenoviralen Vektoren (HA-AdV) stellen hierbei die höchste Entwicklungsstufe dar (Appaiahgari & Vrati, 2015). HA-AdV können bis zu 36 Kilobasenpaare fremder genetischer Information tragen, wodurch große und komplexe Transgene übertragen (Parks et al., 1996b) und sehr stabil in den Empfängerzellen exprimiert werden können (Schiedner et al., 1998). Zur Erhöhung der Sicherheit wurden aus diesen Vektoren alle Protein-kodierenden viralen Sequenzen entfernt. Darüber hinaus können HA-AdV eine Vielzahl von Zelltypen *in vitro* und *in vivo* transduzieren und sind dabei weniger toxisch als frühere adenovirale Vektorgenerationen (Schiedner et al., 1998). Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren werden der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet. Da die HA-AdV neben der zur Verpackung des Genoms notwendigen DNA-Abschnitte keine virale genetische Information mehr tragen, müssen die notwendigen Elemente zur Produktion dieser Vektoren *in trans* durch Helferviren bereitgestellt werden (daher der Name „helferabhängig“). Gentechnische Arbeiten mit diesen Helferviren (HV), bei denen es sich i. d. R. um adenovirale Vektoren früherer Generationen handelt, werden hingegen der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet. Das Verpackungssignal des Helfervirus wiederum ist flankiert von Erkennungssequenzen der Cre-

Rekombinase (loxP). Während der Vektorproduktion in einer Produktionszelllinie, welche die Cre-Rekombinase stabil exprimiert, kann somit das Verpackungssignal des Helfervirus entfernt werden (Parks et al., 1996b). Daher werden nur die HA-AdV-Genome effizient verpackt. Dieser Mechanismus ist jedoch nicht zu 100 % effektiv, so dass Helfervirus-Kontaminationen durch Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt werden müssen, um die Einstufung der HA-AdV in die niedrigere Risikogruppe 1 zu erreichen. Zudem müssen geeignete Produktionszelllinien verwendet werden, bei denen nicht von einer homologen Rekombination zwischen integrierten Helfergen und Helfervirus auszugehen ist, (ZKBS Stellungnahme, Az.: 6790-10-28).

### **10.2.2 Aufreinigung adenoviraler Vektoren**

Der limitierende Faktor bei der Verwendung der HA-AdV ist die komplexe zeit- und arbeitsaufwändige Produktion sowie die anschließende Qualitätskontrolle. Die Aufreinigung der HA-AdV erfolgt üblicherweise mittels Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Umpufferung z. B. mittels Dialyse. Diese Methoden bedürfen viel Erfahrung, da sie technisch anspruchsvoll und entsprechend fehleranfällig sind. Außerdem ist eine solche Produktion nicht skalierbar.

Die hier beschriebene Studie, welche in Zusammenarbeit mit dem LGL durchgeführt wurde (Boehme et al., 2015), beschreibt die Etablierung und anschließende Qualitätskontrolle kommerziell verfügbarer Kits zur Aufreinigung von Adenoviren, bzw. davon abgeleiteten Vektoren, im direkten Vergleich mit der klassischen Aufreinigungsmethode über Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden insbesondere die Infektiosen Titer und die verbleibenden Helfervirus-Kontaminationen der unterschiedlichen Vektorpräparationen bestimmt. In der Studie wurden qPCR- und ddPCR-basierte Methoden verglichen, welche jeweils mit Hilfe von zwei Primer-Sonden Paaren ermöglichen, zwischen helferabhängigem Adenoviralen Vektor und Helfervirus zu unterscheiden. Die dPCR wird hierbei als ein mögliches Mittel angesehen, um tatsächlich vergleichbare Ergebnisse bei der Bestimmung der Virustiter in unterschiedlichen Laboren zu gewährleisten (Wilson, 2015).

### 10.2.3 Versuchsaufbau

#### Vektor-Amplifikation

Um die unterschiedlichen Aufreinigungsverfahren zu vergleichen, wurde ein Helfer-abhängiger adenoviraler Vektor in einem größeren Ansatz amplifiziert. Als Ausgangsmaterial dienten 100 Zellkulturschalen der „116“-Zelllinie (Palmer & Ng, 2003), welche mit dem Vektor und Helfervirus kotransduziert wurden (s. Abbildung 10.3A). Es handelt sich um eine Produktionszelllinie, welche zum einen das adenovirale E1-Gen trägt, welches die E1-Deletion des Helfervirus komplementiert. Dies ermöglicht die Replikation und letztendlich die Verpackung des Helfer-abhängigen Vektorge-noms. Die Verpackung des Helfervirus-Genoms wird zum anderen durch die Cre-Rekombinase verhindert, welche das Verpackungssignal  $\Psi$  aufgrund flankierender Erkennungssequenzen (loxP) herausschneidet (vgl. Abbildung 10.4A). Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert.

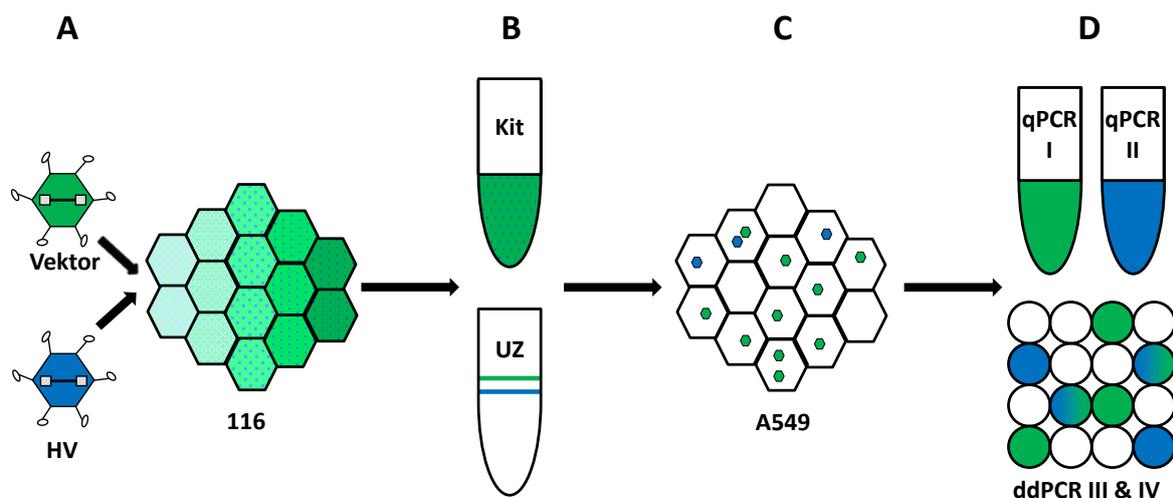


Abbildung 10.3: Übersicht der durchgeführten Experimente. A: Vektor-Amplifikation in „116“-Zellen; B: Aufreinigung mittels kommerzieller Kits und klassischer Ultrazentrifugation; C: Re-Transduktion von A549-Zellen; D: Nukleinsäure-Extraktion und Titration von Vektor- und Helfervirus-Genomen mittels qPCR und ddPCR; Abkürzungen: Vektor: Helferabhängiger adenoviraler eGFP-Vektor; HV: Helfervirus (1. Generation adenoviraler Vektor); 116: „116“-Zelllinie zur Vermehrung von Vektor; A549: „A549“-Zelllinie, keine Vermehrung von Vektor und HV, keine Deletion von  $\Psi$  aus HV-Genom.

#### Vektor-Aufreinigung

Zur Vektor-Aufreinigung wurden drei kommerzielle Adenovirus-Aufreinigungskits entsprechend der Herstellerangaben verwendet: (1) „Adenovirus Purification Miniprep

Kit“ von Cell Biolabs; (2) „Fast-Trap Virus Purification and Concentration Kit“ von Merck Millipore und (3) das „Adeno-X Maxi Purification Kit“ von TaKaRa/Clontech (s. Abbildung 10.3B). Als Kontrolle diente ein etabliertes Aufreinigungsprotokoll mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Jager et al., 2009).

### **Re-Infektion der Vektorisolate**

Um sicherzustellen, dass nur infektiöse Viren- bzw. Vektoren (transduzierende Einheiten) in die Auswertung einfließen, wurden A549-Zellen in 6-Well-Platten mit definierten Volumina der Vektorpräparationen transduziert (s. Abbildung 10.3C). Nach drei Stunden wurden die Zellen trypsinisiert und gewaschen, um extrazelluläre, nicht-infektiöse Partikel zu entfernen.

### **Titration der transduzierenden Einheiten**

Die aus den infizierten A549-Zellen isolierte Gesamt-DNA wurde mittels qPCR und ddPCR vergleichend titriert. Hierfür kamen pro PCR-Technik zwei unterschiedliche PCR-Module zur Unterscheidung zwischen Vektor und Helfervirus zum Einsatz (s. Abbildung 10.4). Bei den qPCR-Methoden handelt es sich (1) um eine SYBR-Green-basierte qPCR, welche das Transgen (grün fluoreszierendes Protein, Abkürzung GFP; engl. *green fluorescent protein*) des Helfer-abhängigen Vektors nachweist und (2) eine qPCR mit Hydrolysesonde zum Nachweis der L3-Region im Helfervirus-Genom (s. Abbildung 10.4A). Beide qPCRs wurden in getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt, da die Farbstoffe im selben Farbkanal emittieren (Abbildung 10.4B). Die ddPCR wurde als duplex-PCR durchgeführt (s. Abbildung 10.4B), mit zwei Primer-Paaren und jeweils einer Hydrolysesonde, welche spezifisch (1) den ITR- $\Psi$ -Bereich von Vektor und Helfervirus, sowie (2) das fiber-Gen (nur im Helfervirus) detektieren. Die Menge der Helferviren entspricht den nachgewiesenen fiber-Kopien. Die Vektorkopien wurden quantifiziert, indem die fiber-Kopien von den ITR- $\Psi$ -Kopien subtrahiert wurden (entspricht der Menge ITR- $\Psi$ -Kopien, welche von Helferviren stammen, s. Abbildung 10.4A).

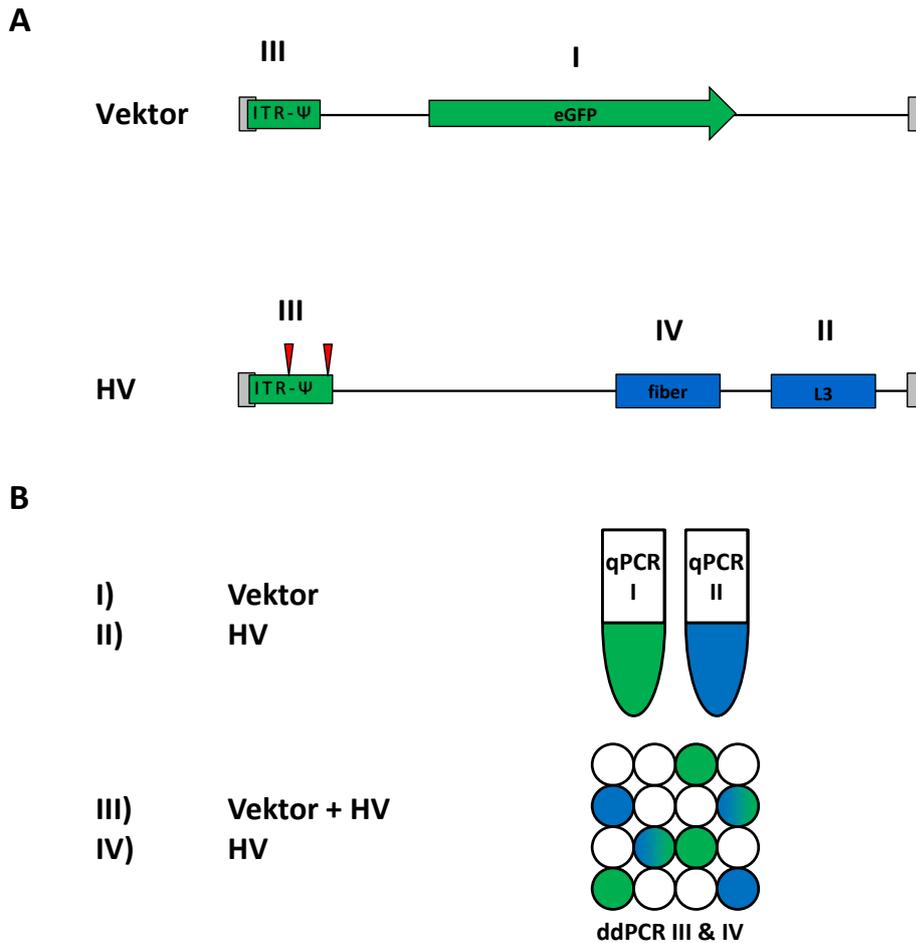


Abbildung 10.4: PCR-Zielsequenzen von qPCR und ddPCR. A: Verwendete PCR-Module (I-IV) zur Quantifizierung des Helfer-abhängigen adenoviralen Vektors (grüne Elemente) und des Helfervirus (HV, blaue Elemente). B: Die qPCR-Quantifizierung Helfer-abhängiger Vektoren und HV-Kontaminationen erfolgte mit den Modulen I und II. Die ddPCR-Quantifizierung wurde mit den Modulen III und IV durchgeführt, wobei der Wert „IV“ vom Wert „III“ subtrahiert wurde, wodurch die HV-Kopien im Vektor-Titer kompensiert werden. Rote Pfeile: loxP-Sequenzen, Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase, welche das Verpackungssignal  $\Psi$  im Helfervirus-Genom flankieren.

## Ergebnisse

Die Titrationsinfektioser Helfer-abhängiger adenoviraler Vektorenergebnis ergibt mittels ddPCR einen etwa um den Faktor 10 höheren Titer als die Titration mittels qPCR (s. Abbildung 10.5). Der Titer nach der konventionellen Aufreinigung mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ist (laut ddPCR-Titration) nochmals um den Faktor 10 bis 100 höher als nach der Aufreinigung mit den kommerziellen Aufreinigungskits. Dieser Wert schwankt aufgrund unterschiedlich hoher Ausbeuten zwischen den untersuchten Kits.

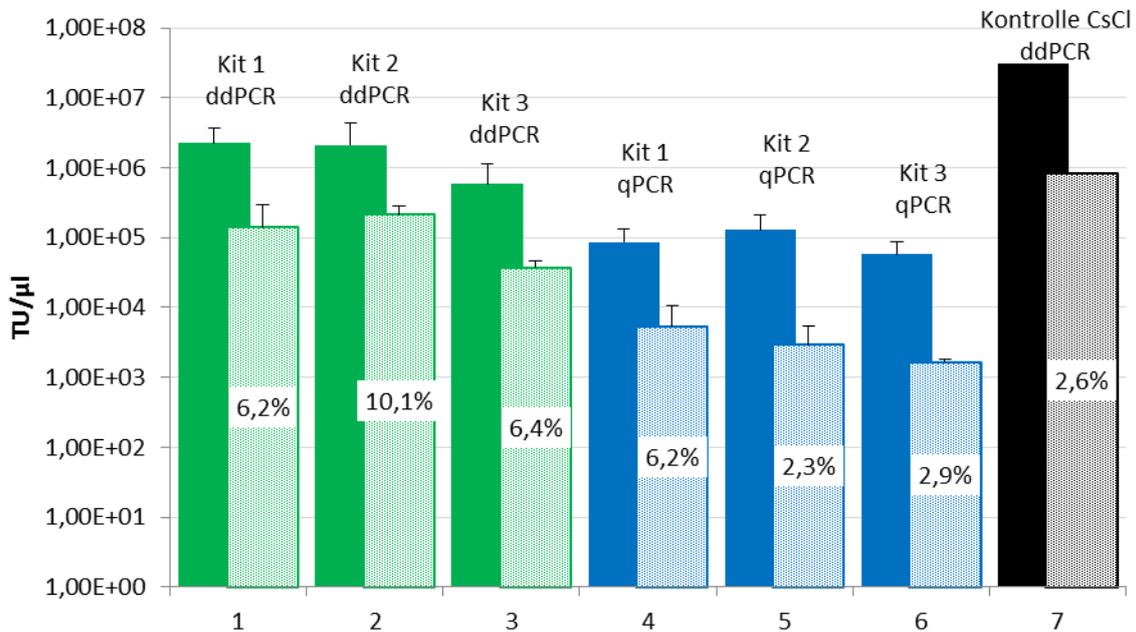


Abbildung 10.5: Infektiöse Titer adenoviraler Vektorpräparationen und HV-Kontaminationen. Volle Balken: Infektiöse Titer Helfer-abhängiger adenoviraler Vektoren. Halbtransparente Balken: Quantifizierung der Helfervirus-Kontaminationen in den entsprechenden Vektorpräparationen. Prozentangaben geben den gemessenen Anteil an HV in der entsprechenden Vektorpräparation an. Grüne Balken repräsentieren die Messungen mittels ddPCR, blaue Balken die Messungen mittels qPCR. 1, 4: Kit 1, „Adenovirus Purification Miniprep Kit“, Fa. Cell Biolabs; 2, 5: Kit 2, „Fast-Trap Virus Purification and Concentration Kit“, Fa. Merck Millipore; 3, 6: Kit 3, „Adeno-X Maxi Purification Kit“, Fa. TaKaRa/Clontech; 7: Kontrollpräparation aus CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, titriert mittels ddPCR. TU: Transduzierende Einheiten (engl. *transducing units*).

Betrachtet man die Reinheit, also den Anteil an infektiösen Helferviren, gemessen mit ddPCR und qPCR, ergibt sich ein ähnliches Bild. Hier ist der Unterschied zwischen ddPCR und qPCR-Messungen nochmals etwas deutlicher mit einem Faktor 10 bis 100, welcher bei der ddPCR höher liegt (s. Abbildung 10.5).

Es handelt sich wohlbermerkt um dieselben Proben, der Unterschied beruht lediglich auf den unterschiedlichen Messmethoden. Vergleicht man die Menge an Helferviren mit der Menge infektiöser Einheiten, errechnet sich eine HV-Kontamination (laut ddPCR) von etwa 6-10 % in den Kit-aufgereinigten Präparationen. Die Kontrollpräparation enthält dagegen nur 2,6 % Helferviren. Grund ist die bessere physikalische Trennung von Vektor und HV aufgrund unterschiedlicher Dichten im CsCl-Gradienten. Die Adenovirus-Aufreinigungskits hingegen reinigen die Partikel aufgrund der Oberflächeneigenschaften auf, welche sich in diesem Fall nicht funktionell unterscheiden.

## **10.3 Fazit**

### **10.3.1 Vergleich qPCR – dPCR**

Die dPCR hat gegenüber der qPCR den grundsätzlichen methodischen Vorteil einer Standard-unabhängigen Quantifizierung. Die Abhängigkeit von Standards bewirkt, dass die Quantifizierung der qPCR immer nur so gut ist, wie die zugehörige Standardreihe, bzw. das dafür verwendete Referenzmaterial. Daraus ergibt sich bei Anwendung der dPCR der weitere Vorteil, dass eben dieses, i. d. R. wertvolle Referenzmaterial geschont wird. Eine Inhibition der PCR-Reaktion, sei es in einer Standardreihe oder einer Probe, verfälscht das Ergebnis der qPCR durch die Verschiebung des C<sub>q</sub>-Wertes nach rechts. Die dPCR ist weniger anfällig gegenüber Inhibitoren, da die Messung zum Endpunkt durchgeführt wird. Dadurch spielt es weniger eine Rolle, in welchem PCR-Zyklus ein Signal positiv gewertet wird, solange es am Endpunkt der PCR einen positiven Wert erzielt. Die Nachteile der dPCR gegenüber der qPCR sind allerdings die derzeit noch höheren Kosten sowie die derzeitige Nicht-Verfügbarkeit kommerzieller Virus-Testkits.

### **10.3.2 Qualitätskontrolle adenoviraler Vektorpräparationen**

In der vorgestellten Studie wurde eine ddPCR-basierte Methode zur Titration helferabhängiger adenoviraler Vektoren entwickelt. Die Qualitätskontrolle mittels qPCR und ddPCR hat gezeigt, dass es möglich ist, helferabhängige adenovirale Vektoren unter Zuhilfenahme von kommerziellen Adenovirus-Aufreinigungskits in kleinem Maßstab zu produzieren. Diese eignen sich qualitativ für Zellkulturexperimente. Da im Gegensatz zur CsCl-Dichtegradientenzentrifugation keine physikalische Trennung von Helferviren und Vektoren stattfindet (wie gefordert in der ZKBS Stellungnahme, Az.: 6790-10-28), enthalten diese Vektorpräparationen noch so große Mengen infektiöser Helferviren, dass sie weiterhin der höheren Risikogruppe 2 zuzuordnen sind. Je nach zum Nachweis verwendeter PCR-Methode liegen die Anteile an restlichem Helfervirus in einer Größenordnung von 1 % (qPCR) bis 10 % (ddPCR). Ausbeute und Qualität dieser Präparationen entsprechen nicht den Kriterien für klinische Anwendungen.

## 10.4 Literatur

- Appaiahgari, M. B. and Vrati, S. (2015). Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther* 15(3): 337-351.
- Boehme, P., Stellberger, T., et al. (2015). Standard free droplet digital polymerase chain reaction as a new tool for the quality control of high-capacity adenoviral vectors in small-scale preparations. *Hum Gene Ther Methods* 26(1): 25-34.
- Bustin, S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29(1): 23-39.
- Bustin, S. A., Benes, V., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622.
- Edelstein, M. (2015). Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Retrieved 24.11.2015, from <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- Heid, C. A., Stevens, J., et al. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10): 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., et al. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11(9): 1026-1030.
- Jager, L., Hausl, M. A., et al. (2009). A rapid protocol for construction and production of high-capacity adenoviral vectors. *Nat Protoc* 4(4): 547-564.
- Palmer, D. and Ng, P. (2003). Improved System for Helper-Dependent Adenoviral Vector Production. *Mol Ther* 8(5): 846-852.
- Parks, R. J., Chen, L., et al. (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24): 13565-13570.
- Schiedner, G., Morral, N., et al. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18(2): 180-183.
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., et al. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13(3): 444-449.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9236-9241.
- Wilson, J. M. (2015). A Call to Arms for Improved Vector Analytics! *Hum Gene Ther Methods* 26(1): 1-2.
- ZKBS Stellungnahme (Az.: 6790-10-28). Gentransfer mit Adenovirus Typ 5.

## **Bisher sind in dieser Schriftenreihe folgende Bände erschienen:**

- Band 1 Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005 (2006)
- Band 2 Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007 (2008)
- Band 3 3. Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“  
Fortbildungsveranstaltung in Oberschleißheim am 02. Dezember 2009 (2010)
- Band 4 Überwachung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut in Bayern  
(2. Auflage, inhaltlich unveränderter Nachdruck im Juli 2011 der 1. Auflage vom April 2011)
- Band 5 Nachweis von nicht zugelassenen gentechnisch-veränderten Organismen (GVO);  
Weltweite Ermittlung, Importanalyse und Entwicklung von Nachweis-Methoden (2011)
- Band 6 4. Fachtagung in Oberschleißheim am 30. November 2011 (2012)
- Band 7 Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen (2013)
- Band 8 5. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 26. November 2013 (2014)

## **sowie der vorliegende Band**

- Band 9 6. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 17. November 2015 (2016)

**Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**

Telefon: 09131 6808-0  
Telefax: 09131 6808-2102  
E-Mail: [poststelle@lgl.bayern.de](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)  
Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)

**91058 Erlangen**  
Eggenreuther Weg 43

**85764 Oberschleißheim**  
Veterinärstraße 2

**80538 München**  
Pfarrstraße 3

**97082 Würzburg**  
Luitpoldstraße 1

**91126 Schwabach**  
Rathausgasse 4

**90441 Nürnberg**  
Schweinauer Hauptstraße 80