

Stellungnahme der ZKBS

zur Risikobewertung von etablierten humanen Zelllinien, die mithilfe des *Epstein-Barr virus (EBV)* immortalisiert wurden

Allgemeines

Gemäß der Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten nach § 5 Absatz 6 Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) werden Zellen und Zelllinien als Spender- und Empfängerorganismen in die **Risikogruppe 1** eingestuft, wenn sie keine Organismen einer höheren Risikogruppe abgeben. Enthalten sie oder geben sie Organismen höherer Risikogruppen ab, werden sie in die Risikogruppe dieser Organismen eingestuft.

Derzeit wird die Einstufung von etablierten humanen B-Zelllinien diskutiert, die aufgrund einer Infektion mit dem *Epstein-Barr virus* (EBV) immortalisiert sind. Die ZKBS stuft diese Zelllinien in die **Risikogruppe 2** ein. Erst der sequenzielle Nachweis des Defektes eines für die lytische Replikation essentiellen Genes ermöglicht eine Einstufung in die **Risikogruppe 1** [1, 2].

Das *Epstein-Barr virus* (EBV), auch *Human herpesvirus 4* (HHV-4), ist ein humanpathogenes, behülltes Virus aus der Familie der *Herpesviridae* mit doppelsträngigem DNA-Genom. Nach Bindung viraler Glykoproteine an den Komplementrezeptor CD21 (DR2) wird das Virus endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen. Das Nukleokapsid gelangt im Folgenden zum Zellkern. Über homologe Rekombination der *terminal repeats* im EBV-Genom zirkularisiert die DNA im Zellkern der infizierten Zelle. Ob es zu einer lytischen oder latenten Infektion kommt, hängt vom Zelltyp und damit vom vorliegenden Expressionsmuster an Transkriptions- und Regulationsfaktoren ab. Eine latente Infektion ist gewöhnlich mit einem episomal vorliegenden EBV-Genom verbunden. Die Replikation des episomalen Genoms erfolgt mithilfe des *oriP*. Es werden virale, latenzassoziierte Proteine exprimiert, die einerseits in den Zellzyklus der infizierten Zelle eingreifen, was mit einer Immortalisierung dieser Zellen einhergeht. Andererseits werden Proteine exprimiert, die das Muster sezernierter Zytokine der infizierten Zellen verändern und somit Einfluss auf eine Erkennung durch das Immunsystem nehmen. Eine lytische Replikation des Virus kann durch verschiedenste Faktoren (Chemikalien, Hormone, Strahlung,...) ausgelöst werden. Unter Zellkulturbedingungen werden häufig Phorbol ester (TPA) und Natrium-Butyrat als Induktoren der lytischen Replikation bei EBV-immortalisierten Zellen eingesetzt. Diese initiieren die Expression des transaktivierenden Zta-Proteins (auch EB1 oder ZEBRA), welches vom viralen *BZLF1*-Gen kodiert wird, und induzieren damit den lytischen Replikationszyklus. Durch Interaktion von Zta mit dem lytischen Replikationsursprung *oriLyt* kann der DNA-Polymerase-Helikase-Primase-Komplex mit der viralen DNA interagieren und die lytische Replikation ermöglichen. Zudem fungiert Zta als Transkriptionsfaktor zur Expression einer Reihe viraler Proteine, wobei auch der Methylierungsstatus des EBV-Genoms entscheidend für die Transkription der entsprechenden Gene ist [3]. Die lytische Replikation geht mit einer Viruspartikelbildung einher. Verpackt wird ein lineares virales Genom. Die Partikelfreisetzung ist mit der Lyse der infizierten Zelle verbunden.

MEC-1/ MEC-2

Es handelt sich um Zelllinien, die aus peripheren Blutzellen einer 64-jährigen Patientin mit chronischem B-Zell-Lymphom etabliert worden sind. Die mononukleären Zellen wurden mit dem Zellkulturüberstand der Affenzelllinie B95-8 inkubiert, welcher infektiöse EBV-Partikel

enthält. Die Zellen immortalisierten. In Immunfluoreszenz- und PCR-Studien sind mehr als 90 % der Zellen positiv auf Vorhandensein des für eine latente Infektion kennzeichnenden EBV-Proteins EBNA1 [4]. Southernblot-Experimente zum Nachweis eines EBV-Genoms in den Zelllinien wurden mithilfe radioaktiv markierter Cosmid-Proben des EBV-Genoms, einer ca. 900 bp-Sonde des 5'-Bereiches des linearen EBV-Genoms oder einer 619 bp-Sonde des 3'-Bereiches des linearen EBV-Genoms, durchgeführt [6]. Der Nachweis ist für beide Zelllinien positiv, wobei im *in situ* lysierenden Gardella-Gel [5] im Lysat der Zelllinie MEC-1 im Gegensatz zur MEC-2-Zelllinie sowohl episomale als auch lineare virale DNA nachzuweisen ist. In MEC-2-Zellen ist nur die episomale EBV-DNA nachweisbar. Beide Zelllinien wurden dahingehend überprüft, ob nach Induktion durch TPA das transaktivierende Protein Zta im Westernblot nachzuweisen ist. In beiden Zelllinien konnte kein entsprechendes Protein detektiert werden [6].

EHEB

Die mononukleären Zellen einer Patientin mit chronischer B-Zell-Leukämie wurden mit dem Zellkulturüberstand der Affenzelllinie B95-8 inkubiert. Infolge einer EBV-Infektion ließ sich eine immortalisierte Zelllinie etablieren. Immunfluoreszenz-Studien erlaubten nach 6-wöchiger Kultivierung der Zelllinie den Nachweis des Latenzmarkers EBNA1 [7]. Im Southernblot ist eine EBV-DNA nachweisbar, die sich im *in situ* lysierenden Gel sowohl episomal als auch linear in der Zelle vorliegend darstellen lässt. Ein Nachweis des transaktivierenden Proteins Zta nach Induktion der Zellen mit TPA konnte im Westernblot nicht erbracht werden [6].

Granta 519

Diese Zelllinie wurde aus peripherem Blut einer mit *high grade B-cell-non-Hodgkin's-Lymphoma* diagnostizierten Frau etabliert [8]. Es handelt sich um eine Zelllinie aus einem spontan proliferierenden Zellklon. Die Zelllinie ist sowohl in einer spezifischen PCR-Analyse positiv für EBV-DNA getestet worden, als auch im Southernblot oder in Immunfluoreszenzstudien. Im *in situ* lysierenden Gardella-Gel ließen sich episomal und linear vorliegende EBV-Genome nachweisen. Nach einer Induktion mit TPA ist im Westernblot auch das transaktivierende Zta-Protein nachweisbar [6]. Diese Ergebnisse sprechen für ein Vorhandensein des vollständigen EBV-Genoms in der Zelle und auch für die Induzierbarkeit des lytischen EBV-Replikationszyklus.

JVM-2/JVM-3

Mononukleäre Zellen einer Patientin mit B-prolymphozytischer Leukämie (B-PLL) wurden durch Inkubation mit EBV-haltigem Zellkulturüberstand der Zelllinie B95-8 in Kombination mit dem Phorbolester TPA zur Proliferation stimuliert [9]. Mithilfe einer PCR ist das Vorhandensein von EBV-spezifischen DNA-Abschnitten in den so etablierten Zelllinien nachgewiesen worden. Diese Daten wurden durch Immunfluoreszenzstudien und Southernblot-Experimente bestätigt. Eine Auftrennung der in den Zellen vorliegenden EBV-DNA im *in situ* lysierenden Gardella-Gel weist sowohl auf episomal als auch auf linear vorliegende EBV-spezifische DNA hin. Nicht nachweisbar ist jedoch die Expression des transaktivierenden Proteins Zta nach Induktion durch TPA in einem Westernblot [6].

LCL-WEI

Es handelt sich um eine B-lymphoblastoide Zelllinie, die aus peripheren Blutzellen eines Melanom-Patienten etabliert worden ist. Sowohl in PCR-Studien als auch im Southernblot und in Immunfluoreszenzstudien ist ein Nachweis auf Vorhandensein von EBV-spezifischen DNA-Abschnitten positiv. Im *in situ* lysierenden Gardella-Gel ist neben einer episomal vorliegenden DNA auch eine EBV-spezifische lineare DNA nachweisbar. Eine TPA-vermittelte Induktion der Zta-Expression kann mithilfe eines Westernblots nicht gezeigt werden [6].

Bewertung

Die Zelllinien MEC-1/MEC-2, EHEB, Granta 519, JVM-2/JVM-3 und LCL-WEI werden als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Abs. 1 i.V.m. Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Alle hier aufgelisteten Zelllinien enthalten spezifische Genomabschnitte des EBV. Rückschlüsse auf ein vollständiges Genom oder eventuell vorliegende Genomdefekte lassen sich durch die hier beschriebenen Experimente nicht eindeutig ziehen.

Es wurden Untersuchungen zu einer möglichen Induktion des lytischen EBV-Replikationszyklus mithilfe von TPA durchgeführt. In einer der hier gelisteten Zelllinien ließ sich anschließend die Expression des für die lytische Replikation essentiellen Proteins Zta im Westernblot nachweisen (Granta 519). Bei den anderen hier beschriebenen Zelllinien war eine Expression nicht nachweisbar. Zudem berichten die Autoren, dass die Induktion durch TPA nicht von einer Lyse der Zellen begleitet wird [6].

Die in der Literatur zur Verfügung stehenden Daten sind nicht ausreichend, um nachzuweisen, dass die hier aufgeführten Zelllinien keine Organismen der **Risikogruppe 2** enthalten oder abgeben können. Aufgrund der Nachweisgrenze eines Westernblots lässt sich nicht ausschließen, dass für die lytische Replikation essentielle Proteine zu einem geringen Anteil exprimiert werden. In der Literatur wird zudem von einer zum Teil heterogenen Verteilung des EBV-Genoms in einer Zelllinie berichtet [6]. Möglicherweise enthalten nur einzelne Zellen ein vollständiges EBV-Genom, das eine lytischen Replikation ermöglicht. Einzelne lysierte Zellen werden schnell von den restlichen Zellen überwachsen und sind somit möglicherweise nicht zu erkennen. Die Zelllinien sind somit der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Wird mithilfe einer Sequenzanalyse der Nachweis für einen Defekt eines essentiellen Genes erbracht, können die Zelllinien in die **Risikogruppe 1** herabgestuft werden. Alternativ kann ein Lymphozyten-Transformations-Test mit Überständen induzierter Zelllinien Hinweise auf Abwesenheit replikationskompetenter Viruspartikel mit hinreichender Sensitivität geben. Bei entsprechend vorgelegten Daten entscheidet die ZKBS im Einzelfall über die Herabstufung in die **Risikogruppe 1**.

Literatur

- [1] Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der Empfängerzelllinien COS, 293 und Raji (Az. 6790-10-18, Aug. 1993).
- [2] Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der Empfängerzelllinien DOHH-2 (Az. 6790-05-04-40, Juli 2005).
- [3] Flower K, Thomas D, Heather J, Ramasubramanyan S, Jones S, Sinclair AJ (2011). Epigenetic Control of Viral Life-Cycle by a DNA-Methylation Dependent Transcription Factor. PLoS One 6(10):e25922.
- [4] Caligaris-Cappio F, Bergui L, Rege-Cambrin G, Tesio L, Migone N, Malavasi F (1987). Phenotypic, cytogenetic and molecular characterization of a new B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cell line. Leuk Res 11(7):579-588.
- [5] Gardella T, Medveczky P, Sairenji T, Mulder C (1984) Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. J Virol 50(1):248-254.
- [6] Uphoff CC, Denkmann SA, Steube KG, Drexler HG (2010). Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in Human and Other Primate Cell Lines. J Biomed and Biotech Art-ID 904767.

- [7] Saltman D, Bansal NS, Ross FM, Ross JA, Turner G, Guy K (1990). Establishment of karyotypically normal B-chronic lymphocytic leukaemia cell line; Evidence of leukaemic origin by immunoglobulin gene rearrangement. *Leuk Res* 14(4):381-387.
- [8] Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR, Catovsky D (1997). Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia* 11(1):64-72.
- [9] Melo JV, Foroni L, Brito-Babapulle V, Luzzatto L, Catovsky D (1988). The establishment of cell lines from chronic B cell leukaemias: evidence of leukaemic origin by karyotypic abnormalities and Ig gene arrangement. *Clin Exp Immunol* 73:23-28.