



### **Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der Empfängerzelllinien COS, 293 und Raji**

Beim Umgang mit den Zelllinien COS-1, COS-7, 293 und Raji wird im Katalog der American Type Culture Collection (ATCC) *Biosafety Level 2* empfohlen.

Die ZKBS nimmt nach den Vorschriften des Gentechnikgesetzes und der Gentechnik sicherheitsverordnung zur Risikobewertung dieser Zelllinien wie folgt Stellung:

#### **I. COS-1- und COS-7-Zelllinie**

Die Etablierung von COS-Zelllinien wurde 1981 publiziert (2). Dabei wurde eine CV-1-Zelllinie, eine etablierte Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen, die für die Vermehrung des SV40-Virus permissiv ist, mit einer SV40-Mutante transfiziert, die eine Deletion von 6 Bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist. Als Kontrolle wurde Wildtyp-SV40-DNA transfiziert. Die mit Wildtyp-DNA transfizierten CV-1-Zellen lysierten durch die virale Replikation nach ca. 6 Wochen. Bei der Transfektion mit den Mutanten bildeten sich 3 Zellpopulationen (COS-1, -3 und -7), wovon COS-1 die einzige klonierte Zellpopulation ist und genauer analysiert werden konnte. COS-1 enthält 2 Kopien defekter Genome der SV40-Mutante, welche im Wirtsgenom integriert vorliegen. Eine Kopie enthält die komplette frühe Region und einen Teil der späten (nur VP2), die zweite Kopie enthält nur die späten Gene VP1 und VP2.

Alle 3 COS-Zelllinien exprimieren das SV40-T-Antigen und sind permissiv für die Infektion und Vermehrung von SV40-Virus.

Da die Transfektion der CV-1-Zelllinie mit rekombinanten SV40-Plasmiden erfolgte, handelt es sich bei den COS-Zelllinien gemäß § 3 GenTG um GVO.

Üblicherweise wird die COS-1- oder COS-7-Zelllinie verwendet.

#### **Stellungnahme der ZKBS:**

Die **COS-1-** und **COS-7-Zelllinien** sind gemäß § 5 Abs. 2 i.V.m. Anhang I Teil A II Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** und der Umgang mit **COS-1-** und **COS-7-Zelllinien** gemäß § 7 Abs. 3 GenTSV der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

Die **COS-1-** und **COS-7-Zelllinien** erfüllen die Voraussetzungen des § 6 Abs. 4 GenTSV. In Verbindung mit Vektoren, die den Replikationsursprung von SV40, aber keine späten SV40-Gene, oder die die späten SV40-Gene, aber keinen funktionsfähigen SV40-Replikationsursprung enthalten, und die die Bedingungen des § 6 Abs. 5 GenTSV erfüllen, handelt es sich um **anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahmen**.

### Begründung:

COS-1- und COS-7-Zelllinien befinden sich bei vielen molekularbiologisch arbeitenden Labors seit langem in Gebrauch. Bei einer Reversion der integrierten SV40-Mutante zum Wildtyp würde diese Zelllinie durch die lytische Vermehrung von Wildtyp-SV40 lysieren. Eine spontan auftretende Lyse wurde nicht beobachtet. Es ist somit davon auszugehen, daß die Deletion im SV40-Replikationsursprung bei den SV40-Mutanten in den COS-Zellen stabil ist. In COS1-Zellen sind die Genome der SV40-Mutante noch durch zusätzliche Deletionen gekennzeichnet. COS-Zellen entsprechen somit etablierten Affennierenzellen, die defekte virale Genome enthalten und keine infektiösen Viruspartikel abgeben.

1. Tooze, J., (1981). DNA-Tumor Viruses, CSH NY
2. Gluzman, Y., (1981). Cell 23 , 175 - 182.

## **II. 293-Zelllinie**

Die Etablierung der Zelllinie 293 wurde 1977 publiziert (2). Dabei wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK) mittels Scherkraft fragmentierter DNA von Adenovirus Typ 5 transformiert. Die durch die Scherung erzielte durchschnittliche Größe von DNA-Fragmenten betrug ein Drittel des viralen Genoms. Eine der wenigen dabei erhaltenen transformierten Zellklone führte zur Etablierung der 293-Zelllinie. Die DNA-Analyse ergab, daß 4 - 5 Kopien vom linken Ende (12% des viralen Genoms, E1a,b-Gene) und 1 Kopie vom rechten Ende (10%, E4-Gen) in 293-Zellen vorhanden sind. Die RNA-Analyse zeigte, daß das linke Ende transkriptionell aktiv ist. Die 293-Zelllinie ist permissiv für die Infektion mit Adenovirus Typ 5 und anderen humanpathogenen Adenoviren. Die Adenoviren durchlaufen dabei einen lytischen Replikationszyklus.

Da die Transfektion von menschlichen embryonalen Nierenzellen nicht mit rekombinanter DNA durchgeführt wurde, handelt es sich bei 293-Zellen gemäß § 3 GenTG nicht um GVO.

### **Stellungnahme der ZKBS:**

Die **293-Zelllinie** ist gemäß § 5 Abs. 2 i.V.m. Anhang Teil B, Teil A II GenTSV der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.

Die **293-Zelllinie** erfüllt die Voraussetzungen des § 6 Abs. 4 GenTSV. In Verbindung mit Vektoren, die nicht die späten adenoviralen Gene enthalten und die die Bedingungen des § 6 Abs. 5 GenTSV erfüllen, handelt es sich um eine **anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahme**.

### Begründung:

Die 293-Zelllinie befindet sich bei vielen molekularbiologisch arbeitenden Labors seit langem in Gebrauch. Hätten die transfizierten adenoviralen Genomabschnitte zu einem vollständigen viralen Genom rekombiniert, wären die Zellen durch die Vermehrung der Adenoviren lysiert und eine Zelllinie hätte sich nicht etablieren können. Eine spontan auftretende Lyse der etablierten Zelllinie wurde auch nicht beobachtet. Die DNA-Fragmente des Adenovirus liegen im Genom der Zelllinie stabil integriert vor. Es konnten keine viralen DNA-Fragmente des mittleren genomischen Bereichs identifiziert werden, die für späte virale Proteine kodieren. Transkripte wurden nur vom linken adenoviralen Genomende, welches die transformierende Region enthält, nachgewiesen. Die 293-Zelllinie entspricht somit einer etablierten menschlichen Zelllinie, die Teile eines viralen Genoms enthält und keine infektiösen Viruspartikel abgibt.

1. Tooze, J., (1981). DNA-Tumor Viruses, CSH NY.
2. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977). J.Gen.Virol. 36, 59 - 72.

### III. Raji-Zelllinie

Die Etablierung der Raji-Zelllinie wurde 1964 publiziert (1). Sie wurde aus einem Burkitt's Lymphom eines 11-jährigen Jungen angelegt. Durch elektronenmikroskopische Analyse konnten keine Viruspartikel identifiziert werden. Die molekularbiologische Analyse ergab, daß in der Raji-Zelllinie latente Epstein-Barr-Virus-(EBV)-Genome vorliegen, welche zwei Deletionen an unterschiedlichen Stellen im Genom enthalten (2). Eine dieser Deletionen betrifft ein für die lytische Replikation essentielles Gen (3). Selbst eine Behandlung mit TPA, die bei anderen Zelllinien, die latentes EBV enthalten, die Abgabe infektiöser EBV bewirkt, führt bei der Raji-Zelllinie weder zu einer Erhöhung der Replikationsrate der EBV-DNA noch zur Herstellung infektiöser EBV (4).

#### Stellungnahme der ZKBS:

Die **Raji-Zelllinie** ist gemäß § 5 Abs. 2 i.V.m. Anhang I Teil B, Teil All GenTSV der **Risiko-Gruppe 1** zuzuordnen.

Die **Raji-Zelllinie** erfüllt die Voraussetzungen des § 6 Abs. 4 GenTSV. In Verbindung mit Vektoren, die nicht die in der Raji-Zelllinie deletierten EBV-DNA-Fragmente enthalten und die die Bedingungen des § 6 Abs. 5 GenTSV erfüllen, handelt es sich um eine **anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahme**.

#### Begründung:

Die Raji-Zelllinie befindet sich bei vielen molekularbiologisch arbeitenden Labors seit langem in Gebrauch. Virale Partikel oder vollständige virale Genome konnten nicht identifiziert werden. Die Raji-Zelllinie entspricht somit einer etablierten menschlichen Zelllinie, die Teile eines viralen Genoms enthält und keine infektiösen Viruspartikel abgibt.

1. Pulvertaft, R.J.V. (1964). Lancet 1, 238.
2. Polack A., Delius, H., Zimber, U. and Bornkamm, G.W. (1984), Virology 133, 146 - 157.
3. Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1992). Journal of Virology 66, 5030 - 5039.
4. Hudewentz, A., Bornkamm, G.W. and zur Hausen, H. (1980), Virology 100, 175 - 178.