



## Risikobewertung der Empfängerzelllinie DOHH-2

Die Etablierung der humanen Zelllinie DOHH-2 wurde 1990 publiziert. Ein 60 Jahre alter Mann mit folliculärem, centroblastischem und centrolytischem B-Zell-Lymphom wurde 4 Monate erfolgreich mit Chlorambucil behandelt. Nach Umwandlung zum immunoblastischen B-Zell-Lymphom wurden aus dessen Pleuraerguss B-Zellen isoliert und kultiviert, wobei die Zellen nach 2 Wochen spontan proliferierten (1).

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein humanes Gamma-Herpesvirus, mit dem ca. 90 % der Bevölkerung weltweit infiziert sind. Es wird als karzinogenes Agens nach internationaler Klassifikation der WHO eingestuft und mit einer Reihe von Tumoren in Assoziation gebracht. Insbesondere bei effizient ruhenden, nicht proliferierenden B-Zellen konnte beobachtet werden, dass eine latente Infektion zu unbegrenzter Proliferation führt.

Die Zelllinie DOHH-2 bekam von der American Type Culture Collection (ATCC) die *biosafety level 2*-Empfehlung und vom Regierungspräsidium Tübingen, aufgrund mittels PCR nachweisbarer EBV-Sequenzen, in einer Stellungnahme eine Einstufung in die Risikogruppe 2.

Nach Ansicht der DSMZ sollte die Zelllinie in die Risikogruppe 1 zurückgestuft werden, da in den von ihnen vorgelegten Daten keine Hinweise auf aktive EBV-Partikel zu finden sind.

- a. Die Behandlung der DOHH-2 mit dem Phorbolöster TPA, die bei anderen Zelllinien, die latentes EBV enthalten, die Abgabe infektiöser EBV bewirkt, induziert hier weder eine Expression des für den lytischen Zyklus essentiellen Transkriptionsfaktors Zta (auch BZLF1 oder EB1 bezeichnet), noch das Auftreten einer spontanen Zell-Lyse.
- b. In einem speziellen Southern-Blot (Gardella-Gel), welcher episomale und linear vorliegende Virus-DNA auftrennt, konnte in der DOHH-2 Zelllinie keine spezifische EBV-DNA nachgewiesen werden. Die verwendete Sonde entspricht einer Länge von 35 kb des 5'-Bereiches der linearen EBV-Sequenz.
- c. In einer spezifischen PCR mit DOHH-2-DNA wurde eine Sequenz des EB1-Gens (BZLF1) amplifiziert. Im konventionellen Southern-Blot konnte jedoch keine für das Virus kodierende Sequenz identifiziert werden.

### Stellungnahme:

Die **DOHH-2-Zelllinie** ist gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.

### Begründung:

Voraussetzung für die Virusreplikation ist die Transkription des *immediate early*-Gens BZLF1/EB1. Der daraufhin exprimierte Transkriptionsfaktor Zta (BZLF1 oder EB1) interagiert mit dem lytischen Replikationsursprung oriLyt. Somit wird eine Interaktion mit dem viralen DNA-Polymerase-Helikase-Primase-Komplex ermöglicht (4). Die in a. beschriebene Behandlung mit dem Phorbolöster TPA führt zur Aktivierung des BZLF1-Promotors Zp und sollte die Transkription des Zta initiieren. Weder konnte jedoch bei DOHH-2 in einem Westernblot Zta

nachgewiesen werden, noch eine spontane Lyse der Zellen, die mit der Bildung von Virus-Partikeln in Zusammenhang gebracht werden könnte, beobachtet werden. Das in b. beschriebene Gardella-Gel zeigt die Abwesenheit von episomal oder linear vorliegender Virus-DNA. Da mittels PCR jedoch EBV-Sequenzen (BZLF1/ EB1) nachgewiesen wurden, sind diese anscheinend in der chromosomalen Wirts- DNA integriert. Es wurde ein Southern Blot mit verschiedenen, fast das gesamte EBV-Genom umfassenden Sonden durchgeführt. Dabei waren jedoch keine EBV-Sequenzen in der DOHH-2 detektierbar (c).

Die DOHH-2 Zelllinie entspricht somit einer etablierten menschlichen Zelllinie, die zwar Teile eines viralen Genoms enthält, aber keine infektiösen Viruspartikel abgibt.

1. Kluin-Nelemans, H.C., Limpens, J., Meerabux, J., Beverstock, G.C., Jansen, J.H., de Jong, D., Kluin, P.M. (1991) *Leukemia* 5, 221-224.
2. Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der Empfängerzelllinien COS, 293 und Raji vom August 1993, Az.: 6790-10-18
3. Sicherheitseinstufung des Regierungspräsidiums Tübingen vom 18.09.2002, Az.: 817.40-020/UNI.UL.0701-14 und 07.04-5.
4. Speck, S. H., Chatila, T. & Flemington, E. (1997). Reactivation of Epstein–Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol* 5, 399–405.