

## 1. Zusammenfassung

- 1.1 Nr. der Anlage: 10/19  
Nr. der Arbeit: 10/19-1
- 1.2 Projektleiter: Prof. Dr. Christian Freund
- 1.3 Betreiber Freie Universität Berlin
- 1.4 Thema der gentechnischen Arbeit

Transduktion von menschlichen Immunzellen und von primären humanen Zellen mit lentiviralen Konstrukten

### 1.5 Kurzfassung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen stabile Zelllinien generiert werden, die es ermöglichen, bestimmte Komponenten der Aktivierung des T-Zell-Komplexes zu untersuchen.

Dazu werden in dem pLeGO-Vektor jeweils die kodierenden Sequenzen von Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), von Proteinen der Antigenverarbeitung oder von Proteinen der Signaltransduktion kloniert. Durch die anschließende Kotransfektion mit den Plasmiden pMDLg/pRRE, pRSV und pVSV-G in HEK293T-Zellen erfolgt die Verpackung des jeweils im pLeGO-Vektor klonierten Bereichs in lentiviralen Partikeln. Mit diesen Virionen erfolgt die Infektion und Transduktion primärer humaner Zellen und ausgewählter Zelllinien.

### 1.6 Einschätzung der Sicherheitsstufe durch den Antragssteller

Sicherheitsstufe 2

## 2. Bewertung der vorgesehenen Arbeiten

### 2.1 Risikogruppen der Spenderorganismen

gemäß § 5 Absatz 1 i. V. m. Anhang I Nr. 1 GenTSV

#### 2.1.1 Mensch

#### Risikogruppe 1

Gene beteiligt an der Antigenpräsentation und Prozessierung über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) sowie abhängiger Signalkaskaden wie z. B.:

Gene des humanen Leukozytenantigen-Systems:

HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DO

TAP1 Tapasin, Gen eines Transporters der Klasse der ATP-Bindenden Cassette (ABC-Transporter), assoziiert mit der Antigen-Prozessierung

TAPBP/TPSN Gen des TAP-bindenden Proteins (Tapasin), transmembranäres Glycoprotein beteiligt an der Interaktion zwischen TAP-Transporter und MHC (TAP), ERP57

TAPBPR Gen des TAP-bindenden Proteins assoziiertem Glycoprotein, Chaperonefunktion beteiligt an der MHC-Beladung

ADAP Gen der Adhäsion und Degranulation-verstärkendes Adapterprotein, Signaltransduktionsmolekül der T-Zellen

- SKAP* Gen des *small kinetochore-associated protein*, beteiligt an der Zelldifferenzierung
- VAMP* Gen des Vesikel-assoziiertes Membran-Protein, an der Exozytose beteiligt
- LAT* Gen eines Linkerproteins zur Aktivierung von T-Zellen, beteiligt am T-Zellen Antigenrezeptor (TCR) Signaltransduktionsweg

2.1.2 *Aequorea victoria* (pazifische Tiefseequalle)

*Discosoma striata* (Seeanemone) **Risikogruppe 1**

- gfp* Gen für das grünfluoreszierende Protein GFP der Qualle, davon abgeleitet: fluoreszenzveränderte Variante cerulean
- tdTomato* Variante des Gens für das rotfluoreszierende Protein DsRed der Anemone

2.1.3 *E. coli*

**Risikogruppe 1**

- bla* Gen der  $\beta$ -Laktamase, Resistenz gegen Ampicillin

2.1.4 *Aspergillus terreus*

**Risikogruppe 2**

- bsd* Gen der Blastizidin-S-Deaminase, Resistenz gegen Blastizidin

2.1.5 Waldmurmeltier Hepatitis Virus (WHV)

Humanes Cytomegalievirus (hCMV)

Poliovirus (außer Serotyp 2)

*Indiana Vesiculovirus* (VSIV)

*Spleen focus-forming virus* (SFFV)

**Risikogruppe 2**

in lentiviralen Vektoren vorliegend:

*WPRE* Posttranskriptionales Regulationselement des WHV

Promotor und Enhancer des CMV

Sequenz der internen ribosomalen Eintrittsstelle des Poliovirus

*vsv-G* Gen für das Env-Glykoprotein des VSIV

*SFFV* U3-Region des LTR mit Promotorfunktion des SFFV

2.1.6 Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)

**Risikogruppe 3\*\***

in lentiviralen Vektoren enthalten subgenomische Sequenzen unter anderem für *gag*, *pol*, *rev*, LTR, *cPPT*, *RRE*,  $\Psi$

2.2 **Risikogruppen der Empfängerorganismen**

gemäß § 5 Absatz 1 i. V. m. Anhang I Nr. 1 GentSV

2.2.1 humane embryonale Nierenzellen der Linie HEK293T

HEK293 Zelle, die ein temperatursensitives SV40-T-Antigen exprimiert

**Risikogruppe 1**

Zur Transformation mit den Vektoren:

**pLeGO-1xT/BSD**

lentiviraler shRNA Expressionsvektor:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); Promoter des CMV; 5'-LTR, Verpackungssignal  $\Psi$ , Rev responsables Element (*RRE*) und zentraler Polypurintrakt (*cPPT*) aus HIV-1; humaner U6 Promoter, Polylinker zur

Integration einer shRNA-Sequenz; U3-Region des 3'LTR mit Promotorfunktion des Spleen focus-forming virus (SFFV); Polylinker; Fusionskonstrukt bestehend aus der Sequenz für tdTomato und *bsd*; WPRE; 3'-LTR mit Deletion in der U3 Region (selbstinaktivierender Vektor)]

#### **pLeGO-iCer**

selbstinaktivierender lentiviraler shRNA und Transgen-Expressionsvektor:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); Promoter des CMV; 5'-LTR, Verpackungssignal  $\Psi$ , Rev responsables Element (*RRE*) und zentraler Polypurintrakt (*cPPT*) aus HIV-1; humaner U6 Promoter, Polylinker zur Integration einer shRNA-Sequenz; U3-Region des 3'LTR mit Promotorfunktion des Spleen focus-forming virus (SFFV); Polylinker; IRES; Sequenz des Fluoreszenzproteins Cerulean; WPRE; 3'-LTR mit Deletion in der U3 Region]

#### **pLeGO-iCer2**

selbstinaktivierender lentiviraler Expressionsvektor:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); Promoter des CMV; 5'-LTR, Verpackungssignal  $\Psi$ , Rev responsables Element (*RRE*) und zentraler Polypurintrakt (*cPPT*) aus HIV-1; U3-Region des 3'LTR mit Promotorfunktion des Spleen focus-forming virus (SFFV); Polylinker; IRES; eCFG Variante Cerulean; WPRE; 3'-LTR mit Deletion in der U3 Region]

#### **pLeGO-iC2**

selbstinaktivierender lentiviraler Expressionsvektor:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); Promoter des CMV; 5'-LTR, Verpackungssignal  $\Psi$ , Rev responsables Element (*RRE*) und zentraler Polypurintrakt (*cPPT*) aus HIV-1; U3-Region des 3'LTR mit Promotorfunktion des Spleen focus-forming virus (SFFV); Polylinker; IRES; mCherry; WPRE; 3'-LTR mit Deletion in der U3 Region]

Verpackungsvektoren:

#### **pMDLg/pRRE**

lentivirales *gag/pol*-Verpackungsplasmid:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); CAG-Hybridpromotor (CMV-Enhancer,  $\beta$ -Aktin-Transkriptionsstart des Huhns und  $\beta$ -Globin-Intron des Kaninchens); Gene *gag* und *pol* mit *cPPT* sowie *RRE* von HIV-1]

#### **pRSV-Rev**

lentivirales *rev*-Helferplasmid:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); *rev* von HIV-1 unter Kontrolle des RSV-Promotors]

#### **pCMV-VSV-G**

*env*-Plasmid für die pseudotypische Verpackung:

[pUC-Derivat (*ori*, *bla*); *f1*-Origin; hCMV-vorfrüher Promotor mit CMV-Enhancer; Gen des Glycoprotein G des VSIV (VSV-G); *poly(A)*-Signal des  $\beta$ -Globingens des Kaninchens]

### 2.2.2 primäre humane Zellen („ungeprüft“)

#### **Risikogruppe 2**

zur Transduktion mit rekombinanten replikationsdefekten lentiviralen Partikeln

### 2.2.3 primäre humane Zellen („geprüft“)

gewonnen von gesunden Spendern, die klinisch unauffällig waren und bei denen die Seronegativität für HIV, HBV und HCV nachgewiesen ist oder bei denen durch andere Verfahren gezeigt ist, dass die Zellen frei von diesen Viren sind

#### **Risikogruppe 1**

zur Transduktion mit rekombinanten replikationsdefekten lentiviralen Partikeln

### 2.2.4 etablierte humane Zelllinien der Risikogruppe 1

Zelllinien wie z. B.:

NF- $\kappa$ B/Jurkat/GFP

humane T-Zelllinie mit vier retroviral integrierten Kopien des NF- $\kappa$ B Gens unter der Kontrolle des minimalen Cytomegalovirus (mhCMV)-Promotors und des copGFP-Reportergens

K-562 Zelllinie abgeleitet aus einem humanen Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie

THP-1 Zelllinie isoliert aus einem humanen Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie

Jurkat E6-1 humane T-Zelllinie

#### **Risikogruppe 1**

zur Transduktion mit rekombinanten replikationsdefekten lentiviralen Partikeln

### 2.2.5 etablierte humane Zelllinien der Risikogruppe 2

B-LCL Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte B-Lymphoblastoide Zelllinie

T2 (174 x CEM.T2)

Humane CD4 positive T-Zell/B-Zell Hybridzelllinie, entstanden durch PEG-Fusion von 721.174 und CEM.3 Zellen, enthält EBV-Genome

#### **Risikogruppe 2**

zur Transduktion mit rekombinanten replikationsdefekten lentiviralen Partikeln

## **2.3 Risikogruppen der gentechnisch veränderten Organismen (GVO)**

gemäß § 5 i. V. m. Anhang I Nr. 2 GentSV

### 2.3.1 HEK293T Zellen

mit einem jeweils einem der unter 2.2.1 beschriebenen rekombinanten lentiviralen Transfervektoren pLeGO-1xT/BSD, pLeGO-iCer, pLeGO-iCer2 oder pLeGO-iC2 in die jeweils ein Gen gemäß 2.1.1 und/oder für eine shRNA-Nukleinsäuresequenz gegen eines der Gene eingefügt worden ist, sowie kotransfiziert mit den Helfer- und Verpackungsplasmiden pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pCMV-VSV-G

#### **Risikogruppe 2**

### 2.3.2 rekombinante replikationsdefekte pseudotypisierte lentivirale Partikel aus den Verpackungsansätzen zu 2.3.1

#### **Risikogruppe 2**

**Begründung:**

Zu 2.3.1 und 2.3.2

In eine etablierte Zelllinie der Risikogruppe 1 werden von HIV (Risikogruppe 3\*\*) abgeleitete Transfervektoren gemeinsam mit weiteren Helferplasmiden eingeführt und aufgrund der Helferfunktion als virale Genome repliziert. Es kommt zur Bildung und Freisetzung von rekombinanten, infektiösen, replikationsdefekten lentiviralen Partikeln. Diese sind VSV-G pseudotypisiert und u. a. für menschliche Zellen infektiös. Von der Entstehung replikationskompetenter lentiviraler Viren durch homologe Rekombination ist nicht auszugehen.

Die gebildeten Viren können sich aufgrund des Replikationsdefekts ohne Helferfunktion nicht weiter vermehren, jedoch nach Integration der lentiviralen DNA in das Genom der infizierten Zelle zur einer Inaktivierung oder über die LTR zu einer Aktivierung zellulärer Gene (z. B. für Tumorsuppressoren oder für Onkogene) führen.

Die von den Viren zusätzlich übertragenen Nukleinsäureabschnitte aus Spendern der Risikogruppe 1 und 2 sind ausreichend charakterisiert und ohne Gefährdungspotential.

Die Viren sind der Risikogruppe 2 zuzuordnen, ebenso die virusproduzierenden Verpackungszellen.

2.3.3 primäre humane Zellen gemäß 2.2.2. oder etablierte humane Zelllinien gemäß 2.2.5

in Verbindung mit den rekombinanten, replikationsinkompetenten lentiviralen Partikeln gemäß 2.3.2

**Risikogruppe 2**

**Begründung:**

Humane Zellen (Empfänger der Risikogruppe 2) werden mit rekombinanten, replikationsdefekten HIV-abgeleiteten pseudotypischen Partikeln infiziert. Der Replikationsdefekt wird nicht kompensiert. Es kommt zu einer stabilen Integration der lentiviralen DNA ins Genom der Wirtszellen, die aber nicht zu einer weiteren Erhöhung des Gefährdungspotentials führt.

Das Risikopotential der gentechnisch veränderten Organismen wird sowohl durch das Vorhandensein infektiöser Viruspartikel als auch durch das Risikopotential der Empfängerzellen bestimmt.

2.3.4 primäre humane Zellen oder etablierte humane Zelllinien

Zellen gemäß 2.2.3 von gesunden Spendern und geprüft auf HBV-, HCV-, HIV- oder

etablierte humane Zelllinien der Risikogruppe 1 gemäß 2.2.4

in Verbindung mit den lentiviralen Partikeln gemäß 2.3.2

**Risikogruppe 2**

sofern die Zellen nachweislich frei von rekombinanten Viruspartikeln sind

**Risikogruppe 1**

**Begründung:**

Humane Zellen der (Empfänger der Risikogruppe 1) werden mit rekombinanten, replikationsdefekten HIV-abgeleiteten pseudotypischen Partikeln infiziert. Der Replikationsdefekt wird nicht kompensiert. Es kommt zu einer stabilen Integration der lentiviralen DNA ins Genom der Wirtszellen, die aber nicht zu einer weiteren Erhöhung des Gefährdungspotentials führt.

Das Risikopotential der gentechnisch veränderten Organismen wird allein durch das Vorhandensein infektiöser Viruspartikel bestimmt.

## **2.4 Einstufung der gentechnischen Arbeit**

gemäß § 7 Absatz 3 GenTSV (Laborbereich)

### 2.4.1 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.1

**Sicherheitsstufe 2**

#### **Begründung:**

Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 1, Spender sind Organismen der Risikogruppen 1, 2 und 3\*\*.

Die GVO (transfizierte Zelllinie) geben gentechnisch veränderte Organismen (replikationsdefiziente Pseudotypviren) der Risikogruppe 2 ab.

Die Vektoren und die aus den Spenderorganismen überführten Nucleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die gentechnisch veränderten Organismen nach einer vorläufigen Risikobewertung gemäß § 5 Absatz 1 Satz 2 i. Verb. m. § 7 Absatz 3 GenTSV nicht das Gefährdungspotential von Organismen der Risikogruppe 2 überschreiten und keine gentechnisch veränderten Organismen einer höheren Risikogruppe abgeben.

### 2.4.2 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.2

**Sicherheitsstufe 2**

#### **Begründung:**

Die GVO sind rekombinante Viren der Risikogruppe 2.

### 2.4.3 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.3

**Sicherheitsstufe 2**

#### **Begründung:**

Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 2, Spender sind Organismen der Risikogruppe 1, 2 und 3\*\*.

Die gentechnisch veränderten Organismen (virusinfizierte Zellen) überschreiten gemäß einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 GenTSV nicht das Gefährdungspotential von Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine gentechnisch veränderten Organismen einer höheren Risikogruppe ab.

### 2.4.4 Arbeiten mit GVO gemäß 2.3.4

**Sicherheitsstufe 2**

sofern diese Zellen nachweislich frei von rekombinanten Viruspartikeln sind

**Sicherheitsstufe 1**

**Begründung:**

Empfänger sind Organismen der Risikogruppe 1, Spender sind Organismen der Risikogruppe 1, 2 und 3\*\*.

Die gentechnisch veränderten Organismen (virusinfizierte Zellen) überschreiten gemäß einer vorläufigen Risikobewertung nach § 5 GenTSV nicht das Gefährdungspotential von Organismen der Risikogruppe 2 und geben keine gentechnisch veränderten Organismen einer höheren Risikogruppe ab.

Diese Zellen können der Risikogruppe 1 zugeordnet werden, sobald sichergestellt ist, dass keine rekombinanten Viruspartikel mehr abgegeben werden.

**2.5 Sicherheitsmaßnahmen**

gemäß Anhang III Teil A GenTSV (Laborbereich)

<b>Zu 2.4.1</b>	<b>Stufe 2</b>
<b>Zu 2.4.2</b>	<b>Stufe 2</b>
<b>Zu 2.4.3</b>	<b>Stufe 2</b>
<b>Zu 2.4.4</b>	<b>Stufe 2/1</b>

Weitere Maßnahmen: keine weiteren

**Auf folgende Stellungnahmen der ZKBS wird verwiesen:**

- Stabile und transiente Genexpression mithilfe  $\gamma$ -retroviraler und lentiviraler Vektoren;  
Az. 6790-10-41, aktualisierte Version vom November 2018
- Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten;  
Az. 6790-10-03 Aktualisierung vom Dezember 2009 Stand Mai 2010

Die allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS können unter der Internetadresse **[www.zkbs-online.de](http://www.zkbs-online.de)** abgerufen werden.

Berlin, den 01.04.2019

