



## Stellungnahme der ZKBS zur Neueinstufung der Zelllinie Hep3B gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV

### Allgemeines

Die Zelllinie Hep3B wurde 1976 aus einer Lebertumor-Biopsie eines acht-jährigen Jungen mit hepatozellulärem Karzinom etabliert [1]. Bisher wurde die Zelllinie als Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten, aufgrund von Daten, die auf eine Integration von 1 - 2 Kopien des *Hepatitis B virus* (HBV)-Genoms im Genom dieser Zellen hinweisen, der Risikogruppe 2 zugeordnet [2, 3]. Zudem ist gezeigt, dass die Zelllinie das Haupt-Hüllprotein HBsAg in den Zellkulturüberstand abgibt [1]. Aufgrund von Behördenanfragen sieht sich die ZKBS nun veranlasst, die Literatur dahingehend zu überprüfen, ob von der Zelllinie infektiöse HBV-Partikel abgegeben werden können.

Su et al. 1998 [5] charakterisierten die HBV-DNA-Integrationen im Genom der Hep3B Zelllinie genauer. Die Ergebnisse weisen auf zwei Integrationen hin, wobei eine der Integrationen detailliert untersucht werden konnte. Es handelt sich dabei um ein 2,3 kb HBV-DNA-Fragment. Durch eine mit der Integration verbundene Chromosomen-Translokation flankiert das HBV-DNA-Fragment Sequenzen der Chromosomen 13 und 4. Der ORF eines der Oberflächen-Antigene ist dabei intakt. Der aktive preS2/S-Promotor ermöglicht die Expression des Haupt-Oberflächenantigens HBsAg. Da das Start-codon zur Transkription des mittleren Oberflächen-Antigens verändert vorliegt, ist keine Expression dieses Proteins möglich. *Upstream* des preS2/S sind die kodierenden Regionen der preC- und C-ORFs sowie des preS1-ORF verkürzt enthalten. Eine spezifische RNA für die Expression eines verkürzten HBcAg ist jedoch im *Northern Blot* nicht nachweisbar [5]. Ebenso wenig konnte die konservierte Region einer HBcAg-kodierenden DNA in einem *Southern Blot* nachgewiesen werden [6]. *Downstream* der preS2/S-Region sind Nukleotidsequenzen der X-Region vorhanden, jedoch unvollständig. Obwohl der Promotorbereich intakt ist, lässt sich im *Northern Blot* keine X-spezifische RNA nachweisen.

Auch bei der zweiten Integration eines HBV-DNA-Fragmentes muss es sich um ein defektes Genom handeln, da mithilfe von *Southern Blot*-Experimenten zwar HBsAg kodierende Nukleotidsequenzen nachgewiesen werden konnten, konservierte Nukleotidsequenzen des C-ORFs jedoch nicht [6].

### Bewertung

Die Zelllinie Hep3B wird gemäß § 5 Abs. 1 i.V.m. Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

### Begründung

Bei der Zelllinie Hep3B handelt es sich um eine etablierte humane Zelllinie, die zwar Teile eines viralen Genoms enthält, jedoch keine infektiösen Viruspartikel abgibt. Die Zelllinie exprimiert nur das Haupt-Oberflächenprotein HBsAg. Aufgrund der Integration defekter Genom-Fragmente können von der Zelle weder das HBcAg, das HBeAg, eine intakte

reverse Transkriptase, noch ein vollständiges X-Protein exprimiert werden. Das HBsAg zeigt eine immunogene Wirkung und wird als Bestandteil von Impfstoffen verwendet. Von dem durch die Zelllinie abgegebenen Protein geht keine Gefahr für Personal und Umwelt aus.

## Literatur

- [1] Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I and Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nat* 282: 615-616.
- [2] Twist EM, Clark HF, Aden D, Knowles BB and Plotkin SA (1981) Integration pattern of Hepatitis B Virus DNA Sequences in Human Hepatoma Cell Lines. *J Virol* 37 (1): 239-243.
- [3] Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung des Hepatitis B Virus des Menschen (HBV) als Spender- oder Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 Gentechnik-Sicherheitsverordnung (Az. 6790-10-39a, März 2009)
- [4] Bova R, Micheli MR, Nardiello S (1991) Molecular biology of hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus association. *Int J Clin Lab Res* 21: 190-198.
- [5] Su TS, Hwang WL, Yauk YK (1998) Characterization of hepatitis B virus integrant that results in chromosomal rearrangement. *DNA and Cell Biol* 17 (5): 415-425.
- [6] Uphoff CC, Denkmann SA, Steube KG, Drexler HG (2010) Detection of RBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II and SMRV in human and other primate cell lines. *J Biomed Biotech* 2010: 1-23; Article ID 904767.