

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)

**Nachweis lentiviraler Sequenzen in viralen Vektorpartikeln,
transduzierten Zelllinien und Vektorplasmiden
- Untersuchungsablauf - AM31**

Erstellt vom Ausschuss Methodenentwicklung der LAG

V01: verabschiedet Juni 2020

1	Tabellenverzeichnis	2
2	Abbildungsverzeichnis	2
3	Zweck und Anwendungsbereich	3
3.1	Untersuchungsmatrizes	3
3.2	Hinweise zur Risikobewertung	5
4	Begriffe	5
5	Kurzbeschreibung (für replikationsdefekte lentivirale Vektorpartikel).....	7
6	Geräte und Materialien	8
7	Probenahme	8
8	Probenvorbereitung	8
9	Durchführung (RT-)PCR-Analytik.....	8
10	Auswertung.....	9
10.1	Ergebnisse für die Untersuchung von Vektorplasmiden	10
10.2	Ergebnisse für die Untersuchung lentiviraler Vektorpartikel in Zellkultur- überständen.....	12
10.3	Ergebnisse für die Untersuchung lentiviral transduzierter Zelllinien.....	12
10.4	Ergebnisse für die Untersuchung von Wischproben.....	13
10.5	Zusammenfassende Bewertung	14
11	Qualitätssicherung	15
12	Laborvergleichsuntersuchung (LVU).....	15
12.1	Beschreibung der LVU-Proben	15
12.2	Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung	17
12.2.1	Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ mittels (RT)-Real-time PCR	18
12.2.2	Konventionelle (RT)-PCR-Nachweise zum Nachweis viraler Sequenzen.....	19
12.2.3	Fazit zur LVU.....	21
13	Literatur	21
Anhang A1:	Nachweisverfahren	23
A1.1.	Chemikalien und Reagenzien	23
A1.2.	Kontrollen	24
A1.3.	Reaktionsansätze für konventionelle PCR bzw. RT-PCR-Analysen	24
A1.4.	Temperatur-Zeit-Programme für konventionelle PCR und RT-PCR	26
A1.5.	Reaktionsansätze für Real-time PCR bzw. (RT)-Real-time PCR.....	27

A1.6. Temperatur-Zeit-Programme für Real-time PCR und (RT)-Real-time PCR	27
A1.7. Leistungsmerkmale der Methoden	28
A1.8. Nachweisgrenze	28
A1.9. Theoretische Spezifität	28
A1.10. Praktische Spezifität	28
Anhang A2: Detaillierte Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung	30
Anhang A3: Morphologie und Genomstruktur HIV-1	37

1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: (RT)- Real-time PCR-Ergebnisse der LVU-Teilnehmer (Labor 2 und 3) zum Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ für die drei Probensets	16
Tabelle 2: Zu erwartende (RT)-PCR-Ergebnisse zum Nachweis der verschiedenen viralen Elemente für die drei Probensets	17
Tabelle 3: Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse	18
Tabelle 4: Oligonukleotide	23
Tabelle 5: Reaktionsansatz PCR	25
Tabelle 6: Reaktionsansatz QIAGEN® One Step RT-Kit	25
Tabelle 7: Reaktionsansatz GoTaq® Long PCR Master Mix	25
Tabelle 8: Temperatur-Zeit-Programm für konventionelle PCR	26
Tabelle 9: Temperatur-Zeit-Programm für konventionelle RT (Reverse Transkriptase) - PCR	26
Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Programme für konventionelle GoTaq® Long PCR	26
Tabelle 11: Reaktionsansatz für Real-time PCR und (RT)- Real-time-PCR	27
Tabelle 12: Temperatur-Zeit-Programm für die (RT)-Real-time-PCR	27
Tabelle 13: Temperatur-Zeit-Programm für die Real-time PCR	27
Tabelle 14: Nachweisgrenzen der verschiedenen PCR-Nachweise	28
Tabelle 15: Überprüfung der Spezifität der Lentivirus-Nachweise an verschiedenen Matrizes (Ergebnisse aus Einzellaborvalidierung)	29
Tabelle 16: Zusammenstellung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung für alle (RT)-PCR-Nachweisverfahren und die drei Probensets für alle teilnehmenden Labore	30

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Produktion von replikationsdefekten, lentiviralen Vektorpartikeln und Transduktion der Zielzellen	4
Abbildung 2: Position der Primerbindungsstellen verschiedener Nachweissysteme in der HIV-1 Sequenz	9
Abbildung 3: Entscheidungsbaum für die Untersuchung von Vektorplasmiden	11
Abbildung 4: Entscheidungsbaum für die Untersuchung lentiviral transduzierter Zelllinien oder von Zellkulturüberständen mit lentiviralen Vektorpartikeln	13
Abbildung 5: Entscheidungsbaum für die Untersuchung von Wischproben	14
Abbildung 6 :Morphologie und Genomstruktur von HIV-1	37

3 Zweck und Anwendungsbereich

Der vorliegende Leitfaden beschreibt Prüfabläufe und mögliche Ergebnisse bei der molekularbiologischen Untersuchung von lentiviralen Proben.

In häufig verwendeten HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektorsystemen wurden ab der 2. Generation die für die Herstellung lentiviraler Vektorpartikel erforderlichen viralen Gensequenzen auf ein notwendiges Minimum reduziert. Um die Gefahr von homologer Rekombination und möglicher HIV-1 - Virusrekonstitution zu minimieren, wurden diese Elemente außerdem auf mindestens drei Vektoren verteilt.

Aufgrund des kompakten Genomaufbaus von Lentiviren weisen Verpackungsplasmide jedoch homologe Bereiche zum Transferplasmid auf.

Das Verpackungssignal Ψ (Packaging Signal Sequence) überlappt im Transferplasmid mindestens 40 bp, häufig aber bis zu 300 bp, in den N-Terminus des *gag*-Gens des entsprechenden Verpackungsplasmids (1); weiterhin liegt zur Steigerung der Transduktionseffizienz oft die von HIV-1-pol abgeleitete etwa 130 bp cPPT (Central polypurine tract) Region vor sowie bis zu 850 bp des RRE (Rev-responsive element) aus HIV-1-env (Envelope). Je nach verwendetem Vektorsystem sind die Überschneidungen unterschiedlich lang (minimal 40 bp bis maximal 1380 bp) (1).

Eine homologe Rekombination zwischen Transferplasmid und entsprechendem Verpackungsplasmid ist damit nicht auszuschließen. Die vollständige Rekonstitution eines lentiviralen Produktionssystems hin zu einem Wildtyp-Virus wurde bisher noch nicht beschrieben (1, 2). Sie wird als wenig wahrscheinlich angesehen, da aufgrund der mindestens drei unterschiedlichen Plasmide mindestens zwei Rekombinationsereignisse stattfinden müssten und den lentiviralen Produktionssystemen außerdem auch das Gen für das HIV-1-eigene Hüllprotein (*env*) fehlt.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von reverse Genetik-Systemen zur Rekonstitution von rekombinantem HIV-1 (z.B. pNL4-3 Plasmide) oder von Wildtyp HIV-1 (z.B. in etablierten Zelllinien bzw. Primärzellen von Patienten) kann aber eine direkte Laborinfektion oder auch die Entstehung replikationskompetenter HIV-1 Viruspartikel nach Rekombinationsereignissen nicht ausgeschlossen werden (3-5).

Im Rahmen der Überprüfung von lentiviralen Arbeiten kann es daher sinnvoll sein, einige Matrizes auf die An- / bzw. Abwesenheit bestimmter viraler Sequenzen zu untersuchen.

Hinweis: Die derzeit nicht weit verbreiteten lentiviralen Systeme, basierend auf anderen Lentiviren außer HIV-1, oder lentivirale Hybrid-Systeme werden in diesem Dokument nicht betrachtet. Für eine detaillierte Beschreibung lentiviraler Vektoren und der Genomstruktur von HIV-1 wird auf (6) und Abbildung 6 verwiesen.

3.1 Untersuchungsmatrizes

Untersuchungsmatrizes im Rahmen der Überwachung können vektorpartikelhaltige Zellkulturüberstände (siehe Kapitel 4 Begriffe) oder lentiviral transduzierte Zielzelllinien sein. Weiterhin können auch Wischproben, z.B. bei der Überprüfung der Sicherheitsmaßnahmen / des Hygienestatus der gentechnischen Anlage entnommen oder die verwendeten lentiviralen Plasmide auf Identität getestet werden.

Zur Herstellung von gentechnisch veränderten lentiviralen Vektorpartikeln werden die Verpackungsplasmide und das Vektorplasmid (Transferplasmid) zunächst transient in geeignete Produktionszellen transfiziert. Diese produzieren rekombinante replikationsdefekte lentivirale Vektorpartikel, die mindestens das mit LTR - Ψ (LTR, Long terminal repeats) und RRE flankierte Transgen tragen und geeignete Zielzellen transduzieren können (s. schematische Abbildung1).

Es wird in der Theorie davon ausgegangen, dass in den Vektorpartikeln lediglich die für die gentechnische Veränderung in den Zielzellen erforderlichen Sequenzen [insbesondere LTR- Ψ , RRE, ggf. tat (Trans-Activator of Transcription) sowie das jeweilige Transgen] vorliegen und keine Verpackungsgene (insbesondere HIV-1-gag, -pol, -env bzw. VSV-G) mit übertragen werden.

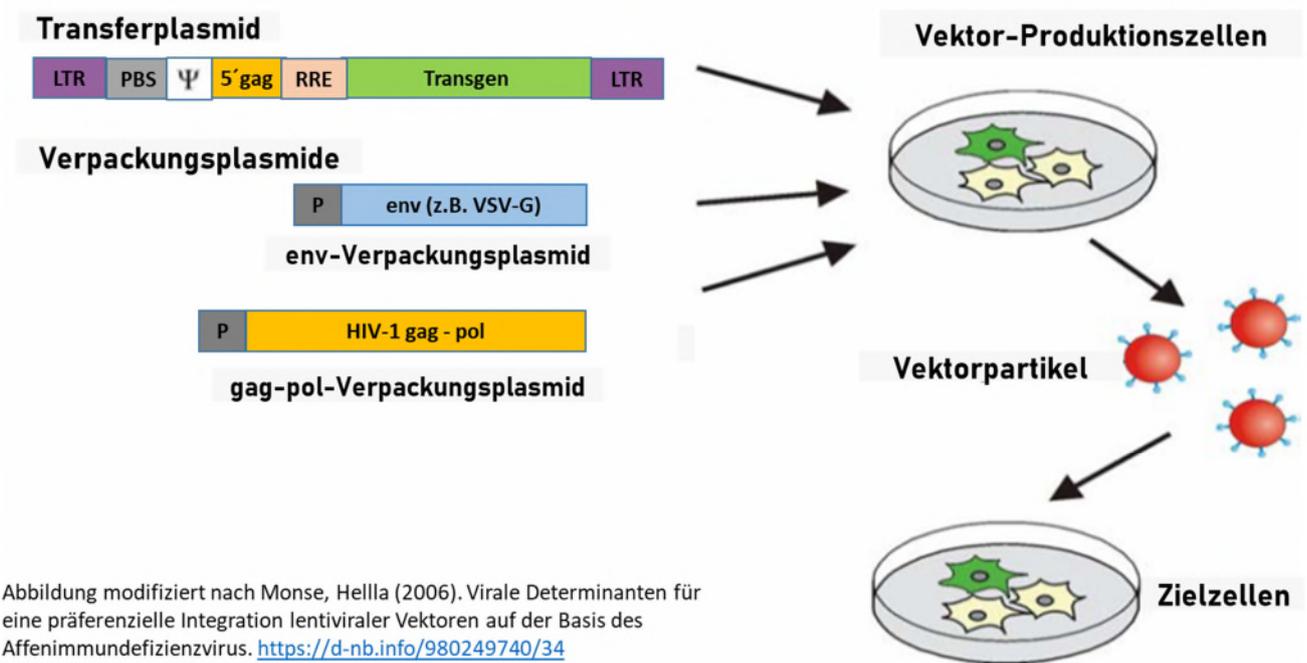


Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Produktion von replikationsdefekten, lentiviralen Vektorpartikeln und Transduktion der Zielzellen

LTR	long terminal repeats	pol	reverse Transkriptase und Integrase
PBS	primer binding site; Bindestelle für tRNA-Primer	env	(pseudotypisierendes) Hüllprotein (z.B. VSV-G)
Ψ	Verpackungssignal	RRE	rev-responsive element
gag	gruppenspezifisches Antigen (Kapsid)	VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein
		P	(Heterologer) Promotor

Die molekularbiologische Untersuchung von vektorpartikelhaltigen Zellkulturüberständen zeigt, dass neben DNA aus den Helferplasmiden häufig noch lentivirale RNA-Sequenzen für z.B. HIV-1-gag, HIV-1-pol oder VSV-G aus den Produktionszellen nachweisbar sind. Auch in lentiviral transduzierten Zellkulturen lassen sich diese Sequenzen in den ersten Passagen teilweise noch nachweisen. Ursache dafür ist vermutlich die Anwesenheit von freier lentiviraler RNA aus den Produktionszellen bzw. von verpackter Strukturgen- oder Helfer-RNA, die zu einem geringen Prozentsatz beim „Budding“-Prozess (Virusreifung und Ausschleusung, Knospung) in die lentiviralen Vektorpartikel verpackt werden oder auch außerhalb der viralen Partikel vorliegen kann (s. auch (7-9)). Vektorpartikelhaltige

Zellkulturüberstände können außerdem abgelöste oder lysierte Zellen enthalten, aus denen ggf. virale Nukleinsäuren (DNA und RNA) nachgewiesen werden kann.

In den Produktionszellen kann es aufgrund homologer Bereiche der DNA-Sequenzen von *gag* und *pol* bereits zur Rekombination zwischen den transfizierten Transfer- und *gag-pol*-Verpackungsplasmiden kommen.

Im vorliegenden Dokument sind die Untersuchungsabläufe für verschiedene Matrizes detailliert beschrieben und im Anhang sensitive (RT-)PCR-Verfahren zum Nachweis (lenti)viraler Sequenzen zusammengestellt. Weiterhin sind die bei unterschiedlichen Matrizes zu erwartenden Ergebnisse mit entsprechenden Entscheidungsbäumen für eine ggf. ergänzende Analytik dargestellt.

3.2 Hinweise zur Risikobewertung

Bei der Rückstufung lentiviral transduzierter Zelllinien in die Risikogruppe 1 ist die Abwesenheit infektiöser amphotroper Vektorpartikel (= Risikogruppe 2) im Überstand der transduzierten Zellen sicher zu stellen.

Teilweise wird von den zuständigen Behörden dazu gefordert, dass die Betreiber die Durchführung eines p24-Antigen-ELISA oder eines Infektionsassays veranlassen. Die in diesem Dokument dargestellten sensitiven (RT-)PCR-Verfahren sind für die Labore der Gentechniküberwachung, aber bei Bedarf auch für die Betreiber, hilfreiche und schnelle alternative Analysenmethoden.

Im Rahmen der analytischen Überwachung können lentivirale Vektorplasmide, lentivirale Vektorpartikel oder lentiviral transduzierte Zielzelllinien untersucht werden. Für die Rückstufung lentiviral transduzierter Zelllinien ist insbesondere die Untersuchung der transduzierten Zelllinien maßgeblich. Die Kenntnis über die erfolgte Passagenzahl (nach der Transduktion mit den lentiviralen Vektorpartikeln) ist dabei wichtig, da durch Waschen und mehrfaches (mindestens zweifaches) Passagieren der Zelllinien kontaminierende Virussequenzen ausverdünnt werden können (10).

Hinweis: Eine pauschale Festlegung der Passagenzahl, nach der rückgestuft werden kann, ist nicht möglich. Die Dauer des Nachweises der lentiviralen Vektorpartikel und/ oder Virussequenzen ist vielmehr abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. dem eingesetzten Virustiter, der verwendeten Zielzelllinie (10) sowie der Beschaffenheit der lentiviralen Vektorpartikel.

4 Begriffe

Es gelten die in der amtlichen Methode G 00.00–2 (11) aufgeführten Begriffe und Definitionen. Spezifische Begriffe zu Lentiviren und viralen Vektorsystemen sind nachfolgend (alphabetisch aufgelistet) definiert (nach (6) und <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie>).

- **Budding Prozess: budding** [von engl. bud = knospen], *Sprossung, Knospung*, Teil der Virusreifung und des Ausschleusungsprozesses von Viren, die mit einer Hülle (Virus-hülle) umgeben sind (z. B. Retroviren). Beim Budding lagern sich die neugebildeten Nukleocapside des Virus an Stellen der Zell-Membran an, in die die virusspezifischen Hüllproteine eingelagert sind. Durch knospenartige Ausstülpung dieser Membranbereiche und anschließende Abschnürung von der zellulären Membran werden die Nukleocapside von einer Membranhülle umgeben und die reifen, infektiösen Virus- bzw. Vektorpartikel freigesetzt.

- **Lentiviren:**

Lentiviren sind behüllte RNA-Viren, (ss(+) RNA) und bilden eine Gattung innerhalb der Familie der Retroviren. Sie können im Gegensatz zu den anderen Retroviren auch nicht teilungsaktive, eukaryotische Zellen infizieren. Bekanntester Vertreter der Lentiviren ist das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), (Morphologie und Genomstruktur s. Kapitel Anhang A3:).

Das Genom replikationskompetenter Retroviren ist zwischen 7000 und 12000 Nukleotide lang und besteht aus zwei identischen einzelsträngigen und linearen RNA-Molekülen mit Plusstrang-Polarität, die eine Cap-Struktur (Capping) am 5'-Ende und eine Polyadenylsäuresequenz am 3'-Ende tragen.

Alle replikationskompetenten Retroviren haben Leserahmen für die Strukturproteine (Gag) die Replikationsenzyme (Pol) und die Glykoproteine (Env). Komplexe Retroviren, wie z.B. HIV-1, verfügen darüber hinaus über weitere offene Leserahmen. Diese kodieren für regulatorische Proteine, welche von mehrfach gespleißten RNAs translatiert werden.

In den meisten Fällen gibt es nur ein Primärtranskript, welches als genomische RNA und mRNA für die viralen Gag- und Pol-Proteine dient. Die viralen Glykoproteine werden dagegen von einer gespleißten mRNA synthetisiert und das Intron, welches herausgespleißt wird, entspricht den für Gag / Pol-kodierenden Sequenzen. Gag und Pol werden als Polyproteine an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und zum Ort des Capsid-Assembly transportiert. Dabei werden in der Regel nur solche RNAs verpackt, die das Verpackungssignal ψ tragen.

- **Lentivirale Vektorpartikel:**

Lentivirale Vektorpartikel sind infektiöse replikationsdefekte Viruspartikel und gentechnisch veränderte Organismen (GVO). Diese von Lentiviren abgeleiteten Virus-ähnlichen Vektorpartikel infizieren eine Zielzelle und übertragen dabei einen Nukleinsäureabschnitt für ein Zielgen (Transgen). Der übertragene Nukleinsäureabschnitt wird anschließend in das Zellgenom der Zielzelle integriert; man spricht dann von einem Provirus bzw. proviralen Vektor.

- **mRNA bei Lentiviren:**

Lentiviren produzieren durch alternatives Spleißen sehr viele verschiedene mRNAs, im Fall von HIV sind es mehr als 20. Sie können dadurch mindestens zehn verschiedene Proteine produzieren. Das lentivirale Genom weist eine sehr starke Kondensation auf, die offenen Leserahmen von tat, rev und env überschneiden sich.

- **Pseudotypisierung:**

Als Pseudotypisierung (engl. pseudotyping) wird der Austausch der viralen Hüllproteine bei der Erzeugung von viralen Vektorpartikeln bezeichnet. Dadurch entstehen Pseudotyp-Vektorpartikel. Die Hüllproteine des Virus werden dabei durch artfremde virale Hüllproteine ersetzt. Auf diese Weise können verschiedene Veränderungen des viralen Vektorpartikels erzeugt werden, die unter anderem eine Veränderung des Tropismus gegenüber den Wirtszellen oder eine erhöhte Stabilität des Vektorpartikels bewirken. Ein häufig verwendetes Hüllprotein ist das Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), abgekürzt VSV-G. Dieses Hüllprotein ermöglicht eine Transduktion nahezu aller Zellspezies bzw. -typen.

- **Transferplasmid:**

pBR-abgeleitetes Plasmid mit einem oder mehreren Fremdgenen sowie nicht-kodierenden Nukleinsäureabschnitten eines oder mehrerer Lentiviren.

Die nicht-kodierenden Nukleinsäureabschnitte umfassen den 5'- und 3'-LTR, das Verpackungssignal Ψ (ggf. einschließlich eines mindestens 40 bp bis maximal 300 bp überlappenden Abschnitts von gag), den PPT sowie ggf. das lentivirale RRE (einschließlich eines überlappenden Abschnitts von env) und / oder das lentivirale cPPT/cTS (einschließlich eines überlappenden Abschnitts von pol); ggf. sind weitere virale oder zelluläre Nukleinsäureabschnitte

zur Expressionsregulierung oder -steigerung (z.B. USE, IRES, 2A-Peptid-Sequenz, micro RNA-Zielsequenzen) enthalten; kodierende Nukleinsäureabschnitte, die für ein vollständiges lentivirales Protein kodieren, sind nicht enthalten.

- **Verpackungsplasmide:**

pBR-abgeleitete Plasmide, welche die auf mindestens zwei verschiedenen Plasmiden (env-Verpackungsplasmid bzw. gag-pol Verpackungsplasmid) positionierten Struktur- und Replikationsproteine, die zur Produktion der lentiviralen Vektorpartikel notwendig sind, *in trans* zur Verfügung stellen. Ein Verpackungssignal Ψ sowie virale LTR-Sequenzen sind i.d.R. nicht enthalten.

- **Verpackungszelllinie / Produktionszelllinie:**

Zelllinie, z.B. HEK 293FT, die nach der Kotransfektion des Transfer- und der gag-pol bzw. env-Verpackungsplasmide die Produktion der viralen Vektorpartikel ermöglicht.

- **Zielzelllinie:**

Durch Infektion der Zielzellen mit z.B. lentiviralen Vektorpartikeln werden Nukleinsäureabschnitte (Transgene) auf diese übertragen. Man spricht dann von Transduktion. Der übertragene Nukleinsäureabschnitt wird mit Ausnahme der Non-integrating lentiviralen Vektoren (NILV) stabil in das Zellgenom integriert. Man spricht von einem Provirus bzw. proviralen Vektor. Als Zielzelllinien können bei lentiviralen Vektorpartikeln sich teilende oder auch nicht-teilende Zellen verwendet werden. Das Wirtsspektrum suszeptibler Zellen kann durch Pseudotypisierung der lentiviralen Vektorpartikel erweitert werden.

5 Kurzbeschreibung (für replikationsdefekte lentivirale Vektorpartikel)

Aus den vektorpartikelhaltigen Zellkulturüberständen wird mit einem geeigneten Verfahren RNA extrahiert. Dieser im Folgenden als „RNA-1“ bezeichnete Nukleinsäureextrakt enthält neben RNA in der Regel auch noch DNA. Um die DNA zu entfernen, wird dieser RNA-Extrakt (RNA-1) anschließend mit DNase verdaut und nach der DNase-Behandlung die RNA erneut aufgereinigt (12, 13). Dieser im Folgenden als „RNA-2“ bezeichnete RNA-Extrakt sollte nur noch RNA enthalten und frei von DNA sein.

Anschließend werden am DNA-freien RNA-2-Extrakt RT-PCR-Analysen (Reverse Transkriptase PCR) mit spezifischen Primern zum Nachweis lentiviraler RNA-Sequenzen durchgeführt. Die vollständige Abwesenheit lentiviraler DNA (z.B. Plasmid-DNA, provirale Vektor-DNA) sollte dabei zusätzlich mit einer PCR-Analyse abgesichert werden. In Abbildung 2 und Tabelle 4 sind die Positionen der Primerbindungsstellen in der HIV-1 Sequenz und die Primersequenzen geeigneter Nachweissysteme dargestellt.

Positive Ergebnisse der RT-PCR auf die lentiviralen RNA-Sequenzen für z.B. HIV-1-gag, HIV-1-pol oder auch für VSV-G, weisen in RNA-2 nach Ausschluss von DNA-Kontaminationen (PCR-Analyse von RNA-2) vermutlich auf die Anwesenheit von freier RNA aus den Verpackungszellen bzw. verpackter Strukturgen- oder Helfer-RNA in dem vektorpartikelhaltigen Zellkulturüberstand hin (9). Eine Unterscheidung zwischen der freien RNA und der RNA in den rekombinanten Vektorpartikeln ist auf dieser Ebene molekularbiologisch allerdings nicht möglich.

Um RNA aus den Vektorpartikeln nachzuweisen, müsste vorab ein Verdau der freien Nukleinsäuren (RNA und DNA) durchgeführt werden. Deren vollständige Entfernung z.B. durch enzymatischen Verdau mit Benzonase und nachfolgender Gewinnung der Viruspartikel durch Bindung an mit anionischem Polymer umhüllte magnetische Kügelchen (sogenanntes „Bead Capture“) (14, 15) scheint bei

lentiviralen Vektorpartikeln schwierig zu sein, vermutlich aufgrund der Komplexierung der eingesetzten Plasmid-DNA mit Transfektionsreagenzien (Ergebnisse Einzellabor).

Neben den Analysen auf lentivirale Gensequenzen aus den Helfer- und Verpackungsplasmiden lassen sich durch Untersuchung auf unerwartete Wildtyp HIV-1-Übergangssequenzen (z.B. Ψ -gag) auch Rückschlüsse auf mögliche Rekombinationsereignisse ziehen. Bei der Auswahl der Primer ist dabei jedoch zu beachten, dass je nach verwendetem Vektorsystem auch die Nukleinsäuresequenz des eingesetzten viralen Vektors verschiedene lange lentivirale Sequenzen (bis zu 300 bp) von z.B. 5' HIV-1 gag enthalten kann, wodurch es in den durchgeführten (RT-)PCR-Reaktionen zu Rekombinationsereignissen zwischen den Nukleinsäuren des Transferplasmids und den Verpackungsplasmiden kommen kann. Dies ist bei der Ergebnisinterpretation zu klären und ggf. zu berücksichtigen.

6 Geräte und Materialien

Bezüglich der Geräte und Materialien wird auf die amtliche Methode G 00.00-1 (16) verwiesen.

7 Probenahme

Es sind die allgemeinen Anforderungen und Hinweise der amtlichen Methoden G 00.00-3 (17) sowie gegebenenfalls G 10.00-1: Nachweis von Viren - Allgemeine Hinweise und Anforderungen und G 10.10-1 (18) zu berücksichtigen.

8 Probenvorbereitung

Es ist sicherzustellen, dass die Untersuchungsprobe für die Laborprobe repräsentativ ist. Für die Extraktion von RNA aus der Untersuchungsprobe sind die allgemeinen Anweisungen und Anforderungen der amtlichen Methode G 00.00-4 (19) zu berücksichtigen.

Die RNA wird mit einem geeigneten RNA-Extraktionskit isoliert (Probe: RNA-1). Um verbliebene DNA zu entfernen, wird der RNA-Extrakt anschließend mit DNase behandelt und die RNA erneut aufgereinigt (Probe: RNA-2).

Das Verfahren zur Isolierung von RNA aus Viren mit nachfolgender DNase-Behandlung ist als Amtliche Methode (12) veröffentlicht.

9 Durchführung (RT-)PCR-Analytik

Allgemeine Anforderungen und Hinweise für die Durchführung der PCR sind in der amtlichen Methode G 00.00-5 (20) beschrieben.

Zur Untersuchung auf An- / Abwesenheit der lentiviralen Sequenzen werden spezifische PCR- sowie RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Amplifikate können bei Bedarf (z.B. abweichende Fragmentlängen) durch Sequenzierung bzw. Restriktionsverdau verifiziert werden.

RNA-1 (erste RNA-Aufreinigung ohne DNase-Behandlung) kann prinzipiell mittels RT-PCR analysiert werden, da sowohl RNA und DNA erfasst werden. Da im Regelfalle jedoch noch Plasmid-DNA aus den Transferplasmiden und den Verpackungsplasmiden in den Virusproben und teilweise auch in den transduzierten Zielzellen vorhanden ist, sind diese Ergebnisse wenig aussagekräftig für den eindeutigen RNA-Nachweis.

Die Untersuchung von RNA-2 (nach DNase-Behandlung und nachfolgender, erneuter RNA-Aufreinigung) ist bei vektorpartikelhaltigen Zellüberständen zielführend. RNA-2 wird mittels RT-PCR und PCR analysiert. Dadurch kann bei negativen Ergebnissen in der PCR (gemäß Amtlicher Methode 45 Zyklen) daraus geschlossen werden, dass bei positiven RT-PCR –Ergebnissen in RNA-2 tatsächlich nur RNA nachgewiesen wird.

Bei lentiviral transduzierten Zielzellen kann zunächst der DNA-Extrakt (enthält auch RNA) oder alternativ der mit einem RNA-Extraktionskit isolierte RNA-Extrakt (RNA-1) mittels RT-PCR auf die An- / Abwesenheit lentiviraler Sequenzen untersucht werden. Sofern dabei neben den erwarteten Sequenzen (insbesondere LTR-Ψ, HIV-1-rev (RRE) sowie das jeweilige Transgen) auch unerwartete Sequenzen nachgewiesen werden (z.B. für Verpackungsgene HIV-1-gag, HIV-1-pol und / oder VSV-G), sollte nachfolgend die mit einem RNA-Extraktionskit aufgereinigte und DNase-behandelte RNA-2 mittels RT-PCR und PCR analysiert werden.

In der nachfolgenden Abbildung 2 sind die Primerbindungsstellen für die in diesem Dokument zusammengestellten Nachweissysteme (s. auch Kapitel A1.1) in der HIV-1 Sequenz dargestellt. Aus der jeweiligen Farbmarkierung der Primer kann die theoretische Zielsequenz im lentiviralen Vektorsystem abgeleitet werden. Dabei muss jedoch die Generation des verwendeten Vektorsystems berücksichtigt werden.

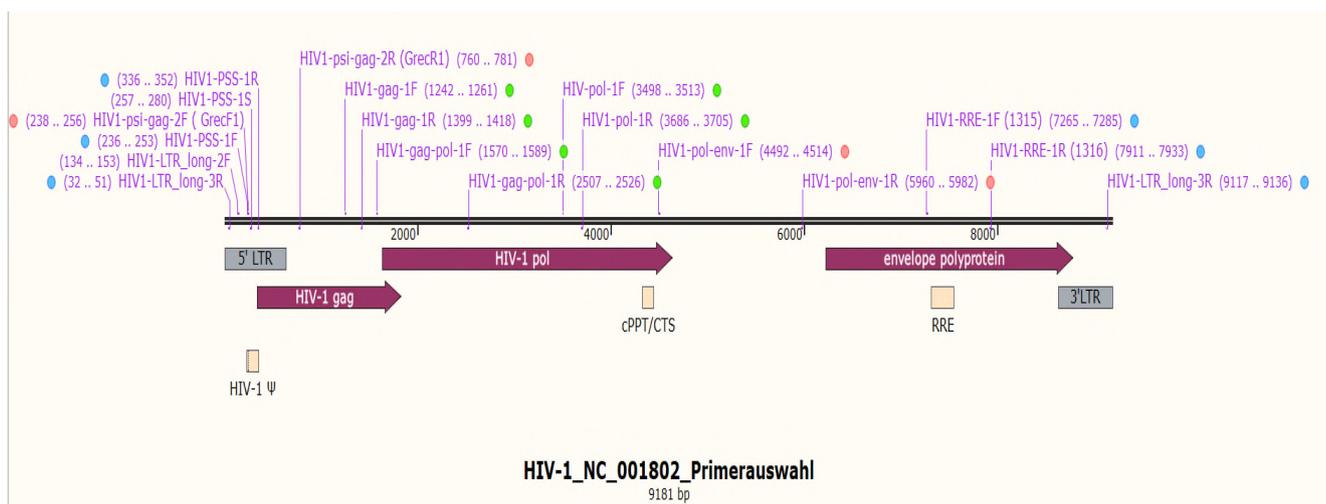


Abbildung 2: Position der Primerbindungsstellen verschiedener Nachweissysteme in der HIV-1 Sequenz

Die Primer eignen sich insbesondere auch zur Überprüfung von lentiviralen Vektorsystemen und es sind abhängig von der Farbkodierung theoretisch folgende Nachweise möglich:

Nachweis Transferplasmid / Nachweis Transgen

Nachweis Verpackungsplasmide

Nachweis unerwartete lentivirale Übergangssequenzen (Rekombination?)

10 Auswertung

Lentivirale RNA gilt in den Proben (transduzierte Zelllinie, lentivirale Vektorpartikel, Wischproben) als nachgewiesen, wenn mindestens eine der in Tabelle 4 aufgeführten RT-PCRs mit spezifischen Primern für die Verpackungsplasmide (z.B. HIV-1-gag) nach DNase Verdau positiv sind, in der PCR-Analyse dabei jedoch keine Amplifikate erhalten werden.

Ob es sich um freie RNA oder um RNA aus den viralen Vektorpartikeln handelt, oder im Falle von Zellkulturüberständen auch um mRNA eines integrierten Provirus, lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht direkt ableiten. Dazu bedarf es zusätzlicher Analysen (s. auch Kapitel 3).

Weiterhin dürfen in den (RT-)PCR-Kontrollansätzen ohne Nukleinsäure-Zugabe (PCR-Reagenzienkontrolle, negative Extraktionskontrolle) keine Signale detektiert werden. In den Ansätzen mit positiver Kontroll-RNA oder Kontroll-DNA müssen die entsprechend positiven Signale detektiert werden.

Werden in einer Probe ohne DNase-Verdau (RNA-1 oder DNA) im PCR-Ansatz die spezifischen HIV-1-Sequenzen nachgewiesen, dann enthält die Probe lentivirale DNA (z.B. von dem eingesetzten lentiviralen Transfer- oder Verpackungsplasmid oder der genomischen DNA mit integriertem lentiviralem Vektor). Wird in einer Probe nach DNase-Verdau in der PCR eine spezifische HIV-1-Sequenz nachgewiesen, dann war der DNase-Verdau nicht vollständig und muss ggf. wiederholt werden, sofern eine Differenzierung zwischen RNA und DNA gewünscht ist.

Nachfolgend sind abhängig von der verwendeten Matrix die möglichen Untersuchungsergebnisse dargestellt. Die abgebildeten Entscheidungsbäume zeigen, wie abhängig von den jeweiligen Ergebnissen weiter verfahren werden kann.

10.1 Ergebnisse für die Untersuchung von Vektorplasmiden

In den Proben von Transferplasmiden sind mittels PCR (sowie RT-PCR) je nach Generation des verwendeten lentiviralen Produktionssystems immer LTR- Ψ und häufig auch cPPT sowie HIV-1-rev (RRE) nachweisbar, die das Transgen flankieren (s. Abbildung 3).

Auf den gag-pol-Verpackungsplasmiden sind HIV-1-gag, HIV-1-pol, tat, rev (RRE) nachweisbar, je nach Generation auf einem Verpackungsplasmid (bis 2. Generation) oder getrennt auf verschiedenen Verpackungsplasmiden (ab 3. Generation).

Hüllprotein-Gene, wie z.B. VSV-G liegen grundsätzlich auf einem separaten env-Verpackungsplasmid vor.

Bei der Untersuchung von kommerziell erhältlichen Mischungen aus Transferplasmiden und gag-pol-Verpackungsplasmiden kann es in einer Probe auch während der (RT-)PCR zu Rekombinationseignissen kommen, so dass die HIV-1- Ψ -gag Übergangssequenz ein positives Signal liefern könnte. Dabei würde es sich um i.d.R. einen PCR-Artefakt handeln, zurückzuführen auf ein Selbst-Annealing der initial amplifizierten DNA-Stränge innerhalb homologer Sequenzbereiche. Im Falle des Vorliegens von RNA ist auch eine Rekombination durch einen Template-Wechsel der Reversen Transkriptase im RT-PCR-Ansatz möglich.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass in einigen (wenigen) Transferplasmiden die vollständige HIV-1- Ψ -gag Übergangssequenz noch vorhanden ist. Für eine eindeutige Ergebnisinterpretation positiver Befunde ist dabei sicherzustellen, dass das verwendete Primersystem (z.B. HIV-1-psi-gag-2F / HIV-1-psi-gag-2R) nicht im Transfervektor bindet (Anmerkung: Die Bindestelle des Primers HIV-1-psi-gag-2R liegt >300bp downstream im HIV-1-gag und bindet somit in der Mehrzahl der verwendeten Transfervektoren nicht).

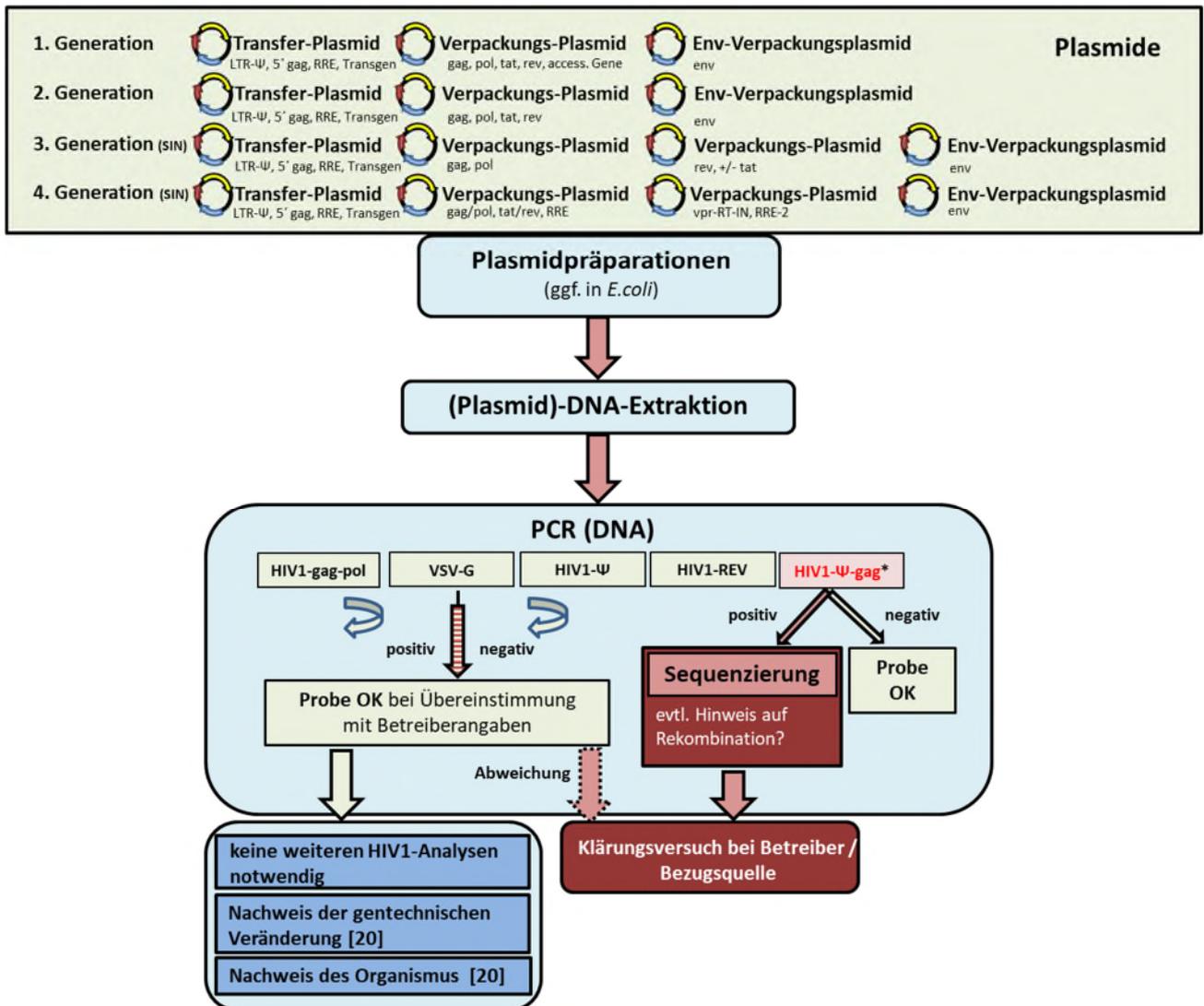


Abbildung 3: Entscheidungsbaum für die Untersuchung von Vektorplasmiden

*Für eine eindeutige Ergebnisinterpretation positiver Befunde ist dabei sicherzustellen, dass das verwendete Primersystem (z.B. HIV-1-psi-gag-2F / HIV-1-psi-gag-2R) nicht im Transfervektor bindet.

10.2 Ergebnisse für die Untersuchung lentiviraler Vektorpartikel in Zellkulturüberständen

In den RNA-Präparationen für lentivirale Vektorpartikel in Zellkulturüberständen lassen sich erfahrungsgemäß häufig noch DNA-Sequenzen aus den Herstellungsplasmiden (Transfektorplasmid, Verpackungsplasmide) der Transfektion nachweisen (z.B. HIV-1-gag, HIV-1-pol, VSV-G, colE1-ori, AmpR).

Des Weiteren können vektorpartikelhaltige Zellkulturüberstände auch abgelöste oder lysierte Zellen enthalten, aus denen ggf. virale Nukleinsäuren (DNA und RNA) nachgewiesen werden kann. *

Für eine aussagefähige Untersuchung bzw. Interpretation der tatsächlich vorhandenen lentiviralen RNA in / an den viralen Vektorpartikeln muss daher sichergestellt sein, dass der untersuchte RNA-2 Extrakt frei von DNA ist, d.h. nur RNA enthält (z.B. Untersuchung der RNA-2 mit dem Primerpaar HIV-PSS-1F/HIV-PSS-1R: PCR negativ und RT-PCR positiv).

In den viralen Vektorpartikeln sollten in RNA-2 (DNA-frei) lediglich die für eine effiziente Transduktion der Ziellzellen erforderlichen lentiviralen RNA-Sequenzen (insbesondere LTR- Ψ , cPPT, rev (RRE)) sowie das Transgen mittels RT-PCR nachweisbar sein, aber keine RNA-Sequenzen für Strukturgene (z.B. HIV-1-gag, HIV-1-pol sowie das zur Pseudotypisierung häufig verwendete Vesicular stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G)) aus den Verpackungsplasmiden vorliegen (siehe Abbildung 4).

Weiterhin sollten auch keine durch Rekombination entstandenen HIV-1-abgeleiteten Übergangssequenzen (wie z.B. HIV-1- Ψ -gag; s. dazu auch Kap 10.1., Abschnitt 2 und 3) vorliegen (21).

Erfahrungsgemäß werden aber auch in RNA-2 Präparationen aus lentiviralen Vektorpartikeln (bzw. Zellkulturüberständen von Produktionszelllinien) teilweise RNA-Sequenzen für die Strukturgene und das zur Pseudotypisierung verwendete VSV-G nachgewiesen. Dies zeigte sich auch in der Laborvergleichsuntersuchung (siehe Kapitel 12 und Anhang A2:). Neben einem möglicherweise unvollständigen DNase-Verdau, kommt auch die bereits in der Einführung (Kapitel 3.1 und 5) erwähnte freie lentivirale RNA aus den Produktionszelllinien bzw. die verpackte Strukturgen- oder Helfer-RNA, die zu einem geringen Prozentsatz beim „Budding“-Prozess in die lentiviralen Vektorpartikel verpackt werden kann, als Ursache in Frage.

10.3 Ergebnisse für die Untersuchung lentiviral transduzierter Zelllinien

In einer stabil transduzierten Zelllinie sollten sich in dem genomischen Nukleinsäureextrakt (enthält DNA und RNA) die folgenden Sequenzen des lentiviralen Vektors nachweisen lassen:

- LTR- Ψ -DNA, cPPT-DNA, RRE-DNA sowie die Transgen-DNA als Bestandteile des integrierten proviralen Vektors.
- LTR- Ψ -RNA, cPPT-RNA, RRE-RNA sowie die Transgen-RNA als RNA-Transkripte des integrierten proviralen Vektors.

Nukleinsäuren (DNA oder RNA) der eingesetzten Verpackungsplasmide wie z.B. HIV-1-gag, HIV-1-pol sowie das zur Pseudotypisierung häufig verwendete Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G) sollten sich nach mehreren Passagen in den transduzierten Zielzellen nicht mehr nachweisen lassen (21) (siehe Abbildung 4).

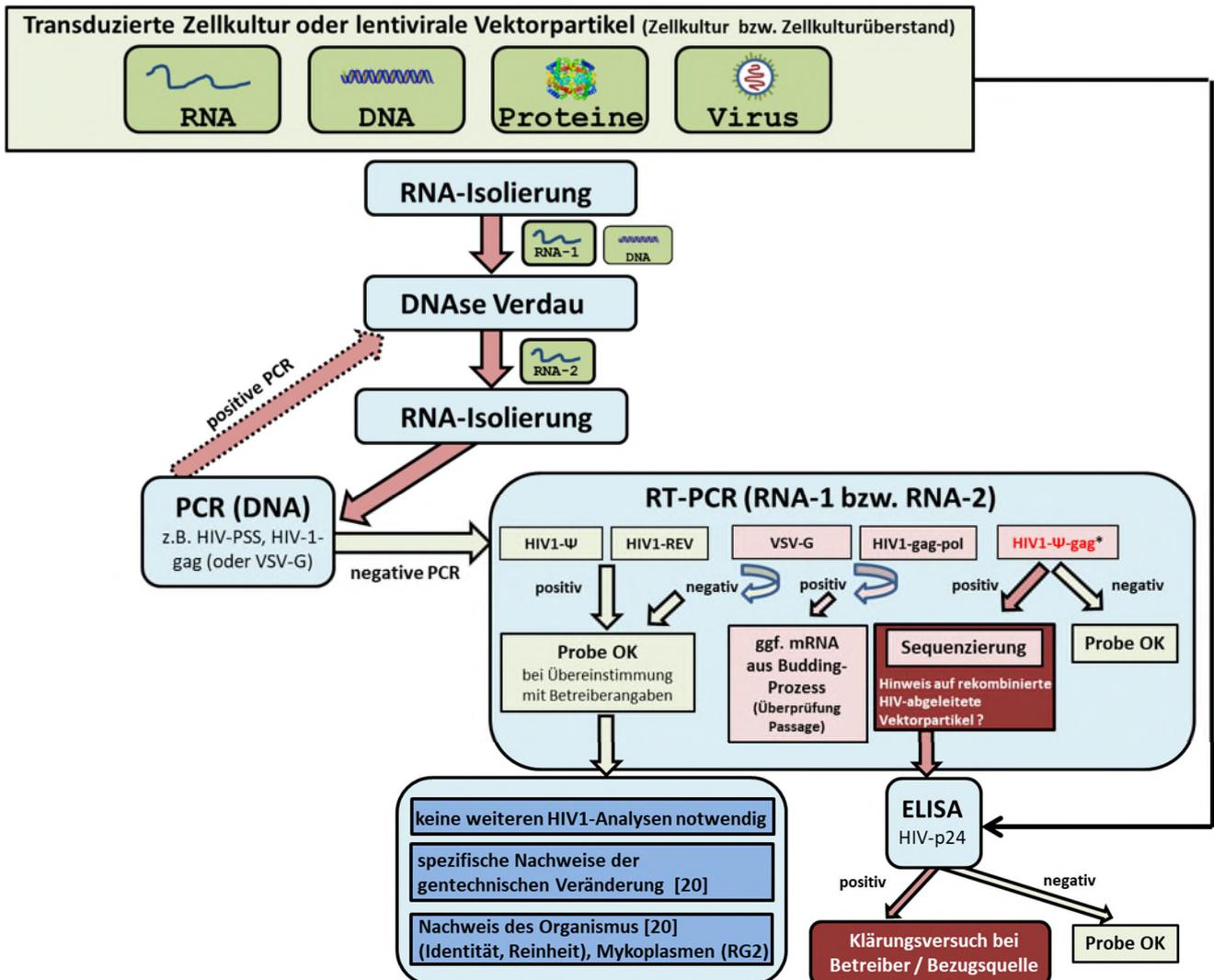


Abbildung 4: Entscheidungsbaum für die Untersuchung lentiviral transduzierter Zelllinien oder von Zellkulturüberständen mit lentiviralen Vektorpartikeln

*Für eine eindeutige Ergebnisinterpretation positiver Befunde ist dabei sicherzustellen, dass das verwendete Primersystem (z.B. HIV-1-psi-gag-2F / HIV-1-psi-gag-2R) nicht im Transfervektor bindet.

10.4 Ergebnisse für die Untersuchung von Wischproben

Bei der Untersuchung von Wischproben in und außerhalb von gentechnischen Anlagen geht es im Wesentlichen um die Überprüfung der Wirksamkeit der Einschließungsmaßnahmen (Containment) und des Hygienestatus der gentechnischen Anlage. Aufgrund der begrenzten Lebensfähigkeit der Lentiviren auf Oberflächen wird aber eine Rückführung auf lebensfähige lentivirale Vektorpartikel und / oder eine Aussage über die Herkunft des positiven Befundes (z.B. *E. coli* mit lentiviralen Vektorplasmiden, transfizierte Produktionszelllinie oder lentiviraler Vektorpartikel) in der Regel nicht möglich sein.

Im Falle von positiven RT-PCR-Nachweisen in Wischproben kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dort zu einem früheren Zeitpunkt lebensfähige, infektiöse Vektorpartikel vorgelegen haben.

Analytisch kann die aus Wischproben isolierte RNA-1 oder RNA-2 zunächst über den Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ nach der Amtlichen Methode (13, 18) mittels RT-PCR analysiert werden. Bei positivem Ergebnis wäre die Durchführung eines p24-Antigen-ELISA oder eines Infektionsassays sinnvoll, wobei aber hier die hohe Nachweisgrenze in den meisten Fällen zu beachten ist. Daher kann alternativ eine Untersuchung der isolierten RNA-2 (DNA-frei) z.B. auf HIV-1-gag, HIV-1-pol und HIV-1-psi-gag und ggf. auch auf das zur Pseudotypisierung häufig verwendete Vesicular stomatitis Virus Glykoproteingen (VSV-G) für die weitere Spezifizierung hilfreich sein und weitere Erkenntnisse liefern (siehe Abbildung 5).

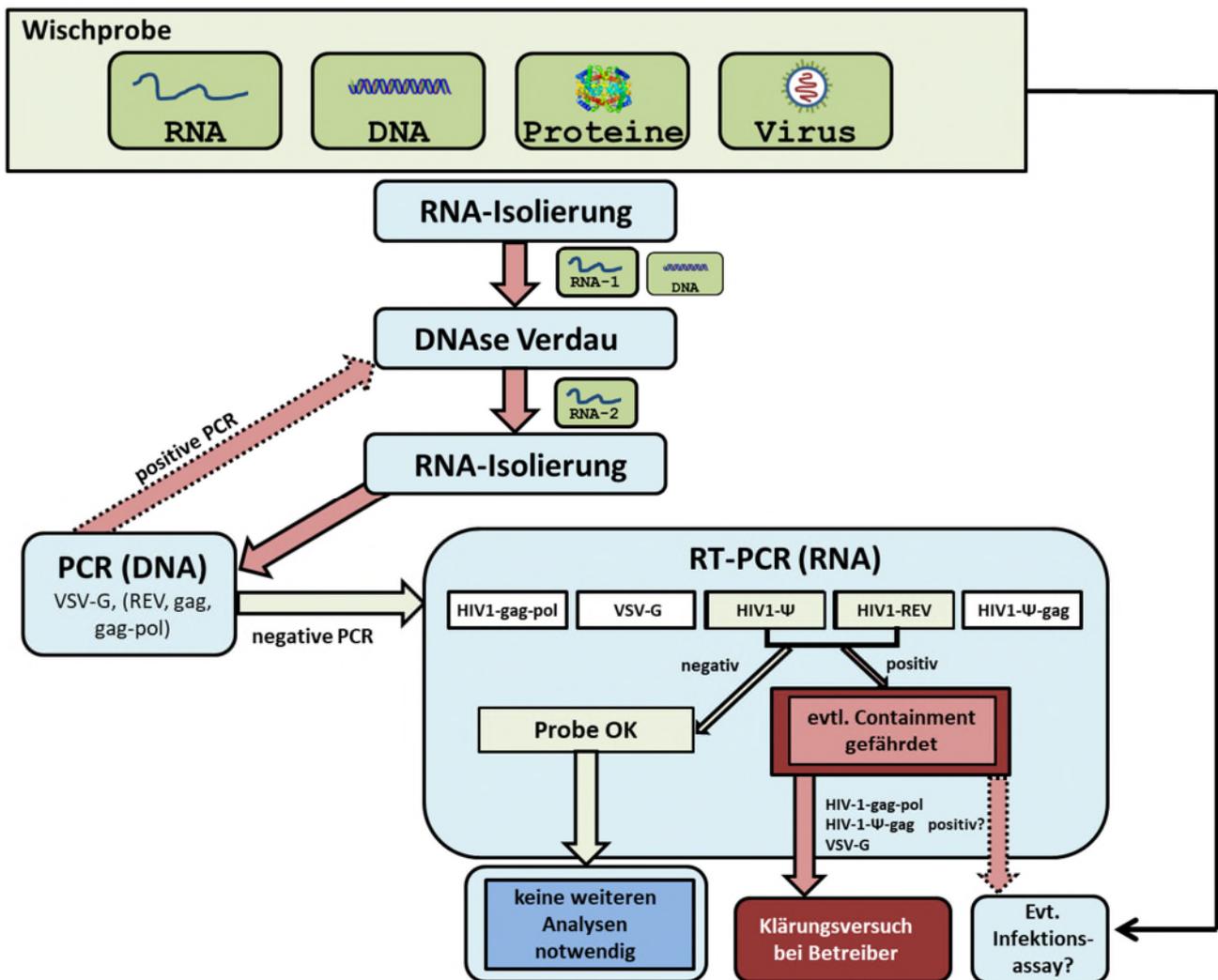


Abbildung 5: Entscheidungsbaum für die Untersuchung von Wischproben

10.5 Zusammenfassende Bewertung

Bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse ist matrixbezogen zu prüfen, ob diese mit den theoretischen Erwartungen übereinstimmen und in den Aufzeichnungen des Betreibers dokumentiert sind. Als zentrale Frage ist zu beantworten, ob die für die jeweilige Matrix erwarteten Sequenzen nachgewiesen und gleichzeitig keine unerwarteten viralen Sequenzen nachgewiesen wurden. Sofern in lentiviral transduzierten und mehrfach passagierten Zellkulturen noch unerwartete lentivirale DNA- oder RNA-Sequenzen, wie z.B. für HIV-1-gag und / oder das Vesicular Stomatitis Virus

Glykoprotein nachgewiesen werden, können weitere Untersuchungen zum Virusnachweis (z.B. auf Proteinebene der p24-ELISA zum Nachweis des gag-Genproduktes oder ein Infektionsassay zur Prüfung der Replikationskompetenz) angeschlossen werden.

Bei der Auswertung und Bewertung der Untersuchungsergebnisse kann die allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Az. 6790-10-41 geänderte Fassung vom Februar 2020 (6) hilfreich sein.

Für die Interpretation und Bewertung sowie die Planung weiterer Untersuchungsverfahren können abhängig von der Untersuchungsmatrix die Entscheidungsbäume heran gezogen werden (s. Abbildung 3 – Abbildung 5). Neben den Untersuchungen auf lentivirale Sequenzen ist für die Identifizierung von GVO die Amtliche Methode G 00.00-6 (22) zu berücksichtigen.

11 Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung geschieht anhand der mitgeführten Kontrollen. Wenn die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse liefern, müssen die Resultate der Versuchsreihe verworfen und die Untersuchungen nach Durchführung geeigneter Maßnahmen wiederholt werden.

Weiterhin wird die DNase-behandelte RNA (RNA-2) mit mindestens einem Nachweisverfahren einerseits über PCR und darüber hinaus über (RT-)PCR analysiert, um sicher zu stellen, dass in der RNA-2 keine DNA mehr vorhanden ist. Der vollständige DNase-Verdau ist kritisch und entscheidend, um die nachfolgenden (RT-) Real-time PCR-Ergebnisse eindeutig bewerten zu können. Bei eventuell unvollständigem DNase-Verdau und somit Verbleiben von Spuren von DNA ist eine Differenzierung zwischen RNA und DNA erschwert (teilweise trotzdem möglich anhand unterschiedlicher Ct-Werte bei (RT-) Real-time PCR und Real-time PCR) bzw. im Extremfalle nicht möglich.

12 Laborvergleichsuntersuchung (LVU)

Im Jahr 2019 wurde vom Ausschuss Methodenentwicklung der LAG (LAG-AM) eine durch das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) koordinierte Laborvergleichsuntersuchung durchgeführt, an der sieben Labore und das LGL teilnahmen. Die Teilnehmer erhielten auf Trockeneis verschickt drei Probensets mit jeweils drei Proben im Duplikat.

12.1 Beschreibung der LVU-Proben

Probenset 1

Matrix: Infektiöse (amphotrope, HIV-1-basierte) lentivirale Vektorpartikel

Sicherheitshinweis: Risikogruppe 2 / Sicherheitsstufe 2 nach GenTG

- | | | |
|-----------------|--------------------------------------|---------------------------|
| - LVU 2018*0001 | pLV [Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>mCherry | 2,5x10 ⁷ TU/ml |
| - LVU 2018*0002 | H ₂ O | |
| - LVU 2018*0003 | pLV [Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>mCherry | 5,0x10 ⁸ TU/ml |

Probenset 2

Matrix: Plasmide mit Elementen von HIV-1 bzw. HIV-1-basierter lentiviraler Vektorsysteme

Sicherheitshinweis: Rekombinante DNA / Kein GVO

- | | | |
|-----------------|---------------------------------|----------------|
| - LVU 2018*0005 | HIV-1 Gesamtgenomplasmid pNL4-3 | ca. 0,13 ng/µl |
| - LVU 2018*0006 | VSV-G Hüllproteinplasmid pMD2.G | ca. 20 ng/µl |
| - LVU 2018*0007 | HIV-1 Gesamtgenomplasmid pNL4-3 | ca. 20 ng/µl |

Probenset 3

Matrix: Zelllinien mit integrierten HIV-1-basierten lentiviralen Vektoren (Proviren)

Sicherheitshinweis: Risikogruppe 1 / Sicherheitsstufe 1 nach GenTG

- LVU 2018*0010 Retroviral (MLV-basiert) transduzierte Zelllinie A549-RV-Bullet-eGFP
- LVU 2018*0011 Zelllinie A549 (humane Lungenkarzinomzelllinie).
- LVU 2018*0012 Lentiviral transduzierte Zelllinie A549-LV-pGK-eGFP

Aus den Proben waren die Nukleinsäuren zu isolieren (Probenset 1: RNA-2 (nach 12) , Probenset 2: Plasmid-DNA (verschickt); Probenset 3: DNA bzw. RNA) und die Nukleinsäuren mindestens mit der Amtlichen Methode (13) zum Nachweis des HIV-1-Verpackungssignals Ψ mittels Real-time-PCR zu analysieren.

Darüber hinaus wurden die Labore gebeten, möglichst viele der im hier vorliegenden Dokument in der Tabelle 4 gelisteten konventionellen PCR-Verfahren zu überprüfen.

In der Tabelle 1 sind die in der LVU von zwei teilnehmenden Laboren (Labor 2 und 3) eingereichten Ergebnisse für den HIV-1-Packaging Signal Ψ Real-time PCR-Nachweis (mit ca. Angabe der Ct-Werte) mit allen drei Probensets dargestellt, aus denen sich eindeutige RNA-Nachweise ableiten ließen. Die detaillierten Ergebnisse aller teilnehmenden Labore, bei denen teilweise ein eindeutiger RNA-Nachweis schwierig war, sind im Anhang A2: dargestellt.

Tabelle 1: (RT)- Real-time PCR-Ergebnisse der LVU-Teilnehmer (Labor 2 und 3) zum Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ für die drei Probensets

Nachweis		HIV-1-Packaging Signal Ψ			
Primerpaar		HIV-1-PSS_1F/ HIV-1-PSS_1R/ HIV-1-PSS-1S			
Art der Probe	Probe	Ct-Wert (ca. Angabe) vor/nach DNase, d.h. mit RNA-1/RNA-2 in Ansatz RT-PCR bzw. PCR			
		vor DNase, RNA-1		nach DNase, RNA-2	
		RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR
Vektor-partikel	LVU 2018*0001	19	24	22	-
	LVU 2018*0002	-	-	-	-
	LVU 2018*0003	13	19	15	-
Plasmide		DNA			
		RT-PCR	PCR		
	LVU 2018*0005	17	17		
	LVU 2018*0006	-	-		
	LVU 2018*0007	9	9		
Zelllinien		RNA-1		RNA-2	
		RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR
	LVU 2018*0010	-	-	-	-
	LVU 2018*0011	-	-	-	-
	LVU 2018*0012	21	21	26	-

RNA-1: enthält Gesamtnukleinsäuren (RNA und DNA);

RNA-2: enthält nach vollständigem DNase-Verdau nur RNA

Die für die drei Probensets mit den konventionellen Nachweisen zu erwartenden Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zu erwartende (RT)-PCR-Ergebnisse zum Nachweis der verschiedenen viralen Elemente für die drei Probensets

Nachweis		HIV-1-RRE	HIV-1-gag	HIV-1-pol	HIV-1-psi-gag		VSV-G / Pseudotyp.		Transgen-nachweis		EGFP								
Primerpaar		HIV-1-RRE-1F HIV-1-RRE-1R	HIV-1-gag-1F HIV-1-gag-1R	HIV-1-pol-1F HIV-1-pol-1R	HIV-1-psi-gag-2F HIV-1-psi-gag-2R	VSV-G-F VSV-G-R		HIV-1-LTR_long-2F HIV-1-LTR_long-3R		EGFP-F/ EGFP-R									
Art der Probe	Probe	Ergebnis vor/nach DNase, d.h. mit RNA-1/RNA-2 in Ansatz RT-PCR bzw. PCR																	
		RNA-1		RNA-2		RNA-1		RNA-2		RNA-1		RNA-2		RNA-1		RNA-1		RNA-2	
		PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR		
Vektor-partikel	LVU 2018*0001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	LVU 2018*0002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	LVU 2018*0003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA			
Plasmide	LVU 2018*0005	+		+		+		+		-		-		-		-			
	LVU 2018*0006	-		-		-		-		+		-		-		-			
	LVU 2018*0007	+		+		+		+		-		+		-		-			
		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA		DNA			
Zelllinien	LVU 2018*0010	-		-		-		-		-		-		-		+			
	LVU 2018*0011	-		-		-		-		-		-		-		-			
	LVU 2018*0012	- ¹		-		-		+		-		+		-		+			

RNA-1: enthält Gesamtnukleinsäuren (RNA und DNA); RNA-2: enthält nur RNA

+: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis

12.2 Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung

Die detaillierten Ergebnisse, die von den teilnehmenden Laboren bei der Untersuchung der drei Probensets mit den unterschiedlichen (RT)-PCR-Verfahren erzielt wurden, sind im Anhang unter Kapitel Anhang A2: in Tabellen zusammengestellt. Wesentliche Aspekte aus der Laborvergleichsuntersuchung werden nachfolgend diskutiert.

In Tabelle 3 sind die von den Laboren eingereichten Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung für alle Nachweisverfahren und für alle drei Probensets im Hinblick auf Falsch-positive und Falsch-negative zusammengefasst.

¹ In dem lentiviralen Vektor pHIV7-PGK-eGFP liegt eine auf 234 Bp verkürzte HIV-1-RRE-Region vor. Daher bindet der Primer HIV-1-RRE-1F, nicht jedoch der Primer HIV-1-RRE-1R, so dass in dieser Probe mit dem angegebenen Primerpaar kein Amplifikat erwartet wird.

Tabelle 3: Falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse

Nachweis	HIV-1-Packaging Signal Ψ -gag Übergang	HIV-1-RRE	HIV-1-psi-gag	HIV-1-gag	HIV-1-pol	HIV-1-gag-pol	VSV-G / Pseudotyp	EGFP	Transgen- nachweis
Primerpaar	HIV1_PSS_1F/ HIV1_PSS_1R/ HIV1-PSS-1S	HIV1-RRE-1F/ HIV1-RRE-1R	HIV-1-psi-gag-2F/ HIV-1-psi-gag-2R	HIV1-gag-1F/ HIV1-gag-1R	HIV1-pol-1F/ HIV1-pol-1R	HIV1-gag-pol-1F/ HIV1-gag-pol-1R	VSV-G-F/ VSV-G-R	EGFP-F/ EGFP-R	HIV1-LTR_long-2F/ HIV1-LTR_long-3R
Anzahl teilnehmender Laboratorien	8	7	6	5	4	3	6	6	4
Anzahl Laboratorien, deren Ergebnisse in die Auswertung einbezogen wurden	8	7	6	5	4	3	6	6	4
Anzahl Proben je Laboratorium	72	9	9	9	9	9	9	9	9
Anzahl eingereichter Ergebnisse	192	63	54	45	36	27	54	54	24
Anzahl Ergebnisse, die in die Auswertung einbezogen wurden	192	63	54	40	32	24	54	48	24
Falsch-positive Ergebnisse %	5,6	5,7	0	5	0	0	0	4,1	0
Falsch-negative Ergebnisse %	0	3,5	10	0	0	0	0	12,5	16

12.2.1 Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ mittels (RT)-Real-time PCR

(siehe Anhang A2: Tabelle (1a)).

Der in der Laborvergleichsuntersuchung verbindlich vorgeschriebene Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ mit der Amtlichen Methode G 10.40-2 (13) wurde von allen acht Teilnehmern (7 von 7 Laboratorien und LGL) durchgeführt. Die Aufarbeitung der RNA-1 und RNA-2 nach DNase-Verdau aus den Probensets 1 und 3 erfolgte von den Laboren nach der Amtlichen Methode G 10.20-2 (12) oder teilweise mit laborspezifischen Modifikationen.

In Probenset 2, den Plasmidproben, wurde von allen Laboren DNA als Template mittels Real-time PCR und / oder (RT)-Real-time PCR untersucht. Die zwei positiven Proben wurden von allen 8 Laboren korrekt identifiziert. Eine negative Probe wurde Falsch-positiv bewertet (Ct33).

Im Probenset 1, in dem es um den Nachweis lentiviraler RNA aus Vektorpartikeln ging, verlief der RNA-Nachweis in RNA-2 in sieben Laboren eindeutig. In fünf Laboren war die RNA-2 vollständig frei von DNA. Bei zwei Laboren war der DNase-Verdau zwar unvollständig, allerdings ließ sich hier anhand der unterschiedlichen Ct-Werte zwischen Real-time PCR und PCR ebenfalls auf die Anwesenheit von viraler RNA schließen.

Auch in Probenset 3, den Zelllinien, gelang drei von vier Laboren der eindeutige Nachweis von RNA in RNA-2. In einem Labor war aber auch in dieser Matrix der DNase-Verdau unvollständig und ließ keine Differenzierung von DNA zu RNA zu.

Insgesamt wurde bezogen auf die Probensets 1 und 2 in 18 von 20 (90%) untersuchten (RNA-positiven) Ansätzen eindeutig RNA in RNA-2-nachgewiesen, auch wenn darunter in 5 von 20 untersuchten RNA-2 Ansätzen (25%) der DNase-Verdau unvollständig war. In 2 von 20 untersuchten (RNA-positiven) Ansätzen (10%) lag aufgrund von unvollständigem DNase-Verdau ein (falsch) negativer RNA-Nachweis vor, da keine Differenzierung zwischen DNA und RNA möglich war.

Beim Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ mit der Amtlichen Methode G 10.40-2 wurden in der Laborvergleichsuntersuchung bezogen auf alle drei Probensets und die Real-time PCR-Methode keine falsch-negativen Ergebnisse erzielt. In 4 von 72 negativen Ansätzen wurden falsch-positive Signale erhalten (5,6%).

12.2.2 Konventionelle (RT)-PCR-Nachweise zum Nachweis viraler Sequenzen

Bei der den Laboren freigestellten Austestung der verschiedenen, konventionellen (RT-)PCR-Nachweise zeigte sich, dass die Labore aufgrund des großen Untersuchungsumfangs in der LVU unterschiedliche Untersuchungsstrategien bezüglich der eingesetzten Templates [RNA-1 (Gesamtnukleinsäuren) oder RNA-2 (nur RNA) sowie der PCR-Analytik (PCR oder RT-PCR)] gewählt haben. Dies macht eine einheitliche und systematische Auswertung teilweise schwierig.

HIV-1-RRE-1F / HIV-1-RRE-1R (siehe Anhang A2: Tabelle (2a)).

Am HIV-1-RRE-Nachweis nahmen 6 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

In fünf Laboren wurden alle negativen Proben mit dem Nachweis richtig identifiziert (falsch-positive Ergebnisse: 0 von 25 untersuchten Ansätzen (0%)) und bei den positiven Proben ein falsch-negativer Befund erhalten. In einem Labor wurden 2 Proben falsch-positiv bewertet, wodurch sich unter Einbeziehen aller 7 Labore folgendes Gesamtergebnis ableitet.

- Falsch-positive Ergebnisse: 2 von 35 untersuchten Ansätzen (5,7%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 1 von 28 (3,5%)

HIV-1-psi-gag-2F / HIV-1-psi-gag-2R (siehe Anhang A2: Tabelle (2b)).

Beim HIV-1-psi-gag Nachweis, bei dem es um den „Nachweis unerwarteter Rekombinationsereignisse“ geht, nahmen 5 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

- Falsch-positive Ergebnisse: 0 von 24 untersuchten Ansätzen (0%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 3 von 30 untersuchten Ansätzen (10%)

Ergebnisse nur für RNA-2-Nachweise in Vektorpartikeln:

- 1 von 6 untersuchten Ansätzen: negativ (17%)
- 3 von 6 untersuchten Ansätzen: positiv (50%)
- 2 von 6 untersuchten Ansätzen: fraglich, da kleineres Fragment (33%)

Anmerkung: Es wurde eine Vektorpräparation in zwei verschiedenen Verdünnungen untersucht

HIV-1-gag-1F/HIV-1-gag-1R (siehe Kapitel Anhang A2: Tabelle (2c)).

Am HIV-1-gag Nachweis nahmen 5 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

- Falsch-positive Ergebnisse: 1 von 20 untersuchten Ansätzen (5%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 0 von 20 untersuchten Ansätzen (0%)

HIV-1-pol-1F/ HIV-1-pol-1R (siehe Anhang A2: Tabelle (2d)).

Am HIV-1-pol Nachweis nahmen 3 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

- Falsch-positive Ergebnisse: 0 von 16 untersuchten Ansätzen (0%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 0 von 16 untersuchten Ansätzen (0%)

HIV-1-gag-pol-1F/ HIV-1-gag-pol-1R (siehe Anhang A2: Tabelle (2e)).

Am HIV-1-gag-pol Nachweis nahmen 2 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

- Falsch-positive Ergebnisse: 0 von 12 untersuchten Ansätzen (0%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 0 von 12 untersuchten Ansätzen (0%)

VSV-G-F/ VSV-G-R (siehe Anhang A2: Tabelle (2f)).

Am VSV-G Nachweis nahmen 6 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

- Falsch-positive Ergebnisse: 0 von 41 untersuchten Ansätzen (0%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 0 von 19 untersuchten Ansätzen (0%)

EGFP-F/ EGFP-R (siehe Anhang A2:Tabelle (2g)).

Am EGFP-Nachweis nahmen 5 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

In vier Laboren wurden alle positiven und negativen Proben mit dem Nachweis richtig identifiziert

- Falsch-positive Ergebnisse: 0 von 16 untersuchten Ansätzen (0%)
- Falsch-negative Ergebnisse 0 von 16 untersuchten Ansätzen (0%)

Zwei von drei falsch-negativen und die eine falsch-positiv getestete Probe sind auf ein einzelnes Labor zurückzuführen (Labor 6, welches auch bei Nachweis (2e) Probleme hatte). Ein zweites Labor teilte ein falsch-negatives Ergebnis in einer niedrig konzentrierten Vektorpartikelprobe mit. Unter Einbeziehen aller 7 Labore lässt sich folgendes Gesamtergebnis ableiten.

- Falsch-positive Ergebnisse: 1 von 24 untersuchten Ansätzen (4,1%)
- Falsch-negative Ergebnisse: 3 von 24 untersuchten Ansätzen (12,5%)

Transgennachweis mit HIV-1-LTR-long-2F / 3R (siehe Anhang A2: Tabelle (3a)).

Am Transgennachweis mit HIV-1-LTR-long-2F/3R nahmen 3 von 7 Laboratorien und das LGL teil.

Von zwei Laboren wurden mit diesem Nachweis alle drei Probensets untersucht und von zwei Laboren nur Probenset drei (Zelllinien), so dass insgesamt 24 Ergebnisse berücksichtigt werden konnten. Im Einzelnen ergab sich dabei folgendes:

Probenset 1: Vektorpartikel (2 Laboratorien)

Nachweis aus Gesamtnukleinsäuren (RNA-1): 2 Laboratorien

- PCR-Amplifikation größerer Fragmente aus RNA-1 (i.e. Plasmide) funktioniert
- Problem: I.d.R. zwei Banden bei Transferplasmiden
- (1x) PCR-Amplifikation und Sequenzierung (nur) des Plasmid-Backbones erfolgreich
 - ▶ Verbesserungsvorschlag: „HIV-RRE-1F“ anstatt „LTR_long2_f“-Primer verwenden
- (1x) Nicht sequenziert

Nachweis aus RNA-2: 1 Laboratorium

- RT-PCR-Amplifikation größerer Fragmente aus RNA-2 funktioniert nicht

Probenset 2: Plasmide (2 Laboratorien)

- Problem: I.d.R. zwei Banden bei Transferplasmiden (bzw. HIV-1 Gesamtgenomplasmiden)
- Hier: (1x) PCR-Amplifikation und Sequenzierung des Virus-Anteils erfolgreich
- (1x) PCR-Amplifikation erfolgreich, aber Banden „nicht direkt sequenzierbar“

Probenset 3: Zelllinien (4 Laboratorien)

- PCR-Amplifikation größerer Fragmente funktioniert
- Hier: (3x) PCR-Amplifikation und Sequenzierung des Provirus erfolgreich
- (1x) PCR-Amplifikation erfolgreich, aber Banden „nicht direkt sequenzierbar“

Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis des Transgens mit Hilfe der flankierenden LTR-Primer und Einsatz einer speziellen Polymerase für große PCR-Produkte (z.B. GoTaq® Long PCR Master Mix) grundsätzlich mit DNA-haltigen Templates funktioniert. Da die LTR-Primer jedoch bei einigen Probenmaterialien mehrfach in der LTR-Region binden, können teilweise zwei Amplifikate entstehen.

Sofern nur ein PCR-Produkt erhalten wird, ist eine direkte Ansequenzierung nach Aufreinigung häufig erfolgreich und zielführend.

12.2.3 Fazit zur LVU

Bewertung der (RT-) PCR-Nachweisverfahren

Insgesamt ist festzustellen, dass sich die in den Amtlichen Methoden G10.20-1 (12) und G10.40-2 (13) festgelegte Verfahrensweise zum Screening-Nachweis für lentivirale RNA eignet, aber entsprechende Erfahrung und Validierung in den Laboren voraussetzt.

Auch die über die Amtliche Methode G10.40-2 (13) zum Nachweis des HIV-1-Packaging Signals Ψ hinausgehenden verschiedenen, konventionellen (RT-) PCR-Verfahren sind grundsätzlich geeignet, um in der Überwachung spezifische Fragestellungen abzuklären, die über ein reines Screening auf lentivirale Sequenzen hinausgehen.

Zur Durchführung derart umfangreicher Laborvergleichsuntersuchungen wird jedoch empfohlen, zukünftig konkretere Vorgaben bezüglich Probenaufarbeitung und Analytik festzulegen, da dies die Aus- und Bewertung erleichtern würde.

Bewertung des DNase-Verdau

Als kritischer Faktor erwies sich bei der Anwendung der Amtlichen Methode zum Nachweis von viraler RNA bei einigen Laboren ein unvollständiger DNase-Verdau der RNA-1, so dass in RNA-2 noch Spuren von DNA vorhanden waren. Dadurch wurde eine Differenzierung zwischen RNA und DNA erschwert (teilweise trotzdem möglich anhand unterschiedlicher Ct-Werte bei (RT-) Real-time PCR und Real-time PCR) bzw. war im Extremfalle nicht möglich. Das Kit mit der besten Performance in der LVU war das auch in der Amtlichen Methode angegebene RNase-Free DNase Set (Qiagen). Jedes Labor muss daher im Rahmen seiner laborinternen Validierung sicherstellen, dass dieser kritische und entscheidende Schritt bei der Aufarbeitung der RNA funktioniert, um die nachfolgenden (RT-) Real-time PCR-Ergebnisse eindeutig bewerten zu können.

13 Literatur

1. C. Baum, A. Schambach, J. Bohne, M. Galla, Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther* **13**, 1050-1063 (2006).
2. A. Schambach, D. Zychlinski, B. Ehrnstroem, C. Baum, Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **24**, 132-142 (2013).
3. A. Soria *et al.*, Occupational HIV Infection in a Research Laboratory With Unknown Mode of Transmission: A Case Report. *Clin Infect Dis* **64**, 810-813 (2017).
4. J. Eberle, J. Habermann, L. G. Gürtler, HIV-1 infection transmitted by serum droplets into the eye: a case report. *AIDS* **14**, 206-207 (2000).
5. J. T. Evans, J. V. Garcia, Lentivirus vector mobilization and spread by human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* **11**, 2331-2339 (2000).
6. *Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Stabile und transiente Genexpression mithilfe γ -retroviraler und lentiviraler Vektoren* (aktualisiert Februar 2020).
7. S. J. Rulli *et al.*, Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J Virol* **81**, 6623-6631 (2007).
8. A. Telesnitsky, S. L. Wolin, The Host RNAs in Retroviral Particles. *Viruses* **8**, (2016).

9. *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 2: Tumorerkrankungen.* (D. Ganten und K Ruckpaul, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1998).
10. C. Bagutti, M. Schmidlin, M. Nueller, P. Brodmann. (Applied Biosyfyety, 2012), vol. 17, pp. 188-197.
11. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-2: Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die Überwachung nach dem Gentechnikrecht - Begriffe und Definitionen* - (Aug. 2010).
12. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 10.20-1: Isolierung von Virus-RNA mittels Festphasenextraktion* (Aug. 2010).
13. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 10.40-2: Nachweis von HIV-1-abgeleiteten lentiviralen Nukleinsäuren mittels reverser Transkription und real-time PCR* (Jun. 2014).
14. A. Sakudo, T. Onodera, Virus capture using anionic polymer-coated magnetic beads (review). *Int J Mol Med* **30**, 3-7 (2012).
15. A. Sakudo, K. Ikuta, A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads. *Int J Mol Med* **30**, 437-442 (2012).
16. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-1: Probenahme- und Untersuchungsverfahren für die Überwachung nach dem Gentechnikrecht - Allgemeine Hinweise und Anforderungen* - (Aug. 2010).
17. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-3: Probenahmeverfahren - Allgemeine Hinweise und Anforderungen* - (Aug. 2010).
18. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 10.10-1: Probenahme von Viren auf Laboroberflächen* (Aug. 2010).
19. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-4: Verfahren zur Nukleinsäureextraktion - Allgemeine Hinweise und Anforderungen* - (Aug. 2010).
20. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-5: Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Allgemeine Hinweise und Anforderungen* - (Sep. 2009).
21. L. Sastry *et al.*, Certification assays for HIV-1-based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol Ther* **8**, 830-839 (2003).
22. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-6: Nachweis gentechnisch veränderter Mikroorganismen - Untersuchungsablauf* - (2018-08).

Anhang A1: Nachweisverfahren

A1.1. Chemikalien und Reagenzien

Bezüglich der allgemeinen Anforderungen an die Reagenzien wird auf die amtliche Methode G 00.00-1 (16) verwiesen.

Hinweis: Die Verfahren wurden mit den Geräten, Chemikalien und Lösungsmittel der angegebenen Hersteller durchgeführt. Prinzipiell können auch Produkte von anderen Herstellern verwendet werden, sofern gezeigt wird, dass sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

- QIAamp Viral RNA Mini Kit
- RNase-freie DNase, z. B. RNase-free DNase Set (QIAGEN, Art. Nr.79254)
- Hot-Star-Polymerase, z.B. AmpliTaq Gold® Polymerase
- QIAGEN® One Step RT-Kit
- GoTaq® Long PCR Master Mix, 2X (PROMEGA)
- QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN)
- QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)

Tabelle 4: Oligonukleotide

Primer	Primersequenz (5'-3')	Accession Nr.	Größe [bp]	Nachweis	Annealingtemperatur [°C]
Nachweis lentiviraler Sequenzen in Transferplasmiden					
HIV-1-PSS_1F (13)	CGCAGGACTCGGCTTGCT	NC_001802	137	HIV-1 Packaging Signal Lentiviren	60
HIV-1-PSS_1R (13)	GACGCTCTCGCACCCAT				
HIV1-PSS-1S (13)	CCYCTCGCCTCTTGTCYGTGYGCRC				
HIV-1-RRE-1F	ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTG	NC_001802	669	HIV-1-RRE Sequenz	60
HIV-1-RRE-1R	GAGGTGGGTCTGAAACGATAATG				
Nachweis unerwartete lentivirale Übergangssequenzen (Rekombination?, Wildtypsequenzen?)					
HIV-1-Ψ-gag-2F (21)	CAGGACTCGGCTTGCTGAA	NC_001802	554	HIV-1- Packaging Signal Lentiviren – gag Übergangssequenz	55
HIV-1-Ψ-gag-2R (21)	GGTGATATGGCCTGATGTACCA				
Nachweis lentiviraler Sequenzen in gag-pol-Verpackungsplasmiden					
HIV-1-gag-1F	ACTCTAAGAGCCGAGCAAGC	NC_001802	177	HIV-1 gag	57
HIV-1-gag-1R	TCTTGCTTTATGGCCGGGTC				
HIV-1-gag-pol-1F	GCTGTTGGAAATGTGGAAAG	NC_001802	957	HIV-1-gag-pol Übergangssequenz	53
HIV-1-gag-pol-1R	TATCTAATCCCTGGTGTCTC				

Primer	Primersequenz (5´-3´)	Accession Nr.	Größe [bp]	Nachweis	Annealing-temperatur [°C]
HIV-1-pol-1F	GTCCCCCTAACGGACACAAC	NC_001802	212	HIV-1 <i>pol</i>	59
HIV-1-pol-1R	GGTACCCATGCCAGGTAGAC				
Nachweis env-Verpackungsplasmide (Pseudotypisierung)					
VSV-G-F	AACTGGAGGCAAGGCCTGCAA	AJ318514	444	Vesicular stomatitis Virus Glykoprotein VSV/ Pseudotypisierung	59
VSV-G-R	GCCCAGTCATCCCACAGTTCCC				
Nachweis des Transgenen Bereiches HIV-1 basierter lentiviraler Vektoren					
LTR_long2-F	CTAGAGATCCCTCAGACCCT	NC_001802	Variabel (>3 kb) GoTaq	Bereich zwischen den HIV-1-LTRs	65 (Touch Down)
LTR_long3-R	CTAGTTAGCCAGAGAGCTCC				

A1.2. Kontrollen

In jeder (RT-)PCR-Reaktion werden, sofern vorhanden, mindestens folgende Kontrollen mitgeführt:

- (RT-)PCR-Reaktionskontrolle (NTC no template control): (RT-)PCR-Reaktionsansatz, der mit Wasser anstelle von Nukleinsäure versetzt wird
- Positivkontrolle: Nukleinsäure, die mit Sicherheit die spezifische nachzuweisende Nukleinsäuresequenz enthält (z.B. eine schon gemessene Probe, welche klar positiv war)
- Negativkontrolle: Nukleinsäure, die mit den eingesetzten Primern die nachzuweisende Sequenz nicht enthält
- Negative Extraktionskontrolle (NEK): Eine Probe, die während der Extraktion der Nukleinsäuren mitgeführt wurde, die aber mit Sicherheit keine Nukleinsäure der nachzuweisenden Spezifität enthält z.B. Wasser, Puffer oder nicht transgenes Probenmaterial
- Amplifikationskontrolle: Positive Amplifikationskontrolle, die anzeigt, dass die Nukleinsäure aus einer Probe in ausreichender Menge und Qualität isoliert wurde.

A1.3. Reaktionsansätze für konventionelle PCR bzw. RT-PCR-Analysen

Die (RT-)PCR wird in dünnwandigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen von 25 µl Reaktionsansatz mit den in nachfolgenden Tabellen angegebenen Reagenzien. Es wird ein (RT-)PCR-Mix hergestellt, der alle Komponenten außer der Proben-Nukleinsäure enthält. Die benötigte Menge an (RT-)PCR-Mix richtet sich nach der Anzahl der durchzuführenden Reaktionen.

- PCR-Mix bzw. (RT-)PCR-Mix gut mischen, kurz zentrifugieren und jeweils 24 µl (bzw. 20 µl bei GoTaq® Long PCR- Reaktionsansatz) in die Reaktionsgefäße pipettieren.
- Für die Reaktionskontrolle (NTC) Wasser anstelle von Probe in den entsprechenden Ansatz pipettieren.
- In die übrigen Ansätze entweder Nukleinsäure-Extrakt bzw. jeweilige Kontrolllösung pipettieren.
- Die Reaktionsansätze sorgfältig verschließen, in das PCR-Gerät überführen und das Temperatur-Zeit-Programm (siehe Tabelle 8 - Tabelle 10) starten.

- Die PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese oder einem alternativen Elektrophorese-System (z.B. Chip-basierte Elektrophorese) analysiert.

Der PCR-Reaktionsansatz für die Analyse von DNA wird standardmäßig, sofern nicht anders angegeben, mit einer Hot Start Taq-Polymerase angesetzt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz PCR

Reagenzien	Endkonzentration	PCR-Ansatz
	Konzentration anpassen gemäß SOP	1 Ansatz (µl)
10 x PCR-Puffer (mit MgCl ₂)	1x	2,5
1 mM dNTPs	0,1 mMol/l	2,5
Primer 1 (20 µmol/l)	400 nMol/l	0,5
Primer 2 (20 µmol/l)	400 nMol/l	0,5
Hot-Start Taq-Polymerase	0,5-1U	0,1
Zusatz:		
Probe/ Template	20 ng	1
steriles Reinstwasser		ad 25

Für die Analyse von RNA wird das QIAGEN® One Step RT-PCR Kit (Fa. Qiagen) genutzt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz QIAGEN® One Step RT-Kit

Reagenzien	Endkonzentration	PCR-Ansatz
	Konzentration anpassen gemäß SOP	1 Ansatz (µl)
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	1x	5
dNTP Mix	0,1 mMol/l	1
Primer 1 (20 µmol/l)	400 nMol/l	0,5
Primer 2 (20 µmol/l)	400 nMol/l	0,5
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1x	1
5xQ-Solution	1x	5
Probe/ Template		1
RNase - free H ₂ O		ad 25

Für die Amplifizierung großer DNA-Fragmente (bis zu 30 kb) wird die PCR mit GoTaq® Long PCR Master Mix (Fa. Promega) angesetzt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz GoTaq® Long PCR Master Mix

Reagenzien	Endkonzentration	PCR-Ansatz
	Konzentration anpassen gemäß SOP	1 Ansatz (µl)
GoTaq® Long PCR Master Mix, 2X	1x	12,5
Primer LTR_long2_f (20 µmol/l)	400 nMol/l	0,5
Primer LTR_long3_r (20 µmol/l)	400 nMol/l	0,5
Probe/ Template	Bis 500 ng*	5
RNase - free H ₂ O		ad 25 µl

Empfehlung des Herstellers: 50 ng– 250 ng humane genomische DNA pro Ansatz,
0,25 – 2,5ng für weniger komplexe Templates, z.B. Plasmide

A1.4. Temperatur-Zeit-Programme für konventionelle PCR und RT-PCR

Tabelle 8: Temperatur-Zeit-Programm für konventionelle PCR

Schritt	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung	95	10	1	
2	Amplifikation	Denaturierung	95	1	35 ²
		Anlagerung (Annealing)	s. Tabelle 4	1	
		Verlängerung (Elongation)	72	2	
3	Terminale Verlängerung (Elongation)	72	10	1	

Tabelle 9: Temperatur-Zeit-Programm für konventionelle RT (Reverse Transkriptase) - PCR

Schritt	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	
1	Reverse Transkriptase	50	30	1	
2	Initiale Denaturierung	95	15	1	
3	Amplifikation	Denaturierung	95	1	35
		Anlagerung (Annealing)	s. Tabelle 4	1	
		Verlängerung (Elongation)	72	1	
4	Terminale Verlängerung (Elongation)	72	10	1	

Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Programme für konventionelle GoTaq® Long PCR

Schritt	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung	95	2	1	
2	Touchdown Amplifikation	Denaturierung	95	0,5	10
		Anlagerung (Annealing)	65 - 0,5 / Zyklus*	1	
		Verlängerung (Elongation)	72	10	
3	Amplifikation	Denaturierung	95	0,5	25
		Anlagerung (Annealing)	60	1	
		Verlängerung (Elongation)	72	10	
4	Finale Elongation	72	10	1	

² Für die Überprüfung von RNA-2 auf die Abwesenheit von DNA ist es wichtig RT-PCR und PCR mit der gleichen Zykluszahl durchzuführen. Abhängig vom Erfolg des DNase-Verdau muss dafür bei Bedarf die Zykluszahl für eine Differenzierung erhöht werden.

* **Hinweis des Herstellers:** Anstelle des Touch down Programmes kann die GoTaq® Long PCR auch bei der für das verwendete Primerpaar optimalen Annealing-Temperatur durchgeführt werden. Für die Elongationszeit werden pro 1 kB Fragmentlänge eine Minute empfohlen.

A1.5. Reaktionsansätze für Real-time PCR bzw. (RT)-Real-time PCR

Tabelle 11: Reaktionsansatz für Real-time PCR und (RT)-Real-time PCR (13)

Reagenzien	Reaktionsansatz (RT Real-time PCR) [µl]	Reaktionsansatz (Real-time PCR) [µl]
Proben- RNA oder Kontrollen	5	5
Real-time PCR-Master Mix, z.B. QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN)	-	1x konzentriert
qRT-PCR-Master Mix, z.B. QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)	1x konzentriert	---
Primer HIV-1-PSS_F [10 µmol/l]	1	1
Primer HIV-1-PSS_R [10 µmol/l]	1	1
Sonde HIV-1-PSS_FAM [10 µmol/l]	0,38	0,38
Wasser, RNase frei	Differenz bis 25	Differenz bis 25

- Den (RT-)PCR- Mix gut mischen, kurz zentrifugieren und jeweils 20 µl in die Reaktionsgefäße/ Mikrotiterplatte pipettieren.
- Für die PCR- Reaktionskontrolle 5 µl Wasser in den entsprechenden Ansatz pipettieren.
- In die übrigen Ansätze entweder 5 µl RNA- Extrakt, 5 µl der negativen Extraktionskontrolle oder 5 µl der Positivkontrolle pipettieren.
- Gegebenenfalls weitere Amplifikationskontrollen (z.B. PCR- Inhibitionskontrolle) ansetzen.
- PCR-Platte mit Klebefolie (oder Deckel) sorgfältig verschließen, die Reaktionsansätze in das real-time PCR-Gerät überführen und das jeweilige Temperatur-Zeit-Programm (s. A1.6) starten.

A1.6. Temperatur-Zeit-Programme für Real-time PCR und (RT)-Real-time PCR

Tabelle 12: Temperatur-Zeit-Programm für die (RT)-Real-time PCR (13)

Schritt	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	
1	Reverse Transkription	50	30	1	
2	Initiale Denaturierung	95	15	1	
3	Amplifikation	Denaturierung	94	0,25	45
		Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation)	60	1	

Tabelle 13: Temperatur-Zeit-Programm für die Real-time PCR (13)

Schritt	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung	95	15	1	
2	Amplifikation	Denaturierung	94	0,25	45
		Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation)	60	1	

A1.7. Leistungsmerkmale der Methoden

Die Verfahren wurden im Rahmen von Einzellaborvalidierungen auf ihre Eignung geprüft (A1.8 - A1.10 und nachfolgend in einer Laborvergleichsuntersuchung des Ausschusses Methodenentwicklung von verschiedenen Laboren getestet. Die detaillierten Ergebnisse der einzelnen Labore sind in Kapitel Anhang A2: dargestellt.

A1.8. Nachweisgrenze

Die praktischen Nachweisempfindlichkeiten der einzelnen (RT-)PCR-Verfahren wurden im Rahmen einer Einzellaborvalidierung mit einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA (HIV-1-pNL4-3; 14,8 kb bzw. für den VSV-G Nachweis mit pMD2.G; 5822 bp) in 10 Parallelen bestimmt.

Tabelle 14: Nachweisgrenzen der verschiedenen PCR-Nachweise

PCR-Nachweis (Primerpaar)	Länge PCR- Produkt [Bp]	Nachweisgrenze	Kopien**
HIV-1-PSS_1F HIV-1-PSS_1R	137		<100 (13)
HIV-1-Ψ-gag-2F HIV-1-Ψ-gag-2R	554	1 fg (10+/10)*	60
HIV-1-gag-1F HIV-1-gag-1R	177	1 fg (10+/10)*	60
HIV-1-pol-1F HIV-1-pol-1R	212	100 ag (10+/10)*	6
HIV-1-gag-pol-1F HIV-1-gag-pol-1R	957	10 fg (10+/10)*	600
HIV-1-RRE-1F HIV-1-RRE-1R	669	100 ag (10+/10)*	6
VSV-G-F VSV-G-R	444	100 ag (10+/10)*	15

* Anzahl positive PCRs bei 10 Parallelen;

** Größe der verwendeten Plasmide: pNL4-3: 14825 bp; pMD2.G: 5822 bp

A1.9. Theoretische Spezifität

Durch die Methodenentwickler wurden die Primersequenzen mittels BLASTN auf Spezifität für HIV-1 sowie für die daraus abgeleiteten Vektorsysteme getestet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Durch die Kombination der verschiedenen PCR - Nachweisverfahren bei der Analyse von DNA bzw. RNA lassen sich Aussagen auf das Vorliegen von viralen Sequenzen aus den Helfer- und Verpackungsplasmiden und / oder von RNA aus den Verpackungszelllinien ableiten sowie nach Berücksichtigung der Anmerkungen in Kapitel 10.1 gegebenenfalls Hinweise auf Rekombinationsereignisse ableiten.

A1.10. Praktische Spezifität

Die PCR-Nachweisverfahren wurden im Rahmen von Einzellaborvalidierungen an lentiviralen Vektorsystemen [(Transferplasmide (2), Verpackungsplasmide (6)], an Virusüberständen (9) sowie an transduzierten Zelllinien (16) validiert. Kreuzreaktionen mit Murine Leukemia Virus (MLV)-Vektorsystemen (3) wurden nicht festgestellt.

Tabelle 15: Überprüfung der Spezifität der Lentivirus-Nachweise an verschiedenen Matrices (Ergebnisse aus Einzellaborvalidierung)

Matrix	Anzahl getestet*	Nukleinsäure	HIV1_PSS_1F / HIV1_PSS_1R	HIV1-RRE-1F / HIV1-RRE-1R	HIV1-psi-gag-2F / HIV1-psi-gag-2R	HIV1-gag-1F / HIV1-gag-1R	HIV1-pol-1F / HIV1-pol-1R	HIV1-gag-pol-1F / HIV1-gag-pol-1R	VSV-G-F / VSV-G-R
virale Zielsequenz			Psi	RRE	Psi-gag	gag	pol	gag-pol	VSV-G
Vektorplasmide									
Transferplasmide	2	DNA	+	+	-	-	-	-	-
Helferplasmide	5	DNA	-	+	-	+	+	+	-
Verpackungsplasmide	3	DNA	-	-	-	-	-	-	+
MLV-Vektoren	3	DNA	-	-	-	-	-	-	-
Lentivirale Viruspartikel (Virusstocks/ Zellkulturüberstände)									
Virusstocks/ Zellkulturüberstände	13	DNA / RNA	+	+	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)
Lentiviral transduzierte Zielzellen									
Transduzierte Zelllinien	Nach 1. Passage	DNA / RNA	+	+	+	+	+	+	+
	6								
Transduzierte Zelllinien	Nach 3. Passage	DNA / RNA	+	+	-	-(2+)	-(2+)	-	-
	16								

+ = positiv; - = negativ; schwarz: Nachweis erwartet, rot: Nachweis unerwartet
 (Anzahl): Anzahl der Proben, für die Ergebnis zutreffend war, bezogen auf Anzahl getestet insgesamt

Anhang A2: Detaillierte Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung

In der nachfolgenden Tabelle 16 sind in den Teiltabellen (1a) – (3a) die Ergebnisse der in Kapitel 12 beschriebenen Laborvergleichsuntersuchung für alle (RT)-PCR-Nachweisverfahren und die drei Probenkits für alle teilnehmenden Labore detailliert dargestellt.

Tabelle 16: Zusammenstellung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung für alle (RT)-PCR-Nachweisverfahren und die drei Probenkits für alle teilnehmenden Labore

(1a) HIV-1 Packaging Signal Ψ , Lentiviren (nach G 10.40-2):

- HIV-1-PSS-1F/ HIV-1-PSS-1R/ Sonde: HIV-1-PSS_FAM

(2a) HIV-1-RRE (Rev responsive element):

- HIV-1-RRE-1F/ HIV-RRE-1R

(2b) HIV-1-Packaging Signal Ψ – gag Übergangssequenz:

- HIV-1-psi-gag-2F/ HIV-1-psi-gag-2R

(2c) HIV-1 gag:

- HIV-1-gag-1F/ HIV-1-gag-1R

(2d) HIV-1 pol:

- HIV-1-pol-1F/ HIV-1-pol-1R

(2e) HIV-1-gag-pol Übergangssequenz:

- HIV-1-gag-pol-1F/ HIV-1-gag-pol-1R

(2f) Vesicular stomatitis Virus Glykoprotein (VSV / Pseudotypisierung):

- VSV-G-F/ VSV-G-R

(2g) Grün fluoreszierendes Protein (EGFP):

- EGFP-F/ EGFP-R

(3a) Identifizierung des transgenen Bereichs HIV-1-basierter lentiviraler Vektoren:

- LTR_long2_f/ LTR_long3_r

(1a) HIV-1 Packaging Signal Ψ , Lentiviren (G 10.40-2); Zahlenwerte = Ct-Werte

Probe		Labor															
Matrix	Proben-Nr.	LGL				1				2				3			
		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase	
		RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR
Vektorpartikel	# 0001	24	25,4	25,3	30,8	22,7	26,1	25,3	-	18,8	24	21,7	-	19,2	25,0	22	-
	# 0002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	# 0003	18,5	20,8	20,1	27,6	17,2	21,2	20,5	-	12,9	18,7	15,6	-	13,4	19,4	15,4	-
Plasmide	# 0005	17,9	18				17,8			17,1	17,3			17,5	15,3		
	# 0006	-	-				-			43,2	36,6			-	-		
	# 0007	10,5	10,9				11			8,8	8,9			8,8	10,4		
Zelllinien	# 0010	-	-				-			-	-	-	-	-	-		
	# 0011	-	-				-			-	-	-	-	-	-		
	# 0012	20,1	20,5	26,5	26,8	24,1	24,2	29,8	-	21,3	21,5	26,4	-	20,4	21,7		

Probe		Labor															
Matrix	Proben-Nr.	4				5				6				7			
		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase		RNA-1 Vor DNase		RNA-2 Nach DNase	
		RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR
Vektorpartikel	# 0001	32,5	31	38	-	21,2	25,9	23,9	-		23	21	25		25,2	24,2	-
	# 0002	-	-			-	-	-	-		-	-	-		-	-	-
	# 0003	26,3	24,5	30	29,5	14	19,9	15,7	(-) 38		17	16	19		20,8	17,5	-
Plasmide	# 0005		18							14					15,1		
	# 0006		-							33					-		
	# 0007		16							8					9,9		
Zelllinien	# 0010		-							-					33,7		
	# 0011		-							-					-		
	# 0012		25,8							19					20,1	31,2	-

	positiver RNA-Nachweis in RNA-2
	positiver RNA-Nachweis in RNA-2, aber DNase-Verdau unvollständig (unterschiedliche Ct-Werte)
	kein sicherer RNA-Nachweis, sondern eher DNA-Nachweis aufgrund von unvollständigem DNase-Verdau (gleicher Ct-Wert)

	nicht bestimmt
	- negatives Ergebnis
	falsch positiv

(2a) HIV-1-RRE (Rev responsive element)

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	+/+	+	+	nd	+	-
	# 0002	-	-	-/-	-	-	nd	-	-
	# 0003	+	+	+/+	+	+	nd	+	+
Plasmide	# 0005	+	+	+	+	+	nd	+	+
	# 0006	-	-	-	-	-	nd	+	-
	# 0007	+	+	+	+	+	nd	+	+
Zelllinien	# 0010	-	-	-	-	-	nd	+	-
	# 0011	-	-	-	-	-	nd	-	-
	# 0012	-	-	-	-	-/(+)*	nd	-	-
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1/2 ↓ RT-PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1 ↓ RT-PCR		RNA-2 ↓ PCR	RNA-1 ↓ PCR

(2b) HIV-1-Packaging Signal Ψ – gag Übergangssequenz

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	+/+**	-	+	nd	nd	-
	# 0002	-	-	-/-	-	-	nd	nd	-
	# 0003	+	+	+/+**	+	+	nd	nd	+
Plasmide	# 0005	+	+	+	+	+	nd	nd	+
	# 0006	-	-	+**	-	-	nd	nd	-
	# 0007	+	+	+	+	+	nd	nd	+
Zelllinien	# 0010	-	-	-	-	-	nd	nd	-
	# 0011	-	-	-	-	-	nd	nd	-
	# 0012	+	+	+	+	-	nd	nd	+
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1/2 ↓ RT-PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1 ↓ RT-PCR		RNA-2 ↓ PCR	RNA-1 ↓ PCR

+	positives Ergebnis
+	unvollständiger DNase-Verdau (bei RNA-2)
nd	nicht durchgeführt
*	mit einem alternativen HIV1-RRE-R Primer wurde das auf 234 bp verkürzte Element nachgewiesen.

-	negatives Ergebnis
-	falsch negativ
+	falsch positiv
**	falsche Fragmentgröße, 380 bp

(2c) HIV-1-gag

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	+/+	+	nd	nd	nd	+
	# 0002	-	-	-/-	-	nd	nd	nd	-
	# 0003	+	+	+/+	+	nd	nd	nd	+
Plasmide	# 0005	+	+	+	+	nd	+	nd	+
	# 0006	-	-	(+)	-	nd	-	nd	-
	# 0007	+	+	+	+	nd	+	nd	+
Zelllinien	# 0010	-	-	-	-	nd	-	nd	-
	# 0011	-	-	-	-	nd	-	nd	-
	# 0012	-	-	-	-	nd	-	nd	-
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1 /-2 ↓ RT-PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR				RNA-1 ↓ PCR

(2d) HIV-1-pol

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	nd	+	nd	nd	nd	+
	# 0002	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-
	# 0003	+	+	nd	+	nd	nd	nd	+
Plasmide	# 0005	+	+	nd	+	nd	nd	nd	+
	# 0006	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-
	# 0007	+	+	nd	+	nd	nd	nd	+
Zelllinien	# 0010	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-
	# 0011	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-
	# 0012	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1 /-2 ↓ RT-PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR				RNA-1 ↓ PCR

+	positives Ergebnis
nd	nicht durchgeführt

-	negatives Ergebnis
+	falsch positiv

(2e) HIV-1-gag-pol

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd
	# 0002	-	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
	# 0003	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd
Plasmide	# 0005	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd
	# 0006	-	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
	# 0007	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd
Zelllinien	# 0010	-	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
	# 0011	-	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
	# 0012	-	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1/2 ↓ RT-PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR				RNA-1 ↓ PCR

(2f) Vesicular stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G / Pseudotypisierung)

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	+/+	+	+	nd	nd	+
	# 0002	-	-	-/-	-	-	nd	nd	-
	# 0003	+	+	+/+	+	+	nd	nd	+
Plasmide	# 0005	-	-	-	-	-	-	nd	-
	# 0006	+	+	+	+	+	+	nd	+
	# 0007	-	-	-	-	-	-	nd	-
Zelllinien	# 0010	-	-	-	-	-	-	nd	-
	# 0011	-	-	-	-	-	-	nd	-
	# 0012	-	-	-	-	-	-	nd	-
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1/2 ↓ RT-PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR				RNA-1 ↓ PCR

+	positives Ergebnis
nd	nicht durchgeführt

-	negatives Ergebnis
---	--------------------

(2g) Grün fluoreszierendes Protein (EGFP)

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+	+	nd	+	+	nd	-	-
	# 0002	-	-	nd	-	-	nd		-
	# 0003	+	+	nd	+	+	nd	-	+
Plasmide	# 0005	-	-	nd	-	-	nd	-	-
	# 0006*	+	+	nd	+	-	nd	-	-
	# 0007	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Zelllinien	# 0010	+	+	nd	+	+	nd	+	+
	# 0011	-	-	nd	-	-	nd	+	-
	# 0012	+	+	nd	+	+	nd	+	+
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	RNA-2 ↓ RT-PCR		RNA-2 ↓ RT-PCR	RNA-1 ↓ RT-PCR		RNA-2 ↓ PCR	RNA-1 ↓ PCR

+	positives Ergebnis
nd	nicht durchgeführt
*	Anmerkung: Vorliegende Kontamination in Probe # 0006 mit einem EGFP-Plasmid an Nachweisgrenze; (Parallele Plasmid-Miniprep); nicht gewertet!

-	negatives Ergebnis
+	falsch positiv
-	falsch negativ

(3a) Identifizierung des transgenen Bereichs HIV-1-basierter lentiviraler Vektoren

Probe		Labor							
Matrix	Nr.	LGL	1	2	3	4	5	6	7
Vektorpartikel	# 0001	+ (3,5 kb)*	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
	# 0002	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
	# 0003	+ (3,5 kb)	nd	nd	+ (3,5 kb)	nd	nd	nd	nd
Plasmide	# 0005	+ (8,5 kb)**	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
	# 0006	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
	# 0007	+ (8,5 kb)	nd	nd	+ (6/10 kb)	nd	nd	nd	nd
Zelllinien	# 0010	(+)	nd	-	-	nd	nd	nd	(+)
	# 0011	(+)	nd	-	-	nd	nd	nd	-
	# 0012	+ (4 kb)***	nd	+ (4 kb)	+ (4 kb)	nd	nd	nd	+ (1,8/3 kb)***
Vorgehensweise bei Vektorpartikeln # 0001 - # 0003		RNA-1 ↓ PCR	□	RNA-1 ↓ PCR	RNA-1 ↓ PCR	□			RNA-1 ↓ PCR

(+)	schwache, unspezifische Bande, nicht sequenzierbar	-	falsch negativ
nd	nicht durchgeführt		

* Bande (ca. 3500 bp): Sequenz von Plasmid-Backbone

** Bande (ca. 8500 bp): Sequenz von Virus (HIV-1)

*** Bande (ca. 4000 bp): Sequenz von viralem Vektor

Teilnahme: 3 von 7 Laboratorien und LGL

Vektorpartikel (2 Laboratorien)

Nachweis aus Gesamtnukleinsäuren (RNA-1): 2 Laboratorien

→ PCR-Amplifikation größerer Fragmente aus RNA-1 (i.e. Plasmide) funktioniert

→ Problem: I.d.R. zwei Banden bei Transferplasmiden

→ (1x) PCR-Amplifikation und Sequenzierung (nur) des Plasmid-Backbones erfolgreich

▶ Verbesserungsvorschlag: „HIV-RRE-1F“ anstatt „LTR_long2_f“-Primer verwenden

→ (1x) Nicht sequenziert

Nachweis aus RNA-2: 1 Laboratorium

→ RT-PCR-Amplifikation größerer Fragmente aus RNA2 funktioniert nicht

Plasmide (2 Laboratorien)

→ Problem: I.d.R. zwei Banden bei Transferplasmiden (bzw. HIV-1 Gesamtgenomplasmiden)

→ Hier: (1x) PCR-Amplifikation und Sequenzierung des Virus-Anteils erfolgreich

(1x) PCR-Amplifikation erfolgreich, aber Banden „nicht direkt sequenzierbar“

Zelllinien (4 Laboratorien)

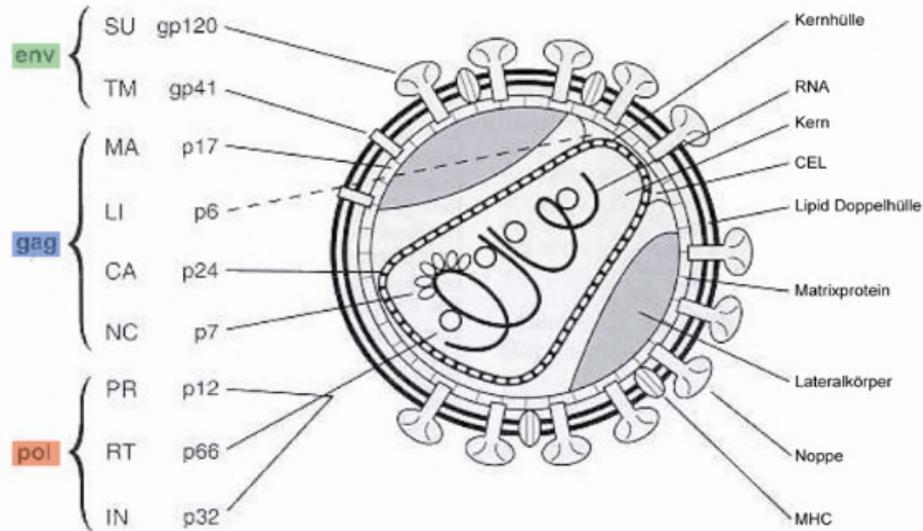
→ PCR-Amplifikation größerer Fragmente funktioniert

→ Hier: (3x) PCR-Amplifikation und Sequenzierung des Provirus erfolgreich

→ (1x) PCR-Amplifikation erfolgreich, aber Banden „nicht direkt sequenzierbar“

Anhang A3: Morphologie und Genomstruktur HIV-1

A



B

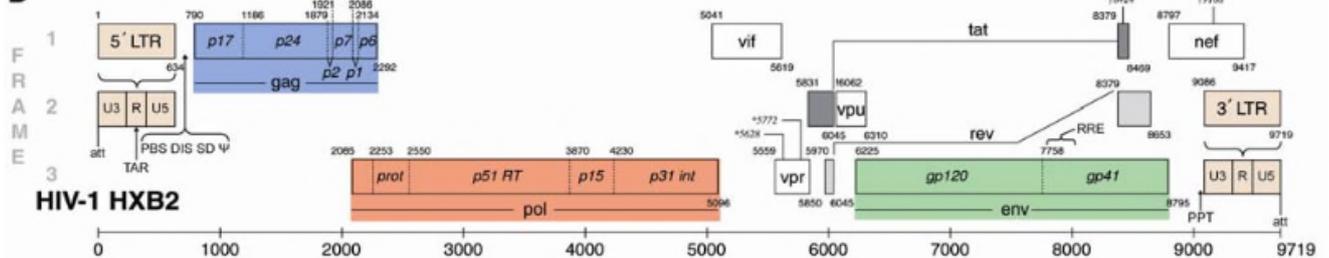


Abbildung 6 : Morphologie und Genomstruktur von HIV-1

Schematische Darstellung des HIV-1 Viruspartikels (A) und der Genomkarte (B).

Die Leserahmen (gag, pol, env) sind mit farbigen Kästchen hervorgehoben (B) deren Farbe und Beschriftung mit den hiervon exprimierten Genprodukten (A) korrespondiert. Die Exons der Proteine Tat und Rev sind jeweils durch Striche miteinander verbunden. Die akzessorischen und regulatorischen Genprodukte sind in (A) nicht dargestellt.

att: Anschlussstelle, CA, p24: Capsidprotein, CEL: Kern-Hülle Verbindung, DIS: Dimer Initiationsstelle, env: Leserahmen für Hüllenglykoproteine, gag: Leserahmen für Strukturproteine, IN, p32/p31, int: Integrase, LI, p6: Verbindungsprotein, LTR: lange terminale Repetition, MA, p17: Matrixprotein, MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, NC, p7: Nucleocapsidprotein, p2, p1: Spacerpeptid, PBS: Primerbindungsstelle, pol: Leserahmen für virale Enzyme, PPT: Polypurinbereich, PR, p12, prot: Protease, Ψ : Verpackungssignal, R: Sequenz die an beiden Enden von RNA wiederholt ist, rev: Regulator der Expression viraler Proteine, RNA: Virales RNA - Genom, RRE: Rev Bindungsstelle. RT, p66, (p51+p15): Reverse Transkriptase, SD: Spleißdonor, SU, gp120: externes Glykoprotein, TAR: Tat-Bindungsstelle, tat: Transaktivator der Transkription, TM, gp41: transmembranes Glykoprotein, U3: einzigartige Sequenz typisch für das 3' Ende von RNA, U5: einzigartige Sequenzen typisch für das 5' Ende von RNA, vif: Virion Infektiositätsfaktor, vpr: virales Protein R, vpu: virales Protein U, nef: negativer Faktor

[Abbildung aus: Roßmann, Oliver (2008). Optimierung und Charakterisierung des lentiviralen Gentransfers in humanen mesenchymalen Stammzellen. S.24] https://edoc.ub.uni-muenchen.de/8058/1/Rossmann_Oliver.pdf

- (A) Modifiziert nach (Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M. A. (1987). *Virology* 156 [1], 171-176; Gelderblom, H. R. (1997). *HIV Molecular Immunology Database* 1997. IV-37-IV-50. Los Alamos, NM, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.)
- (B) Modifiziert nach (Bette T.M.Korber et al. 2005; Coffin et al. 1997).