

## Schlussbericht

**Zuwendungsempfänger:** Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., hier: MPIIB für Infektionsbiologie, Abteilung Molekulare Biologie (MPIIB)

**Förderkennzeichen:** **FK 0316189E**

**Vorhabenbezeichnung:** **CellSys** – Systembiologischer Ansatz zur Entwicklung einer Produktionszelllinie für Influenzavakzine – **Teilprojekt A (MPIIB):** Charakterisierung und Selektion lentiviral transduzierter Zelllinien hinsichtlich verbesserter Influenzavirus-Replikation  
**Teilprojekt E (der FOCS):** Generierung und Validierung von lentiviralen shRNA Konstrukten für die Entwicklung einer Produktionszelllinie für Influenzavakzine Auf Grund des Ausscheidens der Focus Biomed (FOCS) aus dem Konsortium hat das MPIIB vom 1. Januar 2014 bis zum 30. September 2014 die Aufgaben des ehemaligen Partners übernommen. Zum 1. Oktober 2014 wurde als neuer Partner das Steinbeis Center for Systems Biomedicine (SIZ-CSB) operativ tätig.

**Laufzeit des Vorhabens:** **01.01.2013 – 31.12.2015**

### I. Kurze Darstellung zu

#### 1. Aufgabenstellung:

Hauptziel des Verbundprojektes CellSys war die Optimierung eines zellkulturbasierten Prozesses zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen mit Hilfe eines systembiologischen Ansatzes.

Die Arbeiten, die vom MPIIB übernommen wurden, konzentrierten sich auf die Selektion modifizierter humaner Zellen mit optimierter Influenzareplikation. Aufgabe des MPIIB war es zunächst, Kandidatengene zu identifizieren, die nach Knockdown oder Überexpression in humanen Zellen einen positiven Effekt auf die Influenzareplikation ausübten. Dazu wurden zunächst einzelne transduzierte Zellen durch lentivirale Transduktion generiert und hinsichtlich verbesserter Virusreplikation untersucht. (AP-1). Des Weiteren sollten die lentiviralen Vektoren in Kombination eingesetzt werden, um in einem „Pool-Screening“- Ansatz die ideale Zusammensetzung an Knockdown bzw. Überexpression ermitteln zu können.

Im zweiten Schritt sollte die Funktion einzelner zellulärer Faktoren während der Virusreplikation mittels unterschiedlicher virologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht werden und die theoretischen Modellierungsansätze experimentell validiert werden (AP2).

Schließlich sollte die detaillierte Analyse der Virusreplikation positiver Kandidaten in modifizierten AGE1.HN Zellen der Firma Probiogen erfolgen (AP3).

#### 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

- Das MPIIB verfügte bereits zu Beginn des Vorhabens über eine ausgewiesene Expertise auf dem Gebiet der Influenzaforschung sowie über ein umfangreiches Know How zum Screenen von lentiviral transduzierten humanen Zellen, in denen einzelne Gene modifiziert wurden.
- Bedingt durch das Ausscheiden der Firma Cevec aus dem Konsortium Anfang 2013 kam es zu einer Verschiebung des Projektstarts um sechs Monate.
- Verzögerungen, die aus dem Ausscheiden der FOCS resultierten, wurden durch die Übernahme der FOCS-Tätigkeiten durch das MPIIB ausgeglichen.

### 3. Planung und Ablauf des Vorhabens:

In Rahmen des Vorhabens wurden trotz zweifacher Änderungen des Konsortiums alle Arbeitspakete erfolgreich bearbeitet. Die unter Punkt I.1 genannten Ziele dieses Arbeitspaketes wurden mit Erreichen der folgenden Meilensteine größtenteils erfüllt:

- Meilenstein M1-1 „Lentivirale Transduktion zur gezielten Beeinflussung der Expression von Kandidaten“ wurde erfolgreich abgeschlossen
- Meilenstein M1-2 „Analyse der infektiösen Viruspartikel im Überstand lentiviral transduzierten A549 Zellen“ wurde erfolgreich abgeschlossen
- Meilenstein M1-3 „Etablierung und Durchführung des Pool Screening Verfahren“ wurde erfolgreich abgeschlossen
- Meilenstein M2-2: „Experimentelle Analyse der Kandidatenfunktion“ wurde erfolgreich abgeschlossen
- Meilenstein M2-3: „Überprüfung der Modellhypothese mittels experimenteller Ansätze“ konnte wegen fehlender Modellhypothesen nicht beendet werden.
- Meilenstein M3-2: „Detaillierte Charakterisierung der Virusdynamik in transduzierten AGE1.HN Zellen“ wurde wegen fehlender Knockdowneffizienz bzw. Cytotoxizität in AGE1.HN Zellen nicht erfüllt.

Trotz Abweichungen in der Zusammensetzung des Konsortiums konnte das Projekt durch den Ersatz eines Partners und die Übernahme der Projektarbeiten der Firma FOKUS durch das MPIIB erfolgreich durchgeführt werden.

#### 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde:

Das MPIIB verfügte bereits zu Beginn des Projektes über eine ausgewiesene Erfahrung auf dem Gebiet der Zell- und Molekularbiologie von Erreger-Wirtszell-Interaktionen sowie über ein umfangreiches Wissen zur Durchführung und Analyse von RNAi-Screens. Die Ergebnisse aus einem Influenza-spezifischen, genomweiten RNAi Screen stellten die Grundlage dieses Teilprojektes dar. Es wurden 168 zelluläre Proteine identifiziert, die die Virusreplikation unterstützten bzw. während der Replikation benötigt wurden. Zudem zeigten weitere 25 Proteine einen gegenteiligen Effekt, da sie die Virusvermehrung offenbar behinderten (Karlas et al., 2010; Patent PCT/EP2010/070548). Durch die Überexpression von benötigten zellulären Proteinen und dem Knockdown antiviral wirkender Faktoren sollte die Virusausbeute in einer humanen Zelllinie, die für die Impfstoffproduktion geeignet war, gesteigert werden.

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**

Nach Wissen des MPIIB wurden bei der Durchführung des Projektes keine bestehenden Patente oder Schutzrechte tangiert.

- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste**

Zur Literaturrecherche wurden internationale Veröffentlichungen zu den Stichworten „influenza virus“, „cellular factor“, „screen“, „siRNA“, „RNAi“ über folgende Literaturdatenbank herangezogen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Weiterführende Recherchen zu der Rolle der identifizierten bakteriellen Faktoren wurden mit Hilfe folgender Informationsdienste durchgeführt:

- Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>)
- STRING Database for functional protein association networks (<http://string.embl.de/>)
- KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- AmiGO Gene Ontology Database  
(<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/browse.cgi>)

## **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Das MPIIB arbeitete in AP1 sehr intensiv mit dem Partner SIZ-CSB zusammen, der die Herstellung der Doppel- und Triple-Knockdown Zelllinien und das Design der gRNAs übernahm sowie bei der Etablierung und Durchführung des Pool Screening Verfahrens half (AP1-3 und AP2-2). Bei diesem Pool Screening Verfahren wurden neben shRNA Knockdownzellen auch Überexpressionskonstrukte eingesetzt, die vom HZI zur Verfügung gestellt wurden (AP1-3). Die Zellen, die durch das MPIIB positiv auf verbesserte Influenzareplikation getestet worden waren, wurden für weitere Analysen an das MPIMD in Magdeburg geschickt (AP1-2). Die Produktionszelllinie AGE1.HN wurde von dem Partner ProBioGen zur Verfügung gestellt (AP3-2).

Alle wichtigen Fragen zur Zusammenarbeit der Partner wurden im Rahmen eines Konsortialvertrags geklärt.

## II. Eingehende Darstellung

### 1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele:

Ziel des Projektes war es die Influenzavirus-Vermehrung in einer humanen Designer Zelllinie signifikant zu steigern, um sie langfristig für eine effizientere Impfstoffproduktion einsetzen zu können.

In Arbeitspaket AP 1-1 „Lentivirale Transduktion zur gezielten Beeinflussung der Expression von Kandidaten“, das das MPIIB für SIZ-CSB durchführte, wurden hierzu für 28 Gene jeweils mindestens vier (teilweise acht) unterschiedliche shRNA Sequenzen designet und damit 142 shRNA-knockdown A549 Zelllinien hergestellt. Das Ziel war es, Zellen mit Knockdownraten  $\geq 70\%$  zu erzeugen, was bei 42 Zelllinien gelang. Als Positiv-Kontrolle wurden shRNA Knockdown-Zelllinien generiert, in denen die Expression der Gene IFNAR1 und DDX58 zu 80% und 75% inhibiert war. Insgesamt konnten für 5 Gene 3 Zelllinien, für 9 Gene 2 Zelllinien und für weitere 9 Gene eine Zelllinie mit einem mRNA knockdown von  $\geq 70\%$  hergestellt. Für 5 Genen gelang es selbst nach Klonierung von bis zu vier weiterer shRNA Konstrukte nicht eine Zelllinie mit einer Knockdownrate von  $\geq 70\%$  herzustellen. Auf Grund der kurzen Sequenz eines Gens konnten für dieses Gen keine neuen shRNA Sequenzen designet werden. Dennoch stand mit den erzeugten 42 Zelllinien eine ausreichend große Zahl für weitere Analysen zur Verfügung. Der Meilenstein M1-1 „Lentivirale Transduktion zur gezielten Beeinflussung der Expression von Kandidaten“ wurde somit erreicht.

Anschließend wurden in AP1-2 „Quantifizierung der Virusreplikation in transduzierten Zellen“ die zuvor generierten Knockdown Zellen herangezogen, um zu untersuchen, ob der Verlust des jeweiligen Genprodukts einen Einfluss auf die Influenzavirusreplikation hat. Hierfür wurden alle hergestellten shRNA-Zelllinien mit Knockdown-Effizienzen  $\geq 70\%$  anhand eines zuvor etablierten Virusreplikationsassays untersucht, um festzustellen, inwieweit die Inhibition eines der selektierten Gene die Virusreplikation positiv beeinflusst. Die shRNA exprimierenden A549 Zellen wurden zu diesem Zweck 24 Stunden mit Influenza A Viren (IAV) infiziert, und anschließend die Virusmenge im Überstand dieser Zellen durch Titration auf MDCK Zellen quantifiziert. Die Bestimmung des viralen Titers im Überstand wurde durch automatisierte Mikroskopie nach Färbung der Zellen mit einem IAV spezifischen NP-Antikörper sowie HOECHST-Färbung zur Detektion der Zellnuklei durchgeführt. Basierend auf diesen Analysen zeigten 21 Zelllinien eine mindestens zweifache Steigerung der Virusreplikation; Zellen, in denen die Gene „GRAMD4“ bzw. „C6ORF1“ inhibiert wurden, zeigten sogar eine 5fache Steigerung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die shRNA-Zelllinien, die einen deutlichen Effekt auf die Virusreplikation ausübten, wurden für weitere Analysen an das MPIMD nach Magdeburg geschickt. Der Meilenstein M1-2 „Analyse der infektiösen Viruspartikel im Überstand lentiviral transduzierten A549 Zellen“ wurde erreicht.

In AP1-3 „Pool Screening Ansatz“, das ab Oktober 2014 zusammen mit SIZ-CSB bearbeitet wurde, sollten unterschiedliche Knockdown- und Überexpressionskonstrukte zum Einsatz kommen, die in Kombination zu einer verstärkten IAV Replikation in den modifizierten Zellen führen sollten. Für das Pool-Screening-Verfahren wurden alle shRNA-Plasmide (mit Knockdown-Raten  $\geq 70\%$ ) sowie alle Überexpressions-Vektoren verwendet. Insgesamt wurden für den Pool Screen 39 Knockdown- und 5 Überexpressionskonstrukte eingesetzt. Der lentivirale Titer wurde dabei so gewählt, dass A549 Zellen mit einer MOI = 5 infiziert wurde, d.h. im Durchschnitt sollten sich Kombinationen aus 5 unterschiedlichen Knockdown/Überexpressionskonstrukten pro Zelle befinden. Das MPIIB, das in diesem Arbeitspaket die Herstellung der Einzelzellklone und die Analyse der Influenzareplikationsrate

in den erzeugten Zellen übernahm, hat nach lentiviraler Transduktion mit diesen Kombinationen aus Knockdown- und Überexpressionskonstrukten 5000 Zellen mittels FACS Sorter vereinzelt, die anschließend separat in fünfzig 96 Well-Platten kultiviert wurden. Ca. 400 Zellklone mit guten Wachstumseigenschaften wurden daraufhin dupliziert: Während eine Hälfte als Backup für die spätere Charakterisierung diente, wurde die andere Hälfte mit Influenza A/WSN/33 infiziert und anschließend die Virusmenge im Überstand dieser Zellen durch Titration auf MDCK Zellen quantifiziert. Die Bestimmung des viralen Titers im Überstand wurde durch automatisierte Mikroskopie nach Färbung der Zellen mit einem IAV spezifischen NP-Antikörper sowie HOECHST-Färbung zur Detektion der Zellnuklei durchgeführt. Zwanzig Zellklone (5% der untersuchten Zellklone) zeigten eine mehr als zweifach gesteigerte Virusreplikation. Die vielversprechendsten Kandidaten wurden anschließend in zwei weiteren Durchgängen auf verbesserte Virusreplikation getestet, und es fanden sich 7 besonders produktive Zellklone, die zur weiteren Charakterisierung (Identifikation der beteiligten Knockdown- und/oder Überexpressionskonstrukten) zu SIZ-CSB gesandt wurden. Der Meilenstein M1-3 „Etablierung und Durchführung des Pool Screening Verfahren“ wurde erreicht.

In AP2-2 „Experimentelle Analyse der Kandidatenfunktion“ wurde die Rolle einzelner, ausgewählter Kandidatengene auf die IAV Replikation mittels funktioneller Analysen genauer charakterisiert. Aufgrund der Ergebnisse aus AP1-2 lag der Fokus hier auf den beiden Genen GRAMD4“ und „C6ORF1“. Um die selektierten Gene noch genauer zu analysieren, wurde in Abweichung des Arbeitsplans eine neue innovative Methode eingesetzt, die CRISPR/Cas Technologie. Sie bietet im Unterschied zu anderen loss-of-function Analysen den Vorteil, dass das zu untersuchende Gen bereits auf DNA-Ebene und vollständig inaktiviert wird, so dass ein kompletter funktionaler Verlust des zu untersuchenden Gens eintritt. Diese Technologie, die sich somit hervorragend für das CellSys-Projekt eignet, wurde am MPIIB zusammen mit dem SIZ-CSB etabliert und sollte als Erweiterung des CellSys-Vorhabens dazu dienen, die wichtigsten Kandidaten noch umfangreicher zu validieren. Dazu wurden zunächst lentivirale Vektoren kloniert, um die Gene GRAMD4“ und „C6ORF1“ mittels CRISPR/Cas9 zu inaktivieren. Resultierende Zelllinien wurden anschließend im etablierten Virusreplikationsassay untersucht. Dazu wurden zunächst A549 Zellen mittels lentiviraler Partikel transduziert, um eine dauerhafte Cas9 Expression sicherzustellen. Einzelzellklone wurden generiert und die Expression von Cas9 in den unterschiedlichen Klonen wurde mittels Western Blots überprüft. Die Effizienz der so vorselektierten Klone wurde anschließend mittels eines GFP Reporters überprüft: Der Einsatz von GFP spezifischen gRNAs sorgte dabei für einen vollständigen Verlust der GFP Expression und deutete so auf ein funktionierendes Assaysystem hin.

Für die Validierung der beiden Kandidaten „GRAMD4“ bzw. „C6ORF1“ wurden jeweils vier guide RNAs (gRNAs) pro Gen in einen lentiviralen Expressionsvektor kloniert. Das Design der guide RNAs für das CRISPR/Cas-Verfahren wurde von SIZ-CSB übernommen. Zellen des charakterisierten A549/Cas9 Zellklons wurden mit den lentiviralen gRNA Vektoren transduziert. Nach erfolgter Selektion mittels eines Antibiotikums wurde die Effizienz des CRISPR vermittelten Knockouts mittels des „T7E1-Assays“ nachgewiesen. Die so generierten GRAMD4 und C6ORF1 Knockout Zellen wurden anschließend bezüglich veränderter Influenza Virusreplikation untersucht, indem sie für 24 Stunden mit Influenza A Viren (IAV) infiziert wurden. Anschließend wurde die Virusmenge im Überstand dieser Zellen durch Titration auf MDCK Zellen quantifiziert. Die Bestimmung des viralen Titers im Überstand wurde durch automatisierte Mikroskopie nach Färbung der Zellen mit einem IAV spezifischen NP-Antikörper sowie HOECHST-Färbung zur Detektion der Zellnuklei durchgeführt. Die verwendeten GRAMD4 und C6ORF1 Knockout Zellen zeigten keine signifikante Änderung des Virustiters im Vergleich zur Kontrolle (Cas9 exprimierende A549 Zellen). Somit ist davon auszugehen, dass die proviralen Effekte, die sich durch die

Expression der shRNAs (gerichtet gegen GRAMD4 und C6ORF1) ergaben, durch off-target Effekte entstanden sind

Zur weitergehenden Charakterisierung der Kandidatengene GRAMD4 und C6ORF1 wurden zusätzlich lentivirale Überexpressionsplasmide eingesetzt, um zu untersuchen, ob eine gesteigerte Expression von „GRAMD4“ und „C6ORF1“ die Virusreplikation hemmen kann. Weiterhin wurde der Einfluss der Genrepression von C6Orf1, GRAMD4 und CASP8AP2 hinsichtlich der viralen Proteinexpression 6 Stunden nach Infektion mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Diese war jedoch unverändert. Obgleich die in diesem Arbeitspaket durchgeführten Arbeiten zeigten, dass die beiden Kandidatengene mit dem stärksten Effekt auf die Virusreplikation sehr wahrscheinlich durch off-target Effekte der shRNAs verursacht wurden, wurde der Meilenstein M2-2: „Experimentelle Analyse der Kandidatenfunktion fristgerecht erreicht“.

In AP 2-3 „Experimentelle Validierung der Modellierungsansätze“ konnte innerhalb der Projektlaufzeit keine Modellhypothesen entwickelt werden, die seitens des MPIIB durch experimentelle Arbeiten hätte überprüft werden können. Somit konnte der Meilenstein M2-3 „Überprüfung der Modellhypothese mittels experimenteller Ansätze“ nicht fertiggestellt werden.

In AP 3-2 „Experimentelle Validierung der Modellierungsansätze“ wurden AGE1.HN Zellen mit lentiviralen shRNA Vektoren von SIZ-CSB transduziert, die zum Knockdown der Gene GRAMD4, C6ORF1 und CASP8AP2 führen sollten. Allerdings war es aufgrund der beobachteten shRNA-induzierten Zytotoxizität bzw. mangelnder Knockdown-Effizienz (80% verbleibende Restaktivität) in AGE1.HN Zellen, nicht möglich, den Einfluss des Knockdowns von GRAMD4, C6ORF1 und CASP8AP2 auf die Virusreplikation zu analysieren. Da die Ergebnisse aus AP2-2 nahelegten, dass die gesteigerte Influenzareplikation von GRAMD4 und C6ORF1 Knockdownzellen auf off-target Effekte zurückzuführen ist, wurden keine weiteren Versuche unternommen, um die Genexpression dieser Gene in den AGE1.HN Zellen durch RNAi oder CRISPR/Cas9 zu inhibieren. Der Meilenstein M3-2: „Detaillierte Charakterisierung der Virusdynamik in transduzierten AGE1.HN Zellen“ wurde somit nicht erreicht.

## **2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:**

### Personal:

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Personalstellen bewilligt:

2 x Techn. Assistent (E9, 50 %, 2 Jahre)

Im Wesentlichen wurden die Fördermittel zur Finanzierung zweier erfahrener technischer Assistenten in Teilzeit (je 50%) über 24 Monate eingesetzt (104.333,76 €). Sie waren für die Quantifizierung der Virusreplikation in lentiviral transduzierten Zellen und umfangreiche Routinetätigkeiten in der Zellkultur zuständig. Darüber hinaus unterstützten sie den projektverantwortlichen Wissenschaftler bei der Etablierung und Durchführung des Pool-Screens.

### Verbrauchsmittel:

Für die Herstellung der Knockdown-, Knockout und Überexpressions-Zelllinien und deren Validierung mittels Influenzareplikationsassay wurden kostenintensive Reagenzien im Gesamtwert von 32.248 € verwendet. Hervorzuheben sind

- molekularbiologische Reagenzien für Klonierungen, DNA/RNA Aufreinigungen und quantitativer RT-PCR (12.600 €),
- Oligonukleotide und Sequenzierungen für die Herstellung und Qualitätskontrolle der lentiviralen Konstrukte (9.500 €),
- Medien und Plastikwaren (8.600 €)
- Antikörper für die verwendeten Nachweissysteme (1.400 €).

### Aufträge und Investitionen:

Wurden nicht getätigt.

### **3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit:**

Das Forschungsvorhaben erforderte einen finanziellen Aufwand von rund 140.000 €, der aus Institutsmitteln nicht hätte getätigt werden können.

Mit dem Projekt wurde ein hoch innovativer Ansatz verfolgt, in dem die Ergebnisse aus einer früheren Hochdurchsatzanalyse für die Entwicklung einer Hochleistungsproduktionszelllinie für Influenza-Impfstoffe genutzt wurden, um eine attraktive Alternative zur klassischen Impfstoffproduktion im Hühnerei zu schaffen.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass der Ansatz der gezielten genetischen Manipulation einer Impfstoffproduktionszelllinie prinzipiell sehr vielversprechend ist und Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung einen sehr bedeutenden Beitrag hierzu geleistet haben und weiterhin leisten können.

Der wissenschaftlichen Gemeinschaft sollen die gewonnen Erkenntnisse im Rahmen einer gemeinsamen Publikation zugänglich gemacht werden.

#### **4. Des voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:**

Im Rahmen des Projektes wurde die Herstellung einer Hochleistungszelllinie für die Influenza-Impfstoffproduktion angestrebt. Basierend auf den Erkenntnissen eines genomweiten siRNAs Screens gegen Influenza sollte, als Alternative zu der herkömmlichen Produktion im Hühnerei, eine Produktionszelllinie mit Hilfe genetischer Manipulationen optimiert werden.

Im Rahmen des Projektes wurde gezeigt, dass basierend auf den Erkenntnissen eines siRNAs Screens die gezielte, genetische Manipulation einer eukaryotischen Influenzaproduktionszelllinie grundsätzlich zu einer Steigerung der Virusproduktion genutzt werden kann. Wenngleich es auf Grund von off-target Effekten bei der Manipulation der ausgewählten Kandidatengene letztendlich nicht gelang eine kommerziell verwertbare Produktionszelllinie zu generieren, so könnten doch in Zukunft mit Hilfe eines genomweiten CRISPR Poolscreen neue Kandidatengene identifiziert werden, mit denen dieser Ansatz verifiziert und zum Erfolg geführt werden könnte. Darüberhinaus ermöglicht es die CRISPR Technologie solche Gene komplett auszuschalten bzw. über Knockin Strategien einzuführen und somit mögliche off-target Effekte zu reduzieren.

Im Rahmen des Projektes wurden keine Patente angemeldet.

Im Rahmen einer gemeinsamen, wissenschaftlichen Publikation sollen die gewonnenen Ergebnisse der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt werden.

**5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:**

Es sind keine weiteren Ergebnisse von anderen Stellen bekannt, die Einfluss auf den Verlauf des Projektes genommen haben.

## **6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 11.**

Die Ergebnisse der Forschungsarbeit sollen in einer international renommierten, hochrangigen, ‚peer-reviewed‘ Zeitschrift publiziert werden. Gegenwärtig wird ein entsprechendes Manuskript unter Mitwirkung aller Projektteilnehmer angefertigt.

### **III. Erfolgskontrollbericht (, der nicht veröffentlicht wird.)**

Siehe Anlage

### **IV. Berichtsblatt (separates Dokument)**

Siehe Anlage

### **V. Document control sheet (separates Dokument)**

Siehe Anlage

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -----	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) <b>Schlussbericht</b>
3. Titel  <b>CellSys – Systembiologischer Ansatz zur Entwicklung einer Produktionszelllinie für Influenzavakzine</b>  <b>Teilprojekt A</b> Charakterisierung und Selektion lentiviral transduzierter Zelllinien hinsichtlich verbesserter Influenzavirus-Replikation	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]  Dr. Alexander Karlas Prof. Dr. Thomas Meyer Dr. Sigrid Gödert	5. Abschlussdatum des Vorhabens <b>31.12.2015</b>  6. Veröffentlichungsdatum ----  7. Form der Publikation ----
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)  Max-Planck Institut für Infektionsbiologie Abteilung Molekulare Biologie Charitéplatz 1 10117 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution ----  10. Förderkennzeichen <b>FK 0316189E</b>  11. Seitenzahl 1
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 1  14. Tabellen 0  15. Abbildungen 0
16. Zusätzliche Angaben  ----	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)  ----	

18. Kurzfassung

Ziel des Gesamtprojektes war es, basierend auf den Ergebnissen eines Influenza-spezifischen, genomweiten siRNA Screens (Karlus A, Machuy N et al., Nature 2010), die Virusausbeute einer humanen Impfstoff-Produktionszelllinie durch gezielte genetische Manipulation signifikant zu steigern, um eine kommerziell verwertbare Alternative zur klassischen Impfstoffproduktion im Hühnerei zu schaffen.

Zu diesem Zweck wurden für 28 ausgewählte Gene, deren Hemmung zu einer Steigerung der Virusproduktion im oben genannten Screen geführt hatte, insgesamt 142 shRNA Knockdown-Zelllinien hergestellt, von denen 42 eine Knockdown Effizienz von  $\geq 70\%$  aufwiesen. 21 lentivirale Knockdown Zelllinien zeigten eine zweifache, GRAMD4- und C6ORF1-Knockdown Zelllinien eine fünffache Steigerung der Virusreplikation. Die Validierung dieser Kandidatengene erfolgte in Abweichung des ursprünglichen Arbeitsplans mit Hilfe der modernen CRISPR/Cas9 Technologie, die zu einem vollständigen Verlust dieser Wirtszellfaktoren auf Genebene führte. Diese Studien ergaben, dass die zuvor in Knockdown-Zelllinien beobachtete Steigerung der Virusproduktion auf unspezifische Effekte, so genannte off-target Effekte, zurückzuführen ist. Beim Versuch GRAMD4, C6ORF1 bzw. CASP8AP2 in der Produktionszelllinie AGE1.HN mittels lentiviraler shRNA Transduktion zu inhibieren, wurden nur geringe Knockdownraten erzielt (20%) bzw. eine shRNA-vermittelte Zytotoxizität beobachtet. Darüber hinaus wurden in einem Pool-Screen 39 shRNA-Konstrukte des MPIIB mit fünf Überexpressionskonstrukten des Partners HZI kombiniert, so dass fünf Konstrukte pro Zelle gleichzeitig exprimiert werden sollten, um mögliche additive bzw. synergistische Effekte auf Virusreplikation zu untersuchen. Nach Vereinzeln mittels FACS-Sorter und Testung im Influenzareplikationstest wurden die sieben vielversprechendsten und produktivsten Zellklone zur Identifizierung der beteiligten Knockdown- und/oder Überexpressionskonstrukte an das SIZ-CSB übergeben.

Wenngleich die Entwicklung einer kommerziell verwertbaren Hochleistungsproduktionszelllinie im Rahmen des Projektes nicht gelungen ist, so konnte dennoch klar gezeigt werden, dass der gewählte wissenschaftliche Ansatz grundsätzlich für diesen Zweck sehr geeignet ist. Für mögliche weiterführende Studien ist zu empfehlen die Kandidatengene in einem CRISPR-basierten Poolscreen zu identifizieren, um mögliche off-target Effekte weitestgehend auszuschließen.

19. Schlagwörter

Influenza, Impfstoffproduktion, CRIPR, shRNA

20. Verlag

----

21. Preis

----

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN ----	2. type of document (e.g. report, publication) <b>Report</b>
3. title  <b>CellSys – Cell Line Development by Systems Biology</b>  <b>Teilprojekt A Characterization and Selection of lentiviral transduced cell lines for improved influenza replication</b>	
4. author(s) (family name, first name(s))  Dr. Alexander Karlas Prof. Dr. Thomas Meyer Dr. Sigrid Gödert	5. end of project <b>2015/12/31</b>  6. publication date ----  7. form of publication ----
8. performing organization(s) (name, address)  Max-Planck Institut für Infektionsbiologie Abteilung Molekulare Biologie Charitéplatz 1 10117 Berlin	9. originator's report no. ----  10. reference no. <b>FK 0316189E</b>  11. no. of pages <b>1</b>
12. sponsoring agency (name, address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references <b>1</b>  14. no. of tables <b>0</b>  15. no. of figures <b>0</b>
16. supplementary notes  ----	
17. presented at (title, place, date)  ----	

18. abstract

The major goal of the CellSys project was to make use of the results of an influenza specific genome wide screen (Karlus A, Machuy N et al., Nature 2010) to optimize the virus yield of a production cell line for influenza vaccine by targeted genetic manipulation and thereby to develop an exploitable alternative to the classical vaccine production in hen's eggs.

For 28 selected genes which showed an increased virus replication upon knockdown in the above mentioned screen in total 142 shRNA knockdown cell lines were generated and 42 of them showed a knockdown efficiency of  $\geq 70\%$ . 21 of the lentiviral knockdown cell lines exhibited a twofold, GRAMD4 und C6ORF1 knockdown cells a fivefold increase of viral replication. By derogating the original work plan the validation of the candidate genes was performed by the modern CRISPR/Cas9 technology which led to a complete loss of the host cell factors on the gene level. These studies revealed that unspecific, so called off-target effects were responsible for the increase of viral replication observed in GRAMD4 und C6ORF1 knockdown cells. The attempt to knock down GRAMD4, C6ORF1 or CASP8AP2 via lentiviral shRNA transduction in the production cell line AGE1.HN resulted in non-sufficient knockdown rates (20%) respectively shRNA-mediated cytotoxicity. In addition, 39 shRNA constructs of MPIIB and five overexpression constructs of HZI were combined in a pool screen to include 5 construct per cell and to look for additive/synergistic effects on viral replication. After single cell sorting by FACS and subsequent testing in the influenza replication assay the seven most promising and productive cell clones were characterized by SIZ-CSB to identify the involved knockdown/overexpression constructs.

Even if the development of a commercial exploitable high-performance production cell line could not be realized in the project, the gained knowledge showed that the scientific approach is, in principle, well-suited for this purpose. Potential follow-up studies might utilize a CRISPR based pool screen to identify appropriate candidate genes to avoid off-target effect as far as possible.

19. keywords

Influenza, vaccine, CRIPR, shRNA

20. publisher

21. price