

## **Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Betapolyomavirus macacae* als Spender- oder Empfängerorganismus**

### **gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

#### **Allgemeines**

Das *Betapolyomavirus macacae* (Synonyme: *Macaca mulatta polyomavirus 1* (MmPV1), Simian-Virus 40 (SV40)) gehört zur Gattung *Betapolyomavirus* der Familie der *Polyomaviridae*. Zu den Betapolyomaviren gehören neben *B. macacae* auch die humanen Polyomaviren BK-Virus (*Betapolyomavirus hominis*), JC-Virus (*Betapolyomavirus secuhominis*) sowie die 2007 identifizierte Viren KI-Virus (*Betapolyomavirus tertihominis*) und WU-Virus (*Betapolyomavirus quartihominis*) [1–3].

*B. macacae* wurde erstmalig 1960 als Kontamination in Nierenzellkulturen von Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) entdeckt, die zur Herstellung von Poliovakzinen verwendet wurden [4, 5].

Das ikosaedrische nicht-umhüllte Virion enthält ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom von 5243 bp mit einem bidirektionalen Replikationsursprung (*ori*). Es kodiert für neun Proteine und ist grundsätzlich in drei funktionelle Regionen unterteilt, die frühe kodierende Region, die späte kodierende Region und die nicht-kodierende Kontrollregion (*non-coding control region*). Die Transkription der zwei kodierenden Regionen beginnt jeweils in der Nähe des Replikationsursprungs und verläuft divergent. Die frühe Region wird gleich zu Beginn der Infektion noch vor der DNA-Replikation transkribiert. Sie kodiert für vier Proteine: Das ELP (*early leader protein*), das Protein 17KT, das kleine Tumor-Antigen (*small tumor-antigen*, t-Ag) und das große Tumor-Antigen (*large tumor-antigen*, T-Ag), deren kodierende Regionen teilweise überlappen und die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Das 17KT, das t-Antigen und das T-Antigen tragen unter bestimmten Bedingungen zur malignen Transformation der Wirtszelle bei [6]. Das große T-Antigen ist ein multifunktionales Phosphoprotein mit ATPase- und DNA-Helikase-Aktivität. Im Zellkern der infizierten Wirtszelle bindet es an spezifische DNA-Sequenzen im *ori* des viralen Genoms sowie an eine Reihe zellulärer Proteine. In permissiven Zellen ist es als Komplex mit der Wirtszell-DNA-Polymerase an der viralen DNA-Replikation beteiligt. In für eine virale Replikation semipermissiven und nicht-permissiven Zellen kann das T-Antigen u. a. durch Bindung und Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine Rb und p53 eine unkontrollierte Zellproliferation hervorrufen. Zusätzlich transaktiviert es durch die Bindung dieser und weiterer Faktoren den Übergang der Wirtszelle von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase und damit die Proliferation der infizierten Zelle. In seltenen Fällen erfolgt eine Immortalisierung [7–9]. Das T-Antigen alleine ist in der Zellkultur für die Transformation vieler Zelltypen (z.B. Nagetierzellen [10]) bereits ausreichend, für die Transformation menschlicher Zellen sind aber sowohl das T-Antigen, als auch das t-Antigen

erforderlich [11, 12]. Die Mitwirkung des t-Antigens besteht hauptsächlich in der Bindung und Inhibierung der Proteinphosphatase 2 (PP2A). Damit löst es Zellproliferation und Zelltransformation aus. Auch das 17KT-Protein trägt zur Zellzyklusprogression bei, z.B. von ruhenden primären Fibroblasten [11]. Die Funktion des ELP ist nicht bekannt. Die späte Region wird nach der DNA-Replikation transkribiert. Sie kodiert für die Kapsidproteine VP1, VP2, VP3, VP4 und das Agnoprotein. Die Hauptfunktion des Agnoproteins ist der Zusammenbau des Virions [13, 7, 14].

Die natürlichen Wirte von *B. macacae* sind Affen, insbesondere asiatische Makaken und Rhesusaffen. Nahezu alle erwachsenen Rhesusaffen sind mit *B. macacae* infiziert. In Affen verursacht das Virus im Allgemeinen keine klinischen Symptome, persistiert aber lebenslang in den Nieren und kann im Urin detektiert werden [15, 16]. In Einzelfällen können auch schwere Krankheitsverläufe vorkommen. So untersuchten Minor *et al.* [17] Gruppen von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) hinsichtlich der Transmission und Kinetik der Konversion zur Seropositivität gegen *B. macacae* und berichteten in dem Zusammenhang vom Tod von vier Affen von insgesamt 43 Affen. Es kann von einer Übertragung entweder indirekt über die Kontamination der Umgebung oder durch den direkten Kontakt der Tiere untereinander ausgegangen werden. Eine vertikale oder perinatale Übertragung ist nicht wahrscheinlich.

Nagerzellen sind nicht-permissiv für eine virale Replikation von *B. macacae*, humane Zellen können je nach Zelltyp sowohl permissiv (z. B. Epithelzellen), als auch semipermissiv (z. B. Fibroblasten, Mesothelialzellen) oder nicht-permissiv (Lymphozyten) sein [9, 18, 19]. Das immortalisierende Potential für menschliche Zellen wurde *in vitro* dokumentiert [7, 9, 20]. Ein neoplastisch transformierendes Potential von *B. macacae* konnte nach Injektion in neugeborene Hamster gezeigt werden, die Tumore entwickelten [21].

Dass Menschen, die *B. macacae* ausgesetzt waren, eine Infektion entwickeln können, konnte schon in den 1960er Jahren gezeigt werden [22]. Replikationskompetente Virionen von *B. macacae* waren als Kontamination in einem experimentellen Impfstoff gegen *Human orthopneumovirus* (Synonym: Human respiratory syncytial virus (RSV)) enthalten. Nach intranasaler Inokulation entwickelten 60 % der Studienteilnehmer neutralisierende Antikörper bei einem niedrigen Titer. Acht Probanden hatten replikationskompetente *B. macacae* Virionen erhalten. 7-11 Tage nach Inokulation konnten von einigen Probanden im Rachenabstrich geringe Mengen an *B. macacae* Virionen gewonnen werden. In den Monaten nach der Inokulation zeigten sie keinerlei Krankheitssymptome.

Es gibt auch den Hinweis darauf, dass sich Menschen durch direkten Kontakt mit infizierten Affen anstecken können. Engels *et al.* [15] berichteten im Jahr 2004 über eine erhöhte Seroprävalenz virusspezifischer Antikörper gegenüber *B. macacae* bei Zooarbeitern mit beruflicher Exposition gegenüber nicht-humanen Primaten. So war die Seropositivität gegen *B. macacae* in der Gruppe der Zooarbeiter mit häufiger, andauernder Exposition (Tierpfleger, Tierarzt, Labortechniker) gegenüber der Gruppe der Zoomitarbeiter ohne diese Exposition erhöht: 23 % versus 10 %. Generell waren die Antikörpertiter aber sehr niedrig im Vergleich mit den Titern, die die Zooarbeiter gegen das BK-Virus und das JC-Virus aufwiesen. Hierfür waren die Daten von der falsch-positiven Seroreaktivität gegen *B. macacae*, die sich als Kreuzreaktivität gegen BK-Virus und JC-Virus erwies, bereinigt worden. Die Prävalenz der neutralisierenden Antikörper gegen die Kapsidproteine stieg mit zunehmender Dienstzeit an. Allerdings konnte nicht eindeutig belegt werden, was genau die Ursache für die spezifische humane Seroreaktivität gegen *B. macacae* war.

Lange Zeit wurde vermutet, dass sich Menschen weltweit im Zeitraum von 1955 bis 1963 mit *B. macacae* über Kontaminationen in viralen Impfstoffen (Poliomyelitis-Impfstoff, Adenovirus-Impfstoff) infiziert haben könnten und wegen des neoplastisch transformierenden Potentials verschiedene Tumorerkrankungen entwickeln würden. Mehrere Forscher wiesen dann in den 1990er Jahren in Biopsieproben von Patienten mit bestimmten Krebsarten, wie z. B. Mesotheliom, Osteosarkom und Non-Hodgkin-Lymphom, mittels PCR und DNA-Sequenzierung virale DNA von *B. macacae* nach (u. a. die Sequenz des T-Antigens, Sequenzen regulatorischer Elemente, die Sequenz von VP1) [23–25] - allerdings unabhängig davon, ob diese kontaminierte Impfungen erhalten hatten oder nicht. Andere Forscher konnten indes keine virale DNA von *B. macacae* in diesen humanen Tumoren detektieren [26]. Bisher konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *B. macacae* und der Entstehung von Krebs beim Menschen nachgewiesen werden [27–29, 16]. Auch mehrere Langzeit-*Follow-up*-Studien konnten kein erhöhtes Krebsrisiko bei Empfängern von SV40-kontaminierten Poliovirus-Impfstoffen feststellen [30].

Die Seroprävalenz für *B. macacae* in der allgemeinen US-amerikanischen und europäischen Bevölkerung wird auf 5-10 % geschätzt. Die tatsächliche Prävalenz von *B. macacae* in der humanen Population sowie seine Übertragungswege sind nicht bekannt [15, 16]. Wahrscheinlich ist, dass die bei den seropositiven Menschen häufig detektierten, niedrigen Antikörpertiter gegen *B. macacae* nicht durch einen Kontakt der Bevölkerung mit kontaminierten Vakzinen zustande gekommen waren, sondern durch Kreuzreaktivität mit den weitverbreiteten, eng verwandten humanen Polyomaviren BK-Virus und JC-Virus [31]. Es gibt bisher keine Hinweise für eine Ansteckung von Mensch zu Mensch [27].

## **Empfehlung**

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird *Betapolyomavirus macacae* als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

## **Begründung**

*B. macacae* besitzt einen breiten Wirtsbereich und kann neben Makaken, wie z. B. Rhesusaffen und Javaneraffen, auch den Menschen infizieren. Die Infektionen verlaufen beim natürlichen Wirt typischerweise ohne klinische Symptome, in seltenen Fällen kann es jedoch zu schweren Verläufen kommen. Infektionen beim Menschen sind bisher als symptomlos beschrieben. Zudem konnte in Langzeit-*Follow-up*-Studien bislang kein Kausalzusammenhang zwischen der Infektion von Menschen mit *B. macacae* und Krebserkrankungen festgestellt werden. Dennoch ist ein geringes humanpathogenes Potenzial nicht auszuschließen.

## **Literatur**

1. **Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Verschoor EJ, Ehlers B, Ictv RC** (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol* **98**(6):1159–60. E-Pub ahead of print 22.06.2017.
2. **Caldeira DB, Souza Luna LK de, Watanabe A, Perosa AH, Granato C, Bellei N** (2019). The occurrence of polyomaviruses WUPyV and KIPyV among patients with severe respiratory infections. *Braz J Microbiol* **50**(1):133–7. E-Pub ahead of print 30.11.2018.
3. Az. 45242.0187 - Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von Polyomaviren als Spender- oder Empfängerorganismen gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV (Februar 2021)
4. **Shah K, Nathanson N** (1976). Human exposure to SV40: review and comment. *Am J Epidemiol* **103**(1):1–12.
5. **Sweet, BH, Hilleman MR** (1960). The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* **105**
6. **Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS** (2009). Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol* **19**(4):218–28. E-Pub ahead of print 31.03.2009.
7. Howley PM, Knipe DM, Cohen JL, Damania BA (ed.) (2021). *Fields Virology: DNA Viruses*, 7. Auflage. Wolters Kluwer Health
8. **Fiers W, Contreras R, Haegemann G, Rogiers R, van de Voorde A, van Heuverswyn H, van Herreweghe J, Volckaert G, Ysebaert M** (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* **273**(5658):113–20.
9. **Gazdar AF, Butel JS, Carbone M** (2002). SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* **2**(12):957–64.
10. **Zhu JY, Abate M, Rice PW, Cole CN** (1991). The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *J Virol* **65**(12):6872–80.
11. **Boyapati A, Wilson M, Yu J, Rundell K** (2003). SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts. *Virology* **315**(1):148–58.
12. **Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM** (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* **24**(52):7729–45.
13. **Gerits N, Moens U** (2012). Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology* **432**(2):316–26. E-Pub ahead of print 21.06.2012.
14. **Rotondo JC, Mazzoni E, Bononi I, Tognon M, Martini F** (2019). Association Between Simian Virus 40 and Human Tumors. *Front Oncol* **9**:670. E-Pub ahead of print 25.07.2019.
15. **Engels EA, Switzer WM, Heneine W, Viscidi RP** (2004). Serologic evidence for exposure to simian virus 40 in North American zoo workers. *J Infect Dis* **190**(12):2065–9. E-Pub ahead of print 11/16/2004.
16. **Stratton KR, Alamaro DA, McCormick MC** (2003). Immunization safety review. SV40 contamination of polio vaccine and cancer. National Academies Press, Washington D.C.
17. **Minor P, Pipkin PA, Cutler K, Dunn G** (2003). Natural infection and transmission of SV40. *Virology* **314**(1):403–9.
18. **Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, Fresco R, Tosolini A, Testa JR, Pass HI, Rizzo P, Carbone M** (2000). Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18):10214–9.
19. **Shaikh S, Skoczylas C, Longnecker R, Rundell K** (2004). Inability of simian virus 40 to establish productive infection of lymphoblastic cell lines. *J Virol* **78**(9):4917–20.
20. **Manfredi JJ, Prives C** (1994). The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* **1198**(1):65–83.
21. **Cicala C, Pompetti F, Carbone M** (1993). SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am J Pathol* **142**(5):1524–33.
22. **Morris, J. A., Johnson, K. M., Aulisio, C. G., Chanock, R. M., Knight, V.** (1961). Clinical and serologic responses in volunteers given vacuolating virus (SV-40) by respiratory route. *Proc Soc Exp Biol Med* **108**

23. **Bergsagel Daniel J., Finegold Milton J., Butel Janet S., Kupsky William J., Garcea Robert L.** DNA Sequences Similar to Those of Simian Virus 40 in Ependymomas and Choroid Plexus Tumors of Childhood
24. **Lednicky JA, Garcea RL, Bergsagel DJ, Butel JS** (1995). Natural simian virus 40 strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors. *Virology* **212**(2):710–7.
25. **Pepper C, Jasani B, Navabi H, Wynford-Thomas D, Gibbs AR** (1996). Simian virus 40 large T antigen (SV40LTAg) primer specific DNA amplification in human pleural mesothelioma tissue. *Thorax* **51**(11):1074–6.
26. **Manfredi JJ, Dong J, Liu W-j, Resnick-Silverman L, Qiao R, Chahinian P, Saric M, Gibbs AR, Phillips JI, Murray J, Axten CW, Nolan RP, Aaronson SA** (2005). Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma. *Cancer Res* **65**(7):2602–9.
27. **Shah KV** (2004). Simian virus 40 and human disease. *J Infect Dis* **190**(12):2061–4. E-Pub ahead of print 11/16/2004.
28. **Destefano F, Offit PA, Fisher A** (2018). Vaccine Safety. *Plotkin's Vaccines*:1584-1600.e10.
29. **Thu GO, Hem LY, Hansen S, Møller B, Norstein J, Nøkleby H, Grotmol T** (2006). Is there an association between SV40 contaminated polio vaccine and lymphoproliferative disorders? An age-period-cohort analysis on Norwegian data from 1953 to 1997. *Int J Cancer* **118**(8):2035–9.
30. **Engels EA** (2005). Cancer risk associated with receipt of vaccines contaminated with simian virus 40: epidemiologic research. *Expert Rev Vaccines* **4**(2):197–206.
31. **Carter JJ, Madeleine MM, Wipf GC, Garcea RL, Pipkin PA, Minor PD, Galloway DA** (2003). Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J Natl Cancer Inst* **95**(20):1522–30.