



Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der HCMV-Laborstämme AD169 und Towne

Humane Cytomegalovirus-Stämme AD169 und Towne:

Humane Cytomegaloviren (HCMV) haben ein ~230 kb großes, doppelsträngiges DNA-Genom und gehören zur Familie der Herpesviren. Ihr Wirtsspektrum ist auf den Menschen beschränkt. Bei ab-wehrgesunden Erwachsenen sind die meisten Infektionen asymptomatisch, in seltenen Fällen zeigt sich ein Mononucleose-ähnliches Krankheitsbild. Ein Problem sind HCMV-Infektionen für immun-supprimierte Erwachsene, bei denen häufig schwere Verläufe, wie die interstitielle Cytomegalovirus-pneumonie auftreten und zum Tode führen können. Obendrein führt eine vertikale Übertragung von HCMV auf Neugeborene in ca. 5-10% der Fälle zu schweren Schädigungen. Die HCMV-Labor-stämme AD169 und Towne wurden als potentielle Vakzine gegen HCMV-Infektionen entwickelt. AD169 wurde aus den Nasenpolypen eines 7-jährigen Mädchens isoliert und über 50mal auf humanen Fibroblastenzellen (HF) passagiert.³ Der HCMV-Stamm Towne wurde aus dem Urin eines zwei Monate alten Säuglings isoliert und über 100mal auf die HF-Zelllinie WI-38 passagiert.⁹ Die ausschließliche Passagierung auf HF hat den Wirtstropismus von AD169 und Towne im Kontrast zu virulenten Isolaten deutlich eingeschränkt. Beide Laborstämme sind z. B. nicht mehr in der Lage Endo- oder Epithelzellen zu infizieren.¹⁰ In weiteren Wachstumsexperimenten mit SCID-hu-Mäusen, denen menschliche Thymus- und Leberzellen in die Nierentasche transplantiert wurden, wachsen AD169 und Towne um den Faktor 3 schlechter als der virulente HCMV-Stamm Toledo.¹

In verschiedenen Studien mit Freiwilligen wurde dokumentiert, dass beide Stämme avirulent für den gesunden Menschen sind. Diese Versuche zeigen, dass nach einer intramuskulären Injektion von $10^{3,5}$ PFU des Towne-Stamms außer lokalen Reaktionen an der Einstichstelle keine signifikanten klinischen Symptome bei den Versuchspersonen auftraten. Zudem konnte der Stamm aus keinem der untersuchten Freiwilligen reisoliert werden.^{4,6,8} Ähnliche Ergebnisse wurden für AD169 beschrieben.³

Obwohl die genauen genetischen Faktoren für die Attenuierung bisher nicht bekannt sind, offenbart der Vergleich der DNA-Genome von virulenten Isolaten (z. B. Toledo, FIX) mit AD169 und Towne einige Veränderungen innerhalb der Laborstämme, die für die Avirulenz dieser beiden Stämme mit verantwortlich zu sein scheinen.¹⁰ In AD169 ist im UL-Bereich eine Deletion von ~15 kb identifiziert worden, die die Leserahmen 133-151 umfasst. Im HCMV-Stamm Towne ist in dieser Region eine Deletion von ~13 kb nachgewiesen. Im Gegensatz zu AD169 enthält das Genom von Towne die Sequenzen der Leserahmen 147-154. Beide Stämme besitzen in dem Bereich zwischen der UL-Region und der US-Region ein "internal repeat long" (IRL), welches eine invers vorliegende Duplikation der Leserahmen 1-14 ist, die in den virulenten Isolaten fehlt.^{2,7}

Eine Deletion der Leserahmen 136-150 im virulenten Vergleichsstamm Toledo führt zum Verlust der Replikationsfähigkeit von Toledo in SCID-hu-Mäusen mit Thymus-Leber-Xenografts.¹⁴ Außerdem wurden in Sequenzvergleichen Punktmutationen im Gen 131 bei AD169 und im Gen 128 bei Towne gefunden. Eine Mutation in den Genen 128 - 131 verhindert die effektive Infektion von Endo- und Epithelzellen und den Virustransfer auf Leukozyten.^{5,12,13} Andere Zellkulturexperimente belegen, dass die Ausbreitung einer Toledo-Mutante mit einer Deletion der Gene 128-150 in Epithelzellen eingeschränkt ist.¹¹ Ferner wird davon ausgegangen, dass weitere Mutationen in den Laborstämmen vorliegen, die einen Einfluss auf die Avirulenz von AD169 und Towne beim Menschen haben.^{11,14}



Bewertung:

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden die HCMV-Stämme AD169 oder Towne, mit einer Passagenzahl von 54 für AD169 und 125 für Towne oder höher, als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Begründung:

Die Einstufung in die **Risikogruppe 1** begründet sich über die Impffexperimente und die Genomanalysen mit diesen beiden HCMV-Stämmen. In diesen Experimenten konnte die Avirulenz von AD169 oder Towne für den gesunden Menschen nachgewiesen werden. Zudem werden diese beiden Stämme von infizierten Personen nicht ausgeschieden, weshalb eine Ausbreitung auszuschließen ist. Die Beschränkung auf AD169 und Towne mit den oben angegebenen Passagenzahlen ergibt sich aus den für die Impffexperimente an Menschen eingesetzten Passagen. Die multiplen Veränderungen im Genom der Laborstämme lassen eine Reversion zu virulenten Stämmen als unwahrscheinlich erscheinen.

Hinweis: Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass diese beiden Stämme durch Klonierung von DNA aus anderen Cytomegaloviren, die auch in einem Gemisch von DNA-Sequenzen (z. B. Genbanken) vorliegen kann, komplementiert werden können. Eine Höherstufung der GVO's in die **Risikogruppe 2** ist dann im Einzelfall notwendig. Gentechnische Arbeiten, bei denen Nukleinsäuresequenzen in AD169 und Towne eingeführt werden, die die Virulenz dieser Stämme erhöhen können, sind zur Einstufung der ZKBS vorzulegen.

Literatur:

- ¹ J. M. Brown, H. Kaneshima, and E. S. Mocarski, "Dramatic interstrain differences in the replication of human cytomegalovirus in SCID-hu mice," *J. Infect. Dis.* **171**(6), 1599 (1995).
- ² T. A. Cha, *et al.*, "Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains," *J. Virol.* **70**(1), 78 (1996).
- ³ S. D. Elek and H. Stern, "Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero," *Lancet* **1**(7845), 1 (1974).
- ⁴ G. R. Fleisher, *et al.*, "Vaccination of pediatric nurses with live attenuated cytomegalovirus," *Am. J. Dis. Child* **136**(4), 294 (1982).
- ⁵ G. Hahn, *et al.*, "Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes," *J. Virol.* **78**(18), 10023 (2004).
- ⁶ M. Just, *et al.*, "Immunisation trials with live attenuated cytomegalovirus TOWNE 125," *Infection* **3**(2), 111 (1975).
- ⁷ E. Murphy, *et al.*, "Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus," *PNAS* **100**(25), 14976 (2003).
- ⁸ S. A. Plotkin, J. Farquhar, and E. Horberger, "Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus," *J. Infect. Dis.* **134**(5), 470 (1976).
- ⁹ S. A. Plotkin, *et al.*, "Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination," *Infect. Immun.* **12**(3), 521 (1975).
- ¹⁰ M. N. Prichard, *et al.*, "A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains," *Rev. Med. Virol.* **11**(3), 191 (2001).
- ¹¹ B. J. Ryckman, *et al.*, "Human Cytomegalovirus Entry into Epithelial and Endothelial Cells Depends on Genes UL128 to UL150 and Occurs by Endocytosis and Low-pH Fusion," *J. Virol.* **80**(2), 710 (2006).
- ¹² Dai Wang and Thomas Shenk, "Human Cytomegalovirus UL131 Open Reading Frame Is Required for Epithelial Cell Tropism," *J. Virol.* **79**(16), 10330 (2005).
- ¹³ Dai Wang and Thomas Shenk, "Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism," *PNAS* **102**(50), 18153 (2005).
- ¹⁴ W. Wang, *et al.*, "Human Cytomegalovirus Genes in the 15-Kilobase Region Are Required for Viral Replication in Implanted Human Tissues in SCID Mice," *J. Virol.* **79**(4), 2115 (2005).