

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung
des *xenotropic murine leukemia virus-related virus*
und der Zelllinien 22Rv1 und CWR-R1
als Spender- oder Empfängerorganismen gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Im Jahr 2006 wurden bei der Untersuchung von Tumorproben von Patienten mit Prostatakarzinomen Genomabschnitte eines bis dahin unbekanntes Gammaretrovirus entdeckt. Dieses Virus wurde anschließend aufgrund seiner Ähnlichkeit zu xenotropen murinen Gammaretroviren als *xenotropic murine leukemia virus-related virus* (XMRV) benannt [1]. In den folgenden Jahren berichteten weitere Arbeitsgruppen basierend auf PCR-Analysen von einer Assoziation zwischen XMRV und Prostatakrebs. Zudem wurde im Jahr 2009 basierend auf PCR-Analysen sowie Antikörper- und direkten Virusnachweisen in humanen Blutproben ein kausaler Zusammenhang zwischen einer XMRV-Infektion und dem *chronic fatigue syndrome* (auch myalgische Enzephalomyelitis, ME/CFS) postuliert [2]. Unter anderem aufgrund der Implikation dieser Ergebnisse für die Sicherheit von Blutprodukten versuchten in der Folge verschiedene Arbeitsgruppen und Gesundheitsbehörden die Ergebnisse zu reproduzieren. Dabei stellte sich heraus, dass alle Befunde zum Zusammenhang zwischen XMRV und Prostatakrebs bzw. ME/CSF mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Laborkontaminationen zurückzuführen sind. Die Originalpublikationen, die diese Zusammenhänge beschrieben haben, sind inzwischen zum Teil zurückgezogen (zusammengefasst in [3, 4]) Es gibt somit gegenwärtig keine gesicherten Belege für einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit XMRV und einer Erkrankung bei Mensch oder Tier.

XMRV ist ein behülltes Gammaretrovirus (Familie *Retroviridae*) mit einem ca. 8,1 kb großen RNA-Genom. Untersuchungen haben gezeigt, dass das Genom vermutlich durch homologe Rekombination zwischen zwei endogenen murinen Gammaretroviren während der seriellen Passagierung eines humanen Prostatumors in immunsupprimierten Labormäusen entstanden ist [5]. Diese parentalen Viren wurden als Pre-XMRV-1 und Pre-XMRV-2 benannt. Ein Sequenzvergleich zwischen den beiden parentalen Proviren und dem XMRV-Genom zeigte, dass bei Annahme von sechs Matrizenwechsellern während der Minusstrang-DNA-Synthese von Pre-XMRV-1 und Pre-XMRV-2 ein Virusgenom entstünde, dass in nur vier Nukleotiden von der XMRV-Konsensussequenz abweicht. Lediglich eine dieser Mutationen würde zu einer Aminosäuresubstitution führen. Zudem lägen alle Rekombinationsstellen in 20 bis 73 Nukleotide großen Genomabschnitten, die jeweils in beiden parentalen Proviren vorkommen. Die Rekombinationshypothese wird auch durch Genomanalysen von 48 Maus-Laborstämmen und 46 wildlebenden Mausstämmen bzw. Subspezies unterstützt. Dabei zeigte

sich, dass keiner von diesen das vollständige XMRV-Provirus aufweist, während Pre-XMRV-1 oder Pre-XMRV-2 in 14 bzw. 27 der Stämme bzw. Subspezies nachgewiesen wurde. Beide endogenen Proviren gleichzeitig sind hingegen nur in drei Laborstämmen anzutreffen [6]. Nur die Genome der späten Passagen des Tumors sowie die Genome der final aus diesen etablierten Zelllinien CWR22Rv1 (22Rv1) und CWR-R1 enthalten Kopien des XMRV-Provirus. Die Abgabe infektiöser, replikationskompetenter XMRV-Partikel durch die Zelllinie 22Rv1 ist belegt [5].

Untersuchungen in Zellkulturen belegen, dass XMRV humane Epithelzellen, z. B. der Prostata und der Niere, sowie Lymphozyten infizieren kann [7]. Als Eintrittsrezeptor wurde das Protein XPR-1 identifiziert, das auch von anderen xenotropen und polytropen murinen Retroviren genutzt wird. Die Effizienz der Replikation in suszeptiblen Zellen ist abhängig von der Expression der Restriktionsfaktoren APOBEC3G und -F sowie Tetherin (BST2). Darüber hinaus enthält der *enhancer* innerhalb der *long terminal repeats* (LTRs) von XMRV ein *androgen response element*. Die Transkription der viralen RNA unterliegt damit zumindest teilweise der Regulation über den Androgenrezeptor (zusammengefasst in [3, 4]).

In Tierversuchen konnten Makaken mit XMRV infiziert werden, zeigten jedoch nur eine kurzzeitige Virämie. Zeichen einer Erkrankung wurden nicht festgestellt. Auch in diesen Versuchen zeigte sich ein breiter Zelltropismus, der verschiedene Blut- und Epithelzellen umfasste (zusammengefasst in [3]).

In der TRBA 462 „Einstufung von Viren in Risikogruppen“ ist XMRV der Risikogruppe 1 mit dem Zusatz „t21“ zugeordnet [8]. In der TRBA 468 „Liste der Zelllinien und Tätigkeiten mit Zellkulturen“ ist die Zelllinie 22Rv1 der Risikogruppe 1 zugeordnet [9].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV werden das *xenotropic murine leukemia virus-related virus* und die Zelllinien 22Rv1 und CWR-R1 als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Bei XMRV handelt es sich um ein exogenes murines Gammaretrovirus, welches humane Zellen und Makaken infizieren kann. In den Zellen wird beim Durchlaufen des viralen Replikationszyklus virale cDNA in das zelluläre Genom integriert. Dabei ist eine Insertionsmutagenese nicht auszuschließen.

Die Zelllinie 22Rv1 gibt infektiöse, replikationskompetente XMRV-Partikel ab. Aufgrund der ähnlichen Etablierung der Zelllinie CWR-R1 ist dies auch für diese nicht auszuschließen. Die XMRV-Partikel bestimmen somit das Gefährdungspotenzial der Zelllinien.

¹ Wegen der Wirbeltierpathogenität können aus tierseuchenrechtlicher Sicht Sicherheitsmaßnahmen erforderlich werden, die vergleichbar mit den Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe 2 ein Entweichen des Virus in die äußere Umgebung bzw. in andere Arbeitsbereiche minimieren

Literatur

1. **Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL** (2006). Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog* **2**(3):e25. - RETRACTED
2. **Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, Pfof MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B, Dean M, Silverman RH, Mikovits JA** (2009). Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* **326**(5952):585–9. - RETRACTED
3. **Arias M, Fan H** (2014). The saga of XMRV: a virus that infects human cells but is not a human virus. *Emerg Microbes Infect* **3**(4):e25.
4. **Delviks-Frankenberry K, Cingöz O, Coffin JM, Pathak VK** (2012). Recombinant origin, contamination, and de-discovery of XMRV. *Curr Opin Virol* **2**(4):499–507.
5. **Paprotka T, Delviks-Frankenberry KA, Cingöz O, Martinez A, Kung H-J, Tepper CG, Hu W-S, Fivash MJ, Coffin JM, Pathak VK** (2011). Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science* **333**(6038):97–101.
6. **Cingöz O, Paprotka T, Delviks-Frankenberry KA, Wildt S, Hu W-S, Pathak VK, Coffin JM** (2012). Characterization, mapping, and distribution of the two XMRV parental proviruses. *J Virol* **86**(1):328–38.
7. **Stürzel CM, Palesch D, Khalid M, Wissing S, Fischer N, Münch J** (2013). Utilization of replication-competent XMRV reporter-viruses reveals severe viral restriction in primary human cells. *PLoS ONE* **8**(9):e74427.
8. **TRBA** (2012). Einstufung von Viren in Risikogruppen (TRBA 462). <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html>. Besucht am 17. März 2022.
9. **TRBA** (2012). Liste der Zelllinien und Tätigkeiten mit Zellkulturen (TRBA 468). <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-468.html>. Besucht am 17. März 2022.