

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 25 augustus 2017
KENMERK CGM/170825-01
ONDERWERP Advies inschaling *in vitro* werkzaamheden met recombinant humaan prion-eiwit

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-097_2.8-000 getiteld 'Downscaling van klonering prion eiwit in *E. coli*' ingediend door het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's van ggo-werkzaamheden met het humane prion-eiwit (PrP) en mogelijke maatregelen om de risico's voor mens en milieu te minimaliseren.

Prion-eiwitten zijn lichaamseigen eiwitten (PrP^c), die bij alle zoogdieren voorkomen. Onder bepaalde condities kan PrP^c van structuur veranderen en ontstaat PrP^{sc} eiwit. Aggregatie van PrP^{sc} in hersenweefsel leidt tot progressieve neurodegeneratieve afwijkingen met de dood tot gevolg. De aanvrager is van plan om een recombinante versie van het humane PrP eiwit, rPrP⁹⁰⁻²³¹, te kloneren en tot expressie te brengen in *E. coli*. Vervolgens zal de *E. coli* worden afgedood en is de aanvrager voornemens werkzaamheden met het gezuiverde eiwit uit te voeren.

De COGEM is van oordeel dat de kans dat het in *E. coli* geproduceerde rPrP⁹⁰⁻²³¹ pathogene conformaties zal aannemen verwaarloosbaar klein is, omdat hiervoor behandeling van het gezuiverde rPrP met denaturerende chemicaliën en/of toevoeging van specifieke co-factoren noodzakelijk is. Zij is van oordeel dat de klonerings- en productiewerkzaamheden uitgevoerd kunnen worden op ML-I.

Het is bekend dat onder bepaalde condities gezuiverd rPrP omgezet kan worden in infectieuze conformaties en prionziektes kan veroorzaken. De COGEM kan niet uitsluiten dat er tijdens de voorgenomen zuiveringswerkzaamheden infectieus PrP^{sc} gevormd zal worden. De COGEM adviseert de zuivering van rPrP⁹⁰⁻²³¹ op ML-II uit te voeren met inachtneming van een aantal aanvullende werkvoorschriften om de kans op blootstelling van laboratoriummedewerkers te verkleinen. Op deze inperkingsniveaus en met inachtneming van deze aanvullende voorschriften, is de COGEM van oordeel dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn. Verder wijst de COGEM er op dat in het geval van een prikincident het van belang is dat de besmette persoon wordt uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels om verspreiding naar derden te voorkomen.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Vorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Inschaling *in vitro* werkzaamheden met recombinant humaan prion-eiwit

COGEM advies CGM/170825-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een vergunningaanvraag (IG 17-097) getiteld 'Downscaling van klonering prion eiwit in *E. coli*' ingediend door het Universitair Medisch Centrum Utrecht. De aanvrager is voornemens om een getrunceerde versie van de sequentie coderend voor het humane prion-eiwit (PrP) te kloneren en tot expressie te brengen in *Escherichia coli*. In de adviesvraag aan de COGEM stelt de gemandateerde vergunningverlener dat de werkzaamheden met het opgezuiverde eiwit na afdoding van de *E. coli* niet onder de ggo-regelgeving vallen. De COGEM is om advies gevraagd omdat er mogelijk infectieus PrP^{sc} gevormd kan worden tijdens de voorgenomen werkzaamheden. Infectie met PrP^{sc} kan leiden tot progressieve neurodegeneratieve afwijkingen, met de dood tot gevolg.

2. Prionen

Prion-eiwitten zijn lichaamseigen eiwitten (PrP^c, waarvan c van cellulair), die bij alle zoogdieren voorkomen. Een in het lichaam voorkomend eiwit kan alleen goed functioneren wanneer het correct gevouwen is. Eiwitten die niet correct gevouwen zijn, worden door het lichaam afgebroken. Er zijn situaties waarin verkeerd gevouwen endogene eiwitten niet afgebroken worden en gaan aggregeren. Eerst aggregereert een beperkt aantal eiwitten (oligomere vormen), die een 'seed' vormen. Hieraan kunnen zich meerdere van dezelfde verkeerd gevouwen eiwitten binden waardoor een keten en uiteindelijk een fibril (vezel) ontstaat. Van een fibril kunnen zich spontaan of door middel van cellulaire processen delen afsplitsen, die weer opnieuw als 'seed' kunnen fungeren. Uiteindelijk kunnen fibrillen samen plaques vormen die de werking van de cellen verstoren. De eiwitten van deze plaques (amyloïd) zijn zeer stabiel en worden moeilijk door proteasen afgebroken. Omdat het lichaamseigen eiwitten betreft, is er tijdens het ziekteproces geen betrokkenheid van het immuunsysteem.^{1,2,3}

Veel ongeneeslijke ziekten van het centraal zenuwstelsel (CZS) gaan gepaard met ophoping of aggregatie van eiwit in de hersenen. Het bekendste voorbeeld van schadelijke aggregerende eiwitten zijn prionen. Prionen veroorzaken overdraagbare *spongieuze encephalopathieën* (TSE's). Dit zijn fatale neurale aandoeningen die zowel bij mens als dier voorkomen. De meest bekende vormen zijn de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (CJD), het Gertsmann-Sträussler-Scheinker syndroom en Kuru bij de mens, scrapie in schapen en geiten, en bovine spongieuze encephalopathie (BSE) in runderen.^{5,35}

Door toevallige mutaties in het *PRNP* gen of als gevolg van infectie met prionen kan een PrP^{sc}-eiwit (waarbij sc verwijst naar scrapie) ontstaan. Deze eiwitten worden prionen genoemd (*proteinaceous infectious particle*), omdat ze nabijgelegen PrP^c-eiwitten van vorm laten veranderen in PrP^{sc}.^{4,5,35} PrP^c is een proteinase K gevoelige monomeer, waarvan de secundaire structuur gekenmerkt wordt door α -helices. PrP^{sc} is een multimeer, die minder gevoelig is voor proteinase K digestie en waarvan de secundaire structuur wordt gekenmerkt door vele β -sheets. Net als alle andere aggregerende eiwitten zijn prionen zeer stabiel en worden ze nauwelijks afgebroken in het lichaam.

Aggregatie van PrP^{sc} in hersenweefsel leidt tot progressieve neurodegeneratieve afwijkingen, met de dood tot gevolg.^{5,35}

Prionziekte bij de mens kan behalve door een toevallige mutatie in het PrP^c-gen ook ontstaan door de consumptie van producten die prionen bevatten, door toediening van prion-gecontamineerde groeihormonen, via besmet neurochirurgisch instrumentarium, door transplantatie van organen of via bloedproducten. Het risico op besmetting is het hoogst bij contact met hersenmateriaal, het binnenste van het oog en ruggenmerg.^{6,35} PrP^{sc}-eiwitten kunnen op deze wijze van mens-op-mens overgedragen worden, zoals in het geval van CJD en Kuru.^{5,35} Daarnaast kan BSE (voor zover bekend) als enige TSE de soortgrens doorbreken en van dier-op-mens overgedragen worden.⁷ Zo kan consumptie van met BSE besmet rundvles leiden tot het ontstaan van de ziekte van Creutzfeldt-Jakob variant (vCJD) (eerste ziektegeval beschreven in 1996).^{7,12} Er zijn meer dan 492 gevallen bekend van iatrogene transmissie (door medisch handelen) van prionziekte, waarvan de meerderheid als gevolg van toediening van prion-gecontamineerde groeihormonen (238 gevallen) en dura mater transplantaties (238 gevallen).⁸ Verder zijn er tot op heden 3 gevallen beschreven waarin vCJD is overgedragen van mens-op-mens via besmet bloed (bloedtransfusie).^{8,9,12} Naast het CZS zijn perifere weefsels van vCJD patiënten ook een bron van infectie en kan PrP^{sc} ook in de urine van vCJD patiënten worden gedetecteerd.^{10,11,12}

2.1 Prion-vorming en infectiositeit van recombinant PrP

De gangbare hypothese is dat infectieuze prionen alleen uit misgevouwen PrP^{sc} eiwit bestaan, een zelf-propagerende conformatie die PrP^c van vorm laat veranderen in PrP^{sc}.²² De zelf-propagerende eigenschap van PrP^{sc} kan worden gedemonstreerd met *in vitro* assays. De assays die hiervoor gebruikt worden zijn een celvrije conversie-assay en 'proteïen misfolding cyclic amplification' (sPMCA). In de celvrije conversie-assay wordt gedeeltelijk gezuiverd PrP^{sc} als 'seed' gebruikt en uit celkweek gezuiverd PrP^c gebruikt als substraat. Dit is een stuk minder efficiënt dan sPMCA waarin gebruik wordt gemaakt van hersenhomogenaten, waarbij bepaalde co-factoren in het hersenhomogenaat, zoals RNA moleculen en proteoglycanen, de conversie naar PrP^{sc} promoten.

De aanwezigheid van co-factoren lijkt een belangrijke rol te spelen bij de misvouwing en de instandhouding van de infectieuze PrP^{sc} conformatie.^{13,14} Naast RNA moleculen en proteoglycanen kunnen lipiden zoals phospholipid-1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPGD) en phosphatidylethanolamine (PE) ook als co-factoren bij de vorming van prionen optreden.^{13,14}

In *E. coli* geproduceerd PrP kan in aanwezigheid van deze co-factoren omgezet worden in infectieuze conformaties, welke na intracerebrale toediening prionziekte veroorzaken in wild-type knaagdieren en klinische symptomen veroorzaken die vergelijkbaar zijn met scrapie.^{15,16,17,18,19} Hoewel hoge titers infectieuze prionen tot nu toe alleen in de aanwezigheid van co-factoren zijn bereikt,^{15,16,17,18,19,20} zijn er een aantal studies die laten zien dat onder specifieke condities gezuiverd rPrP ook infectieus kan zijn in afwezigheid van co-factoren.^{21,22,23}

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens een recombinante vorm (rPrP) van het humane prion-eiwit PrP te kloneren en tot expressie te brengen in een gangbare geattenueerde apathogene *E. coli*

laboratoriumstam (*E. coli* B). Gedurende de opzuivering van het rPrP eiwit wordt de *E. coli* afgedood. Daarna zullen er werkzaamheden plaatsvinden met dit opgezuiverde prion-eiwit.

Het rPrP eiwit dat de aanvrager van plan is te gebruiken is een getrunceerde versie van PrP bestaande uit aminozuren 90-231 (rPrP⁹⁰⁻²³¹). Deze rPrP variant wordt veel gebruikt in studies om de *in vitro* conversie van PrP^c naar infectieus PrP^{sc} te bestuderen.^{24,25,26,27,28,46} rPrP⁹⁰⁻²³¹ omvat PrP27-30, dit is de proteinase K-resistente kern van PrP^{sc}. PrP27-30 ontstaat uit PrP^{sc} door klieving van de N-terminus in de buurt van aminozuur residu 90.^{29,30}

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden vier maal over prion-gerelateerd onderzoek geadviseerd.^{31,32,33,34} Het eerste advies uit 2004 over dit onderwerp betrof een vergunningaanvraag voor de klonering en expressie in muizen van PrP genen afkomstig van varken, rund en schaaap.³¹ Gezien de wijze van verspreiding van het agens en het ernstige ziektebeeld adviseerde de COGEM werkzaamheden met TSE's onder BSL2 condities uit te voeren.

Aangezien het PrP-eiwit in zijn normale cellulaire vorm niet schadelijk is, achtte de COGEM het uit oogpunt van de risico's voor mens en milieu alleen noodzakelijk om ontsnapping van de transgene muizen en de daaruit voortvloeiende verspreiding van het transgen in andere muizenpopulaties te voorkomen. Zij adviseerde derhalve de transgene PrP muizen op D-I te huisvesten. Echter als deze muizen werden blootgesteld aan TSE's, achtte de COGEM een opschaling naar DM-II noodzakelijk en adviseerde daarbij de volgende aanvullende voorschriften:

- Spattende en aërosol genererende handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse 2,
- Het gebruik van scherpe gereedschappen dient zoveel mogelijk te worden vermeden,
- Afval dient te worden geïnactiveerd door incubatie in 2M NaOH gevolgd door een minimale verhitting gedurende 30 minuten bij 121°C,
- Geïnfecteerde dieren dienen door verbranding vernietigd te worden,
- Gezien de onvolledige werking van 2M NaOH acht de COGEM het noodzakelijk de werkplekken te voorzien van materiaal dat geautoclaveerd kan worden.

Na dit advies heeft de COGEM nog driemaal geadviseerd over manieren waarop priongecontamineerd materiaal geïnactiveerd kan worden en wordt ingegaan op het type kooien waarin transgene PrP-muizen gehouden moeten worden.^{32,33,34} Op basis van de toenmalig beschikbare wetenschappelijke gegevens concludeerde de COGEM dat aërogene overdracht van prionen niet mogelijk was en achtte zij het gebruik van filtertopkooien niet noodzakelijk.

Naar aanleiding van vragen en zorgen uit het werkveld over risico's met werkzaamheden van aggregerende eiwitten (anders dan prionen) die mogelijk betrokken zijn bij neurodegeneratieve ziektes (zoals de ziekte van Alzheimer en Parkinson), heeft de COGEM recent een inventarisatie laten uitvoeren van de beschikbare informatie over de aard van deze aggregerende eiwitten en de mogelijke risico's die de werkzaamheden met deze eiwitten met zich meebrengen. Op basis van de wetenschappelijke informatie beschreven in het onderzoeksrapport³⁵, waaruit onder meer blijkt dat er

geen aanwijzingen zijn voor transmissie of infectiositeit, was de COGEM van oordeel dat inperkingsmaatregelen niet nodig zijn om de milieuveiligheid te waarborgen. Alleen bij handelingen met replicerende vectorsystemen in combinatie met aggregerende eiwitten dienen extra inperkingsmaatregelen in acht genomen te worden. De COGEM signaleerde verder dat vanuit ARBO-overwegingen wel veiligheidsmaatregelen noodzakelijk zijn om laboratoriummedewerkers te beschermen.³⁶

5. Inschaling van TSE's door andere instanties

In de Europese richtlijn 2000/54/EG⁴³ worden 'onconventionele agentia' die in verband worden gebracht met de TSE's: Creutzfeldt-Jakob, Variant van Creutzfeldt-Jakob, BSE en andere daaraan verwante dierlijke TSE's, het Gerstmann-Sträussler-Scheinkersyndroom en Koeroe in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld, met daarbij de opmerking dat deze biologische agentia voor de werknemers een beperkt besmettingsrisico kunnen opleveren, omdat ze normaal niet aërogeen overdraagbaar zijn. Verder heeft de 'World Health Organization' (WHO) verschillende richtsnoeren opgesteld ter beheersing van TSE's.^{37,38}

Het 'Swiss Expert Committee for Biosafety' deelt 'onconventionele agentia' die in verband worden gebracht met de TSE's Creutzfeldt-Jakob, BSE en andere daaraan verwante dierlijke TSE's, het Gerstmann-Sträussler-Scheinkersyndroom en Kuru ook in risicogroep 3 in. De TSE's die niet geassocieerd zijn met ziekte in mens en alleen ziekte in dieren veroorzaken, zoals scrapie en 'chronic wasting disease' worden in risicogroep 2 ingedeeld.³⁹ Verder heeft zij kloneringswerkzaamheden met wild-type PrP^{sc} genen ingedeeld in klasse 2 en 3.⁴⁰ Ook het Belgische Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) heeft onconventionele agentia die geassocieerd zijn met TSE in risicogroep 3 ingedeeld.⁴¹

Het Amerikaanse 'Centers for Disease Control and Prevention' schrijft voor dat de werkzaamheden met dierlijke prionen, prionen uit menselijk weefsel en menselijke prionen uit dierlijk weefsel uitgevoerd moeten worden op BSL-2. Daarnaast moeten sommige werkzaamheden met BSE prionen uitgevoerd worden op BSL-3.⁴² De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

6. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de inschaling van de klonering van een getrunceerde versie van de sequentie coderend voor het humane prion-eiwit (PrP^c) en de productie van dit eiwit in *E. coli*. De vergunningverlener stelt in de adviesvraag dat de werkzaamheden met het opgezuiverde eiwit na afdoding van de *E. coli* niet onder de ggo-regelgeving vallen.

De COGEM wijst erop dat dit laatste inconsistent lijkt. Door te stellen dat het gezuiverde eiwit niet onder de ggo-regelgeving valt, gaat de vergunningverlener voorbij aan de aard van PrP^{sc} en daarmee aan het feit dat bij zowel de werkzaamheden in *E. coli* als met gezuiverd eiwit het (milieu)risico bepaald wordt door de vraag of er infectieus PrP^{sc} gevormd kan worden, besmetting van laboratoriummedewerkers kan optreden en vervolgens verspreiding van PrP^{sc} (cq prionziekten) naar derden kan optreden. Indien het onder laboratoriumomstandigheden geproduceerde of gevormde PrP^{sc}

niet onder de ggo-regelgeving valt, lijkt er ook geen onderbouwing om de expressiewerkzaamheden in *E. coli* anders dan op ML-I in te schalen.

Of het infectieuze agens PrP^{sc} onder de reikwijdte van de ggo-regelgeving valt, is niet eenvoudig te beantwoorden en hangt zowel samen met de aard van prionen en de risico's die ze met zich meebrengen, als de juridische definitie van wat een ggo is.

Prionen kunnen zich vermeerderen, overgedragen worden van individu naar individu en veroorzaken ernstige ziekten met hoge mortaliteit. Prionen staan verder vermeld als onconventionele biologische agentia in de EU richtlijn 2000/54/EG.⁴³

In het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 wordt als definitie van een ggo gegeven:

- 1) *Een organisme, met uitzondering van menselijke wezens, waarvan het genetisch materiaal is veranderd op een wijze die van nature niet mogelijk is door voortplanting of natuurlijke recombinitie.*
- 2) *Als genetisch gemodificeerd organisme worden in elk geval aangemerkt organismen die zijn verkregen door middel van technieken als genoemd in bijlage 1.*

Opgemerkt moet worden dat de juridische definitie van een organisme afwijkt van de wetenschappelijke of gangbare definitie. Virussen zijn geen organismen maar vallen wel als zodanig onder het Besluit ggo. Mogelijk geldt hetzelfde voor onconventionele biologische agentia als prionen.

Onder laboratoriumomstandigheden geproduceerd PrP^{sc} valt in elk geval onder lid 2 van de definitie. Hierbij moet wel aangetekend worden dat bij vermeerdering van prionen in de gastheer altijd het wildtype prion zal ontstaan en dat het de vraag is in hoeverre bij prionen sprake is van genetisch materiaal.

De COGEM merkt verder op dat in het geval de ggo-regelgeving niet van toepassing is op onder laboratoriumomstandigheden gevormd PrP^{sc}, voor humaan en bovine PrP^{sc} de ARBO-regelgeving een veiligheidsvangnet vormt. Een dergelijk vangnet ter milieubescherming lijkt echter niet aanwezig in het geval van werkzaamheden met prionen van andere diersoorten.

De vraag of prionen wel of niet onder de ggo-regelgeving vallen, kan onmogelijk beantwoord worden in de korte termijn (14 dagen) die de COGEM ter beschikking staat om over een vergunningaanvraag voor Ingeperkt Gebruik te adviseren. In dit advies is daarom gekozen voor een pragmatische aanpak waarbij de vragen centraal staan of er in de onderhavige experimenten mogelijk PrP^{sc} gevormd kan worden, of er hierbij een kans is op eventuele besmetting van laboratoriummedewerkers, of in een dergelijk geval de prionziekte naar derden overgedragen zou kunnen worden, en of en in hoeverre er daarom inperkingsmaatregelen opgelegd moeten worden. Gezien het eerder vermelde, neemt de

COGEM daarbij niet alleen de werkzaamheden in *E. coli* in ogenschouw, maar (vooralsnog) ook de zuivering van het geproduceerde eiwit.

6.1 Transmissie van prionen

Prionen veroorzaken TSE's, dit zijn fatale neurale aandoeningen die zowel bij mens als dier voorkomen. Het lichaamseigen PrP^c-eiwit komt voor bij alle zoogdieren. Onder fysiologische condities is PrP een monomeer eiwit, waarvan de secundaire structuur gekenmerkt wordt door α -helices. Onder bepaalde condities ondergaan de PrP^c-eiwitten een conformatieverandering en veranderen ze in PrP^{sc}-eiwitten waarvan de structuur gekenmerkt wordt door vele β -sheets. Aggregatie van PrP^{sc} in hersenweefsel leidt tot progressieve neurodegeneratieve afwijkingen, met de dood tot gevolg.^{5,35} Om deze reden beschouwt de COGEM PrP als een potentieel schadelijk¹ genproduct.

TSE's zijn van dier-op-dier, dier-op-mens en van mens-op-mens overdraagbaar. Transmissie kan plaatsvinden door toediening van prion-gecontamineerde groeihormonen, via besmet neurochirurgisch instrumentarium, door transplantatie van organen of via bloedproducten. Verder zijn er enkele gevallen beschreven van overdracht van mens-op-mens via besmet bloed. TSE's zijn ook via natuurlijke transmissieroutes overdraagbaar (consumptie van producten die prionen bevatten).^{5,35}

Op basis hiervan beschouwt de COGEM PrP^{sc} als een infectieus biologisch agens dat naar derden kan worden overgedragen.

6.2 Klonering en expressie van rPrP⁹⁰⁻²³¹ in *E. coli*

De aanvrager is voornemens een recombinante vorm (rPrP⁹⁰⁻²³¹) van het humane prion-eiwit PrP te kloneren en tot expressie te brengen in *E. coli*. De te gebruiken *E. coli* gastheer is gedefinieerd als een pathogeen uit klasse 1, biologisch ingeperkt en niet in staat in het milieu te overleven of zich te verspreiden.

In *E. coli* geproduceerd rPrP wordt veelvuldig gebruikt in studies om de *in vitro* conversie van recombinant PrP naar infectieus PrP^{sc} te bestuderen.^{24,25,26,27,28,46} Hiertoe wordt het in *E. coli* tot expressie gebrachte rPrP samengevoegd met PrP^{sc}, of het rPrP *in vitro* omgezet in PrP^{sc} door behandeling met denaturerende chemicaliën en/of toevoeging van specifieke co-factoren.^{13,14,30,44,45,46,47,48,49} Alleen onder deze condities ondergaat rPrP de noodzakelijke conformatieverandering voor infectiositeit, mede omdat er een grote energiebarrière is die overwonnen moet om de conversie mogelijk te maken.^{30,46}

Gezien het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat de kans op vorming van PrP^{sc} tijdens de klonerings- en expressiewerkzaamheden van rPrP⁹⁰⁻²³¹ in *E. coli* verwaarloosbaar klein is. Alle aspecten in overweging nemende, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, indien de voorgenoemde klonerings- en expressiewerkzaamheden uitgevoerd worden op ML-I. Hierbij acht de COGEM het van belang dat de voorgenoemde klonerings- en expressiewerkzaamheden van rPrP⁹⁰⁻²³¹ worden uitgevoerd in een laboratorium dat niet eerder is blootgesteld aan prionen om

¹ De COGEM zal in een later stadium terugkomen op het exacte karakter en de eigenschappen van PrP. Het genproduct PrP^c is niet schadelijk. De term 'potentieel schadelijk' wordt in dit advies gebruikt omdat PrP^c omgezet kan worden in PrP^{sc}.

potentiële contaminatie met PrP^{Sc} bevattend materiaal uit te sluiten en daardoor initiatie van prionvorming te voorkomen.

6.3 Zuivering van rPrP⁹⁰⁻²³¹

Na de klonering en productie van rPrP⁹⁰⁻²³¹ in *E. coli* is de aanvrager voornemens om rPrP⁹⁰⁻²³¹ op te zuiveren en wordt de *E. coli* afgedood. De aanvrager is voornemens de werkzaamheden met het opgezuiverde eiwit op BSL-2 niveau uit te voeren.

In *E. coli* geproduceerd rPrP⁹⁰⁻²³¹ accumuleert als onoplosbare vorm in inclusielichamen. Na denaturatie in GuHCl en urea bevattende buffers, en zuivering (NTA kolom) kan gereduceerd PrP onder lage pH (4.0) onder specifieke condities β -sheet rijke conformaties aannemen.^{30,44,45,46,47,48,49}

Verscheidene recente studies hebben aangetoond dat gezuiverd rPrP in aanwezigheid van co-factoren omgezet kan worden in infectieuze conformaties die na intracerebrale toediening prionziekte kunnen veroorzaken in wild-type knaagdieren en klinische symptomen veroorzaakten die vergelijkbaar zijn met scrapie.^{15,16,17,18,19} Hoewel de aanwezigheid van lipiden als co-factoren een belangrijke rol lijkt te spelen bij het ontstaan van de infectieuze PrP^{Sc} conformatie, zijn er een aantal studies die laten zien dat onder gedeneureerde condities gezuiverd rPrP in afwezigheid van co-factoren een conformatieverandering kan ondergaan en daardoor ook infectieus kan worden.^{21,22,23}

De COGEM kan om deze reden niet uitsluiten dat er tijdens de voorgenomen zuiveringswerkzaamheden van rPrP⁹⁰⁻²³¹ infectieus PrP^{Sc} gevormd wordt. De kans bestaat dat een laboratoriummedewerker als gevolg van een (prik)incident besmet raakt met PrP^{Sc} en prionziekte ontwikkelt. In een dergelijk geval kan de COGEM niet uitsluiten dat PrP^{Sc} (de prionziekte) overgedragen kan worden naar derden (bijvoorbeeld door bloedtransfusie of orgaandonatie).

Gezien bovenstaande adviseert de COGEM de zuivering van het geproduceerde rPrP⁹⁰⁻²³¹ op ML-II uit te voeren. Om de kans op besmetting van de medewerker (door spatincidenten, prikincidenten, verkleining van het werkoppervlak, besmetting van materialen en apparatuur in het laboratorium) gedurende de voorgenomen zuiveringswerkzaamheden te minimaliseren, acht de COGEM hierbij de volgende aanvullende maatregelen noodzakelijk:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse 2;
- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Het gebruik van 'sharps' moet tot een minimum worden beperkt en is alleen toegestaan in combinatie met kevlarhandschoenen.

Verder wijst de COGEM er op dat in het geval van een prikincident het van belang is dat de besmette laboratoriummedewerker wordt uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels om besmetting naar derden te voorkomen.

6.4 Inactivatiemethode rPrP⁹⁰⁻²³¹

Gezien de COGEM niet kan uitsluiten dat er tijdens de voorgenomen zuiveringswerkzaamheden van rPrP⁹⁰⁻²³¹ infectieus PrP^{Sc} gevormd wordt, acht de COGEM het van belang dat mogelijk prion-besmet materiaal geïnactiveerd wordt. PrP^{Sc} is een zeer stabiel eiwit dat niet eenvoudig te inactiveren is.

Gangbare inactivatiemethoden als autoclaveren, gebruik van alcohol, formaldehyde, etc. volstaan niet. Derhalve zijn voor werkzaamheden met prion-besmet materiaal specifieke inactivatiemethoden opgesteld. De COGEM heeft hier eerder over geadviseerd.^{32,33,34}

Tot de tijd dat een gevalideerde inactivatiemethode is vastgesteld, adviseert de COGEM voor decontaminatie de volgende voorschriften te hanteren:

- Het vaste afval en kleine volumina vloeibaar afval dient in breukvaste en lekdichte containers verzameld en als ziekenhuisafval door verbranding vernietigd te worden;
- Vloeibaar afval dient geïnactiveerd te worden door incubatie in 2M NaOH, gevolgd door een minimale verhitting gedurende 30 minuten bij 121°C;
- Gezien de onvolledige werking van 2M NaOH dienen werkplekken voorzien te zijn van absorberend materiaal dat geautoclaveerd kan worden.

7. Conclusie

Concluderend acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de klonerings- en expressiewerkzaamheden van rPrP⁹⁰⁻²³¹ in *E. coli* uitgevoerd worden op ML-I en de zuivering van het geproduceerde eiwit uitgevoerd wordt op ML-II onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften ter voorkoming van besmetting van personen en maatregelen voor het inactiveren van met prionen besmet materiaal.

8. Signalering

Hoewel de COGEM vanuit het oogpunt van milieurisico kan instemmen met het uitvoeren van voorgenomen klonerings- en expressiewerkzaamheden op ML-I en de zuiveringswerkzaamheden op ML-II, plaatst zij in het licht van de bewustwording van medewerkers hierbij haar vraagtekens. De COGEM wijst de aanvrager er op dat het mogelijk niet inzichtelijk is voor de medewerker waar dit onderscheid op is gebaseerd. De COGEM wijst er ook op dat niet bij de experimenten betrokken personen toegang hebben tot ML-I ruimtes en dat het niet wenselijk is dat mogelijk niet geïnformeerde derden in aanraking komen met *E.coli* kweken die een potentieel schadelijk genproduct tot expressie brengen. Dit alles in ogenschouw nemende geeft de COGEM de vergunningaanvrager en de regelgevende instanties in overweging of het niet wenselijker is dat alle werkzaamheden op ML-II uitgevoerd worden.

Referenties

1. Jucker M & Walker LC (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501: 45-51
2. Morales R *et al.* (2015). Prion-like features of misfolded A-beta and tau aggregates. *Virus Res.* 207: 106-112
3. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met het aggregerende eiwit tau. CGM/161018-01
4. Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144
5. Annus Á *et al.* (2016). Prion diseases: New considerations. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 150: 125-132

6. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2014). LCI-richtlijn Creutzfeldt-Jakob, ziekte van. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/creutzfeldt-jakob-ziekte-van> (bezoekt: 17 augustus 2017)
7. EFSA panel on biological hazards and ECDC (2011). Joint Scientific Opinion on any possible epidemiological or molecular association between TSEs in animals and humans. *EFSA Journal* 9: 1945
8. Bonda DJ *et al.* (2016). Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg. Focus* 41: E10. doi: 10.3171/2016.5.FOCUS15126
9. Davidson LR *et al.* (2014). Variant CJD and blood transfusion: are there additional cases? *Vox. Sang.* 107: 220-225
10. Moda *et al.* (2014). Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *371*: 530-539
11. Bruce ME *et al.* (2001). Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet.* 358: 208-209
12. World Health Organization (2006). WHO Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies. <http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf?ua=1> (bezoekt: 15 augustus 2017).
13. Ma J (2012). The Role of Cofactors in Prion Propagation and Infectivity. *PLoS Pathog.* 4: e1002589.
14. Wang F & Ma J (2013). Role of lipid in forming an infectious prion? *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 45: 485-493
15. Wang F *et al.* (2010) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327: 1132–1135.
16. Wang F *et al.* (2012) Genetic informational RNA is not required for recombinant prion infectivity. *J. Virol.* 86: 1874–1876
17. Deleault NR *et al.* (2012). Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 8546-8551
18. Deleault NR *et al.* (2012). Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: E1938-1946
19. Zhang Z *et al.* (2013). De novo generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein. *FASEB J.* 27: 4768-4775
20. Wang F *et al.* (2017). Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathog.* 13: e1006491. doi: 10.1371/journal.ppat.1006491
21. Kim JL *et al.* (2010). Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J. Biol. Chem* 285: 14083-14087
22. Choi J-K *et al.* (2016). Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113: 13851-13856
23. Makarava N *et al.* (2010) Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol.* 119: 177–187
24. Swietnicki W *et al.* (2000). Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry* 39: 424-431
25. Zhang H *et al.* (1997). Physical studies of conformational plasticity in a recombinant prion protein. *Biochemistry* 36: 3543-3553

26. Jackson GS *et al.* (1999). Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 283: 1935-1937
27. Sokolowski F *et al.* (2003). Formation of critical oligomers is a key event during conformational transition of recombinant syrian hamster prion protein. 278: 40481-40492
28. Kazlauskaitė J *et al.* (2003). Structural Changes of the Prion Protein in Lipid Membranes Leading to Aggregation and Fibrillization. 42: 3295-3304
29. Prusiner SB (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13363-13383
30. Bocharova OV *et al.* (2005). *In vitro* conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J. Mol. Biol.* 346: 645-659
31. COGEM (2004). Bovine Spongieuze Encephalopathie/Scrapie; clonering en expressie van PrP genen afkomstig van varken, rund en schaaap in muis. COGEM advies CGM/040212-03
32. COGEM (2004). Inactiveren van prionen. COGEM advies CGM/040526-01
33. COGEM (2005). Inactiveren van prionen en huisvesting van met prionen geïnfecteerde muizen. COGEM advies CGM/051028-02
34. COGEM (2006). Expressie van prioneiwitten in muizencellijnen. Inactivatie van prionen in vloeibaar afval. COGEM advies CGM/060127-01
35. Geragousian B, Luider TM & De Vrij J (2016). Aggregated proteins; Are they infectious? COGEM onderzoeksrapport CGM 2017-01
36. COGEM (2017). Adviserende aanbiedingsbrief over werkzaamheden met aggregerende eiwitten en ggo's. COGEM advies CGM/170316-04
37. World Health Organization (2000). WHO infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies.
38. World Health Organization (2003). WHO guidelines on transmissible spongiform encephalopathies in relation to biological and pharmaceutical products
39. Federal Office for the Environment FOEN (2013). Classification of Organisms. Part 2: Viruses. Status January 2013 <https://www.bafu.admin.ch/bafu/en/home/topics/biotechnology/publications-studies/publications/classification-of-organisms.html> (bezoekt: 24 augustus 2017)
40. Swiss Expert Committee for Biosafety (SECB) (2013). Recommendation of the Swiss Expert Committee for Biosafety on the classification of activities using prion genes and prion proteins. http://www.efbs.admin.ch/fileadmin/efbs-dateien/dokumentation/empfehlungen/Empfehlungen_aktuell/Prionen_EFBS_E.pdf (bezoekt: 14 augustus 2017)
41. Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) Risk assessment of laboratories involving the manipulation of unconventional agents causing TSE (2009). http://www.biosafety.be/CU/PDF/Report_Prions_IPH_D_2009_2505_49.pdf (bezoekt: 15 augustus 2017).
42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Section VIII-H: Prion Diseases. <https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/> (bezoekt: 15 augustus 2017)
43. RICHTLIJN 2000/54/EG VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD van 18 september 2000 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk

44. Moda F *et al.* (2015). Synthetic prions with novel strain-specified properties. 11:e1005354. doi: 10.1371/journal.ppat.1005354. eCollection 2015 Dec.
45. Legname G *et al.* (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* 305: 673-676
46. Baskakov IV *et al.* (2001). Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control. *276*: 19687-19690
47. Völkel D *et al.* (1998). Large-scale production, purification and refolding of the full-length cellular prion protein from Syrian golden hamster in *Escherichia coli* using the glutathione S-transferase-fusion system. *Eur. J. Biochem.* 251: 462-271
48. Yin SM *et al.* (2003). On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag. *Protein Expr. Purif.* 32: 104-109
49. Jackson GS *et al.* (1999). Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431:1-13