

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

DATUM 02 juni 2017
KENMERK CGM/170602-02
ONDERWERP Advies omlaagschaling werkzaamheden met gg-RSV in associatie met gg-muizen

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-042_2.8-000 getiteld 'Omlaagschaling werkzaamheden met avian leukosis virus', ingediend door het Nederlands Kanker Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Rous sarcoma virus* (RSV). De aanvrager wil kippencellen gebruiken voor de productie van gg-RSV dat gensequenties bevat die verkeerd tot expressie komen bij bepaalde vormen van kanker. De aanvrager is voornemens de gg-RSV producerende kippencellen te injecteren in de hersenen van gg-muizen. Als gevolg van de infectie van de gliacellen met gg-RSV, ontwikkelen de muizen hersentumoren. De aanvrager verzoekt om omlaagschaling van *in vivo* en *in vitro* werkzaamheden 4 weken na injectie van respectievelijk DM-II en ML-II naar D-I en ML-I.

Op basis van de relatief korte overlevingstijd van de kippencellen, de relatief korte halfwaardetijd van de virusdeeltjes, en het feit dat de geïnfecteerde muizencellen geen infectieus virus produceren, acht de COGEM het onwaarschijnlijk dat er 4 weken na injectie nog infectieus gg-RSV aanwezig zal zijn in de gg-muizen. Om deze reden kan de COGEM instemmen met omlaagschaling van werkzaamheden met de gg-muizen 4 weken na injectie naar D-I, en van werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig van de geïnjecteerde gg-muizen 4 weken na de injectie naar ML-I.

Op deze inperkingsniveaus is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

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

Omlaagschaling werkzaamheden met gg-RSV in associatie met gg-muizen

COGEM advies CGM/170602-02

1. Inleiding

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG 17-042_2.8-000 getiteld ‘Omlaagschaling werkzaamheden met avian leukosis virus’ van het Nederlands Kanker Instituut is de COGEM gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden. De aanvrager is voornemens een DF-1 kippencellijn te transfacteren met een retrovirale vector (RCASBP) afgeleid van het *Rous sarcoma virus* (RSV). Door transfectie met RCASBP zullen de DF-1 kippenfibroblasten RCASBP virus produceren. Vervolgens zullen de RCASBP producerende DF-1 cellen geïnjecteerd worden in de hersenen van genetisch gemodificeerde (gg-) muizen. Deze gg-muizen zijn zo gemodificeerd dat zij de voor vogels specifieke TVA receptor tot expressie brengen in de voorlopers van gliacellen. Als gevolg van de infectie van de gliacellen met RCASBP virus (gg-RSV) ontwikkelen de muizen hersentumoren.

In de huidige vergunningaanvraag verzoekt de aanvrager om *in vivo* werkzaamheden met gg-muizen die geïnjecteerd zijn met de RCASBP (gg-RSV) producerende DF-1 cellen, 4 weken na injectie, uit te mogen voeren op D-I niveau. Daarnaast verzoekt de aanvrager om omlaagschaling naar ML-I van *in vitro* werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig van de geïnjecteerde gg-muizen 4 weken na de injectie.

2. *Rous sarcoma virus* (RSV)

Het *Rous sarcoma virus* (RSV) behoort binnen de familie van de *Retroviridae* tot het genus *Alpharetrovirus*.^{1,2} RSV veroorzaakt sarcomen (kwaadaardige tumoren van weke delen) en bepaalde vormen van bloedcelkanker. RSV komt specifiek voor bij bepaalde vogelsoorten (kip, fazant, kwartel, kalkoen en (in mindere mate) eend), en is endemisch onder tamme kippen.³

RSV heeft een positief enkelstrengs lineair RNA genoom dat omhuld wordt door een envelop.¹ Het genoom omvat twee kopieën (homodimeer) die elk uit ongeveer 7500 basen bestaan.^{2,3} Het genoom van RSV bevat vijf coderende genen: *gag*, *pro*, *pol*, *env* en *src*. Het *gag* gen codeert voor drie verschillende structurele eiwitten die de basis vormen van het virusdeeltje. Het gen *pro* codeert voor een protease. Het *env* gen codeert voor het oppervlakte-eiwit SU en het transmembraaneiwit TM. Het SU eiwit zorgt voor het initiële contact met de gastheerreceptor, en het TM eiwit speelt een belangrijke rol bij de membraanfusie.^{2,3} *Pol* codeert voor eiwitten die nodig zijn voor de reverse transcriptie en integratie van het virale genoom in het DNA van de gastheer (het provirus). Het RNA polymerase II van de gastheer produceert vervolgens het RSV mRNA.³ In het cytoplasma van de gastheercel vindt translatie plaats. De virale eiwitten vormen vervolgens samen met het gesynthetiseerde RNA een nieuw virusdeeltje.²

Naast *gag*, *pro*, *pol* en *env* bevat RSV ook het *src* oncogen. Het *src* gen zorgt er voor dat RSV in staat is om cellen te transformeren.^{1,2,3} Oncogen-bevattende retrovirussen zijn vaak replicatie-incompetent en afhankelijk van een helpervirus, omdat de incorporatie van oncogenen in het genoom

van de virussen doorgaans ten koste gaat van andere virale genen. RSV is in dit opzicht uitzonderlijk, aangezien het een replicatie-competent oncogeen virus betreft.^{1,2,3}

2.1 RSV in zoogdiercellen

De cellulaire receptor van RSV is de zogenaamde TVA receptor, welke geconserveerd is in vogels.^{2,4,13} Door binding van oppervlakte-eiwit SU van RSV aan de TVA receptor kan het virus cellen infecteren. Het gastheerbereik van RSV is beperkt tot vogels (kip, fazant), omdat zoogdiercellen de TVA receptor niet tot expressie brengen.^{2,6,13} Slechts in zeer uitzonderlijke situaties, onder nauw cel-cel contact, is RSV in staat zoogdiercellen infecteren en in zeldzame gevallen kan dit leiden tot sarcoma-inductie bij zoogdieren.^{3,5,6,10}

RSV kan echter niet repliceren in zoogdiercellen en integratie van het RSV provirus in het genoom van zoogdieren, leidt niet tot de productie van infectieuze virusdeeltjes.^{5,6,9,10} Dit komt omdat er verschillende blokkades zijn in zoogdiercellen, waaronder bij de provirus expressie (*env* gen expressie) en bij het transport van 'unspliced' viraal RNA van de kern naar het cytoplasma.^{5,6,9,10} Er zijn slechts enkele zeldzame gevallen beschreven waarin het provirus in staat bleek zich te repliceren in tumorcellijnen van zoogdieren.^{6,7,8}

Deze blokkades kunnen opgeheven worden door RSV-getransformeerde cellen te fuseren met permissieve kippenfibroblasten, hierdoor treedt er 'virus rescue' op en zijn de zoogdiercellen wel in staat infectieus RSV virus te produceren.^{9,10} De efficiëntie van 'virus rescue' kan verder vergroot worden door *trans* expressie van de virale genen *gag* en *env* of infectie met een helpervirus.^{6,9} De aanwezigheid van bepaalde factoren uit kippencellen is essentieel voor RSV replicatie en de productie van infectieuze virusdeeltjes, maar welke cellulaire factoren dit precies zijn, is nog onduidelijk.^{5,6,9,10}

3. Genetisch gemodificeerd RSV (RCASBP)

De aanvrager wil handelingen verrichten met een gg-RSV, genaamd RCASBP. RCAS virale vectoren zijn retrovirale vectoren afgeleid van het RSV virus en kunnen repliceren in cellen van vogels (kip, kwartel).¹¹ De naam RCAS staat voor 'Replication-Competent ASLV long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor'. RCAS vectoren bevatten de virale genen *gag*, *pol* en *env* en de 'splice site' van *src*. In RCAS virale vectoren is het *src* gen vervangen door het gen van interesse.^{11,13} Er zijn vele varianten van RCAS virale vectoren ontwikkeld. De aanvrager is voornemens gebruik te maken van RCASBP (Bryan Polymerase). RCASBP heeft als voordeel dat het een tienmaal hogere virale titer oplevert in kippencellen dan RCAS.¹¹

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft RSV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹² De COGEM heeft niet eerder een specifiek advies over werkzaamheden met dit virus uitgebracht.

5. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van het RCAS-TVA systeem om in de hersenen van gg-muizen tumoren te induceren (glioblastoma (GBM)) voor kankeronderzoek.^{13,14} Hiervoor is de aanvrager van plan om verschillende donorsequenties in een RCASBP vector te zetten. Deze

donorsequenties zijn afkomstig van ‘tumor suppressor’ genen en oncogenen die gedereguleerd zijn in humane GBM patiënten.^{14,15} Met behulp van het RCAS-TVA systeem is de aanvrager voornemens shRNAs gericht tegen ‘tumor suppressor’ genen tot expressie brengen in (de voorlopers van) gliacellen van de gg-muizen. Deze shRNAs moeten de expressie van de ‘tumor suppressor’ genen in deze cellen remmen. Ook wil hij met het RCAS-TVA systeem oncogenen tot overexpressie brengen in (de voorlopers van) gliacellen van de gg-muizen.

De aanvrager is van plan een DF-1 kippenfibroblastcellijn te transfecteren met de RCASBP vector. Door transfectie met RCASBP zullen de DF-1 kippencellen RCASBP produceren. Daarna zullen de RCASBP producerende DF-1 cellen geïnjecteerd worden in de hersenen van gg-muizen. Als gevolg van infectie van de gliacellen met RCASBP ontwikkelen de muizen hersentumoren.

Zoogdiercellen kunnen niet geïnfecteerd worden met RCASBP (gg-RSV) tenzij ze het *tva* gen tot expressie brengen.^{2,6,13} Hiervoor is de aanvrager voornemens gg-muizen (*nTVA; nTVA-Ink4a/Arf-/-*) te gebruiken die de TVA receptor, onder controle van een nestin promotor, tot expressie brengen in de voorlopers van gliacellen.^{13,14} Hierdoor blijft de virale infectie volgens de aanvrager beperkt tot deze celtypen en komt het transgen alleen in (de voorlopers van) gliacellen tot expressie.

Vervolgens wil de aanvrager een aantal (niet-invasieve) handelingen met de geïnfecteerde gg-muizen uit voeren (bestraling, MRI, toedienen van therapeutische medicijnen). Na afloop zullen cellen en organen van de gg-muizen worden geïsoleerd voor kweek en immunohistochemie.

6. Overweging

6.1 Kans op recombinatie bij de productie van RCASBP (gg-RSV) in DF-1 cellen

Voor de productie van RCASBP wordt de virale vector RCASBP getransfecteerd in een DF-1 kippencellijn. De DF-1 kippencellen bevatten volgens de aanvrager geen endogeen retrovirus.^{16,17,18}

De COGEM wijst er enerzijds op dat alle kippen endogene retrovirussen bevatten¹⁹ en dat aangeleverde literatuur niet direct aantoonde dat de DF-1 cellijn geen endogene retrovirussen produceert. Anderzijds zijn de DF-1 cellen afgeleid van *ev-0* fibroblasten van een 10-dagen oud kippenembryo. Bekend is dat deze cellen geen *Avian leucosis virus* (ALV) sequenties bevatten en verder zijn deze cellen goedgekeurd voor het aantonen van retrovirussen op basis van infectiviteitstesten (European pharmacopoea).²⁰ Op basis van deze gegevens is de COGEM van oordeel dat de DF-1 kippencellen die gebruikt worden voor de productie van RCASBP geen aan RSV verwant endogeen retrovirus bevatten. De kans dat er tijdens de productie recombinatie optreedt, acht de COGEM daarom verwaarloosbaar klein.

6.2 Biodistributie en uitscheiding in gg-muizen

De aanvrager heeft gevraagd om omlaagschaling van inperkingsniveau DM-II naar D-I voor *in vivo* werkzaamheden met gg-muizen, 4 weken na injectie met RCASBP (gg-RSV) producerende DF-1 cellen. Daarnaast verzoekt de aanvrager om omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig van de geïnjecteerde gg-muizen, 4 weken na de injectie naar ML-I. Hiervoor heeft de aanvrager informatie aangeleverd over de biodistributie en uitscheiding van RCASBP (gg-RSV) in de gg-muizen.

6.2.1 RCASBP producerende DF-1 cellen

De aanvrager stelt dat de RCASBP (gg-RSV) producerende DF-1 kippenfibroblasten na injectie in de hersenen van de gg-muizen 1-2 dagen overleven, terwijl ze het virus lokaal uitscheiden. Op basis van gegevens uit de literatuur stelt de aanvrager dat er in de muizen 2 dagen na injectie sporadisch nog RCASBP producerende DF-1 cellen te detecteren zijn, maar dat deze na 7 dagen niet meer te detecteren zijn.²¹ Daarnaast is het volgens de aanvrager onwaarschijnlijk dat deze cellen zich verder zullen verspreiden in het lichaam, omdat ze de bloed-hersenbarrière niet kunnen passeren.²²

De COGEM is van oordeel dat op basis van de aangeleverde literatuur niet uit te sluiten valt dat de DF-1 cellen langer dan 1-2 dagen kunnen overleven in de gg-muizen. Wel acht de COGEM het onwaarschijnlijk dat deze kippencellen lang zullen kunnen overleven in de hersenen van de gg-muizen. Verder acht de COGEM het onwaarschijnlijk dat DF-1 cellen zich zullen verspreiden door het lichaam van de gg-muizen, aangezien ze de bloed-hersenbarrière niet kunnen passeren. In het onwaarschijnlijke geval dat de DF-1 cellen zich toch buiten de hersenen verspreiden, zullen deze cellen geïnactiveerd worden door het immuunsysteem van de muis.

6.2.2 TVA receptor expressie

De aanvrager wil gebruik maken van gg- muizen die de TVA receptor, onder controle van een nestin promotor, tot expressie brengen. De aanvrager stelt dat de TVA receptor hierdoor specifiek tot expressie komt in de (voorlopers van) gliacellen en dat alleen deze cellen geïnfecteerd kunnen worden met het RCASBP virus.^{13,21}

De COGEM onderschrijft dat RCASBP normaal gesproken geen zoogdiercellen kan infecteren en dat enkel cellen die de TVA receptor tot expressie brengen, zullen worden geïnfecteerd. De COGEM merkt op dat de nestin promotor minder specifiek is dan de aanvrager stelt. Zo wordt nestin expressie onder andere ook aangetroffen in voorlopers van endotheel op plaatsen van neovascularisatie, in mesenchymale stamcellen in het beenmerg, en in de pericyten die geassocieerd zijn met bloedvaten. Deze cellen zouden in theorie dus ook de TVA receptor tot expressie kunnen brengen, maar de kans dat deze cellen geïnfecteerd raken na intracraniale injectie met RCASBP acht de COGEM zeer klein. Ook kan de COGEM niet uitsluiten dat niet-TVA-transgene cellen, die endogene eiwitten met TVA-achtige eigenschappen tot expressie brengen, geïnfecteerd kunnen raken met RCASBP, maar zij acht deze infectie minimaal en zelflimiterend.

6.2.3 Uitscheiding van infectieus RCASBP (gg-RSV)

De aanvrager stelt dat de RCASBP vector niet in staat is om te repliceren in muizen. Ter ondersteuning heeft de aanvrager validatie-experimenten uitgevoerd. Hiervoor zijn hersencellen van gg-muizen geïsoleerd 2,5 week na intracraniale injectie van RCAS-eGFP producerende DF-1 cellen. De gliacellen zijn in kweek gebracht en getest op uitscheiding van het RCAS-eGFP virus. De aanvrager geeft aan dat het RCAS-eGFP virus niet werd aangetoond in het medium van de geïnjecteerde muizenhersencellen. Volgens de aanvrager tonen deze gegevens aan dat RCASBP (gg-RSV) niet zal worden uitgescheiden.

Hoewel de COGEM van oordeel is dat de gebruikte test niet gedetailleerd beschreven is, lijkt er daadwerkelijk geen replicatie van het virus meer op te treden. Dit, tezamen met de resistentie van

zoogdiercellen die de TVA receptor missen, geeft de COGEM de overtuiging dat het risico van de handelingen met deze sterk biologisch ingeperkte vector verwaarloosbaar klein is.

6.2.4 Kans op recombinatie van RCASBP met endogeen muizen retrovirus

De aanvrager is voornemens om de gg-muizen 4 weken na injectie te bestralen. In de wetenschappelijke literatuur is beschreven dat bestraling kan leiden tot inductie van endogene retrovirussen in diverse muizenstammen (C57/B16, Balb/C en NMRI).^{23,24,25,26}

De COGEM merkt op dat de voorgenomen bestraling dus mogelijk kan leiden tot activatie van endogene retrovirussen in de muizencellen. Hoewel dit zou kunnen kan leiden tot recombinatie van RCASBP met zulke virussen of mobilisatie van RCASBP vectoren door ecotrope of xenotrope retrovirussen, zijn bij de COGEM geen voorbeelden bekend van recombinaties tussen RSV en *Murine leukemia virus* (MLV) of mobilisatie en 'rescue' van RSV door MLV in zoogdiercellen.

7. Advies

De aanvrager is voornemens RCASBP (gg-RSV) met verschillende donorsequenties te produceren in DF-1 kippencellen. Vervolgens is de aanvrager voornemens de RCASBP (gg-RSV) producerende DF-1 cellen te injecteren in de hersenen van gg-muizen.

Op basis van het feit dat RCASBP kan repliceren in DF-1 cellen en het feit dat RSV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden op respectievelijk ML-II en DM-II inperkingsniveau uit te voeren.

Verder verzoekt de aanvrager om *in vivo* werkzaamheden met gg-muizen die geïnjecteerd zijn met de RCASBP (gg-RSV) producerende DF-1 cellen 4 weken na injectie, uit te mogen voeren op D-I niveau. Daarnaast wordt verzocht om omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig van de geïnjecteerde gg-muizen 4 weken na de injectie naar ML-I.

Op basis van de relatief korte overlevingstijd van de DF-1 cellen, de relatief korte halfwaardetijd van retrovirale deeltjes, en het feit dat de geïnfecteerde muizencellen geen infectieus virus produceren, acht de COGEM het onwaarschijnlijk dat er 4 weken na injectie nog infectieus RCASBP virus aanwezig zal zijn in de gg-muizen.

Om deze reden kan de COGEM instemmen met omlaagschaling van werkzaamheden met de gg-muizen 4 weken na injectie naar D-I. De COGEM stemt ook in met omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met cellen en weefsels afkomstig van de geïnjecteerde gg-muizen 4 weken na de injectie naar ML-I. Een uitzondering wordt gemaakt voor handelingen die bedoeld zijn om het RCASBP virus te 'rescue-en' door bijvoorbeeld superinfectie of fusie van deze muizencellen met vogelcellen. Deze handelingen dienen te worden uitgevoerd op ML-II niveau.

De COGEM is van oordeel dat omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden naar de geadviseerde inperkingsniveaus een verwaarloosbaar klein risico oplevert voor mens en milieu.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 23 mei 2017)
2. Goff SP (2013). Chapter 47: *Retroviridae*. Fields Virology
3. Beemon KL (2008). Retroviruses of Birds. Encyclopedia of Virology (third edition). Academic press
4. Wang *et al.* (2002). Characterization of the LDL-A module mutants of Tva, the subgroup A Rous sarcoma virus receptor, and the implications in protein folding. Protein Sci. 11: 2596-2605
5. Svoboda J (1998). Molecular biology of cell nonpermissiveness to retroviruses. Has the time come? Gene 206: 153-163
6. Svoboda J (2015). Cell Association in Rous Sarcoma Virus (RSV) Rescue and Cell Infection. Folia Biol. (Praha). 61: 161-167
7. Mitsialis SA *et al.* (1983). Studies on the structure and organization of avian sarcoma proviruses in the rat XC cell line. J. Gen. Virol. 64: 1885-1893
8. Pichrtová J *et al.* (1989). Structural analysis of proviruses in additional hamster tumour cell lines transformed by provirus II rescued from XC cells and definition of a new cell line harbouring amplified proviruses. Folia Biol. (Praha). 35: 239-253
9. Lounkova A *et al.* (2014). Molecular events accompanying *Rous sarcoma virus* rescue from rodent cells and the role of viral gene complementation. J. Virol. 88: 3505-3815
10. Svoboda J (2016). On board a raft or boat in the retrovirus sea. PNAS 113: 3927-3931
11. The RCAS System. <https://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/overview.html> (bezocht: 23 mei 2017)
12. COGEM advies (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene DNA en RNA virussen. CGM/170522-03
13. Reddy JP and Li Y (2009). The RCAS-TVA system for introduction of oncogenes into selected somatic mammary epithelial cells *in vivo*. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 14: 405-409
14. Hambardzumyan D *et al.* (2009). Modeling Adult Gliomas Using RCAS/t-va Technology. Transl. Oncol. 2: 89-95
15. Huse JT *et al.* (2011). Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. Glia 59: 1190-1199
16. ATCC. UMNSAH/DF-1 (ATCC® CRL-12203™). https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-12203.aspx?geo_country=nl#characteristics (bezocht: 23 mei 2017)
17. Schaefer-Klein J *et al.* (1998). The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors. Virology 248 :305-311
18. Kong BW *et al.* (2011). Genome-wide differential gene expression in immortalized DF-1 chicken embryo fibroblast cell line. BMC Genomics 12:571
19. Boyce-Jacino MT *et al.* (1992). Multiple complex families of endogenous retroviruses are highly conserved in the genus Gallus. J. Virol. 66: 4919-4929
20. Birmingham CL *et al.* (2013). Detection of Avian Retroviruses in Vaccines by Amplification on DF-1 Cells with Immunostaining and Fluorescent Product-Enhanced Reverse Transcriptase Endpoint Methods. J. Clin. Microbiol. 51: 1496-1504

21. Holland EC & Varmus HE (1998). Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1218-23.
22. Tietz S & Engelhardt B (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* 209:493-506
23. Schmidt J *et al.* (1985). Activation of endogenous C-type retroviral genomes by internal alpha-irradiation of mice with 224Radium. *Radiat. Environ. Biophys.* 24: 17-25
24. Erfle V *et al.* (1980). Time course of C-type retrovirus expression in mice submitted to osteosarcomagenic doses of 224radium. *Int. J. Cancer* 26: 107-113
25. Erfle V *et al.* (1986). Activation and biological properties of endogenous retroviruses in radiation osteosarcomagenesis. *Leuk. Res.* 10: 905-913
26. Schimidt J *et al.* (1988). Endogenous murine leukemia viruses: frequency of radiation-activation and novel pathogenic effects of viral isolates. *Leuk. Res.* 12:393-403