

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 21 september 2011
KENMERK CGM/110921-02
ONDERWERP Advies: Knock-out muizen verkregen via retroviraal getransduceerde embryonale stamcellen

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 07-035/02 met de titel 'De biologische rol van GAPR-1' van de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee:


Samenvatting

De aanvrager wil met uit de VS afkomstige genetisch gemodificeerde knock-out muizen werken, vervaardigd met behulp van retrovirale virusdeeltjes gebaseerd op *Moloney murine leukemia virus*. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben te maken met de eventuele vorming en de verspreiding van recombinant en replicatiecompetent retrovirus (RCR).

Voor de productie van de muizen worden embryonale muizenstamcellen (ES cellen) gebruikt die worden geïnfecteerd met retrovirale virusdeeltjes die niet kunnen repliceren. De COGEM kan niet uitsluiten dat er homologe recombinatie plaats kan vinden tussen de verschillende vectoren die gebruikt zijn bij productie van deze virusdeeltjes, en tussen al aanwezige retrovirale sequenties in het DNA van de productieceldlijn. Verder is virale transcriptie na integratie in het DNA van ES cellen nog in beperkte mate mogelijk, wat tot mobilisatie van de in het DNA geïntegreerde sequenties kan leiden. De COGEM kan daarom niet uitsluiten dat er recombinaties in het productiesysteem kunnen plaatsvinden en er gedurende het proces van productie van de knock-out muizen RCR kan ontstaan.


De leverancier van de knock-out muizen controleert de ES cellen op RCR. De gevoeligheid van de PCR zou één retrovirale integratie per cel zijn. Zonder validatie van de gevoeligheid van de PCR en gegevens over de detectie van de PCR voor verschillende retrovirale oppervlakte-eiwitten, kan de COGEM niet uitsluiten dat de test mogelijke recombinatie en het ontstaan van RCR mist.

De COGEM adviseert daarom om de knock-out muizen te huisvesten op inperkingsniveau DM-II. Werkzaamheden met weefsels afkomstig van de muis kunnen op ML-II niveau plaatsvinden. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveau's verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c.

Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Knock-out muizen verkregen via retroviraal getransduceerde embryonale stamcellen

COGEM advies CGM/110921-02

Inleiding

De onderhavige aanvraag betreft een wijziging van een vergunningaanvraag met de titel 'De biologische rol van GAPR-1' van de Universiteit Utrecht. De onderzoekers verwachten dat het 'Golgi-associated plant pathogenesis related-1' eiwit of GAPR-1 een functie heeft in het aangeboren immuunsysteem van zoogdieren en willen dit verder onderzoeken. Hiervoor hebben zij genetisch gemodificeerde GAPR-1 knock-out muizen laten maken in de Verenigde Staten.

De aanvrager wil de GAPR-1 knock-out muizen fokken en kruisen naar verschillende genetische achtergronden. Weefsels van de knock-out muizen zullen worden verwijderd en worden geanalyseerd. Daarnaast zullen *in vivo* proeven met verschillende soorten pathogenen worden uitgevoerd. De aanvrager wil de werkzaamheden met de muizen uitvoeren op D-I inperkingsniveau, en de handelingen met weefsels van de muizen op ML-I niveau.

GAPR-1 knock-out muizen

De GAPR-1 knock-out muizen zijn geproduceerd met behulp van de 'gene trap' technologie. Hierbij worden embryonale muizenstamcellen getransduceerd met retrovirale, op *Moloney murine leukemia virus* (MoMLV) gebaseerde, viruspartikels. Het virale genoom in deze viruspartikels bevat een 'splice acceptor' gevolgd door een markergen. Wanneer het virale DNA in het genoom van de cel wordt ingebouwd, wordt de 'gene trap' functioneel als de sequentie in een intron van een gen terechtkomt. De splice acceptor zorgt voor overschakeling van de transcriptie van het endogene gen naar het markergen, waardoor een eiwit ontstaat met het 5'-gedeelte van het endogene eiwit gefuseerd aan de marker. Dit fusie-eiwit komt tot expressie onder de eigen promotor van het geraakte gen en zorgt voor verlies van de functionaliteit van het gen. Het Texas A&M Institute of Genomic Medicine heeft deze 'gene trap' technologie gebruikt voor grootschalige willekeurige mutagenese van genen in embryonale muizenstamcellen. Dit resulteerde in een knock-out bibliotheek van C57BL/6N embryonale stamcellen van muizen.^{1,2}

Om knock-out muizen te verkrijgen uit deze stamcellen worden de genetisch gemodificeerde ES cellen ingespoten in blastocysten. De ontstane chimere embryo's ontwikkelen zich tot chimere muizen. Door kruising wordt bekeken of de modificatie zich ook in de geslachtscellen van de chimere muizen bevond. Uit de nakomelingen van deze kruising worden stabiele genetisch gemodificeerde knock-out muizen gekozen.

De retrovirale transfervector

Retrovirussen zijn virussen met een RNA genoom die een RNA afhankelijke DNA polymerase bezitten. Na omgekeerde transcriptie kan het virale genoom als proviraal DNA stabiel in het genoom van de gastheer worden opgenomen. Door deze eigenschappen worden retrovirussen veelvuldig toegepast als genoverdrachtsysteem. Een dergelijk systeem zorgt voor een stabiele

integratie van het gen in het genoom van een geïnfecteerde cel. De knock-out muizen in deze vergunning zijn vervaardigd met behulp van de retrovirale transfervector VICTR76.³ Deze vector is afgeleid van MoMLV, een virus dat tot het *Gammaretrovirus* genus van de familie *Retroviridae* behoort.⁴

MoMLV is een ecotroop muizenvirus dat T-cel lymfomen kan veroorzaken bij knaagdieren.⁵ Het virus is echter alleen pathogeen wanneer de infectie optreedt in pasgeboren knaagdieren en er sprake is van meerdere integraties en een blijvende aanwezigheid van het virus in het bloed.⁵ Een replicatiecompetent MoMLV gepseudotypeerd met een amphotrope receptor, bleek ook lymfomen te veroorzaken in niet-humane primaten met een onderdrukt immuunsysteem.⁶ De COGEM is niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat MoMLV pathogeen is voor de mens.

Het genoom van MoMLV codeert voor vier eiwitten: gag, pro, pol en env. De gag eiwitten vormen de matrix- en kapseiwitten en de nucleoproteïnen van het virus. *Pol* codeert voor enzymen die nodig zijn voor replicatie en integratie van het virale genoom in het DNA van de gastheer. *Pro* codeert voor een protease dat de polyproteïne ‘precursor’ knipt. Het gen *env* codeert voor het oppervlakte-eiwit dat nodig is voor herkenning van cellen en daarmee voor de infectie. Naast deze genen bevat het genoom aan beide zijden ook zogenaamde ‘Long Terminal Repeats’ (LTRs). Deze onderdelen zijn essentieel voor replicatie en virulentie van het virus.

De MoMLV LTRs zijn gedeeltelijk in VICTR76 aanwezig. VICTR76 is volgens Soriano *et al.* (1991) zelfinactiverend door de verwijdering van de ‘enhancer’ sequenties uit de 3’ LTR.³ Hierdoor wordt de transcriptie van het virale genoom verminderd. De promoter regio is nog wel in de 3’ LTR aanwezig.

Naast de 5’ en 3’ LTRs zijn er in VICTR76 een ‘splice donor’ sequentie, een ‘packaging’ signaal en *gag* sequenties aanwezig. De expressiecassette van de vector bevat het *beta-galactosidase* gen gefuseerd met het *neomycine* resistentie gen.

De packaging cellijn

Met behulp van de ‘packaging’ cellijn GP+E86, dat de *gag*, *pol* en *env* genen van MoMLV tot expressie brengt, worden de virale partikels geproduceerd.⁷ De cellijn is gebaseerd op NIH 3T3 embryonale muizen fibroblastcellen. De cellijn is zo ontworpen dat er volgens de makers drie recombinaties nodig zijn voor de productie van een replicatiecompetent retrovirus (RCR). In de GP+E86 cellijn worden *gag* en *pol* vanaf een apart plasmide tot expressie gebracht, en het *env* gen vanaf een tweede plasmide. Het derde plasmide nodig voor productie van een virusdeeltje is de transfervector, VICTR76. GP+E86 bevat volgens de makers geen packaging signaal en geen 3’ LTRs.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2007 een advies uitgebracht over de omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen met een op MoMLV gebaseerde vector.⁸ De COGEM concludeerde dat handelingen met getransduceerde cellen konden plaatsvinden op ML-I niveau mits aan een aantal aanvullende voorschriften wordt voldaan. Zo moeten de cellen getest worden

op afwezigheid van RCR. Tevens zijn er aanvullende voorschriften opgesteld om te voorkomen dat tijdens de kweekprocedure op ML-II niveau RCR gevormd wordt door insleep van virussen.

In 2009 adviseerde de COGEM over muizen waarin retroviraal getransduceerde muizencellen zijn getransplanteerd.⁹ De COGEM was van mening dat de kans op het ontstaan van recombinant virus of op complementatie van de gebruikte vector in de muis verwaarloosbaar klein is. Echter, de gebruikte cellen zouden al replicatiecompetent retrovirus kunnen bevatten. De COGEM was van mening dat de gegevens over de voorgestelde test op RCR onvoldoende zekerheid geven dat eventueel aanwezig replicatiecompetent retrovirus inderdaad gedetecteerd zal worden en adviseerde handelingen met cellen afkomstig van de gg-muizen op ML-II uit te voeren.

Overweging en advies

In het onderzoek zal met genetisch gemodificeerde knock-out muizen gewerkt worden die zijn gemaakt in de Verenigde Staten met behulp van retrovirale viruspartikels. Een risico dat hierbij kan optreden is de eventuele vorming en de verspreiding van recombinant virus en RCR in de packaging cellijn, in de ES cellen of in de muis.

Ontstaan van RCR

De vectorproductie vindt plaats door de op NIH3T3 cellen (embryonale muizen fibroblastcellen) gebaseerde packaging cellijn GP+E86 te transfecteren met transfervector VICTR76. De virale helper elementen in de packaging cellen zijn afkomstig van twee afzonderlijke plasmiden, namelijk een construct coderend voor MoMLV *gag/pol* (de packaging vector) en een construct coderend voor het MoMLV *env* oppervlakte-eiwit (de 'pseudotyping' vector).

De aanvrager stelt dat packaging cellijn zo is ontworpen dat er minstens drie recombinaties nodig zijn voor de vorming van RCR. Om RCR te vormen moeten zowel het *gag-pol* construct als het *env* construct recombineren met de transfervector. De COGEM acht het waarschijnlijk dat er homologe regio's zijn tussen VICTR76 en de helpervectoren in de GP+E86 packaging cellijn.

De COGEM wijst erop dat de NIH 3T3 muizencellijn, waarmee packaging cellijn GP+E86 is gemaakt, allerlei defectieve endogene retrovirale sequenties bevat, waaronder mogelijk *env* genen afkomstig van andere dan ecotrope virussen.^{10,11} Hierdoor wordt de kans op recombinatie tussen de verschillende vectoren en endogene retrovirale sequenties in het genoom van de muizencellen vergroot. Dat hierdoor RCR kan ontstaan is bewezen door Garrett *et al.* (2000). Zij tonen aan dat recombinatie van een endogeen *env* gen in de packaging cellijn GP+E86 een stap vormde in de vorming van RCR.¹⁰ Er werden ook recombinaties gevonden in de tweede packaging cellijn GP+envAM12 in combinatie met de MFG-S-Neo transfervector. De auteurs laten ook zien dat er in de GP+E86 cellijn volledige 5' en 3'LTRs aanwezig waren en dat er recombinatie is opgetreden tussen de twee helpervectoren in GP+E86. Gebleken is dat recombinatie al kan optreden op basis van homologe regio's van ongeveer 10 basenparen.^{10,11}

In VICTR76 is de 3'LTR niet volledig aanwezig. Soriano *et al.* wijzen erop dat de vector daarom zelfinactiverend (SIN) is.³ Uit VICTR76 zijn de virale enhancer repeats verwijderd, maar niet de

virale promoter regio. De transcriptie vanaf de virale promoter was 10 keer minder bij verwijdering van de virale enhancer repeats.³ Bij een zelfinactiverende (SIN) vector wordt echter het gehele U3 domein inclusief virale promoter en enhancer repeats uit de 3' LTR verwijderd, wat tot een reductie van een factor 10^3 in de virale transcriptie zou moeten leiden. Aangezien dit bij VICTR76 niet het geval is, kan mobilisatie van VICTR76 uit het genoom van de gastheer in theorie niet uitgesloten worden.

De COGEM concludeert dat het niet uit te sluiten is dat er recombinaties in het productiesysteem kunnen plaatsvinden en dat er RCR zou kunnen ontstaan tijdens de productie van de virale viruspartikels, transductie van de ES cellen en verdere stappen in de ontwikkeling van de knock-out muis.

Test op afwezigheid van recombinatie in de ES cellen

Na transductie van de ES cellen met retrovirale viruspartikels worden deze cellen getest op de vorming van RCR door de leverancier van de knock-out muizen. Met een PCR wordt gecontroleerd of er een MoMLV ecotrope *pol-env* fusie aanwezig is in de cellijn. De resultaten van deze test op de ES cellen die voor de productie van de GAPR-1 knock-out muis zijn gebruikt, waren negatief.

De aanvrager geeft aan dat de gevoeligheid van de PCR één retrovirale integratie per cel is. Er zijn echter geen gegevens over validatie van deze gevoeligheid geleverd. De packaging cellijn GP+E86 zou *env* genen kunnen bevatten die afkomstig zijn van andere dan ecotrope virussen. Er zijn geen gegevens bekend over welke *env* genen kunnen worden gedetecteerd door de PCR. Zonder validatie van de gevoeligheid van de PCR en gegevens over de detectie van de PCR voor verschillende *env* sequenties, kan de COGEM niet uitsluiten dat de test de mogelijke recombinaties en het ontstaan van RCR mist.

Conclusie

De aanvrager wil met knock-out muizen werken die zijn gemaakt in de Verenigde Staten met behulp van retrovirale viruspartikels. De aanvrager wil de werkzaamheden met de muizen uitvoeren op D-I inperkingsniveau, en de handelingen met weefsels van de muizen op ML-I niveau. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van recombinant en replicatiecompetent retrovirus.

De COGEM zet vraagtekens bij het SIN karakter van de gebruikte transfervector, de vermeende afwezigheid van de mogelijkheid op het ontstaan van RCR tijdens productie van de knock-out muis en de validatie en het bereik van de PCR test. Daarom adviseert de COGEM om de knock-out muizen te huisvesten op inperkingsniveau DM-II en de handelingen met de knock-out muizen niet omlaag te schalen. Werkzaamheden met weefsels afkomstig van de muis kunnen op ML-II niveau plaatsvinden. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden op de genoemde inperkingsniveau's verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Hansen GM *et al.* (2008). Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Research* 18: 1670-1679
2. Zambrowicz BP *et al.* (1998). Disruption and sequence identification of 2000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 392: 608-611
3. Soriano P, Friedrich G en Lawinger P (1991). Promoter interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells. *Journal of Virology* 65: 2314-2319
4. Goff SP (2007). Retroviridae: The retroviruses and their replication. In: *Fields virology*, volume two, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p1401-1441
5. Molony murine leukemia virus safety data sheet. www.pediatrics.ucsd.edu/Research/Labs/Atsushi%20Miyano%20PhD%20Vecto/Safety%20Information/Moloney%20Murine%20Leukemia%20virus/Pages/default.aspx (15-9-2011)
6. Donahue RE *et al.* (1992) Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *The Journal of Experimental Medicine* 176: 1125-1135
7. Markowitz D, Goff S en Bank A (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of Virology* 62:1120-1124.
8. COGEM 2007. Omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen. Advies CGM/070405-02
9. COGEM 2009. Inschaling van flow cytometrie analyse van retroviraal getransduceerde muizencellen. Advies CGM/090731-01
10. Garrett E *et al.* (2000). Characterization of recombination events leading to the production of an ecotropic replication-competent retrovirus in a GP+envAM12-derived producer cell line. *Virology* 266: 170-179
11. Chong H *et al.* (1998). A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences. *Journal of Virology* 72: 2663-2670