

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

DATUM 7 maart 2012
KENMERK CGM/120307-01
ONDERWERP Advies: Inschaling kloneringswerkzaamheden met genoom van PG-3 virussen

Geachte heer Atsma,

In het licht van de voorgenomen herziening van de Regeling ggo deelt de COGEM u op basis van een inventarisatie van de milieurisico's van kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen, het volgende mee.

Samenvatting

In de Regeling ggo worden micro-organismen, zoals virussen, op basis van de mate waarin ze ziekte veroorzaken in mens, dier of plant ingedeeld in pathogeniteitsklassen. Op basis van deze indeling worden kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse-3 virussen ingeschaald op ML-II inperkingsniveau.

De virussen die tot pathogeniteitsklasse 3 behoren, vermenigvuldigen zich van nature in zoogdiercellen. De kloneringwerkzaamheden worden echter hoofdzakelijk uitgevoerd in bacteriën. De verschillen tussen zoogdiercellen en bacteriën zijn groot. Op basis van de verschillen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er tijdens de kloneringswerkzaamheden in de bacterie correct geassembleerde infectieuze virusdeeltjes zullen ontstaan. De kloneringswerkzaamheden in bacteriën zouden daarom op ML-I inperkingsniveau kunnen plaatsvinden.

De COGEM kan evenwel niet uit sluiten dat de huidcellen van de onderzoeker door snij- en/of prikaccidenten tijdens de kloneringswerkzaamheden in contact komen met het genomische materiaal van de virussen. In theorie kan hierdoor bij sommige virusgroepen in de huidcellen infectieus virus ontstaan dat zich via de medewerker kan verspreiden. Een ML-I laboratorium biedt hiertegen echter eenzelfde bescherming als een ML-II laboratorium.

Gebaseerd op bovenstaande overweging adviseert de COGEM de kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse-3 virussen voor zover uitgevoerd met bacteriën omlaag te schalen naar ML-I inperkingsniveau. Voor de kloneringwerkzaamheden met virussen waarbij een snij- en/of prikaccident mogelijk kan leiden tot het ontstaan van infectieus virus in de medewerker voegt zij daar enkele aanvullende werkvoorschriften aan toe. Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van gestelde aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's van betreffende kloneringswerkzaamheden in bacteriën met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse-3 virussen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

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

Inschaling van kloneringswerkzaamheden met genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen

COGEM advies CGM/120307-01

Inleiding

In onderstaand advies geeft de COGEM haar visie op de risico's voor mens en milieu van kloneringswerkzaamheden in bacteriën met het volledige genoom van virussen, die zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Het betreft daarbij werkzaamheden die er opgericht zijn plasmide DNA met het genoom van deze virussen te vervaardigen, te vermenigvuldigen en te isoleren. Op basis van de uitgevoerde risicobeoordeling adviseert zij betreffende kloneringswerkzaamheden op inperkingsniveau I in te schalen.

Het inperkingsniveau voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde micro-organismen (ggo's) is gekoppeld aan de pathogeniteitsklasse van het micro-organisme waaruit het ggo is opgebouwd. In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹ Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. De indeling in deze verschillende klassen wordt gebaseerd op de ernst van de ziekte die het micro-organisme bij mens, dier of plant kan veroorzaken, de mate waarin het zich onder de bevolking kan verspreiden en de beschikbare mogelijkheden om de veroorzaakte ziekte te voorkomen of te behandelen. Algemeen geldt: hoe pathogener het micro-organisme waaruit het ggo bestaat, hoe hoger het inperkingsniveau voor de werkzaamheden met dit ggo.

Voor ggo-werkzaamheden met (delen van) virussen is het inperkingsniveau ook afhankelijk van de specifieke virale onderdelen die in voorgenomen experimenten worden samengebracht en de gastheer die gebruikt wordt. De werkzaamheden worden op basis van Bijlage 5: "Inschaling van activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen" van de huidige Regeling ggo ingeschaald.¹ Voor virussen behorend tot pathogeniteitsklasse 3 geldt bijvoorbeeld dat werkzaamheden waarbij gebruik wordt gemaakt van virale sequenties die in combinatie met de beoogde gastheer kunnen leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes worden ingeschaald op ML-III inperkingsniveau. Als de (bijna) volledige sequentie van een eukaryoot virus wordt samengebracht in een apathogene prokaryote gastheer, dan worden deze werkzaamheden voor een pathogeniteitsklasse 3 virus op ML-II inperkingsniveau ingeschaald.¹ De werkzaamheden met slechts één of enkele virale genen van een pathogeniteitsklasse 3 virus in combinatie met een apathogene prokaryote gastheer worden conform de Regeling ggo ingeschaald op ML-I inperkingsniveau.¹

De laatste twee situaties betreffen kloneringswerkzaamheden die worden uitgevoerd om plasmide DNA met het virale gen of de virale genen van interesse te vervaardigen, te vermenigvuldigen en te isoleren. Zolang er sprake is van een 'levend' ggo vallen alle

kloneringswerkzaamheden van transformatie van een bacterie met het plasmide DNA tot en met opzuivering van het plasmide DNA uit bacteriën, onder de Regeling ggo.

In het geval van kloneringswerkzaamheden waarbij het volledige genoom van een virus via een plasmide in een bacterie wordt gebracht, bevat de bacterie in principe alle genetische informatie van het betreffende virus om een pathogeen te maken. Echter, of de eigenschappen van het virus waarop de classificatie berust, tot uiting komen is mede afhankelijk van de vraag of en in welke mate de virale genen in betreffende bacterie tot expressie komen. Daarnaast speelt ook een rol de mate waarin het virale genoom wordt vermeerderd en er infectieuze virusdeeltjes kunnen ontstaan. Gezien bovenstaande is de COGEM voor kloneringswerkzaamheden met pathogeniteitsklasse 3 virussen nagegaan op welk inperkingsniveau en onder welke voorwaarden de mogelijke risico's voor mens en milieu afdoende worden ingeperkt.

Overweging

De productie van eukaryote virussen in prokaryote cellen

Een virus bestaat uit erfelijk materiaal dat wordt omringd door een eiwitstructuur, de zogenaamde eiwitmantel. In een aantal gevallen wordt de eiwitmantel omgeven door een membraan of enveloppe.^{2,3} Op basis van het type erfelijke materiaal worden de virussen ingedeeld in RNA en DNA virussen. Afhankelijk van de vorm waarin het erfelijk materiaal in de eiwitmantel ingepakt wordt, kan onderscheid gemaakt worden tussen zogenaamde gesegmenteerde of niet-gesegmenteerde en enkel-strengs of dubbel-strengs DNA of RNA virussen. De enkel-strengs RNA virussen worden daarbij nog verder onderverdeeld in zogenaamde positief-strengs en negatief-strengs RNA virussen.

Een virus kan zich niet autonoom repliceren, maar is daarvoor afhankelijk van een gastheer. In het geval van de pathogeniteitsklasse 3 virussen is de gastheer een eukaryote cel. Deze virussen kunnen zich van nature niet vermenigvuldigen in een prokaryote cel (bacterie). De kloneringswerkzaamheden vinden echter juist plaats in prokaryote cellen. De kans dat er tijdens werkzaamheden met bacteriën die getransformeerd zijn met het gehele genoom van een pathogeniteitsklasse 3 virus infectieuze deeltjes worden gevormd, is daarom een belangrijk aspect in de overweging.

Een eerste vereiste voor de productie van infectieuze virusdeeltjes is de efficiënte expressie van de virale genen. Aangezien het virussen betreft die zich van nature vermenigvuldigen in eukaryote cellen, staat de expressie van het virale genoom onder controle van een of meerdere eukaryote promoters. Hierdoor zal er in bacteriën geen expressie van de virale genen plaatsvinden. Alleen als de virale genen in de vector (ook) onder controle staan van een prokaryote promotor is het mogelijk dat er virale eiwitten in de bacterie worden aangemaakt.

De COGEM wijst erop dat het niet ongebruikelijk is dat er in het plasmide een prokaryote promotor aanwezig is. Dit betreft echter voornamelijk de zogenaamde T7 of SP6 promotoren. Deze promotoren zijn alleen actief in combinatie met specifieke RNA polymerasen die van nature niet aanwezig zijn in bacteriën. Daarnaast zullen alleen die genen tot expressie komen die kort achter een prokaryote promotor liggen. Op basis van deze feiten en door het gebrek aan

prokaryote promotoren in het virale genoom zelf acht de COGEM de kans zeer klein dat alle virale eiwitten efficiënt tot expressie worden gebracht.⁴

Bovendien zijn er grote verschillen in translationele processing in een prokaryote en eukaryote cel. Volgens de COGEM is de kans hierdoor zeer klein dat alle virale eiwitten in voldoende mate tot expressie komen, volledig functioneel zijn en tot een correcte eiwitmantel samengevoegd kunnen worden.⁵⁻⁷

Naast virale genexpressie dient voor de productie van infectieuze virusdeeltjes ook het virusgenoom vermenigvuldigd te worden. Een van de redenen om kloneringswerkzaamheden in bacteriën uit te voeren wordt gevormd door het feit dat bacteriën zeer geschikt zijn voor de efficiënte vermenigvuldiging van plasmide DNA. Aangezien dit circulair dubbel-strengs DNA betreft, wordt in de risicobeoordeling onderscheid gemaakt tussen de dubbel-strengs DNA virussen en de overige virussen.

De dubbel-strengs DNA virussen die tot pathogeniteitsklasse 3 worden gerekend, behoren tot de familie van de *Herpesviridae* en de *Poxviridae*. In tegenstelling tot het plasmide DNA is het genoom van deze virussen lineair. De COGEM acht de kans klein dat het plasmide DNA in de bacterie efficiënt ingepakt wordt in een virusdeeltje of op correcte wijze gelineariseerd kan worden. Bovendien wijst zij erop dat DNA dat in een bacterie of in een eukaryote cel is geproduceerd met name op het gebied van methylering grote verschillen vertoont, wat de kans op een infectieus virus nog verder verkleint.

De overige virussen die tot pathogeniteitsklasse 3 worden gerekend zijn alle RNA virussen. In theorie kan het gehele infectieuze genoom van een RNA virus in een bacterie geproduceerd worden als het plasmide op de goede positie een prokaryote promotor heeft en het benodigde polymerase aanwezig is. Met het oog op de eisen aan de positie van de promotor en de lengte van het virus genoom is de COGEM van mening dat de kans zeer klein is dat het volledige genoom van een RNA virus in een bacterie wordt geproduceerd. Zij kan dit evenwel niet geheel uitsluiten.

Gebaseerd op bovenstaande overwegingen over virale genexpressie, vermeerdering van het virale genoom en constructie van de eiwitmantel acht de COGEM voor zowel de DNA virussen als de RNA virussen, behorend tot pathogeniteitsklasse 3 de kans verwaarloosbaar klein dat in bacteriën correct geassembleerde infectieuze virusdeeltjes zullen ontstaan. In aanvulling op genoemde theoretisch wetenschappelijke onderbouwing merkt de COGEM op dat er in de wetenschappelijke literatuur geen gegevens bekend zijn waaruit het tegendeel blijkt.

Productie van pathogeniteitsklasse 3 virus als gevolg van een incident

Naast de boven beschreven beoordeling van de mogelijkheid dat infectieuze virusdeeltjes worden gemaakt in prokaryote cellen, is ook gekeken naar de mogelijkheid of het plasmide tijdens de kloneringswerkzaamheden door een incident in contact kan komen met eukaryote cellen en naar de kans dat dit kan leiden tot de productie van infectieuze virusdeeltjes.

In theorie is het niet uit te sluiten dat de onderzoeker tijdens de kloneringswerkzaamheden besmet raakt met het erfelijke materiaal als de onderzoeker wondjes heeft die met het materiaal in

contact komen of als de onderzoeker zich per ongeluk met het materiaal injecteert. Voordat dit leidt tot de productie van infectieuze virusdeeltjes, dienen er een aantal levende cellen getransfekteerd te worden met het betreffende genomische materiaal, moeten de virale genen tot expressie worden gebracht en moet het virusgenoom efficiënt vermenigvuldigd worden en in een virusdeeltje worden opgenomen.

De COGEM acht de kans dat cellen in de huid worden getransfekteerd met plasmide DNA zonder dat gebruik wordt gemaakt van een carrier of speciale toedieningstechniek zeer klein.⁸ Zij kan een dergelijke transfectie evenwel niet geheel uitsluiten. Of een dergelijke transfectie van humane cellen ook kan leiden tot productie van infectieus virus is volgens de COGEM afhankelijk van het genoomtype van het betreffende virus. De COGEM heeft de pathogeniteitsklasse 3 virussen daarbij ingedeeld in twee groepen.

In het geval dat humane cellen worden getransfekteerd met plasmide DNA met het volledige genoom van gesegmenteerde virussen, van negatief-strengs RNA virussen of van de *Poxviridae* is de COGEM van mening dat de mate van genexpressie en vermenigvuldiging van het gehele genoom verwaarloosbaar klein is.

Met betrekking tot de gesegmenteerde virussen is dit ingegeven door de kans dat bij een dergelijk accidentele transfectie alle benodigde genoomsegmenten in dezelfde cel terecht moeten komen. Deze kans acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Zij merkt daarbij echter op dat de kans aanzienlijk groter is als gebruik wordt gemaakt van zogenaamde 'reverse genetics' systemen, waarbij het complete genoom van gesegmenteerde virussen op een en hetzelfde plasmide aanwezig is. In deze situatie kan zij niet uitsluiten dat infectieus virus kan ontstaan.

Uitgaande van plasmide DNA dient voor de productie van het genoom van een al dan niet gesegmenteerd negatief strengs RNA virus eerst een intermediaire genoomvorm, een positief-strengs RNA van het volledige genoom gemaakt te worden. Op basis van dit intermediaire genoom kan vervolgens het negatief-strengs RNA genoom worden gemaakt.⁹ Voor deze stap is RNA-afhankelijke RNA polymerase nodig. Dit enzym is van nature niet aanwezig in de gastheer en wordt door het virus zelf aangeleverd. In het geval van transfectie is het benodigde RNA-afhankelijk RNA polymerase afwezig. De COGEM acht de kans derhalve verwaarloosbaar klein dat de transfectie van plasmide DNA, dat het volledige genoom van een dergelijk virus bevat in afwezigheid van het RNA-afhankelijke RNA polymerase, zal leiden tot de productie van infectieus virus.

De indeling van de *Poxviridae* in deze groep is gebaseerd op wetenschappelijk onderzoek naar de infectiviteit van het virusgenoom.¹⁰ Daaruit is gebleken dat de infectiviteit van het genoom van de *Poxviridae* afhankelijk is van een helpervirus. Deze afhankelijkheid wordt veroorzaakt door het feit dat dit virus in het cytoplasma van de gastheer repliceert in plaats van in de kern en daarvoor virus specifieke polymerases nodig heeft.

Concluderend acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er infectieus virus ontstaat als het genomisch materiaal van bovengenoemde virussen in contact komt met levende huidcellen van de onderzoeker.

Voor een aantal virussen kan de COGEM echter niet geheel uitsluiten dat er infectieuze virusdeeltjes worden gevormd als humane huidcellen accidenteel getransfecteerd worden met plasmide DNA dat het complete virale genoom bevat. Dit geldt onder andere voor de pathogeniteitsklasse 3 virussen die behoren tot de *Retroviridae* en de niet-gesegmenteerde dubbel-strengs DNA virussen (met uitzondering van de *Poxviridae*). In de replicatiecyclus van beide virussen speelt dubbel-strengs DNA van nature een centrale rol.^{11,12} Derhalve kan het genoom door de in de gastheer aanwezige enzymen vermenigvuldigd worden en komen de virale genen tot expressie. Hierdoor is de COGEM van mening dat plasmide DNA met het volledige genoom van de *Retroviridae* of de niet-gesegmenteerde dubbel-strengs DNA virussen na transfectie kan leiden tot de productie van infectieuze virusdeeltjes.

De COGEM kan het ontstaan van infectieuze virusdeeltjes ook niet uitsluiten voor de pathogeniteitsklasse 3 virussen die behoren tot de niet-gesegmenteerde dubbel-strengs RNA virussen en de niet-gesegmenteerde positief-strengs RNA virussen. Dit is gebaseerd op het feit dat een goed geplaatste eukaryote promotor in het plasmide er toe kan leiden dat in een gastheer cel een positief-strengs RNA van het gehele virusgenoom wordt gemaakt. Voor beide virussen kan een dergelijk positief strengs RNA in een eukaryote cel als template dienen voor de productie van infectieuze virusdeeltjes.⁹

Om de kans op het ontstaan van infectieuze virusdeeltjes na een accidentele blootstelling van de cellen van de onderzoeker aan het genomisch materiaal van bovengenoemde virussen te minimaliseren zijn specifieke beschermingsmaatregelen nodig. Op ML-I en ML-II inperkingsniveau behoren dergelijke maatregelen niet tot de standaard werkvoorschriften, zoals opgenomen in de Regeling ggo.¹ De COGEM is derhalve van mening dat een ML-II inperkingsniveau ten opzichte van een ML-I inperkingsniveau voor kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen geen extra bescherming biedt.

Advies

De COGEM heeft een milieurisicobeoordeling uitgevoerd voor kloneringswerkzaamheden in bacteriën die erop gericht zijn plasmide DNA met het genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen te vervaardigen, te vermenigvuldigen en te isoleren. Op basis van deze milieurisicobeoordeling adviseert de COGEM de kloneringswerkzaamheden in bacteriën met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse 3 virussen die behoren tot de gesegmenteerde virussen, negatief-strengs RNA virussen of de *Poxviridae*, en worden uitgevoerd in een gastheer die vermeld staat in bijlage 1 van de Regeling en een vector die vermeld staat in bijlage 2 van de Regeling onder 2.1.1 of voldoet aan de criteria vermeld in bijlage 2 van de Regeling, onder 2.1 in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

In het geval van virussen die behoren tot de *Retroviridae*, de niet-gesegmenteerde dubbel-strengs RNA virussen, de niet-gesegmenteerde positief-strengs RNA virussen en de niet-gesegmenteerde dubbel-strengs DNA virussen, met uitzondering van de *Poxviridae*, kan de COGEM niet uitsluiten dat transfectie van huidcellen van de onderzoeker ten gevolge van een incident met het genomische materiaal van deze virussen leidt tot het ontstaan van infectieus virus. Dit acht de

COGEM ook het geval als het complete genoom van gesegmenteerde virussen wordt gekloneerd in één plasmide zodat deze alle segmenten bevat. Om deze kans op infectieus virus te minimaliseren, adviseert de COGEM in bovenstaande situaties voor de kloneringswerkzaamheden in bacteriën de volgende aanvullende voorschriften op ML-I te hanteren:

- Het gebruik van handschoenen is verplicht,
- Tijdens de werkzaamheden mag geen gebruik worden gemaakt van scherpe en glazen voorwerpen of andersoortige voorwerpen die wondjes in de huid kunnen veroorzaken.

De COGEM is van mening dat op inperkingsniveau ML-I en door in bovengenoemde situaties het navolgen van gestelde aanvullende voorschriften de risico's van kloneringswerkzaamheden met het volledige genoom van pathogeniteitsklasse-3 virussen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties:

1. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
2. Condit RC (2001). Principles of Virology. In Fields Virology. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 19-53
3. Flint SJ *et al.* (2004). Foundations. In: Principles of Virology. ASM Press Washington 2-25
4. Li D *et al.* (2011). Identification of a cryptic prokaryotic promoter within the cDNA encoding the 5' end of Dengue virus RNA genome. PLoS ONE 6: e18197
5. Ball LA (2001). Replication strategies of RNA viruses. In: Fields Virology. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 105-118
6. DiMaio D & Coen DM (2001). Replication strategies of DNA viruses. In: Fields Virology. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 119-132
7. Hunter E (2001). Virus assembly. In: Fields Virology. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 171-197
8. COGEM (2010). Gene therapy with naked DNA: Potential steps towards deregulation. COGEM onderzoeksrapport. CGM 2010-06
9. Flint SJ *et al.* (2004). RNA virus genome replication and mRNA production. In: Principles of Virology. ASM Press Washington: 182-214
10. Domi A & Moss B (2002). Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. PNAS 99: 12415-12420
11. Goff SP (2001). *Retroviridae*: The retroviruses and their replication. In: Fields Virology. Edited by Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 1871-1939
12. Flint SJ *et al.* (2004). Genome replication strategies: DNA viruses. In: Principles of Virology. ASM Press Washington 298-339