

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

DATUM 4 april 2012
KENMERK CGM/120404-01
ONDERWERP Advies: Classificatie van fragmenten van *Clostridium difficile* toxines A en B

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de wijziging van vergunningaanvraag IG 07-053 met de titel 'Regulatie van toxine expressie door *Clostridium difficile*' van het Academisch Ziekenhuis Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

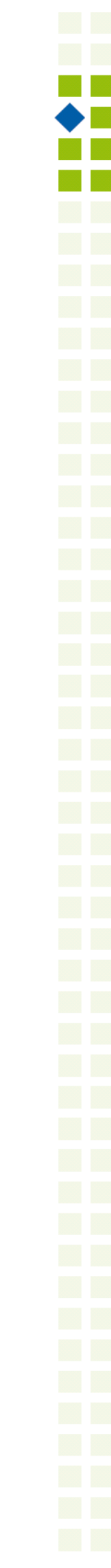
Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van fragmenten van de toxines A en B (TcdA en TcdB) uit de bacterie *Clostridium difficile*. TcdA en TcdB zijn de belangrijkste virulentiefactoren van de bacterie. Infectie met *C. difficile* kan onder meer diarree veroorzaken bij antibioticagebruikers. *C. difficile* is een pathogeniteitsklasse 2 organisme.

De COGEM heeft in 2005 criteria geformuleerd voor de classificatie van toxines. Op grond van de LD₅₀ van TcdA en TcdB vallen beide hele toxines in toxineklasse TK-1. Dit betekent dat de toxines licht tot matig toxisch zijn.

De aanvrager wil werken met het N-terminale gedeelte van de toxines, waarin de enzymatische activiteit ligt. Deze toxinefragmenten van de eerste 516 aminozuren bevatten geen translocatie- en bindingsdomeinen meer. Deze domeinen zijn nodig voor opname door de gastheercel, waarna signaaltransductie-eiwitten in de cel worden geïnactiveerd. Daarnaast zijn er 27 aminozuren verwijderd, waardoor de enzymatische activiteit van de toxinefragmenten is verminderd.

De COGEM is van mening dat de toxinefragmenten 1-516 van TcdA en TcdB onschadelijke genproducten zijn. Hieruit volgt dat klonerings- en expressiewerkzaamheden met deze fragmenten ingeschaald kunnen worden op ML-I of ML-II inperkingsniveau, afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van de donor- en acceptorstammen. Onder deze inperkingsniveau's acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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

Dit advies is mede tot stand gekomen door inbreng van dr. A.C. Fluit van het Universitair Medisch Centrum Utrecht.

Classificatie van fragmenten van *Clostridium difficile* toxines A en B

COGEM advies CGM/120404-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over wijziging van een vergunning met de titel 'Regulatie van toxine expressie door *Clostridium difficile*' van het Academisch Ziekenhuis Leiden. In de vergunning zijn al werkzaamheden opgenomen met sequenties van verschillende toxines en regulatoire sequenties van *Clostridium difficile*. Hieraan wil de aanvrager de sequenties toevoegen die coderen voor de N-terminus van toxines A en B (TcdA en TcdB) van *C. difficile*. Hij wil aan de hand van deze toxinefragmenten onderzoeken hoe TcdA en TcdB worden uitgescheiden uit de cel.

Het geslacht *Clostridium*

Tot het geslacht *Clostridium* behoren meer dan 130 bacteriesoorten. *Clostridium* bacteriën zijn grampositief, sporenvormend en anaeroob. De organismen zijn wijdverspreid in het milieu en bevinden zich onder andere in de grond, het water, het riool en het maag-darmkanaal van dieren en soms mensen.^{1,2} De meeste soorten zijn niet schadelijk en leven van plantaardig afval. Enkele *Clostridium* soorten zijn in staat om ernstige ziektes bij de mens te veroorzaken. Zo veroorzaakt *C. tetani* tetanus en *C. botulinum* botulisme. Ziekte ten gevolge van de aanwezigheid van *Clostridium* bacteriën wordt veroorzaakt door de toxines die de bacteriën produceren, zoals neuro- en enterotoxines.¹

Clostridium difficile

Bij een klein deel van de mensen maakt *C. difficile* deel uit van de normale microbiële darmflora. Bij verstoring van de darmflora, bijvoorbeeld door gebruik van antibiotica, kan overmatige groei van *C. difficile* leiden tot diarree en ontsteking aan de darm.³

De bacterie produceert verschillende toxines; TcdA, TcdB, en het binair toxine CDT. De toxines TcdA en TcdB worden gezien als de belangrijkste virulentiefactoren van de bacterie. De toxines inactiveren Rho- en Ras GTPases in gastheercellen. Rho en Ras GTPases zijn betrokken bij signaaltransductie in de cel. Glycosylering door TcdA of TcdB verhindert interactie van de GTPases met andere moleculen in de cel, wat leidt tot het uiteenvallen van het actine cytoskelet en uiteindelijk celdood.³

TcdA (308 kiloDalton) en TcdB (270 kiloDalton) zijn functioneel en structureel homoloog aan elkaar. De eiwitten zijn voor 66% overeenkomstig en voor 47% identiek.⁴ TcdA en TcdB zijn 2710 en 2366 aminozuren lang, waarbij het katalytische domein uit de eerste 543 aminozuren bestaat. Deze N-terminus met glycosyltransferase activiteit zorgt bij zowel TcdA als TcdB voor glycosylering van GTPases. Meer C-terminaal volgt op het katalytische domein bij beide toxines een cysteine protease, een translocatiedomein en een bindingsdomein. Deze laatste twee domeinen

worden na opname in de cel afgesplitst door autoproteolytische activiteit van het cysteïne protease.

Beide toxines zijn entero- en cytotoxisch, maar blijken onderling te verschillen in activiteit.⁵ TcdA lijkt een effectiever enterotoxine te zijn en TcdB een effectiever cytotoxine. De toxines werken waarschijnlijk synergetisch, waarbij TcdA zorgt voor schade aan het darmslijmvlies en TcdB zich vervolgens richt op de cellen van het darmepitheel.⁶ In zebravissen is daarnaast aangetoond dat TcdB cardiotoxisch is.⁷

Eerder advies

In een recent advies heeft de COGEM een groot aantal bacteriën geclassificeerd. Hierbij is *C. difficile* ingeschaald als een klasse 2 pathogeen.⁸

In 2005 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de classificatie van toxine producerende genen voor gebruik bij de inschaling van werkzaamheden met ggo's.⁹ Hierbij zijn twee klassen gedefinieerd:

- TK-1 voor toxines met een LD₅₀ tussen 0,1 en 100 µg/kg,
- TK-2 voor toxines waarvan de LD₅₀ waarde kleiner dan of gelijk is aan 0,1 µg/kg.

Bovendien worden voor toxines waarvan de LD₅₀ niet relevant of niet bekend is, aanvullende criteria gehanteerd die betrekking hebben op genotoxische of carcinogene eigenschappen, letaliteit, en andere aanwijzingen voor toxiciteit zoals irreversibele effecten of een relevante homologie.

Voorgenomen werkzaamheden

Om te onderzoeken hoe TcdA en TcdB door *C. difficile* worden uitgescheiden, wil de aanvrager de sequenties bestuderen die coderen voor de N-terminus van TcdA en TcdB. De aanvrager is van plan niet het gehele katalytische domein (543 aminozuren) te gebruiken voor zijn studie, maar de eerste 516 aminozuren van TcdA en TcdB. De coderende sequentie zal gekloneerd worden en voorzien worden van een 6xHis-tag in *Escherichia coli*. In de sequenties kunnen ook nog mutaties aangebracht worden. Hierna zal de aanvrager door middel van conjugatie deze sequentie vanuit *E. coli* overbrengen naar *C. difficile* en *B. subtilis* en daarin tot expressie brengen

Overweging en advies

Classificatie C.difficile toxine A en B

De inschaling van de complete toxines TcdA en TcdB is het uitgangspunt voor inschaling van gedeeltelijke varianten van deze toxines. Hierbij worden de criteria aangehouden zoals geformuleerd in het generieke COGEM advies over de classificatie van toxines.⁹

TcdA en TcdB inactiveren GTPases in de cel door glycosylering met behulp van cosubstraat UPD-glucose. Er vindt hierbij geen binding aan DNA plaats. De COGEM heeft op grond van deze werking van de toxines in de cel geen redenen om aan te nemen dat TcdA en TcdB of producten van de glycosylering genotoxisch of carcinogeen zijn.

Injectie van TcdA in de buikholte van muizen geeft een LD₅₀ van ongeveer 425 ng/kg.¹⁰ Voor TcdB is bekend dat het bij intraveneuze injectie in muizen een LD₅₀ van 200 ng/kg heeft.⁷ Een

LD₁₀₀ waarde is voor zowel TcdA als TcdB onbekend. Op basis van de LD₅₀ waarden uit de literatuur worden zowel TcdA als TcdB door de COGEM in TK-1 ingeschaald.

Classificatie toxinefragmenten

De uiteindelijke toxiciteit van de toxinefragmenten van TcdA en TcdB hangt af van de opname van de toxinefragmenten door de cel en de enzymatische activiteit van de toxinefragmenten.

De aminozuursequenties 1-516 van TcdA en TcdB die de aanvrager wil gebruiken, missen de translocatie- en bindingsdomeinen evenals 27 aminozuren (517-543) van het katalytische domein. De aanvrager stelt dat de toxinefragmenten niet meer via endocytose een cel kunnen binnendringen zonder de translocatie- en bindingsdomeinen. Hierdoor zou de toxische werking niet uitgeoefend kunnen worden.

In verschillende recente artikelen wordt binding aan cellulaire receptoren, opname en translocatie aan de hand van deletiemutanten van toxines TcdA en TcdB bestudeerd. Door Olling *et al.* (2011) worden met een TcdA toxinefragment van 1-1101 aminozuren, waarbij het bindingsdomein afwezig is, geen cytopathogene effecten op de cel waargenomen ('cell rounding') ten opzichte van een TcdA 1-1874 fragment of het gehele TcdA.¹¹ Lysaten van deze cellen lieten ook geen glycosylering zien van het GTPase Rac1.

Vergelijkbare resultaten zijn gevonden in een studie door Genisyuerek *et al.* (2011), waar translocatie van TcdB is onderzocht.¹² Het toxinefragment TcdB 1-830 gefuseerd aan een receptor-bindingsdomein van difterietoxine vertoonde geen waarneembare 'cell rounding' van Vero cellen, terwijl fusie-eiwitten met het toxinefragment 1-1550 dit wel deden. Het chimere toxine 1-830 mist de bindings- en translocatiedomeinen, hoewel de autoprotease activiteit en glycosylering van het chimere toxine *in vitro* functioneel bleken. Ook wordt in dit artikel bewezen dat het korte toxinefragment TcdB 1-543 niet tot porievorming in staat is, waardoor het onwaarschijnlijk is dat dit fragment vanuit een endosoom het cytosol van de cel kan bereiken.

De COGEM is van mening dat toxinefragmenten 1-516 van TcdA en TcdB vanwege het ontbreken van de translocatie- en bindingsdomeinen niet opgenomen kunnen worden door de cel en daardoor geen cytotoxisch effect teweeg kunnen brengen.

Volgens de aanvrager resulteert deletie van aminozuren 517-543 van het katalytische domein in een sterke afname van de enzymatische activiteit van partieel TcdA en TcdB. Uit de eiwitstructuur van TcdA blijkt dat de aminozuren op posities 517 en 519 waterstofbruggen vormen met het substraat UDP-glucose.⁵ Als deze verwijderd worden, kan glycosylering minder efficiënt plaatsvinden vanwege slechte binding aan het substraat. Uit Hofmann *et al.* blijkt dat glycosylering van toxinefragment TcdB 1-516 *in vitro* aanzienlijk is afgenomen ten opzichte van TcdB 1-546.¹³ Deze afname kan *in vivo* minder groot blijken. Daarnaast is niet duidelijk of toxiciteit en enzymatische activiteit een lineair verband met elkaar hebben of dat er bijvoorbeeld een drempelwaarde is voor de hoeveelheid glycosylering die een cel blijvend beschadigt. De COGEM concludeert dat door deletie van aminozuren 517-543 de glycosylerende activiteit van de toxinefragmenten 1-543 TcdA en TcdB is verminderd.

De aanvrager is van plan mutaties aan te brengen in de toxinefragmenten TcdA en TcdB 1-516. De COGEM acht een volledig herstel van enzymatische activiteit hierbij zeer onwaarschijnlijk.

Complementatie wordt uitgesloten

In de bestaande vergunning zijn werkzaamheden opgenomen met sequenties van verschillende toxines en regulerende sequenties van *Clostridium difficile*. Er zullen geen vergunde sequenties gecombineerd of gelijktijdig gebruikt worden met de N-terminale TcdA en TcdB toxinefragmenten in de bacteriën, zodat complementatie door andere (toxine-) sequenties uitgesloten kan worden.

Conclusie

Uitgaande van de LD₅₀ waarden uit de literatuur worden de gehele toxines TcdA en TcdB door de COGEM in TK-1 ingeschaald.

De COGEM is van mening dat toxinefragmenten 1-516 van TcdA en TcdB vanwege het ontbreken van de translocatie- en bindingsdomeinen niet opgenomen kunnen worden door de cel en daardoor geen cytotoxisch effect teweeg kunnen brengen. Daarnaast is door deletie van aminozuren 517-543 de glycosylerende activiteit van de toxinefragmenten verminderd.

Op grond van het bovenstaande acht de COGEM de toxinefragmenten 1-516 van *C. difficile* TcdA en TcdB onschadelijk. Hieruit volgt dat klonerings- en expressiewerkzaamheden met deze fragmenten ingeschaald kunnen worden op ML-I of ML-II inperkingsniveau, afhankelijk van de pathogeniteitsklasse van de donor- en acceptorstammen (*E. coli*, *B. subtilis*, *C. difficile*).

Onder de hierboven genoemde inperkingsniveau's acht de COGEM de risico's bij de voorgenoemde werkzaamheden met het N-terminale deel van *C. difficile* TcdA en TcdB toxines voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Murray PR *et al.* (2002). Medical microbiology. 4th edition, Mosby, Inc.
2. Johnson EA (2009). Clostridia. In: Encyclopedia of Microbiology, 3rd edition, Elsevier Inc.
3. Principles and practice of infectious diseases. 7th edition (2010). Eds Mandell GL *et al.* Churchill Livingstone Elsevier
4. Voth DE en Ballard JD (2005). Clostridium difficile Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. Clin. Microbiol. Rev. 18:247-263
5. Pruitt RN *et al.* (2012). Structural determinants of the *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity. J. Biol. Chem. 287:8013-8020
6. Keel MK en Songer JG (2006). The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. Vet Pathol 43:225-240
7. Hamm EE *et al.* (2006). Identification of *Clostridium difficile* toxin B cardiotoxicity using a zebrafish embryo model of intoxication. PNAS 103: 14176-14181
8. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. Advies CGM/111220-03

9. COGEM (2005). Classificatie van toxine producerende genen. Advies CGM/050628-01
10. Meng XQ *et al.* (1993). Purification and characterisation of intracellular toxin A of *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol. 38:69-73
11. Olling A *et al.* (2011). The repetitive oligopeptide sequences modulate cytopathic potency but are not crucial for cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin A. PLoS ONE 6:e17623
12. Genisyurek *et al.* (2011). Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. Mol Microbiol 79:1643-1654
13. Hofmann F *et al.* (1997). Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. J.Biol.Chem. 272:11074-11078