COMMISSIE
COGEM
GENETISCHE
MODIFICATIE

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM	01 mei 2015
KENMERK	CGM/150501-05
ONDERWERP	Advies Inschaling van werkzaamheden met alpha-synucleïne

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over ggo-werkzaamheden met α-synucleïne deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:
De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's van ggo-werkzaamheden met het eiwit α-synucleïne en de inperkende maatregelen die nodig zijn deze potentiële risico's te minimaliseren.
Het α-synucleïne is een eiwit dat betrokken is bij de signaaloverdracht tussen zenuwen in gewervelde dieren. Onder specifieke condities kan dit eiwit een andere structuur aannemen en gaan samenklonteren. Dit wordt in verband gebracht met het ontstaan van de ziekte van Parkinson. In de wetenschappelijke literatuur is beschreven dat deze ziekte van dier-op-dier en van mens-op-dier overdraagbaar is na experimentele blootstelling aan samengeklonterde α-synucleïne structuren. De COGEM is van mening dat de wetenschappelijke kennis op dit moment onvoldoende is om met zekerheid uitspraken te doen over de natuurlijke overdraagbaarheid. Zij beschouwt het α-synucleïne derhalve op basis van het voorzichtigheidsprincipe vooralsnog als schadelijke genproduct totdat wetenschappelijke onderzoek meer duidelijkheid geeft over de aard van dit eiwit.
Gebaseerd op deze kwalificatie van α-synucleïne adviseert de COGEM de *in vitro* werkzaamheden met coderende sequenties voor endogeen of mutant α-synucleïne op ML-II inperkingsniveau, en *in vivo* werkzaamheden met muizen die transgeen zijn voor α-synucleïne op DM-II inperkingsniveau in te schalen. Tevens adviseert zij hierbij enkele aanvullende voorschriften te hanteren.
Tot slot signaleert de COGEM dat genoemde inperkende maatregelen mogelijk ook voor ggo-werkzaamheden met enkele andere aggregerende eiwitten van toepassing zijn. Zij zal IenM hier in een later stadium nader over adviseren.

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

Inschaling van werkzaamheden met het aggregerende eiwit α-synucleïne
COGEM advies CGM/150501-05

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de benodigde inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met potentieel aggregerende eiwitten die worden geassocieerd met ziekte, in het algemeen en α-synucleïne in het bijzonder. In de bestaande vergunningen van het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG) (IG 06-129 en IG 12-071) zijn de ggo-werkzaamheden met de coderende sequentie voor het eiwit α-synucleïne vergund. Het betreft de klonering van sequenties coderend voor α-synucleïne en mutanten in *E. coli*, handelingen met muizen die transgeen zijn voor α-synucleïne en mutante eiwitten (D-I), en handelingen met cellen en weefsels van deze muizen (ML-I). Sinds het vaststellen van deze vergunningen zijn er in de wetenschappelijke literatuur aanwijzingen gerapporteerd dat α-synucleïne overgedragen kan worden tussen hersengebieden. Hierdoor zijn er binnen het UMCG zorgen ontstaan over de veiligheid van de bovengenoemde werkzaamheden. Naar aanleiding van deze zorgen heeft de BVF van het UMCG een veiligheidsrapport opgesteld en is besloten om het inperkingsniveau van de werkzaamheden met muizen en de cellen en weefsels van deze muizen op te schalen naar DM-II en ML-II. De BVF heeft vervolgens de overheid om advies gevraagd inzake de mogelijke risico's van aggregerende eiwitten en de inperkende maatregelen die nodig zijn om veilig met deze eiwitten te kunnen werken.

De COGEM is gevraagd de mogelijke risico's van deze werkzaamheden te beoordelen en te adviseren over de inperkende maatregelen die nodig zijn om deze risico's te minimaliseren. Daarnaast is de COGEM gevraagd of er andere aggregerende eiwitten zijn die als potentieel ziekmakend eiwit beschouwd moeten worden en of de werkzaamheden met deze eiwitten op eenzelfde manier ingeschaald moeten worden.

Aggregerende eiwitten

Een 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 eiwitten niet afgebroken worden en gaan aggregeren. Tijdens dit proces aggregeren eerst een beperkt aantal eiwitten (oligomere vormen) en vormen een 'seed' waaraan meerdere van hetzelfde verkeerd gevouwen eiwit kunnen binden. Tijdens dit proces kan een keten gevormd worden waardoor uiteindelijk een fibril gevormd wordt.[1] Door spontane of via cellulaire processen kunnen delen afbreken die opnieuw als 'seed' kunnen dienen.[2] Uiteindelijk kunnen de fibrillen samen plaques vormen die de werking van de cellen verstoren. De eiwitten in deze plaques zijn zeer stabiel en kunnen moeilijk door proteasen afgebroken worden. Een voorbeeld hiervan zijn de vorming van 'Lewy bodies' bij de ziekte van Parkinson.

Prionen

Veel ongeneeslijke ziekten van centraal zenuwstelsel 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.[3]

Het lichaamseigen PrP^c-eiwit (c van cellulair) is aanwezig in alle cellen van zoogdieren en in grote hoeveelheden in de hersenen.[4] Door toevallige mutaties in het PrP^c-gen kan een PrP^{sc}-eiwit (waarbij sc verwijst naar scrapie) ontstaan. Deze eiwitten worden prionen genoemd (proteinaceous infectious particle) omdat ze de eigenschap hebben om langs een vooralsnog onbekend mechanisme nabijgelegen PrP^c-eiwitten van vorm te laten veranderen. Door stapeling van deze afwijkende prionen in hersenweefsel ontstaan progressieve neurodegeneratieve afwijkingen, met de dood tot gevolg. Prionen kunnen zich niet vermenigvuldigen, maar kunnen de vouwing van het lichaamseigen PrP^c-eiwit veranderen in het afwijkende PrP^{sc}. Omdat het een lichaamseigen eiwit is, is er tijdens het ziekteproces geen betrokkenheid van het immuunsysteem.

Prionen zijn zeer stabiel en het lichaam is niet in staat ze af te breken. Inactivatie van deze eiwitten is lastig. Prionen zijn hittestabiel en autoclaveren onder normale condities (30 minuten bij 121°C) blijkt niet afdoende.[5] Daarnaast zijn prionen resistent tegen desinfectantia zoals alcohol en aceton, maar ook tegen extreme detergentia zoals formaldehyde, HCl, H_2O_2 en fenolen. Behandelen met een Na-hypochloriet- oplossing (20.000 ppm) of een 2M NaOH-oplossing zorgt voor een sterk verminderde infectiviteit, maar werkt niet volledig.[6]

Behalve door een toevallige mutatie in het PrP^c-gen kunnen TSE's ontstaan door erfelijke aanleg, door de consumptie van producten die prionen bevatten, door transplantatie van organen of het overbrengen van bloedproducten. Het risico op besmetting is niet voor alle weefsels en vloeistoffen gelijk: er is sprake van een hoog besmettingsrisico bij direct of indirect contact met dura mater (harde hersenvlies), hersenen, hypofyse, het binnenste van het oog en ruggenmerg.[7] Het is bekend dat de PrP^{sc}-eiwitten van mens-op-mens overgedragen kunnen worden, zoals in het geval van Kuru. Daarnaast kan BSE van dier-op-mens overgedragen worden, terwijl scrapie alleen van dier-op-dier overgedragen wordt.

Andere aggregerende eiwitten en ziektebeelden

Inmiddels is van een aantal neurodegeneratieve ziekten, zoals de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson, Amyotrofische Laterale Sclerose (ALS) en frontotemporale dementie, bekend dat ze geassocieerd zijn met de aggregatie van eiwitten. Daarnaast zijn er aggregerende eiwitten die een rol spelen bij ziekte van de nier, de lever, de milt of het hart.[8] In totaal zijn er meer dan 30 verschillende eiwitten bekend die door aggregatie een ziekte kunnen veroorzaken.[9,10]

Een aantal van deze eiwitten hebben eigenschappen die deels vergelijkbare zijn met prionen. De eiwitten kunnen zich verspreiden naar andere cellen en net als bij prionen zijn de gevormde eiwitafzettingen erg stabiel. Maar anders dan bij prionen is tot op heden niet aangetoond dat deze

aggregerende eiwitten via een natuurlijke route van mens-op-mens of dier-op-dier kunnen verspreiden.[11]

α-synucleïne

α-synucleïne is een lichaamseigen eiwit van 14 kD dat aanwezig is in de cellen van de hersenen van zoogdieren. Bij de mens bestaat het eiwit uit 3 domeinen en bevat de N-terminale regio een aantal repeats waarvan het consensus motief KTKEGV is. Tot dusver zijn er in deze regio zes verschillende mutaties beschreven die betrokken zijn bij het ontstaan van de ziekte van Parkinson.[12]

De functie van α-synucleïne is nog niet bekend. Er wordt gesuggereerd dat α-synucleïne een rol speelt bij de regulatie van het vrijkomen van de neurotransmitter dopamine.[13] Net als voor aggregerende eiwitten zijn er verschillende vormen van α-synucleïne beschreven. De monomere vorm komt voor in de cellen, maar wanneer deze aggregeren kunnen er oligomere vormen en fibrillen ontstaan. De oligomere vorm wordt in de wetenschappelijke literatuur gezien als de meest toxische vorm van α-synucleïne en fibrillen worden soms ook als toxisch beschouwd.[12]

Zowel bij Lewy body dementie (LBD) als de ziekte van Parkinson is verkeerd gevouwen α-synucleïne in geaggregeerde vorm in Lewy bodies in de hersencellen aanwezig.[14] Bij de ziekte van Parkinson zijn de Lewy bodies vooral aanwezig in de *substantia nigra* (zwarte kern), terwijl de Lewy bodies bij LBD ook in de hersenschors gevonden worden.[15]

Wanneer asymptomatische jonge transgene muizen die een humane variant (A53T) van het α-synucleïne bevatten in de hersenen ingespoten werden met hersenextracten van symptomatische transgene muizen, ontwikkelen ze een ziekte.[16] Hetzelfde resultaat werd gevonden wanneer recombinant humane α-synucleïne fibrillen ingespoten werden.[16] Er zijn aanwijzingen dat bepaalde vormen van het eiwit zich kunnen verspreiden naar omliggende gebieden in de hersenen.[17] Daarnaast zijn er aanwijzingen dat α-synucleïne 'seeds' van cel naar cel overgedragen kunnen worden in mensen. In Parkinsonpatiënten die foetale dopamine producerende cellen in het brein getransplanteerd kregen, waren er na elf tot zestien jaar Lewy bodies aanwezig in de getransplanteerde cellen.[18] Daar staat tegenover dat in een studie waarbij de ontwikkeling van de ziekte van Alzheimer en de ziekte van Parkinson werd geëvalueerd bij mensen die menselijk groeihormoon hebben gebruikt, de overdracht van deze ziekte van mens-op-mens niet is vastgesteld.[11] Bij CJD patiënten is de overdracht van prionen via menselijk groeihormoon wel vastgesteld.[19]

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden vier maal over prion-gerelateerd onderzoek geadviseerd.[6,20,21,22] Het eerste advies over dit onderwerp betrof een vergunningaanvraag voor de klonering en expressie van PrP genen afkomstig van varken, rund en schaap in muizen. 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 inperkingsniveau D-I te huisvesten. Echter als deze muizen werden blootgesteld aan TSE's, achtte de COGEM een opschaling naar DM-II inperkingsniveau nodig en adviseerde daarbij de volgende aanvullende voorschriften:

- Spattende en aerosol 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 121ºC,
- 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 met prion-gecontamineerd materiaal geïnactiveerd kan worden en wordt ingegaan op het type kooien waarin de trangene PrP-muizen gehouden moeten worden. 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.

De COGEM heeft tot op heden niet geadviseerd over werkzaamheden met andere aggregerende eiwitten.

Inschaling van TSE's door andere instanties

Binnen de ARBO richtlijn worden de TSE's: Creutzfeldt-Jakob, Variant van Creutzfeldt-Jakob BSE en andere daaraan verwante dierlijke TSE's, het Gerstmann-Sträussler-Scheinkersyndroom en Koeroe als pathogeen van klasse 3 aangemerkt. Het Swiss Expert Committee for Biosafety deelt TSE's ook in risicogroep 3 in. Echter 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.[23] 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.[24]

Overweging

Het eiwit α-synucleïne is van nature aanwezig in de presysnaptische uiteinden van zenuwen in verschillende regionen van de hersenen van gewervelde dieren. Hoewel de fysiologische functie van α-synucleïne niet exact bekend is, lijkt het een rol te spelen in de release van neurotransmitters. Onder fysiologische condities is α-synucleïne een monomeer eiwit, waarvan de secundaire structuur gekenmerkt wordt door α-helices. Onder pathologe condities oligomerizeert en aggregeert het α-synucleïne en wordt de secundaire structuur gekenmerkt door vele β-sheets. Deze α-synucleïne aggregaten zijn een kenmerk van onder andere de ziekte van Parkinson. Er bestaan in

de wetenschappelijke literatuur sterke aanwijzingen dat het ontstaan van deze ziekte het gevolg is van de aggregatie van α-synucleïne. De exacte rol van α-synucleïne aggregaten in het ontstaan van de ziekte van Parkinson is echter nog niet opgehelderd. De COGEM is van mening dat de huidige wetenschappelijke kennis onvoldoende is om van te voren te kunnen voorspellen onder welke condities het α-synucleïne aggregeert. Zij merkt daarbij echter op dat er zes mutaties van het α-synucleïne zijn beschreven die een verhoogde kans op de ziekte van Parkinson geven.

Het ontwikkelen van een neurodegeneratieve afwijkingen door het ontstaan van α-synucleïne aggregaten vertoont overeenkomsten met het ontstaan van CJD door prionen. De COGEM constateert dat een belangrijke aspect van de pathogeniteit van prionen gevormd wordt door de mogelijke transmissie van TSE's van dier-op-dier, dier-op-mens en van mens-op-mens. Experimenteel onderzoek naar de mogelijke transmissie van α-synucleïne pathologie wijst uit dat injectie van een hersenhomogenaat van transgene muizen met α-synucleïne pathologie of hersenmonsters van mensen met de ziekte van Parkinson in de hersenen van wildtype muizen tot de inductie van α-synucleïne pathologie kan leiden.[25] Een vergelijkbaar experiment met niet-humane primaten suggereert bovendien dat deze pathologie ook van mens op aap overgedragen kan worden.[26] De COGEM merkt hierbij op dat tot op heden geen aanwijzingen zijn gevonden dat α-synucleïne pathologie via natuurlijke transmissieroutes overdraagbaar is.

In hoeverre α-synucleïne 'seeds' van een willekeurige locatie in het lichaam kunnen leiden tot aggregatie van endogeen eiwit, dat zich kan verspreiden naar de hersenen en aldaar Parkinson kan veroorzaken, is volgens de COGEM op basis van de huidige wetenschappelijke kennis nog niet met zekerheid te zeggen. In de wetenschappelijke literatuur zijn evenwel verschillende *in vitro* en *in vivo* studies gepubliceerd waaruit blijkt dat α-synucleïne van cel op cel overgedragen kan worden en in de ontvangercel aggregatie van α-synucleïne induceert.[27,28,29,30,31] Op basis van deze gegevens kan de COGEM niet uitsluiten dat α-synucleïne aggregatie zich vanuit een willekeurig locatie in het lichaam naar de hersenen kan uitbreiden.

Gezien de wetenschappelijke gegevens over de mogelijke transmissie van α-synucleïne aggregatie en de mogelijke verspreiding in het lichaam houdt de COGEM er in haar oordeel rekening mee dat de ziekte van Parkinson zich kan ontwikkelen als tijdens de laboratoriumwerkzaamheden waarbij α-synucleïne tot expressie wordt gebracht, de medewerker door bijvoorbeeld een prikincident onbedoeld in aanraking komt met dit eiwit. De COGEM wijst er op dat de vergunninghouder tevens gebruik maakt van twee α-synucleïne mutanten. Deze zogenaamde A30P en A53T mutanten zijn twee van de zes bekende mutaties die gerelateerd zijn met het ontstaan van de ziekte van Parkinson.

Op dit moment zijn er geen aanwijzingen dat een besmet dier of mens α-synucleïne 'seeds' uit zal scheiden. Met het oog op de vermoedelijk afwezigheid van natuurlijke transmissieroutes acht de COGEM de kans zeer klein dat er vanuit een met α-synucleïne 'seeds' besmette medewerker verdere verspreiding van α-synucleïne pathologie optreedt naar derden. De impact van de werkzaamheden op de medewerker na besmetting met α-synucleïne kan evenwel groot zijn.

De COGEM concludeert dat α-synucleïne van nature in de hersenen van gewervelde dieren aanwezig is. Onder specifieke condities kan dit eiwit aggregeren en er bestaan sterke aanwijzingen dat deze aggregatie leidt tot het ontstaan van de ziekte van Parkinson. De exacte rol van α-synucleïne aggregaten in het ontstaan van de ziekte van Parkinson is echter nog niet opgehelderd. Bovendien is op dit moment de wetenschappelijke kennis over de benodigde condities onvoldoende om van te voren te kunnen voorspellen wanneer het α-synucleïne aggregeert. Tevens is op dit moment nog veel onzekerheid over de mogelijke transmissieroutes. Verschillende *in vivo* experimenten suggereren dat α-synucleïne pathologie van dier-op-dier en van mens-op-dier overdraagbaar is. Gezien de ernst van de ziekte van Parkinson en het feit dat nog veel onbekend is over de mogelijke transmissie van α-synucleïne pathologie beschouwt de COGEM op basis van het voorzichtigheidsprincipe α-synucleïne voorlopig als schadelijk genproduct, totdat zij op basis van nieuwe wetenschappelijke informatie de aard van dit eiwit nader kan bepalen.

Advies

Inactivatiemethode a-synucleïne

Voor zover bij de COGEM bekend is er op dit moment geen gevalideerde methode om α-synucleïne te inactiveren. Als referentiekader wijst zij op het prion-eiwit dat een zeer stabiel eiwit is. In het geval van prionen volstaan de gangbare inactivatiemethoden als autoclaveren, gebruik van alcohol, formaldehyde etc. niet. Derhalve zijn voor werkzaamheden met prion-besmet materiaal specifieke inactivatiemethoden opgesteld zijn. De COGEM heeft hier eerder over geadviseerd.[20,21,22]

Op basis van de aangeleverde SOP: 'Working safely with aggregation-prone protiens' gebruikt de vergunninghouder momenteel 1M NaOH om oppervlakken, de buitenkant van gebruiksvoorwerpen en apparaten etc. te decontamineren. Vloeibaar afval wordt geautoclaveerd voordat het in septo-containers wordt afgevoerd. Deze procedures zijn geënt op de specifieke inactivatiemethoden voor prion-besmet materiaal. Het is niet duidelijk of deze inactivatiemethoden effectief zijn voor α-synucleïne aggregaten. De COGEM suggereert om hier een speerpunt van onderzoek van te maken zodat zo spoedig mogelijk inzicht wordt verkregen in efficiënte inactivatiemethoden voor α-synucleïne aggregaten.

Onlangs is gepubliceerd dat ook α-synucleïne oligomeren zeer stabiele structuren zijn die bestand zijn tegen extreme pH waarden, temperatuur en tegen verschillende denaturende middelen.[32] Van de geteste condities blijkt alleen een hoge concentratie ureum oligomere structuren effectief om te zetten in monomeren. De COGEM suggereert derhalve decontaminatie van met α-synucleïne besmet materiaal te baseren op een hoog molaire ureum oplossing.

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;

- Gezien het ontbreken van ervaring met de inactiverende werking van 8M ureum oplossing op werkoppervlakken, dienen de werkplekken voorzien te worden van absorberend materiaal dat als ziekenhuisafval verbrand wordt.
- Vloeibaar afval dient gedurende een uur te worden geïncubeerd in een 8M ureum oplossing (eindconcentratie), gevolgd door minimale verhitting bij 121ºC gedurende 30 minuten;

Aangezien ureum en natriumhypochloriet met elkaar kunnen reageren, suggereert de COGEM in de betreffende laboratoria geen gebruik te maken van natriumhypochloriet als desinfectans. Tevens wijst zij op het feit dat zij niet kan uitsluiten dat bij autoclaveren van 8M ureum ammoniak vrijkomt. Voldoende luchtafzuiging tijdens het autoclaveren lijkt derhalve van belang. Als mogelijke optie suggereert zij hiervoor de autoclaaf in een zuurkast te plaatsen.

Inschaling van in vitro werkzaamheden met α-synucleïne
Gezien bovenstaande overweging adviseert de COGEM *in vitro* werkzaamheden met coderende sequenties voor endogeen of mutant α-synucleïne op ML-II inperkingsniveau in te schalen totdat wetenschappelijk is aangetoond dat betreffende genproducten onder genoemde condities geen aggregaten vormen en als 'seeds' op kunnen treden. De COGEM is hierbij van mening dat de mogelijke transmissie route van α-synucleïne en eventuele hoge concentraties eiwit waarmee onder laboratoriumomstandigheden gewerkt kan worden, de kans verhogen dat een medewerker besmet wordt met dit aggregerende eiwit via wondjes van de huid, of via contact met aerosolen. Om eventuele risico's voor met name de medewerker te minimaliseren, adviseert de COGEM bij de *in vitro* werkzaamheden de volgende aanvullende voorschriften te hanteren.

- 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.

Als alternatief voor het gebruik van een veiligheidskabinet klasse 2 hebben de vergunninghouders voorgesteld bij handelingen die mogelijk kunnen spatten een veiligheidsbril en chirurgische mondneusmasker te dragen. De COGEM adviseert handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan op dit moment alleen in een veiligheidskabinet klasse 2 uit te voeren. Voornaamste reden daarvoor is het feit dat bij het uitvoeren van deze handelingen op de bench, het niet duidelijk is waar aerosolen en spetters terecht zullen komen. Dit vereist dat na de werkzaamheden de wijde omgeving van de werkplek en op gezette tijden het gehele laboratorium gedecontamineerd zal moeten worden met een agressieve schoonmaakmethode. Aangezien er op dit moment nog geen gevalideerde decontaminatiemethode voorhanden is, ziet de COGEM een veiligheidskabinet klasse 2 als enige goede manier om eventuele aerosolen gelocaliseerd te houden.

Inschaling van in vivo werkzaamheden met α-synucleïne
Momenteel zijn er geen aanwijzingen dat α-synucleïne door dieren uitgescheiden wordt en via een natuurlijke wijze overgedragen kan worden. Zelfs in de situatie dat er een verhoogde kans is dat de α-synucleïne variant die in betreffende transgene muis tot expressie komt, zal aggregeren, acht de COGEM de kans op overdacht van α-synucleïne aggregaten vanuit transgene muizen naar andere muizen of laboratoriummedewerkers zeer klein. De COGEM is derhalve van mening dat de veiligheid voor mens en milieu voldoende is gewaarborgd als α-synucleïne transgene muizen op D-I inperkingsniveau in standaardkooien worden gehuisvest.

Als transgene dieren worden geïnjecteerd met α-synucleïne 'seeds' kan de COGEM niet uitsluiten dat de 'seeds' onbedoeld vrijkomen. De kans op overdracht naar en besmetting van de medewerker neemt hierdoor toe. Vanuit het voorzichtigheidsprincipe adviseert de COGEM deze handelingen op DM-II inperkingsniveau uit te voeren. Om de kans op besmetting van de medewerker gedurende deze handelingen te minimaliseren, acht de COGEM het noodzakelijk dat hierbij de volgende aanvullende voorschriften nageleefd worden:

- 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.

Signalering
Het UMCG heeft op basis van de toenemende wetenschappelijke kennis over α-synucleïne de procedures die zij hanteert voor de ggo-werkzaamheden met dit eiwit tegen het licht gehouden en aangepast. De COGEM spreekt haar waardering uit over de pro-actieve wijze waarop het UMCG in een vroegtijdig stadium de mogelijke risico's verbonden aan het onderzoek naar α-synucleïne heeft geëvalueerd en waar nodig maatregelen heeft getroffen om de risico's te minimaliseren.

De COGEM signaleert dat er naast α-synucleïne een aantal andere potentieel aggregerende eiwitten zijn die geassocieerd worden met ziekte bij de mens en mogelijk overdraagbaar zijn. In patiënten met de ziekte van Alzheimer zijn bijvoorbeeld afzettingen van het aggregerende eiwit amyloïd-β aangetroffen. Uit wetenschappelijk onderzoek is gebleken dat wanneer celmateriaal ('seeds') van Alzheimer patiënten intracerebraal in primaten ingespoten wordt, deze dieren amyloïd afzettingen ontwikkelen.[33] Ook aggregaten van tau worden geassocieerd met ziekten, zoals de ziekte van Alzheimer en frontotemporal lobar degeneration.[2] Een intracerebrale injectie in transgene muizen met breinextract dat geaggregeerd tau bevat, induceert de vorming van tau laesies. Het tau kan zich vervolgens via de axonen naar omliggende gebieden verspreiden.[34] Daarnaast zijn er aanwijzingen dat de eiwitten superoxide dismutase-1 (SOD1) en TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) betrokken zijn bij de ontwikkeling van ALS. In patiënten met ALS is een ophoping van TDP-43 aangetoond. Intracellulaire aggregatie van TDP-43 kan plaatsvinden nadat aggregaten van functioneel *in vitro* geproduceerd TDP-43 in de cel gebracht zijn.[35] SOD1 mutanten afkomstig van patiënten met de familiaire vorm van ALS kunnen zich vermeerderen en van cel-naar-cel verspreiden in celculture.[36]

De COGEM constateert dat er veel onderzoek wordt gedaan naar de eigenschappen van deze groep van aggregerende eiwitten. Op dit moment is er geen overzicht beschikbaar van de huidige wetenschappelijke kennis over deze eiwitten en is het niet duidelijk of het noodzakelijk is om voor (ggo-)werkzaamheden met deze eiwitten inperkende of veiligheidsmaatregelen te treffen. Om de wetenschappelijke kennis over deze groep van eiwitten in kaart te brengen en zicht te krijgen op de mogelijke risico's van werkzaamheden met deze eiwitten en hun coderende sequenties is de COGEM voornemens een onderzoeksproject hiernaar uit te zetten. Op basis van de bevindingen van het resulterende rapport zal de COGEM u nader informeren over de wijze waarop ggo-werkzaamheden met aggregerende eiwitten ingeperkt moeten worden om de mogelijke risico's voor mens en milieu te minimaliseren.

Referenties

1. Morales R *et al.* (2015). Prion-like features of misfolded Abeta and tau aggregates. Virus Res
2. Jucker M & Walker LC (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. Nature 501: 45-51
3. Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) (2013). Guidance: Minimise transmission risk of CJD and vCJD in healthcare settings. www.gov.uk/government/publications/guidance-from-the-acdp-tse-risk-management-subgroup-formerly-tse-working-group (bezocht: 10 april 2015)
4. van Rheede T *et al.* (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. Mol Biol Evol 20: 111-121
5. Taylor DM *et al.* (1997). Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. Vet Microbiol 58: 87-91
6. COGEM (2004). Bovine Spongieuze Encephalopathie/Scrapie; clonering en expressie van PrP genen afkomstig van varken, rund en schaap in muis. COGEM advies CGM/040212-03
7. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2014). LCI-richtlijn Creutzfeldt-Jakob, ziekte van. www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Creutzfeldt_Jakob_ziekte_van (bezocht: 10 april 2015)
8. Blancas-Mejia LM & Ramirez-Alvarado M (2013). Systemic amyloidoses. Annu Rev Biochem 82: 745-774
9. Buxbaum JN & Linke RP (2012). A molecular history of the amyloidoses. J Mol Biol 421: 142-159
10. Sipe JD *et al.* (2012). Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Amyloid 19: 167-170
11. Irwin DJ *et al.* (2013). Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. JAMA Neurol 70: 462-468
12. Fonseca TL *et al.* (2015). The Interplay between Alpha-Synuclein Clearance and Spreading. Biomolecules 5: 435-471
13. Lashuel HA *et al.* (2013). The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. Nat Rev Neurosci 14: 38-48
14. Spillantini MG *et al.* (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 388: 839-840
15. Roberts HL & Brown DR (2015). Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric alpha-Synuclein. Biomolecules 5: 282-305
16. Luk KC *et al.* (2012). Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. J Exp Med 209: 975-986
17. Rey NL *et al.* (2013). Transfer of human alpha-synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. Acta Neuropathol 126: 555-573
18. Li JY *et al.* (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nat Med 14: 501-503

19. Brown P *et al.* (1985). Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. N Engl J Med 313: 728-731
20. COGEM (2004). Inactiveren van prionen. COGEM advies CGM/040526-01
21. COGEM (2005). Inactiveren van prionen en huisvesting van met prionen geïnfecteerde muizen. COGEM advies CGM/051028-02
22. COGEM (2006). Expressie van prioneiwitten in muizencellijnen. Inactivatie van prionen in vloeibaar afval. COGEM advies CGM/060127-01
23. 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. www.efbs.admin.ch/fileadmin/efbs-dateien/dokumentation/empfehlungen/Empfehlungen_2014/Prionen_EFBS_E.pdf (bezocht: 15 april 2015)
24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Section VIII-H: Prion Diseases. www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf (beacoht: 15 april 2015)
25. Luk KC *et al.* (2012). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. Science 338: 949-953
26. Recasens A *et al.* (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. Ann Neurol 75: 351-362
27. Angot E *et al.* (2012). Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. PLoS One 7: e39465
28. Danzer KM *et al.* (2009). Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. J Neurochem 111: 192-203
29. Desplats P *et al.* (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 13010-13015
30. Freundt EC *et al.* (2012). Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. Ann Neurol 72: 517-524
31. Hansen C *et al.* (2011). alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. J Clin Invest 121: 715-725
32. Paslawski W *et al.* (2014). High stability and cooperative unfolding of alpha-synuclein oligomers. Biochemistry 53: 6252-6263
33. Meyer-Luehmann M *et al.* (2006). Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. Science 313: 1781-1784
34. Clavaguera F *et al.* (2015). Invited review: Prion-like transmission and spreading of tau pathology. Neuropathol Appl Neurobiol 41: 47-58
35. Furukawa Y *et al.* (2011). A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. J Biol Chem 286: 18664-18672
36. Munch C *et al.* (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 3548-3553