

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

DATUM 18 oktober 2016
KENMERK CGM/161018-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met het aggregerende eiwit 'tau'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 16-228_2.8-000 getiteld 'Recombinant production of the protein 'Tau'' ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's van ggo-werkzaamheden met het tau eiwit en mogelijke maatregelen om de potentiële risico's voor mens en milieu te minimaliseren. Tau komt voor in de zenuwcellen van de mens en zoogdieren. Onder bepaalde condities kan tau van structuur veranderen en gaan samenklonteren (aggregeren) en zich in de hersenen opstapelen. Deze aggregaten zijn geassocieerd met neurodegeneratieve ziektes, waaronder Alzheimer. In de wetenschappelijke literatuur is beschreven dat injectie van geaggregeerd tau in transgene muizen kan leiden tot verdere aggregatie van tau-eiwitten en ziekte. Onder natuurlijke omstandigheden lijkt overdracht van geaggregeerd tau nooit voor te komen.

De aanvrager is van plan om wildtype en genetisch gemodificeerd tau tot expressie te brengen in *E. coli* en celculturen, mede om te onderzoeken welke mutaties in de tau sequentie aggregatie induceren. Op basis van de huidige stand en kennis in de wetenschap is de COGEM van mening dat tau niet als schadelijk en ten hoogste als potentieel schadelijk genproduct aangeduid kan worden. Gezien de aard van de voorgenomen werkzaamheden en het feit dat overdracht van tau-aggregaten van mens tot mens of dier onder natuurlijke omstandigheden nooit is waargenomen, is de COGEM van mening dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau kunnen plaatsvinden.

Wel signaleert de COGEM dat aanvullende maatregelen noodzakelijk zijn om de veiligheid van de betrokken laboratoriummedewerkers te waarborgen. Blootstelling door bijvoorbeeld injectie of inhalatie van geaggregeerd tau eiwit dient voorkomen te worden, aangezien niet uitgesloten kan worden dat dit tot nadelige effecten kan leiden. Voor de inactivatie van geaggregeerd tau moet gebruik gemaakt worden van een erkende methode. Veiligheid voor medewerkers valt echter niet onder de ggo-regelgeving maar onder de Arboret.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

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 tau

COGEM advies CGM/161018-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld 'Recombinant production of the protein 'Tau'' (IG 16-228) ingediend door de bèta-faculteit van de Universiteit Utrecht. Het eiwit tau komt in de zenuwcellen van de mens en zoogdieren voor. Onder bepaalde condities kan tau aggregeren en zich in de hersenen opstapelen. Deze aggregaten zijn geassocieerd met neurodegeneratieve ziektebeelden.

De vergunningaanvraag betreft de klonering van sequenties coderend voor tau en genetisch gemodificeerd (gg-) tau in *Escherichia coli*, de zuivering van het tot expressie gebrachte (gg-)tau, en aggregatie-experimenten van (gg-)tau in celculturen. 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.

2. Ziekteverwekkende aggregerende eiwitten

Een in het lichaam voorkomend 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 endogene eiwitten niet afgebroken worden en gaan aggregeren. Eerst aggregaat een beperkt aantal eiwitten (oligomere vormen), die een 'seed' vormen. Hieraan kunnen zich meerdere van dezelfde verkeerd gevouwen eiwitten binden waardoor een keten en uiteindelijk een fibril (vezel) ontstaat. Van een fibril kunnen zich spontaan of door middel van cellulaire processen delen afsplitsen, die weer opnieuw als 'seed' kunnen fungeren. Uiteindelijk kunnen fibrillen samen plaques vormen die de werking van de cellen verstoren. De eiwitten van deze plaques (amyloïd) zijn zeer stabiel en worden moeilijk door proteasen afgebroken.^{1,2} Omdat het lichaamseigen eiwit betreft, is er tijdens het ziekteproces geen betrokkenheid van het immuunsysteem.

In totaal zijn er meer dan 30 verschillende aggregerende eiwitten bekend die zich intracellulair of extracellulair in verschillende typen weefsels en organen kunnen ophopen. Deze zijn geassocieerd met bepaalde ziektebeelden. Het bekendst zijn de prionen, die onder meer de ziekte van Creutzfeldt-Jakob en bovine spongieuze encefalopathie (BSE of 'gekken koeienziekte') kunnen veroorzaken. Daarnaast zijn er een aantal andere zeer verschillende eiwitten die geassocieerd worden met neurodegeneratieve ziekten, zoals de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson en Amyotrofische Laterale Sclerose (ALS). In tegenstelling tot de 'prionziekten', kennen deze neurodegeneratieve ziektebeelden een langzaam verloop. Het eiwit tau is een voorbeeld van een aggregerend eiwit dat bij misvouwing neurodegeneratieve ziektebeelden kan veroorzaken.^{1,2,3,4}

2.1 Tau

Tau is een gefosforyleerd eiwit dat voorkomt in de neuronen van het centrale zenuwstelsel van mensen en zoogdieren, en is betrokken bij de opbouw van het cytoskelet. Niet alle functies van het eiwit zijn bekend, maar verondersteld wordt dat tau in ieder geval een rol speelt bij de polymerisatie en

stabilisering van tubuline door aan dit cellulaire eiwit te binden. Tau is voornamelijk in de uiteinden van de axonen aanwezig.^{5,6} Daarnaast komt het eiwit voor in cellulaire compartimenten zonder cytoskelet, zoals de dendritische spine, en in extracellulaire ruimtes, zoals in de synaptische spleet en in liquor.^{7,8} Er wordt gesuggereerd dat tau mogelijk ook een rol zou spelen bij de signaal-transductie van zenuwen.⁷

Tau wordt door één gen gecodeerd, maar kan door middel van ‘splicing’ in zes verschillende vormen voorkomen. De grootte varieert van 352 tot 441 aminozuren.⁵ In de C-terminus bevinden zich een variabel aantal repeats. Twee van deze repeats beschikken over microtubuli-bindende domeinen.^{5,9} Onder normale omstandigheden is tau een hydrofiel oplosbaar eiwit dat door middel van proteases afgebroken kan worden.^{9,10}

2.2 Pathogene tau

Onder bepaalde condities kan abnormale hyperfosforylering van tau optreden. Vervolgens induceren bepaalde hexapeptide motieven in de microtubuli-bindende domeinen een verkeerde eiwitvouwing, waardoor de eiwitten gaan aggregeren.⁹ Dit leidt tot de vorming van onoplosbare protease-resistente intracellulaire kluwens die ‘paired helical filaments’ (PHFs) of ‘neurofibrillary tangles’ (NFTs) worden genoemd. Deze aggregaten zijn niet goed meer in staat de microtubuli te stabiliseren, wat leidt tot functieverlies van de cel.^{1,2,5,6,10,11}

Recent is *in vitro* aangetoond dat, naast hyperfosforylering en verkeerde vouwing, klieving van tau op locatie Asp314 door caspase-2 tot een verminderde synapsfunctie kan leiden. *In vivo* kan deze klieving bij muizen geheugenverlies en neurodegeneratie veroorzaken.¹² Caspase-2 is een endogeen cysteine-protease.

Ziektebeelden waarbij taupathologie de belangrijkste neuropathologische eigenschap is, worden primaire tauopathiën genoemd. Ziektebeelden die gekenmerkt worden door andere amyloïdachtige eiwitafzettingen, zoals de aanwezigheid van amyloïd- β plaques, en waarbij daarnaast taupathologie wordt waargenomen, worden secundaire tauopathiën genoemd. Bekende tauopathiën zijn frontotemporale dementie (primair) en de ziekte van Alzheimer (secundair).^{10,13} De ziekte van Alzheimer wordt ook waargenomen bij dieren (apen).¹⁴

Tau-‘seeds’ kunnen zich naar andere hersencellen verspreiden en nieuwe taupathologie induceren. Onder natuurlijke omstandigheden lijkt overdracht van tau-aggregaten alleen op te treden via vesiculair transport tussen zenuwcellen.¹⁵ Echter, bij *in vivo* experimenten met wildtype en transgene muizen bleek intraperitoneale en intracerebrale toediening van exogene tau-aggregaten tauopathiën te kunnen veroorzaken.^{16,17,18,19} Natuurlijke transmissie van taupathologie (mens-mens, dier-dier, mens-dier) is niet in de literatuur beschreven. Dit vormt een belangrijk verschil met de infectiviteit van prionen.^{10,11}

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil eigenschappen van endogeen tau, van een korter tau-fragment dat de microtubuline

bindingsdomeinen bevat, en van tau waarin mutaties zijn aangebracht die de aggregatie van dit eiwit bevorderen, door middel van *in vitro* experimenten met elkaar gaan vergelijken. De verschillende te genereren tau varianten zijn in de literatuur beschreven.^{9,20,21} De aanvrager is van plan de gensequenties die voor de verschillende tau-varianten coderen, in gangbare geattenueerde apathogene *Escherichia coli* laboratoriumstammen te kloneren en tot expressie te brengen (*E. coli* K12, B, C en W). Daarnaast wil de aanvrager dezelfde tau-sequenties in eukaryotische cellijnen inbrengen, en in deze gg-cellijnen aggregatie van tau gaan induceren.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft diverse malen geadviseerd over werkzaamheden met (gemodificeerde) aggregerende eiwitten en de inactivatie hiervan.

In 2004 adviseerde de COGEM werkzaamheden met prionen onder BSL2 condities uit te voeren.²² Tevens adviseerde zij spattende en aerosol genererende handelingen in een veiligheidskabinet van klasse 2 (VK-II kabinet) uit te voeren en het gebruik van ‘sharps’ zoveel mogelijk te vermijden. Voor de inactivatie van prionen beschouwde de COGEM meerdere methoden afdoende. De voorkeursmethode bestond uit het inactiveren van afval door incubatie in 2M NaOH, gevolgd door een minimale verhitting gedurende 30 minuten bij 121°C. Daarnaast adviseerde zij gezien de onvolledige werking van 2M NaOH, werkplekken te voorzien van absorberend materiaal dat geautoclaveerd kan worden.²³

In 2015 heeft de COGEM over werkzaamheden met het aggregerende eiwit α -synucleïne (α -syn) geadviseerd. Gezien de ernst van de ziekte van Parkinson en het feit dat nog veel onbekend is over de mogelijke transmissie van α -syn pathologie, beschouwde de COGEM op basis van het voorzichtigheidsprincipe α -syn voorlopig als schadelijk genproduct. Zij adviseerde werkzaamheden met coderende sequenties voor endogeen of mutant α -syn uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Om eventuele risico's voor met name de medewerker te minimaliseren, adviseerde zij open handelingen uit te voeren in een VK-II kabinet en tijdens deze handelingen handschoenen te dragen. Tevens adviseerde zij het gebruik van ‘sharps’ tot een minimum te beperken en alleen toe te staan in combinatie met kevlarhandschoenen.²⁴ Omdat niet duidelijk was welke inactivatie methode voor α -syn het beste geschikt is en slechts één methode gevalideerd was, adviseerde de COGEM vast afval en kleine volumina vloeibaar afval in breukvaste en lekdichte containers te verzamelen en als ziekenhuisafval door verbranding te vernietigen. Omdat het de enige gevalideerde methode was, adviseerde zij vloeibaar afval gedurende een uur te incuberen in een 8M ureum oplossing (eindconcentratie) gevolgd door minimale verhitting bij 121°C gedurende 30 minuten. Werkplekken adviseerde zij te voorzien van absorberend materiaal en als ziekenhuisafval te verbranden.^{24,25}

5. Overwegingen en advies

Tau is een endogeen eiwit van de zenuwcellen van mens en zoogdier en van belang voor de opbouw van het cytoskelet. Onder bepaalde condities kunnen tau-aggregaten zich in hersenweefsel opstapelen, onoplosbare kluwens vormen, en ernstige neurodegeneratieve ziektebeelden veroorzaken, zoals de ziekte van Alzheimer en andere tauopathiën.

De COGEM heeft eerder op basis van het voorzichtigheidsprincipe het aggregerende eiwit α -syn (voorlopig) als schadelijke genproduct geclassificeerd.²⁴ De aanvrager wijst erop dat tau verschilt van α -syn omdat, in tegenstelling tot α -syn, tau-aggregaten alleen intracellulair zouden voorkomen en daarom passieve diffusie uit de cel voor tau niet mogelijk wordt geacht.¹⁵ De COGEM merkt op dat onder *in vitro* omstandigheden bij expressie in HEK293 cellen wel uitscheiding en opname van tau-fibrillen is waargenomen.²⁶ Hierdoor kan zij passieve diffusie van tau-aggregaten onder natuurlijke omstandigheden niet volledig uitsluiten.

Verschillende *in vivo* experimenten laten zien dat taupathologie van dier-op-dier en van mens-op-dier overdraagbaar is. Transmissie vindt echter alleen plaats na injectie met gehomogeniseerd pathologisch weefsel of gehomogeniseerde synthetische eiwitaggregaten. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen bekend dat taupathologie op natuurlijke wijze overdraagbaar is, zoals via voeding of (in)direct contact met dieren of patiënten. Tevens zijn er geen aanwijzingen dat, in tegenstelling tot prionziekten, behandeling met uit hypofyse gezuiverd groeihormoon heeft geleid tot tauopathieen.¹⁵

Al het bovenstaande in ogenschouw nemende, en gezien het feit dat tau een endogeen eiwit is en van belang is bij de opbouw van het cytoskelet, beschouwt de COGEM de sequentie coderend voor tau niet als een schadelijke gensequentie. Echter, gezien de ernst van de ziektebeelden die tau-aggregaten kunnen veroorzaken, beschouwt de COGEM tau als een *potentieel* schadelijk genproduct.

De aanvrager wil sequenties coderend voor tau en afgeleiden hiervan in cellijnen brengen, en aggregatie van tau in deze gg-cellijnen gaan induceren. Daarnaast wil de aanvrager dezelfde gensequenties coderend voor tau en tau-mutanten tot expressie brengen in *E. coli*. In kweek gebrachte eukaryotische cellijnen kunnen alleen onder specifieke laboratoriumcondities overleven. De te gebruiken *E. coli* gastheren zijn gedefinieerd als pathogeniteitsklasse 1, biologisch ingeperkt en niet in staat in het milieu te overleven of zich te verspreiden. In *E. coli* geproduceerd tau lijkt geen fibrillen te vormen, aangezien hiervoor een *in vitro* behandeling van het gezuiverde tau met heparine noodzakelijk lijkt te zijn.¹⁹ De aanvrager is verder voornemens om gg-tau sequenties tot expressie te brengen die mutaties bevatten die aggregatie bevorderen. De aanvrager stelt dat dusdanige kweekcondities gekozen zullen worden, dat tau-aggregaten niet gevormd worden.

Alle aspecten in overweging nemende, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien voorgenomen werkzaamheden uitgevoerd worden op ML-I inperkingsniveau.

De COGEM signaleert dat in *E. coli* tot expressie gebracht tau en *in vitro* geïnduceerde tau-fibrillen, bij injecties in transgene muizen tot tauopathie kunnen leiden. Zij wijst er daarom op dat er bij laboratoriumwerkzaamheden met tau-aggregaten, mogelijke risico's zijn voor de betrokken medewerkers. Aangezien geen verdere verspreiding zal plaatsvinden, vallen deze risico's niet onder het Besluit GGO, maar onder de ARBO regelgeving. De COGEM brengt geen advies uit over ARBO-gerelateerde aspecten, maar kan hierover wel signaleren.

6. Signalering ten behoeve van de bescherming van de medewerker (ARBO-overwegingen)

De aanvrager is voornemens om tau-aggregaten te produceren met behulp van *E. coli* stammen en eukaryotische cellijnen. In de beoogde tau-mutanten zijn modificaties aangebracht die de aggregatie van tau bevorderen. De aanvrager stelt dat de kweekcondities van de *E. coli* stammen zodanig gekozen zullen worden, dat er geen tau-aggregaten gevormd worden. Op basis van de gegevens in de literatuur, wijst de COGEM er echter op dat het niet bekend is onder welke fysiologische condities tau-aggregaten ontstaan. Zij kan daarom niet volledig uitsluiten dat bij de expressie-experimenten in *E. coli* toch tau-aggregaten gevormd zullen worden. Ook tijdens de experimenten met celculturen zal aggregatie van tau geïnduceerd worden.

Tijdens de werkzaamheden kan de medewerker onbedoeld blootgesteld worden aan tau-aggregaten. *In vivo* experimenten bij muizen hebben aangetoond dat taupathologie via injectie met tau-aggregaten overdraagbaar is. Omdat de impact van een eventuele blootstelling aan tau-aggregaten groot kan zijn, signaleert de COGEM daarom dat uit voorzorg en ter bescherming van de medewerker de volgende aanvullende maatregelen noodzakelijk zijn:

- 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.

Tevens signaleert de COGEM dat inactivatiemethoden van ziekteverwekkende eiwit-aggregaten per type eiwit verschillen. Tevens blijken geaggregeerde eiwitten vaak lastig te inactiveren.²⁴ Zij merkt op dat met betrekking tot de door de aanvrager aangeleverde inactivatiemethode, validatiegegevens ontbreken en alsnog aangeleverd moeten worden, of dat gebruik gemaakt moet worden van een in de wetenschappelijke literatuur beschreven en gevalideerde methode om geaggregeerde eiwitten te inactiveren.

Referenties

1. Jucker M & Walker LC (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501: 45-51
2. Morales R *et al.* (2015). Prion-like features of misfolded A-beta and tau aggregates. *Virus Res.* 207: 106-112
3. Buxbaum JN & Linke RP (2012). A molecular history of the amyloidoses. *J. Mol. Biol.* 421: 142-159
4. Sipe JD *et al.* (2012). Amyloid fibril protein nomenclature: recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 19: 167-170
5. Billingsley ML *et al.* (1997). Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J.* 323: 577-591
6. Khan SS & Bloom GS (2016). Tau: the center of a signalling nexus in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 10: 1-5

7. Ittner LM *et al.* (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142: 387–397
8. Yamada K. *et al.* (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau *in vivo*. *J. Exp. Med.* 211: 387–393
9. Barghorn S *et al.* (2005). Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments *in vitro*. *Methods Mol. Biol.* 299: 35-51
10. Lewis J & Dickinson DW (2016). Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol.* 131: 27-48
11. Annus A *et al.* (2016). Prion diseases: new considerations. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 150: 125-132
12. Zhao X *et al.* (2016). Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory. *Nat. Med.* doi:10.1038/nm.4199
13. Brettschneider J *et al.* (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 109-120
14. Price DL *et al.* (1991). Aged non-human primates: an animal model of age-associated neuro-degenerative disease. *Brain Pathol.* 1: 287–296
15. Guo JL & Lee VMY (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* 20: 130-138
16. Clavaguera F *et al.* (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mousebrain. *Nat. Cell. Biol.* 11: 909–913
17. Clavaguera F *et al.* (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: 9535-9540
18. Clavaguera, F., *et al.* (2014). Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 127: 299–301
19. Iba M *et al.* (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J. Neurosci.* 33: 1024-1037
20. Eckermann L *et al.* (2007). The β -propensity of tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy. *J. Biol. Chem.* 282: 3765-3755
21. Fischer D *et al.* (2009). Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochem.* 48: 10047-10055
22. 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
23. COGEM (2005). Inactiveren van prionen en huisvesting van met prionen geïnfecteerde transgene muizen. COGEM advies CGM/051028-02
24. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met het aggregerende eiwit α -synucleïne. COGEM advies CGM/150501-05
25. COGEM (2016). Advies over inschaling van *in vitro* werkzaamheden met α -synucleïne coderende adenovirale vectoren. COGEM advies CGM/160115-02
26. Kfoury N *et al.* (2012). Trans-cellular propagation of tau aggregation by fibrillary species. *J. Biol. Chem.* 287: 19440-19451