

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 22 februari 2019
KENMERK CGM/190222-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden gg-herpesvirus in associatie met proefdieren

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 18-179_2.8-000 getiteld 'Activiteiten met genetisch gemodificeerde organismen binnen het UMC Utrecht: inperkingsniveau II-k, productie van HSV-1 amplicons en infectie van animale cellen en kleine knaagdieren hiermee', deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)replicatiedeficiënt *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1). Tijdens de werkzaamheden zullen gg-virusdeeltjes, die van markergenen zijn voorzien, in de hersenen van ratten of muizen geïnjecteerd worden om functionele connecties tussen hersengebieden in kaart te brengen.

De aanvrager geeft aan dat de gg-virusdeeltjes replicatiedeficiënt zijn. De COGEM is echter van oordeel dat op basis van de aangeleverde gegevens niet uitgesloten kan worden dat er ook replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de vectorbatch aanwezig is. De COGEM heeft HHV-1 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

Indien de aanvrager via een gevalideerde methode onderbouwt dat in de gg-vectorbatch geen replicatiecompetent (gg-)HHV-1 aanwezig is, adviseert de COGEM voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau I. Indien de afwezigheid van replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de vectorbatch niet wordt bevestigd, adviseert de COGEM de injecties bij de muizen en ratten uit te voeren op inperkingsniveau II. Vervolgens kunnen - onder bepaalde voorwaarden - na drie weken de analyses op het hersenweefsel van de dieren op inperkingsniveau I uitgevoerd worden. Tevens adviseert de COGEM bij diverse handelingen aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen.

Onder inachtneming van de genoemde inperkingsniveaus en werkvoorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Human alphaherpesvirus 1* in associatie met proefdieren

COGEM advies CGM/190222-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)repliatiedeficiënt *Human alphaherpesvirus 1* (IG 18-179). De gg-virale vectordeeltjes zijn van verschillende markergenen voorzien en worden extern vervaardigd. De aanvrager is van plan de deeltjes via een stereotactische injectie toe te dienen aan de hersenen van ratten of muizen. De hersenen zullen na (minimaal) drie weken geanalyseerd worden ten einde functionele connecties tussen hersengebieden in kaart te brengen. De COGEM heeft *Human alphaherpesvirus 1* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2,¹ maar niet eerder over werkzaamheden met hiervan afgeleide gg-virale vectordeeltjes geadviseerd.

2. *Human alphaherpesvirus 1*

Human alphaherpesvirus 1 (HHV-1) behoort tot het genus *Simplexvirus*, familie *Herpesviridae*, subfamilie *Alphaherpesvirinae*, en werd vroeger achtereenvolgens Human simplex virus 1 (HSV-1) en Human herpesvirus 1 genoemd.² HHV-1 beschikt over een lineair dsDNA-genoom van ongeveer 150 kbp.³ Het genoom is opgebouwd uit twee 'unieke' elementen, het lange (U_L) en het korte (U_S) element, waarbij elk element wordt geflankeerd door een 'inverted repeat' (I_R).⁴ Het genoom wordt omhuld door capsid-eiwitten met daar omheen een eiwitachtige substantie (tegument). Om het tegument bevindt zich een eiwit-lipidenmembraan (envelop). Dit membraan is aan de buitenkant voorzien van verschillende glycoproteïnen ('spikes').³

Transcriptie van het HHV-1 genoom start bij de 'Immediate Early' (IE) regio.^{3,4} De IE regio bevat zes genen die coderen voor de eiwitten ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, US1.5 en ICP47.^{4,5} De eiwitten ICP4 en ICP27 reguleren binnen het virale genoom de expressie van de 'Early' (E) regio en de 'Late' (L) regio.⁴ De E regio codeert onder meer voor de enzymen betrokken bij de virale DNA-replicatie. De 'Late' (L) regio codeert voor de structurele eiwitten van capsid, tegument en envelop.^{3,4} Eiwitten ICP4 en ICP27 zijn essentieel voor de productie van infectieus virus.⁴

Herpesvirussen kennen een strikt gastheerbereik.⁶ HHV-1 heeft als primaire gastheer de mens en veroorzaakt - meestal rond de mond - koortsblaasjes (koortslip).³ Het virus tast de huid en slijmvliezen aan en kan ook de ogen infecteren.⁷ Daarnaast is uit diermodellen gebleken dat HHV-1 ook pathogeen is voor onder meer cavia's, konijnen, muizen en ratten.^{8,9,10} Transmissie van HHV-1 vindt plaats via besmetting met blaasjesvocht van beschadigde huid of slijmvliezen, bijvoorbeeld via in(direct) contact. Na infectie vindt in de epitheelcellen replicatie plaats, waarna de cellen lyseren (lytische fase) en het virus uitgescheiden wordt.⁴ Sommige virusdeeltjes verspreiden zich door het weefsel, infecteren de sensorische zenuwen en worden vervolgens naar de zenuwknopen van het ruggenmerg getransporteerd, waar het virus levenslang aanwezig blijft (latente fase). Het virus kan ook latent in het hoornvlies van het oog verblijven.¹¹ Indien na verloop van tijd de zenuwknopen beschadigd raken of

geactiveerd worden, bijvoorbeeld door stress, blootstelling aan UV licht of hormonale schommelingen, kan reactivatie van het virus optreden. Na reactivatie worden virusdeeltjes via de zenuwen naar de epitheelcellen terug getransporteerd, vindt er replicatie plaats, en worden de deeltjes tijdens de lytische fase uitgescheiden.⁴

3. Beschrijving van de genetisch gemodificeerde HHV-1 vector

De aanvrager geeft aan dat het genoom van de gg-HHV-1 vector uit een bacterieel standaard plasmide ('amplicon') bestaat waarin het 'origin of replication S' (*oriS*) en packaging/cleavage signaal (*pac*) van HHV-1 is ingebracht. Daarnaast zijn er verschillende transgene expressiecassettes in gekloneerd, die coderen voor optogenetische sensoren en actuatoren, en fluorescerende eiwitmarkers. De aanvrager stelt dat de expressiecassettes geen sequentie-overlap vertonen met HHV-1.

De amplicons worden met behulp van het zogenaamde '5dl1.2/2-2 vectorsysteem' ingepakt in de manteleiwitten van HHV-1. Bij dit vectorsysteem wordt gebruik gemaakt van het helpervirus '5dl1.2' en de complementerende productiecellijn '2-2'.^{5,12,13,14,15} Helpervirus '5dl1.2' is een deletiemutant van HHV-1. Het virus mist 1,2 kbp van het *ICP27* gen waardoor het replicatiedeficiënt is.^{12,16} Productie van '5dl1.2' vindt plaats op de op Vero-cellen gebaseerde cellijn '2-2', die het *ICP27* gen *in trans* tot expressie brengt.^{14,15} Wanneer cellijn '2-2' met '5dl1.2' en de hierboven beschreven amplicons getransfecteerd wordt, zullen er amplicon bevattende HHV-1 vectordeeltjes en nieuw '5dl1.2' helpervirus worden gegenereerd.

4. Voorgenomen werkzaamheden

4.1 Stereotactische injecties in hersenen van muizen en ratten

De aanvrager is van plan om onder DM-II inperking $7,5 \times 10^5$ gg-HHV-1 amplicon-vectordeeltjes door middel van een stereotactische injectie in de hersenen van onder narcose gebrachte ratten en muizen toe te dienen. De aanvrager geeft aan dat de naalden die hiervoor gebruikt zullen worden, niet door handschoenen heen kunnen prikken omdat ze bewust bot gemaakt zijn. Na injectie wordt de injectieopening volledig afgesloten en zullen de dieren minimaal drie weken onder DM-II inperking in een filtertopkooi worden geplaatst.

4.2 Prepareren en analyse hersenweefsel

Na minimaal drie weken worden de dieren geëuthanaseerd, en zullen de hersenen worden geïsoleerd en geprepareerd. Een deel van de hersenen zal in fixatief worden ondergedompeld om coupes te snijden, die vervolgens met behulp van een fluorescentiemicroscoop zullen worden geanalyseerd. Een ander deel van de hersenen zal in 'artificial cerebrospinal fluid' (ACSF) worden ondergedompeld, in coupes worden gesneden en in ACSF bij kamertemperatuur worden bewaard.

Voor het meten van de elektrische activiteit zal een in ACSF ondergedompelde coupe naar de meetopstelling vervoerd worden en daar in een badje worden geplaatst. Vervolgens zullen m.b.v. microscoopobjectieven die boven het badje aanwezig zijn, fluorescerende hersencellen op een computerscherm worden gevisualiseerd en met behulp van elektrodes worden aangeprikt. De elektrodes bevinden zich in een glazen pipet die door middel van micromanipulators op de juiste plek

worden gebracht. De te gebruiken pipet bevindt zich in een afgesloten injectiespuit. Na het aanbrengen van de elektrodes zal de elektrische activiteit in de cellen worden gemeten.

Omdat de stereotactische injecties en elektrofysiologische metingen precieze handelingen betreffen, is het van belang dat deze op een absoluut trillingvrije ondergrond plaatsvinden. De aanvrager verzoekt daarom de injecties op DM-II niveau buiten een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II kabinet), en de elektrofysiologische metingen op ML-I niveau uit te mogen uitvoeren. De aanvrager geeft aan dat tijdens deze handelingen handschoenen en een mond/neuskapje gedragen zullen worden.

5. Overwegingen en advies

5.1 Gg-HHV-1 vectorbatch

In de vectorbatch zijn amplicon bevattende vectordeeltjes aanwezig. Deze amplicons bevatten de *oriS* en *pac* sequenties van HHV-1 en worden omhuld door de mantel eiwitten van dit virus. De COGEM merkt op dat deze gg-vectordeeltjes geen van HHV-1 afkomstige coderende gensequenties bezitten, waardoor ze niet kunnen repliceren. De COGEM is daarom van oordeel dat de gg-vectordeeltjes replicatiedeficiënt zijn.

In de vectorbatch is ook helpervirus '5dl1.2' aanwezig. Dit virus mist een deel van het *ICP27* gen waardoor het niet in staat is het *ICP27* eiwit te produceren en de virale DNA-replicatie te initiëren. De COGEM is van oordeel dat ook helpervirus '5dl1.2' replicatiedeficiënt is.

De aanvrager geeft aan dat al gedurende 20 jaar elke vectorbatch op de aanwezigheid van replicatiecompetent HHV-1 wordt getest. Daartoe worden standaard Vero-cellen, die geen *ICP27* tot expressie brengen, met de vectorbatch geïnfecteerd. Hierbij is nooit lysis van de cellen opgetreden. Tevens stelt de aanvrager dat tijdens de productie van de gg-amplicon-vectordeeltjes nog nooit lysis van de '2-2' productiecellijn is waargenomen. Op basis van deze waarnemingen stelt de aanvrager dat er tijdens de productie van de gg-HHV-1 vectordeeltjes geen replicatiecompetent HHV-1 wordt gegenereerd. Tenslotte stelt de aanvrager dat onderzoekers, die aan proefdieren vergelijkbare op HHV-1 gebaseerde amplicon-vectorbatches hebben toegediend, nog nooit verschijnselen van virale encefalitis hebben waargenomen.

De COGEM wijst er op dat de aanvrager geen sequentie-informatie aanlevert over de deletie in helpervirus '5dl1.2' en de coderende *ICP27* sequentie in complementerende cellijn '2-2'. Indien in beide sequenties overlappende delen aanwezig zijn, kan er tijdens de productie van de vectorbatch door middel van homologe recombinatie replicatiecompetent HHV-1 ontstaan. Ook geeft de aanvrager niet aan wat de detectielimiet of gevoeligheid van de test is waarmee wordt aangetoond dat de vectorbatch vrij is van replicatiecompetent HHV-1. De COGEM kan daarom niet verifiëren of de vectorbatch daadwerkelijk vrij is van replicatiecompetent HHV-1. Zij merkt op dat in de literatuur melding is gemaakt dat in 5dl1.2 helpervirus stocks een geringe hoeveelheid HHV-1 virusdeeltjes aanwezig was.¹²

Aanvullend merkt de COGEM op dat, omdat de ICP27 sequentie in cellijn '2-2' niet bekend is, niet vastgesteld kan worden of, in het geval dat er recombinatie optreedt, het replicatiecompetente HHV-1 identiek is aan wildtype HHV-1 of dat het gg-HHV-1 betreft.

Samenvattend is de COGEM van oordeel dat niet uitgesloten kan worden dat in de replicatiedeficiënte vectorbatch replicatiecompetent (gg-)HHV-1 (pathogeniteitsklasse 2) aanwezig is.

5.2 Inschaling werkzaamheden

De COGEM is van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden met de replicatiedeficiënte gg-HHV-1 vector op DM-I en ML-I (samengevat als inperkingsniveau I) uitgevoerd kunnen worden omdat de vectordeeltjes niet kunnen repliceren en zich niet kunnen verspreiden. Echter, op dit moment kan de COGEM niet volledig uitsluiten dat er replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de batch aanwezig is omdat de onderbouwing voor de afwezigheid hiervan ontbreekt. Zij heeft er daarom voor gekozen de inschaling van de werkzaamheden in de vorm van twee scenario's uit te werken.

5.2.1 De afwezigheid van replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de vectorbatch is wel onderbouwd

Indien de aanvrager met behulp van een gevalideerde methode heeft onderbouwd dat de vectorbatch vrij is van replicatiecompetent HHV-1, is de COGEM van oordeel dat alle voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau I kunnen plaatsvinden.

Na drie weken wil de aanvrager van het hersenweefsel van de ratten en muizen coupes snijden, en deze microscopisch analyseren of aan elektrofysiologische metingen onderwerpen. De aanvrager stelt dat, op basis van literatuurgegevens over de halfwaardetijd van wildtype HHV-1 in neuronaal weefsel, de halfwaardetijd van de replicatiedeficiënte gg-vectordeeltjes tijdens het voorgenomen experiment ongeveer drie dagen is.^{17,18} Na drie weken (7 halfwaardetijden) zullen volgens de aanvrager naar schatting nog $5,9 \times 10^3$ ($7,5 \times 10^5 \times 0,5^7$) vectordeeltjes in het hersenweefsel aanwezig zijn.

De gg-virale vectordeeltjes zijn niet aerogeen overdraagbaar, maar kunnen wel via (in)direct contact slijmvliesen, ogen of beschadigde huid infecteren. Na infectie van de cel zullen de deeltjes worden uitgekapt, maar niet repliceren. De COGEM kan niet uitsluiten dat de medewerker tijdens de voorgenomen handelingen (injecties, prepareren hersenen en coupes, microscopische analyses), aan de gg-vectordeeltjes blootgesteld wordt. Zij signaleert dat dit een ARBO- aspect is die vraagt om het treffen van veiligheidsmaatregelen, zoals het dragen van handschoenen, een beschermende bril en een daartoe geëigend mond/neuskapje.

5.2.2 De afwezigheid van replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de vectorbatch is niet onderbouwd

Indien de aanvrager niet met behulp van een gevalideerde methode heeft onderbouwd dat de vectorbatch vrij is van replicatiecompetent (gg-)HHV-1, adviseert de COGEM alle handelingen met de vectorbatch op inperkingsniveau II (ML-II, DM-II) uit te voeren. Handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan, zoals tijdens het vullen van de spuiten ten behoeve van de stereotactische injecties, adviseert de COGEM in een VK-II kabinet uit te voeren. Ten einde besmetting van de medewerker via

beschadigingen van de huid te voorkomen, adviseert zij tijdens deze handelingen handschoenen te dragen.

De aanvrager verzoekt de stereotactische injecties bij de ratten en muizen buiten een VK-II kabinet uit te mogen voeren. HHV-1 is niet aerogeen overdraagbaar. Indien tijdens het toedienen van de injectie geen aërosolen kunnen ontstaan, is de COGEM van oordeel dat deze handeling, conform 9.1.6.2.2.r van Bijlage 9 Regeling GGO,¹⁹ buiten een VK-II kabinet kan plaatsvinden. Ten einde via (in)direct contact infectie van de medewerker te voorkomen, adviseert zij tijdens deze handeling handschoenen, een daartoe geëigend mond/neuskapje en een beschermende bril te dragen. Na toediening van de injecties dienen de dieren in een filtertopkooi teruggeplaatst te worden.

Na drie weken wil de aanvrager van het hersenweefsel van de ratten en muizen coupes snijden, en deze microscopisch analyseren of aan elektrofysiologische metingen onderwerpen. De COGEM merkt op dat, indien in de vectorbatch replicatiecompetent (gg-)HHV-1 aanwezig was, de mogelijkheid bestaat dat er virusreproductie heeft plaatsgevonden en de dieren ziek zijn geworden met waarschijnlijk fatale gevolgen, bijvoorbeeld in de vorm van encefalitis. Zij is daarom van oordeel dat bij aan herpes gerelateerde ziekteverschijnselen of overlijden, het prepareren van de hersenen en hersencoupes, en de microscopische analyses hiervan, op DM-II niveau dienen plaats te vinden. Handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan, adviseert de COGEM in een VK-II kabinet uit te voeren. Ten einde besmetting van de medewerker te voorkomen adviseert zij hierbij handschoenen te dragen.

Indien tijdens de werkzaamheden geen aërosolen kunnen ontstaan, is de COGEM van oordeel dat deze handelingen, conform 9.1.6.2.2.r van Bijlage 9 Regeling GGO,¹⁹ buiten een VK-II kabinet kunnen plaatsvinden. Ten einde besmetting van de medewerker te voorkomen adviseert zij in dat geval handschoenen, een daartoe geëigend mond/neuskapje en een beschermende bril te dragen.

Indien de dieren na drie weken geen (fatale) ziekteverschijnselen vertonen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er in de dieren replicatiecompetent (gg-)HHV-1 aanwezig is. Zij adviseert in dat geval de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau I uit te voeren. De COGEM merkt op dat er mogelijk nog replicatiedeficiënt gg-HHV-1 aanwezig is waaraan de medewerker blootgesteld kan worden (zie 5.2.1). Zij signaleert dat dit een ARBO- aspect is die vraagt om het treffen van veiligheidsmaatregelen, zoals het dragen van handschoenen, een beschermende bril en een daartoe geëigend mond/neuskapje.

6. Samenvatting

De COGEM is van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden met de replicatiedeficiënte gg-HHV-1 vector op DM-I en ML-I uitgevoerd kunnen worden. Omdat zij op dit moment echter niet kan uitsluiten dat er replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de batch aanwezig is omdat de onderbouwing hiervoor ontbreekt, heeft zij haar advies over de inschaling van de werkzaamheden in de vorm van twee scenario's uitgewerkt.

Indien de afwezigheid van replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de vectorbatch wel door middel van een gevalideerde methode is bevestigd, adviseert de COGEM om alle voorgenomen werkzaamheden

(stereotactische injecties, prepareren hersenen en coupes, microscopische analyses) op inperkingsniveau I (ML-I, DM-I) uit te voeren. De COGEM signaleert dat er mogelijk nog replicatiedeficiënt gg-HHV-1 aanwezig is waaraan de medewerker blootgesteld kan worden. Zij beschouwt dit een ARBO- aspect die vraagt om het treffen van veiligheidsmaatregelen, zoals het dragen van handschoenen, een beschermende bril en een daartoe geëigend mond/neuskapje.

Indien de afwezigheid van replicatiecompetent (gg-)HHV-1 in de vectorbatch *niet* door middel van een gevalideerde methode is bevestigd, adviseert de COGEM alle handelingen met de vectorbatch op inperkingsniveau II (ML-II, DM-II) uit te voeren. Handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan, adviseert de COGEM in een VK-II kabinet uit te voeren. Tevens adviseert zij daarbij handschoenen te dragen ten einde infectie van de medewerker door middel van contacttransmissie te voorkomen.

Als tijdens het toedienen van de stereotactische injectie geen aërosolen kunnen ontstaan, is de COGEM van oordeel dat deze handeling buiten een VK-II kabinet kan plaatsvinden. Ten einde infectie van de medewerker door middel van contacttransmissie te voorkomen, adviseert zij hierbij handschoenen, een mond/neuskapje en een beschermende bril te dragen. Na toediening van de injecties dienen de dieren in een filtertopkooi teruggeplaatst te worden.

Indien de dieren drie weken na de injecties *geen* (fatale) ziekteverschijnselen vertonen, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden (prepareren hersenen en coupes, microscopische analyses) op inperkingsniveau I uit te voeren. De COGEM signaleert dat er mogelijk nog replicatiedeficiënt gg-HHV-1 aanwezig is waaraan de medewerker blootgesteld kan worden. Zij beschouwt dit een ARBO- aspect die vraagt om het treffen van veiligheidsmaatregelen, zoals het dragen van handschoenen, een beschermende bril en een daartoe geëigend mond/neuskapje.

Indien de dieren drie weken na de injecties *wel* aan herpes gerelateerde (fatale) ziekteverschijnselen vertonen, adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden (prepareren hersenen en coupes, microscopische analyses) op inperkingsniveau II uit te voeren. Handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan, adviseert de COGEM in een VK-II kabinet uit te voeren. Tevens adviseert zij daarbij handschoenen te dragen ten einde infectie van de medewerker door middel van contacttransmissie te voorkomen. Handelingen waarbij geen aerosolen kunnen ontstaan, kunnen naar het oordeel van de COGEM buiten een VK-II kabinet plaatsvinden. Zij adviseert hierbij handschoenen, een mond/neuskapje en een beschermende bril te dragen ten einde infectie van de medewerker door middel van contacttransmissie te voorkomen.

Onder inachtneming van hierboven genoemde inperkingsniveaus en werkvoorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03

2. International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 14 februari 2019)
3. Pellet PE & Roizman B (2013). *Herpesviridae*. In: Fields Virology 6th edition. Ed. Knipe MD and Howley PM, Lippincott Williams And Wilkins, Philadelphia: 1803-1822
4. Roizman B *et al.* (2013). Herpes simplex viruses. In: Fields Virology 6th edition. Ed. Knipe MD and Howley PM, Lippincott Williams And Wilkins, Philadelphia: 1823-1893
5. Neve RL (2012). Overview of gene delivery into cells using HHV-1-based vectors. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 4: Unit 4.12.1-4.12.7
6. Muylaert I *et al.* (2011). Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. J. Biol. Chem. 286: 15619-15624
7. Kwon MS *et al.* (2018). Dendritic cells in the cornea during Herpes simplex viral infection and inflammation. Surv. Ophthalmol. 63: 565-578
8. Webre JM *et al.* (2012). Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. J. Biomed. Biotechnol. doi:10.1155/2012/612316
9. Bergström T *et al.* (1991). Discrimination of herpes simplex virus types 1 and 2 cerebral infections in a rat model. Acta Neuropathol.82: 395 - 401
10. Kollia CM *et al.* (2015), Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis. J. Neurovirol. 21: 8-23
11. Kennedy DP *et al.* (2011). Ocular herpes simplex virus type 1: is the cornea a reservoir for viral latency or a fast pit stop? Cornea 30: 251-259
12. Lim F *et al.* (1996). Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. BioTechniques 20: 460-469
13. Neve RL & Lim F (2013). Generation of high-titer defective HHV-1 vectors. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 4: Unit 4.13. doi: 10.1002/0471142301.ns0413s62
14. Sekulovich RE *et al.* (1988). The Herpes simplex virus type 1 α protein ICP27 can act as a *trans*-repressor or a *trans*-activator in combination with ICP4 and ICP0. J. Virol. 62: 4510-4522
15. Smith IL *et al.* (1992). Evidence that the Herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. Virol. 186: 74-86
16. McCarthy AM *et al.* (1989). Herpes simplex type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. J. Virol. 63: 18-27
17. Arthur JL *et al.* (2001). Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons *in vitro*. J. Virol. 75: 3885-3895
18. Johnson AJ *et al.* (2008). Effector CD4 + T-Cell involvement in clearance of infectious Herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. J. Virol. 82: 9678-9688
19. Regeling genetisch gemodificeerde organismen (GGO) milieubeheer (2013). <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-01-01/#Bijlage9> (bezoekt: 20 februari 2019)