

Advies betreffende: **Genetische modificatie van coronavirussen door middel van gerichte homologe RNA recombinitie**

Kennisgever: **Universiteit Utrecht**

COGEM kenmerk
CGM/010724-02

BGGO nummer
GGO 01-080

Datum advies
24 juli 2001

Inleiding

De aanvrager wil d.m.v. het aanbrengen van gerichte mutaties de rol van afzonderlijke virale genen bij de replicatie, assemblage en virus-cel en virus-gastheer interacties van coronavirussen bestuderen. Hiertoe zullen modificaties worden aangebracht in het muizen hepatitis virus (MHV) en het feline infectieuze peritonitis virus (FIPV). De te genereren mutante virussen zullen zowel in vitro (celkweek) als in vivo (immunisatie studies in proefdieren) worden gekarakteriseerd.

Coronavirussen zijn positief-strengige membraanbevattende RNA virussen. De meeste coronavirussen zijn gastheer-specifiek of zijn in staat een aantal nauw gerelateerde gastheersoorten te infecteren.

De in het onderzoek te gebruiken virussen MHV en FIPV behoren tot de pathogeniteitsklasse 2 en veroorzaken systemische en enterale infecties in respectievelijk muis en kat. MHV is niet infectieus of pathogeen voor de mens of andere diersoorten. Natuurlijke infecties van FIPV komen ook niet bij de mens of andere diersoorten voor. Onder experimentele condities is FIPV echter ook infectieus (maar niet pathogeen) voor hond en varken. Het genoom van de bovengenoemde coronavirussen codeert voor een drietal structurele eiwitten en een aantal niet-structurele eiwitten die een rol spelen bij de replicatie, infectiviteit en virus-gastheer interacties. Voor MHV en FIPV is het spike S eiwit verantwoordelijk voor interactie met en specificiteit voor de gastheercel (tropisme).

Het systeem om recombinant virussen te genereren berust op homologe recombinitie tussen een synthetisch co-replicerend donor RNA en acceptor doelwit recombinant coronavirus. In het geval van MHV wordt een acceptorvirus (fMHV) gebruikt dat een chimeer S eiwit tot expressie brengt, waarvan het ectodomein (celreceptor-bindende gedeelte) afkomstig is van FIPV. Hierdoor repliceert fMHV uitsluitend in kattencellen. Beoogde mutaties/deleties/positionele wisselingen van autologe virale genen en additie van heterologe markergenen worden in het acceptorvirus geïntroduceerd via donor RNA transcrip-ten afkomstig van gemodificeerde expressieconstructen. Electroporatie van dergelijke transcripten in met fMHV geïnfecteerde kattencellen zal leiden tot homologe recombinitie tussen donor RNA en fMHV genoom RNA (acceptor) waardoor de gewenste veranderingen in het genoom RNA worden geïntroduceerd. Donor RNA bevat tevens het oorspronkelijke S gen met specificiteit voor uitsluitend muizencellen. Hierdoor kan selectie van beoogde recombinant MHV virussen in muizencellen plaatsvinden.

Analoog hieraan zal dit systeem (vice-versa) ook voor FIPV worden toegepast, gebruikmakende van een acceptorvirus mFIPV met een chimeer S eiwit specifiek voor muizencellen met uiteinde-lijke selectie van de recombinant FIPV virussen in kattencellen.

Mutant MHV en FIPV virussen met het oorspronkelijke ongewijzigde tropisme zullen uiteindelijk ook in immunisatie experimenten met muis en kat gebruikt worden.

Overweging

In deze kennisgeving is sprake van het genereren van mutanten van MHV en FIPV door respectievelijk gebruik te maken van de acceptorstam fMHV, al dan niet met additionele deletie van het 2a en HE gen, en mFIPV. Het gaat hierbij om een uitwisseling van sequenties van MHV stammen onderling of van FIPV stammen onderling, en niet om uitwisseling van MHV sequenties met FIPV sequenties. De uiteindelijke recombinanten hebben hierdoor hetzelfde gastheertropisme als de originele MHV en FIPV stammen. De fMHV en mFIPV stammen (met het reciproce tropisme) worden slechts als middel gebruikt om de selectie van nieuwe recombinanten mogelijk te maken in respectievelijk muizen- dan wel katten-cellijnen.

Het gaat hier om werkzaamheden met virussen van de pathogeniteitsklasse 2. Transmissie vindt aerogeen of oro-faecaal plaats. Het gastheerbereik van de te gebruiken virussen wordt primair bepaald door het S eiwit. De aanvrager geeft aan dat mutaties in het S gen, waardoor het gastheerbereik van MHV of FIPV zou kunnen veranderen, niet worden beoogd (met uitzondering van de oorspronkelijke vervaardiging van fMHV, al dan niet met additionele deletie van het 2a en HE gen, en mFIPV). Alle te genereren recombinant virussen zijn dus nog steeds replicatie-competent met de mogelijkheid tot verspreiding en dienen daarom nog steeds als pathogeen te worden beschouwd. Overigens bestaat de verwachting dat alle beoogde mutanten geattenuëerd zullen zijn ten opzichte van het oudervirus en een verminderde virulentie of pathogeniteit zullen vertonen, maar dit is niet onderbouwd met experimentele gegevens.

Inschaling

Op basis van het onderbrengen van coronavirussen in pathogeniteitsklasse 2 komt de COGEM tot een VMT inschaling voor het kloneren van genen coderend voor structurele en niet-structurele eiwitten en afgeleiden daarvan in *Escherichia coli* (artikel 5.2.g van de Regeling¹). Kloneringen van gemuteerde spike (S) genen van MHV en FIPV zijn echter uitgezonderd.

Aangezien de mogelijkheid van het ontstaan van autonoom replicerend virus ten gevolge van het inbrengen van virale sequenties in zoogdiercellen bestaat, komt de COGEM voor de constructie van acceptor genoom RNA en het genereren van genetisch gemodificeerde muizen hepatitis virussen of feline coronavirussen tot een inschaling op C-I niveau (artikel 5.5.6.g van de Regeling¹). Voor al deze in vitro experimenten dienen de onderzoekers de volgende aanvullende voorschriften op te volgen:

- alle handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden

- tijdens de handelingen dienen handschoenen gedragen te worden.

Voor de handelingen met bloed, cellen en weefsels van proefdieren die zijn gebruikt voor vaccinatieexperimenten met met genetisch gemodificeerde hepatitis virussen en feline coronavirussen komt de COGEM eveneens tot een inschaling op C-I niveau (artikel 6.5.6.b van de Regeling)¹. Hierbij dienen de bovengenoemde aanvullende voorschriften eveneens in acht genomen te worden.

Voor de immunisatie (in vivo) van muizen met genetisch gemodificeerde muizen hepatitis virussen is de COGEM van mening dat inschaling volgens artikel 6.8.2.b van de Regeling¹ (D-II) dient plaats te vinden. Er wordt een inschaling gegeven voor een volvirulent MHV.

Om de verspreiding van het MHV virus verder in te perken in verband met de bovengenoemde transmissie route dienen de onderzoekers hierbij de volgende aanvullende voorschriften op te volgen:

- de dieren worden gehuisvest in filteropkooien;
- open handelingen, waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden, waarbij handschoenen gedragen moeten worden;
- materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde micro-organismen wordt gesteriliseerd of ontsmet met een gevalideerde methode voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd;
- dieren worden na afloop van het experiment gedood en verpakt in een plastic zak en worden in afgesloten vaten afgevoerd. De afgevoerde kadavers moeten worden gesteriliseerd (middels een gevalideerd proces) of verbrand.

Voor de immunisatie (in vivo) van katten met genetisch gemodificeerde coronavirussen is de COGEM van mening dat inschaling volgens artikel 6.8.2.b van de Regeling¹ (D-II) dient plaats te vinden. Er wordt een inschaling gegeven voor een volvirulent FIPV.

Om de verspreiding van het FIPV virus verder in te perken in verband met de bovengenoemde transmissie route dienen de onderzoekers hierbij de volgende aanvullende voorschriften op te volgen:

- de dieren worden gehuisvest in klassieke kooien;
- er wordt één experiment per vertrek uitgevoerd;
- verzorgers dienen handschoenen en mondkapje te dragen;
- materiaal dat in aanraking is geweest met genetisch gemodificeerde micro-organismen wordt gesteriliseerd of ontsmet met een gevalideerde methode voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd;
- dieren worden na afloop van het experiment gedood en verpakt in een plastic zak, waarna de verpakte kadavers tenslotte in afgesloten vaten worden afgevoerd. De afgevoerde kadavers moeten (middels een gevalideerd proces) worden gesteriliseerd of verbrand.

¹ Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998)