

Advies betreffende: **Manipulatie van signaaltransductie in de hersenen**

Kennisgever: **Universitair Medisch Centrum Utrecht**

COGEM kenmerk  
**CGM/020319-01**

BGGO nummer  
**GGO 00-114/1**

Datum advies  
**19 maart 2002**

## **Inleiding**

Het onderzoek betreft het ontrafelen van de functie van eiwitten bij de signaaloverdracht in de hersenen. Voor het onderzoek wordt gebruik gemaakt van een rattenmodel voor gedragsstudies waarin functies van eiwitten betrokken bij de signaaltransductie in de hersenen worden onderzocht. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een AAV (adeno-associated virus) type 2 vector om de geïsoleerde genen tot expressie te brengen. Voor de productie van de recombinant AAV deeltjes wordt gebruik gemaakt van het plasmide pSSV9. Dit plasmide bevat onder andere de inverted terminal repeats (ITR's) en de tot expressie te brengen genen welke onder controle staan van de CMV promotor. Deze vector wordt samen met een packaging/helperplasmide (pDG), die de vector in trans voorziet van de voor de productie benodigde complementerende AAV rep en cap genen en adenovirus type 5 helper functies (VA, E2A en E4), getransfecteerd in 293 HEK cellen. Dit resulteert in de productie van helpervirus-vrije stocks van recombinant AAV deeltjes.

## **Overwegingen en advies**

### Injectie van AAV deeltjes in de hersenen

Injectie van de AAV deeltjes in de hersenen van de ratten, geschiedt onder de microscoop in een veiligheidskabinet klasse II (VKII). Hierbij wordt door de aanvrager aangegeven dat de injectie onder de microscoop in een VKII lastig is en aanleiding geeft op een verhoogd risico op prikaccidenten. Om deze reden stelt de aanvrager voor om in een C-I laboratorium de injectiespuit te vullen en deze te vervoeren naar een D-II verblijf waar vervolgens de injectie in de hersenen buiten het VK-II onder de microscoop wordt uitgevoerd. De plaats van injectie zal dan afgenomen worden met 70% alcohol en vervolgens worden gesloten. De ruimte zal tijdens de handelingen gesloten blijven.

De COGEM acht het niet correct te veronderstellen dat aërosol vorming en verspreiding geheel voorkomen kunnen worden. In de context van het aangevraagde experiment acht de COGEM het, gezien de aard van de te gebruiken vectoren, onwaarschijnlijk dat er een reëel gevaar kan ontstaan voor mens en milieu.

De rAAV partikels worden geproduceerd door middel van transfectie met plasmide DNA, waarbij de AAV functies over twee plasmiden zijn verdeeld, en waarbij afdoende voorzorgen zijn genomen tegen het optreden van recombinatie. De mogelijkheid van optreden van recombinatie leidt in andere AAV productiesystemen tot de vorming tot de

vorming van AAV partikels die normaal kunnen repliceren, 'rcAAV'. In dit systeem is de vorming van rcAAV echter uitgesloten. Het is niet uit te sluiten dat de HEK 293 cellen besmet worden met adenovirussen door een medewerker met een verkoudheid. Ook adenovirussen kunnen optreden als helpervirus bij de productie van een rcAAV. Om het risico dat rcAAV ontstaat te beperken is het noodzakelijk de gebruikte cellen regelmatig op de aanwezigheid van diverse helpervirussen te testen.

Concluderend komt de COGEM tot een positief advies betreffende de injectie in de hersenen buiten een VKII gezien de verwaarloosbare kans op replicatie van de vector. Om de kans op het ontstaan van een rcAAV tot het minimum te beperken merkt de COGEM op dat de werkzaamheden zorgvuldig uitgevoerd dienen te worden. Aërosol vorming moet zoveel mogelijk worden beperkt. Gedurende de werkzaamheden dienen de medewerkers een neus- en mondkapje te dragen. De ratten moeten direct na toediening in een filtertopkooi worden geplaatst. Tot slot de D-II ruimte dient gedurende de handelingen afgesloten te worden.

#### Huisvesting op D-I

De aanvrager verzoekt om de ratten één week na inspuiting te huisvesten in een D-I verblijf. Om dit verzoek te ondersteunen levert de aanvrager een risicoanalyse aangaande de aanwezigheid van de vorming van replicatie-competent AAV (rcAAV). De aanvrager geeft aan dat voor de productie van recombinant AAV (rAAV) geen wildtype AAV en adenovirus wordt gebruikt. Er wordt vanuit gegaan dat zowel de productiecellen (HEK 293) als de te gebruiken ratten vrij zijn van wt AAV en adenovirus. De aanvrager geeft aan dat de kans op recombinatie/complementatie van rAAV en dus ook de kans op vermenigvuldiging en mobilisatie van rAAV in de rat verwaarloosbaar zal zijn. Ook wordt aangegeven dat transneuraal transport van rAAV nooit is waargenomen en dat infectie van de hersenen met rAAV beperkt blijft rond het gebied van de injectie. De aanvragers tonen middels een PCR aan dat 3 dagen na intracerebrale toediening van 2.108 rAAV deeltjes geen rAAV gedetecteerd wordt in het serum van ratten. Tot op heden worden de beschreven handelingen met AAV in associatie met kleine proefdieren, waaronder ratten, vergund onder D-II condities met diverse aanvullende voorschriften.

De COGEM is van mening dat de toegepaste PCR voldoende aannemelijk maakt dat de hoeveelheid vector die een week na injectie nog in de ratten circuleert minimaal zal zijn. De vector is niet replicatiecompetent zodat er geen gevaar bestaat voor de productie van een replicatiecompetent virus. Zelfs al zou de vector worden uitgescheiden dan nog acht de COGEM het risico te verwaarlozen.