

Advies betreffende: **Bovine Spongieuze Encephalopathie/Scrapie; clonering en expressie van PrP genen afkomstig van varken, rund en schaap in muis.**

Kennisgever: **Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Centraal Instituut voor Dierziekte Controle - Lelystad**

COGEM kenmerk
CGM/040212-03

BGGO nummer
GGO 94-131/2

Datum advies
12 februari 2004

Inleiding

De onderhavige aanvraag betreft een wijzigingsverzoek op de bestaande vergunning GGO 94-131/2. De wijziging betreft de toevoeging van handelingen met transgene muizen die voorzien zijn van 'Prion Protein' (PrP) genen van schaap, rund en varken. PrP-eiwitten worden geassocieerd met de verschillende vormen van spongieuze encephalopathieën (SE) zoals scrapies bij schapen en BSE bij koeien. De transgene muizen zullen geïnfecteerd worden met spongieuze encephalopathieën (SE) preparaten om de conversie van het niet-pathogene PrP^C-eiwit naar het pathogene PrP^{Sc}-eiwit te bewerkstelligen en het ziekteverloop te bestuderen.

De COGEM is verzocht een beschouwing te geven met betrekking tot bovengenoemde conversie en te beoordelen of de voorgestelde aanvullende voorschriften voldoende bescherming bieden voor mens en milieu.

Overdraagbare spongieuze encephalopathieën (TSE's) zijn fatale neurale aandoeningen die zowel bij mens als dier voorkomen. De meest bekende vormen zijn de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (CJD), Gertsman-Sträussler-Scheinker syndroom (GSS) en Koeroe bij de mens, scrapie in schapen en geiten, en bovine spongieuze encephalopathie (BSE) in runderen (1). De ziekte kenmerkt zich door de aanwezigheid van zeer stabiele protease-resistente eiwitten in de hersencellen. Deze zogeheten 'prion (van proteinaceous infectious) proteïnes' of PrP^{Sc}-eiwitten, (waarbij sc verwijst naar scrapie), hopen zich op in hersencellen. Uiteindelijk leidt de ziekte tot afbraak van de hersenen. Door de vacuoles die in de neuronen ontstaan vertonen aangetaste hersenen enige gelijkenis met sponzen, vanwaar de naam spongieuze encephalopathie (2). Op dit moment is therapeutische interventie niet mogelijk en heeft deze ziekte altijd een fatale afloop.

De precursor van het PrP^{Sc}-eiwit is een eiwit dat ook in gezonde dieren in cellen van onder andere het zenuwstelsel wordt aangetroffen. Dit eiwit dat PrP^C wordt genoemd (waarbij de c voor cellulair staat), wordt door de gastheer zelf gecodeerd en aangemaakt. Over de cellulaire functie van het PrP^C is weinig bekend (3), maar het eiwit komt algemeen voor in zoogdieren. Muizen waarbij het gen is geblokkeerd of verwijderd, zogeheten 'knock-out' muizen, ontwikkelen zich normaal (4). Slechts kleine afwijkingen ten opzichte van de wildtype muizen, waaronder een verhoogde gevoeligheid voor stress, lijken toe te schrijven aan deze deficiëntie (5).

Conversie van PrP^c naar PrP^{sc}

In geïnfecteerde hersenen vindt omzetting van het niet-pathogeen PrP^c-eiwit naar het PrP^{sc}-eiwit plaats. Welke fysische of biochemische veranderingen ten grondslag liggen aan deze conversie zijn nog onduidelijk (3). De aminozuurvolgorde van PrP^c en PrP^{sc} zijn identiek. Dit betekent dat PrP^{sc} wordt gevormd door een post-translationeel proces waarbij de conformatie van het al bestaande PrP^c-eiwit wordt aangepast. De tertiaire structuur van het eiwit wordt omgezet van de zogenaamde α -helix-structuur naar de β -structuur, die rijk is aan β -sheets (6).

De aanwezigheid van PrP^{sc}-eiwitten werkt katalyserend doordat PrP^{sc}-eiwitten de omzetting van PrP^c naar PrP^{sc}-eiwitten induceren (2). Door de verandering in conformatie van de tertiaire structuur worden de eiwitten resistent voor proteases, hierdoor worden de PrP^{sc}-eiwitten niet afgebroken en aggregeren de eiwitten in de cel. Afsterving van de cel leidt uiteindelijk tot het ontstaan van plagues op de hersenen.

Doorkruisen van soortbarrière

Voor muizen zijn thans geen prionziekten bekend. Echter het is mogelijk gebleken om muizen en hamsters te infecteren via experimentele overdracht door intracerebrale toediening of voeding van TSE's (afkomstig van koeien en schapen). Bij de overdracht van de ziekte is sprake van een soort- of speciesbarrière. De ziekte ontwikkelt zich veel langzamer in het geïnfecteerde dier dan in het oorspronkelijke dier waaruit het agens afkomstig is. De soortbarrière kan mogelijk verklaard worden uit het feit dat PrP^c-eiwitten van verschillende diersoorten kleine verschillen in aminozuursequenties vertonen (2). Door het gebruik van transgene hamsters en muizen kan deze soortbarrière worden omzeild waardoor deze dieren als proefmodel gebruikt kunnen worden om de ontwikkeling van de ziekte te bestuderen. Hierdoor hoeft minder gebruik gemaakt te worden van grote proefdieren zoals varkens, runderen en schapen. Hiertoe wordt in transgene muizen het PrP gen van rund of schaap ingebouwd. Aangezien het naast elkaar voorkomen van het muizen- en het transgene PrP-gen leidt tot verstoring van prionvorming en het ziektebeeld, worden in de transgene muizen de soorteigen PrP-genen uitgeschakeld (7,8).

Overwegingen

De aanvrager gaat gebruik maken van transgene muizen die voorzien zijn van 'prion proteïne' (PrP) genen van schaap, rund en varken. De transformatie van de muizen wordt niet uitgevoerd door de aanvrager. Hij maakt gebruik van geïmporteerde muizenstammen die voorzien zijn van de gewenste genen. Zolang de dieren niet met TSE-preparaten worden geïnfecteerd vormen deze transgene muizen geen risico voor hun omgeving. Het betreft hier PrP-genen waarvan de sequenties slechts gering afwijken van de sequentie van het muizen PrP-gen en de aard van het PrP-eiwit in zijn 'normale' cellulaire vorm is niet schadelijk. Alleen het ontsnappen van de transgene muizen en het verspreiden van het transgen in (wilde en laboratorium) muizenpopulaties dient voorkomen te worden. Hiervoor is het noodzakelijk dat de dieren in filtertopkooien in een afgesloten ruimte worden gehouden. De inrichtings- en werkvoorschriften behorende bij een D-I gesloten dierverblijf en het gebruik van filtertopkooien sluiten de mogelijkheid van ontsnapping uit.

De aanvrager is verder voornemens om de transgene muizen met spongieuze encephalopathieën (SE) preparaten te infecteren middels intracerebrale injectie teneinde

de conversie van het niet-pathogene PrP^c-eiwit naar het pathogene PrP^{Sc}-eiwit te bewerkstelligen en het ziekteverloop te bestuderen. De COGEM is van mening dat hiervan in principe de risico's vergelijkbaar zijn met infectie van niet-transgene muizen of andere dieren. Immers in beide gevallen zal de ziekte zich ontwikkelen, alleen in het geval van de onderhavige transgene muizen zal het ziektebeeld veel sneller verlopen dan bij infectie van wildtype muizen. De COGEM is van mening dat echter geenszins te verwachten is dat de ziekte die zich ontwikkelt in transgene muizen afwijkt in bijvoorbeeld besmettelijkheid vergeleken met de ziekte in rund of schaap. Immers het ontstane infectieuze agens is in elk van de gevallen hetzelfde, namelijk het runder of schapen PrP^{Sc}. Hierbij dient wel in acht genomen te worden dat het werken met muizen op zich grotere risico's met zich mee brengt omdat het risico van verwondingen door krabben of bijten groter is bij muizen dan bij handelingen met grote landbouwhuisdieren.

TSE's zijn niet aerogeen overdraagbaar. Ze kunnen echter via voeding of verwondingen worden overgedragen. Zo wordt de nieuwe variant van de ziekte van CJD toegeschreven aan het eten van met BSE-besmet rundvlees. Overdracht via voeding van scrapie naar de mens is nooit waargenomen. De soortbarrière lijkt echter doorbroken doordat BSE in runderen is ontstaan door het eten van meel waarin scrapie-geïnfecteerde schapen verwerkt zijn. Ook handelingen met besmet hersenweefsel kunnen overdracht teweegbrengen. Overdracht van CJD van mens op mens werd geconstateerd na gebruik van niet volledig gedesinfecteerde instrumenten bij hersenoperaties. Injecties van besmet hersenweefsel (scrapie en BSE) in de hersenen van muizen en hamsters leidden tot het ziektebeeld overeenkomstig een TSE-infectie.

Gezien de wegen waardoor besmetting met TSE's kan plaatsvinden, en de zeer ernstige gevolgen die een dergelijke besmetting met zich meebrengt, zijn goede maatregelen ter bescherming van de medewerker een vereiste.

De EC heeft richtlijnen opgesteld voor het werken met TSE's onder laboratoriumomstandigheden en in proefdieren (9). Ook in landen als de Verenigde Staten, Zwitserland en het Verenigd Koninkrijk zijn stringente regels opgesteld voor het werken met TSE's (10,11). In het algemeen worden TSE's ingedeeld als klasse drie pathogeen met uitzondering van scrapies (klasse 2). Als inperkingniveau voor het werken met TSE's in muizen onder laboratoriumomstandigheden wordt BSL2 met aanvullende voorschriften voorgeschreven (1,10,11). Van eventuele Nederlandse richtlijnen met betrekking tot het werken met TSE's is de COGEM niet op de hoogte. Gezien de wijze van verspreiding van het agens en het ernstige ziektebeeld is de COGEM van mening dat werkzaamheden met TSE's ook in de Nederlandse situatie onder BSL2 condities uitgevoerd dienen te worden. Handelingen waarbij met hoge concentraties aan agens wordt gewerkt, of ontleding van dieren plaatsvindt dienen derhalve in een veiligheidskabinet van klasse 2 te worden uitgevoerd (11). Voor handelingen met transgene muizen in associatie met TSE's is de COGEM van mening dat gezien het bovenstaande een inperkingniveau van DM-II aangehouden moet worden. Daarbij is de COGEM van mening dat een aantal aanvullende voorschriften in acht genomen dienen te worden betreffende de onderstaande punten.

Aanvullende maatregelen ter voorkoming van besmetting

Het infecteren van muizen middels intracerebrale injecties of orale of peritoneale toedieningen van SE-preparaten zijn risicovolle handelingen. Voldoende

voorzorgsmaatregelen zullen derhalve in acht genomen moeten worden om de medewerker te beschermen. De COGEM acht bij injectie-experimenten het gebruik van een dikke handschoen ter bescherming van een eventuele verwonding met de spuit vereist. Om eventuele opname via ingestie of via wondjes te voorkomen dienen spattende en aërosol genererende handelingen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse 2. De aanwezigheid van een spatruut maakt het gebruik van een mondkapje, veiligheidbril en / of gelaatsscherm hierbij overbodig. Hierbij merkt de COGEM op dat besmetting met TSE's via aërosolen tot voor zover bekend nooit plaats heeft gevonden.

Om het ziekteverloop te kunnen bestuderen is de aanvrager voornemens de geïnfecteerde muizen te ontleden. Gezien de kans op besmetting bij handelingen met besmet weefsels zullen ook deze handelingen met de grootst mogelijke voorzichtigheid moeten worden uitgevoerd. Met name handelingen met weefsel met verhoogde infectieusiteit zoals hersenen, ruggenmerg, lymfeweefsel en ogen verdienen een uiterst voorzichtige aanpak. Naast het uitvoeren van de werkzaamheden in een veiligheidskabinet klasse 2 zoals hierboven beschreven acht de COGEM het wenselijk het gebruik van scherpe gereedschappen zoveel mogelijk te vermijden en waar mogelijk gebruik te maken van disposables.

Inactiveren van prionen

Naast het gegeven dat de cel niet in staat is prionen af te breken blijkt ook buiten het organisme het inactiveren van het eiwit niet eenvoudig. Prionen zijn hittestabiel en autoclaveren onder normale condities, 30 minuten bij 121 °C blijkt niet afdoende. Muizen die geïnjecteerd werden met het op genoemde wijze geautoclaveerde TSE-agens vertoonden na enige tijd het ziektebeeld (12). Ook meerdere malen autoclaveren of het autoclaveren bij hogere temperaturen lijkt niet te volstaan. Daarnaast zijn prionen resistent tegen desinfectanten zoals alcohol en aceton maar ook tegen extreme detergentia zoals formaldehyde, HCl, H₂O₂ en fenolen (1). Behandelen met een Na-hypochloriet-oplossing (20.000 ppm) of een 2M NaOH-oplossing zorgt voor een sterk verminderde infectieusiteit, maar werkt niet volledig. De combinatie van de 2M NaOH-benadering met autoclaveren lijkt echter wel effectief. Hierbij is de duur van de 2M NaOH-behandeling niet van invloed, 30 minuten autoclaveren bij 121 °C direct na de NaOH-behandeling gaf resultaten eender aan incubatie gedurende een uur. Muizen geïnjecteerd met agens dat voornoemde behandeling had ondergaan ontwikkelden geen ziekteverschijnselen (12). De COGEM acht een dergelijke combinatie aan handelingen derhalve vereist. Gezien de onvolledige werking van 2M NaOH acht de COGEM het wenselijk dat waar mogelijk de werkplekken voorzien worden van materiaal, dat geautoclaveerd kan worden.

Conclusie en advies

De COGEM is van mening dat zolang de PrP-transgene muizen niet met TSE-preparaten worden geïnfecteerd deze muizen geen verhoogde risico vormen voor hun omgeving. Deze muizen kunnen op inperkingsniveau D-I gehuisvest worden, zonder dat de veiligheid voor mens en milieu in het geding is.

Voor handelingen met transgene muizen in associatie met TSE's is de COGEM van mening dat de ziekte die zich ontwikkelt in de transgene muizen niet afwijkt in aard van de ziekte zoals die zich ontwikkelt in de donordieren, rund en schaap. Dientengevolge is

de COGEM van mening dat bij het gebruik van transgene dieren geen additionele risico's voor mens en milieu optreden. Echter de COGEM wil opmerken dat aan het gebruik van (wildtype of transgene) muizen grotere risico's zijn verbonden dan bij grote proefdieren. De kans op verwonding van de laboratorium-medewerker of proefdierversorger door bijten of krabben is aanzienlijk hoger bij experimenten met muizen.

De COGEM is gezien het bovenstaande, en buitenlandse en Europese richtlijnen voor het werken met TSE's, van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn indien de voorgenomen experimenten (transgene muizen in associatie met TSE's), uitgevoerd worden in een DM-II dierverblijf, met in acht neming van de onderstaande aanvullende voorschriften:

- Spattende en aërosol genererende handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van 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 121 °C.
- 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.

Ethische en maatschappelijke signalering: prioninfectie-experimenten in transgene muis

Het onderzoek met transgene muizen waarbij typisch menselijke ziekten via een genetische 'humanisering' van de muis worden onderzocht, roept in de maatschappij ethische vragen op. Enerzijds worden er principiële bezwaren geuit tegen het aantasten van het muizengenoom door artificiële constructen of de vermenging met soortvreemde genen zoals in dit geval met genen van schaap, rund en varken. Anderzijds is de onbekendheid met het ontstaan van de ziekte van Creutzfeld-Jacob bij de mens een bron van speculatie, onzekerheid en angst bij de burger. Meer inzicht wordt door een ieder toegejuicht. Toch zet men vraagtekens bij de blijkbaar oneindige mogelijkheden om muizen te gebruiken als instrumenten om menselijke problemen op te lossen. Men vraagt zich af in hoeverre alles wat technisch mogelijk is, ook altijd moet worden uitgevoerd, temeer daar het aantal zieken en doden bij BSE ver onder de grens van weesgeneesmiddelen valt¹.

Voor al deze ethische vragen rond biotechnologische handelingen met dieren heeft de minister van LNV, op verzoek van het parlement, de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD) in het leven geroepen. De COGEM gaat er in het kader van deze onderhavige signalering van uit dat de CBD deze problematiek adequaat zal behandelen. Aangezien het hier geïmporteerde muizen betreft, en de aanvrager niet wettelijk verplicht is om deze bij de CBD aan te melden voor ethische toetsing, acht de COGEM het verstandig om de aanvragers aan te sporen gebruik te maken van de mogelijkheid tot vrijwillige toetsing.

1. In Europa wordt een ziekte zeldzaam genoemd, indien niet meer dan 5 op de 10.000 inwoners in de Europese Unie deze aandoening hebben. In de Verenigde Staten zijn deze aantallen iets anders (7-8 op de 10.000 inwoners). In Nederland is een ziekte zeldzaam wanneer maximaal ongeveer 8.000 patiënten deze aandoening hebben.

Referenties

- (1) Advisory Committee on Dangerous Pathogens and Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (1998). Transmissible spongiform encephalopathy agents: safe working and the prevention of infection.
- (2) Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95: 13363-13383.
- (3) Rheede, van, T., Smolemaars, M.M.W., Madsen, O., Jong, de, W.W. (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Molecular Biology and evolution* 20:111-121.
- (4) Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
- (5) Brown, D.R., Nicholas, R.S. and Canevari, L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *Journal of neuroscientific research* 15: 211-224.
- (6) Cohen, F.E. en Prusiner, S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annual review of biochemistry* 67: 793-819.
- (7) Vilotte, J., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D. and Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *Journal of Virology*, July 2000: 5977-5984.
- (8) Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. and Baron, T. (2001). Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *Journal of Virology*, 75: 5328-5334.
- (9) Richtlijn 200/54/EG van het Europees Parlement en de Raad. (2000). Betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk.
- (10) Swiss Expert Committee for Biosafety (CFSB) (1999). Statement of the Swiss Expert Committee for Biosafety on the classification of work using prion genes and prion proteins.
- (11) Office of Health and Safety (OHS) (1999). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 4th Edition.
- (12) Taylor, D.M., Fernie, K. and McConnell, I. (1997). Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Veterinary microbiology* 58:87-91.