

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 29 juli 2021
KENMERK CGM/210729-01
ONDERWERP Advies werkzaamheden met een ebolavirus-afgeleid minigenoomsysteem

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over een vergunningaanvraag (IG-108_2.8-000) met de titel 'Werkzaamheden met monocistronisch minigenoom systeem voor ebolavirus', ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningsaanvraag, met het verzoek om werkzaamheden met een van ebolavirus-afgeleid minigenoomsysteem op een lager inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

Ebolavirussen veroorzaken bij mensen koorts met interne bloedingen, wat de dood tot gevolg kan hebben. Werkzaamheden met ebolavirussen moeten uitgevoerd worden op het hoogste inperkingsniveau, niveau ML-IV. Onderzoek naar het ebolavirus kan worden uitgevoerd met een zogeheten minigenoomsysteem, waarin slechts een deel van het virusgenoom gebruikt wordt. In het ebolavirus minigenoomsysteem ontbreken drie van de zeven essentiële genen. De vier genen in het minigenoomsysteem coderen voor eiwitten die noodzakelijk zijn voor het produceren van viraal RNA. De drie ontbrekende genen zijn de zogenaamde structurele genen die nodig zijn voor het vormen van infectieuze virusdeeltjes.

De COGEM is van oordeel dat, mits er geen structurele genen worden toegevoegd aan het systeem en er gewerkt wordt met gastheercellen waarin geen ebolavirus of verwante virussen aanwezig zijn, er geen infectieus ebolavirus gevormd kan worden. Als er aan bovenstaande voorwaarden wordt voldaan, is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van werkzaamheden met het van ebolavirus-afgeleide minigenoomsysteem op inperkingsniveau ML-II, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



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. - Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Werkzaamheden met een ebolavirus-afgeleid minigenoomsysteem

COGEM advies CGM/210729-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren bij een vergunningaanvraag van de Universiteit Utrecht, voor de omlaagschaling van werkzaamheden met een van ebolavirus-afgeleid minigenoomsysteem. Ebolavirussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4, waardoor werkzaamheden volgens de Regeling ggo dienen plaats te vinden op inperkingsniveau ML-IV.¹ De onderhavige aanvraag betreft een verzoek voor de omlaagschaling van werkzaamheden met een van ebolavirus-afgeleid minigenoomsysteem op inperkingsniveau ML-II, in plaats van niveau ML-IV. Het onderzoek met dit systeem heeft als doel om met proteomics-technieken de reactie van getransfecteerde cellen op ebolavirus minigenoomreplicatie en transcriptie, te bestuderen. Daarnaast is de aanvrager voornemens om de samenstelling en structuur van 'ribonucleoproteïne' (RNP) complexen met massaspectrometrie en elektronenmicroscopie in kaart te brengen.

1.1 Ebolavirus

Ebolavirussen behoren tot het genus *Ebolavirus* en zijn onderverdeeld in zes soorten: *Bombali ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Bundibugyo ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* en *Zaire ebolavirus*.² Van deze zes ebolavirussen zijn de laatste vier ziekteverwekkend voor de mens.³ Ebolavirussen infecteren de mens en mensapen, maar ook vleermuizen en antilopen, en verspreiden zich via direct contact met geïnfecteerd bloed, andere lichaamsvloeistoffen of weefsel (bijv. vleesconsumptie van besmette wilde dieren).³ De virussen veroorzaken 'Ebola virus disease' (EDV) ofwel hemorrhagische koorts, waarbij interne bloedingen in het lichaam ontstaan en wat vaak leidt tot de dood.^{4,5} De grootste ebolavirus-uitbraak vond plaats in West Afrika in de periode van 2014 tot 2016, waarbij 11.310 mensen overleden.⁶

Ebolavirussen zijn negatiefstrengige RNA ((-)ssRNA) virussen met een lipidenmembraan. Het virale genoom is niet gesegmenteerd, ongeveer 19 kb groot en codeert voor zeven virale eiwitten: nucleoproteïne (NP), RNA-afhankelijk RNA polymerase factor (VP35), matrixeiwit (VP40), spike-glycoproteïne (GP_{1,2}), transcriptie-activator (VP30), secundair matrixeiwit (VP24) en RNA-afhankelijke RNA-polymerase (L).⁷ De virale genen zijn geflankeerd door zeer geconserveerde transcriptie start- en stopsignalen, waardoor bij transcriptie zeven monocistronische mRNA's geproduceerd worden die coderen voor de virale eiwitten.⁹ Het genoom bevat daarnaast aan de 5'- en 3'-uiteinden signalen voor de regulatie van genoomreplicatie en transcriptie, welke in ebolavirussen de 'leader' en 'trailer' sequenties worden genoemd.^{8,9}

Het NP eiwit bindt zich aan het virale genoom, en vormt samen met VP30, VP35 en L het 'nucleocapsid' of een 'ribonucleoproteïne' (RNP) complex.¹⁰ Met behulp van minigenoomsystemen afgeleid van ebolavirus en het verwante *Marburgvirus* (beiden behoren tot de familie *Filoviridae*), is aangetoond dat de drie eiwitten VP35, NP en L voldoende zijn voor virusreplicatie.^{8,9} Hierbij wordt verondersteld dat VP35 en L samen het actieve polymerasecomplex vormen.⁸ Het vierde eiwit in het

RNP complex, VP30, is niet essentieel voor replicatie maar wel voor de transcriptie van virale genen.^{8,9} De overige drie genen (VP40, VP24 en GP) zijn niet essentieel voor de replicatie of transcriptie van het virus, maar vervullen een rol bij het vormen van virusdeeltjes en infectie van gastheercellen. Het matrixeiwit VP40 bevindt zich aan de binnenkant van het virale membraan en is betrokken bij het 'budden' ofwel het vormen van de virale deeltjes met een lipidenmembraan vanuit de gastheercel.^{11,12} Het matrixeiwit VP24 werkt als antagonist van het type I interferon afweerrespons.^{13,14} Daarnaast zou VP24 ook betrokken zijn in de formatie van het RNP complex met de VP35 en NP eiwitten.^{15,16} Het spike-glycoproteïne (GP_{1,2}) bevindt zich in het lipidenmembraan aan het virus oppervlak en gaat een interactie aan met de gastheercel, om zo de gastheercel te infecteren.^{11,17} De gehele levenscyclus van ebolavirussen vindt plaats in het cytoplasma van de gastheercel.

1.2 Virale minigenoom systemen

Virale minigenoom- of minirepliconsystemen worden gebruikt als modelsystemen om de virale genoomreplicatie en transcriptie te kunnen bestuderen.¹⁸ Een minigenoom bestaat uit het virale genoom, waarin de eiwit-coderende sequenties zijn verwijderd of vervangen door een reporter gen. De niet-coderende regio's van het genoom die wel aanwezig zijn in een minigenoom, bevatten signalen die een essentiële rol spelen in replicatie en transcriptie, zoals de 'leader' en 'trailer' sequenties in het ebolavirusgenoom.¹⁸ Daarnaast worden essentiële virale genen op aparte plasmiden tot expressie gebracht, hierbij kunnen de genen voor structurele eiwitten achterwege gelaten worden, om de vorming van infectieuze virusdeeltjes te voorkomen. Deze systemen worden veelal gebruikt om zeer pathogene virussen op een veiligere manier te onderzoeken.

1.3 Minigenoom systeem voor ebolavirus

Het minigenoomsysteem waarvoor een verzoek tot omlaagschaling is aangevraagd, is beschreven door Nelson *et al.* (2017).¹⁹ Het systeem omvat meerdere plasmiden (pCAGGS vectoren), waarvan vier plasmiden elk een ebolavirusgen bevatten (NP, VP35, VP30, L) en één plasmide het minigenoom. De plasmiden worden middels transfectie tot co-expressie gebracht in animale cellen, zoals Vero-cellen, en humane cellen, zoals HeLa en HEK293T ('Human embryonic kidney') cellen.

Het minigenoom bestaat uit de 3'- en 5'-genoomuiteinden van ebolavirus (dat de intacte virale 3' en 5' UTRs, genomische 'leader' en 'trailer' sequenties en virale transcriptie start- en stopsignalen bevat) en een reporter gen (eGFP of luciferase). Expressie van het minigenoom in de pCAGGS vector wordt gereguleerd door de CAG promotor, wat een combinatie is van een CMV-IE (cytomegalovirus immediate-early) 'enhancer'

In het door Nelson *et al.* beschreven minigenoomsysteem, zijn twee ribozyme-sequenties aanwezig: voor een *Hepatitis delta virus* (HDV) ribozyme en een ‘hammerhead’ ribozyme (HHR).^{8,19,21} Deze ribozymen knippen de 3’- en 5’-uiteinden van het RNA-minigenoom (dat door het endogene RNA-polymerase II is getranscribeerd) af, tot virale genomische ‘leader’ en ‘trailer’ sequenties. Deze gedefinieerde sequenties aan de 3’- en 5’-uiteinden zijn van belang voor efficiënte genoomreplicatie door het RNP-complex.^{8,20,21,22} Hierbij knipt het HDV ribozyme aan het 3’ uiteinde en het HHR aan het 5’-uiteinde.

2. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om HEK293 cellen te transfecteren met het van ebolavirus-afgeleide minigenoomsysteem. De voorgenomen werkzaamheden hebben als doel om met proteomics technieken de reactie van getransfecteerde cellen op ebolavirus minigenoom-replicatie en transcriptie, te bestuderen. Daarnaast is de aanvrager voornemens om de samenstelling en structuur van RNP complexen met massaspectrometrie en elektronenmicroscopie in kaart te brengen.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden met het minigenoomsysteem en animale cellen uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij alle open handelingen in een VK-II worden uitgevoerd. De aanvullende werkvoorschriften die hierbij door de aanvrager worden voorgesteld en gehanteerd zijn:

- Het dragen van handschoenen
- Het gebruik van ‘sharps’ wordt vermeden
- De gebruikte gastheercellijnen zijn vrij van filovirussen

3. Eerder COGEM advies

Ebolavirussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 4.²³ De COGEM heeft in het verleden geadviseerd over diverse virale systemen waarin het gen coderend voor het spike-glycoproteïne (GP) van het ebolavirus, tot expressie werd gebracht.^{24,25} Hierbij was de COGEM van oordeel dat werkzaamheden met deze virale systemen en o.a. ebolavirus-donorsequenties, plaats kunnen vinden op ML-II. De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over virale systemen die gebaseerd zijn op ebolavirussen.

4. Overweging

4.1 Ontwerp van de vectoren

Bij het verzoek om omlaagschaling van ML-IV naar ML-II zijn een risicoanalyse en gedetailleerde vectorkaarten aangeleverd. De vectorkaarten illustreren zes plasmiden: de vier plasmiden met de ebolavirale genen L, NP, VP30 en VP35, één plasmide met het minigenoom en een eGFP reporter gen en één plasmide met het minigenoom en een luciferase reporter gen. Het van ebolavirus-afgeleide minigenoomsysteem zoals beschreven door Nelson *et al.*¹⁹ bevat sequenties die coderen voor ribozymen die de 3’- en 5’-uiteinden van het virale RNA afknippen voor effectieve genoomreplicatie. De COGEM merkt op dat de ribozyme-sequenties niet staan aangegeven in de aangeleverde vectorkaarten. Dit is het geval voor zowel het plasmide met het eGFP reporter gen als het plasmide met het luciferase reporter gen. Tevens merkt de COGEM op dat zich in deze twee minigenoom-bevattende plasmiden, een ‘long

terminal repeat' sequentie staat aangegeven, waarvan de oorsprong of functie niet duidelijk is. De plasmiden die zijn uitgerust met de NP, VP30, VP35 en L genen, bevatten volgens de vectorkaarten delen van de oorspronkelijke 5'en 3' UTR's. De plasmide met het VP30 gen bevat naast de oorspronkelijke VP30 UTR's, ook (een deel van) de 5' UTR van VP24, hierover is geen verdere toelichting gegeven. De COGEM merkt op dat de aanwezigheid van incomplete UTR's voor deze genen opmerkelijk is, gezien deze niet van belang zijn voor het tot expressie komen van de vier virale genen, omdat zij onder de controle staan van een CAG promoter.

4.2 Vorming van infectieuze virusdeeltjes

De vier genen (NP, L, VP30 en VP35) in het van ebolavirus-afgeleide minigenoomsysteem, coderen voor eiwitten die RNP-complexen vormen.¹⁹ Alleen in de cellen waarin alle expressieplasmiden en het reporterconstruct voorkomen, kan het reporter gen tot expressie gebracht worden door het virale RNP-complex. Het virale RNP-complex kan op zichzelf geen nieuwe cellen infecteren en kunnen geen infectieuze virusdeeltjes vormen door het ontbreken van 3 structurele ebolavirus genen (VP24, VP40 en GP_{1,2}).

Het minigenoomsysteem zou in theorie infectieuze virusdeeltjes kunnen vormen wanneer het minigenoom gecomplementeerd wordt met de vier virale genen van het systeem (NP, VP30, VP35 en L) plus de missende ebolavirusgenen (VP24, VP40 en GP_{1,2}) en de bijbehorende UTR's met transcriptie start- en stopsignalen. Hiervoor zouden de missende sequenties afkomstig moeten zijn van het (wild-type) ebolavirus of verwante filovirussen, zoals het marburgvirus.

5. Conclusie

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het ebolavirus-afgeleide minigenoomsysteem geen infectieuze virusdeeltjes kan vormen en zodoende als biologisch ingeperkt kan worden beschouwd. De COGEM merkt tevens op dat de aangeleverde vectorkaarten verduidelijking behoeven, maar dat de aangegeven onduidelijkheden, gezien het systeem als biologisch ingeperkt kan worden beschouwd, niet van invloed zijn op eventuele risico's voor mens en milieu. Concluderend is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn bij werkzaamheden met het ebolavirus minigenoomsysteem op inperkingsniveau ML-II. Daarbij stelt de COGEM als randvoorwaarden dat:

- De uitvoerder geen structurele genen van ebolavirus, of verwante virussen, in het systeem introduceert;
- Er gebruik gemaakt wordt van gastheercellen die vrij zijn van ebolavirus en verwante virussen;

Daarnaast stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. Dit betreft het uitvoeren van open handelingen in een VK-II, het vermijden van het gebruik van 'sharps' en het dragen van handschoenen, waarmee de veiligheid van de medewerkers gewaarborgd wordt.

6. Advies

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met het van ebolavirus-afgeleide minigenoomsysteem op inperkingsniveau ML-II, met inbegrip van de

bovengenoemde randvoorwaarden en aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2021-04-01> (bezocht op 22 juli 2021)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Taxonomy browser <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht op 16 juli 2021)
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Ebola Virus Disease <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html> (bezocht op 16 juli 2021)
4. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) Ebola. <https://www.rivm.nl/ebola> (bezocht op 16 juli 2021)
5. World Health Organisation. Ebola virus disease fact sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease> (bezocht op 16 juli 2021)
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Ebola outbreak in West Afrika 2014-2016. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/index.html> (bezocht op 19 juli 2021)
7. Feldmann H *et al.* (2013). Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Fields virology, 6th edition. Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
8. Mühlberger E *et al.* (1999). Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J. Virol.* 73: 2333–2342
9. Mühlberger E *et al.* (1998). Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.* 72: 8756–8764
10. Mühlberger E (2007). Filovirus replication and transcription. *Future Virol.* 2: 205–215
11. Jasenosky LD & Kawaoka Y (2004). Filovirus budding. *Virus Res.* 106: 181–188
12. Hoenen T *et al.* (2010). Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription. *J. Virol.* 84: 7053–7063
13. Ebihara H *et al.* (2006). Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog.* 2:e73
14. Reid SP *et al.* (2006). Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J. Virol.* 80: 5156–5167
15. Noda T *et al.* (2005). Nucleocapsid-like structures of Ebola virus reconstructed using electron tomography. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 325–328
16. Huang Y *et al.* (2002). The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol. Cell.* 10: 307–316
17. Kuhn JH *et al.* (2006). Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor. *J. Biol. Chem.* 281: 15951–15958
18. Hoenen T *et al.* (2011). Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res.* 91: 195–208

19. Nelson E *et al.* (2017). An RNA polymerase II-driven Ebola virus minigenome system as an advanced tool for antiviral drug screening. *Antiviral Res.* 146: 21–27
20. Pattnaik AK *et al.* (1992). Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell* 69: 1011-1020
21. Yanai H *et al.* (2006). Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal. *Microbes Infect.* 8: 1522-1529
22. Ghanem A *et al.* (2012). Significantly improved rescue of rabies virus from cDNA plasmids. *Eur. J. Cell. Biol.* 91: 10-16
23. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
24. COGEM (2017). Werkzaamheden met gg-alphavirus-replicons (SFV, SINV en VEEV) met donorsequenties van griepvirussen, Human respiratory syncytial virus, en Marburg- en Ebolavirussen. COGEM advies CGM/171024-01
25. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Vesicular stomatitis Indiana virus*. COGEM advies CGM/160310-01