

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 06 december 2022
KENMERK CGM/221206-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden gg-M. tuberculosis

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 17-177_2.8-005 getiteld 'Inschaling van activiteiten met genetisch gemodificeerde micro-organismen' ingediend door Stichting Vrije Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met vier verzwakte *Mycobacterium tuberculosis* stammen. De aanvrager is voornemens in deze stammen verschillende (combinaties van) sequenties te voegen. Deze sequenties betreffen o.a. genen die betrokken zijn bij het transport van eiwitten en de opname van voedingsstoffen. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II uit te mogen voeren met aanvullende voorschriften tegen aëroge verspreiding.

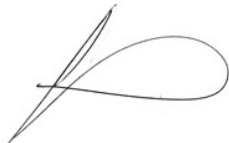
In twee van de vier verzwakte tuberculosestammen, mc² 6030 en mc² 6230, ontbreekt een bepaald systeem voor eiwittransport, en zijn de stammen voor groei afhankelijk van toegevoegd vitamine B5. De derde tuberculosestam, mc² 6020, is voor zijn groei afhankelijk van zowel lysine als vitamine B5. In de vierde verzwakte stam H37Ra zijn meerdere genen verstoord.

De te gebruiken donorsequenties kunnen sommige aanwezige mutaties en tekortkomingen mogelijk opheffen. De COGEM is van oordeel dat in stammen mc² 6030 en 6230 het ontbrekende systeem voor eiwittransport niet mag worden gecompenseerd. Bij complementatie in de opname of het gebruik van vitamine B5, blijven deze stammen zo nog voldoende verzwakt. In stam H37Ra mogen een beperkt aantal genen worden aangevuld, zodat deze stam nog voldoende verzwakt blijft. Voor stam mc² 6020 kan niet uitgesloten worden dat de verzwakking opgeheven wordt bij opname van sommige sequenties.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met stammen H37Ra, mc² 6030 en mc² 6230 op inperkingsniveau ML-II, onder navolging van de gestelde en aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Voor stam mc² 6020 zal op inperkingsniveau ML-III eerst moeten worden vastgesteld dat de verzwakking voldoende gehandhaafd blijft.

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

Inschaling van werkzaamheden met vier verzwakte genetisch gemodificeerde *Mycobacterium tuberculosis* stammen

COGEM advies CGM/221206-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met vier geattenueerde *Mycobacterium tuberculosis* stammen: *M. tuberculosis* mc² 6020 (Δ LysA Δ panCD), *M. tuberculosis* mc² 6030 (Δ panCD Δ RD1), *M. tuberculosis* mc² 6230 (genetisch identiek aan stam mc² 6030, maar mist het hygromycine antibioticumresistentiegen) en *M. tuberculosis* H37Ra (IG 17-177). De aanvrager is voornemens donorsequenties toe te voegen aan deze vier geattenueerde *M. tuberculosis* stammen, en verzoekt de werkzaamheden op ML-II te mogen uitvoeren.

2. De soort *Mycobacterium tuberculosis*

De ziekte tuberculose wordt veroorzaakt door bacteriesoorten behorende tot het *Mycobacterium tuberculosis* soortencomplex. *M. tuberculosis* zelf is de belangrijkste oorzaak van tuberculose bij de mens. Tuberculose is een veel voorkomende ziekte, waaraan wereldwijd in 2021 1,6 miljoen mensen stierven.¹ Besmetting vindt aerogeen plaats², waarna de infectie met de bacterie doorgaans asymptomatisch verloopt. Bij 5 tot 10% van de geïnfecteerde mensen ontwikkelt zich gedurende hun leven de ziekte tuberculose.¹ Klassieke symptomen zijn een aanhoudende hoest, nachtzweeten, gewichtsverlies, koorts en vermoeidheid. De bacterie kan na infectie latent aanwezig blijven. Tuberculose is moeilijk te behandelen en vereist het gebruik van een combinatie van verschillende antibiotica. De behandeling duurt meestal zes maanden. Wereldwijd wordt een geattenueerde stam van *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* 'Bacille de Calmette et Guérin' (BCG) gebruikt als vaccin tegen tuberculose.³

2.1 Bacteriestam *M. tuberculosis* H37Ra en de virulente tegenhanger H37Rv

M. tuberculosis H37Ra is een avirulente laboratoriumstam en de tegenhanger van de virulente stam *M. tuberculosis* H37Rv. Beide stammen zijn afgeleid van een klinisch isolaat (H37), dat in 1905 uit een patiënt werd geïsoleerd, en worden sinds 1940 veelvuldig in laboratoria gebruikt om *M. tuberculosis* te bestuderen.⁴ Het genoom van beide H37R-stammen is gesequenced en met elkaar vergeleken, waarbij is aangetoond dat de sequentie van H37Ra op meerdere posities afwijkt van de H37Rv-sequentie.^{4,5,6} De genoomsequentie van H37Ra is wegens alle veranderingen (53 inserties en 21 deleties ten opzichte van H37Rv) ca. 8,5 kb groter dan van H37Rv.⁴ Het genoom van H37Ra is in 2017 met behulp van single-molecule real-time (SMRT) sequencing opnieuw geanalyseerd, waaruit bleek dat er minder genen gemuteerd zijn dan gepubliceerd in 2008.^{4,5} Op basis van beide sequentie-analyses, zijn in vergelijking met H37Rv in de avirulente stam meerdere genen verstoord, waarvan er voor *phoP*, *mazG* en *hadC* experimenteel is aangetoond dat deze genen betrokken zijn bij de virulentie van *M. tuberculosis*.⁵

De virulentie van *M. tuberculosis* H37Ra is bestudeerd in muizen⁷ en cavia's⁸. Hoewel *M. tuberculosis* H37Ra in staat is beide diersoorten te infecteren en kan worden aangetoond in lymfeklieren

en longweefsel, is de stam duidelijk minder pathogeen dan de H37Rv-stam. De virulentie en infectie-eigenschappen van *M. tuberculosis* H37Ra zijn in muizen vergelijkbaar met die van *M. bovis* BCG dat als vaccin tegen tuberculose wordt gebruikt.⁷ H37Ra is in staat te persisteren in cavia's, maar de virulentie neemt na 4 weken duidelijk af ten opzichte van H37Rv.⁸

2.2 Bacteriestam *M. tuberculosis mc² 6020 (H37Rv ΔLysA ΔpanCD)*

M. tuberculosis mc² 6020 is gebaseerd op de virulente H37Rv stam, waarbij het gen *lysA* verwijderd is, en de genen *panC* en *panD* zijn vervangen voor een hygromycine-resistentiegen.⁹ Door het ontbreken van de genen *lysA*, *panC* en *panD* is deze bacteriestam niet in staat lysine en pantothenaat (pantotheenzuur of vitamine B5) te synthetiseren, waardoor de bacterie voor zijn groei afhankelijk is van reeds aanwezige of extern toegevoegde lysine en pantothenaat (auxotroof). De attenuatie van deze stam ten opzichte van H37Rv is aangetoond in immuun-gecompromitteerde en immuun-competente muizen. Waar muizen na een H37Rv-infectie binnen een maand stierven, overleefden alle muizen de infectie met *mc² 6020*.⁹ Drie weken na de infectie konden er geen *mc² 6020* tuberculosebacteriën uit de longen, lever en milt van de geïnfecteerde muizen worden geïsoleerd en waren er slechts enkele, milde laesies in de longen waarneembaar.⁹ Tevens is aangetoond dat deze stam veilig is in non-humane primaten.¹⁰

2.3 Bacteriestammen *M. tuberculosis mc² 6030 (H37Rv ΔpanCD ΔRD1)* en *M. tuberculosis mc² 6230 (H37Rv ΔpanCD ΔRD1)*

Net als de stam *mc² 6020*, is de *M. tuberculosis* stam *mc² 6030* gebaseerd op H37Rv en zijn de *panCD* genen vervangen voor een hygromycine-resistentiegen. Hierdoor is de stam auxotroof voor pantothenaat. Daarnaast is in stam *mc² 6030* de 'region of difference' (RD1) verwijderd. Het ontbreken van dit 9,5 kb grote RD1-gebied is één van de belangrijkste redenen voor de attenuatie van de vaccinstam *M. bovis* BCG.¹¹ Voor *mc² 6030* is de attenuatie en veiligheid ten opzichte van H37Rv aangetoond in muizen en cavia's.¹¹ Hoewel zowel H37Rv als *mc² 6030* in muizen konden repliceren, was *mc² 6030* niet lethaal en leidde infectie met deze mutant tot een milde pathologie in de milt en longen, tegenover de ernstige pneumonie en hepatitis in de H37Rv geïnfecteerde muizen.¹¹ Net als voor stam *mc² 6020*, is voor stam *mc² 6030* de veiligheid aangetoond in non-humane primaten.¹⁰

M. tuberculosis stam *mc² 6230* is identiek aan stam *mc² 6030* en is auxotroof voor pantothenaat, maar het hygromycine-resistentiegen ontbreekt.

3. Voorgenomen werkzaamheden en in te voegen sequenties, en voorstel tot inschaling

De aanvrager is voornemens verschillende sequenties en combinaties van sequenties in deze vier verzwakte *M. tuberculosis* stammen te insereren, en verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II met inachtneming van de volgende in bijlage 9 (uit de Regeling genetisch gemodificeerde organismen¹²) voorgeschreven voorwaarden: tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen, en open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

De sequenties die de aanvrager wenst toe te voegen zijn als volgt:

1. Regulatorie sequenties en structurele genen betrokken bij het type VII secretie systeem (T7SS) (als substraat of als onderdeel van het functioneren) van de *Mycobacterium* soorten *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. hassiacum*, *M. avium* subsp. *avium* en *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*.
2. Regulatorie sequenties en coderende sequenties van gekarakteriseerde genen betrokken bij het metabolisme, de opbouw van de celenvlop en polysaccharide en lipidestructuren daarin, biogenese van membranen en membraaneiwwitten, membraaneiwwitten en stressrespons systemen afkomstig uit de volgende organismen: *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium hassiacum*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum*).
3. Regulatorie sequenties en coderende sequenties voor Cas9 afkomstig uit *E. coli*, *Streptococcus pyogenes* en *Streptococcus thermophilus*.
4. Regulatorie sequenties en structurele genen coderend voor SecA2 en substraten hiervan: MM2284, MM3060, MM3061, trcS, DppA, lipA en PknG afkomstig uit *M. marinum*.
5. Marker- en reporter genen (GFP, sfGFP, NeonGreen, mCherry, mScarlet, YFP, tdTomato), tags (Myc, Ha, Strep, T7, TEV, FLAG), streptavidine en synthetisch afgeleiden daarvan afkomstig uit *Streptomyces avidinii*, sortase, Spy-tag/Spycatcher en afgeleiden daarvan afkomstig uit *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*), Snoop-tag/Snoopcatcher en afgeleiden daarvan afkomstig uit *S. pneumoniae*).
6. Verschillende antibioticumresistentiegenen (hygromycine, kanamycine en ampicilline resistentie).

Voor alle genoemde organismen in de aanvraag geldt dat deze, met uitzondering van *M. tuberculosis* (pathogeniteitsklasse 3), afkomstig zijn uit pathogeniteitsklasse 1 of 2.

3.1 Regulatorie sequenties en structurele genen betrokken bij het type VII secretiesysteem

Het '6 kDa early secretory antigenic target (ESAT6) protein family secretion (ESX)' systeem, ook wel bekend als het Type VII secretie systeem (T7SS), is betrokken bij het transport van eiwwitten, die bijdragen aan de overleving van de (myco)bacterie in de gastheercel, naar het celoppervlak.¹³ In *M. tuberculosis* zijn 5 paraloge ESX clusters aanwezig (ESX-1 tot en met ESX-5).¹³ Van ESX-1, ESX-3 en ESX-5 is bekend dat zij vereist zijn voor volledige virulentie en het overlevingsvermogen van *M. tuberculosis*.¹⁴

Het ESX-1 systeem in *M. tuberculosis* is belangrijk voor de resistentie tegen, of ontwijking van afweerreacties van de gastheer. Een deel van het *esx-1* locus bevindt zich in het gebied van RD1, waardoor in *M. bovis* BCG niet het volledige ESX-1 systeem aanwezig is. De afwezigheid van dit systeem is een factor in de attenuatie van deze vaccinstam.¹³

Eén van de belangrijkste functies van het ESX-1 systeem is het induceren van ‘phagosomal rupture’, waarbij de bacterie in het cytosol van de fagocyten terecht komt.^{13,15} In het cytosolische compartiment van de fagocyten kan de mycobacterie repliceren en induceert het necrosis-achtige celdood van de fagocyt, waardoor er verspreiding naar andere macrofagen optreedt.¹³ De bijdrage van het ESX-1 systeem aan de virulentie lijkt per mycobacteriumsoort te verschillen. Recombinant *M. bovis* BCG die het ESX-1 van *M. marinum* tot expressie bracht veroorzaakte minder gewichtsverlies in muizen dan een *M. bovis* BCG recombinant die het ESX-1 van *M. tuberculosis* H37Rv tot expressie bracht.¹⁶

Het ESX-3 systeem is belangrijk voor de opname van nutriënten, zoals ijzer en zink.¹⁵ Het ESX-5 systeem is alleen aanwezig in langzaam groeiende mycobacteriesoorten, waar de meest pathogene soorten zoals *M. tuberculosis* en *M. marinum* onder vallen. Van dit systeem is aangetoond dat het essentieel is voor het transport van nutriënten door het impermeabele mycomembraan, en dat eiwitten uit de PE (en PE-PGRS) en PPE familie hiervoor belangrijk zijn.¹⁵ Deze eiwitfamilies zijn substraten van het T7SS en beslaan ongeveer 10% van het mycobacteriële proteoom.¹⁷ Eiwitten uit de PE en PPE families zijn belangrijke virulentiefactoren die het vermogen om te overleven in de gastheer beïnvloeden.¹⁸ Zo resulteerde expressie van PE-PGR33 in het apathogene *M. smegmatis* tot betere overleving van de soort in macrofaagculturen en in muizen na intraperitoneale administratie.¹⁸

3.2 Regulatorische sequenties en structurele genen coderend voor SecA2 en substraten hiervan

Het geconserveerde Sec exportsysteem is, net als het T7SS, betrokken bij het transporteren van eiwitten vanuit het cytoplasma door het celmembraan.¹⁹ Het Sec systeem is belangrijk voor de bacteriële homeostase en virulentie. In mycobacteriën zijn twee paralogen van dit systeem aanwezig, SecA1 en SecA2, waarbij SecA1 essentieel is en de meeste eiwitten exporteert.¹⁹ Hoewel SecA2 niet noodzakelijk is voor de groei van mycobacteriën *in vitro*, draagt dit systeem wel bij aan de virulentie van *M. tuberculosis* en *M. marinum*. Het SecA2 systeem is betrokken bij het inhiberen van fagosoommaturing (via het substraat PknG) en apoptose, processen die normaliter bijdragen aan de afweer van de gastheer tegen *M. tuberculosis*. Een *SecA2* deletiemutant van *M. tuberculosis* groeide minder goed in muizen, en muizen geïnfecteerd met deze mutant overleefden langer dan muizen geïnfecteerd met wildtype *M. tuberculosis*.^{20,21} Voor *M. marinum* is in volwassen zebrafissen en in zebrafis-embryo's aangetoond dat verwijdering van *secA2* leidde tot verminderde groei van *M. marinum* en tot een langere overlevingstijd van de vissen. In een ‘murine tail vein infection’ model veroorzaakte *secA2* deficiënt *M. marinum* minder laesies.^{22,23}

4. Eerder COGEM advies

Mycobacterium tuberculosis is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁴ *M. tuberculosis* stam H37Ra heeft in vergelijking tot zijn virulente tegenhanger H37Rv, meerdere verstoorde genen. Hierdoor is stam H37Ra geattenuëerd en door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁵ Met uitzondering van

M. tuberculosis, zijn alle soorten waarvan de aanvrager in onderhavige aanvraag voornemens is sequenties uit te halen, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 of 2.²⁴

5. Overweging

Voor eventuele omlaagschaling van de werkzaamheden staat de vraag centraal wat het effect is van de insertie van de bovengenoemde sequenties op de virulentie en pathogeniteit van deze geattenueerde *M. tuberculosis* stammen.

Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen aanwijzingen dat het invoegen van de sequenties vermeldt onder punt 3 (CAS9 gerelateerde sequenties), 5 (marker-, reporter genen en tags) en 6 (antibioticumresistentiegenen) in paragraaf 3 van dit advies, als gevolg heeft dat de virulentie en/of pathogeniteit van de te gebruiken *M. tuberculosis* stammen beïnvloed worden. De sequenties en genen die onder deze punten worden beschreven (zoals o.a. Cas9 en de verschillende reporter genen) zullen worden gebruikt voor het genetisch modificeren en/of karakteriseren van de te gebruiken *M. tuberculosis* stammen. Voor de sequenties beschreven onder punt 1, 2, en 4 in paragraaf 3 van dit advies is een effect op de virulentie van de stammen niet geheel uit te sluiten, en zullen daarom hieronder worden toegelicht.

5.1 Regulatorische sequenties en structurele genen betrokken bij het type VII secretiesysteem afkomstig uit verschillende organismen

Het T7SS in (myco)bacteriën is een secretiesysteem betrokken bij het exporteren van eiwitten door het celmembraan en de opname van nutriënten. Het secretiesysteem is nodig voor het overlevingsvermogen van *M. tuberculosis*, en draagt bij aan de virulentie van de bacterie. Het ESX-1 systeem van het T7SS in mycobacteriën is aanwezig in het RD1 gebied op het genoom, en is een belangrijke virulentiefactor, betrokken bij het vermogen van *M. tuberculosis* om te verspreiden vanuit geïnfecteerde fagocyten.^{13,15,16} Het verwijderen van het RD1 gebied in stam H37Rv heeft als gevolg dat de groei van deze mutant in macrofagen en ‘humane mononucleaire cellen uit perifeer bloed’ (PBMC’s) verstoord is ten opzichte van de wildtype H37Rv stam.²⁶ Ook infectie-experimenten in muizen tonen aan dat deletie van het RD1 gebied in H37Rv tot attenuatie leidt, maar dat deze mutante stam nog wel virulenter is dan *M. bovis* BCG.^{11,26} *M. tuberculosis* stammen mc² 6030 en mc² 6230 missen het RD1 gebied, waar het ESX-1 systeem zich op bevindt. Het inbrengen van regulatorische en coderende sequenties uit het ESX-1 systeem kan mogelijk het attenuerende effect van de RD1 mutatie reduceren. Deze stammen blijven wel auxotroof voor pantothenaat.

De ESX-3 en ESX-5 systemen zijn betrokken bij het transport van nutriënten door het impermeabele mycomembraan. Complementatie of overexpressie van deze systemen (en de systemen/pathways beschreven in punt 2, paragraaf 3; zie ook paragraaf 5.2 hieronder) in stammen mc² 6020, mc² 6030 en mc² 6230 zou de opname van nutriënten kunnen verbeteren, waardoor mogelijk het vermogen tot opname van lysine en/of pantothenaat in deze stammen verbetert. Dit kan het geattenueerde karakter van deze stammen mogelijk beïnvloeden. Stammen mc² 6030 en mc² 6230 zijn echter nog steeds deficiënt voor het RD1 gebied en het ESX-1 systeem, en daardoor geattenueerd. Voor stam mc² 6020 is het onduidelijk er nog sprake is van een voldoende geattenueerde stam, wanneer de opname-efficiëntie

van lysine en/of pantothenaat verhoogd wordt. Het is onduidelijk wat het effect op het groeivermogen en de attenuatie van stam mc² 6020 zal zijn, wanneer deze stam beter in staat is de in de gastheercel aanwezige lysine en/of pantothenaat op te nemen.

Eiwitten uit de families PE/PE-PGRS en PPE zijn belangrijke substraten voor het T7SS, met name voor het ESX-5 systeem.¹⁵ In *M. tuberculosis* stam H37Ra zijn, ten opzichte van H37Rv, meerdere genen verstoord, waarvan onder meer genen uit de families PE/PE-GRS en PPE.⁵ De COGEM maakt uit de vergunningaanvraag op dat de aanvrager voornemens is het aantal in te brengen PE/PE-GRS en PPE genen te beperken tot maximaal 2. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat het invoegen van twee genen uit de PE/PE-GRS en/of PPE familie het geattenueerde karakter van H37Ra zal beïnvloeden.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat stammen mc² 6030 en mc² 6230 voldoende geattenueerd blijven als het ESX-1 systeem niet gecomplementeerd wordt. Omdat voor stam mc² 6020 niet kan worden uitgesloten dat de voorgenomen werkzaamheden tot een verhoogde opname-efficiëntie van lysine en/of pantothenaat zullen leiden, is de COGEM van oordeel dat voor stam mc² 6020 op inperkingsniveau ML-III moet worden vastgesteld of de attenuatie in voldoende mate gehandhaafd blijft, alvorens omlaagschaling op niveau ML-II met aanvullende voorschriften kan plaatsvinden. Tevens is de COGEM van oordeel dat stam H37Ra geattenueerd blijft, wanneer er maximaal 2 coderende sequenties voor genen uit de PE/PE-GRS en PPE subfamilies gecomplementeerd worden.

5.2 Regulatorische sequenties en structurele genen coderend voor SecA2 en substraten hiervan, en coderende sequenties van gekarakteriseerde genen betrokken bij het metabolisme, de opbouw van de celenvlop (biogenese van) membranen en membraaneiwwitten, en stressrespons systemen afkomstig uit verschillende organismen

Net als het T7SS, is het Sec exportsysteem betrokken bij het transporteren van eiwwitten door het celmembraan. Het SecA2 systeem is, (onder andere via het substraat PknG), betrokken bij het inhiberen van processen die bijdragen aan de afweer van de gastheer tegen *M. tuberculosis*.^{8,9,19} De aanvrager geeft aan coderende of regulatorische sequenties te willen invoegen van genen betrokken bij het secA2 systeem en substraten hiervan, het metabolisme, de opbouw en samenstelling van de celenvlop, (biogenese) van membranen en membraaneiwwitten, en stressrespons systemen. Met uitzondering van de genoemde genen en substraten betrokken bij het secA2 systeem, wordt voor alle andere systemen, processen en 'pathways' niet gespecificeerd welke regulatorische- en coderende sequenties ingebracht zullen worden.

Net als voor het T7SS het geval is, is het mogelijk dat het insereren van de hierboven beschreven sequenties van invloed kunnen zijn op de permeabiliteit van het celmembraan en het vermogen van de stammen om nutriënten op te nemen. Voor stam mc² 6030 en mc² 6230 geldt dan nog steeds dat het RD1 gebied ontbreekt en deze stammen voldoende geattenueerd zijn. Voor stam mc² 6020 geldt, net als hierboven voor het T7SS beschreven, dat het onduidelijk is of de attenuatie in voldoende mate gehandhaafd blijft, wanneer de opname-efficiëntie van lysine en/of pantothenaat verhoogd wordt.

Van *phoP*, *mazG* en *hadC* is experimenteel aangetoond dat deze mutaties betrokken zijn bij de attenuatie van H37Ra. PhoP is een onderdeel van het twee-componenten systeem PhoPR, welke betrokken is bij de secretie van eiwitten die bijdragen aan virulentie.²⁷ MazG is een NTP pyrophosphohydrolase betrokken bij de oxidatieve stressrespons in *M. tuberculosis*.²⁸ HadC is betrokken bij de biosynthese van (zuurstofhoudende) micolzuren, welke componenten zijn van de celwand van *M. tuberculosis*.²⁹ De werkzaamheden zoals beschreven onder punt 2 in paragraaf 3 van dit advies betreffen het invoegen van regulatoire sequenties of coderende genen betrokken bij het metabolisme, de opbouw van de celenvlop en synthese van membranen, membraaneiwitten en stressresponsystemen. Hieruit volgt dat het mogelijk is dat de genen *phoP*, *mazG* en *hadC* in de vier geattenueerde *M. tuberculosis* stammen ingevoegd of gecomplementeerd kunnen worden, waaronder in stam H37Ra.

H37Ra stammen gecomplementeerd met *phoP* afkomstig uit H37Rv vertonen een toegenomen persistentie in macrofagen, maar bereiken niet de virulentie van H37Rv.³⁰ In een 'rabbit liquefaction model' produceert H37Ra gecomplementeerd met H37Rv *mazG* grotere laesies dan H37Ra, maar de veroorzaakte laesies zijn minder groot dan veroorzaakt door H37Rv.³¹

Complementatie van H37Rv *hadC* in H37Ra leidt tot een grotere bacteriële 'load' in de longen en milt van immuun-gecompromitteerde (SCID) muizen vergelijkbaar met een *phoP* gecomplementeerde H37Ra stam, maar de virulentie bereikt in beide gevallen niet het niveau van wildtype H37Rv.²⁹ Uit de aanvraag blijkt dat er combinaties van verschillende systemen en pathways in de 4 geattenueerde *M. tuberculosis* stammen kunnen worden ingevoegd. Het effect op de toename in virulentie van H37Ra, wanneer één of meerdere combinaties van *phoP*, *mazG*, *hadC*, T7SS en/of *secA2* genen of substraten en/of genen betrokken bij metabolisme, opbouw/synthese van de celenvlop of celmembraan en stressrespons systemen worden ingevoegd, is op basis van de door de aanvrager verstrekte informatie niet vast te stellen.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat insertie van regulatoire en coderende sequenties, zoals beschreven onder punt 2 en 4 in paragraaf 3, de attenuatie van stam mc² 6030 en mc² 6230 niet zal compenseren. Voor stam mc² 6020 valt, net als hierboven beschreven, niet op voorhand vast te stellen in welke mate de stam geattenueerd blijft wanneer deze beter in staat is extern aanwezig lysine en/of pantothenaat op te nemen. Hierdoor dient op inperkingsniveau ML-III te worden vastgesteld dat de attenuatie van mc² 6020 in voldoende mate gehandhaafd blijft, alvorens omlaagschaling op niveau ML-II met aanvullende voorschriften kan plaatsvinden. Voor stam H37Ra is de COGEM van oordeel dat de stam geattenueerd blijft als er maximaal één van de coderende sequenties van de genen *phoP*, *mazG* of *hadC* in stam H37Ra worden ingebracht.

6. Kanamycineresistentie en testen voor gevoeligheid eerstelijns antibioticum

Kanamycine is een tweedelijns antibioticum voor de behandeling van tuberculose.³² De COGEM heeft in een eerder advies geadviseerd om een *phoP* mutante *M. tuberculosis* stam die resistent is voor kanamycine, te testen op de susceptibiliteit van ten minste één algemeen voorgeschreven eerstelijns antituberculosemiddel (zoals isoniazide, rifampicine, pyrazinamide en ethambutol). Om de risico's voor (kwetsbare) medewerkers te minimaliseren, adviseert de COGEM de vergunningaanvrager om vanwege

ARBO-overwegingen de te gebruiken batches van de stammen die resistent zijn tegen kanamycine, te testen op de gevoeligheid voor ten minste één algemeen voorgeschreven eerstelijns anti-tuberculosemiddel.

7. Advies

Alles in ogenschouw nemende, stemt de COGEM voor stammen H37Ra, mc² 6030 en mc² 6230 in met de voorgelegde inschaling op inperkingsniveau ML-II met de aanvullende voorschriften opgenomen in bijlage 9¹² voor activiteiten met ggo's die aërogeen kunnen verspreiden, en met inachtnaam van de volgende aanvullende voorschriften:

- Er worden geen regulatoire en coderende sequenties van het ESX-1 systeem en de substraten hiervan ingebracht in de stammen mc² 6030 en mc² 6230;
- Zoals door de aanvrager aangegeven, worden het aantal coderende sequenties van PE/PE-PGRS en PPE genen in de stam H37Ra beperkt tot maximaal twee;
- Het inbrengen van de sequenties coderend voor *phoP*, *mazG* en *hadC* zal in stam H37Ra wordt beperkt tot maximaal één van deze genen.

Voor stam mc² 6020 kan op basis van de door de aanvrager verstrekte informatie niet worden vastgesteld in welke mate de stam geattenuëerd blijft wanneer er regulatoire en coderende sequenties van genen en/of substraten van het T7SS, SecA2 of betrokken bij metabolisme, de opbouw van de celenvlop, (biogenese van) membranen en membraaneiwitten, en stressrespons systemen worden ingevoegd. De COGEM adviseert werkzaamheden met stam mc² 6020 uit te voeren op inperkingsniveau ML-III. Alleen als aangetoond is dat de attenuatie van mc² 6020 gehandhaafd blijft, stemt de COGEM in met inschaling op inperkingsniveau ML-II met de aanvullende voorschriften opgenomen in bijlage 9.¹²

Samenvattend, is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met stam H37Ra, mc² 6030 en mc² 6230 op inperkingsniveau ML-II, onder navolging van de gestelde voorwaarden en voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. World Health Organisation. Tuberculosis. [Tuberculosis \(who.int\)](https://www.who.int). Bezocht 23 november 2022
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tuberculosis. [How TB Spreads | Basic TB Facts | TB | CDC](https://www.cdc.gov/tb/about/basics/basic_tuberculosis.htm). Bezocht 23 november 2022
3. Fatima S *et al.* (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci.* 252: 117594
4. Zheng H *et al.* (2008). Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One.* 3: e2375
5. Elghraoui A *et al.* (2017). SMRT genome assembly corrects reference errors, resolving the genetic basis of virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Genomics* 18: 302

6. Pinto SM *et al.* (2018). Integrated Multi-Omic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra redefines virulence attributes. *Front. Microbiol.* 9: 1314
7. Larson CL & Wicht WC (1964). Infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Ra. *Am Rev Respir Dis.* 90: 742-748
8. Alsaadi AI & Smith DW (1973). The fate of virulent and attenuated *Mycobacteria* in guinea pigs infected by the respiratory route. *Am Rev Respir Dis.* 107: 1041-1046
9. Sambandamurthy VK *et al.* (2005). Long-term protection against tuberculosis following vaccination with a severely attenuated double lysine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 73: 1196-1203
10. Larsen MH *et al.* (2009). Efficacy and safety of live attenuated persistent and rapidly cleared *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates in non-human primates. *Vaccine* 27: 4709-4717
11. Sambandamurthy VK *et al.* (2006). *Mycobacterium tuberculosis* $\Delta RD1 \Delta panCD$: a safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* 24: 6309-6320
12. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. [wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 \(overheid.nl\)](https://www.wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 (overheid.nl)). Bezocht 23 november 2022
13. Gröschel MI *et al.* (2016). ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 677-691
14. Rivera-Calzada A *et al.* (2021). Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. *Nat. Rev. Microbiol.* 19: 567-584
15. Bunduc CM *et al.* (2020). Structure and function of the mycobacterial type VII secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 74: 315-335
16. Gröschel MI *et al.* (2017). Recombinant BCG expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* combines low virulence with cytosolic immune signaling and improved TB protection. *Cell Rep.* 18: 2752-2765
17. Akhter Y *et al.* (2012). The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: perhaps more? *Biochimica* 94: 110-116
18. Dheenadhayalan V *et al.* (2006). Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect.* 8: 262-272
19. Miller BK *et al.* (2017). The Sec pathways and exportomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Spectrum* 5: TBTB2-0013-2016
20. Braunstein M *et al.* (2003). SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 48: 453-464
21. Kurtz S *et al.* (2006). The SecA2 secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infect. Immun.* 74: 6855-6864
22. Van der Woude AD *et al.* (2014). Analysis of SecA2-dependent substrates in *Mycobacterium marinum* identifies protein kinase G (PknG) as a virulence effector. *Cell Microbiol.* 16: 280-295
23. Watkins BY *et al.* (2012). *Mycobacterium marinum* SecA2 promotes stable granulomas and induces tumor necrosis factor alpha *in vivo*. *Infect. Immun.* 80: 3512-3520.
24. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/211025-01

25. COGEM (2022). Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. COGEM advies CGM/220314-01
26. Lewis KN *et al.* (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *J. Infect. Dis.* 187: 177-123
27. Ryndak M *et al.* (2008). PhoP, a key player in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Trends Microbiol.* 16: 528-534
28. Lu LD *et al.* (2010). Mycobacterial MazG is a novel NTP pyrophosphohydrolase involved in oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* 285: 28076-28085
29. Slama N *et al.* (2016). The changes in mycolic acid structures caused by *hadC* mutation have a dramatic effect on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 99: 794-807
30. Lee JS *et al.* (2008). Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe* 3: 97-103
31. Zhang G *et al.* (2010). Evaluation of mycobacterial virulence using rabbit skin liquefaction model. *Virulence* 1: 156-173
32. RIVM, LCI richtlijn tuberculose. [Tuberculose | LCI richtlijnen \(rivm.nl\)](#) bezocht: 28 november 2022