

Advies betreffende: **Functie van *Helicobacter pylori* genen betrokken bij de pathogenese van *Helicobacter pylori* gerelateerde ziekten**

Kennisgever: **Academisch Ziekenhuis van de Universiteit van Amsterdam (AMC)**

COGEM kenmerk
CGM/010323-11

BGGO nummer
GGO 00-199/1

Datum advies
23 maart 2001

Beschrijving van het experiment

De kennisgever wil een *Helicobacter pylori* chromosomale DNA bank maken in *Escherichia coli*. Hiertoe wordt *H. pylori* chromosomaal DNA gekloneerd voor een cat reporter in de vector pKC1. De recombinant plasmiden worden uit *E. coli* geïsoleerd en getransformeerd naar *H. pylori* ten einde een insertie "library" van *H. pylori* met random chromosomale fusies aan een promotorloos cat-gen te construeren. Deze *H. pylori* library wordt in aanwezigheid van HMO2 cellen (humane maagepitheliale cellijn) gekweekt. Selectie van *H. pylori* genen die geïnduceerd worden door de associatie met HMO2 cellen zal door middel van chloramphenicol gebeuren.

Aard van het bezwaar

Vanwege het ontbreken van experimentele gegevens over de potentiële effecten die klonering van sequenties (inclusief de toxinen) van *H. pylori* heeft op de pathogeniteit van de gastheerstam werd geadviseerd (CGM/010110-02) de betreffende werkzaamheden uit te voeren onder C-II condities conform artikel 5.4.a van de Richtlijnen van de COGEM. Bij de totstandkoming van bovengenoemde beschikking is dit advies opgevolgd.

Middels een schrijven van 24 januari 2001 tekenen de aanvragers bezwaar aan tegen de inschaling, onder C-II condities, van bovengenoemde werkzaamheden. De aanvragers geven hierbij de volgende argumentatie:

'Het betreft hier de klonering van chromosomaal DNA van Helicobacter pylori stam 1061 in de gastheer Helicobacter pylori stam 1061. Door homologe recombinatie wordt het donor DNA geïncorporeerd in het chromosomale DNA van de gastheer (identiek aan de donorstam). De genen die na transformatie tot expressie komen zijn daarom dezelfde als voor de transformatie. De expressie van eventueel getransformeerde toxinegenen is na transformatie niet anders dan voor transformatie. Immers er is getransformeerd met homolog DNA. Op de introductie van een reporter gen na wordt de acceptorstam Helicobacter pylori niet genetisch gemodificeerd.'

Naar aanleiding van het ingediende bezwaar en de door de aanvragers geleverde aanvullende informatie heeft de COGEM de betreffende kennisgeving en haar advies heroverwogen. De COGEM komt hierbij tot het volgende advies.

Advies, overwegingen en motivatie

Het donor- en gastheerorganisme *H. pylori* vormt 2 toxines: endotoxine en vacuolating toxine A (VacA). De kans dat door de klonering een extra kopie van een van de toxines in het genoom wordt geïntegreerd is minimaal daar gebruik wordt gemaakt van relatief kleine Sau3A fragmenten. Hierdoor kan nagenoeg uitgesloten worden dat een verhoogde expressie van deze toxines op zal treden door de aanwezigheid van een extra kopie van de betreffende genen. Om deze reden is een toename van de toxiciteit alleen mogelijk wanneer een modificatie van het reeds aanwezige gen leidt tot een verhoogde toxiciteit van het geproduceerde genproduct.

Het niveau van recombinitie binnen het *H. pylori* genoom is van nature erg hoog. Ook verspreiding van deze recombinanten vindt voortdurend plaats. De COGEM acht het dan ook niet uitgesloten dat, met uitzondering van de vectorsequenties, verwante experimenten als dat van de aangevraagde in de natuur reeds hebben plaatsgevonden. De ervaring met deze natuurlijke varianten van de toxines geven geen aanleiding tot ongerustheid betreffende een verhoogde toxiciteit van de reeds aanwezige toxines.

Het endotoxine van *H. pylori* heeft een geringe toxiciteit welke vele malen lager is dan die van het endotoxine van *E. coli*. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat na een zelfklonering in *H. pylori* een verhoogde expressie van dit toxine op zal treden. Omdat voor de synthese van het endotoxine een groot aantal genen noodzakelijk zijn acht de COGEM de kans op een verhoogde toxiciteit van het endotoxine uiterst gering.

Van het VacA toxine gen blijken diverse vormen te bestaan, waaronder de (sub)typen s1a, s1b, s1c, s2, m1 en m2. Verschillende *H. pylori* stammen produceren elk een specifiek VacA toxine. Ondanks het zeer hoge niveau van natuurlijke recombinitie en mutatie bestaan er slechts enkele vormen van het VacA toxine. Dit impliceert dat de voorwaarden voor de vorming van een nieuw actief VacA subtype bijzonder strikt zijn. De kans dat middels het betreffende experiment nieuwe actieve VacA subtypen ontstaan kan als nihil worden beschouwd. Het feit dat in het beschreven experiment een overeenkomstige acceptor- en donorstam worden gebruikt zorgt zelfs voor een verdere reductie van de kans op het ontstaan van nieuwe toxines.

Van een in *E. coli* tot expressie gebracht VacA is aangetoond dat het toxine geen biologische activiteit bezit. Verondersteld wordt dat voor een biologisch actief toxine strikte eisen gesteld worden aan secundaire en tertiaire conformaties waarbij niet alleen expressie maar met name de assemblage van het multimeren VacA cruciaal is.

Epidemiologisch onderzoek heeft aangetoond dat 25% van de Nederlandse bevolking is geïnfecteerd met *H. pylori*. Het merendeel van deze populatie is geïnfecteerd met een *H. pylori* stam, die reeds van nature een relatief hoge toxineproductie heeft (VacA genotype s1, meestal subtype s1a). Overdracht van *H. pylori* gebeurt faeco-oraal of oraal-oraal van

mens naar mens. Buiten de maag is *H. pylori* nog nooit aangetroffen hieruit concludeert de COGEM dat alleen ingestie van recombinant *H. pylori* tot infectie kan leiden.

Concluderend acht de COGEM een inschaling van de werkzaamheden op C-I niveau conform artikel 5.2a van de Richtlijnen van de COGEM voldoende.