

Advies betreffende: **Rol van omgevingsfactoren en specifieke *Helicobacter pylori* genen in de genexpressie van *H. pylori***

Kennisgever: **Academisch ziekenhuis van de Universiteit van Amsterdam**

COGEM kenmerk  
**CGM/020318-05**

BGGO nummer  
**GGO 01-190/1**

Datum advies  
**18 maart 2002**

## **Inleiding**

Het donor- en gastheerorganisme *H. pylori* vormt twee toxines: endotoxine en vacuolating toxine A (VacA) welke beiden voorkomen in alle *H. pylori* isolaten. Het endotoxine (een T-1 toxine) van *H. pylori* heeft een geringe toxiciteit welke vele malen lager is dan die van het endotoxine van *E. coli*. Voor de synthese van het endotoxine is een groot aantal genen noodzakelijk. Van het VacA toxine gen bestaan diverse (sub)typen, 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 (s1a, s1b, s1c, s2, m1 en m2). Betreffende de klonering van *H. pylori* DNA in *H. pylori* heeft de COGEM eerder geadviseerd (CGM/010323-11). Destijds oordeelde de COGEM dat de kans dat door de klonering van relatief kleine Sau3A fragmenten een extra kopie van een van de toxines in het genoom wordt geïntegreerd minimaal is. 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. In dit advies werd geconcludeerd dat een inschaling op C-I niveau toereikend is om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen. In dit advies werd geen uitspraak gedaan over de inschaling van de klonering van *H. pylori* DNA in *E. coli*.

## **Advies en Inschaling**

In het huidige experiment wordt chromosomaal DNA van *H. pylori* gesonificeerd waarbij fragmenten met een grootte van 1000 bp worden gegenereerd. De willekeurig gecreëerde fragmenten worden vervolgens met een pUC vector gekloneerd in *E. coli* K12.

### Klonering in *Escherichia coli*

Vanwege de grootte van het VacA gen (3800 bp) kan klonering van een intact VacA worden uitgesloten. Het endotoxine is voor zijn synthese afhankelijk van meerdere genproducten en kan hierdoor niet functioneel tot expressie gebracht worden in *E. coli*. De COGEM adviseert de betreffende werkzaamheden uit te voeren op VMT-niveau. Hierbij wordt aanvullend gesteld dat de te kloneren DNA fragmenten niet groter zijn dan 1000 bp.

### Kan VacA beschouwd worden als een toxine van klasse T-1 ?

De centrale vraag die gesteld moet worden is of VacA als een toxine van klasse T-1 beschouwd moet worden. De definitie van T-1 gaat uit van een LD50 voor vertebraten van 1 tot en met 100 mg per kg lichaamsgewicht. De COGEM acht de door Marchetti et al beschreven gegevens niet voldoende als basis voor een LD50 bepaling. Derhalve is er onvoldoende bewijs op basis waarvan tot een lagere classificatie van het VacA toxine, dan de huidige T-1, gekomen kan worden. De aanvragers dienen uitgebreidere gegevens betreffende de toxiciteitsstudies te overleggen om aannemelijk te maken dat de toxiciteit van het VacA toxine lager is dan die van een klasse T-1 toxine.

Een ander argument dat gebruikt kan worden is dat het in E. coli geproduceerde VacA geen biologische activiteit bezit. Echter de onderbouwing hiervoor is onvoldoende om op basis hiervan een omlaagschaling te verantwoorden.

Vooralsnog dient het VacA toxine beschouwt te worden als een T-1 klasse toxine. Meer gedetailleerde gegevens betreffende de LD50 van het VacA en de toxiciteit van het in E.coli tot expressie gebrachte VacA kunnen in de toekomst een herziene classificatie van dit toxine tot gevolg hebben.