

Advies betreffende: **Synthese van fusie-eiwitten**

Kennisgever: **Vereniging voor Christelijk Wetenschappelijk Onderwijs, VU Medisch Centrum**

COGEM kenmerk
CGM/020513-01

BGGO nummer
GGO 02-083

Datum advies
13 mei 2002

Inleiding

Het onderzoek betreft de productie van fusie-eiwitten van het PTD (proteïn transduction domain) van het Tat eiwit van het HIV-1 virus met verschillende tumorantigenen of daarvan afgeleide peptidesequenties of markergenen. Deze PTD-fusie eiwitten zullen in *E. coli* middels een bacteriële expressievector worden geproduceerd, opgezuiverd en uiteindelijk worden gebruikt in transductie- experimenten in primaire humane cellen om onder meer in vitro tumor-specifieke T-cel responsen te induceren.

HIV-1 Tat-gemedieerde eiwit transductie werd voor het eerst in 1988 beschreven. Aan deze technologie zijn de laatste jaren een aantal verbeteringen aangebracht. De gezuiverde fusie-eiwitten kunnen direct aan celweek cultures of bijvoorbeeld in vivo in muizen worden geïnjecteerd. Transductie van het fusie-eiwit, middels in vitro experimenten, vindt plaats op een concentratie afhankelijke manier waarbij maximale intracellulaire concentraties binnen 5 minuten worden bereikt. Hierbij worden vrijwel gelijke intracellulaire concentraties van fusieeiwitten in cellen binnen een getransduceerde populatie bereikt. De regio van het Tat eiwit die verantwoordelijk is voor de Tat-gemedieerde transductie beslaat elf (basische) aminozuren. Deze sequentie wordt gekloneerd in een expressievector, waarin vervolgens ook de fusie-sequentie gekloneerd wordt. Fusie-producten met sequenties coderend voor peptide sequenties (partieel) of gehele eiwitten van meer dan 1000 aminozuren kunnen op deze wijze worden geproduceerd en vervolgens worden getransduceerd in zoogdiercellen.

Overweging en advies

Bij deze aanvraag gaat het om de volgende handelingen: klonering van fusie constructen en de expressie van de fusie-eiwitten in bacteriën. De transductie experimenten met de fusie-eiwitten in primaire zoogdiercellen worden niet opgenomen in de procedure aangezien het hier niet om handelingen met ggo's gaat.

Bacterieel gegenereerd Tat-eiwit is niet infectieus, niet toxisch, kan niet autonoom repliceren en kan niet (gemakkelijk) in een intacte huid doordringen. Echter gezondheidsrisico's en bijwerkingen ten gevolge van transductie zijn nog niet volledig onderzocht. Daarnaast is de transductie-efficiëntie zeer hoog. Dierstudies hebben aangetoond dat de bloed-hersen barrière en de placentaire barrière kunnen worden gepasseerd. Het transductie-mechanisme is echter nog grotendeels onbekend. Er wordt dan ook voor een conservatieve benadering gekozen met betrekking tot de

voorzorgsmaatregelen: aanbevolen wordt om de activiteiten volgens NIH "Biosafety Level 2" (veilige handelingen met recombinante eiwitten) richtlijnen uit te voeren zoals beschreven door Becker-Hapak . Het eventuele risico van de verscheidene Tat fusieproducten dienen te worden ingeschat aan de hand van de eigenschappen en het te verwachten effect van het eiwit dat als fusie-partner wordt gebruikt.

Mede op basis van het bovenstaande acht de COGEM een C-I inschaling noodzakelijk waarbij de onderstaande aanvullende voorschriften opgevolgd dienen te worden:

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II te worden uitgevoerd.