

Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der Expression von Tat-Fusionsproteinen

Das Transkriptions-transaktivierende Protein Tat des humanen Immundefizienzvirus 1 ist in der Lage, Rezeptor-unabhängig zelluläre Membranen zu durchdringen (1, 2). Sowohl bei Tat als auch bei anderen Proteinen wie Antennapedia von *Drosophila* oder VP22 des Herpes simplex-Virus Typ 1, die ebenfalls in der Lage sind, Membranen zu durchdringen (3, 4, 5), wurden die Proteintransduktionsdomänen (PTD) auf kleine kationische Bereiche von 10 bis 16 Aminosäuren eingegrenzt (4, 5). Die Fusion heterologer Proteine an PTD bietet einen experimentellen Ansatz, um diese Proteine in eukaryote Zellen einzuführen.

Zur Herstellung von Tat-Fusionsproteinen stehen prokaryote und eukaryote Expressionssysteme zur Verfügung. In der Regel wird das in der Arbeitsgruppe von Dowdy entwickelte prokaryote System verwendet (6). Hierbei wird das heterologe Gen in einen pBR-abgeleiteten Vektor pTAT, der eine Expressionskassette mit dem T7-Promotor, einem N-terminalen His₆-Tag, der Tat-PTD mit 11 Aminosäuren, die von Glycin-Resten flankiert wird, einem Hämagglutinin-Tag und einer „multi cloning site“ enthält, inseriert. Zur Synthese des Fusionsproteins wird der rekombinante Vektor auf *E. coli* BL21(DE3)pLysS übertragen, einem *E. coli* B-Derivat, welches T7-Polymerase unter Kontrolle des induzierbaren *lacUV5*-Promotors exprimiert. Aber auch in Säugerzellen wird mithilfe eines Vektors, der über eine eukaryote Expressionskassette mit dem CMV-Promotor, dem SV40-Replikationsursprung und der Tat-PTD mit 11 Aminosäuren verfügt, ein funktionsfähiges Tat-Fusionsprotein exprimiert (7).

Bewertung und Empfehlung

Tat-Fusionsproteine haben das Potenzial, in verschiedene Zelltypen effizient einzudringen und dort ihre Funktion auszuüben, wobei auf die Zielzelle kein Erbgut übertragen wird. Das Fusionsprotein wird innerhalb der Zelle abgebaut, sodass das übertragene Protein seine Funktion nur transient ausübt. Daher ist bei Tat-Fusionsproteinen dann kein Gefährdungspotenzial zu erwarten, wenn das Protein keine Zellschädigungen verursacht.

- a. Werden Tat-Fusionsproteine mithilfe von *E. coli* K12- oder *E. coli* B-Derivaten und prokaryoten pBR-abgeleiteten Expressionsvektoren oder mithilfe etablierter Zelllinien der Risikogruppe 1 und eukaryoten Expressionsvektoren exprimiert, und handelt es sich bei den Proteinen, die an Tat-PTD fusioniert wurden, um andere als die unter b. aufgeführten Proteine, werden die GVO gemäß § 5 Abs. 1 i.V.m. Anhang I Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet. Gentechnische Arbeiten mit diesen GVO werden gemäß § 7 Abs. 3 GenTSV der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet.
- b. Werden Tat-Fusionsproteine mithilfe von *E. coli* K12- oder *E. coli* B-Derivaten und prokaryoten pBR-abgeleiteten Expressionsvektoren oder mithilfe etablierter Zelllinien der Risikogruppe 1 und eukaryoten Expressionsvektoren exprimiert, und handelt es sich bei den Proteinen, die an Tat-PTD fusioniert wurden, um virale Onkoproteine mit „hit and run“-Mechanismen, um Prionen oder Prionproteinen von Mensch und Rind, um Apoptose-auslösende Proteine oder um Toxine, werden die GVO gemäß § 5 Abs. 1 i.V.m. Anhang I Nr. 2 GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Gentechnische Arbeiten mit diesen GVO werden gemäß § 7 Abs. 3 GenTSV der **Sicherheitsstufe 2** zugeordnet.

Bei gentechnischen Arbeiten mit Bakterien- oder Zellkulturen, die das Fusionsprotein exprimieren, wird für a. und b. empfohlen, Schutzhandschuhe zu tragen und sich bei Ultrabeschallung vor Aerosolen zu schützen.

Literatur:

1. Frankel AD & Pabo CO (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193.
2. Green M & Loewenstein PM (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179-1188.
3. Elliott G & O'Hare P (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233.
4. Kaplan IM, Wadia JS & Dowdy SF (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release* 102: 247-253.
5. Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends in Cell Biology* 10: 290-295.
6. Nagahara H, Vocero-Akbani A M, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA & Dowdy SF (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27^{Kip1} induces cell migration. *Nature Medicine* 4: 1449-1452.
7. Barka T, Gresik ES, Henderson SC (2004). J Histochem Cytochem. Production of cell lines secreting TAT fusion proteins. *J Histochem Cytochem* 52: 469-477.