

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 27 november 2009
KENMERK CGM/091127-01
ONDERWERP Advies: Vrijwaring van gg-E. coli voor GGO regelgeving

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek van Biorad Laboratories B.V. om een tweetal genetisch gemodificeerde micro-organismen op de Bijlage IIC van de Europese richtlijn 90/2189/EEG te plaatsen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek om twee genetisch gemodificeerde micro-organismen (ggm's) op de Bijlage IIC van de Europese richtlijn 90/219/EEG te plaatsen. Plaatsing op Bijlage IIC zou betekenen dat deze ggm's vrijgesteld worden van de GGO wetgeving. Zover bekend bij de COGEM is dit de eerste keer dat van deze mogelijkheid gebruik gemaakt wordt. Het betreft twee genetisch gemodificeerde (gg) *Escherichia coli* HB101 bacteriën die getransformeerd zijn met respectievelijk de vectoren pBAD18 en pGLO. Laatst genoemde vector is pBAD18 met de coderende sequentie voor 'green fluorescent protein' (GFP).

E. coli HB101 stamt af van *E. coli* B en K12, wordt wereldwijd sinds vele jaren in laboratoria gebruikt voor onderzoeks-doeleinden en kent een lange geschiedenis van veilig gebruik. Mede doordat alle bekende virulentiefactoren ontbreken, is de stam niet in staat de menselijke darm te koloniseren. Ook kan HB101 zich niet handhaven in het milieu en heeft de stam een verhoogde gevoeligheid voor UV licht. De vector pBAD18 is gebaseerd op het bekende plasmide pBR322 en bevat geen elementen die niet in de microflora voorkomen. GFP wordt veel gebruikt als lichtgevend markereiwit, en kent een geschiedenis van veilig gebruik.

De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is als betreffende ggm's op Bijlage IIC worden geplaatst. Echter de COGEM merkt op dat wegens het ontbreken van 'quality control' procedures en het ontbreken van een genetische typering, de verificatie van de gebruikte *E. coli* als HB101 stam niet goed mogelijk is. Ook ontbreken 'quality control' procedures met betrekking tot verificatie van de vectoren pBAD18 en pGLO. Als voorwaarde voor toelating tot Bijlage IIC dienen deze 'quality control' procedures en de genetische karakterisatie van *E. coli* HB101 aan het dossier toegevoegd te worden.

Verder merkt de COGEM op dat de aanvraag niet alleen de ggm's maar ook de vervaardiging van deze ggm's betreft. Het is de COGEM onduidelijk of vervaardiging van ggm's onder de reikwijdte van Bijlage IIC valt.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Vrijwaring van gg-*E. coli* voor GGO regelgeving

COGEM advies CGM/091127-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek van Bio-Rad Laboratories B.V. om een tweetal genetisch gemodificeerde micro-organismen (ggm) op de Bijlage IIC van de Europese richtlijn 90/219/EEG te plaatsen. Het betreft twee genetisch gemodificeerde *Escherichia coli* HB101 (gg-*E. coli* HB101) bacteriën die getransformeerd zijn met respectievelijk de vector pBAD18 en pGLO. Deze laatste vector is pBAD18 met de coderende sequentie voor een versterkt 'green fluorescent protein' (GFPuv). Een andere naam voor pGLO is pBAD18-GFPuv.

Door plaatsing van deze twee gg-*E. coli* bacteriën op Bijlage IIC worden ze vrijgesteld van de GGO wetgeving.

Gastheer

De *E. coli* bacterie behoort tot de familie van *Enterobacteriaceae*. *E. coli* komt van nature voor in de darm van warmbloedige dieren. Door verspreiding van dierlijke mest en lozing van rioolwater kan *E. coli* aangetroffen worden in het milieu. In onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van de *E. coli* HB101 stam. Deze laboratoriumstam is een hybride tussen de *E. coli* K12 en de *E. coli* B bacterie¹.

De *E. coli* K12 stam is in 1922 geïsoleerd uit een difteriepatiënt. Door uitvoerige mutagenese en door langdurig gebruik van *E. coli* K12 in laboratoria zijn er varianten ontstaan die alle bekende virulentie genen hebben verloren.² *E. coli* K12 maakt geen toxines, adhesiefactoren of invasiefactoren en bevat geen ijzer-transportstelsel. *E. coli* K12-afgeleiden hebben een defectieve vorm van lipopolysaccharide in het membraan waardoor de stam de menselijke darm niet meer kan koloniseren. Dientengevolge heeft inname van grote hoeveelheden van dit organisme geen effect op de normale darmflora.^{4,5,6} De bacteriestam wordt al sinds 1944 veelvuldig gebruikt in het onderwijs, onderzoek en in industriële settings, maar heeft in deze periode nog nooit geleid tot ziektegevallen.^{4,6} Door de specifieke eigenschappen en het langdurige en veilige gebruik van *E. coli* K12 wordt deze stam als niet-pathogeen beschouwd en is daardoor opgenomen in de lijst van micro-organismen, waarmee veilig gewerkt kan worden op ML-I niveau (Bijlage I van de Regeling GGO).⁷

De *E. coli* B stam stamt af van een normale commensaal uit de humane darm en werd reeds vóór 1918 gebruikt in het laboratorium.⁸ Het laboratoriumgebruik nam na 1940 een vlucht door de keuze voor de *E. coli* B stam als algemene gastheer voor werkzaamheden met bacteriofaag T1-T7.⁹ Analyse van de genen, die betrokken zijn bij *E. coli*-specifieke virulentie toont aan dat de bekende virulentie factoren niet in de geteste *E. coli* B stammen aanwezig zijn.¹⁰ De *E. coli* B stam wordt net als *E. coli* K12 aangemerkt als niet pathogeen en staat vermeld op Bijlage I van de Regeling GGO.

De te gebruiken *E. coli* HB101 wordt algemeen toegepast voor genetische modificatie. Net als beide ouderstammen mist HB101 de virulentie factoren en is deze stam niet in staat de menselijke

darm te koloniseren. Daarnaast wordt deze stam gekenmerkt door de afwezigheid van de zogenaamde Gal, Lac, Pro en Leu genen, waardoor de mogelijkheid dat deze stam zich kan handhaven in het milieu wordt geminimaliseerd.¹ Tevens bevat deze stam een RecA mutatie, waardoor HB101 zeer gevoelig is voor UV licht en de daaruit voortkomende DNA schade.

Vector

De gg-*E. coli* bacteriën worden gecreëerd door expressie-vectoren pBAD18 en pGLO (pBAD18-GFPuv) in te brengen. De ‘backbone’ van pBAD18 wordt gevormd door plasmide pBR322.³ pBR322 is een voor genetische modificatie algemeen toegepaste vector en kent een lange historie van veilig gebruik. Naast de pBR322 ‘backbone’ bevat pBAD18 de pBAD promotor en het *araC* gen. *AraC* is van nature aanwezig in het genoom van *E. coli* bacteriën en reguleert de activiteit van de pBAD pomoter.

In pGLO is aan pBAD18 een sequentie toegevoegd coderend voor GFPuv. GFP is oorspronkelijk afkomstig van de kwal *Aequorea victoria*.^{11,12} Door modificatie van de coderende sequentie is een verhoogd fluorescerend GFP ontwikkeld, GFPuv.¹³ In de aanwezigheid van arabinose en *AraC* wordt de pBAD promotor aangezet tot expressie van GFPuv.

In zowel pBAD18 als pGLO is het antibioticum resistentie gen *bla* aanwezig. Dit gen codeert voor β -lactamase en biedt resistentie tegen ampicilline.

Beoordelingscriteria

Voor plaatsing van genetisch gemodificeerde micro-organismen (ggm's) op Bijlage IIC moeten de betreffende ggm's voldoen aan een aantal criteria. Deze criteria zijn weergegeven in Bijlage IIB van de richtlijn 90/129/EEG en zijn hieronder in het kort weergegeven.^{14,15}

1. De identiteit van de stam moet exact worden bepaald en de modificatie moet bekend en geverifieerd zijn.
2. Er moet gedocumenteerd bewijsmateriaal voor de veiligheid van het organisme worden ingediend.
3. Wanneer de veiligheid nadelig kan worden beïnvloed door instabiliteit, moet stabiliteit worden aangetoond.
4. Het ggm mag bij een mens, plant of dier in goede gezondheid geen ziekte of schade kunnen veroorzaken. Onder pathogeniteit vallen zowel toxigene als allergene werking, zodat het ggm tevens de volgende eigenschappen moet hebben:
 - a. Het ggm mag door de genetische modificatie niet sterker toxigeen worden en het mag geen bekende toxigene eigenschappen hebben.
 - b. Het ggm mag door de genetische modificatie niet sterker allergen worden en het mag geen bekende allergene eigenschappen hebben met bijvoorbeeld een allergene werking die met name vergelijkbaar is met die van de micro-organismen die in Richtlijn 93/88/EEG van de Raad van 12 oktober 1993 tot wijziging van Richtlijn 90/679/EEG betreffende de bescherming van de

werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk worden gespecificeerd.¹⁶

5. Het ggm mag geen bekende adventieve agentia bevatten, zoals actieve of latente andere micro-organismen, die zich aan of in het ggm bevinden en schade aan de gezondheid van de mens of het milieu kunnen toebrengen.
6. Het gemodificeerde genetische materiaal mag geen schade veroorzaken als het wordt overgebracht en mag ook niet met een hogere frequentie zelf-overdraagbaar of over te brengen zijn dan andere genen van het recipiente of ouder-micro-organisme.
7. De ggm's mogen geen directe of vertraagde schadelijke gevolgen voor het milieu hebben wanneer zij onbedoeld in significante hoeveelheden vrijkomen.

De beoordeling van ggm's voor plaatsing op de Bijlage IIC is een Europese procedure, waarvan tot op heden nog geen gebruik is gemaakt. In onderstaande overweging wordt ingegaan op de mate waarin beide ggm's voldoen aan ieder van de bovengenoemde criteria.

Overweging

*Identiteit en verificatie van *E. coli* HB101 en plasmiden*

Eigenschappen van de *E. coli* HB101 stam zijn resistentie tegen streptomycine en gevoeligheid voor ampicilline. Ter identificatie groeit de aanvrager de stam op onder selectieve streptomycine dan wel ampicilline druk. Hierdoor worden vele bacterie stammen uitgesloten, maar dit vormt geen sluitend bewijs voor de identificatie van deze bacteriestam. Voor verdere identificatie van de bacteriestam verwijst de aanvrager naar 'quality control' procedures die voldoen aan ISO 900:2001. Er wordt in de aanvraag echter geen informatie aangeleverd over deze procedures. Ook ontbreekt de bevestiging van het genotype van *E. coli* HB101 zoals die omschreven wordt in de wetenschappelijke literatuur. Door het ontbreken van deze noodzakelijke informatie kan de COGEM niet opmaken of daadwerkelijk gebruik gemaakt wordt van *E. coli* HB101.

E. coli HB101 is genetisch gemodificeerd met plasmiden pBAD18 en pGLO. Beide plasmiden zijn goed gedefinieerd. Eigenschappen van de gg-*E. coli* HB101 stammen zijn resistentie tegen ampicilline en in geval van de gg-*E. coli* HB101 met pGLO expressie van GFPuv onder inductie van arabinose. Ter identificatie van de gg-*E. coli* HB101 stammen wordt alleen de expressie van GFPuv in gg-*E. coli* HB101 met pGLO geverifieerd. Voor verdere identificatie verwijst de aanvrager naar 'quality control' procedures. Er wordt in de aanvraag echter geen informatie aangeleverd over deze procedures.

*Veiligheid van *E. coli* HB101 en plasmiden*

De te gebruiken *E. coli* HB101 stam kent een lange geschiedenis van veilig gebruik en is net als zijn twee ouderstammen, *E. coli* K12 en B, niet in staat de menselijke darm te koloniseren. Tevens blijkt uit de genetische karakteristieken van deze stam dat de kans op overleving en handhaving buiten de kunstmatige laboratoriumomstandigheden verwaarloosbaar klein is.

Het plasmide pBR322 waarvan pBAD18 en pGLO zijn afgeleid kent een lange periode van veilig gebruik. De vector pBAD18 brengt in *E. coli* *araC* en *bla* tot expressie. Beide genen

worden van nature aangetroffen in *E. coli* bacteriën en zijn nooit in verband gebracht met nadelige effecten op mens en milieu.

Naast bovengenoemde genproducten brengt pGLO tevens GFPuv tot expressie. GFP wordt sinds zijn toepassing als marker in 1994 wereldwijd gebruikt in wetenschappelijk onderzoek. Bij de COGEM zijn geen publikaties bekend dat GFP dan wel GFPuv van invloed zijn op het normaal functioneren van cellen.

Genetische stabiliteit

De COGEM is niet bekend met wetenschappelijke studies naar de stabiliteit van onderhavige specifieke combinatie van *E. coli* HB101 met pBAD18 of pGLO. Het is bekend dat *E. coli* HB101 een RecA mutatie bezit waardoor chromosomale integratie van het plasmide wordt voorkomen en de stabiliteit van een exogeen plasmide wordt verhoogd.¹ Voorts zijn de plasmiden afgeleiden van de vector pBR322. Deze vector kent een jarenlang veilig gebruik en wordt beschouwd als genetische stabiel.³ Daarnaast worden de gg-*E. coli* bacteriën onder selectiedruk opgegroeid, waardoor genetische stabiliteit een voorwaarde is om te kunnen overleven. Op basis van deze aspecten acht de COGEM het waarschijnlijk dat beide gg-*E. coli* bacteriën genetisch stabiel zullen zijn.

Overigens wijst de COGEM op het feit dat de ggm's het plasmide spoedig verliezen als er geen selectiedruk wordt gehanteerd. Zij is evenwel van mening dat dit geen milieurisico vormt omdat het verlies van plasmide zal leiden tot het ontstaan van de uitgangsstam *E. coli* HB101.

Toxigene en allergene eigenschappen

E. coli HB101 kent een jarenlange toepassing in laboratoria. Voor zover de COGEM bekend zijn er geen publikaties verschenen waarin toxigene en allergene eigenschappen van *E. coli* K12 en *E. coli* B gemeld worden.

Plasmiden pBAD18 en pGLO coderen niet voor bekende allergenen. Voor GFP is in ratten aangetoond dat er een lage kans op toxigene en allergene eigenschappen bestaat.¹⁸

Daarom heeft de COGEM geen reden om aan te nemen dat bij gg-*E. coli* HB101 met pBAD18 of pGLO toxigene en allergene eigenschappen bestaan.

Aanwezigheid van adventieve agentia

In *E. coli* HB101 is de Lambda profaag latent aanwezig. Als gevolg van DNA schade kan deze profaag aangezet worden tot overgang naar de lytische fase en uit de bacterie vrijkomen. De aanvrager geeft aan dat door de *RecA* mutatie die de *E. coli* HB101 stam kenmerkt, activering van de Lambda profaag voorkomen wordt. Eventuele horizontale genoverdracht door lambda fagen tussen ggm's en niet ggm's acht de COGEM hierdoor onwaarschijnlijk. Daarnaast wijst de COGEM erop dat wildtype *E. coli* bacteriën van nature in grote getalen voorkomen en vele bacteriofagen huisvesten. Zij is derhalve van mening dat eventueel aanwezige bacteriofagen in *E. coli* HB101 reeds in het milieu aanwezig zijn. Samengevat acht de COGEM het milieurisico van mogelijk aanwezige bacteriofagen in de stam HB101 verwaarloosbaar klein.

Overdracht van genetisch materiaal

De plasmiden pBAD18 en pGLO zijn beide afgeleid van het plasmide pBR322. Dit plasmide wordt al jaren gebruikt voor de bestudering van genen en genfuncties.³ Een van de kenmerken van pBR322 en daarvan afgeleide plasmiden is dat dit type plasmide niet overdraagbaar is door conjugatie van bacteriecellen. Bovendien mist de *E. coli* HB101 stam het zogenaamde 'Fertility' plasmide, waarop de voor conjugatie benodigde transfer of *tra* genen liggen. Door deze combinatie van eigenschappen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er genetisch materiaal overgedragen zal worden tussen ggm's en niet-ggm's.

Schadelijke effecten van ggm's op milieu

Bij het onbedoeld vrijkomen van significante hoeveelheden *E. coli* HB101 in het milieu acht de COGEM de kans op overleving van het ggm minimaal. Zelfs grote aantallen *E. coli* K12 bacteriën kunnen maar een zeer korte periode overleven in de natuur. Ze worden geconsumeerd door aquatische organismen en zijn nauwelijks in staat zich te repliceren.¹⁷ Bovendien is *E. coli* HB101 ten opzichte van *E. coli* K12 extra gevoelig voor UV licht als gevolg van de RecA mutatie. Met betrekking tot de aanwezigheid van het *araC* gen en de resistentie tegen ampicilline in de ggm's verwacht de COGEM geen nadelig effecten aangezien deze genen reeds wijdverbreid voorkomen in de natuur. Daarbij merkt de COGEM op dat in het milieu zonder selectiedruk *E. coli* HB101 bacteriën het plasmide pBAD18 of pGLO snel verliezen zodat het uitgangsgenotype weer ontstaat. Ondanks veelvuldig en jarenlang gebruik van *E. coli* HB101 zijn er geen ongevallen bekend als gevolg van het gebruik van deze stam.

De COGEM is derhalve van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zullen zijn bij een onbedoeld vrijkomen van significante hoeveelheden van betreffende ggm's.

Advies

E. coli HB101 stamt af van *E. coli* B en K12, wordt wereldwijd sinds vele jaren in laboratoria gebruikt voor onderzoeks-doeleinden en kent een lange geschiedenis van veilig gebruik. Mede doordat alle bekende virulentiefactoren ontbreken, is de stam niet in staat de menselijke darm te koloniseren. Ook kan *E. coli* HB101 zich niet handhaven in het milieu en heeft de stam een verhoogde gevoeligheid voor UV licht.

Vectoren pBAD18 en pGLO zijn gebaseerd op het bekende plasmide pBR322 en bevatten geen elementen die niet in de microflora voorkomen. GFP, aanwezig in pGLO, wordt veel gebruikt als lichtgevend markereiwit en kent een geschiedenis van veilig gebruik.

Wegens het ontbreken van 'quality control' procedures is de COGEM van mening dat verificatie van de gebruikte *E. coli* HB101 stam niet goed mogelijk is. De bevestiging van het genotype van *E. coli* HB101, zoals die omschreven wordt in de wetenschappelijke literatuur, ontbreekt. Door het ontbreken van deze noodzakelijke informatie kan de COGEM niet opmaken of daadwerkelijk gebruik gemaakt wordt van *E. coli* HB101.

Plasmiden pBAD18 en pGLO zijn goed gedefinieerd. Ter identificatie van de met pBAD18 en pGLO gg-*E. coli* HB101 stammen wordt alleen de expressie van GFP_{uv} in gg-*E. coli* HB101 met

pGLO geverifieerd. Voor verdere identificatie verwijst de aanvrager naar de 'quality control' procedures. Er wordt in de aanvraag echter geen informatie aangeleverd over deze procedures.

Samengevat is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is als de betreffende ggm's op Bijlage IIC worden geplaatst. Echter de COGEM merkt op dat de aanvrager geen 'quality control' procedures overlegt die bevestigen dat het hier daadwerkelijk *E. coli* HB101 en plasmides pBAD18 dan wel pGLO betreffen. Deze 'quality control' procedures moeten aan het dossier toegevoegd worden, voordat de beschreven ggm's in Bijlage IIC opgenomen kunnen worden.

Additionele opmerking

De COGEM wijst erop dat de aanvraag betrekking heeft op een zogenaamde kit voor scholingsdoeleinden. Met deze kit kunnen *E. coli* bacteriën getransformeerd worden met een lichtgevend marker (GFP). Dit betekent dat de aanvraag niet alleen de twee ggm's (HB101 met pBAD18 en pGLO) betreft, maar ook de vervaardiging van de ggm's.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van zowel de betreffende ggm's als de vervaardiging van deze ggm's verwaarloosbaar klein. Echter, mede gezien de gehanteerde criteria in Bijlage IIB, is het de COGEM niet duidelijk of vervaardiging van ggm's onder de reikwijdte van Bijlage IIC valt.

Referenties

1. Boyer HW *et al.* (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472
2. Mühldorfer L & Hacker J (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Pathog.* **16**:171-181
3. Bolivar F *et al.* (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113
4. Kuhnert P & Frey J (1996). Identification and monitoring of *Escherichia coli* K-12 safety strains. Tools for safety assessment www.bats.ch/bats/publikationen/1996-1_e.coli/96-1_e-coli_k12.php?lang_select=de (06-07-2007)
5. Smith HW (1975). Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of human. *Nature* **255**:500-502
6. TSCA (1997). *Escherichia coli* K-12 derivatives final risk assessment www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra004.htm (18-11-2009)
7. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2004)
8. Jeong H *et al.* (2009) Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**:644-652
9. Daegelen P *et al.* (2009) Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**:634-643
10. Kuhnert P *et al.* (1997) Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:703-709

11. Prasher DC *et al.* (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. **111**:229-233
12. Prasher DC (1995). Using GFP to see the light. *Trends in Genetics* **11**:320-323
13. Cramer A *et al.* (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotech.* **14**:315-319
14. Europese Gemeenschappen (2001). Beschikking van de Raad van 8 maart 2001. website: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:073:0032:0034:NL:PDF> (18-11-2009)
15. Europese Unie (2005). Beschikking van de commissie van 28 februari 2005. website: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:059:0020:0026:NL:PDF> (18-11-2009)
16. Europese Gemeenschappen (1993). Richtlijn 93/88/EEG van de Raad van 12 oktober 1993. website: [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993L0088: NL: HTML](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993L0088:NL:HTML) (18-11-2009)
17. Brettar I & Höfle MG (1992). Influence of ecosystematic factors on survival of *Escherichia coli* after large-scale release into lake water mesocosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2201-2210
18. Richards HA *et al.* (2003). Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to weaned rats. *J. Nutr.* **133**:1909-1912