

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
dhr. J.J. Atsma  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 26 november 2010  
**KENMERK** CGM/101126-01  
**ONDERWERP** Advies inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde  
*Macrostomum lignano* platwormen

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 10-075 met de titel 'Role of small RNAs in development and regeneration' van het Hubrecht Instituut van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW), deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) platworm *Macrostomum lignano*. De aanvrager is voornemens gg-*M. lignano* te vervaardigen door genen die betrokken zijn bij de regulatie van kleine RNA's afkomstig uit *M. lignano* en *Isodiametra pulchra* in eencellige *M. lignano* embryo's te injecteren. *M. lignano* is nog niet eerder als gastheer door de COGEM beoordeeld.

*M. lignano* is een hermafrodiete, vrij-levende platworm van ongeveer 1-1,5 mm lang en 150 µm breed. Natuurlijke *M. lignano* populaties komen voor op stranden rond de Adriatische zee die tijdens vloed onder water lopen. Omdat het wormpje eenvoudig kan worden gekweekt, gemakkelijk kan worden gekleurd en eenvoudig te ontleden is, wordt het gezien als een goed modelorganisme in de ontwikkelings- en (stam)celbiologie.

Het wormpje wordt al geruime tijd in verschillende laboratoria over de wereld bestudeerd zonder dat er negatieve effecten zijn gerapporteerd. De worm heeft verder geen commensale of parasitaire relatie met de mens en de COGEM is ook niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat *M. lignano* pathogeen is voor dieren of planten. De COGEM is daarom van mening dat *M. lignano* beschouwd kan worden als apathogeen en dat handelingen met deze platworm kunnen plaatsvinden op ML-I niveau.

De COGEM is van mening dat er geen aanwijzingen zijn dat het genoom van *M. lignano* en *I. pulchra* voor schadelijke genproducten coderen. De COGEM is ook niet bekend met andere vrij-levende platwormen die schadelijke genproducten produceren.

Gebaseerd op de indeling van *M. lignano* in pathogeniteitsklasse 1 en de afwezigheid van schadelijke genproducten in *M. lignano* en *I. pulchra*, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu, bij de voorgenomen werkzaamheden, verwaarloosbaar klein.

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 on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

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

*Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van Dr. R. Sluys, werkzaam bij het Zoölogisch Museum Amsterdam en het Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics te Amsterdam.*

# Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Macrostomum lignano* platwormen

## COGEM advies CGM/101126-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde platworm *Macrostomum lignano*. De aanvrager wil onderzoek doen naar de rol van kleine RNAs bij de ontwikkeling en regeneratie van *M. lignano*. De aanvrager is voornemens genen die betrokken zijn bij de regulatie van kleine RNA's afkomstig uit *M. lignano* en *Isodiametra pulchra* in eencellige *M. lignano* embryo's te injecteren.

De COGEM is tevens gevraagd te adviseren over de noodzaak van karakterisering van PCR fragmenten afkomstig uit *M. lignano* en *I. pulchra* voorafgaand aan klonering in *E.coli*. *M. lignano* is nog niet eerder als gastheer door de COGEM beoordeeld.

### *Macrostomum lignano*

*M. lignano* is een kleine, transparante, niet-parasitaire platworm die behoort tot het fylum *Platyhelminthes*, familie *Macrostomidae*. Natuurlijke *M. lignano* populaties komen voor op stranden rond de Adriatische zee die tijdens vloed onder water lopen.<sup>1</sup>

*M. lignano* is een hermafrodit met een gemiddelde levensduur van ongeveer 30 weken.<sup>2</sup> Volwassen *M. lignano* wormen zijn ongeveer 1-1,5 mm lang en 150 µm breed en bevatten ongeveer 25.000 cellen. Ongeveer 1600 hiervan zijn stamcellen die een belangrijke rol spelen tijdens de voorplanting, ontwikkeling en regeneratie van de worm.<sup>1</sup>

Volwassen wormen produceren ongeveer 1 ei per dag. Bij 20 graden Celsius duurt de embryonale ontwikkeling in het ei ongeveer vijf dagen. De postembryonale ontwikkeling van de wormen naar het volwassen stadium duurt ongeveer 2 weken.<sup>1</sup>

Aangezien het wormpje eenvoudig kan worden gekweekt, gemakkelijk kan worden gekleurd en eenvoudig te ontleden is, wordt het gezien als een goed modelorganisme in de ontwikkelings- en (stam)celbiologie.<sup>1</sup>

### *Isodiametra pulchra*

*I. pulchra* is een kleine, ongepigmenteerde, traanvormige worm van ongeveer 1 mm lang en 365 µm breed behorend tot het fylum *Acoelomorpha*, familie *Isodiametridae*. De worm werd in 1991 voor het eerst ontdekt in modderige zandstranden langs de Atlantische kust van Noord Amerika.<sup>3</sup>

Volwassen *I. pulchra* wormen produceren ongeveer 1 ei per dag. Bij 20 graden Celsius duurt de embryonale ontwikkeling in het ei ongeveer drie dagen.

In 2009 werd de worm, onder andere vanwege de aanwezigheid van grote hoeveelheden stamcellen, het kweekgemak, de grootte van de worm en de korte generatietijd, geïntroduceerd als potentieel nieuw modelorganisme in de ontwikkelings- en (stam)celbiologie.<sup>4</sup>

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is voornemens genen die direct of indirect een functie hebben in het regulatienetwerk van kleine RNA's te isoleren uit *M. lignano* en *I. pulchra*. De sequenties worden gekloneerd in *E. coli*.

De genetische modificatie van de worm zal plaatsvinden door middel van een groot aantal expressievectoren. De geselecteerde genen (gefuseerd met het 'Green Fluorescent Protein' of het 'Red Fluorescent Protein') worden met behulp van een Eppendorf micromanipulator in eencellige *M. lignano* embryo's geïnjecteerd. De geïnjecteerde eieren worden in medium (zeewater) in petrischaaltjes gegroeid en gehouden in een gesloten plastic doos tot het uitkomen van de eieren.

Na het uitkomen van de eieren worden de wormen verder gekweekt en gekruist in medium in petrischaaltjes in een gesloten plastic doos. Handelingen en kweek zullen volgens de aanvrager plaatsvinden in een laboratorium op ML-I inperkingsniveau. Verder zal kortdurende confocale microscopie op levende wormen en regenererende fragmenten buiten inperking plaatsvinden.

### **Pathogeniteitsklassen**

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is gekoppeld aan de pathogeniteitsklasse van het organisme. Voor een correcte inschaling van de werkzaamheden is het van belang te weten tot welke pathogeniteitsklasse het organisme behoort. Volgens de 'Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen' worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.<sup>5</sup> Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. De criteria voor indeling in pathogeniteitsklassen zijn als volgt gedefinieerd:

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 1** is van toepassing op een micro-organisme dat in ieder geval voldoet aan een van de volgende voorwaarden:
  - o het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
  - o het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
  - o het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
  - o van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond.
  
- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.
- Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat.

### Overweging en advies

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een (micro-)organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van (micro-)organismen. Hierdoor is van veel (micro-)organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden dat effecten mogelijk moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste (micro-)organismen apathogeen. Daarom worden (micro-)organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

*M. lignano* is een vrij-levende platworm die voorkomt in en rond de Adriatische zee. Sinds zijn ontdekking in 1995 wordt de worm in verschillende laboratoria over de wereld bestudeerd zonder dat hierbij sprake lijkt te zijn van bijzondere inperkende maatregelen. Er zijn tot dusver geen negatieve effecten gerapporteerd. De worm heeft verder geen enkele commensale of parasitaire relatie met de mens. De COGEM is ook niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat *M. lignano* pathogeen is voor dieren of planten. Op basis van deze gegevens beschouwt de COGEM *M. lignano* als apathogeen.

De aanvrager is voornemens genen afkomstig uit *M. lignano* en *I. pulchra* in eencellige *M. lignano* embryo's te injecteren. Op dit moment zijn het genoom van *M. lignano* en *I. pulchra* nog niet volledig gesequenced. Wel zijn van *M. lignano* en *I. pulchra* respectievelijk ongeveer 23000 en 14.000 'Expressed Sequence Tags' (ESTs) gesequenced. Dit zijn kleine stukjes DNA van ongeveer 200 tot 500 nucleotiden die worden gegenereerd middels het sequencen van één of beide uiteinden van een tot expressie gebracht gen.<sup>6</sup> Functionele analyse van de ESTs heeft tot dusver geen schadelijke genen aan het licht gebracht. De COGEM is ook niet bekend met andere vrij-levende platwormen die schadelijke genproducten produceren. De COGEM is daarom van mening dat er geen aanwijzingen zijn dat de genomen van *M. lignano* en *I. pulchra* voor schadelijke genproducten coderen.

Op basis van het bovenstaande is de COGEM van mening dat handelingen met gg- *M. lignano* kunnen plaatsvinden op ML-I niveau. Gezien de onwaarschijnlijkheid dat *M. lignano* en *I. pulchra* schadelijke genproducten produceren, acht de COGEM karakterisering van de PCR fragmenten voorafgaand aan klonering in *E.coli* niet noodzakelijk.

### **Conclusie**

Gebaseerd op de indeling van *M. lignano* in pathogeniteitsklasse 1 en de afwezigheid van schadelijke genproducten in *M. lignano* en *I. pulchra*, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu, bij de voorgenomen werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau, verwaarloosbaar klein.

### **Referenties**

<sup>1</sup> Ladurner P. *et al* (2008). The stem cell system of the basal flatworm *Macrostomum lignano*. In Stem Cells: From Hydra to Man. Editor Prof. Dr. Thomas C.G. Bosch. Springer Science + Business Media B.V

<sup>2</sup> Mouton S. *et al* (2009). The free-living flatworm *Macrostomum lignano*: a new model organism for ageing research. *Exp. Gerontol.* 44: 243-249

<sup>3</sup> Smith & Bush (1991). *Convoluta pulchra* n. sp. (Turbellaria: Acoela) from the East coast of North America. *Trans. Am. Microsc. Soc* 110: 12-26

<sup>4</sup> De Mulder *et al.* (2009). Characterization of the stem cell system of the acoel *Isodiametra pulchra*. *BMC Dev Biol* 9: 69-85

<sup>5</sup> Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen.

<sup>6</sup> ESTs: Gene discovery made easier. [www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html)