

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

DATUM: 9 januari 2012  
KENMERK: CGM/120109-02  
ONDERWERP: Advies ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sponscellen

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sponscellen, gemmulae en larven in het kader van de vergunningaanvraag 'Ontwikkeling van continue spons cellijnen' (IG 11-086) van de Wageningen Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

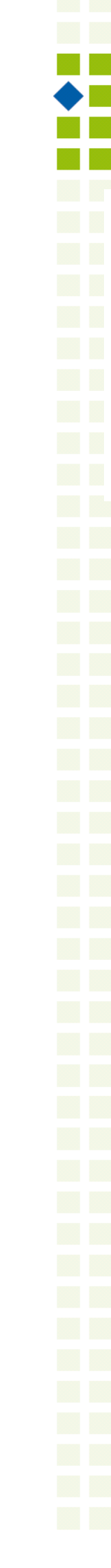
De COGEM is verzocht te adviseren over het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde cellen en celgroepen van de sponssoorten: *Haliclona oculata*, *Haliclona xena*, *Dysidae avara*, *Crambe crambe* en *Ephydatia fluviatilis*. De eerst vier soorten komen in zoutwater voor, de laatste in zoetwater. De sponzen *H. oculata* en *H. xena* worden aangetroffen in de Nederlandse kustwateren.

De aanvrager is van plan de cellen van genoemde sponssoorten te transfecteren met reportergenen, om te onderzoeken op welke wijze sponscellen het best getransfecteerd kunnen worden en welke promotoren geschikt zijn voor gebruik in deze sponscellen. Na analyse van het resultaat van de transfectie worden de gg-sponscellen vernietigd.

Voorzover bekend bij de COGEM zijn de genoemde sponssoorten niet geassocieerd met pathogeniteit. Gebaseerd op de jarenlange ervaring met de betreffende reportergenen acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat het apathogene karakter van de sponzen door voorgenomen transfecties zal veranderen.

Sponzen hebben een groot regeneratief vermogen. Hierdoor kan de COGEM niet uitsluiten dat sponscellen als zij in het juiste milieu terecht komen, uitgroeien tot een volwassen organisme en zich kunnen voortplanten. Voor voorgenomen werkzaamheden zal gebruik worden gemaakt van transfecties met plasmide DNA zonder, voor zover bekend, integratiemechanismen, waardoor de reportergenen geleidelijk uit de celweek zullen verdwijnen. Als gg-sponscellen onvoorzien uit het laboratorium in het voor groei juiste milieu terecht komen, acht de COGEM de kans daarom verwaarloosbaar klein dat er uit deze gg-sponscellen een volwassen gg-spons zal ontstaan.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met gg-cellen en celgroepen van genoemde sponssoorten uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de hiervoor geldende werkvoorschriften, acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met sponscellen voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,



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. Rob van Soest, afdeling Marine Zoölogie aan het Nederlands Centrum voor Biodiversiteit (NCB Naturalis) te Leiden.*

# Ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde sponscellen

## COGEM advies CGM/120109-02

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde cellen, gemmulae en larven van sponzen. Het betreft hier een aanvraag voor de sponzen *Haliclona oculata*, *Haliclona xena*, *Dysidae avara*, *Crambe crambe* en *Ephydatia fluviatilis*. De aanvrager wil onderzoeken op welke wijze de cellen, gemmulae en larven getransfecteerd kunnen worden en welke promotoren geschikt zijn voor gebruik in de sponzen. Daartoe zal de aanvrager alleen gebruik maken van de reporterergenen die coderen voor het zogenaamde 'Green Fluorescence Protein' (GFP) en Luciferase. Na analyse van het resultaat van de transfectie worden de gg-cellen, gemmulae en larven van genoemde sponzen vernietigd. De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde sponzen of sponscellen.

### Sponsdieren

#### *Anatomie van de sponsdieren*

De Porifera of sponsdieren zijn sedentaire primitieve meercellige dieren die zich onder andere vastzetten op de bodem van zeeën, oceanen, meren en rivieren. Een spons heeft een relatief eenvoudige bouw en is opgebouwd uit een beperkt aantal celtypen.<sup>1,2</sup> De verschillende cellen zijn ingebed in een gelatineachtige matrix dat mesoglea of mesenchyme wordt genoemd. Deze matrix vormt het bindweefsel van het sponslichaam en wordt ondersteund door een skelet. Dit skelet bestaat uit twee hoofdcomponenten. De eerste component is een vezelnetwerk van het eiwit spongine. De tweede component wordt gevormd door zogenaamde skeletnaalden (spicula). Deze skeletnaalden bestaan uit aggregaten van calciumcarbonaat of silica. De classificatie van de sponzen is mede gebaseerd op het type skeletnaalden, waaruit het skelet bestaat.

Alle sponzen voeden zich door uit het water kleine deeltjes te filteren. Daartoe bezitten sponzen een netwerk van kanaaltjes. De kanaaltjes starten aan de buitenkant van de spons in zogenaamde poriën en monden uiteindelijk uit in het zogenaamde osculum. De kanaaltjes zijn bedekt met kraagcellen (choanocyten) die voorzien zijn van een zweefhaar. Door de beweging van de zweefpharen wordt een binnenwaartse stroming gecreëerd van poriën naar osculum. De kraagcellen zijn ook van belang bij het opvangen van voedsel.<sup>1,2</sup>

Binnen de sponsdieren zijn ruwweg drie typen kanaalsystemen te onderscheiden. Het zogenaamde asconoïde kanaalsysteem is het meest eenvoudige systeem waarin de kanaaltjes zich niet vertakken. Het zogenaamde syconoïde kanaalsysteem is een gecompliceerder netwerk van kanaaltjes met verscheidene aftakkingen. Het derde type, het zogenaamde leuconoïde systeem, is het meest complexe en vertakte netwerk. De sponssoorten waarvoor vergunning wordt aangevraagd, bezitten allen het leuconoïde kanaalsysteem, dat kenmerkend is voor de klasse Demospongiae.

#### *Voortplanting*

Sponzen kunnen zich zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk voortplanten.<sup>1,2</sup> Bij de ongeslachtelijke voortplanting laten fragmenten of speciale groepen cellen van de spons los

en kunnen tot een nieuwe spons uitgroeien. Indien dit plaatsvindt aan de buitenkant van de spons spreekt men van knopvorming. De groepen cellen die zich aan de binnenkant van de spons ontwikkelen, worden gemmulae genoemd. Een gemmula bevat veel kraagcellen en is omgeven door skeletnaalden.

Sponsdieren kunnen zich ook geslachtelijk voortplanten. Ze zijn over het algemeen hermafrodit, maar kunnen niet tegelijkertijd het vrouwelijke en mannelijke geslacht aannemen. De sponsdieren wisselen hun geslacht veelal af. De sponzen hebben geen permanente geslachtsklieren. De zaad- of eicellen worden geproduceerd in een aantal gebieden, waarvan de cellen gedurende de reproductieve periode differentiëren. De spermacellen komen vrij in de omgeving via het osculum van de spons. Ze worden gevangen in het kanaalsysteem van een andere spons en kunnen daar als het een vrouwelijke spons betreft de aanwezige eicellen bevruchten. De bevruchte eicellen ontwikkelen zich vervolgens tot larven. De larven verblijven een bepaalde periode in de spons waarna ze worden vrijgelaten in het omringende water. Na een vrijlevend stadium hechten de larven zich aan de bodem en groeien uit tot een nieuwe spons.

### **Eigenschappen van te gebruiken sponssoorten**

De aanvrager geeft aan dat de sponssoorten die hij wil gaan gebruiken al veelvuldig zijn onderzocht en toegepast in laboratoria. De aanvrager stelt dat uit het laboratoriumgebruik geen toxiciteit of pathogeniteit van deze sponssoorten is gebleken. Het onderzoek heeft wel uitgewezen dat de sponssoorten *Crambe crambe* en *Dysidae avara* bio-actieve stoffen aanmaken ter verdediging tegen predatoren en micro-organismen. Voorzover bekend produceren de overige drie soorten geen bio-actieve stoffen.

#### *Haliclona oculata*

De spons *Haliclona oculata*, in het Nederlands Geweispons genoemd, behoort binnen de klasse Demospongiae tot de familie der Chalinidae.<sup>3,4</sup> De *H. oculata* is een boomvormige vertakte spons. Deze spons komt algemeen voor in de zoute wateren van Nederland. De Geweispons kan echter ook tegen lagere zoutgehalten waardoor deze spons zich goed kan handhaven in verschillende biotopen, waaronder riviermondingen. De spons wordt aangetroffen in het hele Noordoost-Atlantische gebied (inclusief de Oostzee) en aan de Noord-Amerikaanse oostkust van Labrador tot North Carolina.<sup>4</sup>

#### *Haliclona xena*

De spons *Haliclona xena*, in het Nederlands Paarse buisjesspons genoemd, behoort binnen de klasse Demospongiae tot de familie der Chalinidae.<sup>3,4</sup> Deze spons vormt een brede korst met daarop vrij brede pijpjes tot vijf centimeter hoog. De Paarse buisjesspons is in Nederland voor het eerst waargenomen in 1977 in de Oosterschelde en komt algemeen voor in de Zeeuwse delta. De soort is echter niet inheems en waarschijnlijk geïmporteerd met oesters. De spons komt voor in de getijdzone en iets beneden de laagwaterlijn. De Paarse buisjesspons kan zich ook goed handhaven in brak water.<sup>3,4</sup>

#### *Dysidae avara*

De spons *Dysidae avara* behoort binnen de klasse Demospongiae tot de familie der Dysideidae.<sup>3</sup> Het is een roze-paarse massieve spons met vele zogenaamde conules (holle kegels) die tot 4 mm hoog zijn en 2-5 mm uit elkaar staan. Deze spons is een marine spons en

wordt aangetroffen in de Middellandse Zee en aan de kust van Galicië.<sup>5</sup> Deze spons produceert het bio-actieve avarol dat zowel een anti-tumor als anti-virale werking heeft.<sup>6</sup>

#### *Crambe crambe*

*Crambe crambe* behoort binnen de klasse Demospongiae tot de familie der Crambeidae.<sup>3</sup> *C. crambe* is een marine spons en komt voor in de kustgebieden van de Middellandse Zee en de Atlantische Oceaan.<sup>7</sup> In de Middellandse Zee is het een van de meest voorkomende sponzen. *C. crambe* produceert zogenaamde crambinen en crambescidinen. Deze bio-actieve verbindingen hebben een anti-tumor en anti-virale werking bij de mens.<sup>6,8</sup>

#### *Ephydatia fluviatilis*

*Ephydatia fluviatilis* behoort binnen de klasse Demospongiae tot de familie der Spongillidae.<sup>3</sup> *E. fluviatilis* is een zoetwaterspons en wordt wereldwijd aangetroffen.<sup>9,10</sup> Deze spons is goed bestand tegen stress veroorzaakt door veranderingen in de omgeving. Dit is mede te danken aan de asexuele reproductie, waarbij gemmula worden afgescheiden.<sup>1,11</sup> Deze gemmulae kunnen perioden van uitdroging en bevroering overleven.

### **Overwegingen**

In onderhavige aanvraag is de aanvrager van plan de sponscellen, gemmulae en larven van *Haliclona oculata*, *Haliclona xena*, *Dysidae avara*, *Crambe crambe* en *Ephydatia fluviatilis* transiënt te transfecteren met de reporter genen voor GFP en Luciferase. Door expressie van de reporter genen kan het resultaat van de transfectie eenvoudig worden bepaald.

Voorzover bij de COGEM bekend zijn deze sponssoorten in de wetenschappelijke literatuur niet geassocieerd met pathogeniteit. Op basis van de jarenlange ervaring met de reporter genen voor GFP en Luciferase acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de expressie van deze reporter genen hier verandering in zal brengen. Tevens acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat de aanwezigheid van reporter genen van invloed is op de fitness van de sponscellen.

De vergunningaanvraag betreft werkzaamheden met genetisch gemodificeerde cellen, gemmulae en larven van vijf verschillende sponssoorten. Taxonomisch gezien kunnen de cellen van de sponzen beschouwd worden als animale cellen.

Tot nog toe heeft de COGEM alleen geadviseerd over de genetische modificatie van animale cellen die niet kunnen regenereren tot het oorspronkelijke organisme en die over het algemeen zeer kwetsbaar zijn als ze buiten het laboratorium terecht komen. Deze situatie geldt echter niet voor sponscellen. In tegenstelling tot de eerder genoemde groep van dierlijke cellen kunnen (groepen van) sponscellen wel regenereren tot het oorspronkelijke organisme. Als sponscellen, gemmulae of larven in het juiste milieu gebracht worden, kan de COGEM derhalve niet uitsluiten dat deze uitgroeien tot een volwassen organisme en zich voortplanten.

De sponzen zullen gekweekt worden in gesteriliseerde media in multi-well platen, petrischalen en T-flessen. De aanvrager geeft aan dat al het gebruikte materiaal waaronder media, gemmulae, pipetten etc. wordt afgevoerd als ggo materiaal in daarvoor bestemde containers voor inactivatie. Door inactivatie van al het materiaal dat eventueel met het ggo in aanraking is geweest, wordt onbedoelde verspreiding uit het laboratorium voorkomen.

Met betrekking tot de voorgenomen werkzaamheden wijst de COGEM tevens op het feit dat het hier een transfectie betreft van naakt DNA zonder, voor zover bekend,

integratiemechanismen, en de cellen worden gekweekt zonder selectiedruk. Hierdoor zal het DNA niet actief in het genoom van de sponscellen worden geïntegreerd en biedt de vector met de reporter genen de cellen geen groeivoordeel. Daarom zal het DNA met de reporter genen slechts tijdelijk in de sponscellen aanwezig zijn en geleidelijk uit de celkweek verdwijnen. De COGEM is om deze reden van mening dat de gg-sponscellen na verloop van tijd hun oorspronkelijke genotype terug zullen krijgen.

Op basis van bovenstaande acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de gg-sponscellen, larven of gemmulae die door onvoorzien verspreiding buiten het laboratorium in het juiste milieu terecht komen, uit zullen groeien tot een volwassen gg-spons.

### Advies

Op basis van bovenstaande overweging adviseert de COGEM de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde cellen, gemmulae en larven van de vijf sponssoorten: *Haliclona oculata*, *Haliclona xena*, *Dysidea avara*, *Crambe crambe* en *Ephydatia fluviatilis* uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de werkvoorschriften die hiervoor gelden, acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met sponscellen, gemmulae of larven voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### Referenties

1. Earthlife. The Phylum Porifera. [www.earthlife.net/inverts/porifera.html](http://www.earthlife.net/inverts/porifera.html) (6 januari 2012)
2. Wikipedia (2011). Sponsdieren. <http://nl.wikipedia.org/wiki/Sponsdieren> (6 januari 2012)
3. World Register of Marine Species (WoRMS). Taxa. [www.marinespecies.org](http://www.marinespecies.org) (6 januari 2012)
4. Analyse Educatie en Marien Oecologisch ONderzoek (Stichting ANEMOON) (2008). Soortinformatie. [www.anemoon.org/anemoon/soortinformatie/sponzen/](http://www.anemoon.org/anemoon/soortinformatie/sponzen/) (6 januari 2012)
5. Marine Species Identification Portal (1994). Sponges of the NE Atlantic. [http://species-identification.org/species.php?species\\_group=sponges&id=213](http://species-identification.org/species.php?species_group=sponges&id=213) (6 januari 2012)
6. Caralt de, S. *et al.* (2007) Cultivation of sponge larvae: Settlement, survival and growth of juveniles. *Mar. Biotechnol.* 9:592-605
7. Duran S. *et al.* (2004). Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Peocilosclerida). *Mar. Biol.* 144:31-35
8. Ottinger S *et al.* (2011). Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract. *Int. J. Cancer* (epub ahead of print)
9. Meixner M.J. *et al.* (2007). Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45:875-886
10. Gaino E. *et al.* (2004) The consortium of the sponge *Ephydatia fluviatilis* (L.) living on the common reed *Phragmites australis* in Lake Piediluco (central Italy). *Hydrobiologia* 560:165-178
11. Gigliarelli L. *et al.* (2008). Applications of PCR-RFLPs for differentiating two freshwater sponges: *Ephydatia fluviatilis* and *Ephydatia mülleri*. *Hydrobiologia* 605:265-269

*Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. Rob van Soest, afdeling Marine Zoölogie aan het Nederlands Centrum voor Biodiversiteit (NCB Naturalis) te Leiden*