

Aan de staatssecretaris
van Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 2 mei 2013
KENMERK CGM/130502-02
ONDERWERP Advies Grootschalige productie palmitase m.b.v. gg-*Pseudomonas*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 12-082 met de titel 'Genetisch gemodificeerde *Pseudomonas fluorescens* stammen als groep I ggo's, waarmee activiteiten op MI-I en MI-II niveau mogen worden uitgevoerd' deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor de grootschalige productie van het enzym palmitase met behulp van de gg-*Pseudomonas fluorescens* stam BD29241. De COGEM is gevraagd of de wildtype uitgangsstam *P. fluorescens* MB101 en de uit MB101 verkregen gg-deletiemutant *P. fluorescens* DC454 geïncubatie kunnen worden als klasse 1 pathogeen en geschikt zijn voor de vervaardiging van ggo's waarmee zogenaamde grootschalige productiehandelingen kunnen worden uitgevoerd (IAB erkenning). Verder is de COGEM gevraagd of de gg-*P. fluorescens* stam BD29241 onder MI-I inperkingsniveau gebruikt kan worden. De productiestam BD29241 is verkregen uit deletiemutant *P. fluorescens* DC454, door een plasmide in te brengen met onder meer het palmitase-gen.

P. fluorescens MB101 kent een historie van veilig gebruik, en is niet geassocieerd met ziekteverwekkende eigenschappen. De COGEM is van mening dat MB101 een niet pathogeen micro-organisme is. *P. fluorescens* DC454 is een gg-deletiemutant van MB101. Deze stam is auxotroof en daardoor biologisch ingeperkt. In de productiestam *P. fluorescens* BD29241 is de auxotrofie van DC454 door de inbreng van het plasmide en de daarop aanwezige genen opgeheven. BD29241 is echter waarschijnlijk verzwakt ten opzicht van MB101 door metabole stress vanwege de expressie van het palmitase. Het ingebrachte plasmide is niet overdraagbaar en bevat geen schadelijke genen of genen die een fitnessvoordeel in het milieu bieden.

De COGEM adviseert de *P. fluorescens* stammen MB101 en DC454 in te schalen in pathogeniteitsklasse 1 en op Bijlage 1 te plaatsen (IAB erkenning). De COGEM acht de risico's voor mens en milieu van grootschalige productieactiviteiten met *P. fluorescens* BD29241 op (het laagste) MI-I inperkingsniveau 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, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Grootschalige productie van palmitase met behulp van genetisch gemodificeerde *Pseudomonas fluorescens*

COGEM advies CGM/130502-02

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag van DSM Food Specialities betreffende de grootschalige productie van het enzym palmitase met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) *Pseudomonas fluorescens* stam BD29241. De productie van het palmitase zal in eerste instantie worden uitgevoerd op proeffabrieksschaal. Daartoe zal stam BD29241 opgekweekt worden in fermentoren met een maximaal volume van 4000 liter. De aanvrager wil deze productie uitvoeren onder MI-I inperkingsniveau.

In het kader hiervan is de COGEM gevraagd of de wildtype stam *P. fluorescens* MB101 en de uit MB101 verkregen gg-deletiemutant *P. fluorescens* DC454 geclassificeerd kunnen worden in pathogeniteitsklasse 1 en geschikt zijn voor de vervaardiging van ggo's waarmee zogenaamde grootschalige handelingen (categorie B) kunnen worden uitgevoerd (IAB erkenning). Verder is de COGEM gevraagd of de gg-*P. fluorescens* stam BD29241 onder MI-I gebruikt kan worden. Stam BD29241 is verkregen uit deletiemutant *P. fluorescens* DC454 door het plasmide pDOW1169 in te brengen. In dit plasmide is een gen coderend voor palmitase gekloneerd.

1.1 *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens is een gramnegatieve staafvormige bacterie en bezit geen sporenvormende eigenschappen.¹ De bacterie komt voor in de bodem en is alom in het milieu aanwezig.^{1,2,3}

Klinische isolaten van *P. fluorescens* zijn gevonden als commensaal in de menselijke darm. *P. fluorescens* isolaten zijn in staat bij 37°C te groeien en kunnen een reeks van ziektebeelden veroorzaken in (immuun)verzwakte mensen. De bacteriesoort wordt voor de mens beschouwd als een opportunistisch pathogeen.^{1,3} Doordat de soort veelvuldig in het milieu wordt aangetroffen, kan *P. fluorescens* materialen besmetten die bedoeld zijn schoon of steriel te blijven voor medische toepassingen. Als *P. fluorescens* aanwezig is in klinisch patiëntmateriaal, is er doorgaans sprake van contaminatie tijdens een ingreep of andere medische handeling.^{2,3}

P. fluorescens komt als commensaal voor bij planten. Bepaalde *P. fluorescens* stammen worden in de landbouw toegepast als 'biocontrol agent'.³ Voor koudbloedige dieren zoals vissen, weekdieren en insecten, zijn pathogene isolaten beschreven.^{3,4,5,6,7,8,9}

P. fluorescens wordt gedetermineerd op basis van biochemische eigenschappen. De genetische variabiliteit binnen de soort is zeer divers.^{2,4,10} Tenminste 9 subgroepen binnen *P. fluorescens* kunnen worden onderscheiden.⁴ De volledige genomsequenties van tenminste elf *P. fluorescens* stammen zijn beschikbaar in het publieke domein. Vergelijkende genoomanalyse laat zien dat in ieder geval drie van deze stammen mogelijk niet tot dezelfde soort behoren, maar in feite verschillende species betreffen.^{2,4,10} Dezelfde analyse toont ook aan dat deze drie stammen sterk afwijkend zijn van *P. fluorescens* 'type strain' ATCC 13525.⁴

P. fluorescens NCIMB 10586 wordt gebruikt als mupirocine productiestam.¹¹ Het antibioticum mupirocine ('pseudomonaszuur') wordt in de vorm van neuszalf toegepast bij de behandeling van dragerschap met methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).¹¹

2. Inrichtingsvoorschriften procesinstallaties

Grootschalige kweek van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de Regeling ggo.¹³ Binnen een MI-I inperking stelt de Regeling dat het fysisch inperkende systeem moet voldoen aan de eisen die voor het ouderorganisme gelden in procesinstallaties. Daarnaast geldt dat de werkvoorschriften gevolgd worden die gebruikelijk zijn voor activiteiten met het ouderorganisme in procesinstallaties.

Op MI-I inperkingsniveau worden uitsluitend organismen gehanteerd die voldoen aan de IAB criteria.^{12,13} Volgens deze criteria moeten de organismen niet-pathogeen zijn, een veilige vector en ongevaarlijke sequenties bevatten. Na afloop van de werkzaamheden hoeven deze ggo's niet eerst afgedood te worden voordat zij worden geloosd, omdat IAB organismen geen risico vormen voor mens en milieu.

Op MI-II inperking of hoger worden organismen gehanteerd die geen IAB erkenning hebben. In deze ruimten moet het fysisch inperkende systeem zo geconstrueerd zijn dat de verspreiding van de ggo's wordt beperkt. Tevens moeten de ggo's na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode zijn geïnactiveerd alvorens de inhoud van het fysisch inperkende systeem geloosd mag worden.

3. Pathogeniteitsclassificatie

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. 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. Bijlage 1 van de regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen (apathogeen) zijn voor mens, dier of plant. Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang, omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.¹³ Voorbeelden van potentieel 'gevaarlijke' inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen. Micro-organismen die op Bijlage 1 vermeld staan, voldoen in ieder geval aan één van de volgende criteria.

- Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- Het micro-organisme behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.

- Het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen derhalve op Bijlage 1 geplaatst worden.

4. Eerdere COGEM adviezen

P. fluorescens is in 2007 door de COGEM geclassificeerd als een opportunistisch pathogeen micro-organisme en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.¹⁴ Tevens is geadviseerd de bacteriesoort op te nemen in bijlage 1. Op basis van een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject, heeft de COGEM in 2011 twee adviezen uitgebracht met pathogeniteitsclassificaties van (a-) pathogene bacterien.^{15,16} In deze adviezen en in het corresponderende onderzoeksrapport is *P. fluorescens* niet opgenomen.

5. Genetisch gemodificeerde *P. fluorescens*

Als uitgangsgenotype voor de in de onderhavige aanvraag toegepaste gg-*P. fluorescens* is stam MB101 gebruikt. *P. fluorescens* MB101 is geïsoleerd van een slablad.¹⁷ Op basis van fenotype, biochemische eigenschappen en 16S rRNA gensequentie analyse is de stam volgens de aanvrager gedetermineerd als een *P. fluorescens* biovar I. De genomsequentie van MB101 is niet beschikbaar in het publieke domein.

Een experimentele studie bij muizen heeft aangetoond dat de stam bij orale toediening niet virulent is.¹⁷ De stam wordt sinds 1989 op commerciële schaal toegepast voor de productie van op *Bacillus thuringiensis* gebaseerde insecticiden en kent een lange historie van veilig gebruik.¹⁷

5.1 *P. fluorescens* deletiemutant DC454

Van *P. fluorescens* stam MB101 is door middel van een allel uitwisselingsmechanisme deletiemutant DC454 vervaardigd. In deze deletiemutant is het 'open reading frame' van het *pyrF* gen uit het chromosoom verwijderd.¹⁸ Het *pyrF* gen codeert voor orotidine-5'-fosfaat decarboxylase, een essentieel enzym betrokken bij de synthese van pyrimidines. Door de deletie is de stam auxotroof en biologisch ingeperkt. Indien aan groeimedium uracil wordt toegevoegd, is de stam in staat om via een alternatieve metabole route de afwezigheid van orotidine-5'-fosfaat decarboxylase te compenseren.¹⁸

5.2 *P. fluorescens* stam BD29241

Stam BD29241 is verkregen door deletiemutant DC454 te transformeren met plasmide pDOW1169-BD29241.

- *pDOW1169-BD29241*

Voor het vectorplasmide pDOW1169-BD29241 is als uitgangsvector het plasmide RSF1010 gebruikt.

RSF1010 is een mobiliseerbaar 'broad host range' plasmide met een grootte van 8684 baseparen (bp).¹⁹ Op het plasmide zijn de *oriV*-, *repA*-, *repB*- en *repC*-genen aanwezig die 'vegetatieve replicatie' binnen de gastheer bewerkstelligen. Daarnaast zijn op RSF1010 de *mobA*-, *mobB*-, *mobC*- en *oriT*-genen aanwezig die, alleen in aanwezigheid van een conjugatief helperplasmide, overdracht van RSF1010 naar andere gramnegatieve bacteriën mogelijk maken.^{19,20} Mobiliseerbare plasmiden zoals RSF1010 zijn niet zelfoverdraagbaar.^{19,20} Op RSF1010 zijn twee antibioticumresistentiegenen aanwezig.¹⁹

In pDOW1169-BD29241 (9305 bp) is een *pyrF* gencassette gekloneerd dat het orotidine-5'-fosfaat decarboxylase tot expressie brengt. Daarnaast is een synthetisch palmitase gen ingebracht dat codon-geoptimaliseerd is.²¹ Palmitase is een vetafbrekend enzym (lipase) dat palmitinezuur afsplitst van triacylglycerol. Het enzym wordt toegepast in de plantaardige-olieverwerkende industrie ten einde olie te produceren met een gewijzigde vetzuursamenstelling.²¹

Daarnaast zijn twee van de drie aanwezige mobilisatiegenen (*mobA* en *mobB*) veranderd en daardoor niet meer functioneel. De aanvrager geeft aan dat door de mutaties in de mobilisatiegenen, pDOW1169-BD29241 in de aanwezigheid van een conjugatief helperplasmide slechts zeer beperkt mobiliseerbaar is, en heeft daartoe aanvullende informatie aangeleverd. In deze informatie wordt aan de hand van een experimentele studie aangetoond dat in aanwezigheid van een helperplasmide de mobilisatiefrequentie van pDOW1169-BD29241 naar *P. fluorescens* en *Escherichia coli* met een factor van respectievelijk 10^{-8} en 10^{-6} is teruggebracht. Daarnaast toont hij in een controle-experiment aan dat, in afwezigheid van een conjugatief helperplasmide, de mobilisatiefrequentie van pDOW1169-BD29241 minder dan 10^{-10} is.

Verder zijn de twee antibioticumresistentiegenen aanwezig op RSF1010 uit pDOW1169-BD29241 verwijderd.

- *P. fluorescens* stam BD29241

Door het inbrengen van pDOW1169-BD29241 is de auxotrofie van gastheer DC454 opgeheven, en produceert de op deze wijze verkregen stam BD29241 het enzym palmitase.

De aanvrager stelt dat het ggo metabole stress ondervindt en daardoor verzwakt is ten opzichte van uitgangsgo MB101. Het palmitase wordt intracellulair in het ggo opgeslagen en dientengevolge zou het ggo er baat bij hebben als het plasmide uit de cel verdwijnt, waardoor het ggo auxotroof wordt en biologisch ingeperkt is. Daarnaast laat hij aan de hand van literatuurgegevens zien dat micro-organismen bij expressie van heterologe genen metabole stress ondervinden.^{22,23}

Werkzaamheden met een vergelijkbaar ggo, eveneens gebaseerd op MB101, is volgens de 'Good Industrial Large Scale Practice (GILSP) criteria for recombinant microorganisms' van de 'Organization for Economic Co-operation and Development' (OECD) en de 'National Institutes of Health Guidelines for recombinant DNA molecules' (NIH), ingedeeld onder het laagste inperkingsniveau voor grootschalige producties ('BL1-LS').¹⁷

6. Overweging en advies

Sinds de classificatie in 2007 door de COGEM van *P. fluorescens* in pathogeniteitsklasse 1, zijn er

verschillende publicaties verschenen over *P. fluorescens* stammen die pathogeen zijn voor koudbloedige dieren.^{4,5,6,7,8,9} *P. fluorescens* is echter een genetisch zeer diverse soort. In hoeverre al deze stammen tot dezelfde species gerekend moeten worden, is onderwerp van discussie.

P. fluorescens MB101 kent een historie van veilig gebruik, en is niet geassocieerd met ziekte-verwekkende eigenschappen. De COGEM is van mening dat *P. fluorescens* MB101 beschouwd moet worden als een niet-pathogeen micro-organisme. De COGEM adviseert *P. fluorescens* MB101 in te schalen in klasse 1 en op Bijlage I te plaatsen.

P. fluorescens DC454 is een gg-deletiemutant van MB101. Deze stam is auxotroof en daardoor biologisch ingeperkt. De COGEM adviseert daarom *P. fluorescens* DC454 in te schalen in klasse 1 en op Bijlage I te plaatsen.

Bij de classificatie van *P. fluorescens* BD29241 spelen de volgende afwegingen. Door het inbrengen van het plasmide pDOW1169-BD29241 is de auxotrofie van de gastheer DC454 opgeheven. Aannemelijk is dat BD29241 door de expressie van palmitase metabole stress ondervindt en verzwakt is ten opzicht van MB101. Het plasmide pDOW1169-BD29241 is niet conjugatief en overdraagbaar. Er zijn geen antibioticumresistentiegenen aanwezig op het plasmide. Er zijn geen redenen om te veronderstellen dat het op het plasmide aanwezige en in het ggo tot expressie gebrachte orotidine-5'-fosfaat decarboxylase (palmitase) de fitness en overlevingskansen van het ggo in het milieu verhoogt. Gezien het bovenstaande acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van grootschalige productieactiviteiten met *P. fluorescens* BD29241 op MI-I inperkingsniveau verwaarloosbaar klein.

Advies

Concluderend is de COGEM van mening dat *P. fluorescens* MB101 en DC454 geclassificeerd kunnen worden in pathogeniteitsklasse 1 en geschikt zijn voor de vervaardiging van ggo's waarmee zogenaamde grootschalige handelingen (categorie B) kunnen worden uitgevoerd (IAB erkenning). Bij werkzaamheden met gg-*P. fluorescens* BD29241 onder MI-I inperkingsniveau acht de COGEM de milieurisico's verwaarloosbaar klein.

7. Referenties

1. Zago A & Cgugani S (2009). *Pseudomonas*. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Eds Schaechter M *et al.* Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
2. Silby MW *et al.* (2011). Review *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev 35: 652-680
3. OECD (1997). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 6; consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving *Pseudomonas*. [http://search.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?co te=OCDE/GD\(97\)22&docLanguage=En_Websitebezoek 24/04/2013](http://search.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?co te=OCDE/GD(97)22&docLanguage=En_Websitebezoek 24/04/2013)

4. Mulet M *et al.* (2010). DNA sequence-based analysis of *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12(6): 1513-1530
5. Devi KK & Kothamasi D (2009). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome C oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS Microbiol Lett* 300: 195-200
6. Olcot MH *et al.* (2010). Lethality and developmental delay in *Drosophila melanogaster* larvae after ingestion of selected *Pseudomonas fluorescens* strains. *Plos One* 5(9): e12504
7. Molloy DP *et al.* (2013) *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A – A biopesticide for the control of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae). *J invertebr Pathol* 113(1): 104-114
8. Molloy DP *et al.* (2013). Mode of action of *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (Bivalvia: Dreissenidae). *J invertebr Pathol* 113(1): 115-121
9. Péchy-Tar M *et al.* (2008). Molecular analysis of a novel gene-cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Microbiology* 10(9): 2368-2386
10. Loper JE *et al.* (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas spp.*: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *Plos Genetics* e1002784
11. Gunery R & Thomas CM (2011). Mupirocin: biosynthesis, special features and applications of an antibiotic from a Gram-negative bacterium. *Appl Microbiol Technol* 90: 11-21
12. EVO criteria. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/EVO%20criteria.pdf> (websitebezoek 26/04/2013)
13. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regeling-genetisch-gemodificeerde-organismen.pdf> (websitebezoek 26/04/2013)
14. COGEM 2007. Classificatie van enkele micro-organismen van bijlage 1 van de Regeling ggo. COGEM advies CGM/070917-02
15. COGEM 2011. Classificatie apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
16. COGEM 2011. Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
17. Landry TD *et al.* (2003). Safety evaluation of an α -amylase enzyme preparation derived from the archeal order Thermococcales as expressed in *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 37: 149-168
18. Schneider JC *et al.* (2005). Auxotrophic markers *pyrF* and *proC* can replace antibiotic markers on protein production plasmids in high-cell-density *Pseudomonas* fermentation. *Biotechnol Prog* 21: 343-348
19. Scholz P *et al.* (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75: 271-288
20. Davison J (2002). Genetic tools of Pseudomonads, Rhizobia, and other Gram-negative bacteria. *BioTechniques* 32(2): 386-401
21. Halich R *et al.* (2012). Safety evaluation of a lipase enzyme (BD29242 Palmitase) preparation, expressed in *Pseudomonas fluorescens*, intended for removing palmitic acid from triacylglycerol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 64: 87-94
22. Snoep JL *et al.* (1995). Protein burden in *Zyomonas mobilis*: negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. *Microbiology* 141: 2329-2337

23. Heyland J *et al.* (2011). Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 155: 178-184