

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

DATUM 04 juni 2013
KENMERK CGM/130604-01
ONDERWERP Advies: carrier DNA in gg-gisten en gg-schimmels

Geachte mevrouw Mansveld,

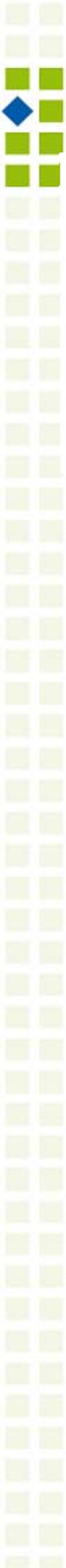
Naar aanleiding van een adviesvraag over het gebruik van zogenaamd 'carrier' DNA bij de constructie van genetisch gemodificeerde gisten en schimmels voor grootschalige productie deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de eventuele milieurisico's van grootschalige producties met genetische gemodificeerde (gg-) gisten en schimmels die gemaakt zijn met behulp van transformatiemethoden met enkelstrengs (ss) 'carrier' DNA. Het carrier DNA wordt toegevoegd om de transformatie-efficiëntie te verhogen. Normaliter kan een grootschalige productie met ggo's plaatsvinden op het laagste inperkingsniveau als ggo's voldoen aan de zogenaamde IAB criteria. Hierbij wordt geen rekening gehouden met de eventuele effecten van de aanwezigheid van carrier DNA bij de constructie van de ggo's. De COGEM is gevraagd in hoeverre het gebruik van ss-carrier DNA van invloed is op de inschaling van grootschalige producties met gg-gisten en schimmels die verder voldoen aan genoemde criteria. De COGEM heeft in haar overweging carrier DNA betrokken afkomstig van zalm, haring of rund.

De COGEM kan niet uitsluiten dat toevoeging van ss-carrier DNA bij de constructie van gg-gisten en gg-schimmels zou kunnen leiden tot onbedoelde integratie van het carrier DNA in het genoom van het ggo. De COGEM acht de kans echter zeer klein dat een fragment van ca. 2,0 kb van het carrier DNA een compleet gen omvat, en efficiënt en functioneel in gist of schimmel tot expressie komt. Daarbij acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat een zalm-, haring- of rundergen een fitnessvoordeel oplevert voor betreffend ggo of van invloed is op de (a)pathogeniteit.

De COGEM adviseert daarom de grootschalige productie met gg-gisten en gg-schimmels die gemaakt zijn in aanwezigheid van ss-carrier DNA dat afkomstig is van zalm, haring of rund en gefragmenteerd is tot fragmenten van ca. 2,0 kb op MI-I inperkingsniveau in te schalen als de betreffende ggo's voldoen aan de IAB criteria. Onder deze voorwaarden is de COGEM van mening dat een MI-I inperkingsniveau de veiligheid voor mens en milieu afdoende waarborgt.



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

Gebruik van enkelstrengs carrier DNA bij de constructie van genetisch gemodificeerde gisten en schimmels voor grootschalige toepassingen

COGEM Advies CGM/130604-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de eventuele milieurisico's van grootschalige toepassingen met genetische gemodificeerde (gg-) gisten en schimmels, die gemaakt zijn met behulp van transformatiemethoden, waarin gebruik wordt gemaakt van zogenaamd enkelstrengs (ss-)carrier DNA. Het gebruik van carrier DNA zou kunnen leiden tot onbedoelde integratie van het carrier DNA in het genoom van het ggo. Gg-gisten en schimmels worden al gedurende lange tijd gebruikt voor de grootschalige productie van onder andere enzymen en metabolieten. Indien dergelijke ggo's voldoen aan specifieke criteria, kunnen de grootschalige toepassingen op het laagste inperkingsniveau worden uitgevoerd. Deze zogenaamde Erkenning van Vectoren en Organismen (EVO) criteria stellen specifieke eisen aan het uitgangsorganisme, de vector, het insert en het ggo.⁸ Bij het opstellen van deze eisen is echter geen rekening gehouden met de mogelijke consequenties van het gebruik van carrier DNA bij het construeren van ggo's.

De COGEM is gevraagd de mogelijke milieurisico's van het gebruik van carrier DNA bij de risicoanalyse van betreffende ggo's te betrekken en te adviseren over de inschaling van grootschalige producties met deze ggo's. Ter illustratie en onderbouwing van de adviesvraag zijn gegevens overlegd van een transformatieprotocol met de gist *Saccharomyces cerevisiae*. Dit protocol is indicatief voor de transformatieprotocollen die tegenwoordig worden toegepast.

1.1 Gebruik van carrier DNA

In theorie kan voor de introductie van een beoogd gen in het genoom van gisten of schimmels worden volstaan met het onder bepaalde condities samenvoegen van de gastheer (de betreffende gist- of schimmelstam) met het DNA van interesse. In de praktijk is echter gebleken dat de toevoeging van zogenaamd carrier DNA aan het transformatiemengsel de transformatie-efficiëntie van gist positief beïnvloedt.^{1,2} Er wordt vermoed dat de positieve bijdrage van carrier DNA op de transformatie op twee effecten berust.³ Ten eerste worden de DNA bindingsplaatsen op de celwand verzadigd door de overmaat aan carrier DNA, waardoor meer DNA van interesse overblijft voor integratie in het genoom van de gastheer. Daarnaast wordt in de wetenschappelijke literatuur gesuggereerd dat de binding van DNA aan de celwand een verandering in de celwandstructuur teweegbrengt met een verhoging van de transformatiefrequentie als gevolg.³

Door de positieve invloed van carrier DNA op de transformatie-efficiëntie, wordt bij de constructie van gg-gisten of gg-schimmels veelvuldig een overmaat carrier DNA aan het transformatiemengsel toegevoegd. Als carrier DNA wordt veelal ss-DNA gebruikt dat afkomstig is uit de testis van zalm of haring, het zogenaamde ss-zalmsperma of ss-haringsperma DNA. Maar ook ss-DNA afkomstig uit de thymus van kalveren wordt als carrier DNA toegepast.

In transformaties wordt altijd gebruik gemaakt van gefragmenteerd carrier DNA. Een veel gebruikte methode om DNA op willekeurige wijze te fragmenteren is het zogenaamde 'DNA shearing'. Uit onderzoek naar DNA 'shearing' is gebleken dat met behulp van de 'point-sink shearing' methode binnen enkele ronden gefragmenteerd DNA van ca. 2 kb ontstaat.⁴ In het protocol dat ter

ondersteuning van de adviesvraag is bijgevoegd, wordt gebruik gemaakt van mechanisch gefragmenteerd ss-zalmsperma DNA dat afkomstig is van de Pacifische zalm (*Oncorhynchus keta*).⁵ Op basis van de productinformatie is het niet duidelijk hoe het betreffende zalmsperma exact wordt gefragmenteerd, en wat het moleculair gewicht is.⁶ In een wetenschappelijke publicatie die gebruik heeft gemaakt van hetzelfde gefragmenteerde ss-zalmsperma DNA is het moleculaire gewicht bepaald op ongeveer 2,0 kb.

1.2 Procesinstallaties voor grootschalige kweek van ggo's

Een grootschalige kweek van ggo's kan ingeschaald worden op vier verschillende inperkingsniveau's. In oplopende mate van inperking worden deze aangeduid met MI-I, MI-II, MI-III en MI-IV. De specifieke inrichtingsvoorschriften en werkvoorschriften die voor deze inperkingsniveau's gelden, zijn weergegeven in Bijlage 4 van de Regeling ggo.⁷

Op het laagste inperkingsniveau (MI-I) worden uitsluitend organismen gehanteerd, die voldoen aan de EVO criteria voor een IAB erkenning.^{7,8} 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 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.

1.3 Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden al meerdere malen geadviseerd over de grootschalige productie van ggo's.^{9,10,11,12} Het betrof veelal ggo's die gebaseerd waren op bacteriën of virussen. Voor de constructie van deze ggo's werd gebruik gemaakt van een gastheer, vector en insert. Hierdoor was de milieurisicoanalyse en het daaruit voortvloeiende inperkingsniveau beperkt tot de eigenschappen van de gastheer, vector, het insert en het resulterende ggo. De inschaling van de grootschalige productie van deze ggo's kon met behulp van de IAB criteria worden vastgesteld. De impact van het gebruik van carrier DNA bij de constructie van een ggo is tot op heden niet eerder in de milieurisicoanalyse meegenomen.

2. Adviesvraag

De adviesvraag beperkt zich tot ggo's die op basis van gastheer, vector en insert voldoen aan de IAB criteria, maar waarbij bij de constructie van het ggo ss-carrier DNA is gebruikt. Dit creëert de mogelijkheid dat niet alleen het beoogde insert in het genoom van het ggo wordt opgenomen, maar ook het carrier DNA. Hierbij is het is de vraag wat de kans is dat het carrier DNA in het genoom van het ggo opgenomen zal worden en of een dergelijke insertie van invloed is op de uitkomst van de milieurisicoanalyse. Op basis van de uitkomst van haar milieurisicobeoordeling wordt de COGEM gevraagd te adviseren over het inperkingsniveau waarop grootschalige producties met dergelijke ggo's en gg-schimmels uitgevoerd dienen te worden. De COGEM heeft zich in haar milieurisicobeoordeling beperkt tot carrier DNA dat afkomstig is van zalmsperma, haringsperma of kalfthymus en dat gefragmenteerd is tot fragmenten van ca. 2,0 kb door bijvoorbeeld 'shearing'.

3. Overweging

Bij de milieurisicoanalyse van ggo's die in aanwezigheid van carrier DNA worden geconstrueerd, moet rekening worden gehouden met de kans dat ss-carrier DNA in het ggo wordt opgenomen en de impact van een eventuele insertie van carrier DNA op de eigenschappen van het ggo. In onderstaande overweging wordt op deze twee onderdelen ingegaan voor de constructie van gg-gisten en gg-schimmels waarbij gebruik wordt gemaakt van carrier DNA dat afkomstig is uit zalm, haring of kalf. Hierbij is voornamelijk gebruik gemaakt van gegevens over transformatie met *Saccharomyces cerevisiae*. Deze bakkersgist wordt veelvuldig gebruikt voor productiedoeleinden, waardoor er veel ervaring mee is opgedaan.

3.1 Kans op opname van ss-carrier DNA in gg-gisten

Door de toevoeging van carrier DNA in de huidige transformatieprotocollen wordt de efficiëntie waarmee het DNA van interesse in het genoom van gisten integreert en daarmee de frequentie waarmee gewenste transformanten worden verkregen, verhoogd.^{1,13} Dit kan in theorie ook tot gevolg hebben dat delen van het carrier DNA in de transformanten worden opgenomen. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat de transformatie-efficiëntie van de gist *S. cerevisiae* in belangrijke mate afhankelijk is van de kans op homologe recombinatie tussen het genoom van de betreffende gist en het DNA van interesse.¹⁴ Terwijl een transformatie van *S. cerevisiae* met ss-DNA dat een identieke sequentie van ca. 1.000 basen bevat 1.058 tot 51.900 transformanten/ μ g DNA oplevert, resulteert een transformatie met niet-identiek, lineair, ss-DNA in 3 tot 55 transformanten/ μ g DNA.^{14,15} Gebaseerd op deze informatie is de transformatie-efficiëntie ongeveer 300 tot 1000 maal hoger bij de aanwezigheid van sequentie-overeenkomst. De COGEM is daarom van mening dat de aanwezigheid van homologe regionen tussen het carrier DNA en het genoom van gg-*S. cerevisiae* in belangrijke mate de kans bepaald dat carrier DNA wordt opgenomen in gg-*S. cerevisiae*.

De COGEM wijst er hierbij op dat de transformatie-efficiëntie tussen verschillende gistsoorten kan verschillen. Homologe recombinatie is ook bij andere soorten zoals *Yarrowia lipolytica* van invloed op de transformatie-efficiëntie.¹⁶ In deze gist neemt integratie van exogeen DNA via niet-homologe recombinatie echter een groter aandeel in dan het geval is bij *S. cerevisiae*.¹⁷ Dit wordt ook in andere niet *Saccharomyces* gisten waargenomen.¹⁸

Evolutionair gezien zijn dieren en gisten ongeveer 1 miljard jaar geleden van elkaar afgesplitst.¹⁹ De genomische verschillen tussen zalm, haring of kalf en gisten zijn hierdoor groot. De COGEM is daarom van mening dat identieke sequenties tussen vissen of runderen en gisten beperkt aanwezig zullen zijn. Dit blijkt ook uit een analyse van sequenties van de gist *S. cerevisiae* en de Atlantische zalm *Salmo salar*, die is aangeleverd bij de adviesaanvraag.^{20,21} Hieruit blijkt dat beide organismen in totaal 34 volledig identieke sequenties van 29 tot 50 bp bezitten.

Voor een homologe recombinatie met de insertie van carrier DNA tot gevolg, moet worden voldaan aan een aantal eisen. Ten eerste is het noodzakelijk dat de betreffende identieke sequenties in het zalmgenoom op hetzelfde chromosoom liggen en daarnaast dienen ze op dusdanige afstand van elkaar gelokaliseerd zijn dat ze in theorie op eenzelfde fragment (van 2.0 kb) van het gefragmenteerde carrier DNA kunnen liggen. Tevens is het van belang dat deze sequenties op hetzelfde chromosoom van het gistgenoom liggen. De afstand tussen beide regionen op het gistgenoom is minder van belang,

maar naarmate de afstand groter wordt, zal de kans toenemen dat essentiële gistgenen door een homologe recombinatie worden verwijderd en de 'fitness' van het resulterende ggo doen afnemen.

Uit de genoemde analyse van sequenties van de gist *S. cerevisiae* en de zalm *S. salar* kan worden afgeleid dat bij transformatie van *S. cerevisiae* met behulp van gefragmenteerd, ss-zalm DNA, niet aan deze voorwaarden wordt voldaan. Op basis van deze informatie zou de kans verwaarloosbaar klein zijn dat *S. salar* DNA via homologe recombinatie in het gistgenoom van *S. cerevisiae* integreert. In hoeverre identieke sequenties aanwezig zijn in andere gistsoorten en carrier DNA dat afkomstig is van andere zalmsoorten, haring of runderen is niet bepaald. Gezien het grote evolutionaire verschillen tussen de genoemde micro-organismen en vissen of rund heeft de COGEM geen reden om aan te nemen dat de kans op homologe recombinatie tussen DNA van deze organismen wezenlijk anders is. Op basis van bovenstaande analyse en de evolutionaire overeenkomsten tussen haring en zalm en onder de voorwaarde dat gebruik wordt gemaakt van gefragmenteerd zalm of haring DNA van ca. 2.0 kb acht de COGEM de kans dat homologe recombinatie zal leiden tot gisttransformanten zeer klein is.

Opgemerkt moet worden dat DNA ook via niet-homologe recombinatie in het genoom van gg-*S. cerevisiae* opgenomen wordt, zoals blijkt uit de transformatie-experimenten van Gjuracic *et al.*¹⁵ De kans dat dit optreedt is zeer klein. De beperkte kans op integratie van carrier DNA wordt geïllustreerd aan de hand van een *S. cerevisiae* stam die negen maal is getransformeerd in aanwezigheid van ss-carrier DNA afkomstig van de zalm *Oncorhynchus keta*. Analyse van het genoom van deze gg-*S. cerevisiae* variant bracht geen sequenties aan het licht die afkomstig waren van het gebruikte carrier DNA.

Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat niet-homologe recombinatie bij transformatie van niet-*Saccharomyces* gisten vaker voorkomt dan bij transformatie van *S. cerevisiae*.^{17,18} Gezien bovenstaande gegevens acht de COGEM de kans dat carrier DNA als gevolg van niet-homologe recombinatie in het genoom van een gg-gist wordt opgenomen klein tot zeer klein. Op basis van deze gegevens kan de COGEM een insertie van gefragmenteerd carrier DNA in het genoom van gisten echter niet uitsluiten.

De COGEM wijst hierbij op de mogelijkheid dat een gedeelte van het carrier DNA ten gevolge van re-annaeling van ss-DNA uit dubbelstrengs (ds-)DNA fragmenten zal bestaan. Uit eerder genoemde experimenten blijkt dat de transformatie-efficiëntie van ds-DNA in *S. cerevisiae* lager is dan die van ss-DNA.¹⁵ Eventueel aanwezig ds-carrier DNA zal de kans op integratie van carrier DNA in het gistgenoom via niet-homologe recombinatie derhalve verder verkleinen.

3.2 Impact van carrier DNA op eigenschappen van gg-gisten

Naast de kans op integratie is het effect dat een integratie teweeg kan brengen het tweede belangrijke onderdeel bij de beoordeling van de risico's voor mens en milieu. Er zijn verschillende aspecten die van invloed zijn op de mogelijke impact die een eventuele integratie van zalm, haring of kalf sequenties kan hebben.

Ten eerste wordt in de transformaties gebruik gemaakt van mechanisch gefragmenteerd carrier DNA. Zoals gesteld zijn de fragmenten van het carrier DNA ongeveer 2,0 kb groot. Aangezien meer dan de helft (>66%) van de zalm genen groter is dan 2 kb, zou in theorie slechts 33% van de genen als geheel functioneel zalmgen in het genoom van het ggo terecht kunnen komen.²² Daarbij acht de COGEM de

kans klein dat de genen die kleiner of gelijk zijn aan 2 kb geheel intact op een fragment zullen liggen, als het carrier DNA via shearing wordt gefragmenteerd.

Een tweede aspect betreft de expressie van eventueel geïntegreerd carrier DNA. Voor een efficiënte transcriptie van coderende sequenties van het zalm of het haring genoom, zijn regulatoire sequenties vereist.²³ De COGEM wijst hierbij op het feit dat dieren als zalm, haring en rund, en gisten evolutionair al vele honderden miljoenen jaren geleden van elkaar zijn afgesplitst.¹⁹ Deze organismen verschillen hierdoor sterk in hun genomische en cellulaire organisatie. Gezien deze grote verschillen is de kans klein tot verwaarloosbaar dat een eventueel aanwezige zalm-, haring of runder-promoter door endogene transcriptiefactoren in gist wordt herkend en een efficiënte transcriptie oplevert van een geïntegreerd zalm- haring- of rundergen. Voor een efficiënte transcriptie van een transgen zal carrier DNA in de nabijheid van een constitutief actieve endogene promotor geïnsereerd moeten worden.^{24,25} Aangezien slechts een beperkt aantal van deze regionen in het gistgenoom aanwezig is, acht de COGEM de kans klein dat het carrier DNA bij integratie in het gistgenoom op een locatie terecht komt die aan deze eis voldoet. Bovendien is zij van mening dat een dergelijke insertie waarschijnlijk een groeinadeel oplevert voor de gist, doordat het intervenueert in de expressie van gisteigen genen rondom de insertieplaats.

Een derde aspect betreft de translatie en post-translationele processing in gisten. In tegenstelling tot vis- en zoogdier-genen bevatten het merendeel van gistgenen geen intronen.²⁶ Bovendien maken gisten gebruik van een ander splicingsmechanisme, waardoor intronen die in de eventuele zalm-, haring- of rundergenen aanwezig zijn onvolledig of incorrect zullen worden verwijderd. Daarnaast verschillen gisten met hogere eukaryoten in de manier waarop N- en O-gelinkte glycosylering van een eiwit plaatsvindt.²⁷ Op basis van deze verschillen acht de COGEM de kans klein dat expressie van een gen van zalm, haring of kalf leidt tot een eiwit dat functioneel actief is in gist dat van invloed is op de pathogeniteit van gisten of hen enig groeivoordeel op zal leveren.

Als laatste aspect merkt de COGEM op dat zalm, haring en rund al vele eeuwen tot voedsel dienen voor mens en dier. Afgezien van een mogelijke allergische reactie door consumptie van vis in een klein deel (0-2%) van de bevolking heeft dit nooit geleid tot nadelige effecten.²⁸ In 95% van de gevallen van visallergie bij mensen is het visallergeen parvalbumine betrokken.²⁹ Dit kleine eiwit is ongeveer 12 kDa en afhankelijk van de betreffende parvalbumine variant beslaat het mRNA in geval van *S. salar* respectievelijk ca. 750 of 2470 basen.³⁰ Gezien deze lengte van het gen voor parvalbumine kan de COGEM niet uitsluiten dat de coderende sequentie voor dit allergeen in zijn geheel in het gefragmenteerde carrier DNA aanwezig is. De kans dat het complete gen in een gg-gist wordt opgenomen en efficiënt tot expressie komt acht de COGEM evenwel zeer klein. Zij wijst er daarbij op dat parvalbumine genen alom vertegenwoordigd zijn in vissen en als gevolg van de visconsumptie wijdverspreid in het milieu kunnen worden aangetroffen. De COGEM acht de kans op een nadelig effect voor mens en milieu als gevolg van de introductie in het milieu van een parvalbumine gen in een apathogene gist daarom verwaarloosbaar klein.

In het geval van parvalbumine treedt een allergische reactie op na consumptie van dit eiwit door mens of dier. In onderhavige grootschalige producties wordt gebruik gemaakt van ggo's voor de productie van eiwitten of metabolieten. De ggo's zijn over het algemeen niet bedoeld voor consumptie en er is geen reden om aan te nemen dat de ggo's tijdens het productieproces geconsumeerd zullen

worden. De COGEM wijst er daarbij op dat voor ggo's die wel voor consumptiedoeleinden worden gebruikt, een voedselveiligheidsbeoordeling noodzakelijk is. Op soortgelijke wijze moet voor de verwerking van de geproduceerde producten in bijvoorbeeld medicijnen worden voldaan aan de productkwaliteitsreggeving.

3.3 Kans op en impact van opname van ss-carrier DNA in gg-schimmels

De COGEM beschikt niet over wetenschappelijke gegevens met betrekking tot de kans dat ss-carrier DNA afkomstig van zalm- of haringsperma of kalfthymus in het genoom van gg-schimmels wordt opgenomen. Uitgaande van ss-carrier DNA dat gefragmenteerd is tot fragmenten van ca. 2,0 kb en gezien de evolutionaire verwantschap tussen beide micro-organismen acht de COGEM de kans aanwezig dat gefragmenteerd ss-carrier DNA via niet-homologe recombinatie in het genoom van een gg-schimmel terecht komt. Zij kan dit net als bij gg-gisten dus niet uitsluiten. Uitgaande van de mogelijkheid dat gefragmenteerd ss-DNA in een gg-schimmel aanwezig is, is het voor de risicoanalyse van belang te weten welk nadelig effect dit kan opleveren. Net als voor gg-gisten acht de COGEM de kans zeer klein dat een (deel van) een exogeen eiwit van zalm, haring of kalf functioneel actief is in een schimmel en een positieve invloed heeft op de fitness. Daarnaast heeft zij geen reden om aan te nemen dat zalm-, haring- of rundergenen van invloed zijn op de pathogeniteit van schimmels of hen enig groeivoordeel op zal leveren. Afgezien van eerder genoemde allergische reactie tegen parvalbumine door consumptie acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat expressie van zalm-, haring- of rundergenen in een schimmel tot nadelige effecten zal leiden.

4. Conclusie

Als bij de constructie van een gg-gist of gg-schimmel gebruik wordt gemaakt van carrier DNA kan dit DNA via homologe of niet-homologe recombinatie in het genoom van het ggo integreren. De efficiëntie waarmee dit gebeurt, zal verschillen per gist- of schimmelsoort, de mate waarin homologe regionen in het carrier DNA aanwezig zijn en de grootte van de fragmenten van het carrier DNA. Op basis van genoemde variabelen is de COGEM van mening dat de kans dat carrier DNA in het genoom van een gg-gist of gg-schimmel zal worden opgenomen, zal variëren. Zij kan niet uitsluiten dat dat carrier DNA in het genoom van gg-gisten of gg-schimmels opgenomen wordt.

Uitgaande van het 'worst case' scenario dat een gg-gist of gg-schimmel wordt gegenereerd waarin carrier DNA is opgenomen dat afkomstig is van zalm, haring of rund, ligt de focus op de vraag wat het nadelige effect is dat betreffend DNA teweeg kan brengen. Op basis van bovenstaande overweging acht de COGEM de kans zeer klein dat een fragment van het carrier DNA een volledig visse- of rundergen omvat, efficiënt tot expressie komt en functioneel en stabiel in gist of schimmel aanwezig is. De kans dat een zalm-, haring- of rundergen hierbij groeivoordeel oplevert voor betreffend ggo of van invloed is op de (a)pathogeniteit acht de COGEM echter verwaarloosbaar klein.

Op basis van bovenstaande conclusie adviseert de COGEM de grootschalige productie van gg-gisten en gg-schimmels die met behulp van carrier DNA zijn gemaakt op MI-I inperkingsniveau in te schalen als de betreffende ggo's voldoen aan de IAB criteria en het carrier DNA gefragmenteerd is via bijvoorbeeld 'post-sink shearing' tot fragmenten van ca. 2,0 kb. Onder deze voorwaarden is de COGEM van mening dat een MI-I inperkingsniveau de veiligheid voor mens en milieu afdoende waarborgt.

5. Referenties

- 1 Gietz RD and Woods RA (2001). Genetic transformation of yeast. *BioTechniques* 30:816-831
- 2 Schiestl RH and Gietz RD (1989). High efficiency transformation on intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16:339-346
- 3 Pham TA *et al.* (2011). Visualization of the synergistic effect of lithium acetate and single-stranded carrier DNA on *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Curr Genet* 57:233-239
- 4 Thorstenson YR *et al.* (1998). An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased DNA shearing. *Genome Methods* 8:848-855
- 5 Sigma. DNA, sodium salt, from salmon testes. Product information
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d1626pis.Par.0001.File.tmp/d1626pis.pdf (23 mei 2013)
- 6 Sigma. Product information: DNA, sodium salt, from Salmon testes.
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d1626pis.Par.0001.File.tmp/d1626pis.pdf (29 mei 2013)
- 7 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> (28 mei 2013)
- 8 EVO criteria. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/EVO%20criteria.pdf> (28 mei 2013)
- 9 COGEM (2013). Grootschalige productie van palmitase met behulp van genetisch gemodificeerde *Pseudomonas fluorescens* COGEM advies CGM/130502-02
- 10 COGEM (2012). Grootschalige productie van antigeen tegen West Nile virus op MI-III inperkingsniveau. COGEM advies CGM/120814-02
- 11 COGEM (2011). Grootschalige productie van melkzuur door genetisch gemodificeerde cyanobacteriën in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110418-03
- 12 COGEM (2008). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Aspergillus vadensis*. COGEM advies CGM/080507-01
- 13 Pham TA *et al.* (2011). Visualization of the synergistic effect of lithium acetate and single-stranded carrier DNA on *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Curr Genet* 57:233-239
- 14 Simon JR and Moore PD (1987). Homologous recombination between single-stranded DNA and chromosomal gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol and Cel Biol* 7:2329-2334
- 15 Gjuracic K and Zgaga Z (1996). Illegitimate integration of single-stranded DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 253:173-181
- 16 Madzak C *et al.* (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109:63-81
- 17 Verbeke J *et al.* (2013). Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol Lett* 35:571-576
- 18 Klinner U and Schäfer B (2004). Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol Reviews* 28:201-223
- 19 Taylor JW and Berbee ML (2006). Dating divergences in the fungal tree of life: review and new analyses. *Mycologia* 98: 838-849
- 20 Nijkamp JF *et al.* (2012). *De novo* sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. *Microbial Cell Factories* 11:36

-
- 21 Davidson WS *et al.* (2010). Sequencing the genome of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genome Biology* 11:403
 - 22 SalmonDB (2011). A database for salmonids species. http://genomicasalmones.dim.uchile.cl/download/gene-prediction/augustus_rename.gff3 (29 mei 2013)
 - 23 Hahn S and Young ET (2011). Transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* 189:705-736
 - 24 Ishida N *et al.* (2005). Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* 71:1964-1970
 - 25 Maya D *et al.* (2008). Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 30:979-987
 - 26 Chang T-Y and Liao B-Y (2013). Flagellated algae protein evolution suggests the prevalence of lineage-specific rules governing evolutionary rates of eukaryotic proteins. *Genome Biol Evol* doi:10.1093/gbe/evt055
 - 27 Jung E and Williams KL (1997). The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol Appl Biochem.* 25:3-8
 - 28 Rona RJ *et al.* (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 120:638-46
 - 29 Kuehn A *et al.* (2010) Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol* 53:359-366
 - 30 Leong JS *et al.* (2010). *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequence reveal changes in evolutionary pressures on a post teraploidization genome. *MBC genomics* 11:279