

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 4 december 2014
KENMERK CGM/141204-01
ONDERWERP Advies inschaling drie genetisch gemodificeerde platwormen

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 14-077 met de titel 'Molecular mechanisms of regeneration and ageing' van het Universitair Medisch Centrum Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-)platwormen *Macrostomum hystrix*, *Macrostomum pusillum* en *Isodiametra pulchra*. De aanvrager wil de platwormen modifieren met gekarakteriseerde genen en niet-gekaracteriseerde DNA-fragmenten, eveneens afkomstig van *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra*. Daarbij wil de aanvrager de platwormen als modelorganismen voor de ontwikkelings- en (stam)celbiologie gaan toepassen.

M. hystrix, *M. pusillum* en *I. pulchra* zijn enkele millimeters grote, hermafrodiete, vrijlevende platwormen. Natuurlijke populaties komen voor langs de kusten van zeeën op het noordelijke halfrond.

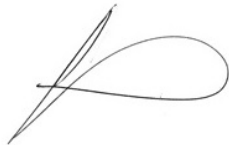
M. hystrix en *M. pusillum* zijn verwant aan de apathogene platworm *Macrostomum lignano*. Van *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra* is nooit gerapporteerd dat zij pathogeen zijn voor de mens of als parasiet bij de mens voorkomen. De COGEM is ook niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat zij parasitair of pathogeen zijn voor dieren of planten. Tevens is de COGEM niet bekend met vrijlevende platwormen die schadelijke genproducten produceren. Zij is daarom van mening dat *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra* beschouwd kunnen worden als apathogeen, en dat handelingen met deze gg-platwormen kunnen plaatsvinden op ML-I niveau.

Gebaseerd op de indeling van *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra* in pathogeniteitsklasse 1, 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,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie en inschaling werkzaamheden van de mariene platwormen

M. hystrix, *M. pusillum* en *I. pulchra*

COGEM advies CGM/141204-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) platwormen *Macrostomum hystrix*, *Macrostomum pusillum* en *Isodiametra pulchra*. De aanvrager wil deze platwormen als modelsysteem gebruiken om het moleculaire mechanisme van regeneratie op te helderen. Tevens wil de aanvrager onderzoeken hoe dit mechanisme door het verouderingsproces wordt beïnvloed.

M. hystrix en *M. pusillum*

M. hystrix en *M. pusillum* zijn kleine, transparante, vrijlevende, hermafrodiete platwormen die behoren tot het fylum *Platyhelminthes* (platwormen) en de familie *Macrostomidae*.^{1,2,3} Van het genus *Macrostomum* zijn inmiddels 189 soorten beschreven.² De platwormen die tot dit genus behoren, worden maximaal 3,5 mm lang.⁴

Volwassen *Macrostomum*-wormen leggen eieren waaruit zich, via een embryonaal stadium van enkele dagen, na verloop van tijd volwassen platwormen ontwikkelen. *Macrostomum* spp. zijn zogenaemde afvaleters en voeden zich onder meer met mosselen in het larvale stadium. Daarom wordt deze platworm geweerd uit kweekbassins van mosselen.⁴

M. hystrix is voor het eerst in 1843 beschreven en werd destijds aangetroffen in de Oostzee.⁵ Ook komt de platworm voor in brak water nabij de Adriatische kust en in brak water nabij de kust van de Ligurische zee.^{1,6} *M. hystrix* heeft een gemiddelde levensduur van ongeveer 4 weken. Bij 20 °C duurt de embryonale ontwikkeling in het ei ongeveer drie dagen.⁶

M. pusillum is voor het eerst in 1951 beschreven en destijds geïsoleerd uit poelen aan de stranden van de Noordzee (Kiel, Duitsland) die tijdens eb ontstaan.⁷ Van de soort worden twee subspecies beschreven die genetisch verschillend zijn, maar morfologisch niet van elkaar onderscheiden kunnen worden.¹ De platworm komt algemeen voor in de Noordzee, de Oostzee, de Middellandse Zee, de Zwarte Zee, en aan de kusten van Noorwegen, Alaska en Zuid-Oost Canada.⁸

De platworm *Macrostomum lignano*, verwant aan *M. hystrix* en *M. pusillum*, wordt als modelorganisme voor het bestuderen van de ontwikkelings- en (stam)celbiologie gebruikt.^{9,10} De soort kent een sterk vermogen tot regeneratie. Bij fragmentatie kan het deel met het hoofd weer uitgroeien tot een volledig dier. Aangezien *M. hystrix* en *M. pusillum* eenvoudig kunnen worden gekweekt, gemakkelijk kunnen worden gekleurd en eenvoudig te ontleden zijn, bestaat het vermoeden dat zij, net als *M. lignano*, eveneens goede modelorganismen zijn.

I. pulchra

I. pulchra is voor het eerst in 1991 onder de naam *Convoluta pulchra* beschreven en is tegenwoordig onder de naam *I. pulchra* bekend.^{11,12} In de wetenschappelijke literatuur twijfelt men of *I. pulchra* tot het fylum van de platwormen behoort.^{13,14,15} Omdat er geen taxonomische eenduidigheid is of de soort een platworm is, en tot welke taxonomische groep het organisme dan wel zou toebehoren, beschouwt de COGEM *I. pulchra* vooralsnog als een platworm.

I. pulchra werd in 1991 voor het eerst ontdekt in modderige zandstranden langs de Atlantische kust van Noord Amerika.¹² Het is een kleine, ongepigmenteerde, traanvormige platworm van ongeveer 1 mm lang en 365 µm breed, die behoort tot het subfylum *Acoelomorpha*, familie *Isodiametridae*.¹¹

Volwassen *I. pulchra* platwormen produceren ongeveer 1 ei per dag. Bij 20°C duurt de embryonale ontwikkeling in het ei ongeveer drie dagen. De platworm is onder andere vanwege zijn grootte, de aanwezigheid van grote hoeveelheden stamcellen, het kweekgemak en de korte generatietijd, als potentieel nieuw modelorganisme in de ontwikkelings- en (stam)celbiologie geïntroduceerd.¹⁶

Eerder COGEM advies

In 2010 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Macrostonum lignano* waarbij ook genen afkomstig uit *Isodiametra pulchra* werden gebruikt.¹⁷ De COGEM achtte *M. lignano* apathogeen. Zij had tevens geen redenen om aan te nemen dat *M. lignano* en *I. pulchra* over genen beschikken die coderen voor schadelijke producten zoals toxines of pathogeniteitsfactoren. De COGEM adviseerde de werkzaamheden met gg-*M. lignano* op ML-I inperkingsniveau in te schalen.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan om gekarakteriseerde genen betrokken bij regeneratie en veroudering en grote, niet-gekarakteriseerde fragmenten cDNA en genomisch DNA in verschillende soorten vectoren (expressievectoren, plasmides, 'bacterial artificial chromosomes' (BACs)) te kloneren. Het te kloneren DNA is afkomstig van *M. pusillum*, *M. hystrix* en *I. pulchra*. Na klonering zullen de vectoren gebruikt worden voor transformatie van *E. coli* K12, B of C. De gg- *E. coli* zal als voedselbron aan *M. lignano* aangeboden worden.

Tevens wil de aanvrager *M. pusillum*, *M. hystrix* en *I. pulchra* labelen met fluorescerende marker- en reporter genen waarbij deze genen onder controle staan van endogene promotoren. Daartoe zal gebruik gemaakt worden van de hierboven vermelde kloneringsvectoren. De genetische modificatie zal uitgevoerd worden door middel van micro-injectie in eencellige, bevruchte eicellen. Tijdens de ontwikkeling en tijdens regeneratie, geïnduceerd door doorsnijden van het dier, zullen expressiepatronen bestudeerd worden.

De aanvrager is van plan om alle handelingen met gg- *E. coli*, gg- *M. hystrix*, gg-*M. pusillum* en gg-*I. pulchra*, bestaande uit kweek, verschillende vormen van microscopie, 'flow cytometrie' en FACS-analyse, uit te voeren in een ML-I dan wel ML-II gekwalificeerde ruimte. Voor het uitvoeren van bestralingen en 'confocal imaging' zullen de gg-platwormen buiten de ingeperkte ruimtes in een gesloten petrischaal en in een afgesloten container naar de betreffende ruimtes vervoerd worden.

Analyses zullen in een gesloten container plaatsvinden. Na afloop wordt de plaats waar de container heeft gestaan, ontsmet en worden de gg-platwormen in de container naar de ML-I gekwalificeerde ruimte teruggebracht.

Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.¹⁸ 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. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het 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.

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

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 gedocumenteerde 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 mogelijkermogelijk 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. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel eveneens als apathogeen beschouwd.

Classificatie *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra*

M. hystrix, *M. pusillum* en *I. pulchra* zijn vrij-levende platwormen die algemeen onder zilte omstandigheden in een marien of aquatisch milieu voorkomen. De platwormen kennen geen commensale of parasitaire relatie met de mens. De COGEM is ook niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat de platwormen pathogeen zijn voor dieren of planten. Ze zijn verwant aan de apathogene platwormsoort *M. lignano*, en niet verwant aan parasitaire platwormen.^{14,15,19} Op basis van deze gegevens beschouwt de COGEM *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra* als apathogeen.

De COGEM niet bekend met vrij-levende platwormen die schadelijke genproducten produceren. Zij heeft geen redenen om aan te nemen dat de genomen van *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra* voor schadelijke genproducten coderen.

Conclusie

Op basis van bovenstaande informatie, adviseert de COGEM *M. hystrix*, *M. pusillum* en *I. pulchra* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Gebaseerd op deze indeling, en het feit dat de COGEM geen redenen heeft om aan te nemen dat *M. hystrix* en *M. pusillum* in het bezit zijn van genen die coderen voor schadelijke producten, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu, bij de voorgenomen werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau, verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Scharer L *et al.* (2011). Mating behaviour and the evolution of sperm design. PNAS 108(4). Supporting information 10.1073/pnas.1013892108
2. World Register of Marine species (WoRMS). www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=142205
3. Egger E *et al.* (2007). Free-living flatworms under the knife: past and present. Dev. Genes Evol. 217: 89–104
4. Zimmerman LL *et al.* (2003). Control of predacious flatworms *Macrostomum* sp. in culturing juvenile freshwater mussels. North America Journal of Aquaculture 65: 28-32
5. Ørsted AS (1843). Forsøg tile n ny classification of planarieerne (Planariae Dugès) grundet paa mikroskopish-anatomiske undersøgelser. Kroyer's Naturhistorisk Tidsskrift 1(4): 519-581
6. Ramm SA *et al.* (2012). Occurrence, costs and heritability of delayed selfing in a free-living flatworm. J. of Evol. Biol. 25: 2559–2568
7. Ax E (1951). Die Turbellarien des Eulitorals der Kieler Bucht. Zool. Jb. Syst. 80: 227-378
8. Ax P & Armonies W (1990). Brackish water Platyhelminthes from Alaska as evidence for the existence of a boreal brackish water community with circumpolar distribution. Microfauna Marina 6: 7-109

9. Schärer L *et al.* (2011). Mating behaviour and the evolution of sperm design. PNAS 108(4): 1490-1495
10. 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 and Business Media B.V
11. World Register of Marine Species (2 december 2014). *Isodiametra* Hooze & Tyler 2005. In: Tyler, Seth; Artois Tom World list of Acoelomorpha. www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=379811
12. Smith JPS & Bush L (1991). *Convolvata pulchra*, n. sp., (Turbellaria: Acoela) from the east coast of North America. Trans. Am. Microsc. Soc. 110:12-26
13. Philippe H *et al.* (2007). Acoel flatworms are not platyhelminthes: evidence from phylogenomics. PLoS ONE 8: e717
14. Egger E *et al.* (2009). To be or not to be a flatworm: the acoel controversy. PLoS ONE 4(5): e5502
15. Riutort M *et al.* (2012). Evolutionary history of the Tricladida and the Platyhelminthes: an up-to-date phylogenetic and systematic account. Int. J. Dev. Biol. 56: 5-17
16. De Mulder K *et al.* (2009). Characterization of the stem cell system of the acoel *Isodiametra pulchra*. BMC Dev. Biol. 9: 69-85
17. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Macrostomum lignano* platwormen. COGEM advies CGM/101126-01
18. Bureau GGO (december 2010). Regeling genetische gemodificeerde organismen www.ggo-vergunningverlening.nl/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:193514&versionid=&subobjectname=
19. Carranza S *et al.* (1997). Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. Mol. Biol. Evol. 14(5): 485-497