

Advies betreffende: **Kleine wijziging project 95-278: 'Constructie van genetisch gemodificeerde micro-organismen voor de productie van optisch zuivere aminozuren op basis van bacteriële amidases'**

Kennisgever: **DSM Research**

COGEM kenmerk
CGM/010125-01

BGGO nummer
GGO 95-278/1

Datum advies
25 januari 2001

Het experiment

Voor de productie van optisch zuivere aminozuren worden diverse gastheer organismen gebruikt voor de expressie van amidases en aminopeptidases. Aangaande het gebruik van *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* *Pseudomonas fluorescens sp.* is in het verleden reeds advies uitgebracht (CGM/951120-13).

In de kennisgeving wordt verzocht *Ochrobactrum anthropi* als gastheer organisme toe te voegen aan de huidige vergunning. Doel van het experiment is te onderzoeken of *Ochrobactrum anthropi* een geschikte producent is van optisch zuivere aminozuren.

Ochrobactrum anthropi

Ochrobactrum anthropi is een gram negatief micro-organisme dat ingedeeld is in klasse 2 (Appendix A van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling, Juni 1998). Diverse stammen zijn door de kennisgever uit de bodem geïsoleerd en een uitgebreide toxiciteit en pathogeniteit analyse is uitgevoerd met stam NCIMB 40321 door TNO in 1993. Pathogeniteitstesten zijn uitgevoerd met albinomuizen waarbij toediening oraal, intraperitoneaal en intranasaal plaats vond. Klinische afwijkingen werden niet gevonden, *Ochrobactrum* werd snel uitgescheiden. Literatuurstudies hebben evenmin aangetoond dat *O. anthropi* toxines kan produceren. Geconcludeerd werd dat het hier gaat om een niet-toxine producerend micro-organisme van klasse 2.

Minitransposons

Een tweede aandachtspunt dat advies behoeft, betreft het gebruik van EZ::TN minitransposons. Deze transposons bestaan enkel en alleen uit een selectie marker (tetracycline, trimetoprim of kanamycine) geflankeerd door twee korte repeats, waarop het transposase aangrijpt. Deze lineaire DNA sequentie wordt samengevoegd met het Tn5-transposase en het resulterende complex (transposoom) kan *in vitro* geïncubeerd worden met het target DNA of het kan rechtstreeks in het target organisme geëlectroporeerd worden. Het antibioticum resistentiegen wordt vervolgens in het gastheer DNA geïnserteerd. Het transposase of andere genproducten betrokken bij

plasmide replicatie of transposon mobilisatie worden niet door dit minitransposon gecodeerd en het transposase is derhalve niet stabiel aanwezig.

De inschaling en motivatie

De kennisgeving heeft betrekking op klonering en expressie in *Ochrobactrum anthropi*, hetgeen volgens de Regeling op C-I ingeschaald dient te worden, omdat het een klasse 2 organisme betreft. DSM Research verzoekt echter tot inschaling op VMT-niveau, op grond van de resultaten toxiciteit- en pathogeniteits-testen. De COGEM is van mening dat het op grond van de door de kennisgever geleverde gegevens geen bezwaren bestaan om de werkzaamheden met *Ochrobactrum anthropi* uit te voeren op VMT niveau. Hierbij dient opgemerkt te worden dat dit geldt voor de *O. anthropi* stam NCIMB 40321 en zijn klassiek afgeleiden, en dus niet voor andere stamlijnen van *O. anthropi*, waarvan niet is aangetoond dat zij geen toxische danwel pathogene eigenschappen bezitten. Aanvullend wil de COGEM opmerken dat VMT alleen toereikend is voor experimenten tot maximaal 10 liter. De geleverde gegevens zijn niet toereikend om op voorhand uitspraken te doen over grootschaligere toepassingen.

De voorgenomen handelingen met EZ::TN minitransposons kunnen op VMT niveau worden verricht. Het benodigde transposase wordt niet geïntroduceerd waardoor transpositie niet op kan treden. Mocht een werkzaam transposase endogeen in de gastheer aanwezig zijn dan zullen er waarschijnlijk ook target sequenties van nature aanwezig zijn. Dit betekent dat in een natuurlijke situatie al sprake is van transpositie en er dus geen additioneel risico verbonden is aan het inbrengen van de EZ::TN minitransposons.