

Advies betreffende: **Functionele analyse van genen uit hyperthermofiele micro-organismen**

Kennisgever: **Wageningen Universiteit**

COGEM kenmerk
CGM/020612-09

BGGO nummer
GGO 00-050/1

Datum advies
12 juni 2002

Inleiding

De voorgenomen experimenten hebben betrekking op het onderzoek naar de structuur en functie van genen en genproducten afkomstig uit niet pathogene, (extreem) thermofiele bacteriën en archaea. De adviesvraag heeft betrekking op de klonering van genen die coderen voor metabole enzymen en regulatoren in de gastheren *Sulfolobus solfataricus* en *Sulfolobus acidocaldarius*. Hiertoe zal de aanvrager gebruik maken van een tweetal shuttle vectoren, pEXs en pKMSD48 en een aantal nog te ontwikkelen vectoren, die afgeleid zijn van het fusellovirus SSV1 (*Sulfolobus shibatae* virus 1). Verscheidene *Sulfolobus* species zijn geïsoleerd en gekarakteriseerd en vele bevatten extrachromosomale genetische elementen zoals virussen en (conjugatieve) plasmiden met een breed gastheerbereik. De natuurlijke gastheer van SSV1 is *Sulfolobus shibatae* die behoort tot de extreem thermofiele zuurminnende Archaeabacteriën. De aanvrager geeft aan dat SSV1 zeer specifiek is voor het genus *Sulfolobus*. pEXs is een shuttle vector die gebaseerd is op de *E. coli* plasmide pGEM5Zf die de ARS (autonomously replicating sequence) van SSV1 bevat. Hierdoor is autonome propagatie van de vector in *S. solfataricus* en *E. coli* mogelijk. De shuttle vector pKMSD48 bestaat uit het complete genoom (cirulair DNA; 15.5 kb) van het SSV1 virus waarin in een niet-essentieel ORF pBluescript II SK+ is gekloneerd. Deze vector vermenigvuldigt zich stabiel in hoge kopie-aantallen in zowel *E. coli* als *S. solfataricus*. In *S. solfataricus* kan deze vector leiden tot virusdeeltjes (vergelijkbaar met wild-type SSV1 virus) die zich verspreiden in geïnfecteerde cultures. De aanvrager geeft verder aan dat beide shuttle vectoren de mogelijkheid missen van zelfoverdraagbaarheid middels conjugatie, en dat het gastheerbereik is beperkt tot *E. coli* en *Sulfolobus*.

Overwegingen en inschaling

De shuttlevector pEXs bevat geen genetische informatie die overdracht middels conjugate mogelijk maakt. Daarnaast is het ontstaan van virusdeeltjes uitgesloten. De COGEM adviseert daarom om het gebruik van de shuttle vector pEXs en daarvan afgeleide vectoren ten behoeve van de klonering van de aangegeven donorsequenties, volgens artikel 5.2.j van de Regeling in te schalen op VMT niveau.

De shuttlevector pKMSD48 mist eveneens de mogelijkheid van overdracht middels conjugate.

In tegenstelling tot de bovengenoemde shuttlevector pEXs is pKMSD48 wel in staat infectieus virus te produceren. Hoewel de gevormde deeltjes alleen een productieve infectiecyclus in *Sulfolobus* kunnen doormaken en dit thermofiele micro-organisme in het ons omringende milieu niet voorkomt, is de COGEM van mening dat niet valt uit te sluiten dat pKMSD48 zich in het milieu verspreidt in de vorm van een bacteriofaag. De COGEM is van mening dat deze vector niet voldoet aan de criteria voor een erkende vector. De COGEM adviseert daarom dat het gebruik van deze vector en daarvan afgeleide vectoren ten behoeve van de klonering van de aangegeven donorsequenties, volgens artikel 5.3.j van de Regeling¹ zou moeten worden ingeschaald op C-I niveau.