

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 17 mei 2010  
**KENMERK** CGM/100517-01  
**ONDERWERP** Advies: classificatie *Lachancea kluyveri*

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek tot wijziging van vergunning IG 05-45 met de titel 'Karakterisering van cDNAs en/of genen betrokken bij het metabolisme van purines en pyrimidines en bij de regulatie van genexpressie' van het Academisch Ziekenhuis bij de Universiteit van Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de gistsoort *Lachancea kluyveri* (*Saccharomyces kluyveri*) en de mogelijke plaatsing van dit micro-organisme in Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo).

Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt worden.

De aanvrager wil de gistsoort *L. kluyveri* genetisch modificeren voor de productie van humane eiwitten, die betrokken zijn bij de aanmaak en afbraak van belangrijke bouwstenen van DNA en RNA, de zogenaamde purines en pyrimidines. Hij verzoekt de benodigde clonerings- en expressiewerkzaamheden uit te mogen voeren op ML-I inperkingsniveau.

Sinds de ontdekking van *L. kluyveri* in 1956 is deze gist aangetroffen in de bodem, op verschillende boomsoorten, in de darm van de fruitvlieg *Drosophila*, en in vruchtensappen. Door zijn efficiëntere energiegebruik dan de algemeen bekende bakkergist *S. cerevisiae* staat *L. kluyveri* steeds meer in de belangstelling als organisme voor industriële toepassingen. Hoewel deze gistsoort al lange tijd bestudeerd wordt en algemeen voorkomt in het milieu, wordt *L. kluyveri* niet geassocieerd met enige pathogeniteit voor mens en dier met een normaal functionerend immuunsysteem. Tevens zijn er geen aanwijzingen dat deze gistsoort pathogeen is voor planten.

De COGEM adviseert daarom de gistsoort *L. kluyveri* in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen en op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen te plaatsen. Tevens is zij van mening dat de voorgenomen clonerings- en expressiewerkzaamheden met *L. kluyveri* op ML-I niveau ingeschaald moeten worden.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.*

# Classificatie van de gist *Lachancea kluyveri*

## COGEM advies CGM/100517-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de gistsoort *Lachancea kluyveri* (*Saccharomyces kluyveri*) ingedeeld dient te worden en of dit micro-organisme op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) geplaatst kan worden.<sup>1</sup> De aanvrager wil in deze gist humane enzymen tot expressie brengen die betrokken zijn bij het purine- en pyrimidinemetabolisme.

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 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.<sup>1</sup> 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:

- 1) Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- 2) Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- 3) 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.
- 4) 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 immuuncompetente mensen een ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die een ziekte kunnen veroorzaken bij immuungecompromiteerde individuen, worden als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen op Bijlage 1 geplaatst worden.

### *Lachancea kluyveri*

De zogenaamde ‘budding’ gist *Lachancea kluyveri*, behoort tot de familie der *Saccharomycetaceae*. De gistsoort is in 1956 voor het eerst beschreven na isolatie uit de darm van

de fruitvlieg *Drosophila* en stond aanvankelijk bekend onder de naam *Saccharomyces kluyveri*.<sup>2</sup> Op basis van zijn nauwe fylogenetische verwantschap met een aantal gistsoorten behorend tot andere genera zoals *Kluyveromyces* en *Zygosachharomyces* is *S. kluyveri* in 2003 omgedoopt tot *Lachancea kluyveri*.<sup>3</sup> In het advies wordt deze inmiddels breed geaccepteerde naam gehanteerd.

De gist *L. kluyveri* lijkt wijdverspreid in het milieu voor te komen. Naast de aanwezigheid in *Drosophila* soorten is *L. kluyveri* ook aangetroffen in de Europese bodem, op bepaalde boomsoorten in India en Noord-Amerika en in vruchtensap.<sup>4,5</sup>

Ten opzichte van de bekende bakkergist *S. cerevisiae* heeft *L. kluyveri* een aantal afwijkende eigenschappen. Ten eerste maakt *L. kluyveri* op efficiëntere wijze gebruik van de energie die in suikers opgeslagen ligt door de beschikbare suikers alleen af te breken onder anaerobe omstandigheden (fermentatie). Hierdoor levert *L. kluyveri* meer biomassa op dan *S. cerevisiae*. Deze eigenschap maakt *L. kluyveri* aantrekkelijk voor industriële toepassingen.<sup>6</sup> Daarnaast volstaan pyrimidines en hiervan afgeleide metabolieten voor *L. kluyveri* als stikstofbron. *L. kluyveri* is derhalve een interessant modelorganisme om de pyrimidinedegradatie te bestuderen.<sup>7</sup>

### **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 er van veel bacteriën of schimmels weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange 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 mogelijkerwijs moeilijk 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 bij de afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik micro-organismen als apathogeen beschouwd.

Onderstaande overweging is gebaseerd op de gegevens uit de literatuur én de inschattingen van (externe) experts.

### ***Lachancea kluyveri***

Sinds de beschrijving van *L. kluyveri* in 1956 is er één studie gepubliceerd, waarin deze gistsoort in verband wordt gebracht met ziekte bij mensen.<sup>8</sup> In deze studie wordt het overlijden van een 47-jarige Aidspatiënt met een uitgebreid klinische verleden op gebied van infectieziekten toegeschreven aan een *L. kluyveri* infectie. Identificatie vond plaats op basis van fysiologische eigenschappen van de betreffende gist. *L. kluyveri* werd aangetroffen in enkele bloedmonsters en in het hersenvocht van de patiënt. Bovendien werden post mortem, gist-achtige infiltraties aangetroffen in verschillende organen.

Onderzoek naar de vermeende letaliteit van giststammen in muizen wijst uit dat voor muizen met een actief onderdrukt immuunsysteem een blootstelling aan *L. kluyveri* dodelijk kan zijn. In

de groep muizen met een normaal functionerend immuunsysteem werd echter geen letaliteit waargenomen na blootstelling aan *L. kluyveri*.<sup>9</sup>

In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels inclusief vele opportunistische soorten, staat *L. kluyveri* niet vermeld als pathogeen.<sup>10</sup> Bovendien wordt in dit naslagwerk aangegeven dat de eerder genoemde publicatie over de betrokkenheid van *L. kluyveri* bij het overlijden van een Aidspatiënt mogelijk berust op een foutieve identificatie van het betrokken micro-organisme.

Ook in de komende editie van het standaardwerk 'The Yeasts, a taxonomic study', dat later in 2010 uitgebracht zal worden, wordt geen melding gemaakt van enige pathogeniciteit van *L. kluyveri*.<sup>11</sup>

Ondanks het feit dat *L. kluyveri* al lange tijd in het laboratorium wordt bestudeerd en wijdverspreid voorkomt in het milieu heeft de COGEM geen aanwijzingen aangetroffen waaruit blijkt dat *L. kluyveri* pathogeen is voor mensen of dieren indien ze beschikken over een normaal functionerend immuunsysteem. Tevens zijn er geen aanwijzingen gevonden om aan te nemen dat *L. kluyveri* als plantpathogeen aangemerkt dient te worden.

De *L. kluyveri* stammen die beschikbaar zijn in de 'American Type Culture Collection' worden allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>12</sup> De gistsoort *L. kluyveri* wordt ook in de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' beschouwd als een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 1.<sup>13</sup>

Concluderend is de COGEM van mening dat *L. kluyveri* als een apathogeen micro-organisme beschouwd moet worden.

### Advies

Gezien het niet pathogene karakter van *L. kluyveri* adviseert de COGEM om deze gistsoort in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en tevens in Bijlage 1 van de Regeling ggo op te nemen. Aansluitend adviseert de COGEM de voorgenomen clonerings- en expressiewerkzaamheden met de *L. kluyveri* op inperkingsniveau ML-I in te schalen.

### Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
2. Phaff HJ *et al.* (1956). The taxonomy of yeast isolated from Drosophila in the Yosemite region of California. *Antonie van Leeuwenhoek* 22: 145-161
3. Kurtzman CP (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Res.* 4: 233-245
4. Barnett JA *et al.* (1990). Description of the species *Saccharomyces kluyveri*. In: *Yeasts: characteristics and identification*. (2<sup>nd</sup> edition) Cambridge University Press, Cambridge.
5. The Genome Center at Washington University (06-05-2010). [http://genome.wustl.edu/genomes/view/saccharomyces\\_kluyveri/](http://genome.wustl.edu/genomes/view/saccharomyces_kluyveri/)
6. Møller K *et al.* (2004). Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *J. Biotechnol.* 111: 311-318

7. Beck H *et al.* (2008). *Saccharomyces kluyveri* as a model organism to study pyrimidine degradation. *FEMS Yeast Res* 8: 1209-1213
8. Pynka M *et al.* (1998). Disseminated infection with *Saccharomyces kluyveri* in a patient with AIDS. *Infection* 26:184-186
9. Okawa Y & Yamada Y (2002). Lethality of yeasts with low pathogenicity in mice immunocompromised by cylophosphamide treatment. *Biol. Pharm. Bull.* 25:940-942
10. Hoog de GS *et al.* (2009). *Atlas of Clinical Fungi*. 3<sup>rd</sup> edition
11. Kurtzman CP *et al.* (2010). *The Yeasts: a taxonomic study*. 5<sup>th</sup> edition
12. American Type Culture Collection (29-04-2010). [www.lgcstandards-atcc.org/](http://www.lgcstandards-atcc.org/)
13. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (29-04-2010). [www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm070517.html](http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm070517.html)

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.*