

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 11 februari 2019
KENMERK CGM/190211-03
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie *Tetrahymena thermophila*

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier '*Tetrahymena thermophila*' (IG 19-005_2.13-000), ingediend door de Stichting Hubrecht Organoid Technology, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het eencellige organisme *Tetrahymena thermophila* en de plaatsing van dit organisme op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'.

T. thermophila is een eencellig organisme dat wereldwijd voorkomt in zoet water. Dit zogenaamde trilhaardiertje bevat twee celkernen die structureel en functioneel van elkaar verschillen. Deze ééncellige wordt al jaren toegepast als modelorganisme voor onderzoek en kent een lange historie van veilig gebruik. De COGEM heeft geen aanwijzingen dat *T. thermophila* ziekte veroorzaakt in gezonde mensen, dieren of planten. Daarom is de COGEM van oordeel dat *T. thermophila* apathogeen is, en adviseert deze soort in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat *T. thermophila* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

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 IenW

Pathogeniteitsclassificatie van de ciliaat *Tetrahymena thermophila*

COGEM advies CGM/190211-03

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Hubrecht Organoid Technology (IG 19-005) is de COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van het ééncellige organisme *Tetrahymena thermophila* en over de plaatsing van dit organisme op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (respectievelijk 'lijst A2 veilige vectoren' en 'lijst A3 inserties'). Activiteiten met deze ggo's kunnen, zonder dat een aanvrager daar een milieurisico-beoordeling voor hoeft aan te leveren, direct na kennisgeving gestart worden.

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. 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:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

3. *Tetrahymena thermophila*

T. thermophila is een vrij-levende ciliaat (fylum Ciliophora) die wereldwijd voorkomt in zoetwater. Deze ééncelligen hebben zeer veel trilharen (cilia), die dienen voor de voortbeweging en de opname van voedsel, en worden daarom ook wel trilhaardiertjes genoemd. *Tetrahymena* spp. zijn ongeveer 30-50µm groot en voeden zich met bacteriën. Ciliaten kunnen zich zeer snel vermenigvuldigen, waarbij elke 2 uur een celdeling kan optreden.^{2,3} *T. thermophila* is makkelijk te kweken, en tolereert temperaturen tussen de 12°C en 41°C.³

Oorspronkelijk werden alle soorten uit het genus *Tetrahymena* geschaard onder de naam *T. pyriformis*. Door de ontdekking van verschillende ‘mating types’ is *T. thermophila* als aparte soort erkend. Hierbij hebben enkele naamswijzigingen plaatsgevonden, waarbij het organisme eerst *T. pyriformis* variety 1, en later *T. pyriformis* syngen 1 werd genoemd, voordat de uiteindelijke naam *T. thermophila* in 1976 is vastgesteld.

Tetrahymena hebben de unieke eigenschap dat er zich twee kernen binnen één cel bevinden die sterk verschillen in structuur en functie, de zogenaamde micronucleus (MIC) en macronucleus (MAC). In de MIC bevindt zich het diploïde kiembaangenoom, dat in vegetatieve staat niet tot expressie komt. In de MAC bevindt zich het polyploïde somatische genoom, dat de voornaamste bron is van transcriptie en translatie.⁴ De sequentie van het MAC genoom van de *T. thermophila* stam SB210 is nog niet volledig in kaart gebracht, maar bevat circa 104Mbp DNA en ongeveer 180-250 chromosomen.^{5,6} Het MIC genoom van SB210 is wel volledig gesequenced, en bevat 157Mbp DNA en 5 chromosomen.⁷

T. thermophila heeft een complexe levenscyclus die onder te verdelen is in een aseksuele en een seksuele vorm. Tijdens de aseksuele levenscyclus vindt er binaire deling plaats waarbij het MIC genoom mitose ondergaat en het MAC genoom amitose, waarbij de chromosoomsegregatie een stochastisch proces is. Onder nutriënt-arme condities vindt de seksuele levenscyclus plaats, waarbij in beide eencelligen meiose plaatsvindt van het MIC genoom en één functionele haploïde pronucleus wordt gevormd. Deze wordt door mitose verdubbeld, waarbij één van de gevormde pronuclei door conjugatie wordt uitgewisseld en fuseert met de achtergebleven pronucleus in het ontvangende organisme tot één diploïde nucleus. Deze diploïde nucleus ondergaat tweemaal mitose, waarbij twee van de ontstane nucleï differentiëren in de nieuwe polyploïde MAC en de andere twee in de diploïde MICs. De oorspronkelijke MAC wordt afgebroken.

Enkele soorten uit het genus *Tetrahymena* staan bekend als opportunistische pathogenen van verschillende vissoorten (zoals de Atlantische zalm (*Salmo salar*), zebravis (*Danio rerio*), neontetra (*Paracheirodon innesi*), maar voornamelijk guppy's (*Poecilia reticulata*)).^{8,9} Zo is *Tetrahymena corlissi* geassocieerd met de ziekte 'tetrahymenosis' in vissen, waarbij het weefsel van de vis aangetast wordt doordat de cellen geconsumeerd worden.¹⁰ In experimenten kan infectie alleen nagebootst worden als er eerst een beschadiging in het weefsel heeft plaatsgevonden of onder stressvolle condities waarbij in de gastheer geen reactie tegen de infectie plaatsvindt.^{8,11} Ook een andere, nog onbekende *Tetrahymena* soort is geïdentificeerd die verschillende vissoorten kan infecteren.^{9,12}

In vitro is aangetoond dat *T. thermophila* zich kan voeden op monolaag van vis-epitheelcellen. Door fysiek contact met de monolaag komen cellen lost te zitten en kan fagocytose plaatsvinden.¹³ Ook in monolaag cellijnen afkomstig van kikkers, muizen, insecten en mensen vindt fagocytose door *T. thermophila* plaats.¹⁴ De afbraak wordt niet veroorzaakt door cytolytische enzymen, zoals bij sommige amoebes het geval is.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over *Tetrahymena thermophila*, of andere soorten uit het genus *Tetrahymena*. Wel heeft zij een enkele ééncellige humaan- en dierpathogene parasieten geclassificeerd.¹⁵

5. Classificaties door andere beoordelende instanties

De 'American Type Culture Collection' (ATCC), die pathogeniteit voor de mens in ogenschouw neemt, heeft verschillende *Tetrahymena thermophila* stammen ingedeeld in PG1.¹⁶ De inschaling door buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

6. Overweging en advies

T. thermophila is een veelvoorkomend ééncellig organisme. Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *T. thermophila* pathogeen is voor gezonde mensen, dieren of planten. *In vitro* kan *T. thermophila* cellen (monolaag) fagocyteren, maar *T. thermophila* wordt in de wetenschappelijke literatuur niet beschreven als vispathogeen. Soortgenoten die wel geassocieerd zijn met ziekte in vissen, worden beschouwd als opportunistische pathogenen. *T. thermophila* wordt al lange tijd als modelsysteem gebruikt in onderzoek,² en ook in het onderwijs wordt de soort ingezet als leermiddel.¹⁷

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *T. thermophila* apathogeen is. Zij adviseert daarom de COGEM *T. thermophila* in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van oordeel dat *T. thermophila* in aanmerking komt voor plaatsing op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-01-01> (bezocht: 29 januari 2019)
2. Ruehle MD *et al.* (2016). *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: genetic and genomic tools. *Genetics* 203:649-665
3. Orias E (1998). Mapping the germ-line and somatic genomes of a ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. *Genome Res.* 8: 91-99
4. Orias E *et al.* (2011). *Tetrahymena thermophila*, a unicellular eukaryote with separate germline and somatic genomes. *Res. Microbiol.* 162: 578–586
5. Eisen JA *et al.* (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol.* 4: e286
6. Coyne RS *et al.* (2008). Refined annotation and assembly of the *Tetrahymena thermophila* genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure. *BMC Genomics* 9:562
7. Hamilton EP *et al.* (2016). Structure of the germline genome of *Tetrahymena thermophila* and relationship to the massively rearranged somatic genome. *eLife* 5: e19090
8. Leibowitz MP *et al.* (2005). Environmental and physiological conditions affecting *Tetrahymena* sp. infection in guppies, *Poecilia reticulata* Peters. *Journal of Fish Diseases* 28: 539-547
9. Sharon G *et al.* (2014). Comparative study of infection with *Tetrahymena* of different ornamental fish species. *J. Comp. Path.* 150: 316-324
10. Leibowitz MP *et al.* (2009). Cysteine proteases and acid phosphatases contribute to *Tetrahymena* spp. pathogenicity in guppies, *Poecilia reticulata*. *Vet Parasitol.* 166:21-26
11. Chettri JK *et al.* (2009). Protective immunization against *Tetrahymena* sp. infection in guppies (*Poecilia reticulata*). *Fish Shellfish Immunol.* 27: 302-308
12. Leibowitz MP & Zilberg D (2009). *Tetrahymena* sp. infection in guppies, *Poecilia reticulata* Peters: parasite characterization and pathology of infected fish. *J. Fish Dis.* 32: 845-855
13. Pinheiro MDO & Bols NC (2014). Delineating cellular interactions between ciliates and fish by co-culturing *Tetrahymena thermophila* with fish cells. *Cell Biol. Int.* 38: 1138–1147
14. Pinheiro MDO & Bols NC (2015). Some but not All *Tetrahymena* species destroy monolayer cultures of cells from a wide range of tissues and species. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 605-613
15. COGEM advies (2012). Classificatie hu­maan- en dierpathogene parasieten. CGM/120127-01
16. American Type Culture Collection (ATCC). *Tetrahymena thermophila*.
<https://www.atcc.org/search#q=tetrahymena%20thermophila&sort=relevancy> (bezocht: 30 januari 2019)
17. Smith JJ *et al.* (2012). *Tetrahymena* in the classroom. *Methods Cell Biol.* 109: 411-430