

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 16 januari 2012
KENMERK CGM/120116-02
ONDERWERP Advies inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde
zeeanemoon *Nematostella vectensis*

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 11-093 met de titel 'Analyse van *Nematostella vectensis* embryogenese' van de Universiteit van Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) zeeanemoon *Nematostella vectensis*. De aanvrager is voornemens gg- *N. vectensis* te vervaardigen door genen afkomstig uit verschillende donororganismen in te brengen in bevruchte *N. vectensis* eicellen. *N. vectensis* is nog niet eerder als gastheer door de COGEM beoordeeld.

N. vectensis is een kleine zeeanemoon die, vanwege zijn brede zout- en temperatuurtolerantie, relatief korte generatietijd, sterke herstelvermogen en het gemak waarmee de anemoon in het laboratorium te houden en te kweken is, wordt gezien als modelorganisme voor de bestudering van de ontwikkeling van neteldieren.

De COGEM is niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat *N. vectensis* pathogeen is. De te kloneren genen en toe te passen plasmiden coderen niet voor (potentieel) schadelijke genproducten. Er zijn ook geen redenen om aan te nemen dat de te gebruiken sequenties de toxiciteit van *N. vectensis* beïnvloeden.

Om onbedoelde verspreiding uit het laboratorium te voorkomen wordt al het materiaal dat bij de experimenten wordt gebruikt, verzameld en geautoclaveerd. De COGEM acht de kans op verspreiding in het milieu bij naleving van deze voorschriften verwaarloosbaar klein.

De COGEM adviseert de werkzaamheden met de gg-zeeanemoon uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de werkvoorschriften die hiervoor gelden, acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met de anemoon voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,



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 met inbreng van ir. M.A. Faasse van Acteon Marine Biology Consultancy.

Inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde zeeanemoon *Nematostella vectensis*

COGEM advies CGM/120116-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) zeeanemoon *Nematostella vectensis*. Doel van het onderzoek is om meer inzicht te krijgen in het mechanisme van de embryogenese van *N. vectensis*. De aanvrager wil *N. vectensis* genetisch modificeren met sequenties coderend voor transcriptiefactoren en eiwitten die betrokken zijn bij celbeweging, adhesie, patroonvorming en celspecificatie. De aanvrager wil de werkzaamheden op ML-1 niveau uitvoeren. *N. vectensis* is nog niet eerder als gastheer door de COGEM beoordeeld.

Kenmerken van *Nematostella vectensis*

N. vectensis is een kleine, bodemwroetende, doorzichtige zeeanemoon die behoort tot de stam der Cnidaria (neteldieren) en wordt gerekend tot het rijk der Animalia. Volwassen exemplaren zijn ongeveer twee tot zes centimeter groot en opgebouwd uit een lichaamskolom met aan het ene uiteinde een kopstructuur met tentakels en een mondopening en aan het andere uiteinde een voetstructuur.

N. vectensis komt wijdverspreid voor langs de Atlantische kust van Noord-Amerika.¹ Daarnaast wordt de soort aangetroffen voor de zuidelijke kust van Engeland en de Pacifische kust van de Verenigde Staten.^{1,2,3} Vermoedelijk is de soort in deze laatste gebieden onbedoeld geïntroduceerd door de mens. Volgens de aanvrager is de soort niet in Nederland gesignaleerd.

De zeeanemoon kent een brede milieutolerantie en wordt aangetroffen in ondiepe, brakke wateren met fluctuerende zoutgehaltes en temperaturen variërend van -1 tot 28°C.^{1,3} De zeeanemoon kan niet overleven in zoet water. Het dier leeft half ingegraven in het sediment en voedt zich met klein dierlijk plankton dat hij verdooft met een neurotoxine dat zich in de netelkapsels op de tentakels en rond de mond bevindt.^{4,5}

Voortplantingswijze

N. vectensis kan zich zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk voortplanten. Tijdens de geslachtelijke voortplanting laten volwassen vrouwelijke dieren eicellen vrij die uitwendig door vrijgekomen spermacellen uit mannelijke anemonen worden bevrucht. Ongeveer twee dagen na de bevruchting komen er zogenoemde planulae larven uit de eicellen tevoorschijn die na ongeveer een week transformeren in volwassen poliepen. Deze volwassen individuen worden na ongeveer 70 dagen geslachtsrijp.^{2,3}

Tijdens de ongeslachtelijke voorplanting deelt het organisme zich transversaal (overdwars) in tweeën, waarbij de kop en voetstructuur van elkaar gescheiden worden. Na enkele dagen worden de ontbrekende structuren geregenereerd waardoor er twee nieuwe exemplaren ontstaan. In zeldzame gevallen wordt er aan de voet van het lichaam eerst een nieuwe kopstructuur gevormd waarna splitsing volgt. Dit proces wordt ook wel ‘polarity reversal’ genoemd. Na verwonding kan ook regeneratie optreden.¹

N. vectensis wordt vanwege zijn brede zout- en temperatuurtolerantie, relatief korte generatietijd, sterke herstelvermogen en het gemak waarmee de anemonen in het laboratorium te houden en te kweken zijn, gezien als modelorganisme voor de bestudering van de ontwikkeling, ecologie en evolutie van de neteldieren. Het volledige genoom van de zeeanemoon is inmiddels bekend.⁶

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil meer inzicht krijgen in het mechanisme van *N. vectensis* embryogenese en in het bijzonder de gastrulatie. Hiertoe wil de aanvrager bevruchte *N. vectensis* eicellen genetisch modificeren met sequenties coderend voor transcriptiefactoren en eiwitten die betrokken zijn bij celbeweging, adhesie, patroonvorming en celspecificatie. Deze genen, waaronder *snail*, *forkhead*, *brachyury*, en *wnt*, zijn afkomstig uit verschillende donororganismen zoals de mens, rat, muis, hond, rund, konijn, kip, kikker, zebravis, zee-egel, *Drosophila* (fruitvlieg), *Caenorhabditis elegans* (rondworm), Porifera (sponsdieren) en neteldieren. De genetische modificatie zal plaatsvinden door middel van transfectie of micro-injectie van bevruchte eicellen met plasmide DNA.

N. vectensis wordt in het lab gekweekt in een volledig donkere incubator bij 17°C en bewaard in kleine glazen bakjes in verdund steriel zeewater. Dit zeewater wordt ongeveer twee keer per week verversd. De productie van eicellen en zaadcellen wordt geïnduceerd met behulp van licht- en temperatuursverhoging. De eicellen worden vervolgens bevrucht door toevoeging van het sperma. Na de bevruchting worden de eicellen genetisch gemodificeerd. De gemodificeerde eicellen en gemodificeerde en ongemodificeerde embryo's of dieren worden ook in afgedekte glazen bakjes gehouden en gelabeld met informatie die betrekking heeft op de ingebrachte genen. De ontwikkeling van de bevruchte eicellen wordt gevolgd met behulp van in situ hybridisatie, microscopisch onderzoek of realtime PCR.

Overweging

De vergunningaanvraag betreft werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *N. vectensis*. De aanvrager wil de werkzaamheden op ML-1 niveau uitvoeren. De zeeanemoon wordt in het laboratorium gekweekt en bewaard in kleine glazen bakjes in verdund steriel zeewater. De embryo's, larven en volwassen dieren kunnen niet zonder tussenkomst van de mens vrijkomen uit de kweek.

Gezien de biologische eigenschappen van de zeeanemoon en de condities waarin deze gekweekt moeten worden, kan de COGEM instemmen met inperking op ML-1 niveau dat geldt voor activiteiten met genetisch gemodificeerde animale cellen.

De COGEM is niet bekend met publicaties in de wetenschappelijke literatuur waaruit blijkt dat *N. vectensis* pathogeen is. Het neurotoxine dat *N. vectensis* produceert heeft een sterke specificiteit voor invertebraten en heeft slechts in extreem hoge concentraties een zeer zwak effect op zoogdiercellen.^{4,5} De te kloneren genen zijn afkomstig van verschillende donororganismen en betrokken bij de vroege embryogenese van *N. vectensis*. De donorsequenties en toe te passen plasmiden coderen niet voor (potentieel) schadelijke genproducten. Er zijn geen redenen om aan te nemen dat de te gebruiken sequenties de toxiciteit van *N. vectensis* beïnvloeden.

Om onbedoelde verspreiding uit het laboratorium te voorkomen wordt al het materiaal dat bij de experimenten wordt gebruikt, waaronder zeewater, dieren, embryo's en eicellen, verzameld en geautoclaveerd. De COGEM acht kans op verspreiding in het milieu bij naleving van deze voorschriften verwaarloosbaar klein.

In het onwaarschijnlijke geval dat *N. vectensis* door onvoorziene handelingen in het milieu terecht komt, kan de COGEM niet uitsluiten dat de zeeanemoon zich vestigt in het Nederlandse aquatische milieu. *N. vectensis* heeft een brede milieutolerantie en een hoog voortplantingspotentieel, waardoor het zich theoretisch als een invasieve soort zou kunnen gedragen (in Amsterdam en andere delen van Nederland zijn brakke wateren aanwezig die een potentiële habitat voor de zeeanemoon vormen). In Engeland, waar de soort vermoedelijk door de mens geïntroduceerd is, komt *N. vectensis* niet wijdverspreid voor en werd het dier lange tijd beschouwd als bedreigde diersoort.⁷ Tot dusver zijn daar geen nadelige effecten van de zeeanemoon gerapporteerd. Er zijn geen aanwijzingen dat de mogelijke invasiviteit wordt beïnvloed door de te gebruiken gensequenties. Daarnaast is het aantal kwetsbare zeldzame diersoorten in de habitat van de zeeanemoon laag en leven deze diersoorten grotendeels niet in de microhabitat van de zeeanemoon die bestaat uit zachte waterbodems. Mocht het dier toch onverhoopt in het milieu terechtkomen, dan kan dit in het uiterste geval leiden tot een situatie die vergelijkbaar is met de niet als schadelijk ervaren zeeanemonenpopulatie zoals die bestaat voor de zuidelijke kust van Engeland.

Advies

Op basis van bovenstaande overwegingen adviseert de COGEM de werkzaamheden met gg-*N. vectensis* uit te voeren op ML-I inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de werkvoorschriften die hiervoor gelden, acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden met de zeeanemoon voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Darling JA et al. (2005). Rising starlet: the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. Bioessays 27: 211-221
2. Hand C & Uhlinger KR (1994). The unique , widely distributed, estuarine sea anemone, *Nematostella vectensis* Stephenson: a review, new facts and questions. Estuaries 17: 501-508
3. Hand C & Uhlinger KR (1992). The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone *Nematostella vectensis*. Biol. Bull. 182: 169-176
4. Moran Y et al (2008). Intron retention as a posttranscriptional regulatory mechanism of neurotoxin expression at early life stages of the starlet anemone *Nematostella vectensis*. J Mol Biol. 380:437-43
5. Moran Y et al (2011). Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones. Proc Biol Sci. Ahead of print
6. Putman NH et al (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. Science 317(5834):86-94
7. Sheader M et al. (1997). The anemone, *Nematostella vectensis*, in Britain: Considerations for conservation management. Aquatic Conservation, 7: 13-25