

De minister van Volkshuisvesting  
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 28 oktober 2008  
**KENMERK** CGM/081028-04  
**ONDERWERP** Signalerende brief 'cisgenese en voedselveiligheidsbeoordeling'

Geachte mevrouw Cramer,

Op 2 september jongstleden heeft de COGEM een bijeenkomst met deskundigen op het gebied van de voedsel- en veevoederveiligheid van ggo's belegd. De bijeenkomst is georganiseerd naar aanleiding van een eerdere toezegging van de COGEM en een verzoek van het ministerie van VROM. Het doel van de bijeenkomst was om te verkennen hoe de verschillende deskundigen betrokken bij de vergunningverlening, de potentiële risico's beoordelen die verbonden zijn aan de inbouw van zeer korte DNA fragmenten (oligonucleotiden) in het plantengenoom.

Deze vraag speelt een belangrijke rol in de discussie rond de eventuele vereenvoudiging van de ggo-regelgeving voor cisgene planten. Bij cisgenese worden planten gemodificeerd met DNA van de plantensoort zelf of met DNA van een van nature kruisbare soort. De COGEM heeft eerder gesteld dat de milieurisico's van cisgene planten grotendeels gelijk zijn aan die van planten verkregen door conventionele veredeling<sup>1</sup>. De COGEM heeft destijds een voorbehoud gemaakt met betrekking tot de aanwezigheid van korte transgene DNA fragmenten rond de ingebouwde cisgene sequentie. De inbouw van deze zogenaamde (bacteriële) T-DNA borders, - variërend in grootte van 2 tot 25 nucleotiden -, is onvermijdbaar bij transformatie van planten met behulp van *Agrobacterium tumefaciens*. De COGEM achtte onder meer overleg met experts op het gebied van voedselveiligheid en toxicologie noodzakelijk om gezamenlijk de eventuele risico's voor voedselveiligheid in kaart te kunnen brengen.

De COGEM signaleert dat uit het overleg van 2 september blijkt, dat de risico's voor het milieu en de voedselveiligheid door de deskundigen anders beoordeeld worden.

De COGEM experts zijn van mening dat het zeer onwaarschijnlijk is dat de insertie in het plantengenoom van korte DNA fragmenten of oligonucleotiden, zoals een T-DNA border, tot (milieu)risico's leidt. Ten eerste is de kans minimaal dat er door de insertie een nieuw functioneel

---

<sup>1</sup> COGEM signalering 'Vereenvoudiging van regelgeving bij cisgenese, een reële optie?' (CGM/060428-05).

eiwit ontstaat. Ten tweede is de kans dat een nieuw functioneel eiwit de biologische karakteristieken van een plant verandert, en de plant een ecologisch voordeel verschaft, verwaarloosbaar klein. Verder is het genoom van de plant zeer dynamisch en vinden er van nature al tal van herschikkingen in het genoom plaats. Eventuele risico's van de insertie van oligonucleotiden vallen daarmee in de 'baseline' van de van nature voorkomende risico's en de risico's die bij conventionele veredeling optreden.

De bij de bijeenkomst aanwezige deskundigen op het gebied van veevoeder- en voedselveiligheid zijn daarentegen van mening dat er bij de risicobeoordeling voor (vee)voedselveiligheid geen onderscheid gemaakt kan worden tussen cisgene of transgene planten.

Zij zijn van mening dat de aanwezigheid van soortvreemde T-DNA borders potentiële risico's ten aanzien van de (vee)voedselveiligheid met zich meebrengt, waardoor een volledige risicobeoordeling van de betreffende plant of het product, - zoals moleculaire karakterisering en analyse van het metaboliëetprofiel -, noodzakelijk is.

De COGEM wijst erop dat het een verkennend gesprek betrof. De meningen die in het overleg naar voren zijn gekomen, zijn een momentopname gebaseerd op de huidige inzichten en kennis. De overweging om een volledige risicobeoordeling voor (vee)voedselveiligheid bij cisgene planten te eisen, is primair gestoeld op toepassing van het voorzorgsprincipe.

De COGEM ziet voor zichzelf, wanneer daarin door de daartoe ingestelde instanties wordt voorzien, geen taak en rol op het gebied van (vee)voedselveiligheid en onthoudt zich sinds het begin van 2008 op verzoek van uw ministerie van een oordeel op dit gebied om onnodige doublure van werkzaamheden te voorkomen.

Gezien het bovenstaande geeft de COGEM geen oordeel over de wijze van beoordeling en de gehanteerde inschatting van eventuele risico's op het gebied van (vee)voedselveiligheid.

Wel signaleert de COGEM dat het wenselijk is dat nader onderzoek wordt uitgevoerd om meer inzicht te verkrijgen in de feitelijke risico's van de inbouw van oligonucleotiden voor de voedselveiligheid. Mogelijkerwijs kan door middel van een bio-informatische analyse meer inzicht ontstaan. Hierbij zouden sequenties van bekende eiwitten met allergene en toxische eigenschappen vergeleken kunnen worden met T-DNA sequenties en de kans berekend kunnen worden of door fusie met andere eiwitsequenties er toxische of allergene peptiden kunnen ontstaan.

De COGEM signaleert evenwel dat ook een dergelijk onderzoek nooit volledige zekerheid kan geven over de afwezigheid van (theoretische) risico's. De mogelijkheid dat deze risico's kunnen optreden, wordt evenwel met zo'n onderzoek verder ingekaderd.

Voor een nadere toelichting op de bijeenkomst van 2 september verwijs ik u naar het bijgevoegde verslag.

Met vriendelijke groet,

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

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

cc     drs. H.L. Bresser  
       drs. H.P. de Wijs

# **Verslag bijeenkomst 'risico-analyse van de insertie van oligonucleotiden het plantengenoom'**

**Locatie: COGEM, Bilthoven**

**Datum: 2 september 2009**

**Aanwezig:** drs. Hanneke Bresser (waarnemer VROM), dr. ir. Marjan Bovers (COGEM), dr. ir. Gijs Kleter (Rikilt), dr. Jan Kooter (COGEM, VU), dr. Inge van der Leij (waarnemer VROM), Gitte Tiesjema (RIVM, SIR), dr. ir. Frank van der Wilk (COGEM)

## **1. Doel van de bijeenkomst: verkennen van de risico's van insertie van korte/kleine DNA fragmenten in het kader van cisgenese**

Van der Wilk verwelkomt de aanwezigen en licht de achtergrond en het doel van de bijeenkomst toe. De aanleiding van de bijeenkomst ligt in een advies van de COGEM over cisgenese. Bij cisgenese worden planten gemodificeerd met DNA van de plantensoort zelf of met DNA van een van nature kruisbare soort. In haar signalering 'Vereenvoudiging van regelgeving bij cisgenese, een reële optie?' (CGM/060428-05) stelt de COGEM dat zij van mening is dat cisgene planten in sommige gevallen geen groter risico voor mens of milieu met zich brengen dan traditioneel veredelde gewassen. In deze gevallen is het haar inziens een optie cisgene planten van onderdelen van de regelgeving vrij te stellen. Eén van de vereisten hierbij is dat het geïnsereerde functionele DNA in zijn geheel uit een donorplant afkomstig is en niet opgebouwd mag zijn uit meerdere DNA-fragmenten. Echter met de huidige transformatietechnieken komen er bij cisgenese naast planteigen sequenties meestal ook noodzakelijkerwijs soortvreemde sequenties mee in de plant, de zogenaamde T-DNA borders. Dit zijn zeer kleine sequenties van 2 tot 25 nucleotiden groot. De COGEM stelde in haar signalering verder dat zij overleg met experts op het gebied van voedselveiligheid en toxicologie noodzakelijk acht om zo gezamenlijk de eventuele risico's voor voedselveiligheid in kaart te kunnen brengen.

Het ministerie van VROM onderzoekt of handelingen met cisgene planten deels vrijgesteld kunnen worden onder Ingeperkt gebruik (werkzaamheden in laboratoria, kassen e.d). VROM heeft daarom de COGEM gevraagd om een bijeenkomst te beleggen met deskundigen op het gebied van voedsel- en veevoederveiligheid om de risico's van de insertie van zeer korte stukken DNA te verkennen. Hierbij speelt ook de vraag of elementen van de huidige verplichte risico-analyse voor gg-gewassen en gg-(vee)voedsel zoals de moleculaire karakterisering en analyse van metabolietprofielen bij de beoordeling van cisgene planten of producten afgezwakt kunnen worden dan wel kunnen vervallen.

## **2. Analyse risico's: geen milieurisico's maar risico's voor de voedselveiligheid zijn niet uit te sluiten**

Kooter merkt op dat de COGEM eerder tot de conclusie is gekomen dat het zeer onwaarschijnlijk is dat korte DNA fragmenten of oligonucleotiden zoals een T-DNA border tot milieurisico's leiden. De kans dat de insertie van een oligonucleotide leidt tot een nieuw functioneel eiwit is minimaal. De kans dat een nieuw functioneel eiwit de biologische karakteristieken van een plant verandert (zoals een veranderde fitness) en de plant een ecologisch voordeel verschaft moet als verwaarloosbaar klein worden beschouwd. Daarbij is het genoom van de plant zeer dynamisch en vinden er van nature, bij celdeling en vorming van pollen en eicellen, al tal van herschikkingen in het genoom plaats. Eventuele

risico's van de insertie van oligonucleotiden vallen daarmee in de 'baseline' van de van nature voorkomende risico's en de risico's die bij conventionele veredeling optreden.

Verder zijn de sequentievorgorden van de T-DNA borders bekend. De sequenties die ingebouwd worden variëren per geval tussen de 1 en 25 nucleotiden. Dit betekent dat deze fragmenten ten hoogste coderen voor een eiwitsequentie van 8 aminozuren.

Kleter en Tiesjema wijzen er op dat cisgenese onder de wetgeving van genetische modificatie valt. Volgens de 'EFSA guidelines' is een volledige moleculaire karakterisering en analyse op veevoeder- en voedselveiligheid noodzakelijk. Van der Wilk stelt voor om de regelgeving vooralsnog buiten de discussie te houden en te concentreren op de risico-analyse.

Voor de discussie over de risico-analyse van de insertie van korte DNA sequenties in de plant moeten drie elementen in oenschouw genomen worden:

- de door het oligonucleotide gecodeerde eiwitsequentie
- de fusie van de geïnsereerde sequentie met coderende sequenties van de plant (fusie-ORFs)
- pleiotrope effecten, onbedoelde effecten ten gevolge van de insertie cq genetische modificatie.

### ***2.1 Coderende sequentie oligonucleotide***

Naar aanleiding van een vraag hierover stelt Kleter dat een sequentie van 4 tot 6 aminozuren al voldoende kan zijn om een epitoom te vormen. Dit kan een epitoom zijn gerelateerd aan allergene eigenschappen. Opgemerkt moet echter worden dat er altijd meerdere epitopen noodzakelijk zijn om een allergeen eiwit te vormen.

Om meerdere epitopen te verkrijgen moet de sequentie van het oligonucleotide gefuseerd zijn met de sequentie van in de plant aanwezige genen of openleesramen (ORFs). Fusie van de sequentie van het oligonucleotide met de sequentie van in de plant aanwezige genen of ORFs is verder noodzakelijk omdat anders de oligosequentie niet tot expressie kan komen.

### ***2.2 Fusie-ORFs***

Van der Wilk meldt dat de COGEM in het verleden altijd een zo volledige mogelijke moleculaire karakterisering van gg-planten heeft geëist. Gekeken werd hierbij naar de overgangen tussen het geïnsereerde DNA en het plantengenoom en ook naar eventuele andere herschikkingen en co-integraties. Via bio-informatische analyse worden voorspellingen gedaan over eventuele fusie-ORFS en homologie met bekende eiwitten. De COGEM is haar standpunt over moleculaire karakterisering aan het heroverwegen. Uit de ervaringen van de afgelopen 10 jaar blijkt dat de bio-informatische analyse weinig voorspellende waarde heeft voor de milieurisico-analyse. Eiwitten die de biologische karakteristieken van de plant veranderen zijn op deze wijze niet te identificeren. Tot op heden zijn nog nooit fusie-ORFS geïdentificeerd met potentieel ongunstige eigenschappen voor het milieu.

Kleter wijst erop dat bij een insertie van sequenties het ontstaan van een fusie-eiwit nooit kan worden uitgesloten. Hierdoor kunnen nieuwe deelsequenties met ongunstige eigenschappen aan het fusie-eiwit toegevoegd worden.

Kooter wijst erop dat de sequenties van de T-DNA borders klein zijn en dat het bijna altijd mogelijk zal blijken te zijn om een vergelijkbare sequentie ergens in het plantengenoom aan te treffen. Deze sequenties worden als P-DNA aangeduid. P-DNA sequenties worden al gebruikt voor

plantentransformaties. De aanwezigheid van dergelijke sequenties in het plantengenoom betekent dat dergelijke fusie-ORFs ook kunnen ontstaan door natuurlijk optredende rearrangements e.d..

Kleter stelt dat dit laatste voor de risico-analyse niet uitmaakt. Bij een eventuele fusie en expressie van een fusie-ORF is het niet uit te sluiten dat er een eiwit met allergene of toxische eigenschappen ontstaat. Daarom zullen Rikilt en RIVM altijd een volledige moleculaire karakterisering eisen.

Tiesjema wijst erop dat er bovendien altijd om een metaboliëprofiel gevraagd zal worden omdat dit uitsluitel kan geven over eventuele veranderingen in het metabolisme van de plant. Dit mede met het oog op eventuele pleiotrope effecten

### **2.3 Pleiotrope effecten**

Bij genetische modificatie, - de inbouw van transgene of cisgene sequenties en het noodzakelijke weefselkweekstadium -, kunnen zogenaamde pleiotrope effecten optreden. Dit zijn effecten die te wijten zijn aan genomische *rearrangements*, epigenetische effecten etc.. Deze kunnen leiden tot veranderingen in het metabolisme van de plant.

Kooter wijst erop dat deze effecten ook optreden in de natuur of bij conventionele veredeling. Deze effecten zijn niet gebonden aan genetische modificatie. Kleter merkt op dat veranderingen in het metabolisme tot verhoogde toxiciteit of allergeniteit kunnen leiden en dat deze effecten daarom bij de beoordeling op veevoeder en voedselveiligheid meegenomen moeten worden.

### **3. Conclusies**

- De COGEM vertegenwoordigers zijn van mening dat het voor de milieurisico-analyse mogelijk is een uitzonderingssituatie te creëren voor cisgene planten. De milieurisico's van de inbouw van de T-DNA borders zijn klein en vallen onder die van de baseline van conventionele veredeling.
- Bij de beoordeling op veevoeder- en voedselveiligheid wordt er weinig tot geen onderscheid tussen transgene en cisgene planten gemaakt. In beide gevallen is een volledige moleculaire karakterisering en analyse van het metaboliëprofiel noodzakelijk aangezien er bij de insertie van DNA altijd een theoretische kans op het ontstaan van een nieuw fusie-eiwit is en er mogelijkwerijs pleiotrope effecten op zouden kunnen treden.