



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

**DATUM** 1 juli 2010  
**KENMERK** CGM/100701-03  
**ONDERWERP** Advies en signalering 'De status van oligonucleotiden in de context van gerichte mutagenese'

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag van het ministerie van VROM of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur is, adviseert de COGEM als volgt.

### **Samenvatting**

De COGEM is door VROM om advies gevraagd over de vraag of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuurmolecuul is. Het antwoord is van belang voor het oordeel of planten die zijn ontwikkeld met behulp van gerichte mutagenese wel of niet onder ggo-regelgeving vallen. 'Klassieke' mutagenese is vrijgesteld van de Europese ggo-regelgeving. Bij klassieke mutagenese worden willekeurige deleties of herschikkingen in het genoom aangebracht met chemische of radioactieve mutagentia. Tegenwoordig is het ook mogelijk om gericht mutaties aan te brengen, met behulp van korte nucleïnezuurmoleculen (oligonucleotiden) waarvan de sequenties nagenoeg gelijk zijn aan de doelsequentie in het genoom waarin een mutatie moet worden aangebracht. Deze vorm van gerichte mutagenese wordt veiliger geacht dan klassieke mutagenese omdat er minder willekeurige veranderingen in het genoom van de plant worden aangebracht. Het is echter onduidelijk of gerichte mutagenese onder de vrijstelling valt. Dit is afhankelijk van het oordeel of het gebruikte oligonucleotide wel of niet als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden.

De COGEM wijst erop dat de vraag of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur is, niet eenduidig valt te beantwoorden. Het antwoord is afhankelijk van de context waarbinnen het oligonucleotide wordt toegepast en de sequentievogorde. De COGEM gaat in haar overwegingen uit van een oligonucleotide dat gebruikt wordt om mutaties in genoomsequenties in de cel te bewerkstelligen. De COGEM is van mening dat een oligonucleotide dat gebruikt wordt voor gerichte mutagenese, niet als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden.

De COGEM signaleert dat deze adviesvraag onderstreept dat de kaders en uitgangspunten van de huidige Europese ggo-regelgeving achterhaald zijn door de technologische ontwikkelingen, waardoor de wetenschappelijke grondslag onder de regelgeving in het geding is.

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

# **De status van oligonucleotiden in de context van gerichte mutagenese**

COGEM advies en signalering CGM/100701-03

## **Commissie Genetische Modificatie (COGEM)**

De COGEM heeft tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van genetisch gemodificeerde organismen en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van genetische modificatie (Wet milieubeheer §2.3).



## Samenvatting

De COGEM is door VROM om advies gevraagd over de vraag of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuurmolecuul is. Het antwoord op deze adviesvraag is van belang voor het oordeel, of planten die zijn ontwikkeld met behulp van gerichte mutagenese met oligonucleotiden wel of niet onder de regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vallen. 'Klassieke' mutagenese is vrijgesteld van de Europese ggo-regelgeving. Bij klassieke mutagenese worden willekeurige deleties of herschikkingen in het genoom aangebracht met chemische of radioactieve mutagentia. Tegenwoordig is het ook mogelijk om gerichte mutaties aan te brengen, met behulp van korte nucleïnezuurmoleculen (oligonucleotiden) waarvan de sequenties nagenoeg gelijk zijn aan de doelsequentie in het genoom waarin een mutatie moet worden aangebracht. Gerichte mutagenese wordt veiliger geacht dan klassieke mutagenese omdat er minder ongerichte veranderingen in het genoom van de plant worden aangebracht. Het is echter onduidelijk of gerichte mutagenese juridisch onder de vrijstelling valt. Dat hangt af van het oordeel of het gebruikte oligonucleotide wel of niet als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden.

De COGEM definieert een oligonucleotide als *'een enkel- of dubbelstrengs molecuul dat is opgebouwd uit de verschillende nucleotiden (of analogen daarvan) van het DNA en/of RNA met een lengte tot ongeveer 120 nucleotiden (of basenparen), dat al dan niet synthetisch is vervaardigd'*

De COGEM wijst erop dat de vraag of een oligonucleotide moet worden gezien als een recombinant nucleïnezuur, niet eenduidig valt te beantwoorden. Het antwoord is ten eerste afhankelijk van de context waarbinnen het oligonucleotide wordt toegepast. In dit advies beperkt de COGEM zich tot een visie op het gebruik van oligonucleotiden bij gerichte mutagenese.

Bij de beantwoording van de adviesvraag binnen deze toepassing staat de sequentievolvergader van het oligonucleotide centraal: is er al dan niet sprake van een combinatie van sequentievolvergaderes in het oligonucleotide die van nature niet naast elkaar voorkomen. Verder is het antwoord afhankelijk van het milieu (de cel) waarin het oligonucleotide wordt ingebracht. Indien een oligonucleotide in een cel gebracht wordt met een sequentievolvergader die gelijk is aan de sequentievolvergaderes in het genoom van de ontvangende cel, is er naar de mening van de COGEM geen sprake van recombinant nucleïnezuur.

Bij gerichte mutagenese (*'oligonucleotide-directed mutagenesis'*) wordt gebruik gemaakt van oligonucleotiden die mutaties bevatten ten opzichte van de bekende genoomsequentie in de cel. De COGEM is van mening dat deze oligonucleotiden niet beschouwd moeten worden als recombinant nucleïnezuur. Er kunnen namelijk ook tussen de sequenties van individuen van één soort verschillen aanwezig zijn die overeen kunnen komen met de sequentie van het oligonucleotide. Daarnaast kan er niet gesproken worden van een recombinatie van sequenties in het oligonucleotide, omdat enkele puntmutaties in een sequentie niet te definiëren zijn als een eigenstandige sequentie.

De COGEM adviseert om de reikwijdte van een besluit over het karakter van oligonucleotiden tot de context van gerichte mutagenese te beperken. Als zo'n beperking van de reikwijdte niet mogelijk is, kan dit mogelijk leiden tot onbedoelde en ongewenste effecten voor andersoortige experimenten en technologieën. Onderzocht zal moeten worden of aanpassing van de regelgeving of nieuwe regelgeving (al dan niet binnen de huidige kaders van de ggo-regelgeving) noodzakelijk is.

Deze adviesvraag onderstreept de eerdere signalering van de COGEM dat de kaders en uitgangspunten van de huidige Europese ggo-regelgeving achterhaald zijn door de technologische ontwikkelingen. Hierdoor moeten steeds vaker *ad hoc* afwegingen gemaakt worden die gepaard gaan met steeds verdergaande beschrijvingen van uitzonderingssituaties en dergelijke. Zodoende ontstaat een onontwarbare knoop van juridische overwegingen, wetenschappelijke beschrijvingen en beleidsoverwegingen die een wetenschappelijke grondslag missen. Een oplossingsrichting hiervoor kan zijn de risico's van het eindproduct in plaats van de aard van het proces van modificatie meer nadruk te geven in de regelgeving.

## Inhoudsopgave

1 Inleiding .....	6
1.1 Adviesvraag .....	6
1.1.1 Mutagenese.....	6
1.2 Eerdere adviezen.....	6
1.3 Letter en geest van de EU ggo-regelgeving .....	7
2 Oligonucleotiden: toepassingen en verschijningsvormen .....	8
2.1 Definitie van oligonucleotiden.....	8
2.2 Toepassingen en vormen van oligonucleotiden .....	9
2.2.1 Mutagenese met behulp van oligonucleotiden .....	9
2.2.2 Andere toepassingen van oligonucleotiden .....	9
3 Recombinant nucleïnezuur: definitie.....	10
4 Is een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur?.....	10
4.1 Semantiek als leidend element.....	10
4.2 Sequentiehomologie als onderscheidend kenmerk .....	11
4.2.1 Twee verschillende bronnen is niet gelijk aan twee verschillende organismen .....	11
4.3 De sequentie van een oligonucleotide kan afwijken van de natuurlijke sequentie .....	12
4.3.1 Arbitraire grens voor verschil sequentie oligonucleotide met doelsequentie .....	12
5 Andere overwegingen.....	13
5.1 Adviesvraag gaat verder dan de plantenveredeling alleen .....	13
5.1.1 Risico's voor mens en milieu overschrijden de natuurlijke baseline niet.....	13
5.1.2 Aanpassing van regelgeving .....	13
5.2 Grens tussen mutagenese en recombinitie blijft gehandhaafd.....	14
5.3 Handhaafbaarheid en draagvlak.....	14
6 Signalering: Kaders van de regelgeving zijn achterhaald .....	14
7 Conclusies en advies .....	15
Referenties.....	18
Bijlagen .....	19

## 1 Inleiding

VROM heeft de COGEM om advies gevraagd over de vraag of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuurmolecuul is. Het antwoord op deze adviesvraag is van belang voor de standpuntbepaling van de Nederlandse overheid over de vraag of planten die zijn ontwikkeld met behulp van gerichte mutagenese wel of niet onder de regelgeving van genetisch gemodificeerde organismen vallen.

### 1.1 Adviesvraag

Genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vallen onder de Europese regelgeving voor ggo's, beschreven in de Richtlijn 2001/18/EG voor introductie in het milieu en Richtlijn 98/81/EG voor ingeperkt gebruik van ggo's.<sup>1,2</sup> Enkele technieken en de daaruit resulterende organismen zijn vrijgesteld van de ggo-regelgeving, waaronder mutagenese (zie bijlage 2 en 3). Voor bedrijven in de plantenveredeling zijn technieken die vrijgesteld zijn van de ggo-regelgeving financieel aantrekkelijk. Voor organismen die met vrijgestelde technieken gemaakt worden is voor vermarkting geen ggo-vergunning, met daaraan verbonden tijdverlies en hoge kosten, nodig. Deze drijfveer speelt ook bij de discussie over de techniek van gerichte mutagenese met behulp van oligonucleotiden.

#### 1.1.1 Mutagenese

Bij (klassieke) mutagenese worden door middel van een chemisch mutageen of een radio-isotoop nucleotidensubstituties in het DNA aangebracht of herschikkingen in het genoom geïnduceerd. Hierdoor ontstaan op willekeurige plekken in het genoom talloze kleinere en grotere deleties en veranderingen, waardoor de resulterende organismen nieuwe eigenschappen kunnen krijgen, waarop geselecteerd kan worden. Mutagenese is vrijgesteld van de ggo-regelgeving op grond van de algemene overweging dat deze techniek al decennia grootschalig werd toegepast bij het ontwikkelen van nieuwe gewassen, zonder zichtbare problemen, noch maatschappelijk debat daarover, en dat het achterwege laten van een dergelijke vrijstelling economische gevolgen zou hebben. Inmiddels zijn er ca. 3100 plantenrassen uit meer dan 175 species geregistreerd die afgeleid zijn van mutagenese.<sup>3</sup>

Naast de klassieke vorm van willekeurige mutagenese is het nu ook mogelijk om gericht mutaties aan te brengen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van oligonucleotiden waarvan de sequentie nagenoeg gelijk is aan de doelsequentie in het genoom waarin een mutatie moet worden aangebracht. Een mutageen gekoppeld aan het oligonucleotide zelf, induceert de gewenste mutatie. Gerichte mutagenese wordt zowel toegepast bij planten, micro-organismen, virussen als dieren.

Indien voor mutagenese gebruik wordt gemaakt van oligonucleotiden, is niet helder of deze techniek wel of niet onder de ggo-regelgeving valt. Dit omdat de volgende voorwaarde wordt gesteld voor vrijstelling van de Richtlijnen: er mag geen recombinant nucleïnezuur worden gebruikt in het proces van vervaardiging van het ggo. Het ministerie van VROM heeft de COGEM verzocht om antwoord te geven op de vraag of een oligonucleotide beschouwd moet worden als een recombinant nucleïnezuur.

### 1.2 Eerdere adviezen

In 2005 en 2006 heeft de COGEM twee adviezen uitgebracht over het gebruik van oligonucleotiden. Deze adviezen zijn voortgekomen uit de ontwikkeling van moleculaire technieken op medisch en plantenbiotechnologisch vlak. Het eerste advies brengt de toepassingen van oligonucleotiden en hun genetische effecten in kaart.<sup>4</sup> In het tweede advies wordt ingegaan op het gebruik van oligonucleotiden met een aangekoppeld mutageen voor gerichte mutagenese in planten.<sup>5</sup> Deze vorm van gerichte



mutagenese moet volgens de COGEM beschouwd worden als een vorm van klassieke mutagenese, ondermeer omdat het gekoppelde mutageen (chemisch molecuul of radionuclide) de mutatie veroorzaakt en het oligonucleotide alleen voor de ‘plaatsbepaling’ zorgt.

In haar advies merkt de COGEM op dat ‘klassieke’ of ongerichte mutagenese door de toepassing van straling of chemische mutagentia talloze willekeurige mutaties in het genoom veroorzaakt. Echter oligonucleotiden binden aan een specifieke DNA-sequentie in het genoom, waardoor mutagenese meer gericht plaatsvindt. Hierbij bestaat een kleine kans dat naast bedoelde ook onbedoelde modificaties in het DNA geïnduceerd worden. Door de verhoogde specificiteit door middel van bijvoorbeeld oligonucleotiden, ziet de COGEM minder risico's bij gerichte mutagenese dan bij ongerichte mutagenese. Ook de Belgische Adviesraad voor de Bioveiligheid<sup>6,7</sup> en het ministerie van VROM<sup>8</sup> is deze mening toegedaan.

De Belgische Adviesraad voor de Bioveiligheid heeft in 2007 een advies uitgebracht over ‘*targeted gene repair*’ (gerichte mutagenese met oligonucleotiden). In haar advies stelt de adviesraad dat ‘targeted gene repair’ niet onder de EU ggo-regelgeving moet vallen, omdat de techniek een vorm van mutagenese is en omdat synthetische oligonucleotiden niet als geen recombinant nucleïnezuur beschouwd moeten worden. Verder wordt gesteld dat er wetenschappelijke argumenten zijn om deze techniek(en) niet onder de reikwijdte van de Europese ggo-regelgeving te laten vallen.

### ***1.3 Letter en geest van de EU ggo-regelgeving***

In de Richtlijn 2001/18 staat expliciet dat mutagenese uitgesloten is van de richtlijn mits daarbij geen recombinant nucleïnezuren of ggo's worden gebruikt. Opvallend genoeg was dit voorbehoud niet opgenomen in Richtlijn 90/220<sup>9</sup>, de voorloper van Richtlijn 2001/18. In deze oude richtlijn (deel II, bijlage IB) staat dat mutagenese van de richtlijn is uitgesloten, mits geen gebruik wordt gemaakt van ggo's als recipiënt of ouderorganismen (zie bijlage 1). Blijkbaar is er een expliciete reden geweest om in 2001 het voorbehoud aangaande recombinant nucleïnezuur op te nemen.

Het roept de vraag op of de regelgever hierbij ook oligonucleotiden in gedachten had. De COGEM wijst erop dat milieuveiligheidsoverwegingen hiervoor geen aanleiding geven (zie paragraaf 1.2). De regelgever heeft mutagenese willen vrijstellen, omdat deze techniek al sinds langere tijd toegepast werd, zonder zichtbare veiligheidsrisico's, en mutagenese dus niet met terugwerkende kracht gereguleerd hoefde te worden. De geest van de wet lijkt dus gericht op vrijstellen van mutagenese.

Mogelijk heeft de wetgever het verschil tussen mutagenese en insertie van nieuwe sequentievorgordes willen waarborgen. Opgemerkt moet worden dat met oligonucleotiden gerichte mutaties aangebracht kunnen worden in tegenstelling tot de klassieke mutagenese. Dit betekent dat in theorie met een opeenvolgende cyclus van gerichte mutaties een geheel nieuwe sequentie geïntroduceerd zou kunnen worden. Hierbij zou bijvoorbeeld gedacht kunnen worden aan het veranderen van de sequentie van een gen of het introduceren van een promotor voor een genoomsequentie die eerder niet tot expressie gebracht werd. Het mogelijke gevolg hiervan is dat het onderscheid tussen het aanbrengen van puntmutaties en deleties, en het introduceren of tot expressie brengen van nieuwe sequenties in een organisme vervaagt. In paragraaf 5.2 wordt hierop verder ingegaan.

## 2 Oligonucleotiden: toepassingen en verschijningsvormen

Oligonucleotiden zijn korte DNA of RNA moleculen die zijn opgebouwd uit verschillende nucleotiden. Van nature voorkomende oligonucleotiden zijn bijvoorbeeld *short interfering RNAs*, *microRNAs* en *piRNAs*, die variëren in lengte van 20 tot 30 nucleotiden en genexpressie reguleren in de cel.

Synthetische oligonucleotiden worden veel gebruikt in onderzoek, bijvoorbeeld als ‘hybridisatie probe’, of ‘primer’ voor de amplificatie van stukjes DNA in een ‘*polymerase chain reaction*’ (PCR) of om modificaties aan te brengen in specifieke delen van het erfelijke materiaal van een organisme. Oligonucleotiden worden toegepast in het onderzoek bij zowel micro-organismen, planten, dieren en mens.

### 2.1 Definitie van oligonucleotiden

Er is geen vaststaande definitie van wat oligonucleotiden zijn. Er is echter een consensus af te leiden uit wetenschappelijke lesboeken en publicaties. Deze consensus stelt vast, dat oligonucleotiden al dan niet synthetisch zijn en uit DNA, RNA of beide nucleïne-zuren tegelijk kunnen bestaan. Oligonucleotiden kunnen zowel enkelstrengs als dubbelstrengs zijn, en kunnen nucleotide-analogen bevatten die chemisch gemodificeerd zijn. Daarnaast is voor een definitie van oligonucleotiden de lengte van het molecuul van belang.

‘Oligos’ is Grieks voor weinig. In de verschillende definities van ‘oligonucleotide’ wordt doorgaans geen maximale lengte voor een oligonucleotide gegeven, maar gerefereerd aan een gebruikelijke lengte, zoals 2 tot 30 nucleotiden. In het geval van dubbelstrengs oligonucleotiden betreft deze lengte basenparen. Dit soort grootte-aanduidingen is afhankelijk van wat op dat moment gesynthetiseerd kon worden en aan wat in het specifieke wetenschapsveld als gangbaar geldt of wenselijk is met het oog op de toepassing. Vroeger werden oligonucleotiden hoofdzakelijk gebruikt als ‘*primer*’ voor het amplificeren van DNA in een PCR of bij sequentiebepalingen. Een gangbare lengte was 20 à 25 nucleotiden. Tegenwoordig is de technologie van het synthetiseren van stukken DNA en RNA zo vergevorderd, dat nucleïne-zuren met een lengte van 120 nucleotiden makkelijk gemaakt kunnen worden. Grotere synthetische moleculen worden gemaakt door oligonucleotiden aan elkaar te ligeren. Voor experimenten om sequentieveranderingen in bacteriën te induceren worden oligonucleotiden van 70 tot 120 nucleotiden gebruikt, terwijl in zoogdiercellen oligonucleotiden van 25 tot 45 nucleotiden optimaal zijn.<sup>10</sup> Al deze verschillen komen terug in de verschillende definities of aanduidingen voor oligonucleotiden die in de (semi-) wetenschappelijke literatuur terug te vinden zijn, al naar gelang de achtergrond van de auteur of de stand van zaken op dat tijdstip.

Echter, om een onderscheid te maken tussen korte nucleïne-zuren (oligonucleotiden) en langere, vaak coderende nucleïne-zuren, is een duidelijke normstelling voor de lengte van een oligonucleotide voor de ggo-regelgeving van belang. De COGEM adviseert voor de ggo-regelgeving de maximale lengte van een oligonucleotide af te kaderen tot circa 120 nucleotiden. Op basis van het bovenstaande definieert de COGEM een oligonucleotide als volgt:

*‘Een oligonucleotide is een enkel- of dubbelstrengs molecuul dat is opgebouwd uit de verschillende nucleotiden (of analogen daarvan) van het DNA en/of RNA met een lengte tot ongeveer 120 nucleotiden (of basenparen), dat al dan niet synthetisch is vervaardigd.’*

## 2.2 Toepassingen en vormen van oligonucleotiden

### 2.2.1 Mutagenese met behulp van oligonucleotiden

Oligonucleotiden worden in medisch en plantenbiologisch onderzoek algemeen gebruikt als systeem om modificaties of mutaties aan te brengen in het DNA van een of meerdere cellen. De modificaties kunnen ten doel hebben een mutatie te creëren, maar ook om een bestaande mutatie te verwijderen en het functioneren van een gen te herstellen. Oligonucleotiden die in één of enkele nucleotiden afwijken van de sequentie van het doelwit DNA, worden in de cel gebracht. Het proces waardoor deze oligonucleotiden modificaties kunnen veroorzaken is nog grotendeels onduidelijk, maar werkt via de DNA-reparatiemechanismen van de cel. Het oligonucleotide hybridiseert aan het complementaire nucleïnezuur, waardoor een mismatch ontstaat. Enzymen repareren deze mismatch, wat meestal resulteert in een herstel van de originele sequentie van het DNA, maar in enkele gevallen kan leiden tot een mutatie, deletie of insertie in of van het DNA. De efficiëntie van gerichte mutagenese verschilt sterk tussen organismes (planten, bacteriën, dieren, etc.) en is ook afhankelijk van ontwerp en soort van de gebruikte oligonucleotiden.

Er zijn verschillende typen oligonucleotiden die gebruikt worden voor mutagenese, waaronder chimere DNA/RNA hybriden. Deze oligonucleotiden zijn gedeeltelijk dubbelstrengs nucleïnezuren van ongeveer 25 nucleotiden lang, die bestaan uit een enkelstrengs RNA molecuul dat gehybridiseerd is aan een complementair enkelstrengs DNA molecuul. Voorbeelden van andere typen oligonucleotiden zijn enkelstrengs DNA oligonucleotiden die een specifieke binding aangaan met de DNA dubbelhelix (*'triple helix forming oligonucleotides'* (TFO)) of enkelstrengs DNA oligonucleotiden die chemisch gemodificeerd zijn. Chemische modificatie van oligonucleotiden heeft ten doel om afbraak in de cel tegen te gaan en inbouw in het genoom te voorkomen. Twee voorbeelden van chemisch gemodificeerde nucleotiden zijn *'locked nucleic acids'* (LNA's), die een stabielere structuur hebben vanwege een extra methylgroep, en nucleotide-analogen waarbij een zuurstofatoom is vervangen door een zwavelatoom (de *'phosphorothioaten'*).

Al naar gelang het gebruikte type oligonucleotide wordt vaak een andere benaming voor de gerichte mutagenese gebruikt. In dit advies schaaft de COGEM al deze verschillende vormen onder de noemers *'oligonucleotiden'* en *'gerichte mutagenese'* (*'oligonucleotide-directed mutagenesis'* of *'site-directed mutagenesis'*).

### 2.2.2 Andere toepassingen van oligonucleotiden

Naast mutagenese kunnen oligonucleotiden ook voor andere doeleinden gebruikt worden. Een voorbeeld van een medische toepassing is het toedienen van oligonucleotiden aan patiënten om een afweerreactie op te wekken. Deze techniek met CpG oligonucleotiden wordt onder andere ingezet als therapie tegen kanker. Daarnaast worden er enkelstrengs DNA of RNA oligonucleotiden, *'aptameren'* genoemd, specifiek ontworpen om eiwitten, nucleïnezuren, co-factoren en chemische stoffen te binden. Deze oligonucleotiden worden toegepast in diagnostiek, therapie en onderzoek.

Regulatie van genexpressie is een derde veelvoorkomende toepassing van oligonucleotiden. Deze toepassing is geënt op het natuurlijke systeem van RNA interferentie, waarbij eiwitsynthese wordt verhinderd. Hierbij worden oligonucleotiden in de cel gebracht die complementair zijn aan een bepaald deel van een messenger (m-)RNA. Na hybridisatie wordt het doelwit mRNA molecuul afgebroken. Voor regulatie van genexpressie worden voornamelijk enkelstrengs of dubbelstrengs RNA oligonucleotiden gebruikt.

### 3 Recombinant nucleïnezuur: definitie

Hoewel de uitdrukking ‘recombinant DNA’ ingeburgerd is onder wetenschappers en in de regelgeving, is het lastig om hier een eenduidige definitie voor te geven. Er zijn verschillende beschrijvingen en nuanceringen in omloop, onder meer veroorzaakt door nieuwe wetenschappelijke inzichten en interpretaties. De meest simpele definitie van recombinant DNA is een DNA molecuul waarin een stukje ‘vreemd’ DNA is ingelast. ‘Vreemd’ slaat dan op een DNA sequentie die van nature niet in combinatie voorkomt met de rest van de DNA sequentie. Soms wordt ook gesteld dat recombinant DNA een vorm van artificieel DNA is.

De waarschijnlijk beste definitie wordt gegeven in het gezaghebbende lesboek ‘Biochemistry’<sup>11</sup>: “*Recombinant DNA (rDNA) is a form of DNA that does not exist naturally, but is created by combining DNA sequences that would not normally occur together*”. De COGEM acht deze definitie in de volgende vorm toepasbaar voor recombinant nucleïnezuur:

*‘Recombinant nucleïnezuur is nucleïnezuur met een nucleotidenvolgorde die niet natuurlijk voorkomt, maar wordt gemaakt door nucleïnezuursequenties te combineren die van nature niet naast elkaar voorkomen.’*

### 4 Is een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur?

De vraag of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur is, is niet eenvoudig te beantwoorden. Mede omdat er geen wettelijke vastgelegde wetenschappelijke definities zijn, heeft de vraag ook een sterke juridische invalshoek. In de volgende paragrafen worden mogelijke argumentaties die bij de beantwoording van de vraag gehanteerd kunnen worden en hun consequenties, beschreven.

#### 4.1 Semantiek als leidend element

Het woord recombinant, een anglicisme, is een samentrekking van *re-* (wederom, terug) en *combine* (combineren). Dit impliceert dat een recombinant nucleïnezuur is opgebouwd uit twee of meerdere stukken DNA of RNA. Men kan beredeneren dat een synthetisch oligonucleotide wordt gesynthetiseerd door nucleotiden aan elkaar te koppelen, en er daarom geen sprake is van recombinatie van bestaande stukken DNA of RNA. Hieruit volgt dat een synthetisch oligonucleotide geen recombinant nucleïnezuur is.

De Belgische Adviesraad voor de Bioveiligheid lijkt in een toelichting op haar artikel (persoonlijke communicatie Dr. D. Breyer) deze redenering te onderschrijven door als onderscheidend criterium te stellen dat een recombinant nucleïnezuur is opgebouwd uit genetisch materiaal van twee verschillende bronnen (organismes). Omdat een oligonucleotide dat voor mutagenese wordt gebruikt, altijd chemisch gesynthetiseerd is en dus niet is samengesteld uit verschillende bronnen, zijn volgens de Belgische adviesraad oligonucleotiden geen recombinant nucleïnezuur.

Echter, een andere redenering kan zijn dat het synthetiseren van een oligonucleotide niets anders is dan het recombineren van losse nucleotiden. Immers waar ligt de grens van de brokstukken waarmee gerecombineerd wordt? Volgens deze redenering is een synthetisch oligonucleotide per definitie een recombinant nucleïnezuur.

Er zijn ook andere nadelen van een ‘semantische’ invalshoek die te maken hebben met de nadruk die gelegd wordt op ‘synthetisch’. Hiermee wordt het proces waarop het oligonucleotide verkregen is, centraal gesteld. Echter, ‘natuurlijk’ DNA of RNA kan ook mechanisch of enzymatisch in kleine brokstukken worden opgedeeld. Een synthetisch oligonucleotide is niet te onderscheiden van een ‘natuurlijk’ oligonucleotide. Het is mede daarom sterk de vraag of de wijze waarop een oligonucleotide gemaakt is, leidend moet zijn in plaats van de eigenschappen van het oligonucleotide. Want er wordt daarmee voorbijgegaan aan de biologische of intrinsieke waarde van nucleïnezuur in de moleculaire biologie, namelijk de sequentievolverde van het nucleïnezuur. De sequentievolverde bepaalt de coderende eigenschappen en daarmee het belang van DNA of RNA. Gesteld kan worden dat recombinant slaat op het (re)combineren van verschillende (al dan niet coderende) sequentievolverdes en minder op het combineren van fysieke stukken DNA. Immers recombinatie wordt uitgevoerd om bepaalde sequenties (cq coderende eigenschappen) te combineren. De fysieke eigenschappen van DNA moleculen verschillen niet, wel hun sequenties. Dit sluit ook aan op de eerder genoemde definitie in *Biochemistry*.

#### **4.2 Sequentiehomologie als onderscheidend kenmerk**

De sequentievolverde van een oligonucleotide kan volledig gelijk zijn aan een ‘natuurlijke’ sequentie in een genoom. Er is dus geen sprake van een nieuwe combinatie van sequentievolverdes die van nature niet naast elkaar voorkomen. Een dergelijke oligonucleotide kan derhalve niet als recombinant worden aangeduid.

Echter, dit is contextafhankelijk. Een stuk DNA met de sequentievolverde die voorkomt in een bacterie is een ‘natuurlijke’ sequentie. Echter als dit stukje DNA in de cel van een plant wordt ingebracht, zal het door veel wetenschappers als recombinant nucleïnezuur worden aangeduid, omdat de sequentie afwijkt van de sequentievolverdes in het plantengenoom. De sequentie van het oligonucleotide is vreemd voor het milieu (de plantencel) waarin het wordt ingebracht.

Bij inbouw van een ‘vreemde’ DNA sequentie in een plantengenoom is er altijd sprake van recombinatie van sequenties, en ontstaat dus een ggo. Maar ook in een situatie waarbij het ingebrachte nucleïnezuur transiënt aanwezig is in de cel, kan de ingebrachte sequentie als recombinant beschouwd worden.

Dit alles betekent dat niet gesteld kan worden dat een oligonucleotide per definitie wel of geen recombinant nucleïnezuur is. Dit is afhankelijk van de context waarbinnen het oligonucleotide wordt gebruikt.

##### **4.2.1 Twee verschillende bronnen is niet gelijk aan twee verschillende organismen**

Zoals eerder vermeld hanteert de Belgische Adviesraad voor de Bioveiligheid als onderscheidend criterium dat een recombinant nucleïnezuur is opgebouwd uit sequenties van twee verschillende bronnen (organismes). Bij de interpretatie van ‘twee bronnen’ kunnen echter vraagtekens worden gezet. Ook een nucleïnezuur dat is opgebouwd uit twee niet natuurlijk bij elkaar voorkomende sequenties uit één organisme - bijvoorbeeld een promotor van een gen gecombineerd met het coderende deel van een ander gen - zal volgens de gangbare wetenschappelijke opvatting als een recombinant nucleïnezuur gezien worden.

#### ***4.3 De sequentie van een oligonucleotide kan afwijken van de natuurlijke sequentie***

Genoomsequenties van verschillende individuen binnen een soort zijn van nature verschillend door de vele ‘*single nucleotide polymorphisms*’ (SNP), DNA ‘*copy number*’ variaties en inserties en deleties (InDels). De meeste van de SNPs/mutaties in gensequenties zijn ‘silent’, ze leiden niet tot veranderingen in gecodeerde eiwitsequentie. Sommige SNPs/mutaties leiden wel tot veranderingen in eiwitsequenties of fenotypische eigenschappen van het individu. Dit zijn de genetische verschillen en mutaties waar de veredelaars bij ‘toeval’ op stuiten en waarmee verder wordt gewerkt. Dergelijke SNPs en mutaties kunnen ook door middel van mutagenese met behulp van oligonucleotiden worden verkregen en wel veel gericht.

Voor de beantwoording van de vraag wanneer een oligonucleotide als recombinant nucleïnezuur gezien moet worden zijn, mede gezien het bovenstaande, de volgende elementen van belang.

De natuurlijke variatie van genoomsequenties betekent dat de sequentie van een oligonucleotide niet volledig eender hoeft te zijn aan de meest voorkomende (of enige bepaalde) genoomsequentie. Immers binnen de populatie zijn er individuen met mutaties in de genoomsequentie waardoor hun sequentie eender zal zijn aan een oligonucleotide waarin een puntmutatie of deletie aanwezig zijn.

De mutaties die de onderzoeker of veredelaar wil aanbrengen zijn mogelijk al in de populatie aanwezig. Het identificeren van deze individuen is echter zeer lastig, waardoor uitgeweken wordt naar gerichte mutagenese. Bovendien zullen na identificatie van een gezochte mutatie kruisingen uitgevoerd moeten worden om een ras met de juiste eigenschappen te verkrijgen. Bij gerichte mutatieverdeling is dit niet noodzakelijk.

Verder kan een puntmutatie in een sequentie niet beschouwd worden als een recombinatie van verschillende sequenties. Immers één of op zijn hoogst enkele nucleotiden wijken af van de bekende ‘natuurlijke sequentie’. Dit is te weinig om als aparte sequentie beschouwd te worden die teruggeleid kan worden naar een specifieke bron.

Derhalve kan gesteld worden dat een oligonucleotide dat grotendeels gelijk is aan, - en slechts enkele nucleotiden verschilt van -, de bekende sequentie niet als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden.

##### ***4.3.1 Arbitraire grens voor verschil sequentie oligonucleotide met doelsequentie***

Een oligonucleotide dat grotendeels gelijk is aan een bekende sequentie in het doelorganisme hoeft volgens het bovenstaande niet als recombinant nucleïnezuur beschouwd te worden. Echter, waar ligt de grens voor wat als overeenkomstig gezien wordt? Het hanteren van een grens bij oligonucleotiden is van belang om het onderscheid tussen mutaties van enkele nucleotiden en grotere modificaties duidelijk te stellen. Een keuze voor een grens, die daarmee een lijn trekt tussen wanneer een oligonucleotide als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden en wanneer niet, zal altijd arbitrair zijn. Met het oog op de specifieke toepassing van mutatie zou een grens van één op de twintig nucleotiden afwijking ten opzichte van de genoomsequentie gehanteerd kunnen worden.

Aan het stellen van een arbitraire grens van sequentieovereenkomst ter bepaling of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur is, kleven ook nadelen. Het is mogelijk dat in een oligonucleotide dat gebruikt zal worden voor mutagenese, naast de genoomsequentie en de veranderde nucleotide(n), nog extra sequenties ingebouwd worden die als doel hebben de efficiëntie van de mutagenese te verhogen, bijvoorbeeld door ‘*hairpin*-structuren’ te vormen. Behalve ter verhoging van de efficiëntie hebben deze sequenties geen rol, ze worden niet ingebouwd in de genoomsequentie. Door de toevoeging van

deze sequenties kan het oligonucleotide buiten de arbitraire grens vallen terwijl het eindresultaat, de gemuteerde sequentie in het organisme, bij toepassing van het oligonucleotide eender is. Het is moeilijk te rationaliseren waarom het resulterende organisme in het ene geval wel en in het andere geval niet als ggo gezien moet worden.

Daarnaast kan een dergelijk onderscheid geen basis voor handhaving zijn. Het eindproduct van een geoptimaliseerd oligonucleotide is niet te onderscheiden van andere typen van mutagenese met oligonucleotiden, en er valt niet te controleren welk oligonucleotide gebruikt is bij de productie van het organisme.

## 5 Andere overwegingen

### *5.1 Adviesvraag gaat verder dan de plantenveredeling alleen*

Het is van belang om op te merken dat de beantwoording van de adviesvraag gevolgen kan hebben voor tal van aspecten van de ggo-regelgeving. De adviesvraag betreft mutagenese onder Richtlijn 2001/18<sup>1</sup> in het kader van veredelingsactiviteiten. Richtlijn 2001/18 omvat introductie in het milieu van alle ggo's, niet alleen genetische gemodificeerde planten. Daarnaast bevat de EU Richtlijn 2009/41<sup>2</sup> over ingeperkt gebruik dezelfde paragrafen (Bijlage II, deel A). Dit betekent dat een eventuele vrijstelling niet alleen de marktintroductie betreft van gemuteerde planten, maar ook andere organismen zoals bacteriën of virussen, en ook werkzaamheden in laboratoria, diervverblijven en plantenkassen.

#### *5.1.1 Risico's voor mens en milieu overschrijden de natuurlijke baseline niet*

Van virussen is bekend dat soms een enkele puntmutatie tot een sterk verhoogde virulentie kan leiden. Gerichte mutagenese kan daarom leiden tot een virulenter virus en tot de vraag of een dergelijk experiment vrijgesteld kan worden van de ggo-regelgeving. Echter dergelijke virusmutanten komen ook in de natuur voor en kunnen op relatief simpele wijze uitgeselecteerd worden, zonder dat de ggo-regelgeving van toepassing is. Dit is ook van toepassing op werkzaamheden met bacteriën en andere micro-organismen.

Daarbij is voor werkzaamheden met pathogenen ook andere regelgeving van toepassing die een vangnet vormt voor dit soort experimenten. Ten eerste is er de ARBO regelgeving (Arbobesluit artikel 4.84 en EU Richtlijn 200/54/EG)<sup>12,13</sup> gericht op de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia. Ook zijn er richtlijnen van de beroepsgroepen zelf, zoals de richtlijnen en protocollen van de Werkgroep Infectie Preventie (WIP) en de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (NVvM)<sup>14</sup>, en de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM)<sup>15</sup>. Voor werkzaamheden met dierpathogenen of plantenpathogenen kan regelgeving op het gebied van quarantaineorganismen van toepassing zijn.<sup>16,17</sup>

#### *5.1.2 Aanpassing van regelgeving*

Zoals eerder gesteld, is de COGEM van mening dat een oordeel of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur is, niet los gezien kan worden van de context en de toepassing van gerichte mutagenese. Indien echter het besluit ook buiten de context van gerichte mutagenese van toepassing is, zal onderzocht moeten worden of aanpassing van de regelgeving, om ongewenste en onbedoelde consequenties te voorkomen, noodzakelijk is. Indien bijvoorbeeld geoordeeld wordt dat synthetische oligonucleotiden geen recombinant nucleïnezuur zijn en dit generiek van toepassing is, kan dit gevolgen hebben voor de regelgeving over synthetische biologie. De COGEM heeft eerder gesteld dat

voor het nieuwe wetenschapsveld van de synthetische biologie geen nieuwe regelgeving noodzakelijk is, omdat de ggo-regelgeving ook de synthetische biologie afdekt. Echter, een synthetisch genoom kan gevormd worden door oligonucleotiden aan elkaar te koppelen en dit DNA-molecuul in een gist of bacteriële cel te brengen.<sup>18</sup> De cel recombineert de verschillende ingebrachte DNA-moleculen tot een genoom. Doordat het synthetische genoom het natuurlijke genoom van een bacteriële cel kan vervangen, ontstaat een 'synthetisch' micro-organisme. Dit soort werkzaamheden zou mogelijk niet meer onder de ggo-regelgeving vallen als oligonucleotiden niet als recombinant nucleïnezuur gezien worden. Aanvullende regelgeving zou dan noodzakelijk zijn.

Dit geldt overigens niet alleen voor het besluit dat oligonucleotiden geen recombinant nucleïnezuur zijn. Ook in het geval dat besloten wordt dat oligonucleotiden wel een recombinant nucleïnezuur zijn, kan dit tot onbedoelde consequenties leiden voor bepaalde experimenten. Oligonucleotiden worden voor talloze doeleinden (anders dan mutagenese en het bouwen van synthetisch genomen) in het onderzoek gebruikt. Er zijn geen redenen of rechtvaardigingen om deze experimenten plotseling onder de ggo-regelgeving te brengen.

### ***5.2 Grens tussen mutagenese en recombinitie blijft gehandhaafd***

Zoals in paragraaf 1.3 vermeld, kunnen theoretisch met behulp van opeenvolgende cycli van gerichte mutaties meerdere nucleotiden in een genoom veranderd worden. Deze mutaties kunnen aanéénliggend zijn. In theorie is het hierdoor mogelijk om een 'nieuwe' sequentie in een genoom te introduceren. Ook zou een niet tot expressie komende sequentie in een genoom van een promotor e.d. voorzien kunnen worden. Dit kan niet met klassieke mutagenese aangezien die ongericht is. Opgemerkt moet worden dat dit op dit moment slechts een theoretische mogelijkheid is, omdat de efficiëntie van gerichte mutagenese te laag is. Verder zou bij elke volgende stap in de cyclus van gerichte mutagenese een oligonucleotide gebruikt moeten worden dat verder afwijkt van de bekende natuurlijke genoomsequentie, omdat het oligonucleotide ook de vorige mutaties moet bevatten. Dit betekent dat na een beperkt aantal cycli de gebruikte oligonucleotiden als recombinant aangemerkt moeten worden en dat ook het resulterende organisme als ggo beschouwd moet worden.

### ***5.3 Handhaafbaarheid en draagvlak***

De COGEM wijst erop dat een organisme met een natuurlijke mutatie (klassiek veredelingsproduct), met mutaties geïnduceerd door straling of chemische mutagena, of als product van gerichte mutagenese (met behulp van een oligonucleotide) niet van elkaar te onderscheiden is. Het handhaven van regelgeving die onderscheid maakt tussen de verschillende categorieën is dan ook uiterst lastig en onmogelijk bij import uit landen met een andere regelgeving.

Daarbij is het voor een overheid moeilijk uit te leggen waarom bij identieke producten de ene wel onder de ggo-regelgeving en een duur veiligheidsregime valt en het andere product niet. Dit terwijl in het geval van gerichte mutagenese met oligonucleotiden het product dat onder de regelgeving valt, veiliger geacht wordt dan het vrijgestelde product.

## **6 Signalering: Kaders van de regelgeving zijn achterhaald**

De COGEM heeft eerder gesignaleerd dat de EU regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) niet meer in de pas loopt met de wetenschappelijke inzichten en ontwikkelingen in



de biotechnologie.<sup>5,19</sup> Hierdoor ontstaat er onduidelijkheid over wat als een genetisch gemodificeerd organisme (ggo) beschouwd moet worden. De huidige adviesvraag is hier een voorbeeld van.

In de Europese ggo-regelgeving is er voor gekozen om voor ggo's een speciale regelgeving in te stellen en daarmee voor een zogenaamde 'procesbenadering'. De reden of aanleiding voor regulering is niet een veranderde of nieuwe eigenschap van een organisme, maar de wijze waarop het organisme is gemaakt. Klassieke mutagenese (via straling of chemische mutagentia) is vrijgesteld van de ggo-regelgeving, omdat deze techniek al voor de opkomst van genetische modificatie toegepast werd (Richtlijn 2001/18, overweging 17). Echter, het aanbrengen van veranderingen in het genoom door middel van genetische modificatie wordt altijd gereguleerd en onderworpen aan het ggo-veiligheidsregime, ongeacht de eigenschap die geïnduceerd wordt. Met het voortschrijden van de technologische ontwikkelingen wordt het onderscheid tussen genetische modificatie en andere veredelingsstechnieken steeds kleiner of onduidelijker. Kunstgrepen moeten worden toegepast om het bestaande juridische onderscheid te onderbouwen. De voorliggende adviesvraag is hiervan een voorbeeld. Op basis van in de wetenschap gebruikte aanduidingen wordt gevraagd een indeling en een keuze te maken. Echter de termen 'recombinant nucleïnezuur' en 'oligonucleotide' worden door wetenschappers gebruikt om op min of meer intuïtieve wijze bepaalde categorieën aan te duiden, maar zijn niet scherp gedefinieerd. Wat er precies mee wordt aangeduid, is in de loop van de tijd veranderd. In de jaren '80 werd onder oligonucleotide verstaan; een DNA molecuul van ongeveer 12 à 20 nucleotiden lang. Dit konden DNA-synthesizers namelijk maken. Tegenwoordig is die grens opgerekt tot circa 200 nucleotiden en kunnen zowel RNA als DNA moleculen gemaakt worden. Deze fragmenten kunnen weer *in vitro* aan elkaar gekoppeld worden tot langere fragmenten. Voor wetenschappelijke doeleinden is een exacte definiëring dus ook niet relevant en werkbaar.

In verschillende andere landen zoals de VS is er voor gekozen om ggo's onder bestaande algemene regelgeving te reguleren. Als een organisme een veranderde eigenschap heeft, is dat de aanleiding om regulering toe te passen. Hierbij staat dus het product, het gewas, centraal ongeacht de wijze waarop dit gemaakt is. Deze benadering wordt gekarakteriseerd als 'productbenadering' of 'product-based'.

De COGEM heeft eerder gesignaleerd dat de kaders van de EU ggo-regelgeving herzien moeten worden.<sup>19</sup> Geconstateerd is dat met de huidige regelgeving zowel de keuzevrijheid van de consument, de geloofwaardigheid van de overheid als de concurrentiekracht van het Europese bedrijfsleven in het geding komt. Gesignaleerd is dat het '*Cartagena protocol on Biosafety*' een uitweg biedt om het ontstane dilemma tussen regelgeving en nieuwe wetenschappelijke toepassingen op te lossen. Het biedt ruimte voor een andere interpretatie van de EU Richtlijn waarbij de 'nieuwe combinatie' van genetisch materiaal centraal komt te staan. Met de sterkere nadruk op het feit dat de planten of gewassen nieuwe eigenschappen moeten hebben, wordt een link gelegd met de 'productgebaseerde' regelgeving.

De COGEM signaleert dat de onderhavige adviesvraag de noodzaak voor herziening van de kaders van de regelgeving onderstreept. De ggo-regelgeving moet op duidelijke en transparante definities en overwegingen gebaseerd zijn, en ook handhaafbaar zijn.

## 7 Conclusies en advies

- De COGEM wijst erop dat de kaders en uitgangspunten van de huidige Europese ggo-regelgeving zoals die op dit moment geïnterpreteerd en gehanteerd worden, leiden tot onduidelijkheid en op termijn onhoudbaar zijn. Met het voortschrijden van de technische mogelijkheden en

wetenschappelijke inzichten komen de juridische kaders onder druk te staan. Hierdoor moeten steeds vaker *ad hoc* afwegingen gemaakt worden die gepaard gaan met steeds verdergaande beschrijvingen van uitzonderingssituaties en wetenschappelijke technieken die bij het proces van fabricage zijn toegepast. Hierdoor ontstaat een gordiaanse knoop van juridische overwegingen, wetenschappelijke beschrijvingen en beleidsoverwegingen. De voorliggende adviesvraag is hiervan een voorbeeld.

- Echter, de COGEM realiseert zich dat aanpassing van de regelgeving een complex en langdurig proces is. Omdat overheid en bedrijfsleven nu voor de vraag staan hoe met de producten van gerichte mutagenese ('*oligo-directed mutagenesis*' of '*site-directed mutagenesis*') omgegaan moet worden, kan beantwoording van de adviesvraag niet wachten. De COGEM benadrukt dat de beantwoording van de vraag of oligonucleotiden recombinant nucleïnezuur zijn, contextafhankelijk is en dat beantwoording van de adviesvraag slechts korte tijd soelaas zal bieden en achterhaald zal worden door de ontwikkelingen.
- De vraag of een oligonucleotide een recombinant nucleïnezuur is, is niet eenduidig te beantwoorden. Afhankelijk van de context kan een oligonucleotide al dan niet opgevat worden als een recombinant nucleïnezuur. In haar overwegingen gaat de COGEM uit van een oligonucleotide dat gebruikt wordt om mutaties in genoomsequenties in de cel te veroorzaken.
- Bij de beantwoording van de adviesvraag staat naar de mening van de COGEM centraal of er sprake is van een samenstelling van sequentievorgordes in het oligonucleotide die van nature niet naast elkaar voorkomen. Daarnaast is het afhankelijk van het milieu (de cel) waarin het oligonucleotide wordt ingebracht. Indien een sequentie gelijk is aan de sequentievorgorde in het genoom (kern, chloroplast of mitochondrium) van de ontvangende cel, is er geen sprake van recombinant nucleïnezuur.  
Dit is in lijn met het eerdere COGEM advies over mutagenese met behulp van oligonucleotiden met daaraan gekoppeld een mutageen (chemisch of radio-isotoop). De sequentie van het oligonucleotide is hierbij gelijk aan de genoomsequentie. Derhalve is hier sprake van klassieke mutagenese die vrijgesteld is van de ggo-regelgeving.
- Bij gerichte mutagenese (zonder chemisch of radioactief mutageen) wordt gebruik gemaakt van oligonucleotiden die mutaties bevatten ten opzichte van de bekende genoomsequentie. De COGEM wijst erop dat ook tussen de sequenties van individuen van één soort verschillen aanwezig zijn. Daarnaast zijn enkele puntmutaties in een sequentie niet te definiëren als een sequentie afkomstig van een andere bron en is er daarom geen sprake van recombinatie. Op grond hiervan is de COGEM van mening dat een sequentie van een oligonucleotide niet geheel identiek hoeft te zijn aan de bekende natuurlijke sequentie om als niet-recombinant aangeduid te worden. Als arbitraire grens waarbij een oligonucleotide niet als recombinant nucleïnezuur hoeft te worden beschouwd, zou een verschil van één per twintig nucleotiden gehanteerd kunnen worden.
- De COGEM wijst erop dat het noodgedwongen hanteren van een arbitraire grens waarbij een oligonucleotide niet als recombinant nucleïnezuur hoeft te worden beschouwd, nieuwe problemen zal opwerpen in de nabije toekomst. Dit is echter inherent aan de huidige kaders van de EU ggo-regelgeving en vormt een onderstreping van de noodzaak om de ggo-regelgeving in de EU ter discussie te stellen en te hervormen.

- Indien het niet mogelijk is om de reikwijdte van een besluit over het karakter van oligonucleotiden alleen tot de context van gerichte mutagenese te beperken, kan dit tot mogelijk onbedoelde en ongewenste effecten leiden op andersoortige experimenten en technologieën. Onderzocht zal moeten worden of aanpassing van de regelgeving of nieuwe regelgeving (al dan niet binnen de huidige kaders van de ggo-regelgeving) noodzakelijk is.

## Referenties

1. Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu
2. Richtlijn 2009/41/EG van het Europees Parlement en de Raad van 6 mei 2009 inzake het ingeperkte gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen
3. FAO/IAEA programme - Database of mutant variety and genetic stock (MVGS) (28 juni 2010). <http://mvgs.iaea.org>
4. COGEM (2005). Toepassingen van oligonucleotiden: effecten en potentiële genoomveranderingen. COGEM advies. CGM/050707-02
5. COGEM (2006). Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie. COGEM advies en signalering. CGM/061024-02
6. Biosafety Advisory Council (2007). Advice of the Belgian Biosafety Advisory Council on the use of 'Targeted Gene Repair' as a strategy to develop novel organisms. WIV-ISP/BAC\_2007\_SC-529.doc
7. Breyer D *et al.* (2009) Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? *Environ. Biosafety Res.* 8: 57-64
8. VROM notitie (2007). Verantwoord veredelen met genetische modificatie: 'Ontwikkelingen in plantenveredelingstechnieken en de ggo-regelgeving'
9. Richtlijn 90/220/EEG van de Raad van 23 april 1990 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu
10. Aarts M (2010). Gene targeting by single-stranded DNA oligonucleotides in mouse embryonic stem cells. Thesis VU medisch centrum
11. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007). *Biochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman
12. Houba R, Maas J, Siegert H, Wielaard P (2009). Dossier Biologische agentia. [http://www.arbokennisnet.nl/images/dynamic/Dossiers/Biologische\\_agentia/D\\_Biologische\\_agentia.pdf](http://www.arbokennisnet.nl/images/dynamic/Dossiers/Biologische_agentia/D_Biologische_agentia.pdf)
13. Richtlijn 2000/54/EG van het Europees Parlement en de Raad van 18 september 2000 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk
14. Richtlijnen en protocollen van de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie. (22 juni 2010). [www.artsennet.nl/Richtlijnen/Overzicht-per-organisatie/NVvM.htm](http://www.artsennet.nl/Richtlijnen/Overzicht-per-organisatie/NVvM.htm)
15. Richtlijnen Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (22 juni 2010). [www.nvmm.nl/richtlijnen](http://www.nvmm.nl/richtlijnen)
16. World Organization for Animal Health (22 juni 2010). [www.oie.int/eng/](http://www.oie.int/eng/)
17. Richtlijn 2008/61/EG van de Commissie van 17 juni 2008 tot vaststelling van de voorwaarden waaronder bepaalde in de bijlagen I tot en met V bij Richtlijn 2000/29/EG van de Raad vermelde schadelijke organismen, planten, plantaardige producten en andere materialen voor proefnemingen of wetenschappelijke doeleinden en voor selectiewerkzaamheden in de Gemeenschap of in bepaalde beschermde gebieden daarvan mogen worden binnengebracht of naar een andere plaats overgebracht
18. Gibson DG *et al.* (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* Published online, May 20 2010
19. COGEM (2009). EU-Regelgeving updaten? Wetenschappelijke ontwikkelingen werpen nieuw licht op de proces- en productbenadering. COGEM signalering CGM/090626-03

## **Bijlagen**

- 1) Bijlage IA en IB van de Richtlijn 90/220/EEG inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu (vervallen)
- 2) Bijlage IA en IB van de Richtlijn 2001/18/EG inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu
- 3) Bijlage IA en IB van de Richtlijn 2009/41/EG inzake het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen

**1) Richtlijn 90/220/EEG van het Europees Parlement en de Raad van 23 april 1990 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu (vervallen)**

BIJLAGE I A

TECHNIEKEN BEDOELD IN ARTIKEL 2, LID 2

DEEL 1

De technieken van genetische modificatie bedoeld in artikel 2, lid 2, onder i), zijn onder andere:

1. recombinant DNA-technieken waarbij gebruik gemaakt wordt van vectorsystemen, bedoeld in Aanbeveling 82/472/EEG (,);
2. technieken met rechtstreekse inbrenging in een organisme van erfelijk materiaal dat buiten het organisme geprepareerd is, waaronder micro-injectie, macro-injectie en micro-encapsulatie;
3. celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) of hybridisatietechnieken waarbij levende cellen met nieuwe combinaties van erfelijk genetisch materiaal worden gevormd door de fusie van twee of meer cellen met gebruikmaking van methoden die van nature niet voorkomen.

DEEL 2

Technieken bedoeld in artikel 2, lid 2, onder ii), die niet worden geacht tot genetische modificatie te leiden, mits deze technieken niet het gebruik van r-DNA-moleculen of GGO's impliceren, zijn:

1. in vitro bevruchting;
2. conjugatie, transductie, transformatie of andere natuurlijke technieken;
3. polyploidie-inductie.

BIJLAGE I B

TECHNIEKEN BEDOELD IN ARTIKEL 3

Technieken van genetische modificatie die van de richtlijn moeten worden uitgesloten, mits daarbij geen gebruik wordt gemaakt van GGO's als recipiënte of ouderorganismen, zijn:

1. mutagenese;
2. celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) van cellen van planten wanneer de organismen ook kunnen worden geproduceerd met behulp van traditionele kweekmethoden.

**2) Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad**

BIJLAGE I A

IN ARTIKEL 2, LID 2, BEDOELDE TECHNIEKEN

DEEL 1

De in artikel 2, lid 2, onder a), bedoelde genetische modificatietechnieken zijn onder andere:

1. recombinant-nucleïnezuurtechnieken waarbij nieuwe combinaties van genetisch materiaal worden gevormd door de invoeging van ongeacht op welke wijze buiten een organisme vervaardigde nucleïnezuurmoleculen in een virus, bacterieel plasmide of ander vectorsysteem en de opname daarvan in een gastheerorganisme waarin ze van nature niet voorkomen maar waarin ze blijvend vermenigvuldigd kunnen worden;
2. technieken met rechtstreekse inbrenging in een organisme van erfelijk materiaal dat buiten het organisme vervaardigd is, waaronder micro-injectie, macro-injectie en micro-inkapseling;
3. celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) of hybridisatietechnieken waarbij levende cellen met nieuwe combinaties van erfelijk genetisch materiaal worden gevormd door de fusie van twee of meer cellen met gebruikmaking van methoden die van nature niet voorkomen.

DEEL 2

In artikel 2, punt 2, onder b), bedoelde technieken die niet worden geacht tot genetische modificatie te leiden, mits daarbij geen recombinantnucleïnezuurmoleculen of genetisch gemodificeerde organismen worden gebruikt die zijn vervaardigd met behulp van andere technieken/methoden dan in bijlage I B worden uitgesloten:

1. in-vitrofertilisatie;
2. natuurlijke processen als conjugatie, transductie of transformatie;
3. polyploidie-inductie.

BIJLAGE I B

IN ARTIKEL 3 BEDOELDE TECHNIEKEN

Genetische modificatietechnieken/methoden waarbij organismen worden verkregen die van de richtlijn worden uitgesloten,

mits daarbij geen andere recombinant-nucleïnezuurmoleculen of genetisch gemodificeerde organismen worden

gebruikt dan met behulp van een of meer van de volgende technieken/methoden zijn vervaardigd, zijn:

1. mutagenese;
2. celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) van plantencellen van organismen die genetisch materiaal kunnen uitwisselen met behulp van traditionele kweekmethoden.

### **3) Richtlijn 2009/41/EG van het Europees Parlement en de Raad van 6 mei 2009 inzake het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde micro-organismen**

#### BIJLAGE I

##### DEEL A

Technieken van genetische modificatie bedoeld in artikel 2, onder b), i), zijn onder meer:

1. recombinant-nucleïnezuurtechnieken die resulteren in de vorming van nieuwe combinaties van genetisch materiaal doordat op enigerlei wijze buiten een organisme geproduceerde nucleïnezuurmoleculen worden geïnsereerd in een virus, een bacteriële plasmide of een ander vectorsysteem en worden geïntegreerd in een gastheerorganisme waarin zij van nature niet voorkomen maar waarin zij tot regelmatige replicatie in staat zijn;
2. technieken met rechtstreekse inbrenging in een micro-organisme van erfelijk materiaal dat buiten het micro-organisme geprepareerd is, waaronder micro-injectie, macro-injectie en micro-encapsulatie;
3. celfusie of hybridisatietechnieken waarbij levende cellen met nieuwe combinaties van erfelijk genetisch materiaal worden gevormd door de fusie van twee of meer cellen met gebruikmaking van methoden die van nature niet voorkomen.

##### DEEL B

Technieken bedoeld in artikel 2, onder b), ii), die niet worden geacht tot genetische modificatie te leiden mits bij deze technieken geen gebruik wordt gemaakt van recombinant-nucleïnezuurmoleculen of GGM's die zijn geproduceerd met behulp van andere dan de bij bijlage II, deel A, uitgesloten technieken/methoden:

1. in-vitrobevruchting;
2. natuurlijke processen, zoals conjugatie, transductie, transformatie;
3. polyploidie-inductie.

#### BIJLAGE II

##### DEEL A

Technieken/methoden van genetische modificatie waarbij micro-organismen ontstaan die van het toepassingsgebied van de richtlijn worden uitgesloten op voorwaarde dat daarbij geen andere recombinantnucleïnezuurmoleculen of GGM's worden gebruikt van die welke door middel van een of meer van de hieronder genoemde technieken/methoden zijn geproduceerd:

1. mutagenese;
2. celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) van prokaryotische soorten die genetisch materiaal uitwisselen door middel van bekende fysiologische processen;
3. celfusie (met inbegrip van protoplastfusie) van cellen van eukaryotische soorten, met inbegrip van de productie van hybridoma's en de fusie van plantencellen;
4. zelfklonering, dit wil zeggen het verwijderen van nucleïnezuursequenties uit een cel van een organisme, al dan niet gevolgd door de reïnsertie van dit nucleïnezuur of een deel daarvan (of een synthetisch equivalent) — eventueel na een aantal voorafgaande enzymatische of mechanische bewerkingen — in cellen van dezelfde soort of cellen van een fylogenetisch nauw verwante soort waarmee eerstgenoemde soort genetisch materiaal kan uitwisselen door middel van bekende fysiologische processen, voorzover het onwaarschijnlijk mag worden geacht dat het resulterende micro-organisme een ziekte kan verwekken bij mens, dier of plant. Bij zelfklonering mag gebruik worden gemaakt van recombinante vectoren waarvan het gebruik in combinatie met de betrokken micro-organismen in de loop der tijd veilig is gebleken.