

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

DATUM 19 december 2008
KENMERK CGM/081219-01
ADVIES Signalering moleculaire karakterisering

Geachte mevrouw Cramer,

Hierbij bied ik u de signalering “Heroverweging criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-gewassen” aan.

Samenvatting:

De COGEM heeft de eisen die gesteld worden aan de moleculaire karakterisering bij de markttoelating van gg-gewassen heroverwogen. Aan deze heroverweging lagen drie redenen ten grondslag. De COGEM heeft de afgelopen twee jaar veel ervaring opgedaan met de risicobeoordeling bij markttoelatingen. Daarnaast is de inhoud van het takenpakket van de COGEM recent gewijzigd. De COGEM zal de risico's van incidentele consumptie niet langer beoordelen wanneer de voedselveiligheid al wordt beoordeeld door andere instanties. Ten laatste is de afgelopen tien jaar de kennis over het genoom sterk toegenomen. Het genoom blijkt veel dynamischer dan vroeger gedacht. Insertie van chloroplast-DNA in het nucleaire DNA blijkt bijvoorbeeld een van nature veel voorkomend fenomeen.

Naar aanleiding van het bovenstaande heeft de COGEM de volgende criteria voor de moleculaire karakterisering opgesteld:

- Bekend moet zijn welke elementen en in welk kopie-aantal elementen in het plantengenoom zijn geïntegreerd. Ook moet de functie van deze elementen bekend zijn.
- De gg-plant moet geanalyseerd worden op de aanwezigheid van ‘backbone-DNA’.
- Alle inserties moeten volledig gekarakteriseerd zijn door middel van sequentie-bepaling.
- Deze bepaling moet plaatsvinden tot in de flankerende sequenties van het genoom.
- De overgangsequenties tussen de insertie(s) en het genomische DNA van de plant moet bioinformatisch geanalyseerd worden. Echter, er kunnen zich situaties voordoen waarbij hier gemotiveerd van afgeweken kan worden.
- Bij de analyse van de theoretische fusie-ORFs moeten sequenties van stop- tot stopcodon geanalyseerd worden.

De volledige tekst van de signalering met de door de COGEM gehanteerde overwegingen voor de herziening van de criteria die aan de moleculaire karakterisering bij de markttoelating van gg-gewassen gesteld moeten worden treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a horizontal line 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

Heroverweging criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-gewassen

COGEM signalering CGM/081219-01

1. Inleiding

Eén van de taken van de COGEM is om te adviseren over de eventuele milieurisico's van gg-gewassen bij markttoelatingen, zoals teelt en import. De afgelopen jaren is er een sterke toename te zien geweest van het aantal vergunningaanvragen voor markttoelatingen. Tot 2007 bleef het aantal vergunningaanvragen, en daarmee ook het aantal adviesvragen aan de COGEM, beperkt tot enkele per jaar. Echter, de afgelopen twee jaar heeft de COGEM 40 adviesvragen behandeld. De ervaring van de COGEM met de risicobeoordeling van gg-gewassen is hiermee navenant gestegen.

Ook de inhoud van het takenpakket van de COGEM is recent gewijzigd¹. In het verleden beoordeelde de COGEM bij elke vergunningaanvraag voor een gg-gewas de risico's van incidentele consumptie. Recent is door uw departement aangegeven dat dit niet nodig is wanneer de voedselveiligheid van een gg-gewas al wordt beoordeeld door andere instanties.

Bij de milieurisico-analyse spelen de moleculaire karakterisering van het gg-gewas en de geïnserteerde sequenties een belangrijke rol. De COGEM heeft tot op heden op het standpunt gestaan dat een zo volledig mogelijke set moleculaire gegevens van een gg-gewas door de aanvrager overlegd moet worden.

De afgelopen tien jaar is de kennis over het genoom sterk toegenomen. Het genoom blijkt dynamischer dan vroeger gedacht. Als gevolg van fouten bij DNA-replicatie en door DNA-recombinatie is het genoom continu onderhevig aan veranderingen. Tevens is er in het plantengenoom een 'in- en uitstroom' van DNA afkomstig uit mitochondriën en chloroplasten. Deze genoomveranderingen kunnen epigenetische effecten hebben op genexpressie. Daarnaast zijn er epigenetische processen die niet gerelateerd zijn aan veranderingen in de basenvolgorde van het genoom. Deze achtergrond van natuurlijk voorkomende veranderingen in het genoom roept de vraag op welke moleculaire gegevens nodig zijn voor een risicobeoordeling van een GGO.

Gezien de voortschrijdende wetenschappelijke inzichten, de veranderde inhoud van het takenpakket van de COGEM en de opgedane ervaringen met de beoordeling van gg-gewassen acht de COGEM de tijd rijp voor een heroverweging van de eisen die vanuit de COGEM aan de moleculaire karakterisering worden gesteld.

In deze signalering gaat de COGEM puntsgewijs in op haar overwegingen en de eisen en criteria waaraan de moleculaire karakterisering haar inziens moet voldoen. Dit document is daarmee ook een leidraad voor en toelichting op de door de COGEM uitgevoerde milieurisicobeoordeling bij markttoelatingen.

1.1 De milieurisicobeoordeling van gg-gewassen

Voordat een gg-gewas kan worden toegelaten tot de Europese markt wordt beoordeeld of dit gewas risico's oplevert voor mens en milieu². De COGEM wordt door het ministerie van VROM gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een gg-gewas. Hierbij wordt gekeken naar de mogelijke directe of indirecte schadelijke effecten van een gg-gewas en naar de kans dat deze effecten zich voordoen.

De COGEM kijkt voor het beoordelen van de milieurisico's onder meer naar de kans op verspreiding door pollen of zaden, het eventueel uitkruisen van een gewas met wilde verwanten of andere verwanten, mogelijke veranderingen in persistentie, invasiviteit en verwildering van de plant. Daarnaast wordt gekeken naar eventuele nadelige effecten indien de ingebrachte genen zich in het milieu zouden verspreiden. Bovendien worden eventuele effecten op niet-doelwitorganismen bestudeerd.

Tegenwoordig wordt in de meeste vergunningaanvragen voor markttoelatingen toestemming gevraagd voor gebruik van het gg-gewas als voedsel en veevoeder³. In dit geval wordt de voedselveiligheid van het gg-gewas beoordeeld door andere instanties, zoals de Europese Voedselwarenautoriteit (EFSA), en het RIKILT en RIVM in Nederland. Zoals eerder vermeld onthoudt de COGEM zich in deze gevallen van een beoordeling van de risico's van incidentele consumptie en vraat teneinde duplicering van werkzaamheden te vermijden.

In de uitzonderlijke gevallen dat de vergunningaanvraag alleen teelt of verwerking betreft en er dus geen voedselveiligheidsbeoordeling wordt uitgevoerd door andere instanties, beoordeelt de COGEM de risico's voor incidentele consumptie, vraat en mogelijke toxische of allergene effecten op mens en dier.

2. Moleculaire karakterisering: de verschillende elementen

Om de milieurisico's van een gg-gewas te kunnen beoordelen is het van belang dat bekend is welke DNA elementen in het gg-gewas zijn ingebracht en wat de functie van deze elementen is. Door het gg-gewas moleculair te karakteriseren wordt informatie verkregen over de elementen die daadwerkelijk in het plantengenoom zijn geïntegreerd. Deze informatie kan vervolgens worden gebruikt om met behulp van bioinformatica te voorspellen of een gg-gewas nieuwe of veranderde eigenschappen heeft.

Daarnaast kan uit de moleculaire gegevens met behulp van bioinformatica worden voorspeld of eventueel ontstane nieuwe coderende sequenties eiwitten op kunnen leveren die toxische of allergene kenmerken hebben, waardoor het gg-gewas tot risico's leidt bij incidentele consumptie en vraat. Hieronder wordt verder ingegaan op de aspecten van de moleculaire karakterisering die door de COGEM noodzakelijk worden geacht voor het beoordelen van milieurisico's.

2.1 De insertie

Om een milieurisicobeoordeling te kunnen uitvoeren moet bekend zijn welke genen en sequenties ingebracht zijn in de plant en wat de functie van deze elementen zijn. Een vereiste hiervoor is dat zowel een beschrijving van de transformatievector, de insertiecassette, de functies van de verschillende genen en gebruikte regulatoire sequenties, en de sequentievolgorde van de insertiecassette beschikbaar is.

2.2 Karakterisering van de inserties

Bij de genetische modificatie van een plant is het mogelijk dat meerdere kopieën van het gewenste DNA (de insertie) in het genoom van de plant ingebouwd worden. Deze kopieën kunnen zowel op dezelfde insertieplaats (in tandem) als verspreid door het genoom ingebouwd worden. Soms is niet de volledige insertie in een kopie aanwezig maar mist er een gedeelte.

De COGEM wijst erop dat precies bekend moet zijn welke elementen in het plantengenoom zijn ingebracht, omdat het voor het uitvoeren van een risicobeoordeling van belang is dat alle aanwezige elementen worden meegenomen in deze beoordeling. Derhalve moet minimaal een 'Southernblot-analyse' worden uitgevoerd waarbij de gehele insertie als 'probe' gebruikt wordt.

De COGEM is verder van mening dat alle inserties volledig moeten zijn gekarakteriseerd door middel van sequentiebepaling. Hiervoor is het noodzakelijk dat de gehele sequentie van het geïnserteerde DNA bepaald wordt tot in de flankerende sequenties van het plantengenoom. Samen met Southernblot-analyse kan op deze wijze de structuur van het geïnserteerde DNA en het kopie aantal exact bepaald worden. Van de flankerende sequenties moet aangetoond worden dat deze afkomstig zijn van het genoom van de gastheer. Dit kan worden vastgesteld door een bioinformatische analyse c.q. door de verkregen sequenties te vergelijken met bekende plantensequenties, Southernblot-analyse, of door middel van PCR analyse, waarbij gebruik gemaakt wordt van DNA afkomstig uit de isogene lijn.

2.3 Gg-gewas moet worden geanalyseerd op aanwezigheid van vector (backbone)-DNA

Bij het vervaardigen van een gg-gewas wordt DNA in een plantengenoom gebracht. Hiervoor worden hoofdzakelijk twee technieken gebruikt, '*Agrobacterium tumefaciens* transformatie' en '*particle bombardment*'.

Tegenwoordig wordt de transformatieprocedure met de bacterie *A. tumefaciens* het meest toegepast. Deze bacterie is van nature in staat om DNA in een plantengenoom te inserteren en kan daardoor gebruikt worden om gewenst DNA in een plant te brengen. In sommige gevallen wordt onbedoeld DNA van de vector samen met de transgencassette in het plantengenoom geïnserteerd. Dit vector-DNA wordt ook wel 'backbone'-DNA genoemd.

Ook met behulp van de, niet vaak meer toegepaste, methode van '*particle bombardment*' kan DNA in een plantengenoom gebracht worden. Bij deze methode wordt gezuiverd DNA aan microscopisch kleine metalen bolletjes gehecht die vervolgens in een plantencel worden geschoten. Het gezuiverde DNA fragment kan echter verontreinigingen bevatten met vector- of bacterieel-DNA waardoor onbedoeld ook bacterieel- of vector-DNA in de plant kan worden ingebouwd.

Het backbone-DNA bestaat uit bacterieel plasmide-DNA dat bijvoorbeeld een antibioticum-resistentiegen kan bevatten. Om de risico's van een gg-gewas te kunnen beoordelen is het belangrijk om te weten of en welke delen van het bacteriële backbone-DNA in een gg-gewas terecht zijn gekomen zodat de eigenschappen die op het ingebrachte backbone-DNA liggen meegenomen kunnen worden in de risicobeoordeling. De COGEM is daarom van mening dat uit de moleculaire karakterisering van een gg-gewas moet blijken of backbone-DNA in het gg-gewas aanwezig is. Dit kan ondermeer worden beoordeeld op basis van Southernblot-analyses. Indien backbone-DNA aanwezig is moet hiervan de sequentie

bepaald worden tot in de flankerende planten-DNA sequenties, zodat duidelijk is welke sequenties en genen zijn ingebouwd.

2.4 Analyse op het ontstaan van fusie-openleesramen

Op de overgang tussen het geïnserteerde DNA en het plantengenoom kunnen nieuwe open leesramen (ORFs) ontstaan, die in theorie kunnen leiden tot expressie van eiwitten met onbekende eigenschappen. Of fusie-ORFs ontstaan, kan bepaald worden door de overgangen tussen het insert en het flankerende plantengenoom te sequencen en de sequentie te analyseren. De aminozuurvolgordes van de eventuele theoretische fusie-ORFs kunnen bioinformatisch geanalyseerd worden op homologie met bekende eiwitsequenties.

Opgemerkt moet worden dat de kans dat een eventueel fusie-ORF leidt tot een functioneel eiwit zeer klein is. Allereerst moeten de juiste regulatiesignalen aanwezig zijn om RNA synthese te laten plaatsvinden. Voor een efficiënte vertaling van RNA in eiwit moeten vervolgens structuren zoals de zogenaamde 5' CAP structuur en de polyA-staart aanwezig zijn. Daarnaast is ook de kans dat een eiwit wordt gevormd dat zich in een zodanige tertiaire structuur vouwt dat het niet wordt afgebroken zeer klein. Het ontstaan van nieuwe (fusie-) eiwitten kan echter niet worden uitgesloten en de kans op de vorming en de eigenschappen van eventuele nieuwe eiwitten moeten daarom worden meegenomen in de risicobeoordeling.

2.4.1 Alle ORFs moeten worden meegenomen bij analyse van mogelijke nieuwe eiwitten

De COGEM merkt op dat aanvragers vaak alleen de eventuele fusie-ORFs analyseren die beginnen met het meest gebruikte ATG startcodon. Dit betekent dat ORFs die geen ATG startcodon bevatten of de sequenties van het ORF voor dit startcodon niet in de analyse opgenomen worden.

De COGEM wijst erop dat de aanwezigheid van een ATG startcodon geen noodzakelijke voorwaarde is voor expressie. De COGEM acht het daarom noodzakelijk dat ook ORFs die niet beginnen met een ATG startcodon geanalyseerd worden. Eiwittranslatie kan ook door andere codons dan het ATG geïnitieerd worden^{4,5}. Verder is de aanwezigheid van een startcodon geen noodzakelijke voorwaarde voor de start van eiwitsynthese mocht dit deel van de transgeninsertie als RNA afgelezen worden. Via RNA '*splicing*', - een vorm van RNA processing in eukaryote cellen waarbij verschillende delen (exons) van een pre-mRNA aan elkaar worden gekoppeld-, kan een eiwitcoderende sequentie uit kleinere ORFs gemaakt worden. Het kan ook voorkomen dat een ORF van een eiwitcoderend transgen 'verlengd' wordt via splicing van flankerende genoom sequenties⁶. De signaalsequenties voor splicing zijn deels bekend, er zijn echter ook cryptische splicingsignalen, waardoor het niet mogelijk is om splicing altijd te voorspellen.

Als laatste moet worden opgemerkt dat bij de vertaling van mRNA in eiwit, een ORF of delen van een ORF achter een stopcodon toch tot expressie gebracht kunnen worden. Een stopcodon kan genegeerd worden bij de translatie (zogenaamde '*readthrough*'). Ook is het mogelijk dat er bij de translatie een verschuiving in leesraam optreedt, een zogenaamde '*translational frameshift*'.

RNA-synthese en bovengenoemde RNA processing stappen e.d. kunnen theoretisch niet worden uitgesloten, maar de COGEM wijst erop dat de kans dat ze daadwerkelijk optreden klein is gezien de vele voorwaarden waaraan moet worden voldaan. Zoals eerder beschreven acht de COGEM de kans dat overgangs-ORFs stabiele eiwitten opleveren zeer klein. De

COGEM acht het daarom voldoende dat overgangsgebieden geanalyseerd worden op de aanwezigheid van ORFs die bepaald zijn van stopcodon tot stopcodon en die groter zijn dan 8⁷ aminozuren.

2.4.2 Ecologische risico's: bioinformatica weinig voorspellende waarde

De voorspellende waarde van bioinformatische analyse voor veranderde biologische eigenschappen is klein. De aminozuursequentie van een fusie-eiwit zal een nieuwe combinatie zijn van bestaande aminozuursequenties. Een dergelijke sequentie zal in de meeste gevallen geen homologie vertonen met eiwitten waarvan bekend is dat zij bepalend zijn voor specifieke biologische eigenschappen. Tot op heden is dan ook nog nooit een fusie-ORF geïdentificeerd waaraan (in theorie) een biologische eigenschap kon worden verbonden. De COGEM is daarom van mening dat een bioinformatische analyse voor het ontstaan van eventuele nieuwe eiwitten op de overgang tussen de insertieplaats en het plantengenoom nauwelijks tot geen substantiële bijdrage levert aan het beoordelen van ecologische risico's. Bij een markttoelating van een gg-gewas worden altijd veldproeven uitgevoerd waarbij de biologische karakteristieken van een gg-gewas worden bestudeerd. Deze veldproeven worden in meerdere jaren op verschillende locaties uitgevoerd. Veldproeven geven een beter inzicht in eventuele veranderde biologische karakteristieken.

Echter zoals gesteld in paragraaf 2.2 is de sequentiebepaling van de overgang tussen insert en plantengenoom een eis om vast te stellen welke inserties aanwezig zijn. Een analyse van deze sequenties op het ontstaan van fusie-ORFs en de vergelijking van theoretisch gevormde fusie-eiwitten met bekende sequenties in databases vraagt slechts een geringe inspanning in tijd en kosten.

2.4.3 Voedselveiligheid: bioinformatische analyse verplicht

Verder verplichten de instanties die (vee)voedselveiligheid beoordelen, de aanvrager tot een bioinformatische analyse van de overgangen tussen insert en plantengenoom⁸. Het is namelijk wel mogelijk om met behulp van sequentievergelijkingen met bekende toxines en allergenen in sequentiedatabases aanwijzingen te verkrijgen of eventuele nieuw ontstane eiwitten allergene of toxische kenmerken hebben⁹.

Indien een vergunningaanvraag alleen teelt of verwerking betreft, wordt er geen beoordeling op (vee)voedselveiligheid uitgevoerd. In dergelijke, - thans uitzonderlijke -, gevallen worden de eventuele risico's van incidentele consumptie en vraat beoordeeld in het kader van de milieurisicobeoordeling. Dit betekent dat de COGEM deze risico's in haar overwegingen mee zal nemen. In deze gevallen acht de COGEM een volledige bioinformatische analyse van de overgangen tussen flankerende sequenties en planten genomisch-DNA noodzakelijk, in lijn met de eisen voor de (vee)voedselveiligheidsbeoordeling.

Overigens dringt de COGEM erop aan dat bij een voedselgewas in alle gevallen, dus ook wanneer het niet de bedoeling is om dit gewas als voedsel te gebruiken, een voedselveiligheidsbeoordeling wordt uitgevoerd, zodat ook bij een eventuele onbedoelde vermenging de voedselveiligheid gewaarborgd blijft.

2.4.4 Conclusie

Gezien het bovenstaande acht de COGEM het in het algemeen noodzakelijk dat een volledige bioinformatische analyse wordt uitgevoerd van de overgangen tussen insert-DNA en plantengenoom naar de eventuele vorming van fusie-ORFs en de eigenschappen van de eventueel theoretisch gevormde eiwitten. Echter, er kunnen zich situaties voordoen waarbij hier gemotiveerd van afgeweken kan worden, bijvoorbeeld in het geval van gewassen die niet voor menselijke of dierlijke consumptie geschikt zijn.

2.5 Herschikkingen komen ook van nature voor in het plantengenoom

Door het proces dat gepaard gaat met het inbrengen van DNA in het plantengenoom worden herschikkingen in het genomisch-DNA in de hand gewerkt. Vooral bij particle bombardment worden tal van breuken in het genomisch-DNA veroorzaakt die leiden tot herschikkingen.

De afgelopen jaren is steeds duidelijker geworden dat het genoom geen statisch geheel is, maar continu onderhevig is aan veranderingen, herschikkingen, en inserties^{10,11}. Bij elke meiotische en mitotische deling worden herschikkingen (rearrangements, translocaties, inversies, duplicaties, ‘*single nucleotide polymorphisms*’ (SNPs), etc) in het genoom geïnduceerd^{12,13,14}. Deze ‘*genomic rearrangements*’ zijn een natuurlijk en frequent voorkomend fenomeen en een drijvende kracht achter de evolutie.

Of een ‘herschikking’ van het genomisch-DNA leidt tot een veranderde eigenschap van de plant is niet te voorspellen. Bioinformatische analyse van eventuele genomische herschikkingen heeft daarom een geringe voorspellende waarde. Veldproeven geven meer informatie over de biologische karakteristieken van een gg-gewas. Omdat eventuele additionele herschikkingen ten gevolge van het inbrengen van DNA in het plantengenoom gering zullen zijn ten opzichte van de genoomveranderingen die van nature optreden en gezien de geringe voorspellende waarde van een bioinformatische analyse, acht de COGEM een analyse van eventuele herschikkingen in het genoom niet noodzakelijk voor de risicobeoordeling van gg-gewassen.

2.6 Inserties van chloroplast-DNA treden van nature met hoge frequentie op

Bij de transformatie van planten door middel van particle bombardment treedt vaak co-integratie op van DNA afkomstig uit de chloroplast. De COGEM heeft eerder gesteld dat de overgang tussen het geïntegreerde chloroplast-DNA en het genomisch-DNA gesequenced en geanalyseerd moet worden op de vorming van eventuele fusie-ORFs met nadelige eigenschappen.

Echter integratie van chloroplast-DNA in het plantengenoom is een proces dat van nature voorkomt. Gedurende de evolutie zijn tal van chloroplast sequenties in het nucleaire DNA van planten ingebouwd. Tal van plantengenen zijn ontstaan door de inbouw van sequenties afkomstig uit het chloroplastgenoom^{15,16,17,18}. Uit onderzoek blijkt dat de integratie van chloroplast-DNA in het nucleaire genomische DNA met een verrassend hoge frequentie gebeurt. Gerapporteerd zijn frequenties van integratie in het nucleaire DNA van functionele genen afkomstig uit de chloroplast van 1 :16.000 tot 1 :49.000 gevormde pollenkorrels of zaailingen^{19,20}. Tegenover de constante integratie van chloroplast-DNA staat een continu proces van verwijdering van deze sequenties waardoor er een evenwicht is tussen de ‘instroom en uitstroom’ van chloroplast sequenties²¹.

In het licht van het bovenstaande concludeert de COGEM dat insertie van chloroplast-DNA in het nucleaire DNA een natuurlijk en vaak voorkomend fenomeen is. Eventuele theoretische risico's verbonden aan de co-integratie van chloroplast-DNA bij genetische modificatie overschrijden daarmee niet de baseline van 'natuurlijk aanwezige risico's'. Derhalve is de COGEM van mening dat een sequentiebepaling en een bioinformatische analyse van de overgang tussen eventueel geïntegreerd chloroplast-DNA en genomisch nucleair-DNA niet noodzakelijk is.

2.7 Epigenetische signaalsequenties

De insertie van een gen in het plantengenoom kan tot epigenetische effecten leiden zoals 'silencing' van genen, inclusief het transgen zelf, of veranderingen in expressieniveau's. Deze effecten zullen deels overerfbaar en stabiel zijn over meerdere generaties.

Met betrekking tot de risico-analyse moeten hierbij een aantal kanttekeningen gemaakt worden. Deze effecten zijn ten eerste niet goed voorspelbaar met behulp van bioinformatische analyse. Ten tweede is het de vraag of dergelijke epigenetische effecten tot milieurisico's kunnen leiden, immers deze effecten leiden tot 'silencing' of tot een veranderd expressieniveau. Ten derde treden vergelijkbare epigenetische effecten ook onder natuurlijke omstandigheden en bij conventionele veredeling op.

Op grond hiervan is de COGEM van mening dat epigenetische effecten thans niet in de moleculaire karakterisering beschouwd hoeven te worden.

3. Conclusie

De COGEM heeft sinds 2007 de milieurisico's van tientallen gg-gewassen beoordeeld en hierdoor extra ervaring opgedaan met het beoordelen van deze risico's. Daarnaast zal de COGEM de risico's van incidentele consumptie niet meer beoordelen wanneer de voedselveiligheid van een gg-gewas wordt beoordeeld door andere instanties.

Dit alles heeft ertoe geleid dat de COGEM de bijdrage van de verschillende elementen van de moleculaire karakterisering van gg-gewassen aan de risicobeoordeling heeft heroverwogen. Centraal stond hierbij de vraag welke bijdrage de gevraagde informatie levert aan de risicobeoordeling.

Samenvattend is de COGEM van mening dat:

- Bekend moet zijn welke elementen in het plantengenoom zijn geïnserteerd, evenals het aantal aanwezige (gedeeltelijke) kopieën van de insertiecassette. Verder moet de functie van deze elementen bekend zijn.
- De gg-plant moet geanalyseerd worden op de eventuele aanwezigheid van zogenaamd backbone-DNA.
- Alle inserties in het plantengenoom moeten volledig gekarakteriseerd zijn door middel van sequentiebepaling.
- Deze sequentiebepaling moet plaatsvinden tot in de flankerende sequenties van het plantengenoom, zodat uitsluitel verkregen kan worden dat de gehele insertie gekarakteriseerd is.
- De overgangsequenties tussen de insertie(s) en het genomisch-DNA van de plant moet bioinformatisch geanalyseerd worden op de aanwezigheid van fusie-ORFs en de in

theorie door de fusie-ORFs gecodeerde aminozuursequenties moeten vergeleken worden met bekende eiwitsequenties in databases. Echter, er kunnen zich situaties voordoen waarbij hier gemotiveerd van afgeweken kan worden, bijvoorbeeld in het geval van gewassen die niet voor menselijke of dierlijke consumptie geschikt zijn.

- Bij de analyse van de theoretische fusie-ORFs moeten de sequenties van stop- tot stopcodon geanalyseerd worden.

Referenties

- ¹ COGEM (2008) Aanvullend COGEM advies over de vergunningaanvraag voor import en verwerking van de gg-maïs variëteit GA21. (CGM/0801170-02)
- ² Richtlijn 2001/18/EG van het Europees parlement en de raad inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad
- ³ Verordening (EG) nr. 1829/2003 van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2003 inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders
- ⁴ Takahashi K, Maruyama M, *et al.* (2005). Evolutionary conserved non-AUG translation initiation in *NAT1/p97/DAP (EIFG2)*. *Genomics* 85: 360-371
- ⁵ Tikole S, Sankararamkrishnan R (2006). A survey of mRNA sequences with a non-AUG start codon in RefSeq database. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 24: 33-41
- ⁶ Rang A, Linke B, *et al.* (2005). Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready Soybean. *European food Research technology* 220: 438-443
- ⁷ Thomas K, Bannon, G *et al.* (2005). In silico methods for evaluating human allergenicity to novel proteins: International bioinformatics workshop meeting report, 23-24 February 2005. *Toxicological sciences* 88: 307-310
- ⁸ EFSA (2006). Guidance document for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use by the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) (Question number: EFSA-Q-2003-005B)
- ⁹ COGEM (2008). Verslag bijeenkomst 'risico-analyse van de insertie van oligonucleotiden het plantengenoom', 2 september 2008, Bilthoven
- ¹⁰ Nowacki M, Vijayan V *et al.* (2008). RNA-mediated epigenetic programming of a genome-rearrangement pathway. *Nature* 451: 153-159
- ¹¹ Eckardt N (2006). Genomic hopscotch: gene transfer from plastid to nucleus. *Plant Cell* 18: 2865-2867
- ¹² Xiwen C, Xu S (2007). Meiosis-Driven Genome Variation in Plants. *Current Genomics*, 8: 151-161
- ¹³ Hamant O, Hong M, Cande Z (2006). Genetics of meiotic prophase in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 267-302
- ¹⁴ Petes T (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nature Reviews Genetics* 2: 360-369
- ¹⁵ Leister D (2005). Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in genetics* 21:655-663
- ¹⁶ Timmis J, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews* 5: 123-135

- ¹⁷ Shahmuradov I, Akbarov YY, Solovyev VV, Aliyev JA (2003). Abundance of plastid DNA insertions in nuclear genomes of rice and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 52: 923-934
- ¹⁸ Stegemann S, Hartmann S, *et al.* (2003). High frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 8828-8833
- ¹⁹ Huang CY, Ayliffe MA *et al.* (2004) Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 9710-9715
- ²⁰ Sheppard AE, Ayliffe MA, *et al.* (2008). Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevated during male gametogenesis in tobacco. *Plant Physiology* 148: 328-336
- ²¹ Matsuo MY, Ito Y, *et al.* (2005). The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *Plant Cell* 17:665-675