

Leeswijzer

**bij de wijziging van de bijlagen 2, 5, 6 en 8
van de Regeling ggo**

zoals van kracht per 1 april 2008

Inhoudsopgave

1.	Inleiding	3
2.	Toelichting op de wijziging van bijlage 2	3
3.	Toelichting op de wijziging van bijlagen 5 en 6	4
3.1	Samenvoeging van bijlagen 5 en 6 van de Regeling ggo	4
3.2	Vervallen, samenvoegen en toevoegen van inschalingsartikelen	4
3.3	Wijzigingen binnen een inschalingsartikel	5
3.4	Transponeringstabel	6
4.	Toelichting op termen uit bijlage 5	8
4.1	Gekarakteriseerde en ongekarakteriseerde donorsequenties	8
4.2	Schadelijk genproduct	8
4.3	Biologische inperking	10
4.4	Eigenschappen van de plantensoort	13
4.5	Aërogene verspreiding	14
5.	Toelichting op de wijziging van bijlage 8	15

1. Inleiding

De inschalingsbijlagen (bijlagen 5 en 6) bij de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (de Regeling) zijn vanaf 1993 tot de huidige Regeling ongewijzigd gebleven. Gezien de vele ontwikkelingen in het recombinant DNA onderzoek en de ruime ervaring die in deze jaren is opgedaan met het inschalen volgens deze bijlagen lag een herziening van de inschalingsbijlagen voor de hand. Een belangrijk doel van deze herziening is om inschalingsartikelen af te schaffen die niet langer van toepassing zijn en om de inschalingsartikelen beter bij de huidige praktijk te laten aansluiten.

Resultaat hiervan is het vervallen van bijlage 6 en een nieuwe bijlage 5 die minder inschalingsartikelen bevat, transparanter is en beter aansluit bij de onderzoeks- en vergunningverleningspraktijk. Voor aanvragers betekent deze nieuwe bijlage dat zij beter kunnen zien hoe de activiteiten ingeschaald moeten worden en wat hierbij de belangrijkste criteria zijn. Door het beperken van het aantal inschalingsartikelen is het ook eenvoudiger geworden om tot een juist inperkingsniveau te komen. Bevatte de oude bijlagen 5 en 6 nog 213 verschillende inschalingsartikelen, in de nieuwe bijlage zijn dit er nog slechts 69.

Overigens is het zo dat de wijze van risicobeoordeling gelijk blijft en dat de nieuwe inschalingsartikelen niet leiden tot een andere inschaling van de activiteiten.

Aan de bijlage over vectoren en inserties (bijlage 2) zijn twee inleidende teksten toegevoegd die duidelijk maken aan welke criteria vectoren moeten voldoen om voor plaatsing op bijlage 2.1.1 in aanmerking te komen.

De regels voor het opslaan van afval dat ggo's bevat (of kan bevatten) buiten een geclassificeerde ruimte (bijlage 8) zijn nader uitgewerkt naar de herkomst van het afval.

De wijzigingen in bijlagen 2, 5, 6 en 8 van de Regeling hebben ook consequenties voor de artikelen 6, 7 en 8 van deze Regeling. De gewijzigde artikelen zijn opgenomen in de Regeling zoals die nu ook beschikbaar is op www.vrom.nl/ggo-vergunningverlening.

De hierboven bedoelde wijzigingen zijn gepubliceerd in de *Staatscourant*, nr. 240 van 11 december 2007.

2. Toelichting op de wijziging van bijlage 2

Bijlage 2 bestaat uit twee lijsten met vectoren, te weten:

- bijlage 2.1.1: vectoren die geschikt zijn voor de vervaardiging van genetisch gemodificeerde organismen die behoren tot groep I in prokaryoten, gisten en schimmels;
- bijlage 2.1.2: vectoren die geschikt zijn voor de vervaardiging van genetisch gemodificeerde organismen die behoren tot groep I in animale cellen of plantencellen in cultuur.

De wijziging van bijlage 2 betreft toevoeging van bijlage 2.1 waarin een aantal specifieke criteria benoemd worden waaraan een vector moet voldoen om geschikt te zijn voor de vervaardiging van ggo's die behoren tot groep I in prokaryoten, gisten en schimmels. In de Regeling uit 1993 was deze informatie reeds opgenomen, maar in de versie van de Regeling uit 2004 kwam deze informatie niet meer voor.

Verder is in bijlage 2.1.1 informatie toegevoegd die aangeeft dat bepaalde afgeleiden van vectoren ook toegepast kunnen worden. Voor nadere informatie betreffende de typen afgeleide vectoren is een toelichting beschikbaar op vrom.nl/ggo-vergunningverlening onder 'veelgestelde vragen'.

3. Toelichting op de wijziging van bijlagen 5 en 6

De wijzigingen die geleid hebben tot de nieuwe bijlage 5 betreffen:

- samenvoeging van bijlagen 5 en 6;
- toevoegen en doen vervallen van inschalingsartikelen;
- wijzigingen binnen een inschalingsartikel.

In onderstaande paragrafen 3.1, 3.2 en 3.3 worden deze wijzigingen nader besproken.

In paragraaf 3.4 wordt een transponeringstabel gepresenteerd die de samenhang tussen de oude bijlagen 5 en 6 en de nieuwe bijlage 5 weergeeft.

3.1 Samenvoeging van bijlagen 5 en 6 van de Regeling ggo

In alle voorgaande regelingen was er een aparte bijlage voor vervaardiging van ggo's (bijlage 5) en handelingen met ggo's (bijlage 6). In de praktijk werd nauwelijks gebruik gemaakt van het onderscheid tussen vervaardiging van en handelingen met een ggo, omdat dit ook niet leidde tot een inschaling op een ander inperkingsniveau. In feite was bijlage 6 voor het overgrote deel een kopie van de inschalingsartikelen van bijlage 5 die handelingen met gekarakteriseerde inserties beschreven. De nieuwe inschalingsbijlage bestaat dan ook uit een samenvoeging van de oude bijlagen 5 en 6. Daarbij is de formulering 'vervaardiging van een ggo' en 'handelingen met een ggo' samengevoegd tot de formulering 'activiteiten met een ggo'.

Naar de nieuwe bijlage zijn tevens de in de oude bijlage 5 ontbrekende inschalingsartikelen uit bijlage 6 overgeheveld en zijn enkele nieuwe inschalingsartikelen opgenomen.

In totaal heeft het samenvoegen van de bijlagen 5 en 6 een aanzienlijke reductie van het aantal inschalingsartikelen opgeleverd. Daarbij is de wijze van risicobeoordeling gelijk gebleven en leiden de nieuwe inschalingsartikelen niet tot een andere inschaling van de activiteiten.

3.2 Vervallen, samenvoegen en toevoegen van inschalingsartikelen

Vervallen van inschalingsartikel voor HV-2 systemen

De HV-2 systemen genoemd in de oude inschalingsartikelen 5.1 en 6.1 (zie bijlage 3 van de Regeling voor beschrijving van deze systemen) zijn de laatste 12 jaar niet geactualiseerd, ook zijn er geen beschikkingen afgegeven waarin aanspraak wordt gemaakt op dit inschalingsartikel. Alle toestemmingen waarin wel sprake was van het gebruik van HV-2 systemen en de bijbehorende verlaagde inschaling (de zogenaamde p-projecten) zijn afgesloten. Omdat er ook geen nieuwe aanvragen meer verwacht worden, is de noodzaak voor dit inschalingsartikel vervallen.

Toevoeging van inschalingsartikel voor IA activiteiten

IA activiteiten (zoals bedoeld in artikel 2 en 3 van het Besluit ggo) hoeven in principe maar eenmalig aangevraagd te worden en deze activiteiten worden per definitie op ML-I niveau ingeschaald volgens het oude inschalingsartikel 5.2.k. Om nog inzichtelijker te maken dat het om IA activiteiten gaat, is hiervoor een apart inschalingsartikel in de nieuwe bijlage 5 (zie artikel 5.1) in het leven geroepen.

Samenvoeging van de oude artikelen 5.3 (resp. 6.3) en 5.4 (resp. 6.4)

De artikelen 5.3 en 6.3 uit de oude bijlagen 5 en 6, omvatten de inschalingsartikelen voor vervaardiging van en handelingen met een micro-organisme van klasse 1 dat niet erkend was als een micro-organisme van bijlage 1. De artikelen 5.4 en 6.4 waren overeenkomstig 5.3 en 6.3 geformuleerd, maar dan voor micro-organismen van klasse 2, 3 of 4. Dit is het enige onderscheid tussen beide artikelen; door samenvoeging is een inzichtelijker en meer samenhangend geheel ontstaan (zie artikel 5.3 van de nieuwe bijlage 5).

Beperking van de inschalingsartikelen voor virale systemen

Voor een aantal virale systemen waren er in zowel bijlage 5 als bijlage 6 aparte artikelen opgenomen, bijvoorbeeld voor papilloma virussen, baculovirussen en plantenvirussen. De praktijk heeft uitgewezen dat de inschaling van virussen van plant of dier gebaseerd is op slechts twee criteria: de pathogeniteitsklasse waartoe het virus behoort, en de vraag of het toegepaste systeem biologisch ingeperkt is. Deze biologische inperking, het samenspel tussen de cel, de vector(en) en de modificatie, kan op veel verschillende manieren worden bewerkstelligd. Bijvoorbeeld door het genetische ontwerp van het systeem of door gebruik van non-host cellen. Hierover volgt een gedetailleerde uitleg in Hoofdstuk 4.3.

Samenvoeging van al de verschillende inschalingsartikelen die betrekking hadden op virussen leidt tot een reductie van het aantal inschalingsartikelen zonder dat hiermee het feitelijke inschalingsniveau van de activiteiten wordt veranderd.

Toevoeging van een inschalingsartikel voor cellen

Voor de aanvrager bleek het de afgelopen jaren vaak onduidelijk of er voor handelingen met cellen, afkomstig van genetisch gemodificeerde dieren of planten al dan niet in associatie met genetisch gemodificeerde organismen, een risicoanalyse moest worden uitgevoerd. Dit type activiteiten werd en wordt expliciet in de beschikking vermeld. Om dit voor aanvragers duidelijker te maken is in de nieuwe bijlage hiervoor een apart inschalingsartikel opgenomen (artikel 5.4.4).

3.3 Wijzigingen binnen een inschalingsartikel

Vervanging inschalingsartikel voor toxinen

In de voorgaande Regelingen werd er gebruik gemaakt van inschalingsartikelen die verwezen naar de toxiciteitsklasse van een toxine (LD50 klasse, zie hiertoe de definitie voor toxine in de Regeling van 2004). Deze benadering had een aantal nadelen: van veel genproducten, die als mogelijk toxisch te boek staan, is geen LD50 bepaling voorhanden. Probleem hierbij was dat in de gevallen waarin deze bepaling wel voorhanden was, deze voor de specifieke toepassing vaak niet relevant was. Daarnaast waren er inschalingsartikelen voor schadelijke genproducten. Deze artikelen werden in de praktijk weinig toegepast omdat altijd onduidelijk bleef wat onder een schadelijk genproduct verstaan moest worden. Ook was het bezwaarlijk dat voor zowel een schadelijk als een niet-schadelijk genproduct altijd hetzelfde inschalingsniveau van toepassing was.

In de nieuwe bijlage wordt alleen met de term 'schadelijk genproduct' gewerkt. Toxinen worden gezien als een verbijzondering van de term 'schadelijk genproduct'. In de aan te leveren informatie bij de vergunningaanvraag, is alle ruimte om uit te leggen waarom bij de aangevraagde activiteiten het toxine wel of niet als schadelijk genproduct moet worden gezien. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van informatie zoals bv. een LD50 bepaling. Een nadere uitleg over wat er verstaan wordt onder de term schadelijk genproduct wordt gegeven in Hoofdstuk 4.2.

Vervallen van inschalingsartikel 'de donor is een organisme van klasse 1, plant of dier'

Sequenties afkomstig van een organisme van klasse 1, van een plant of dier, worden nu als niet-schadelijke sequenties ingeschaald. Hiermee komt het oude inschalingsartikel m.b.t. deze donoren te vervallen.

Toevoeging van virale vector van klasse 1 in inschalingsartikel 5.4.2

De terminologie 'virale vector van klasse 1' is biologisch gezien niet juist. Er is echter toch voor deze formulering gekozen om aan te sluiten bij de inschalingsystematiek van micro-organismen, waarbij een niet-pathogeen micro-organisme erkend kan worden als een klasse 1 en op ML-I ingeschaald wordt. In navolging hiervan is de virale vector Modified vaccinia virus Ankara (MVA) een voorbeeld van een niet-pathogeen virus dat op ML-I gehanteerd wordt. Toelichting: MVA is een veel gebruikte vacciniastam die is ontstaan door meer dan 570 passages in kippenembryo fibroblasten. Hierdoor is MVA gastheerspecifiek geworden voor kippenembryo fibroblasten en niet meer in staat om in mensen of andere zoogdieren te vermenigvuldigen. Deze wijziging van het gastheerbereik is ontstaan als gevolg van deleties in het virale genoom van MVA die gedurende de veelvuldige passages in kippenembryo

fibroblasten zijn ontstaan. De stabiliteit van deze deleties is aangetoond door een langdurig en veilig gebruik als vaccinstam voor pokkenvaccinaties.

Toevoeging inschalingsartikel voor ggo plant of dier met schadelijke sequentie

In de voorgaande Regelingen werd de inschaling van ggo planten en dieren niet afhankelijk gemaakt van de ingebrachte donorsequenties. In de nieuwe bijlage is een apart inschalingsartikel toegevoegd voor ggo planten (artikel 5.5.1.c) en voor ggo dieren (artikel 5.6.1.b) waarin een schadelijke sequentie is gekloneerd. Hierbij valt te denken aan bijvoorbeeld een allergeen genproduct in planten (zie ook hoofdstuk 4 voor uitleg schadelijk genproduct). De inschaling van de ggo plant op PC-I of PK-II zal dan aangevuld worden met aanvullende voorschriften, toegesneden op het schadelijke effect. Dezelfde procedure zal gevolgd worden voor ggo dieren op D-I.

3.4 Transponeringstabel

In deze tabel kan opgezocht worden hoe de nieuwe inschalingsartikelen corresponderen met de oude inschalingsartikelen.

Oud inschalingsartikel volgens Regeling ggo 1998

Nieuw inschalingsartikel volgens Regeling ggo 2008

Vervaardiging van en handelingen met genetisch gemodificeerde micro-organismen

5.1.a t/m j en 6.1.a t/m e	vervallen
5.2.k en 6.2.f	5.1
5.2.a t/m j en 6.2.a t/m e	5.2.a t/m i
5.3.a t/m j en 6.3 a t/m e	5.3.a t/m i
5.4.a t/m j en 6.4 a t/m e	5.3 a t/m i

Vervaardiging van en handelingen met genetisch gemodificeerde animale cellen

5.5.1.a t/m j en 6.5.1 a t/m e	5.4.1.a t/m i
5.5.2.a t/m j en 6.5.2 a t/m e	5.4.2.a t/m i
5.5.3.a t/m j en 6.5.3 a t/m e	5.4.3.a t/m i
5.5.4.a t/m j en 6.5.4 a t/m e	5.4.2.a t/m i
5.5.5.a t/m j en 6.5.5 a t/m e	5.4.2.a t/m i
5.5.6.a t/m j en 6.5.6 a t/m e	5.4.3.a t/m i
5.5.7.a t/m j en 6.5.7 a t/m e	5.4.2.a t/m i
	5.4.4 a t/m e is nieuw

Vervaardiging van en handelingen met genetisch gemodificeerde plantencellen

5.6.1.a t/m j en 6.6.1 a t/m e	5.4.2.a t/m i
5.6.2.a t/m j en 6.6.2 a t/m e	5.4.3.a t/m i

Handelingen met planten

6.7.1.a en b	5.5.1.a en b (c is nieuw)
6.7.2.a t/m d	5.5.2.b t/m e (a is nieuw)

Handelingen met dieren

6.8.1	5.6.1.a (b is nieuw)
6.8.2.a t/m e	5.6.2.a t/m e

Handelingen in procesinstallaties

6.9.1	5.7.1
6.9.2	5.7.2
6.9.3.a en b	5.7.3.a en b

**Onderverdeling binnen
oud inschalingsartikel**

5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6

a
b
c
d
e
f
g
h
i
j

**Onderverdeling binnen
oud inschalingsartikel**

6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6

a
b
c
d
e

**Onderverdeling binnen
nieuw inschalingsartikel**

5.1, 5.2, 5.3, 5.4

a
b
c
d
e
f
g
h
f
i

**Onderverdeling binnen
nieuw inschalingsartikel**

5.1, 5.2, 5.3, 5.4

f
g
h
f
i

4. Toelichting op termen uit bijlage 5

In dit hoofdstuk worden enkele termen die in de inschalingsartikelen van bijlage 5 gebruikt worden nader toegelicht. Dit met als doel om meer houvast en inzicht te geven in wat er met de term bedoeld wordt en om het beter mogelijk te maken tot een goede risicoanalyse te komen.

4.1 Gekarakteriseerde en ongekarakteriseerde donorsequenties

In de inschalingsartikelen wordt gesproken over gekarakteriseerde en ongekarakteriseerde donorsequenties. Er is sprake van een gekarakteriseerde sequentie naarmate beter kan worden beargumenteerd dat de sequentie uitsluitend de functie heeft die in de risicoanalyse in beschouwing genomen wordt. Zolang dat niet voldoende beargumenteerd kan worden, wordt de sequentie beschouwd als ongekarakteriseerd en vindt de inschaling plaats aan de hand van de risicoanalyse voor het meest schadelijke genproduct dat in het organisme waaruit de sequentie afkomstig is, aanwezig is.

Als voorbeeld van het gebruik van ongekarakteriseerde sequenties kan het maken van banken genoemd worden. Hierbij wordt uitgegaan van een mengsel van al het genetisch materiaal van de (verschillende) donor(en) en dus moet men bij de risicoanalyse er van uitgaan dat iedere coderende sequentie van een donor aanwezig kan zijn in het resulterende ggo. De inschaling gebeurt dan aan de hand van de risicoanalyse voor het meest schadelijke gen dat in de donor aanwezig is. Pas nadat het daadwerkelijk gekloneerde materiaal gekarakteriseerd is kan de risicoanalyse gedaan worden aan de hand van de gegevens van de gekarakteriseerde sequentie. Dit kan vervolgens leiden tot een omlaagschaling van de werkzaamheden.

Nieuwe recombinant-DNA technieken stellen vaak nieuwe eisen aan de onderbouwing dat een bepaalde sequentie 'gekarakteriseerd' is. Bij het 'oppikken' van sequenties met behulp van PCR is het eerste PCR product in principe nog niet voldoende gekarakteriseerd. Toch zal men vaak kunnen beargumenteren, op basis van de gekozen primers en op basis van de uniformiteit van het PCR product, dat de risicoanalyse kan worden gedaan op basis van de eigenschappen van het verwachte PCR product.

Een sequentie hoeft niet volledig gesequenced te zijn om 'gekarakteriseerd' te zijn. Een eenduidige restrictiekaart gecombineerd met kennis van de fysiologische rol van het genproduct zal meestal voldoende zijn om een sequentie te karakteriseren.

Een sequentie wordt in ieder geval beschouwd als ongekarakteriseerd indien de onderstaande gegevens in zijn geheel of gedeeltelijk ontbreken:

- De herkomst van de sequentie;
- De wijze waarop de insertie is geconstrueerd;
- De functie.

Als gegevens over deze aspecten gedeeltelijk ontbreken zal van geval tot geval vastgesteld moeten worden of de betreffende sequentie beschouwd kan worden als een gekarakteriseerde sequentie.

4.2 Schadelijk genproduct

Een steeds terugkerende overweging in de inschalingsartikelen van bijlage 5 is de vraag of de donor(sequentie) codeert (of kan coderen) voor een schadelijk genproduct dat *werkzaam kan zijn* in de gastheer.

Het is daarom van belang om een goed beeld te hebben wat er wordt verstaan onder het begrip 'schadelijk genproduct'. Daarbij is het van belang dat men zich realiseert dat het daadwerkelijk gerealiseerde schadelijke effect afhankelijk is van de genetische en fysiologische context van de gastheer waarin een sequentie wordt toegepast, en of het genproduct in de gastheer tot expressie komt.

Het is niet mogelijk om een uitputtende lijst van 'schadelijke genproducten' op te stellen. De vaststelling of een genproduct al dan niet schadelijk is zal daarom case-by-case plaats moeten vinden, door middel van een risicoanalyse. Bij de beoordeling van de schadelijkheid van een genproduct moet in deze context niet alleen het eiwit dat gecodeerd wordt door een sequentie worden beoordeeld, maar ook de manier waarop het tot expressie komt, onder invloed van regulatorische sequenties, zoals promotoren en enhancers.

De schadelijkheid van genproducten wordt beoordeeld voor situaties van ingeperkt gebruik. Dat betekent dat er gekeken wordt naar schadelijkheid voor de medewerker, als eerst blootgestelde, voor de omgeving van de medewerker, en naar schadelijkheid voor het milieu in het algemeen.

Als eerste stap in de risicoanalyse moet worden nagegaan of er een aanleiding, een 'trigger', is om te veronderstellen dat het genproduct *potentieel* schadelijk is. Alleen als er zo'n trigger is, moet er in een tweede stap worden nagegaan in hoeverre het genproduct schadelijk is onder de omstandigheden van gebruik.

Stap 1: De eigenschappen en functie van het genproduct

Om na te gaan of er triggers zijn om een genproduct als potentieel schadelijk aan te merken, moet worden nagegaan of er een 'scenario' kan worden opgesteld waarlangs een schadelijke werking van het genproduct kan optreden. Zo'n scenario wordt gebaseerd op de eigenschappen en fysiologische functie van het genproduct, zoals die bekend zijn uit de donor, en uit andere ggo's waarin hetzelfde of een vergelijkbaar gen is gekloneerd.

Op deze manier is er een aantal genproducten geïdentificeerd die worden gezien als potentieel schadelijk:

- genproducten die direct schadelijk zijn voor de omgeving, ook zonder de aanwezigheid van het organisme dat ze produceert: toxines en cytolytines, en allergenen.
- virulentiefactoren, zoals genproducten die de fysiologie van de gastheer veranderen zodanig dat de pathogeniteitsklasse van de gastheer toeneemt. Denk hierbij ook aan virale sequenties die het tropisme van virussen (kunnen) beïnvloeden;
- genproducten die kunnen bijdragen aan de verspreiding van het gekloneerde genetisch materiaal, zoals transposases en genproducten betrokken bij conjugatie, en sequenties die betrokken zijn bij deze processen, of sequenties die betrokken zijn bij de herrangschikking van genetisch materiaal, zoals ITRs, LTRs, herkenningssites voor plaats specifieke recombinatie of voor integratie van sequenties in het genoom.

Daarnaast is er een groep van potentieel schadelijke genproducten die niet in een van de hierboven geïdentificeerde groepen valt. Voor deze genproducten moet case-by-case vastgesteld worden of zij potentieel schadelijk kunnen zijn. De triggers die binnen deze groep van genproducten gelden zijn zeer divers. Voor de toepassing van bacteriële genen als donorsequenties in een bacteriële gastheer bijvoorbeeld, zullen andere triggers gelden dan voor sequenties van humane oorsprong gekloneerd in een virale vector.

Voor de triggers die gelden als een indicatie voor schadelijkheid in verschillende contexten was tot nog toe geen duidelijke leidraad beschikbaar. Inmiddels heeft een eerste verkenning van wat er verstaan moet worden onder het begrip 'overige schadelijke genen' (en sequenties), geleid tot de volgende indicatieve lijst van potentieel schadelijke genproducten:

- genproducten betrokken bij pathogenese;
- genproducten en sequenties die een rol hebben in de herrangschikking van het genoom, zoals hierboven genoemd;
- genproducten die een signaalfunctie hebben, zoals immuunmodulatoren, groeifactoren en in het algemeen endocriene factoren;
- genproducten met een functie in de homeostase, oncogenese of apoptose.

Kennis en ervaring met bestaande gegevens (familiarity) hebben bijgedragen aan de totstandkoming van deze lijst.

Belangrijk is dat als een genproduct niet binnen een van de hierboven genoemde categorieën valt er bewijs moet zijn dat een genproduct als niet potentieel schadelijk (onschadelijk) kan worden beschouwd. Dit kan gedaan worden door de beschikbare literatuur hierbij te betrekken. De raadpleging van de beschikbare gegevens zal over het algemeen alleen mogelijk zijn door het doorzoeken van, eventueel gespecialiseerde, literatuur databases. De waarde van de resultaten van zo'n zoekopdracht is afhankelijk van de kwaliteit van de database en de zorgvuldigheid van de zoekopdracht. Bij gebruik van de resultaten in een risicoanalyse moet

daarom steeds worden aangegeven welke zoek sleutel men op welke database heeft toegepast, en moet worden onderbouwd dat de zoek sleutel en de database adequaat waren. In het algemeen is het lastiger om langs deze weg de *afwezigheid* van schadelijke effecten te onderbouwen dan om een geobserveerd effect boven water te halen. Maar als een genproduct nooit in verband is gebracht met een schadelijk effect, terwijl men aannemelijk kan maken dat zo'n effect als het er zou zijn wel geobserveerd zou moeten zijn bijvoorbeeld omdat men er actief naar heeft gezocht, dan is dat een argument om het genproduct onschadelijk te beschouwen.

Stap 2: De genetische en fysiologische context waarin het genproduct tot expressie komt

Als er triggers zijn om een genproduct te beschouwen als potentieel schadelijk, moet vervolgens worden vastgesteld in hoeverre het genproduct in de betreffende gastheer ook als schadelijk moet worden aangemerkt. Dit gebeurt door middel van een risicoanalyse waarbij rekening wordt gehouden met de genetische en fysiologische context waarin het genproduct tot expressie komt. De volgende factoren spelen hierbij een rol:

- De omstandigheden van de expressie van het genproduct, bijvoorbeeld de plaats in het organisme waar de expressie plaatsvindt, of het moment in de celcyclus. Voor, bijvoorbeeld, een genproduct dat onder normale omstandigheden weefselspecifiek tot expressie komt kan het een groot verschil uitmaken als het tot expressie wordt gebracht door een promotor die in alle weefsels werkt; voor een genproduct dat normaliter getimed of na inductie tot expressie komt kan het verschil maken of het achter een constitutieve promotor ligt.
- De mate van expressie van het genproduct is een belangrijke factor. De interpretatie van het risico van hoge expressie, of van onbalans van het natuurlijke expressie niveau, moet worden beoordeeld tegen de achtergrond van het niveau van de expressie onder normale omstandigheden.
- Sommige genproducten krijgen hun fysiologische werking, en daarmee ook hun potentieel schadelijke werking, pas na posttranslationale modificatie, of nadat ze geleid zijn naar het juiste celcompartiment.
- De werkzaamheid van het genproduct in de fysiologische achtergrond van de gastheer. Als voorbeeld: een virulentiefactor afkomstig uit een bepaalde pathogene bacterie zal alleen maar kunnen bijdragen aan de pathogene eigenschappen van de gastheer als de virulentiefactor past in het 'leefpatroon' van de gastheer. In het algemeen: als het genproduct meewerkt aan het optreden van een schadelijk effect als onderdeel van een pathway waarin meerdere genproducten een rol spelen, dan moeten alle onderdelen van de pathway in het ggo aanwezig zijn om het schadelijke effect gerealiseerd te krijgen.

Vaak zal ook voor deze gegevens worden gevraagd om de resultaten van een risicoanalyse te toetsen aan beschikbare empirische gegevens. Dit kan bijvoorbeeld nodig zijn om te onderbouwen dat een verondersteld schadelijke effect, dat onwaarschijnlijk wordt geacht, inderdaad ook niet in de praktijk is waargenomen. Ook hiervoor kan de literatuur geraadpleegd worden maar in dat geval geldt eveneens dat de waarde van de resultaten van zo'n zoekopdracht afhankelijk is van de kwaliteit van de database en de zorgvuldigheid van de zoekopdracht.

4.3 Biologische inperking

Biologische inperking houdt in dat het vermogen van een organisme om te overleven en te verspreiden in het milieu is afgenomen. Deze afname is in sommige gevallen absoluut maar hoeft niet altijd 100% te zijn. Soms kan een gedeeltelijke afname van verspreiding en overleving toch leiden tot voldoende biologische inperking.

In de inschalingsartikelen wordt biologische inperking bij virale vectoren expliciet genoemd (artikel 5.4.2). Ook bij de inschaling van dierproeven in associatie met genetisch gemodificeerde micro-organismen wordt de biologische inperking genoemd (artikel 5.6.2). Opgemerkt moet worden dat ook bij toepassingen van niet-virale genetisch gemodificeerde organismen biologische inperking een rol kan spelen. Dit wordt niet expliciet in de inschalingsartikelen terug gevonden. Biologische inperking voor toepassingen met niet-virale genetisch gemodificeerde organismen kan resulteren in een verlaging van de pathogeniteitsklasse, waardoor inschaling van de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau mogelijk wordt.

Biologische inperking kan op basis van verschillende eigenschappen gerealiseerd worden. Met behulp van onderstaande voorbeelden wordt het begrip biologische inperking geïllustreerd. Deze voorbeelden zijn niet uitputtend, maar geven een beeld van de diversiteit aan eigenschappen en niveaus die een rol spelen bij de biologische inperking. Bij de voorbeelden wordt tussen haakjes aangegeven op basis van welke eigenschappen de biologische inperking gerealiseerd is.

Wanneer een aanvrager zich in zijn risicoanalyse wil beroepen op de biologische inperking dan moet dit onderbouwd worden in de aanvraag zodat deze bij de beoordeling in beschouwing genomen kan worden. Bij deze onderbouwing dient ingegaan te worden op de basis van de biologische inperking en de stabiliteit van de biologische inperking in relatie tot de experimentele context. De onderbouwing moet met behulp van wetenschappelijke literatuur of experimentele gegevens geleverd worden. Verder moet aandacht besteed worden aan de invloed van de genetische modificatie en de omstandigheden waarbinnen het onderzoek wordt uitgevoerd. Een verzoek om voor biologische inperking van een systeem in aanmerking te komen, wordt case-by-case beoordeeld.

Biologische inperking door veranderde genetische samenstelling

- *Escherichia coli K12 (afname van overleving in natuurlijke niche)*
E. coli is een darmbacterie, die onder omstandigheden ziekten kan veroorzaken zoals diarree. Toch wordt een bepaalde stam van deze bacterie, *E. coli K12*, al vele tientallen jaren in grote hoeveelheden in laboratoria gebruikt, zonder dat daar ongelukken uit voortkomen. Het blijkt dat bij deze laboratoriumstam het vermogen is verloren om zich te nestelen in de darm, de eerste voorwaarde voor het ziekteproces. Hetzelfde defect in de stam is ook de oorzaak dat de bacterie de concurrentie met andere bacteriën in de darm niet meer aankan. Het langdurige veilig gebruik en het achterwege blijven van incidenten met *E. coli K12* worden beschouwd als de onderbouwing van de stabiliteit van de biologische inperking.
- *Bacillus subtilis 168 spo⁻ (afname van overleving in voedselarme omgeving)*
B. subtilis stammen worden, net als *E. coli*, veel in het laboratorium gebruikt. *B. subtilis* is een bodemorganisme, dat wanneer in de bodem het voedsel is verbruikt, in staat is om sporen te vormen die onder deze omstandigheden kunnen overleven. Wanneer opnieuw voedsel beschikbaar komt zal het organisme weer kunnen groeien. In het laboratorium wordt gebruik gemaakt van *B. subtilis* stammen die geen sporen vormen zoals *B. subtilis 168 spo⁻*. Deze stammen hebben buiten het laboratorium een sterk verminderde kans om te overleven. De stabiliteit van de biologische inperking van *B. subtilis 168 spo⁻* blijkt uit een langdurige periode van veilig gebruik. Uiteraard is het hierbij van belang dat door de modificatie of de toepassing het *spo⁻* karakter gehandhaafd blijft.
- *Salmonella typhi ΔaroC (groei afhankelijkheid van aromatische aminozuren)*
Auxotrofe micro-organismen kunnen alleen groeien en overleven als er nutriënten aan het kweekmedium zijn toegevoegd die in de mens of in het milieu buiten kweekmedia niet beschikbaar zijn. Het *aroC* gen codeert voor een enzym dat een rol speelt in de biosynthese van aromatische aminozuren. *S. typhi ΔaroC* kan door de *aroC* deletie alleen gekweekt worden als de aromatische aminozuren aan het kweekmedium worden toegevoegd waardoor er sprake is van een biologische inperking. Over het algemeen worden deletiemutanten als stabiel beschouwd. In het voorbeeld van *S. typhi ΔaroC* moet opgemerkt worden dat de groei afhankelijkheid opgeheven kan worden wanneer de *aroC* deletie als selectiemarker wordt gebruikt. In dat geval is er geen sprake meer van een biologisch ingeperkt organisme.
- *Replicatie deficiënt adenovirus (ontbreken functioneel E1 genproduct)*
Adenovirussen zijn voor hun replicatie afhankelijk van een functionele expressie van het E1 gen. In de praktijk worden verschillende adenovirale vectoren toegepast die door een genetische verandering van het virus geen functioneel E1 genproduct tot expressie brengen. Ten gevolge van een E1 deletie ontstaat een replicatie deficiënte vector.

Diverse cellijnen zijn beschikbaar die kunnen compenseren voor E1 waardoor de afwezigheid van dit gen in de vector wordt gecompenseerd. In deze cellijnen is er dus geen sprake van een biologisch ingeperkt gastheer / vector systeem. In cellen waar geen complementatie of recombinatie kan optreden is er sprake van een stabiele biologische inperking vanwege de deletie van het E1 gen. Verschillende cellijnen die in combinatie met een replicatie defectief adenovirus toegepast worden sluiten recombinatie en de vorming van replicatie competente virussen niet uit. De virussen die in deze cellijnen geproduceerd worden, worden niet beschouwd als biologisch ingeperkt. Reden hiervoor is dat de stabiliteit van de biologische inperking onvoldoende gegarandeerd kan worden. Een uitzondering hierop zijn PER.C6 cellen. Aangetoond is dat het gebruik van deze cellen in combinatie met nauwkeurig omschreven E1 gedeleteerde vectoren voor de productie van adenovirale vectoren niet kan leiden tot de vorming van replicatie competent virus.

- *Zelf-inactiverende lentivirale vectoren geproduceerd met derde generatie packaging systemen*
In het derde generatie lentiviraal systeem zijn de virale genen en het transgen over vier afzonderlijke plasmiden verdeeld. Hierdoor wordt de kans verkleind dat er tijdens de productie een replicatiecompetente lentivirale vector gevormd kan worden. Ten gevolge van de deleties van genetisch materiaal is de kans op mobilisatie van de vector uit een getransduceerde cel uitermate klein. Ten opzichte van een wildtype lentivirus (klasse 3) kan de toepassing van derde generatie lentivirale vectoren in celkweek beschouwd worden als biologisch ingeperkt.

Biologische inperking door onderbroken levenscyclus

- *Plasmodium (afwezigheid vector)*
De levenscyclus van *Plasmodium* soorten (veroorzaker van malaria) is afhankelijk van de aanwezigheid van *Anopheles* muggen welke als vector optreden. Van alle *Anopheles* soorten zijn er circa 60 in staat om malaria over te brengen. In Nederland komen van nature vijf anopheline soorten voor waarvan één in staat is om *Plasmodium* soorten over te dragen die bij de mens malaria veroorzaken. Echter voor de ontwikkeling van de betreffende mug is een langere periode nodig met een constante temperatuur (12-20 dagen aaneengesloten periode van 21 °C). Omdat de klimatologische omstandigheden in Nederland hier zelden aan voldoen en omdat de in Nederland voorkomende *Anopheles* soort slechts als een 'slechte' vector fungeert kunnen veel *Plasmodium* soorten als biologisch ingeperkt worden beschouwd. Opgemerkt moet worden dat toekomstige klimaatveranderingen met als mogelijk resultaat een verhoging van de temperatuur in Nederland kunnen leiden tot een situatie waarbij de muggen die *Plasmodium* soorten over kunnen dragen zich in Nederland kunnen handhaven. In dat geval kan er niet langer gesproken worden van een biologische inperking. De stabiliteit van de biologische inperking is in dit geval mede afhankelijk van klimatologische omstandigheden.
- *Baculovirus (afwezigheid geoccludeerd morfotype)*
Uitscheiding van baculovirus na infectie van een gastheercel (*Spodoptera* spp.) vindt plaats in twee verschillende vormen die morfotypen worden genoemd. Het virus is alleen in een door polyhedrine afgesloten vorm (geoccludeerd morfotype) in staat om cellen in het darmstelsel van de natuurlijke gastheer te infecteren. In afwezigheid van polyhedrine wordt het afgesloten morfotype niet gevormd en is het virus niet stabiel genoeg om in het milieu en het darmstelsel van de gastheer te overleven en de natuurlijke gastheer te infecteren. Om deze reden worden vectoren met een polyhedrine deletie beschouwd als biologisch ingeperkt. Door de afwezigheid van polyhedrine is de natuurlijke levenscyclus van het baculovirus onderbroken. Vanwege de deletie van het polyhedrine gen is er sprake van een stabiele biologische inperking. Uiteraard is het hierbij van belang dat door de modificatie of de toepassing de afwezigheid van polyhedrine gehandhaafd blijft.
- *Vaccinatie van proefdieren met plasmide DNA (afwezigheid autonome replicatie)*
Het gebruik van plasmide DNA voor vaccinatie van proefdieren wordt als biologisch ingeperkt beschouwd mits het plasmide geen virale onderdelen bevat anders dan bijvoorbeeld de CMV promotor, HSV-tk gen of SV-40 ori. In het geval dat een SV-40 ori

aanwezig is in het plasmide moet uitgesloten worden dat de proefdieren geïnfecteerd zijn met SV-40 virus. Uiteraard moet bij de beoordeling van de biologische inperking rekening gehouden worden met de gekloneerde sequenties. Als deze aanleiding kunnen geven tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes is er niet langer sprake van een biologische inperking.

- *Ficus carica* (afwezigheid bestuiver)
Het merendeel van de *Ficus* soorten komt voor in (sub)tropische gebieden. De meerderheid van deze planten kan in Nederland niet overleven in het milieu. Een uitzondering hierop is *F. carica* die in Nederland kan overleven en zelfs tot bloei kan komen. Echter voor bestuiving van *F. carica* is een vijgwesp nodig die in Nederland niet overleefd ten gevolge van de relatief lage temperatuursomstandigheden. Met betrekking tot de stabiliteit van de biologische inperking geldt hierbij, evenals bij het beschreven *Plasmodium* voorbeeld dat eventuele klimatologische veranderingen hier van grote invloed kunnen zijn.
- *Ashbya gossypii* (afwezigheid gastheerplant en vector)
Ashbya gossypii is een plantenpathogeen dat ziekte veroorzaakt op katoen. Katoenplanten komen in Nederland niet voor. Hierdoor is groei en sporulatie op katoenplanten uitgesloten. Verspreiding van sporen van *A. gossypii* is afhankelijk van een vector, namelijk insecten (*Leptoglossus species*) die evenals de gastheerplant niet in Nederland zijn waargenomen. Vanwege het niet voorkomen in het Nederlandse milieu van zowel de gastheer (katoenplant) als de vector (*Leptoglossus species*) kan *A. gossypii* beschouwd worden als een biologisch ingeperkt organisme.
- *Ustilago maydis* (afwezigheid gastheerplant)
In het laboratorium kan *Ustilago maydis*, in afwezigheid van de plant, maar een beperkt deel van zijn levenscyclus volbrengen. Haploïde basidiosporen kunnen onder laboratorium omstandigheden worden gekweekt. Echter, doordat versmelting van de haploïde basidiosporen onder deze condities niet op kan treden, worden geen diploïde teliosporen gevormd waarmee de levenscyclus van de schimmel is onderbroken. Geconcludeerd kan worden dat *U. maydis* in afwezigheid van de plant beschouwd kan worden als biologisch ingeperkt.

4.4 Eigenschappen van de plantensoort

De term 'eigenschappen van de plantensoort' wordt genoemd in inschalingsartikel 5.5.1.b ten behoeve van de inschaling van bloeiende genetisch gemodificeerde planten in PK-I of PK-II. Met eigenschappen van de plantensoort worden de intrinsieke planteigenschappen bedoeld, die een rol kunnen spelen bij de verspreiding en vermeerdering van de betreffende soort. Omdat de wijze van verspreiding en vermeerdering per soort kan verschillen, moet dit per plantensoort geïnventariseerd worden. Hierbij moet in ieder geval gedacht worden aan de volgende planteigenschappen:

- de voortplantingswijze: generatief en/of vegetatief en welke plantenstructuren spelen hierbij een rol. Denk hierbij aan vegetatieve plantenstructuren zoals knollen, wortelstokken en scheuten, als wel aan de generatieve structuren, te weten pollen en zaden.
- de bestuivingswijze: planten kunnen strikte zelfbevruchters zijn, waarbij de mogelijkheid van pollenverspreiding of kruisbevruchting minimaal is. In tegenstelling tot strikte zelfbevruchters kan bij kruisbevruchters pollenverspreiding plaatsvinden via wind en/of insecten;
- het bloeiseizoen;
- het voorkomen van kruisbare verwanten in de Nederlandse flora en hun bloeiseizoen;
- de zaadkarakteristieken: hierbij kan gedacht worden aan de grootte, vorm, verspreidingswijze, vastzadigheid waarbij de uitgangsgedachte moet zijn 'hoe gemakkelijk verspreidt het zaad zich ongemerkt'.

Op grond van deze planteigenschappen kan een risicoanalyse opgesteld worden op basis waarvan bepaald kan worden in welke plantenkas (PK-I of PK-II) de betreffende plantensoort gekweekt mag worden.

Als vuistregel kan gesteld worden dat strikte zelfbevruchters in PK-I kassen geteeld mogen worden, waarbij teelt in de volle grond mogelijk is. Kruisbevruchters die via insecten bestoven worden, moeten echter in PK-II kassen worden geteeld, omdat deze kassen insectendicht ingericht zijn. Voor planten waarvan pollen, zaden en vegetatieve plantendelen ongemerkt kunnen verspreiden, zullen aanvullende voorschriften benodigd zijn.

Van een groot aantal plantensoorten zijn de planteigenschappen reeds geïnventariseerd en is vastgesteld onder welke inperkende maatregelen de genetisch gemodificeerde planten geteeld moeten worden. Deze plantensoorten staan vermeld in het document 'Lijst van inhullingsverplichtingen' die te vinden is op de site www.vrom.nl/ggo-vergunningverlening. Van de op deze lijst vermelde planten is het niet meer nodig dat de aanvrager gegevens aanlevert betreffende bovenbedoelde planteneigenschappen. Inschaling van de werkzaamheden met de betreffende plantensoort gebeurt op basis van deze lijst.

4.5 Aërogene verspreiding

Ook bij de inschaling van handelingen met genetisch gemodificeerde micro-organismen in associatie met bijvoorbeeld planten of dieren speelt de kans op verspreiding van het ggo een belangrijke rol. In het bijzonder moet de kans op aërogene verspreiding beoordeeld worden. Aërogene verspreiding wordt enerzijds bepaald door de kenmerken van het ggo. Anderzijds kunnen werkzaamheden met ggo's in associatie met bijvoorbeeld planten of dieren juist leiden tot aërogene verspreiding. Wanneer bij deze werkzaamheden de kans op aërogene verspreiding aanwezig is kan besloten worden hoger in te schalen dan op basis van de inschaling van het ggo onder laboratorium-omstandigheden verwacht zou worden.

Zo kan de situatie zich voordoen dat een ggo onder laboratorium omstandigheden op ML-II niveau is ingeschaald maar dat bij handelingen in associatie met planten of dieren de kans op verspreiding in het milieu vergroot is. Om deze reden zullen deze handelingen met het ggo op een hoger inperkingsniveau (niveau III) ingeschaald worden (5.5.2 en 5.6.2). Hiermee kan de kans op verspreiding in het milieu gereduceerd worden doordat de inrichtingsvoorschriften de noodzakelijke inperking opleveren.

Twee voorbeelden waar de bovenstaande situatie zich in de praktijk voordoet betreffen het gebruik van de schimmel *Fusarium oxysporum* in associatie met planten en adenovirussen in associatie met proefdieren. De inschaling voor het gebruik van genetisch gemodificeerde *F. oxysporum* onder laboratoriumomstandigheden is ML-II (met gebruik van veiligheidskabinet). Besmette planten moeten op PKM-III/PCM-III niveau worden gehanteerd, vanwege de mogelijkheid dat aërogene verspreiding van sporen optreedt. Voor handelingen met genetisch gemodificeerde adenovirussen in combinatie met proefdieren gelden overeenkomstige inschalingsartikelen. Werkzaamheden onder laboratoriumomstandigheden worden ingeschaald op ML-II. Echter bij handelingen met genetisch gemodificeerde adenovirussen in associatie met grote proefdieren, die niet gehuisvest kunnen worden in filtertopkooien, is er een kans op aërogene verspreiding. Hierdoor volstaat een inschaling op DM-II niet om verspreiding in het milieu te reduceren en volgt een inschaling op DM-III.

5. Toelichting op de wijziging van bijlage 8

Bijlage 8 voorziet in voorschriften ten behoeve van de opslag van afval dat ggo's bevat of kan bevatten, buiten een geclassificeerde ruimte. Uit de oude bijlage kon niet duidelijk worden opgemaakt om welk type afval het gaat. Bijvoorbeeld opslag van afval van planten of dieren in associatie met genetisch gemodificeerde micro-organismen was niet duidelijk verwoord. Daartoe is in de nieuwe bijlage 8 een uitsplitsing gemaakt naar het type laboratorium waaruit het afval afkomstig is. Per type laboratorium worden nagenoeg dezelfde voorschriften, of soepelere voorschriften, gesteld als in de oude bijlage 8.

De in de nieuwe bijlage 8 opgenomen voorschriften zijn overgenomen uit het COGEM-advies van 31 augustus 2005 (kenmerk CGM/050831-01). Dit advies bevat ook voorschriften voor afval afkomstig uit de ML-III/-IV, DM-III/-IV, PCM-III/-IV en PKM-III/-IV geclassificeerde ruimten, maar omdat afval uit deze ruimten binnen de betreffende ruimte opgeslagen moet worden, passen deze voorschriften niet in bijlage 8. Deze bijlage betreft uitsluitend de opslag van afval buiten de geclassificeerde ruimten en dat is met de wijziging van de titel ook expliciet aangegeven. Overigens zijn voorschriften voor afval afkomstig uit D-I niet in bijlage 8 opgenomen, omdat kadavers niet voldoen aan de definitie van een ggo en daarmee niet onder het Besluit ggo vallen.