



Ministerie van Infrastructuur
en Waterstaat

Biotechnologie en veiligheid

Tien onderzoeken naar nieuwe
technieken, hun risico's en gevaren

Virussen tegen kanker

Nuttige schimmels

Potato, patato

*“Het afgelopen decennium zorgde CRISPR-Cas
voor een ware revolutie in biotechnologieland”*

Inhoud

04	Voorwoord
05	Op verkenning Tien onderzoeken naar biotechnologie en veiligheid
08	Samen werken aan bioveiligheid Het project T-TRIPP
11	Virussen tegen kanker Oncolytische viro-immunotherapie
15	Beloftevolle nieuwe mRNA vaccins Het project RepliSAFE
17	Klonterende eiwitten Risico's van blootstelling aan amyloïde fibrillen
20	Veilig herontwerp van <i>Pseudomonas putida</i> Het project SafeChassis
23	Samen <i>gene editing</i> verkennen Kansen en veiligheid van nieuwe genmodificatietechnieken
26	Vreemde genen in het milieu Overdracht van genetische informatie in de natuur
29	Nuttige schimmels Op weg naar veilige toepassingen van CRISPR-Cas9
33	Potato, patato Nieuwe aardappelrassen met <i>gene editing</i>
35	CRISPR-Cas: precies pas? De effectiviteit van <i>gene editing</i> in planten
38	Wie is wie in biotechnologie?
39	Colofon

Voorwoord

Met trots presenteer ik u deze speciale uitgave over het onderzoeksprogramma Biotechnologie en Veiligheid. In dit magazine nemen we u mee in de wondere wereld van nieuwe en innovatieve biotechnologie en leest u meer over de tien onderzoeken die het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW) sinds 2016 heeft laten doen naar de risico's voor mens en milieu hiervan.

De prettige, jarenlange samenwerking tussen het ministerie van IenW, het domein Toegepaste en Technische Wetenschappen van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), binnen- en buitenlandse universiteiten en onderzoeksinstituten, het bedrijfsleven en andere partners onderstreept het belang van het programma voor de Nederlandse samenleving. Maar wat maakt dat dit zo'n belangrijk programma is, vraagt u zich misschien af? Misschien herinnert u zich nog wel de nieuwe en Nobelprijswinnende techniek CRISPR-Cas, die in 2013 werd ontdekt. Het afgelopen decennium zorgde dit voor een ware revolutie in biotechnologieland. Erfelijke informatie zoals DNA en RNA kon opeens met chirurgische precisie worden aangepast. Waar vroeger grote delen van het DNA moesten worden bestraald of met recombinante technieken worden verwijderd of verdubbeld, kunnen biotechnologen nu één puntmutatie maken exact daar waar het nodig is.

Ingewikkelde materie en voor de meeste mensen lastig te begrijpen. Logisch dat er in de maatschappij zorgen zijn over de risico's en de gevolgen van deze nieuwe gentechnieken voor mens en milieu. Daarom heeft het ministerie hier onderzoek naar laten doen. Naast onderzoek naar de risico's zijn er ook innovatieve onderzoeken gedaan. Denk aan het kweken van aard-appels die niet meer vatbaar zijn voor schimmels. Een nieuwe industriële bacterie die volledig uit veilige onderdelen is opgebouwd. Of nieuwe vaccins en virussen die kankercellen aanvallen.

In dit magazine is geprobeerd om in begrijpelijke taal uit te leggen wat de onderzoeken hebben opgeleverd voor biotechnologie en de risico's ervan. Ik heb het in ieder geval met plezier en verwondering gelezen en ik hoop dat u dit ook doet.

Vivianne Heijnen
Staatssecretaris van Infrastructuur en Waterstaat

Bewust omgaan met veiligheid

De Rijksoverheid werkt aan de veiligheid en gezondheid van iedereen in Nederland. Dat doet de Rijksoverheid samen met bedrijven en burgers. Ook op het gebied van de leefomgeving. Denk dan aan waterveiligheid, verkeersveiligheid of het voorkomen van milieuschade.



Op verkenning

Van nieuwe behandelingen van kanker tot landbouwgewassen die beter bestand zijn tegen droogte: de verwachtingen van de moderne biotechnologie zijn hooggespannen. De biotechnologie doet ons al langer versteld staan.

Denk aan Dolly het gekloonde schaap en stier Herman in de jaren '90, of de razendsnelle ontwikkeling van coronavaccins.

Maar de laatste jaren zijn de ontwikkelingen nog meer in een stroomversnelling geraakt. Nieuwe technieken zoals *gene editing* maken het steeds eenvoudiger om het erfelijk materiaal van organismen te ontcijferen, aan te passen of zelfs helemaal opnieuw te bouwen. Het brengt een heel scala aan nieuwe toepassingen in het vizier.

Maar wat komt er op ons af als deze nieuwe technieken grootschalig gebruikt gaan worden? Hoe beoordeel je de mogelijke risico's van nieuwe toepassingen? En hoe ga je om met ontwikkelingen in de toekomst? De Trendanalyse Biotechnologie van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) en de Gezondheidsraad stelde in 2016 vast dat meer inzicht nodig was in de kansen en risico's van de razendsnelle ontwikkelingen in de biotechnologie. Mede daarom liet het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW) in samenwerking met het NWO-domein Toegepaste en Technische Wetenschappen (TTW) tien onderzoeken naar de mogelijke risico's en veiligheidsaspecten van nieuwe biotechnologie uitvoeren. De projecten onderzochten de veiligheid van nieuwe technieken zoals CRISPR-Cas in opkomende toepassingsgebieden. Denk aan de ontwikkeling van nieuwe vaccins, de productie van chemicaliën uit hernieuwbare grondstoffen en plantveredeling. Dit magazine brengt de uitkomsten van deze tien onderzoeken samen.

10 keer biotechnologie en veiligheid

Het onderzoeksprogramma Biotechnologie en Veiligheid was bedoeld om meer inzicht op te doen over de risico's en onzekerheden rond moderne biotechnologie. Welke nieuwe veiligheidsvragen nemen de nieuwe gentechnieken met zich mee? Hoe nauwkeurig zijn nieuwe gentechnieken zoals CRISPR-Cas nou precies? Heeft het knippen en plakken van erfelijk materiaal ook onbedoelde effecten, en wat zijn daar dan de mogelijke gevolgen van? Met welke methoden zou je die vragen kunnen onderzoeken? En welke maatregelen zou je kunnen nemen op basis van de bevindingen?

Hoe beoordeel je de mogelijke risico's van nieuwe toepassingen?

De onderzoeksprojecten belichtten deze vragen vanuit verschillende invalshoeken. Zo onderzocht een onderzoeksteam onder leiding van moleculair biotechnoloog Gilles van Wezel de mogelijke overdracht van genetische informatie door micro-organismen in de natuur: kunnen genetische eigenschappen zoals bijvoorbeeld antibioticaresistentie van het ene micro-organisme op het andere worden overgedragen? Wat betekent dat voor veiligheidsmaatregelen in omgevingen waar met micro-organismen wordt gewerkt? Een ander project, geleid door viroloog Ron Fouchier, verkende de veiligheidsvraagstukken bij de milieurisicobeoordeling van genetisch gemodificeerde virussen die

gebruikt worden voor oncolytische viro-immunotherapie. Dat is een nieuwe benadering voor behandeling van kanker die de laatste jaren sterk in opmars is. En het project onder leiding van industrieel biotechnoloog Vitor Martins dos Santos verkende de mogelijkheid om veiligheidsmechanismen in te bouwen in industriële micro-organismen, zodat ze zich niet in de natuur kunnen verspreiden. Andere projecten onderzochten mogelijke onverwachte effecten van de toepassing van CRISPR-Cas (de zogeheten *off-target* mutaties), de voorwaarden voor veilige toepassing van *gene drives*, de veiligheid van een nieuw soort vaccins, en de risico's van blootstelling aan amyloïde fibrillen (dat zijn dunne eiwitvezeltjes die ontstaan als eiwitten op een verkeerde manier vouwen en in het menselijk lichaam kunnen neerslaan).

Wat de onderzoekers precies vonden, leest u in de verhalen van dit magazine.

Gene editing: erfelijk materiaal knippen en plakken met CRISPR-Cas

CRISPR-Cas is een afweermecanisme dat van nature voorkomt in bacteriën. Door een stukje genetisch materiaal van een binnendringend virus over te nemen in het eigen DNA, kan de bacterie het indringende virus een volgende keer herkennen en het DNA van het virus kapot knippen. Dit natuurlijke afweersysteem vormde de inspiratie voor de CRISPR-Cas-techniek. CRISPR staat voor *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*, en Cas staat voor *CRISPR-associated genes and proteins*. Het CRISPR-Cas-systeem knipt op een precies bepaalde plek in het DNA van een cel. Zo kunnen bepaalde eigenschappen van een organisme heel nauwkeurig worden aangepast. De eerste praktische toepassing van de CRISPR-Cas techniek is in 2012 beschreven. Het wetenschappelijke vakblad *Science* noemde *gene editing* in 2015 de doorbraak van het jaar. In een paar jaar tijd heeft de CRISPR-Cas techniek zich ontwikkeld tot standaardtechniek voor aanpassing van erfelijk materiaal in laboratoria en bedrijven over de hele wereld.

Samen werken aan veilige biotechnologie

Het onderzoeksprogramma was niet alleen bedoeld om wetenschappelijke gegevens boven tafel te krijgen, maar ook om bewustwording te creëren. Het daagde onderzoekers uit om mee te denken met de risicobeoordeling van nieuwe toepassingen van biotechnologie. Een van de uitgangspunten van het programma was dat onderzoekers, risicobeoordelaars en beleidsmakers elkaar nodig hebben om de veiligheid van nieuwe gentechnieken te beoordelen. Onderzoekers zitten dicht op het vuur van de razendsnelle ontwikkelingen. Zij kunnen de kennis aanleveren die nodig is voor de beoordeling van veiligheid. Andersom kunnen risicobeoordelaars aangeven welke gegevens nodig zijn om de veiligheidsvragen te beantwoorden.

Kennisuitwisseling tussen alle betrokkenen was daarom een belangrijk thema in het onderzoeksprogramma. Het was een stimulans voor onderzoekers om veiligheidsoverwegingen al vanaf de onderzoeksopzet in het onderzoek mee te nemen. Dat bood de projecten meteen een uitdaging: want hoe doe je onderzoek naar de veiligheid van nieuwe technieken? Hoe moet die kennisuitwisseling vorm krijgen, en wat is daar voor nodig? Dat was nog grotendeels onontgonnen gebied. De uitwisseling van kennis kreeg op verschillende manieren vorm.

Ten eerste dachten betrokkenen in de loop van het onderzoek mee met de onderzoekers in zogeheten 'gebruikerscommissies'. Gebruikerscommissies zijn netwerken van betrokken partijen die samen ideeën uitwisselen over de voortgang van het onderzoek en mogelijkheden voor valorisatie. Met deze gebruikerscommissies stimuleert NWO de uitwisseling tussen stakeholders in de onderzoeksprojecten. In de gebruikerscommissies zaten vertegenwoordigers van IenW, het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), maatschappelijke partijen en het bedrijfsleven. Daarmee werd het verzamelen en bespreken van kennis voor de risicobeoordeling een terugkerend thema in de projecten.

Ten tweede richtte het T-TRIPP project, een gezamenlijk project van het Rathenau Instituut en de TU Delft, zich specifiek op de kennisuitwisseling die nodig is voor de vroegtijdige beoordeling van nieuwe gentechnieken. T-TRIPP had een sociaalwetenschappelijke insteek. Het project bracht het netwerk van betrokkenen rondom biotechnologie en veiligheid in kaart en ontwikkelde instrumenten om het onderlinge leerproces tussen stakeholders te stimuleren en te begeleiden.

Puzzelstukjes

Als we naar de uitkomsten van het programma als geheel kijken, dan zien we dat elk van de projecten een stukje van de puzzel heeft verzameld die gelegd moet worden voor de veilige toepassing van moderne biotechnologie. De projecten hebben nieuwe inzichten opgeleverd in de kansen en risico's van nieuwe gentechnieken. In ieder geval geeft geen van de projecten aanleiding om alarm te slaan over de veiligheid van biotechnologie: uit het onderzoek naar onbedoelde gevolgen van *gene editing* blijkt dat CRISPR-Cas een effectieve en efficiënte manier is om organismen aan te passen, zonder zorgwekkende of onvoorspelbare bijeffecten. Ook zijn geen tekortkomingen in de huidige risicobeoordeling ontdekt. De beoordeling van de veiligheid van nieuwe biotechnologische toepassingen is

op dit moment op orde. Wel benadrukken de uitkomsten van enkele projecten dat waakzaamheid geboden is: kennisuitwisseling tussen onderzoekers, risicobeoordelaars en beleidsmakers blijft nodig zodat de risicobeoordeling de snelle ontwikkelingen kan bijhouden.

Een complicerende factor is dat een deel van de onderzoekers niet blij is met de huidige ggo-regelgeving. Ze willen verder met hun onderzoek, en ervaren de ggo-regelgeving als een onnodige belemmering. Volgens deze onderzoekers staat de regelgeving nuttige innovaties in de weg, zonder dat de veiligheid erbij gebaat is. Deze onvrede komt in enkele van de verhalen in dit magazine heel duidelijk naar voren. Ook op dat gebied is meer uitwisseling van kennis en ervaringen nodig, zodat betrokkenen beter van elkaar kunnen leren hoe de regelgeving tot stand komt en welke veranderingen wenselijk en haalbaar zijn. Voor de plantenbiotechnologie is dit een actueel thema: de Europese Commissie komt naar verwachting in de loop van 2023 met een voorstel voor nieuwe wetgeving. Juist nu is het van belang dat Nederlandse onderzoekers, beleidsmakers, risicobeoordelaars en andere betrokkenen met elkaar in gesprek blijven.

Structurele kennisuitwisseling

Het onderzoeksprogramma Biotechnologie en Veiligheid is inmiddels afgerond, maar daarmee is het werk nog niet gedaan. De inzichten uit het programma helpen beleidsmakers en risicobeoordelaars om de snelle ontwikkelingen in de biotechnologie bij te houden. Vooral de kennisuitwisseling is een aandachtspunt voor beleidsmakers. De gebruikerscommissies bieden aanknopingspunten om die kennisuitwisseling te versterken. De ervaringen met de gebruikerscommissies zijn goed bevallen: het verkennen van veiligheidsvraagstukken gedurende het onderzoek levert nuttige kennis op om de mogelijke risico's van nieuwe technieken vroegtijdig op te sporen en aan te pakken. Onderzoekers en risicobeoordelaars pleiten er dan ook voor om deze kennisuitwisseling structureler mee te nemen in de opzet van nieuwe onderzoeksprojecten. Zo zetten ze het gesprek voort om alle stukjes van de puzzel in elkaar te passen.

Drie kleuren biotechnologie: rood, wit en groen

Biotechnologie wordt in uiteenlopende toepassingen gebruikt, van medicijnontwikkeling tot industriële productie. Biotechnologen gebruiken verschillende kleuren om een onderscheid te maken tussen de toepassingsgebieden. In het onderzoeksprogramma Biotechnologie en Veiligheid kwamen drie toepassingsgebieden aan bod: rood, wit en groen.

De rode biotechnologie is gericht op de gezondheidszorg.

Denk aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, vaccins, gentherapieën of diagnostiek. De mogelijkheid om ernstige ziektes te genezen of zelfs te voorkomen is een belangrijke drijfveer voor de rode biotechnologie. Tegelijkertijd roept de toepassing van biotechnologie in de gezondheidszorg principiële ethische vragen op, omdat het om ingrijpen in menselijk leven en mogelijk overerfbare eigenschappen gaat. In de rode biotechnologie speelt de afweging tussen de mogelijke gezondheidswinst van patiënten en de gevolgen voor de bredere samenleving en het milieu een grote rol.



De witte biotechnologie is gericht op industriële productie.

De witte biotechnologie maakt gebruik van micro-organismen zoals bacteriën, gisten of algen om grondstoffen om te zetten tot producten. De witte biotechnologie staat de laatste jaren veel in de aandacht vanwege de mogelijkheid om groene grondstoffen te gebruiken voor de productie van chemicaliën, bioplastics en energie. Dit zou kunnen bijdragen aan het verminderen van onze afhankelijkheid van fossiele grondstoffen.



De groene biotechnologie is gericht op de landbouw en voedselvoorziening.

Denk aan de genetische modificatie van landbouwgewassen om ze beter bestand te maken tegen ziekte, droogte of verzilting, of aan de genetische modificatie van dieren om ze sneller te laten groeien. Omdat het gaat over modificatie van planten en dieren, roept de groene biotechnologie – net als de rode – principiële ethische vragen op. Dat uit zich in het maatschappelijke debat over de groene biotechnologie dat al sinds de jaren '90 gevoerd wordt.



Over de witte biotechnologie is minder maatschappelijke discussie: de genetische modificatie van micro-organismen roept minder vragen op dan bij planten, dieren of mensen. Daarnaast vinden veel van de toepassingen in gesloten systemen plaats. Daardoor zijn er minder zorgen over de controleerbaarheid van deze toepassingen dan bij de groene biotechnologie.



Het project T-TRIPP

Samen werken aan bioveiligheid

Hoe kunnen onderzoekers en risicobeoordelaars beter samenwerken aan een goede risicobeoordeling van nieuwe toepassingen van biotechnologie? Dat was de hoofdvraag in het T-TRIPP project, een gezamenlijk onderzoek van het Rathenau Instituut en de TU Delft.

De ontwikkelingen in de moderne biotechnologie gaan ontzettend snel. Biotechnologen kunnen organismen steeds nauwkeuriger aanpassen. Daarmee komt een heel scala aan nieuwe toepassingen in zicht, van nieuwe vaccins tot sterkere gewassen. Maar die nieuwe toepassingen kunnen pas op de markt komen als ze bewezen veilig zijn. Dat vraagt om een goede inschatting van de mogelijke risico's voor mens en milieu.

Onzekerheden rond de beoordeling van risico's vragen om intensieve kennisuitwisseling

Voor nieuwe toepassingen kan de risicobeoordeling soms best lastig zijn, bijvoorbeeld omdat gegevens ontbreken of de toepasbaarheid van bestaande methodes nog niet vaststaat. Die onzekerheden rond

de risicobeoordeling vragen om intensieve kennisuitwisseling en interactie tussen onderzoekers en risicobeoordelaars. Het T-TRIPP-project (*Tools for Translation of Risk research into Policies & Practices*) onderzocht hoe de verschillende instanties die betrokken zijn bij de uitvoering van het bioveiligheidsbeleid op een effectieve manier van elkaar kunnen leren over de risico's van nieuwe biotechnologie. De onderzoekers brachten de beleidsuitvoering rondom biotechnologie en veiligheid in kaart en voerden gesprekken met onderzoekers, bioveiligheidsfunctionarissen, risicobeoordelaars en beleidsmakers. Ze gebruikten de bevindingen om instrumenten te ontwikkelen voor kennisuitwisseling tussen onderzoekers en risicobeoordelaars. Zo ontwikkelden ze een protocol voor kennisuitwisseling en twee *serious games* (spellen die niet alleen gericht zijn op puur vermaak, maar ook een serieus doel hebben zoals kennisuitwisseling of onderwijs).

Veranderende rollen en verantwoordelijkheden

Op basis van de literatuurstudie, gesprekken met betrokkenen en workshops concludeert het Rathenau Instituut dat het biotechnologisch onderzoek de laatste jaren op afstand is komen te staan van het toelatingssysteem voor activiteiten met moderne biotechnologie. Het rapport 'Samen voor bioveiligheid – Vier manieren om beleidsuitvoering te versterken' beschrijft de historische ontwikkelingen van de interacties tussen alle betrokkenen rondom bioveiligheid, het zogeheten *governance-ecosysteem*.

In de jaren zeventig was volgens de onderzoekers de verantwoordelijkheid voor bioveiligheid binnen biotechnologisch onderzoek volledig belegd bij de onderzoeker. Na deze eerste jaren van zelfregulering door de wetenschap werd in de periode tussen 1980 en 2010 bioveiligheid steeds meer een maatschappelijk en politiek thema. Dat leidde tot een toename van regulering. De rollen van de betrokkenen veranderden: zo groeide de verantwoordelijkheid van de overheid voor bioveiligheid, terwijl die van onderzoekers juist afnam. De laatste jaren staat deze verdeling van rollen en verantwoordelijkheden opnieuw ter discussie.

Biotechnologisch onderzoek is de laatste jaren op afstand komen te staan van het toelatingssysteem

Vertaalslag tussen wetenschap en beleid

In de praktijk is de verantwoordelijkheid voor de veiligheid voor een groot deel belegd bij de bioveiligheidsfunctionarissen van universiteiten en onderzoeksinstituten, die toezicht houden op het werken met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's, zie kader). Onderzoekers worden door de tussenkomst van de bioveiligheidsfunctionarissen ontzorgd. Zij kunnen zich vooral richten op de ontwikkeling van nieuwe toepassingen. Dit sluit aan bij het huidige wetenschapsbeleid, dat vooral nieuw en innovatief onderzoek stimuleert. Maar het gevolg van deze nadruk op innovatief onderzoek

is dat onderzoekers minder aandacht hebben voor de kennis die nodig is om de risico's van nieuwe biotechnologie adequaat te beoordelen.

Volgens de onderzoekers van het T-TRIPP project zijn biotechnologen door de rollenscheiding minder goed op de hoogte van de praktijk van risicobeoordeling en veiligheidsbeleid. Daarmee is het voor biotechnologen lastig om een rol te spelen in de uitvoering van het bioveiligheidsbeleid, terwijl juist zij belangrijke kennis kunnen leveren. Op deze manier wordt er te weinig kennis opgebouwd die van belang is voor de beoordeling van bestaande en nieuwe risico's. Een mogelijk gevolg hiervan is dat op den duur de risico's van nieuwe biotechnologische ontwikkelingen niet meer adequaat beoordeeld kunnen worden. Kennisopbouw over de risico's moet gelijk opgaan met de biotechnologische ontwikkelingen, zodat de risicobeoordeling de ontwikkelingen kan blijven bijbenen. Het Rathenau-rapport biedt opties om de uitvoering van het bioveiligheidsbeleid toekomstbestendig te maken.

Risicobeoordeling van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's)

Het veiligheidskader voor activiteiten met ggo's is vastgelegd in Europese en Nederlandse regelgeving. Dit kader staat activiteiten met ggo's alleen toe als de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Er zijn verschillende regels voor activiteiten met ggo's, afhankelijk van de toepassing. Activiteiten binnen een ingeperkte ruimte, zoals een laboratorium, kas of dierverblijf, vallen onder de regelgeving voor 'ingeperkt gebruik' (IG). Onderzoekers moeten een kennisgeving doen of een vergunning aanvragen om met ggo's te mogen werken. Ze moeten een risicobeoordeling uitvoeren en het veiligheidsniveau van de activiteiten met de ggo's bepalen voordat ze mogen beginnen. Een toegelaten bioveiligheidsfunctionaris (BVF) van de instelling houdt toezicht op het veilig werken met de ggo's.

Bij werkzaamheden die buiten een ingeperkte ruimte plaatsvinden, zoals veldproeven of genterapie bij patiënten, is er sprake van 'introductie in het milieu' (IM). Voor activiteiten met ggo's onder IM moeten onderzoekers een milieurisicobeoordeling uitvoeren en een vergunning aanvragen. Een toegelaten milieuveiligheidsfunctionaris (MVF) van de universiteit houdt toezicht op het veilig werken met de ggo's.

Voor commerciële toepassingen is een markttoelating nodig. Een marktaanvraag legt alle gegevens vast die onder IG en IM zijn verzameld. Alle Europese lidstaten beoordelen de marktaanvraag. De Europese Commissie neemt het besluit over de markttoelating.

Protocol voor kennisuitwisseling

T-TRIPP ontwikkelde een protocol voor kennisuitwisseling en twee *serious games*. Dat protocol geeft handen en voeten aan de

kennisuitwisseling tussen onderzoekers, risicobeoordelaars en beleidsmakers die nodig is voor het functioneren van het *governance-ecosysteem*.

Het T-TRIPP-protocol beschrijft een werkvorm voor kennisuitwisseling tussen onderzoekers, risicobeoordelaars, beleidsmakers en andere betrokkenen. Het protocol kan onderzoekers handvatten geven om in gesprek te gaan over hun onderzoek en de onzekere risico's die daarmee gepaard gaan. Wanneer is een risico aanvaardbaar? Waar zitten kennisleemtes? Hoe kunnen we die leemtes opvullen, en wie hebben we daarvoor nodig? Deze informatie biedt nieuwe inzichten voor risico-beoordeling en beleid.

Spelen met perspectieven

De *serious games* van T-TRIPP zijn ontwikkeld om onderzoekers en beleidsmakers kennis te laten maken met de verschillende rollen in het *governance-ecosysteem*.

In het spel *MachiaCelli* ervaren onderzoekers en beleidsmakers hoe het is om aan de andere kant van de tafel te zitten. Spelers ervaren de ontwerp- en uitvoeringsfase van een biotechnologieproject vanuit het perspectief van wetenschappers, beleidsmakers en risicobeoordelaars. Samenwerking brengt communicatiebarrières aan het licht en biedt ruimte om te werken aan mogelijke oplossingen.

Het spel *Cards voor Biosafety* is bedoeld om junior onderzoekers kennis te laten maken met bioveiligheid. Spelenderwijs leren de deelnemers over de risico's van biotechnologisch onderzoek en veiligheidsmaatregelen. Het spel begint met een bepaald bioveiligheidsscenario uit de praktijk van biotechnologie, zoals een genetisch gemodificeerd organisme dat uit het lab ontsnapt. De spelers trekken elk zes kaarten waar mogelijke bioveiligheidsrisico's op staan. Ze kiezen individueel welk risico de grootste kans heeft, en moeten deze keuze beargumenteren. Op vijf andere willekeurig getrokken kaarten per speler staan mogelijke oplossingen of maatregelen die de kans op het risico kunnen verkleinen

of de negatieve gevolgen ervan kunnen beperken. Ook hier kiest iedere speler een oplossing die het beste past bij het eerder gekozen risico. De kaarten kunnen zowel serieuze als grappige risico's en oplossingen bevatten. Uiteindelijk moeten de spelers stemmen op elkaars oplossingen. Na afloop evalueren de spelers het verloop van het spel en de uitkomsten met elkaar.

Al spelend leren de deelnemers veel over de mogelijke risico's en vooral van elkaar

Dit spel is tijdens de ontwikkeling getest door studenten, risicobeoordelaars van het RIVM en bioveiligheidsfunctionarissen. De reacties waren zeer positief. Door de verscheidenheid aan scenario's, risico's en voorgestelde oplossingen ontstaat een boeiende discussie over mogelijke risico's en maatregelen in de biotechnologie. Met name het verzinnen van argumenten voor keuzes in het spel bleek een stimulans om creatief te denken. Al spelend leren de deelnemers veel over de mogelijke risico's en maatregelen, vooral van elkaar.

Cards for Biosafety is verstuurd naar een groot aantal bioveiligheidsfunctionarissen en andere professionals in binnen- en buitenland. Tot nu toe zijn meer dan honderd *Cards for Biosafety*-spellen in gebruik bij organisaties, onderzoeksinstituten en bioveiligheidsexperts in zestien landen.

Gesprek en uitwisseling

Het T-TRIPP project vroeg de onderzoekers binnen het programma Biotechnologie en Veiligheid ook naar hun ervaringen met de zogeheten 'gebruikerscommissies'. Uitwisseling tussen belanghebbenden in deze gebruikerscommissies was een belangrijk onderdeel van alle projecten in het onderzoeksprogramma.

De kennisuitwisseling in de gebruikerscommissies vergemakkelijkt het wederzijds leerproces tussen onderzoekers, risicobeoordelaars en beleidsmakers. Onderzoekers omschreven de interactie met de risicobeoordelaars en beleidsadviseurs van COGEM en Bureau GGO als zeer waardevol. De ervaringen in de gebruikerscommissies laten zien hoe onderzoekers, risicobeoordelaars en beleidsmakers al tijdens het onderzoek in gesprek kunnen gaan om de mogelijke risico's van nieuwe biotechnologische toepassingen vroegtijdig te duiden.

Talking about risks!

Het Rathenau Instituut biedt de workshopformats, *serious games* en het protocol over veiligheid en biotechnologie aan via de website.



Project

Tools for Translation of Risk research into Policies & Practices (T-TRIPP)

Projectleider

Prof. dr. ir. Rinie van Est

Projectpartners

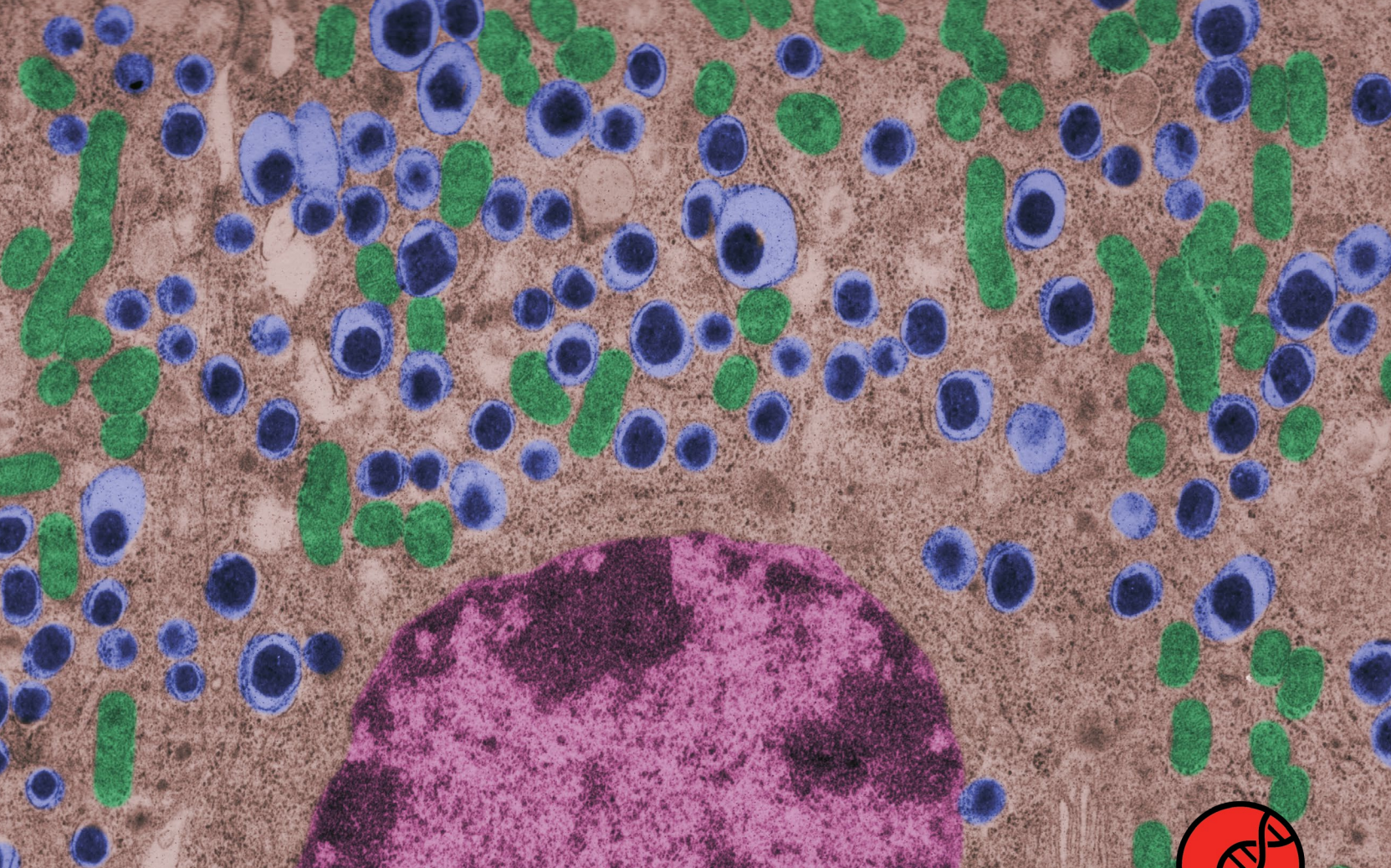
Rathenau Instituut, Technische Universiteit Delft

Gebruikerscommissie

National Institute of Health Pakistan, Hellenic Biosafety Society, COGEM, Ministerie van IenW, RIVM, International Genetically Engineered Machine Competition, Wageningen University & Research, Universiteit Maastricht

Looptijd

1 januari 2018 tot 30 juni 2022



Transmission electron microscope foto van een bètacel van een eilandje van Langerhans met de typische insulinekorrels (blauw), mitochondriën (groen) en kern (paars)



Oncolytische viro-immunotherapie

Virussen tegen kanker

Dat virussen ziektes kunnen veroorzaken, weten we allemaal. Minder bekend is dat je er ook ziektes mee kunt genezen. Viroloog Ron Fouchier en gentherapie-onderzoeker Rob Hoeben willen virussen inzetten voor de behandeling van kanker.

Ze gingen in overleg met risicobeoordelaars om vast te stellen of deze nieuwe therapie veilig is voor mens en milieu.

Virotherapie

Fouchier en Hoeben werken aan oncolytische viro-immunotherapie, een behandeling voor patiënten met agressieve vormen van kanker. Speciale virussen (zogenoemde oncolytische virussen) worden zo ingezet dat ze kankercellen in het lichaam aanvallen en gezonde cellen met rust laten. Wetenschappelijk onderzoek met viro-immunotherapie is veelbelovend. Er is inmiddels al een virusgeneesmiddel tegen uitgezaaid melanoom op de markt.

Fouchier en Hoeben verwachten dat virussen in de toekomst een belangrijke rol gaan spelen in de behandeling van kanker. Daarom bracht Hoeben in 2012 samen met virologen Bernadette van den Hoogen en Martine Lamfers een team van wetenschappers en artsen van verschillende universiteiten bij elkaar in het Oncolytische Viro-Immunotherapie (OVIT)-consortium om nieuwe viro-immunotherapieën in Nederland te ontwikkelen.

Het OVIT-consortium werkt met verschillende oncolytische virussen die veelbelovende kandidaten zijn voor immunotherapie, waaronder *Newcastle disease virus* (NDV) en reovirus (RV). De onderzoekers proberen deze virussen zo aan te passen, dat ze kankercellen zo effectief mogelijk aanvallen. Fouchier: “De standaard werkwijze is om sterk verzwakte virussen toe te dienen. Maar om zo goed mogelijk tumoren aan te vallen, wil je eigenlijk een zo sterk mogelijk virus hebben – alleen moet dat virus niet ziekmakend voor de patiënt of het milieu zijn.”

*Je wilt een zo sterk mogelijk virus hebben,
alleen moet dat virus niet ziekmakend
voor patiënt of milieu zijn*

Risico's in kaart

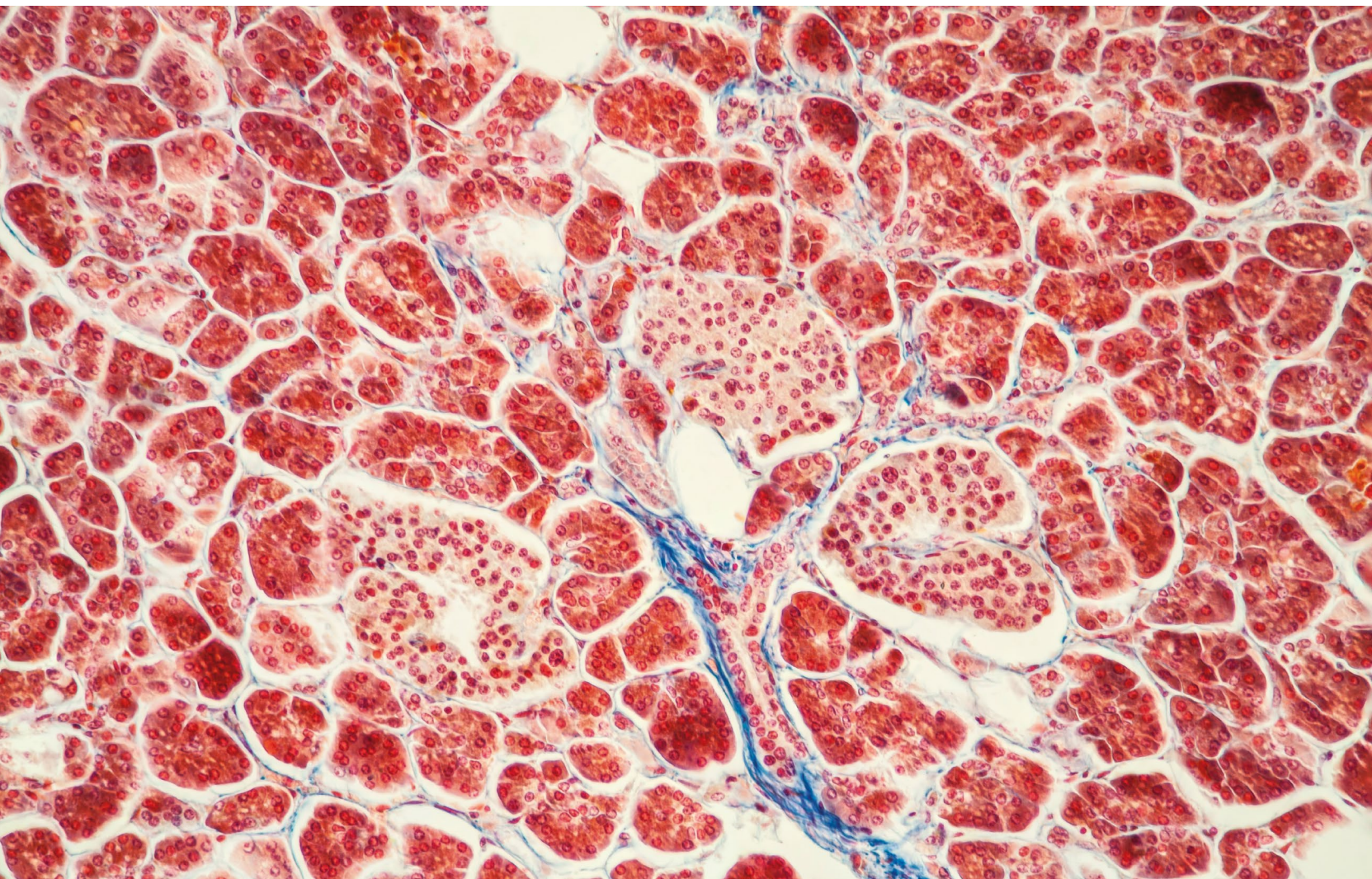
Het uiteindelijke doel is om patiënten te genezen, dus Fouchier en Hoeben willen deze nieuwe vorm van therapie graag in patiënten testen. Daarvoor moeten ze eerst aantonen dat deze virussen veilig zijn voor mens én milieu (zie kader). De virussen kunnen mogelijk risico's met zich meebrengen als ze zich in het milieu verspreiden. Beide virussen

veroorzaken geen ernstige verschijnselen bij mensen, maar NDV kan wel vogels ziek maken. Als patiënten het virus aan vogels doorgeven, dan zou dat gevolgen kunnen hebben voor de pluimveesector.

Risicobeoordeling van ggo's bij klinische proeven

De virussen van Fouchier en Hoeben zijn genetisch gemodificeerde organismen (ggo's). Klinische proeven met ggo's moeten voldoen aan strenge regels voor de veiligheid van de patiënt én voor de veiligheid van mens en milieu. Als patiënten het ziekenhuis verlaten, kunnen ze de ggo's via bijvoorbeeld de ontlasting in het milieu brengen (dit heet 'shedding'). In Nederland worden klinische proeven met ggo's daarom gezien als 'introductie in het milieu' (zie kader 'risicobeoordeling van ggo's'). Er moet een uitgebreide milieurisicobeoordeling aan de klinische proef voorafgaan: wat zijn de mogelijke gevolgen als het ggo in het milieu terecht komt? Gentherapiestudies zijn voorsnog alleen toegestaan als de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Alveesklier met eilandcellen



Fouchier en Hoeben gingen daarom in gesprek met risicobeoordelaars om de mogelijke risico's voor mens en milieu in kaart te brengen. Fouchier: "Dit zijn virussen die we genetisch modificeren om ze de juiste kankerbestrijdende eigenschappen te geven. De wijzigingen die we aanbrengen, maken klassieke beoordeling moeilijk. Daarom proberen we te komen tot de juiste verzameling gegevens die nodig is om dit soort therapieën bij mensen te mogen toepassen."

Besmettelijkheid, ziekmakend vermogen en overlevingskansen

De onderzoekers deden veel experimenten om een beeld te krijgen van de besmettelijkheid, het ziekmakend vermogen en de overlevingskansen van de virussen buiten het lichaam. Ze keken allereerst naar de overlevingskansen van de virussen. Ze testten bijvoorbeeld hoe lang de virussen konden overleven op verschillende oppervlaktes zoals labjassen, tafels of papier. De virussen bleken over het algemeen snel dood te gaan, maar NDV bleek in sommige gevallen na 48 uur nog steeds besmettelijk. Tegen temperaturen van boven 80°C en desinfectie met chloride of ethanol bleken de virussen niet bestand.

De onderzoekers keken ook in hoeverre kippen ziek werden van besmetting met gemodificeerd NDV en reovirus. Geen van de dieren die besmet werden met de virussen vertoonde ziekteverschijnselen of gewichtsverlies. Wel bleken de kippen bij besmetting met een van de NDV-varianten virusdeeltjes uit te scheiden via de ogen en de snavel, en konden ze andere dieren besmetten. Dat was niet het geval bij besmetting met reovirus en twee andere NDV-varianten.

Om te bepalen of NDV ziekte veroorzaakt in zoogdieren, deden de onderzoekers ook experimenten met muizen. Geen van de geteste virussen bleek ziekte bij de dieren te veroorzaken, zelfs niet wanneer die dieren een slecht werkend afweersysteem hadden.

Wanneer is de milieurisicobeoordeling voldoende onderbouwd om klinische proeven met mensen te kunnen doen?

Kennis voor milieurisicobeoordeling

De experimenten hebben allerlei nieuwe gegevens opgeleverd voor de milieurisicobeoordeling. Volgens Fouchier en Hoeben kan deze kennis gebruikt worden om protocollen te ontwikkelen voor het toekomstige gebruik van deze virussen in het lab en het ziekenhuis. Die protocollen moeten ervoor zorgen dat de virussen niet in de buitenwereld terecht komen.

De resultaten zijn besproken met de gebruikerscommissie van het project. In de gebruikerscommissie kwamen de werelden van onderzoek en ontwikkeling, risicobeoordeling en toelating bij elkaar: de biologische veiligheidsfunctionaris (BVF) van de deelnemende universiteiten, medisch specialisten, veterinaire specialisten, een

gentherapie-expert, Bureau GGO, loket gentherapie en beleidsmakers van het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat gingen twee keer per jaar met elkaar in gesprek. De grote vraag in dit overleg was: wanneer is de milieurisicobeoordeling voldoende onderbouwd om klinische proeven met mensen te kunnen doen? Volgens Rob Hoeben waren het goede, gedegen bijeenkomsten, waarin stevig gediscussieerd werd: "Er was beide kanten op een groot lerend vermogen. Ik vind het een voorbeeld."

Toch zal naar verwachting nog meer discussie nodig zijn voor een eindoordeel over de veilige toepassing van de oncolytische virussen geveld kan worden. Fouchier en Van den Hoogen werken aan een aanvraag voor klinische proeven met oncolytische NDV om patiënten met alveeskliekkanker te behandelen. Bij die aanvraag zal de milieuveiligheid opnieuw aan de orde komen.

Kanker verslaan met virussen

In De Volkskrant van 5 november 2022 verscheen een uitgebreid artikel over onder andere dit onderzoek en andere onderzoeken naar kanker.



Project

Evaluatie van de milieuveiligheid van gastheerbereik-gemodificeerde oncolytische virussen: centrale onderzoeken naar reovirus en het virus van de ziekte van Newcastle

Projectleider

Prof. dr. Ron Fouchier

Projectpartners

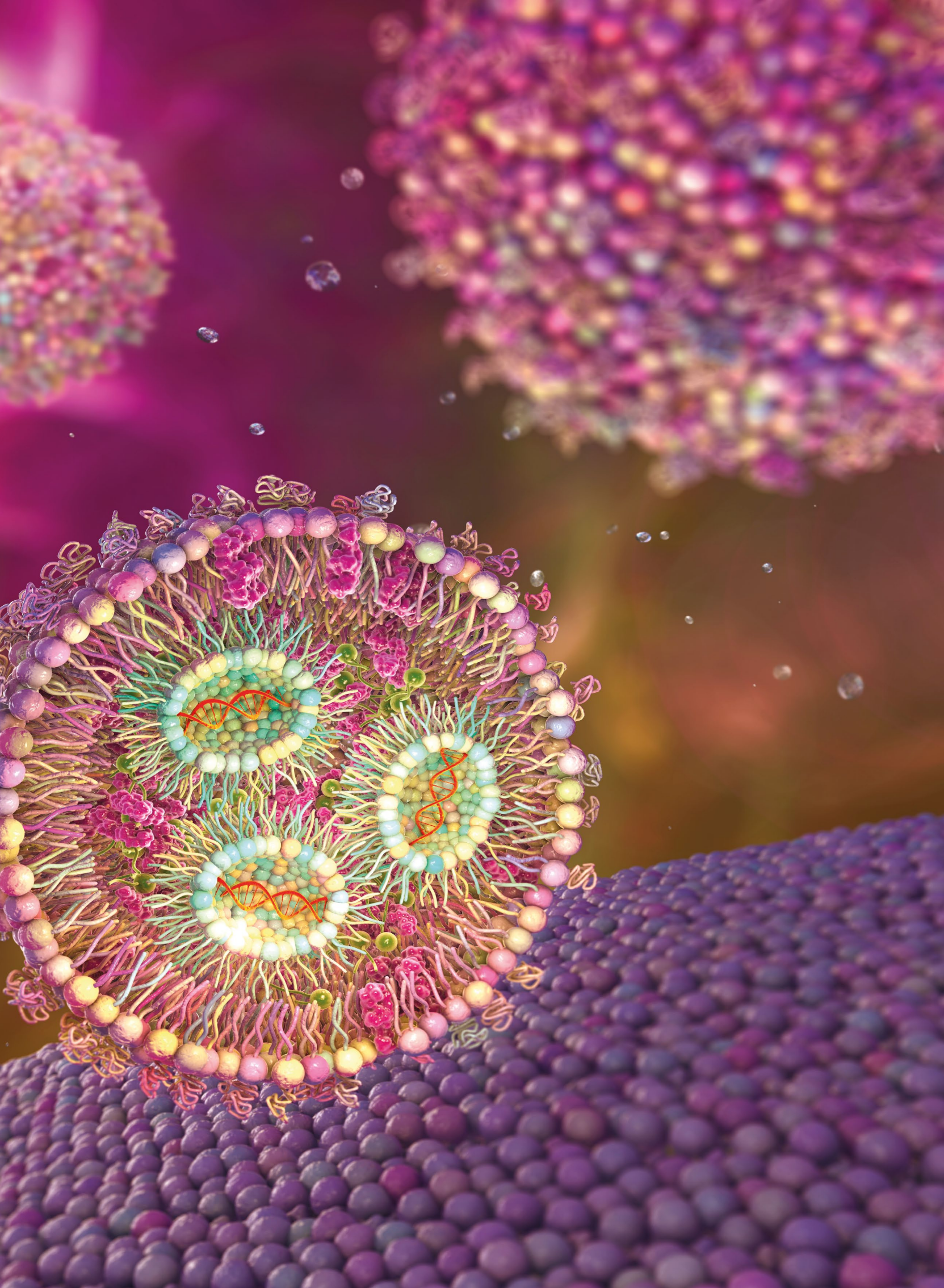
Erasmus MC, Leids Universitair Medisch Centrum

Gebruikerscommissie

Universiteit Leiden, Erasmus Universiteit & MC, Universiteit Utrecht, VU Medisch Centrum, Ministerie van IenW, RIVM, ORCA Therapeutics en Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR

Looptijd

1 juni 2017 tot 31 augustus 2022





Beloftevolle nieuwe mRNA vaccins

Hoe bepaal je de veiligheid van nieuwe vaccins?

Sinds de coronapandemie kan iedereen zich wat bij deze vraag voorstellen. Viroloog Gorben Pijlman en promovenda Tessy Hick onderzochten de milieuveiligheid van *self-amplifying mRNA* vaccins, een nieuwe generatie vaccins.

Effectief en snel beschikbaar

Vaccins zijn essentieel om de verspreiding van infectieziekten te beheersen. Bij een nieuwe uitbraak moeten ze snel ontwikkeld en op een veilige manier beschikbaar gemaakt worden. De zoektocht naar nieuwe vaccins gaat daarom onverminderd voort.

Een grote doorbraak in vaccinontwikkeling is het mRNA vaccin. Veel mensen zijn hiermee succesvol gevaccineerd tegen COVID-19, maar de mRNA vaccins hebben soms bijwerkingen na vaccinatie. Die bijwerkingen zouden nog verder verminderd moeten worden. Een nieuw type vaccin dat dit voor elkaar kan krijgen, is het zogeheten *self-amplifying mRNA*-vaccin, ook wel replicon genoemd. Deze repliconvaccins zijn gebaseerd op zichzelf vermenigvuldigende mRNA-moleculen. Replicons combineren de effectiviteit van levende, replicerende vaccins met het voordeel dat ze zich, in tegenstelling tot levende vaccins, niet ongecontroleerd kunnen verspreiden en daarmee mogelijk ziekte veroorzaken. Replicons kunnen namelijk niet de eiwitten aanmaken die voor verspreiding nodig zijn. Daarnaast blijken replicons ook nog eens goedkoper te zijn, omdat er minder mRNA nodig is om deze vaccins te maken dan bij gewone mRNA-vaccins.

“Recombinatie gebeurt constant in de natuur”

< 3D-illustratie van een dwarsdoorsnede van een lipidenodeeltje, dat RNA van een virus draagt dat een menselijke cel binnendringt

Kunnen replicons combineren?

Voor toepassing van deze nieuwe generatie vaccins moet de veiligheid onderzocht worden. Daarom onderzochten Gorben Pijlman, viroloog aan de Wageningen University & Research, en promovenda Tessy Hick in het project RepliSAFE of het genetisch materiaal van replicons kan recombineren met in de natuur voorkomende ('wildtype') virussen. Als replicons kunnen combineren, dan zou dat nieuwe risico's met zich mee kunnen brengen: het genetisch materiaal zou zich in dat geval kunnen verspreiden en ziekte veroorzaken.

Ze keken vooral naar zogeheten alfavirussen: deze virussen komen in de natuur voor, en worden door steekmuggen overgedragen. Chikungunya virus en *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), oftewel Venezolaanse paardenencefalitis, behoren tot deze familie van virussen.

Hick bestudeerde of een replicon afgeleid van de verzwakte vaccin-stam van VEEV TC-83 kan recombineren met andere alfavirussen. Ze deed experimenten in cellen en in proefdieren. In het proefdieronderzoek bekeek ze waar deze replicons in een proefdier terecht komen en voor hoelang ze daar zijn aan te tonen.

Veilig gebruik

Pijlman en Hick toonden aan dat replicons in cellen de verspreiding van een alfavirus dat later binnenkomt sterk verminderen. Het replicon-RNA kan in gekweekte zoogdiercellen in principe recombineren met een wildtype alfavirus, maar de kans dat dit gebeurt is minimaal. Als recombinitie plaatsvindt, dan blijkt het nieuwe, samengestelde virus geen sterkere overlevingskansen te hebben dan de virussen waar het van afstamt. In proefdieren bleek recombinitie tussen repliconvaccins en het virus geen samengestelde virussen op te leveren, zelfs niet in proefdieren met een verminderd immuunsysteem.

De onderzoekers ontwikkelden ook repliconvaccins die een spike eiwit produceren van een varkens-coronavirus, het *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV). Ze onderzochten of het spike gen in deze replicons kan recombineren met een PEDV variant als deze in dezelfde cel terechtkomen. Ze stelden vast dat het alfavirusreplicon en PEDV in ieder geval in dezelfde cellen kunnen repliceren, maar dat recombinitie niet optreedt.

Op basis van het onderzoek concluderen Pijlman en Hick dat het risico van RNA-recombinatie tussen replicons afgeleid van VEEV en wildtype virussen vrijwel nihil is.



Lichtere beoordeling?

De onderzoeksresultaten van Hick nemen een deel van de theoretische onzekerheid bij de risicobeoordeling van repliconvaccins weg. Het gebruik van repliconvaccins voor de bestrijding van een volgende pandemie komt daarmee een stapje dichterbij.

Het feit dat een replicon de verspreiding van een wildtype alfavirus tegengaat was volgens de onderzoekers onverwacht, maar is wel een positief resultaat voor het uiteindelijke risicoprofiel van deze vaccins. Dit kan ertoe bijdragen dat ze in de toekomst op een lager inperkingsniveau ingeschaald kunnen worden (zie kader 'risicobeoordeling van ggo's'). Dat zou volgens de onderzoekers tijdswinst en minder discussie opleveren: "als de risico's verwaarloosbaar klein zijn, dan moet je je daarover ook durven uitspreken".

Project

Veiligheid van synthetische replicon vaccins in het milieu: risico van RNA-recombinatie met wildtype virussen (RepliSAFE)

Projectleider

Dr. ir. Gorben Pijlman

Projectpartners

Wageningen University & Research, QIMR
Berghofer Medical Research Institute
(AUS)

Gebruikerscommissie

MSD, Amarna Therapeutics, IntraVac,
VicniVax, Ministerie van IenW en RIVM

Looptijd

1 november 2017 tot 2 januari 2023

*“Als de risico's verwaarloosbaar klein zijn,
dan moet je je daarover ook durven
uitspreken”*

Inmiddels is een eerste replicon particle-vaccin, gebaseerd op replicons afgeleid van het VEEV TC-83 dat Pijlman en Hick ook gebruikten, in de Verenigde Staten onder voorwaarden goedgekeurd voor gebruik in dieren, en in India voor gebruik in mensen.

Pijlman en Hick hopen dat de resultaten ook helpen bij de beoordeling van de risico's van andere virale vectoren die gebruik maken van replicons afgeleid van alfa- en flavivirussen. De COGEM oordeelde onlangs dat generieke omlaagschaling van replicons van alfa- en flavivirussen onder bepaalde voorwaarden mogelijk is.



Klonterende eiwitten

Als eiwitten op een verkeerde manier vouwen, dan kunnen ze samenklonteren tot amyloïde fibrillen: dunne eiwitvezeltjes die in het menselijk lichaam kunnen neerslaan. Amyloïde fibrillen spelen een rol in ernstige ziektes als Alzheimer en Parkinson. Maar in het dagelijks leven worden we ook al blootgesteld aan amyloïde fibrillen, zonder dat we er ziek van worden. Is er een manier om te voorspellen wanneer eiwitten fibrillen vormen en wat de risico's daarvan zijn? Dat is de kern van het onderzoek van fysisch chemicus Mireille Claessens.

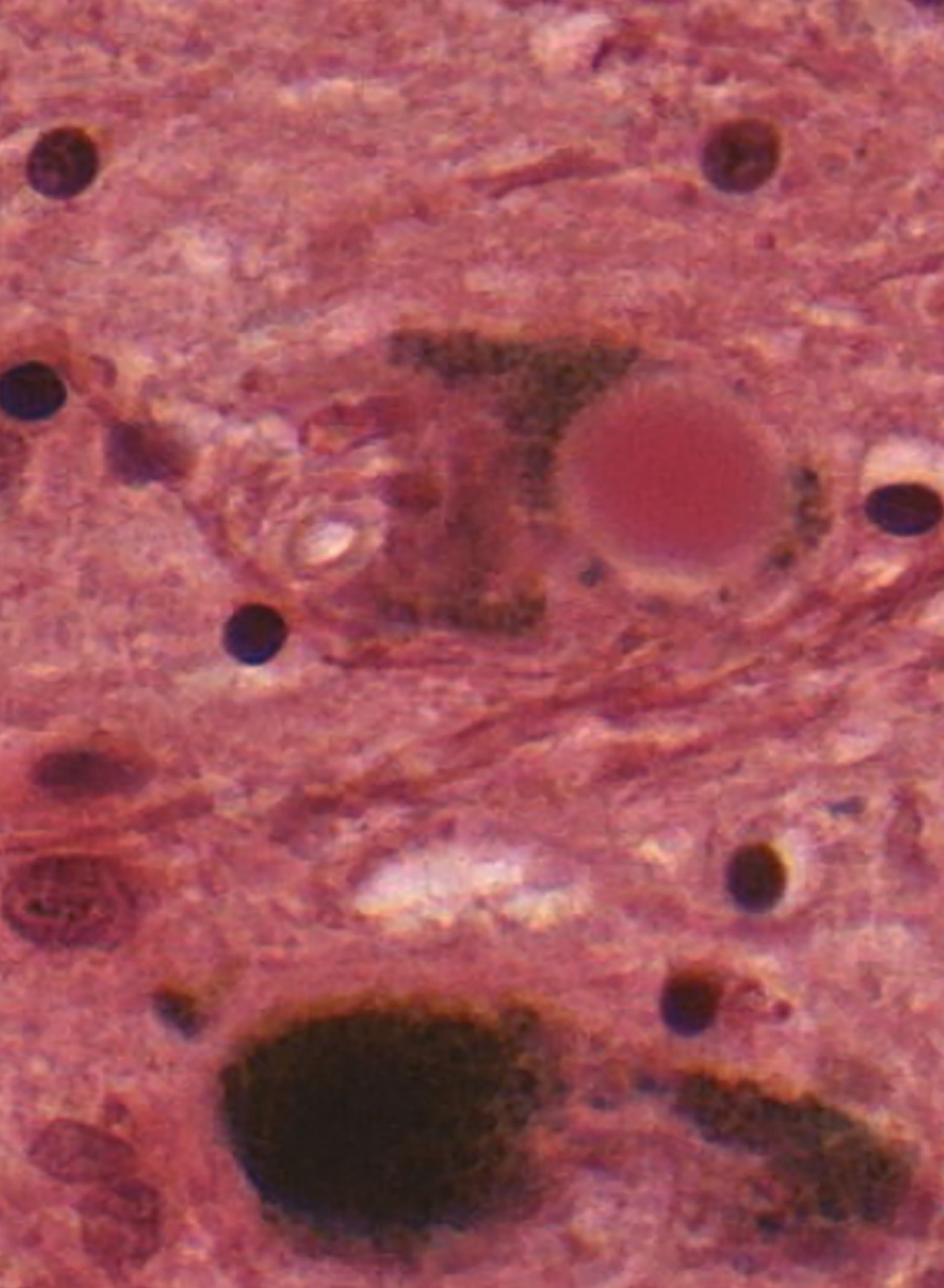
Eiwit-origami

Eiwitten zitten ingewikkeld in elkaar. Ze moeten precies goed gevouwen zijn. Als er iets misgaat bij het vouwen, dan kunnen ze samenklonteren tot amyloïde fibrillen. Dat samenklonteringsproces speelt een rol bij neurodegeneratieve ziektes als Alzheimer, Parkinson, en Creutzfeldt-Jakob. Er is nog veel onduidelijk over dit proces. Onder welke omstandigheden klonteren eiwitten samen tot amyloïde fibrillen? En wanneer vormen ze een risico voor de gezondheid? Amyloïde fibrillen zitten namelijk ook in voedsel: ze zijn aangetroffen in moedermelk en gebakken eieren. We komen dus allemaal regelmatig met amyloïde fibrillen in aanraking, zonder dat dat problemen lijkt op te leveren. Er wordt wereldwijd veel onderzoek gedaan om het ontstaan en de rol van amyloïde fibrillen in het lichaam beter te begrijpen.

Mireille Claessens, hoogleraar Nanobiofysica aan de Universiteit Twente, doet al lange tijd onderzoek naar α -synucleïne, een eiwit dat bij Parkinsonpatiënten in klompjes in de hersenen gevonden wordt. Claessens: "α-synucleïne is een raar eiwit: het heeft geen vaste structuur. Als de moleculen botsen, vouwen ze om elkaar heen en vormen ze een fibril." Ze vroeg zich af of blootstelling aan amyloïde fibrillen uit voedsel kan leiden tot ophoping van ziekte-gerelateerde eiwitten in de hersenen. Onder welke omstandigheden kan de amyloïde vouwing van een eiwit overgedragen worden op een ander eiwit? Samen met junior onderzoeker Jonathan Vaneyck bracht ze de risico's van blootstelling aan amyloïde fibrillen in kaart.

Wanneer vormen amyloïde fibrillen een gezondheidsrisico, en wanneer niet?

Het doel was een hulpmiddel te ontwikkelen dat kan bijdragen aan het voorspellen van de risico's van amyloïde eiwitten. Er wordt namelijk niet alleen in het lab gewerkt met amyloïde eiwitten. Ze spelen ook een rol in allerlei nieuwe toepassingen zoals weefselregeneratie of het filteren van zware metalen en medicijnen uit water. Als je weet hoe groot de kans is dat deze eiwitten aanzetten tot fibrilvorming, dan kan dat helpen om te bepalen welke veiligheidsmaatregelen je moet nemen als je met een bepaald eiwit werkt.



Natuurlijke barrières

Claessens en Vaneyck onderzochten of amyloïden van verschillende eiwitten de natuurlijke barrières in het lichaam zoals de darmwand kunnen passeren. Uit de proeven in het lab bleek de kans daarop heel klein. Ze keken ook of de fibrillen andere eiwitten kunnen aanzetten tot fibrilvorming als ze de barrières eenmaal zijn gepasseerd. Uit de recente literatuur blijkt namelijk dat cellen het eiwitsamenklonteringsproces aan elkaar kunnen doorgeven. Zo besmet de ene cel de andere en verbreidt de ziekte zich over de hersenen. Dit besmettingsmechanisme zorgde er in eerste instantie voor dat de veiligheidseisen voor laboratoria, die werken met α -synucleïne, omhoog geschroefd zijn. Inmiddels is dit advies teruggetrokken: de COGEM oordeelde na verder onderzoek dat er geen verhoogd risico op besmetting is.

Het risico dat eiwitten aanzetten tot fibrilvorming is niet zo groot

Vaneyck maakte voor zijn promotieonderzoek allerlei amyloïde fibrillen, en testte vervolgens of ze α -synucleïne wel of niet aan konden zetten tot de ophoping van eiwitten. Het onderzoek van Vaneyck verkende hoe fibrillen groeien als andere eiwitten worden toegevoegd. Vaneyck ontdekte dat fibrilvorming plaatsvindt als andere eiwitten op een bepaalde manier op het oppervlak plakken. Dat maakt het makkelijker om een nieuw fibril te maken. Maar de eigenschappen van het eiwit om precies op die manier aan de oppervlakte te plakken, bleken vrij zeldzaam. Van bijna vijftig verschillende eiwitten bleken er twee aan te zetten tot aggregatie: lysozym en het tau-eiwit. Al met al is het risico dat eiwitten aanzetten tot fibrilvorming dus niet zo groot.

Kunstmatige intelligentie

In theorie zou dit inzicht gebruikt kunnen worden om een voorspellend algoritme te ontwikkelen waarmee je kunt toetsen of een eiwit aanzet tot fibrilvorming. Als het eiwit de eigenschappen heeft waarmee het aan het oppervlak kan binden, dan zou dat een reden kunnen zijn om het eiwit niet te gebruiken.

Claessens en Vaneyck gebruikten een zogeheten Support Vector Machine (SVM), een vorm van kunstmatige intelligentie, om de kans op fibrilvorming door interactie tussen eiwitten te voorspellen. De SVM bleek behoorlijk goed te kunnen voorspellen welke eiwitten mogelijk een probleem vormden. Volgens Claessens zou je zo'n algoritme ook in andere veiligheidsvraagstukken kunnen gebruiken. Het onderzoek laat dus niet alleen zien dat het met de risico's op fibrilvorming wel meevalt. Er is ook zicht op nieuwe instrumenten om de risico's van fibrilvorming te voorspellen. Helaas ligt de ontwikkeling van deze tools nu stil. Het wachten is op nieuwe fondsen om met het onderzoek door te gaan.

< Lewy-lichaampjes (amyloïde) in mesencephalon-neuron bij de ziekte van Parkinson. Congo-rode kleuring, x600.

Project

Protein DOMINO: Risico's van blootstelling aan amyloïden

Projectleider

Prof. dr. ir. Mireille Claessens

Projectpartners

Universiteit Twente

Gebruikerscommissie

Universiteit Twente, Rijksuniversiteit Groningen, COGEM, Ministerie van IenW, RIVM, Radboudumc en Katholieke Universiteit Leuven

Looptijd

15 januari 2018 tot 31 augustus 2022



Bioreactor voor microbiologie



Het project SafeChassis:

Veilig herontwerp van *Pseudomonas putida*

Kan je bacteriën zo aanpassen dat ze niet in de natuur kunnen overleven? Het project SafeChassis ontwikkelde technische veiligheidsmechanismen om de mogelijke risico's van genetische aanpassing van het industriële micro-organisme *Pseudomonas putida* te minimaliseren.

Kansen van witte biotechnologie

In de industriële (of 'witte') biotechnologie worden micro-organismen zoals bacteriën, gisten of algen gebruikt om grondstoffen om te zetten tot producten. Zo kunnen bijvoorbeeld plastics of chemicaliën gewonnen worden uit biomassa. De productie vindt plaats in zogeheten bioreactoren, waar de micro-organismen in optimale omstandigheden worden gekweekt. Met behulp van genetische modificatie kunnen de stofwisselingsroutes van de micro-organismen zo worden aangepast dat de omzetting zo effectief mogelijk is. Er zijn hoge verwachtingen van de industriële biotechnologie voor de Nederlandse economie. Omdat producten gemaakt kunnen worden op basis van hernieuwbare grondstoffen, kan de witte biotechnologie ook bijdragen aan de transitie naar een circulaire economie. Dankzij nieuwe technieken als *gene editing*, kunnen micro-organismen nu nog nauwkeuriger aangepast worden (ze worden daarom ook wel 'celfabrieken' genoemd).

Aanpassen van micro-organismen

Een van de kansrijke micro-organismen voor de industriële biotechnologie is *Pseudomonas putida*, een staafvormige bacterie die van nature veelvuldig voorkomt in de grond en in zuurstofrijk water. Deze microbe wordt wel gezien als 'microbiologisch werkpaard': het wordt op allerlei manieren genetisch aangepast om grondstoffen efficiënter om te zetten.

“Hoe genetische modificatie de veiligheid van micro-organismen beïnvloedt, is als het raadsel van het Orakel van Delphi: als je alle planken van een houten boot vervangt, is het dan nog dezelfde boot?”

P. putida wordt als een 'veilig' organisme gezien: het is geen ziekteverwekker. Verregaande structurele veranderingen en aanpassingen in het genoom van *P. putida* kunnen echter de vraag oproepen in hoeverre bestaande veiligheidsinschattingen voor dit organisme nog van toepassing zijn

Veiligheidsmechanismen inbouwen

De gedachte achter het SafeChassis-project was simpel: als aangepaste micro-organismen niet buiten de bioreactor kunnen overleven, dan is de kans veel kleiner dat ze een milieurisico vormen. De onderzoekers verkenden daarom technische veiligheidsmechanismen die in het genoom van *P. putida* ingebouwd kunnen worden. Dit wordt ook wel biologische insluiting genoemd. Vergelijk het met het inbouwen van remmen, airbags en gordels in een auto.

In het project zijn verschillende strategieën verkend. De eerste strategie om veiligheidsmechanismen in industriële micro-organismen in te bouwen zijn zogeheten *kill-switch* strategieën: het inbouwen van een responsmechanisme in het genoom, waarbij het organisme zichzelf onder bepaalde stimuli vernietigt. SafeChassis ontwikkelde het GenoMine mechanisme, een op CRISPR-Cas9 gebaseerde *kill switch* voor *P. putida*.

“Risico's moet je altijd in de context van een toepassing zien”

Een andere strategie is om het micro-organisme afhankelijk te maken van bepaalde voedingsstoffen, zodat het organisme in de afwezigheid van deze grondstof niet kan overleven. In SafeChassis werd een afhankelijkheid van fosfaat ingebouwd. Omdat fosfaat in de natuur

maar weinig voorkomt, zijn de overlevingskansen van deze variant buiten de bioreactor gering.

Een derde strategie is genetische hercodering: door het herschrijven van de 'taal' van het genoom, kan het micro-organisme niet langer communiceren met andere organismen. Daarmee wordt de kans dat genetische informatie naar andere soorten wordt doorgegeven, aanzienlijk verkleind. De onderzoekers ontwikkelden ReScribe, een instrument voor genetische hercodering op basis van CRISPR-Cas9.

100% veilig?

Het onderzoek kan gezien worden als een voorbeeld van *Safe-by-Design*: het meewegen van de risico's voor mens en milieu in een zo vroeg mogelijk stadium van technische ontwikkeling. Door veiligheidsmechanismen in het ontwerp van *P. putida* in te bouwen, worden de mogelijke risico's voor mens en milieu verkleind.

Is *P. putida* dan 'inherent veilig' als deze veiligheidsmechanismen ingebouwd worden? De onderzoekers benadrukken dat 100% veiligheid niet bestaat. Omdat het gaat om levende organismen die zich kunnen aanpassen, is het van belang dat risico's altijd in de context van een toepassing gezien worden: om welke organismen gaat het? Welke eigenschappen worden veranderd? Met welke methode? Waar vindt de productie plaats? Hoe wordt het product uit de bioreactor gewonnen? En waar wordt het product vervolgens voor gebruikt?



Artist impression van een celfabriek

Vanwege het belang van de context vraagt de inschatting van veiligheid volgens de onderzoekers om een multidisciplinaire aanpak. Onderzoekers kunnen de veiligheid van een toepassing niet in hun eentje bepalen: daarvoor is ook inbreng van risicobeoordelaars, producenten, eindgebruikers en andere betrokkenen nodig. SafeChassis hanteerde daarom een interdisciplinaire onderzoeksopzet: biotechnologen werkten samen met filosofen en sociale wetenschappers. Risicobeoordelaars en producenten dachten mee in de gebruikerscommissie.

Naast de ontwikkeling van technische veiligheidsmechanismen verkenden de onderzoekers ook de industriële en maatschappelijke context. Zo interviewden ze producenten over de toepassing van genetische veiligheidsmechanismen. Uit de gesprekken bleek dat de industrie vooralsnog terughoudend is om deze veiligheidsmechanismen te gebruiken. Ten eerste is er onvoldoende duidelijk over hoe deze mechanismen in de praktijk toegepast zouden moeten worden. Het inbouwen van veiligheidsmechanismen vindt vooral nog op labschaal plaats. Bij de huidige experimenten wordt slechts naar een beperkt aantal variabelen gekeken, zoals de ontsnappingskans en de levensvatbaarheid van het micro-organisme. Er is nog weinig bekend over de effecten van evolutie van de micro-organismen: houden de veiligheidsmechanismen stand als micro-organismen langere tijd in bioreactoren gebruikt worden, of passen de organismen zich aan? Ook is nog geen overeenstemming over standaardisering van methodes voor het inbouwen van veiligheidsmechanismen.

Dat gebrek aan eenduidigheid maakt het voor producenten onaantrekkelijk om deze strategieën toe te passen. Het is immers niet duidelijk hoe betrouwbaar de mechanismen zijn, en wat precies de voordelen zijn.

“Biologische veiligheid is nu gericht op naleving. Het zou gericht moeten zijn op verantwoordelijkheid”

Ten tweede bleek uit de gesprekken dat er onduidelijkheid bestaat over de verdeling van verantwoordelijkheden voor veilig ontwerp van micro-organismen. Wie is eerstverantwoordelijke om de veiligheid van micro-organismen in een vroeg stadium van ontwikkeling te toetsen? Bedrijven zien zich vooralsnog niet door wetgeving gehouden om systemen voor veiligheid ‘aan de voorkant’ in te richten.

Gezamenlijke verantwoordelijkheid

Veilig ontwerp is volgens de onderzoekers niet alleen een kwestie van technisch ontwerp, maar ook van beleid en regelgeving. Ze zien het een gezamenlijke verantwoordelijkheid van biotechnologen, risicobeoordelaars, beleidsmakers en producenten. De onderzoekers pleiten daarom voor meer interdisciplinaire samenwerking rond de wenselijkheid en mogelijke risico's van het gebruik van micro-organismen. De voorkeur voor interdisciplinaire samenwerking blijkt ook uit het proefschrift van onderzoeker Enrique Asín García. Het bevat naast biotechnologische onderzoekspublicaties ook sociaalwetenschappelijke publicaties. Dat is voor een proefschrift in de biotechnologie vooralsnog vrij uitzonderlijk.

Project

Implementatie en evaluatie van veiligheidsmaatregelen voor de technologische ontwikkeling van een industrieel lifestyle-chassis (SafeChassis)

Projectleider

Prof. dr. ir. Vitor Martins dos Santos

Projectpartners

Wageningen University & Research, Radboud Universiteit, Yale University en Massachusetts Institute of Technology (MIT)

Gebruikerscommissie

Corbion, Ingenza, DSM, BioFaction, Rathenau Instituut, Ministerie van IenW en RIVM

Looptijd

1 december 2017 tot 31 maart 2022

Meer over SafeChassis

Zie voor een overzicht van technische veiligheidsmaatregelen het proefschrift van onderzoeker Enrique Asín García, *SafeChassis: engineering biosafety for industrial biotechnology*.





Kansen en veiligheid van nieuwe genmodificatietechnieken

Samen *gene editing* verkennen

Om de kansen en risico's van nieuwe biotechnologische technieken zoals *gene editing* te duiden, is intensieve interdisciplinaire samenwerking nodig. Daarover zijn medisch biotechnoloog Niels Geijsen en bioeticus Nienke de Graeff het roerend eens. Gezamenlijk zochten ze naar antwoorden.

De belofte van nieuwe technieken

Niels Geijsen ziet kansen. Als hoogleraar Ontwikkelingsbiologie en Regeneratieve Geneeskunde en hoofd van de afdeling Anatomie en Embryologie van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) doet hij onderzoek naar genetische spieraandoeningen. Denk aan Duchenne spierdystrofie, een ernstige erfelijke spierziekte die de spieren aantast en verzwakt. Gentherapie biedt mogelijkheden om deze erfelijke ziekten te behandelen. Door het corrigeren van fouten in het DNA van de patiënt kan de spierverswakking in de toekomst hopelijk worden vertraagd.

Maar hoe zit het met de veiligheid van deze nieuwe technieken?

Door de opkomst van *gene editing* is het onderzoek in een stroomversnelling geraakt. Met behulp van *gene editing* kunnen onderzoekers genetische informatie heel gericht aanpassen. De techniek heeft een ware revolutie ontketend: deze technologieën bieden zoveel mogelijkheden dat het een kwestie van tijd lijkt voor ze klinisch worden toegepast.

Maar hoe zit het met de veiligheid van deze nieuwe technieken? Een onderzoeksteam onder leiding van Geijzen bracht de mogelijke risico's en voordelen van *gene editing* in kaart. Het onderzoek combineerde technisch onderzoek met ethische verkenningen. Geijzen deed in het laboratorium onderzoek naar een specifiek *gene editing*-systeem, het enzym CRISPR-Cas13. Hij deed dat samen met mede-projectleider John van der Oost, een van de ontdekkers van CRISPR-Cas, die aan de Wageningen University & Research eveneens met Cas13 werkte. En De Graeff deed onder begeleiding van hoogleraar medische ethiek Annelien Bredenoord 'ethisch parallelonderzoek' naar *gene drives*. Ethisch parallelonderzoek is een vorm van ethisch onderzoek waarin vroegtijdig in het ontwikkelproces wordt nagedacht over de ethische vragen die een nieuwe technologieën oproepen.

Wat zijn *gene drives*?

Gene drives maken het mogelijk om gewenste veranderingen in het genoom op elke kopie van het betreffende gen aan te brengen, door een CRISPR-Cas complex in het doelgen in te bouwen. In principe erven alle nakomelingen dit CRISPR-complex, kopiëren het complex en geven het op hun beurt weer door aan elke volgende individuele nakomeling van de volgende generatie. Zo verspreidt in theorie de genetische verandering zich door de gehele populatie en verdwijnt op termijn het 'wildtype' gen (zie afbeelding).

Het grote verschil tussen *gene drives* en *gene editing* is dat *gene drives* zich actief kunnen verspreiden: de genetische verandering wordt elke generatie gekopieerd en aan de nakomelingen doorgegeven. Bij *gene editing* gebeurt dat maar bij de helft van het aantal nakomelingen, waardoor de verandering na enkele generaties kan verdwijnen.

CRISPR-Cas13

Het technische onderzoek richtte zich op de mogelijkheden van CRISPR-Cas13 om specifieke cellen aan te vallen. Cas13 werkt op RNA (Ribonucleïnezuur). Net als DNA bestaat RNA uit lange ketens van nucleotiden. RNA speelt een belangrijke rol in het coderen, overbrengen, reguleren en tot expressie brengen van genen. Cas13 kan RNA herkennen aan de volgorde van moleculen in de streng. Als het Cas13-enzym het RNA herkent, raakt het 'geactiveerd' en knipt het alle RNA in de omgeving kapot. De cel kan daardoor niet goed meer functioneren, en gaat dood. Het Cas13-systeem is dus een cel-selectie systeem dat cellen met een specifiek RNA heel gericht elimineert. Dat biedt allerlei mogelijkheden.

Geijzen onderzoekt nu of het Cas13-systeem kan worden ingezet om kankercellen te doden zonder de omliggende weefsels te beschadigen. Als het Cas13-eiwit RNA vindt dat alleen in kankercellen voorkomt, dan knipt het alleen de kankercellen kapot terwijl de gezonde cellen intact blijven. Zo zou Cas13 in de toekomst mogelijk een rol kunnen spelen in de bestrijding van tumoren.

Gene drives

Het ethische onderzoek richtte zich op een andere groep technologieën: *gene drives*. Bij *gene drives* wordt DNA zo veranderd dat de mutatie via de geslachtelijke voortplanting aan alle of een groot deel van de nakomelingen doorgegeven wordt, onafhankelijk van de normale erfelijkheidsregels. Een *gene drive* zou het mogelijk maken om relatief snel en efficiënt een genetische eigenschap blijvend in een groot deel van de populatie van een organisme te verspreiden. Als *gene drives* werken als gehoopt, dan zou je de techniek bijvoorbeeld kunnen inzetten om ziekteverwekkers of invasieve exoten tegen te gaan.

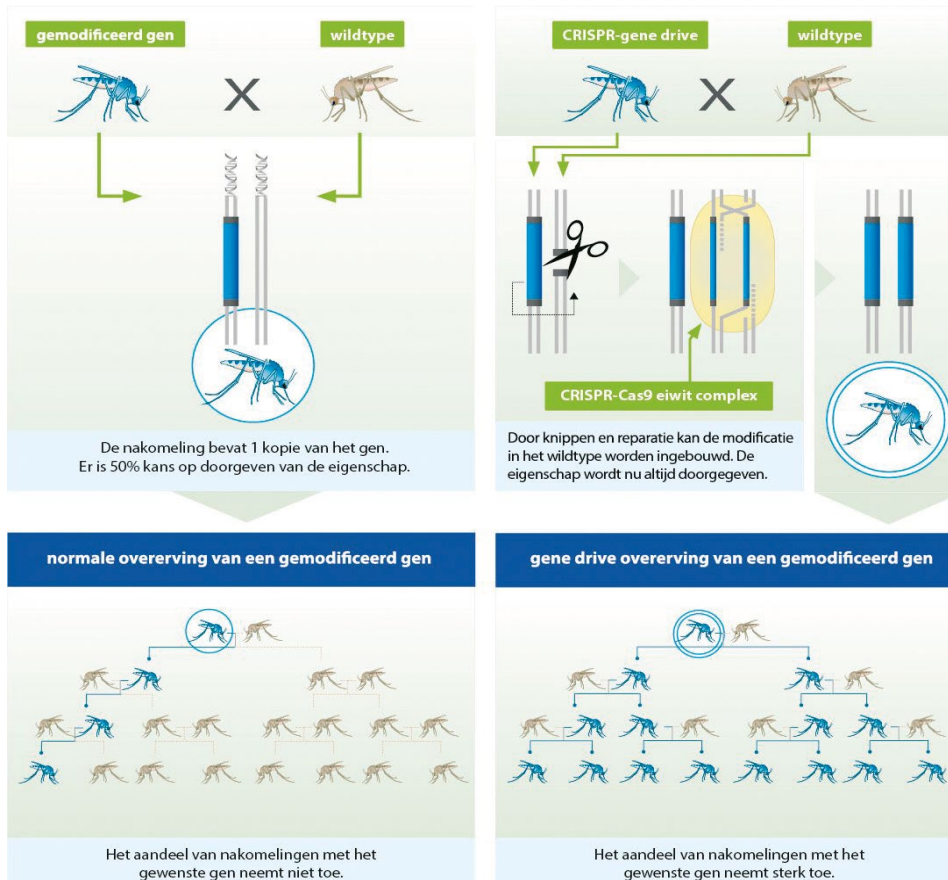
Om de mogelijkheden en risico's van *gene drives* in kaart te brengen, sprak onderzoeker Nienke de Graeff, inmiddels *assistant professor* Bioethiek aan het Leids Universitair Medisch Centrum, voor haar promotieonderzoek onder andere met 33 experts in het *gene drive*-veld. Ze vroeg biomedisch onderzoekers, ethici, beleidsmakers en maatschappelijke partijen in Nederland, Engeland en de Verenigde Staten naar de mogelijke toepassingen van *gene drives*. Daarbij focuste zij op wat de mogelijke risico's en ethische vragen en bezwaren zijn rondom de ontwikkeling en mogelijke toepassing van *gene drives*, en hoe je de risico's kunt indammen.

De Graeff herkende drie terugkerende thema's in die gesprekken. Ten eerste bleken er verschillende visies te zijn op de onzekerheden en risico's rondom *gene drive*-technologie, en hoe je hiermee om zou moeten gaan. Ten tweede verschilden de respondenten van mening over de alternatieven waarmee *gene drive*-technologie vergeleken zou moeten worden, en hoe deze alternatieven tegen elkaar zouden moeten worden afgewogen. En ten derde bleken er verschillende visies te zijn op de rol van mensen in de natuur. Die visies beïnvloeden hoe mensen denken over *gene drive*-technologie. In haar proefschrift analyseerde de Graeff de besproken visies en argumenten vervolgens vanuit ethisch perspectief.

“Bij COVID ging het bijvoorbeeld mis, daar was een te selecte groep disciplines in het OMT die keuzes maakte”

Tunnelvisie voorkomen

Overigens zou je volgens de Graeff niet over *gene drives* als een enkele techniek moeten spreken. Er zijn verschillende soorten *gene drives*, en de risico's zijn sterk afhankelijk van de context: welke toepassing vindt er plaats? In welke diersoort, en in welk ecosysteem? Voor de besluitvorming is het relevant om die context mee te nemen. Juist omdat er



< Het werkingsmechanisme van *gene drives*
Bron: COGEM

zoveel verschillende meningen over *gene drives* zijn, moet je vragen over de kansen en veiligheid van nieuwe technieken volgens de Graeff interdisciplinair en proactief aanpakken. In haar proefschrift pleit ze voor een brede betrokkenheid van maatschappelijke partijen en stakeholders in besluitvorming over nieuwe technologieën als *gene drives*. De Graeff: "Door interdisciplinair en proactief na te denken over beleid rondom nieuwe technologieën kan je een tunnelvisie voorkomen en kan je een brede set aan overwegingen meenemen in het ontwikkelen van de technologie en bijbehorende regelgeving. Bij COVID ging dat bijvoorbeeld mis, daar was mijns inziens een te selecte groep disciplines in het Outbreak Management Team die keuzes maakte. Het was heel zinvol geweest als ook allerlei niet-biomedische experts een prominentere rol hadden gekregen, zoals bijvoorbeeld ethici die kunnen helpen met het reflecteren op de waarde-afwegingen die worden gemaakt, en psychologen en sociale wetenschappers die iets kunnen zeggen over wat de effecten van de maatregelen op de maatschappij kunnen zijn. Bij besluitvorming over nieuwe technologieën is interdisciplinaire reflectie ook essentieel." Geijsen is het daarmee eens: "Het is evident dat je dit samen moet doen. Met de toenemende technische mogelijkheden worden de vragen over de toepassing steeds urgenter. Je wil niet alles ontwikkelen in het lab, en daarna pas vragen stellen over de veiligheid en maatschappelijke acceptatie."

De onderzoekers denken dat de combinatie van technisch onderzoek met ethisch parallelonderzoek als model kan dienen voor verantwoorde besluitvorming over nieuwe gentechnieken. Door de morele overwegingen en onderliggende waarden bij verschillende standpunten van betrokkenen al tijdens het technische onderzoek in beeld te brengen, kunnen de technische en ethische vragen in samenhang meegenomen worden in de besluitvorming.

Project

Kansen en veiligheid van nieuwe genmodificatietechnieken

Projectleider

Prof. dr. Niels Geijsen

Projectpartners

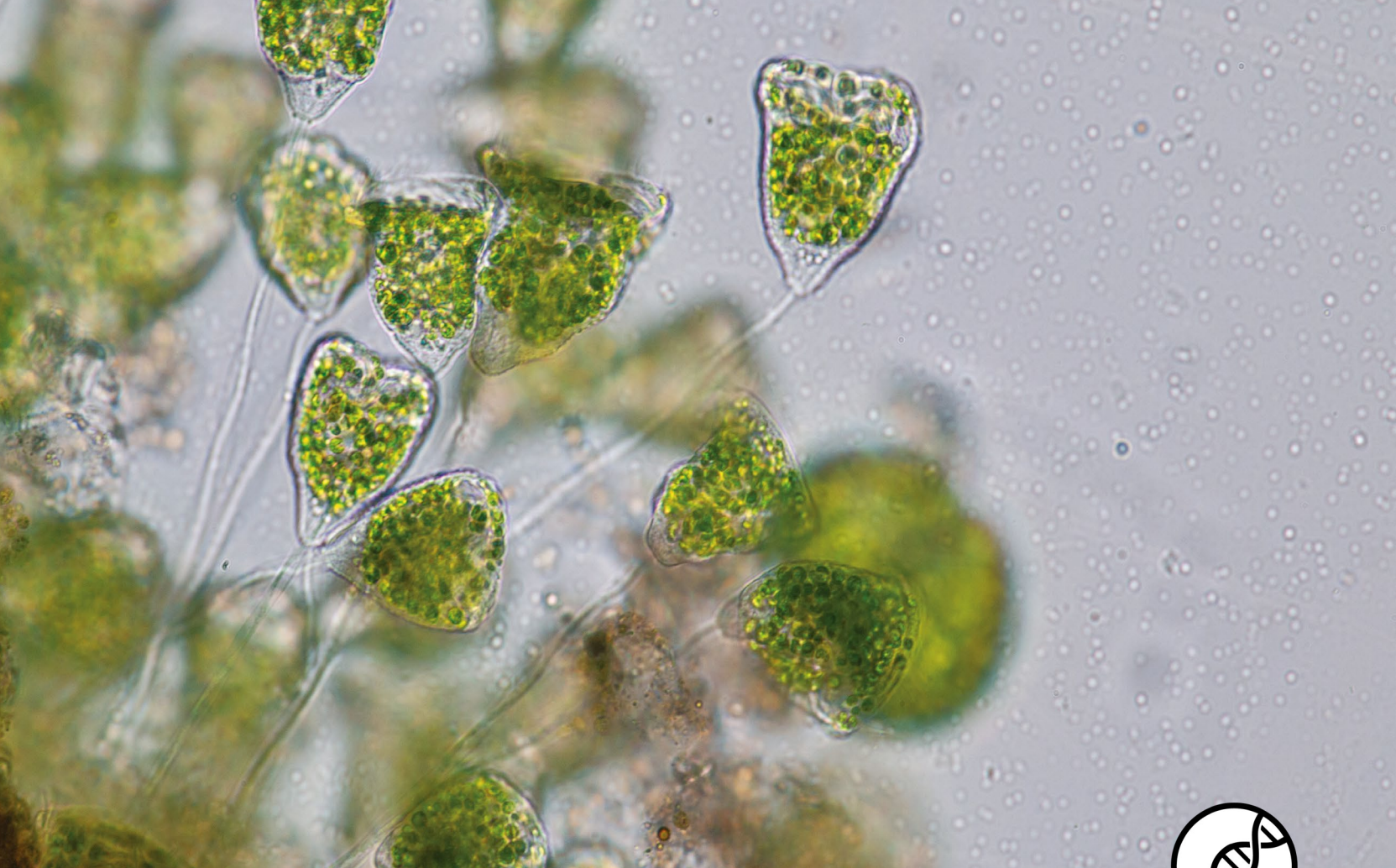
Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), Hubrecht Instituut, Wageningen University & Research (WUR), Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU)

Gebruikerscommissie

Rathenau Instituut, Ministerie van IenW, RIVM, UNESCO International Bioethics Committee & World Commission on the Ethics of Scientific Knowledge and Technology (COMEST), Public Health and Food safety (ENVI)

Looptijd

1 december 2017 tm 31 oktober 2021



Vorticella (organisme) in afvalwater onder de microscoop



Overdracht van genetische informatie in de natuur

Vreemde genen in het milieu

Kunnen genetisch gemodificeerde micro-organismen ingebouwde eigenschappen zoals antibioticaresistentie aan hun soortgenoten in de natuur doorgeven? Dat was de hoofdvraag in een gezamenlijk onderzoek van de Universiteit Leiden en de TU Delft onder leiding van moleculair biotechnoloog Gilles van Wezel.

De industriële biotechnologie maakt gebruik van micro-organismen om medicijnen, chemicaliën en voedingsstoffen te maken. Het DNA van de micro-organismen wordt aangepast om precies die eigenschappen te krijgen die voor de toepassing van belang zijn. In theorie is het zelfs mogelijk om met de bouwstenen van het DNA hele nieuwe eigenschappen of zelfs nieuwe organismen te ontwerpen. Zou dit vreemde genetische materiaal in het milieu terecht kunnen komen? En wat gebeurt er dan mee?

Onderzoekers van de Universiteit Leiden en de TU Delft verkenden in een gezamenlijk project de mogelijke verspreiding van vreemd DNA in het milieu. De onderzoekers richtten zich op DNA afkomstig van Actinobacteriën, micro-organismen die veelvuldig gebruikt worden voor de productie van antibiotica. In de zoektocht naar nieuwe antibiotica wordt het DNA van deze bacteriën op grote schaal gemodificeerd en gecombineerd. De bacteriën zijn resistent tegen antibiotica (anders zouden ze dood gaan aan de antibiotica die ze zelf

produceren). Kan het DNA voor deze antibioticaresistentie doorgegeven worden aan andere micro-organismen die aanwezig zijn in afvalwaterzuiveringsinstallaties? En kan dit bijdragen aan de toenemende antibioticaresistentie van ziekteverwekkende bacteriën?

“Antibioticaresistentie verspreidt zich als resistentiegenen en antibiotica samenkomen”

Horizontale genoverdracht

Het Leidse deel van het onderzoek richtte zich op de fundamentele mechanismen voor de uitwisseling van genetische informatie tussen micro-organismen, ook wel ‘horizontale genoverdracht’ genoemd. Welke genetische en fysiologische eigenschappen van micro-organismen bevorderen de overdracht van DNA? “Fundamentele onderzoeksvragen over de overdracht van genetische informatie tussen micro-organismen gingen in ons project hand in hand met veiligheidsonderzoek,” aldus Van Wezel. “Welke invloed hebben antibiotica op de verspreiding van antibioticaresistentie? Stel dat resistentiegenen of synthetische genconstructen om wat voor reden dan ook in het milieu terecht komen: wat zijn dan de gevolgen? Als antibioticaresistentie zich makkelijk tussen micro-organismen verspreidt, dan heb je een probleem.”

De onderzoekers vonden dat antibioticaresistentie zich efficiënt verspreidt in de aanwezigheid van antibiotica. Bacteriën zijn onder invloed van lichte antibioticadruk eerder geneigd om resistentiegenen op te nemen uit hun omgeving. Op die manier wordt de verspreiding van resistentiegenen bevorderd. Dit proces lijkt verder gestimuleerd te worden wanneer bacteriën hun celwand verliezen. Dat (tijdelijke) verlies van de celwand kan optreden wanneer bacteriën worden blootgesteld aan stressvolle condities, zoals blootstelling aan antibiotica die de aanmaak van de celwand verstoren. “Dit is iets waar bedrijven zich bewust van moeten zijn,” stelt een van de Leidse onderzoekers, Dennis Claessen.

Vreemd DNA in het afvalwater

In Delft richtte het onderzoek zich op de vraag wat er gebeurt als genetische informatie in het afvalwater terecht komt, bijvoorbeeld bij de productie van antibiotica. Onderzoeker David Calderón Franco deed promotieonderzoek naar het afdoden van micro-organismen in het lab. Uit het onderzoek blijkt dat de sterilisatietechnieken die vaak gebruikt worden om micro-organismen te doden niet altijd leiden tot totale vernietiging van het DNA. Calderón Franco kon met behulp van DNA-extractie en qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*, een standaardtechniek die gebruikt wordt om DNA te meten) stukken DNA uit het gesteriliseerde materiaal isoleren en vermeerderen. Samen met TU Delft collega’s David Weissbrodt, Mark van Loosdrecht en Thomas Abeel ontwikkelde hij een nieuwe techniek om vrij DNA uit afvalwater te isoleren en te analyseren. In labexperimenten bleken micro-

organismen in het afvalwater in staat synthetisch DNA uit hun omgeving op te nemen.

Van het lab naar de praktijk

Uit het onderzoek blijkt dus dat veelgebruikte sterilisatietechnieken niet altijd leiden tot totale vernietiging van DNA, en dat micro-organismen onder bepaalde omstandigheden dit DNA weer kunnen opnemen. Wat betekent dat voor de veiligheid? Moeten we ons zorgen maken? Volgens Van Wezel moeten we niet overdrijven: het is nog maar de vraag of de opname van antibioticaresistentiegenen ook daadwerkelijk optreedt buiten het laboratorium. Zo is het nog onduidelijk of de daadwerkelijke hoeveelheid antibiotica waaraan bacteriën in afvalwater worden blootgesteld, vergelijkbare concentraties hebben als de experimenten in het lab en dus hetzelfde effect geven. Daarnaast bleek uit het Leidse onderzoek dat informatie alleen wordt overgedragen aan nauw verwante bacteriën (het onderzoek keek naar vrijwel identieke *Streptomyces*-bacteriën). Horizontale genoverdracht tussen minder nauw verwante bacteriën is veel minder waarschijnlijk. Desalniettemin verdient het bestuderen van DNA-opname in natuurlijke systemen volgens de onderzoekers een nadere blik.

De bevindingen zijn reden om nader onderzoek te doen

De COGEM over de risico’s van antibioticaresistentie van micro-organismen

De Commissie Genetische Modificatie (COGEM) heeft zich eerder over de risico’s van antibioticaresistentie van micro-organismen gebogen. Volgens de COGEM is de kans verwaarloosbaar klein dat antibioticumresistentiegenen bij laboratoriumwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde bacteriën die van nature antibioticumresistentiegenen bevatten naar andere bacteriesoorten worden overgedragen en de bestrijding van ziekteverwekkers in gevaar brengen. De COGEM ziet dan ook geen reden om het werken met niet-ziekteverwekkende bacteriesoorten die van nature antibioticumresistentiegenen bevatten op een hoger inperkingsniveau in te schalen.



De onderzoekers benadrukken dat hun onderzoek zich richtte op de waarschijnlijkheid dat horizontale genoverdracht plaatsvond, niet op de feitelijke risico's. Het onderzoek laat zien dat cellen zonder celwand en micro-organismen in afvalwater onder antibiotische druk DNA kunnen opnemen. Maar of dat een probleem is, hangt van veel meer factoren af: welke genetische informatie bevatten de sequenties? Wordt het DNA ook daadwerkelijk hergebruikt? En door welke organismen?

“Het blijft een uitdaging om wetenschappelijke onderzoeksresultaten te vertalen naar bruikbare informatie voor de risicobeoordeling”

Toch zijn de bevindingen volgens de onderzoekers wel reden om nader onderzoek te doen. Van Wezel: “Stel dat we een nieuw antibioticum ontwikkelen. Als antibioticaresistentiegenen in het milieu terecht komen, dan zou antibioticaresistentie via horizontale genoverdracht kunnen toenemen. Je wilt niet dat deze genetische informatie zich naar ziekteverwekkende organismen verspreidt.” Ondanks het feit dat het onderzoek geen uitspraak doet over de feitelijke risico's, kan je volgens de onderzoekers wel stellen dat je niet onnodig genetische informatie over antibioticaresistentie in het milieu moet brengen. Onderzoekers en producenten moeten zich daarom bewust zijn waar het DNA uit hun onderzoeken terecht komt.

Project

Overdracht van antimicrobiële resistentiegenen en synthetisch DNA door transgene biosystemen in de natuur

Projectleider

Prof. dr. Gilles van Wezel

Projectpartners

Leiden Universiteit en TU Delft

Gebruikerscommissie

Scripps Institute of Oceanography (VS), J. Craig Venter Institute (VS), Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA), RIVM, BaseClear BV, CML Delft, COGEM, Ministerie van IenW

Looptijd

1 november 2017 tot 31 juli 2022

Van wetenschap naar beleid

Het onderzoek geeft wel aanwijzingen voor de mogelijke gevolgen van horizontale genoverdracht van antibioticatieresistentie, maar het blijft onduidelijk wat de feitelijke risico's zijn. Moeten beleidsmakers actie ondernemen? Deze vraag stond centraal in het overleg met de gebruikerscommissie, waaraan medewerkers van het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat, Bureau GGO van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) deelnamen.

De onderzoekers hebben veel geleerd van de interactie in de gebruikerscommissie. Ze ondervonden hoe lastig het is voor risicobeoordelaars om actie te ondernemen op basis van vermoedens. Het onderzoek biedt weliswaar inzicht in de mogelijkheid van horizontale genoverdracht, maar geeft geen doorslaggevend bewijs dat overdracht op deze manier plaatsvindt, of in hoeverre dat problematisch is. Om aanscherping van de regelgeving te rechtvaardigen is harder bewijs nodig. Het risico moet precies uitgedrukt worden: hoe waarschijnlijk is het dat genoverdracht in de natuur plaatsvindt? Via welke blootstellingsmechanismen? Wat is de blootstellingsduur? En wat zijn de gevolgen daarvan?

Onderzoeker Dennis Claessen zou daarom een uitgebreider experiment willen doen, waarin micro-organismen in een gecontroleerde omgeving worden blootgesteld aan grote hoeveelheden DNA. Dat zou een beeld kunnen geven van de mate waarin overdracht feitelijk voorkomt, en of die overdracht mogelijk een probleem vormt.

Om aanscherping van de regelgeving te rechtvaardigen is harder bewijs nodig

De onderzoekpraktijk en de risicobeoordelingspraktijk blijken niet altijd nauw op elkaar aan te sluiten. Onderzoeker Renée Kapteijn: “De informatie die je als nieuwsgierigheidsgedreven onderzoeker uit je resultaten haalt, is niet altijd de inbreng die risicobeoordelaars nodig hebben om de feitelijke risico's te beoordelen.” Calderón Franco voegt daaraan toe: “Als promotieonderzoeker hebben we slechts vier jaar om complexe wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Dat laat weinig ruimte om ook de risicobeoordelingsvraagstukken te beantwoorden: daarvoor zou je meer informatie over bijvoorbeeld blootstellingsmechanismen en blootstellingsduur moeten aanleveren.”

Als de onderzoekers in de toekomst vergelijkbaar onderzoek zouden doen, dan zouden ze het RIVM veel eerder betrekken: “Je zou iemand van het RIVM als mede-begeleider willen hebben. Die persoon kan van meet af aan helpen om de vragen in het vizier te houden die voor de risicobeoordeling relevant zijn. Je kunt dan bij het ontwerp van je experimenten al rekening houden met het type gegevens dat nodig is om de risico's te beoordelen.”



Nuttige schimmels

Hoe kan je CRISPR-Cas9 inzetten om industriële schimmels op een eenvoudige manier de gewenste eigenschappen mee te geven? Dat vroegen schimmelonderzoekers dr. Ewald Groenewald, prof. Ronald de Vries en prof. Pedro Crous zich af.

Knippen en plakken

Schimmels roepen over het algemeen niet de meest positieve associaties op. We denken al snel aan een beschimmelde boterham of een vervelende kwaal. Toch worden schimmels al sinds jaar en dag gebruikt om nuttige producten te maken. Denk maar aan Franse kaas of champignons.

De industriële biotechnologie doet daar nog een schepje bovenop. Schimmels worden zo aangepast dat ze allerlei nuttige producten maken. Bekende voorbeelden zijn antibiotica en enzymen voor een schonere was. De verbetering van schimmels voor industriële productie vond aanvankelijk plaats door de beste soorten te selecteren. Sinds de opkomst van de moleculaire biologie in de jaren '70 kunnen de schimmels veel gericht aangepast worden.

Het gebruik van CRISPR-Cas technologie in veel schimmels zit nog in de beginfase

De nieuwste ontwikkeling op dit gebied is *gene editing*, het gericht knippen en plakken van genetische informatie met behulp van CRISPR-Cas. Er wordt veel verwacht van deze nieuwe technologie voor de industriële biotechnologie. Door industriële micro-organismen nog nauwkeuriger aan te passen, komt de productie van allerlei enzymen, biochemicalïen en biologisch actieve verbindingen zoals nieuwe antibiotica in zicht. Toch zit het gebruik van CRISPR-Cas technologie in veel schimmels nog in de beginfase.

Dr. Ewald Groenewald, prof. Ronald de Vries en prof. Pedro Crous van het Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, een instituut van de

Koninklijke Nederlandse Academie voor Wetenschappen dat onderzoek doet naar schimmels, wilden weten hoe je CRISPR-Cas9 kan inzetten om industriële schimmels op een eenvoudige manier de gewenste eigenschappen mee te geven.

Ze voerden drie deelonderzoeken uit. Ten eerste ontwikkelden ze robuuste protocollen voor de toepassing van CRISPR-Cas9 technologie in verschillende schimmels. Ten tweede onderzochten ze hoe efficiënt deze technologie is voor het maken van complexe genetische modificaties in goed bestudeerde industriële schimmels. En ten derde beoordeelden ze de veiligheid van deze technologie. Daarbij keken ze vooral of het knippen en plakken met behulp van CRISPR-Cas9 ook tot onverwachte effecten elders op het genoom leidde (de zogeheten *off-target* mutaties).

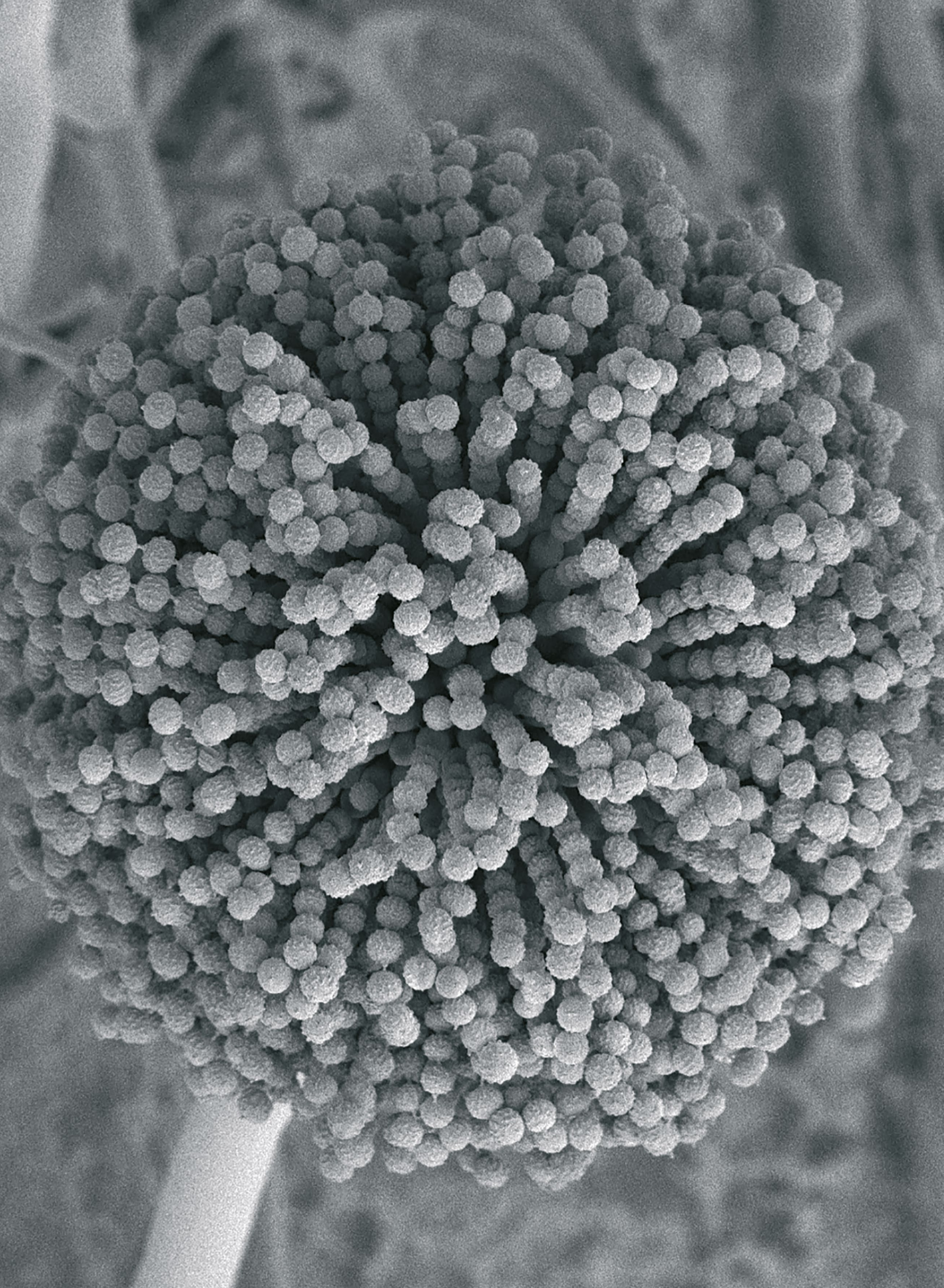
In hoeverre zijn aanpassingen in schimmelstammen terug te zien in volgende generaties?

Barcodes

De onderzoekers verkenden als onderdeel van het onderzoek naar de veiligheid ook de traceerbaarheid van de aanpassingen: in hoeverre zijn aanpassingen in schimmelstammen terug te zien in volgende generaties? Om de genetische aanpassing te markeren, voegden ze zogeheten 'barcodes' in. Dat zijn stukjes herkenbare genetische informatie die je op de plek van de aanpassing kunt inbouwen. Het voordeel van dit soort barcodes is dat je kunt nagaan wanneer *gene editing* heeft plaatsgevonden. Dat biedt ook een voordeel voor de ontwikkelaar: je kunt aantonen dat het jouw construct is, zodat eventueel gebruik door anderen herkenbaar is. Dit zorgt ervoor dat het intellectueel eigendom beschermd kan worden en concurrenten niet zomaar deze stam kunnen gebruiken, mochten ze deze in handen hebben gekregen.

Uitkomsten

Uit het onderzoek bleek dat *gene editing*-activiteiten eenvoudig te traceren zijn met behulp van bekende barcodes die tijdens het proces geïntroduceerd zijn. Volgens de Vries is het denkbaar dat barcodes in de toekomst nodig zijn om een vergunning voor de modificatie van schimmels te krijgen. Bij onderzoek met ziekteverwekkende schimmels



zou dat kunnen helpen om de gemodificeerde stammen goed te kunnen monitoren. Toch verwacht hij niet dat deze barcodes algemeen toegepast zullen worden. Onderzoekers en bedrijven benadrukken vooral de nadelen van deze techniek, zoals de noodzaak om extra ingrepen in het genoom te plegen.

Het onderzoek laat verder zien dat er geen grote verschillen zijn in de aanpassing van schimmels met en zonder CRISPR-Cas9. Er zijn geen aanwijzingen dat de toepassing van CRISPR-Cas9 meer *off-target* mutaties veroorzaakt. De betrouwbaarheid van stamontwikkeling (zowel met CRISPR-Cas9 als met andere methoden) hangt sterk af van de genetische achtergrond van de stam. De meeste *off-target* mutaties ontstaan door een reparatiesysteem dat van nature bij schimmels voorkomt, dat *Non Homologous End Joining* (NHEJ) genoemd wordt. Schimmelgenomen zijn constant onderhevig aan willekeurige mutaties. Om die mutaties te repareren hebben schimmels dat reparatiesysteem. NHEJ zorgt ervoor dat mutaties gerepareerd worden en de stam deze mutaties overleeft. Maar dat reparatiesysteem leidt wel tot allerlei onbekende mutaties, die mogelijk ongewenste effecten hebben. Als het reparatiesysteem wordt uitgeschakeld, dan vinden veel minder willekeurige mutaties plaats. Schimmels met een defect NHEJ-systeem zijn dus minder gevoelig voor ongewenste mutaties dan wildtype schimmels. Daarom raden de onderzoekers aan om dit systeem aan het begin van een stamontwikkelingsproces als eerste uit te schakelen.

Volgens De Vries levert CRISPR-Cas geen grote risico's: "Met *gene editing* kan je veel gericht en efficiënter stammen verbeteren, omdat tijdens de 'traditionele' verbetering van stammen enorm veel mutaties plaatsvinden waar je geen zicht op hebt. Met *gene editing* zou je het NHEJ-systeem uit je schimmel kunnen halen, dan je stamverbetering doen, en daarna weer NHEJ terug in je stam kunnen plaatsen als dit gewenst is: het risico op mutaties tijdens de stamontwikkeling is dan veel lager, evenals de kans op bijwerkingen."

Het risico op mutaties is bij gene editing veel lager, en je hebt geen bijwerkingen

Wel moeten de bevindingen uit het onderzoek volgens De Vries eerst herhaald worden in andere schimmels voordat je iets kunt zeggen over de algemene geldigheid van de resultaten. Daarvoor is verder onderzoek nodig.

Lichtere beoordelingsregimes?

De onderzoekers zien in het onderzoek aanknopingspunten voor aanpassingen in de regelgeving rond biotechnologie. Volgens De Vries kan de risicobeoordeling voor bepaalde toepassingen eenvoudiger als blijkt dat de risico's laag zijn.

< Foto van een schimmel onder de microscoop

Bepaalde typen modificaties die bewezen veilig zijn, zouden dan niet meer onder de strenge Europese ggo-regelgeving hoeven te vallen. De Vries: "We moeten meer genuanceerd kijken naar de risico's. Welke veranderingen aan welke organismen accepteren we wel, en welke niet?"

Schimmels worden in de industriële biotechnologie in een gecontroleerde omgeving gebruikt (dit wordt in beleidstermen 'ingeperkt gebruik' genoemd). Maar ook bij ingeperkt gebruik worden nog wel beperkingen gesteld aan de toegestane aanpassingen in het genoom en de toepassing van aangepaste stammen en producten. Dit heeft volgens De Vries deels te maken met een risicobeoordeling die nu weinig onderscheid maakt in het type modificaties dat uitgevoerd wordt.

"We moeten meer genuanceerd kijken naar de risico's"

Volgens De Vries is biotechnologie hard nodig om de maatschappelijke uitdagingen van deze tijd het hoofd te bieden: "We kunnen de problemen niet meer met natuurlijke variatie alleen oplossen. Onze gewassen in de akkerbouw zullen aangepast moeten worden aan de klimaatverandering. We hebben gewassen nodig die met droogte kunnen omgaan. Daar hebben we genetisch gemodificeerde organismen voor nodig omdat traditionele veredeling dit soort nieuwe gewassen niet snel genoeg kan ontwikkelen. Zelfs met behulp van genomediting zal het waarschijnlijk nog wel tien tot vijftien jaar duren om een nieuw gewas kunnen ontwikkelen. Met de huidige regelgeving komen daar nog jaren bij voordat die gewassen goedgekeurd zijn. De vraag is of we zo lang hebben, gezien het tempo van de klimaatverandering."

Project

Op weg naar veilige toepassingen van de CRISPR-Cas9-technologie in schimmels

Projectleider

Dr. Ewald Groenewald

Projectpartners

Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

Gebruikerscommissie

Wageningen University & Research,
Ministerie van IenW, RIVM, Concordia
University (CAN), BRAIN AG (DE)

Looptijd

1 september 2017 tot 30 april 2022





Nieuwe aardappelrassen met *gene editing*

Potato, patato

Is een nieuw aardappelras ontwikkeld met behulp van *gene editing* net zo veilig als bestaande rassen? Hoe meet je de verschillen? En wat zeggen die verschillen over de voedselveiligheid? Dat onderzocht een Wageningse onderzoeksteam onder leiding van plantenbiotechnoloog Richard Visser.

Betere gewassen

Richard Visser is hoogleraar plantenveredeling aan de Wageningen University & Research. Hij doet al sinds 1989 onderzoek naar de verbetering van gewassen. Denk aan aardappelen die minder snel ziek worden, beter smaken of langer houdbaar zijn. Plantenveredeling gaat over het vergroten van de genetische variatie: immers, hoe meer variatie, hoe meer eigenschappen om uit te kiezen. Visser is dan ook enthousiast over de mogelijkheden van *gene editing*. CRISPR-Cas maakt het mogelijk om heel gericht genetische veranderingen aan te brengen. Dat maakt het veel eenvoudiger om planten zoals aardappelen, die een lange veredelingstijd kennen, sneller de gewenste eigenschappen te geven.

De meest simpele toepassing van *gene editing* is het uitschakelen van ongewenste eigenschappen. CRISPR-Cas werkt dan als een moleculaire schaar: het knipt het gen voor de ongewenste eigenschap kapot, zodat het niet meer actief is. Een andere mogelijkheid is om niet-werkzame genen te repareren door specifieke basen in het DNA te veranderen. CRISPR-Cas heeft een revolutie in de plantenveredeling veroorzaakt. De ontwikkeling van een nieuw aardappel- of fruitras kan met traditionele veredelingstechnieken tot wel 25 jaar duren. Met CRISPR-Cas gaat het veel sneller. *Gene editing* biedt dus enorme kansen voor de plantenveredeling. Maar de toepassing is vooral nog aan strenge regels gebonden. *Gene edited* planten vallen onder de Europese regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen.

Technieken vergelijken

Om de veiligheid van nieuwe veredelingstechnieken zoals *gene editing* te bepalen, vergeleken de Wageningse onderzoekers de veiligheid van gewassen die ontwikkeld zijn met behulp van nieuwe veredelingstechnieken met een referentiecollectie van gewassen uit de klassieke veredeling.

De centrale gedachte achter het onderzoek was om de verschillen te meten in een breed scala van metabolieten. Metabolieten zijn de inhoudsstoffen van de plant. Belangrijke eigenschappen van gewassen, zoals smaak en voedingswaarde maar ook de giftigheid hangen samen met de aan- of afwezigheid van bepaalde metabolieten. Het onderzoeksteam wilde weten: in hoeverre vallen de verschillen tussen gewassen die ontwikkeld zijn met nieuwe veredelingstechnieken en de referentiegewassen binnen de bandbreedte van de normale variatie die er bestaat tussen referentierassen onderling? En kan deze zogenaamde equivalentietoets gebruikt worden als screening voor de beoordeling van de veiligheid van het gewas?

Onderzoekers Jack Vossen en Daniel Monino Lopez ontwikkelden met behulp van *gene editing* Phytophthoraresistente aardappelen. Phytophthora, ook wel de aardappelziekte genoemd, is een waterschimmel die de aardappelplant ernstig aantast en zich razendsnel verspreidt. De ziekte leidt tot grote maatschappelijke en economische schade. In de 19e eeuw veroorzaakten achtereenvolgende uitbraken van de aardappelziekte hongersnood in Ierland. Veel Ieren werden daardoor gedwongen om naar Amerika te emigreren. Ook vandaag nog wordt de aardappeloogst geplaagd door Phytophthora. Er wordt daarom veel onderzoek gedaan om gewassen te kweken die resistent zijn tegen deze ziekte. Veel wilde aardappelsoorten zijn resistent tegen Phytophthora dankzij een lange co-evolutie met de ziekteverwekker. Met behulp van CRISPR-Cas probeerde het onderzoeksteam de 'slapende' genen die al aanwezig zijn in vatbare aardappelrassen te activeren om zo de plant resistent te maken.

De nieuwe Phytophthoraresistente aardappelrassen werden vervolgens aan de hand van hun metabolieten vergeleken met andere bestaande commerciële aardappelrassen die al lang op de markt zijn. Onderzoekers Gwen Leday, Jasper Engel en Hilko van der Voet ontwikkelden nieuwe statistische methoden voor de equivalentietoetsing van een reeks aan metabolieten. Uit de vergelijking kwam naar voren dat de metabolieten in de aardappelen van de nieuw gemaakte rassen vergelijkbaar waren met die van de bestaande aardappelrassen.

Protocol

De nieuwe equivalentietoetsen kunnen een bijdrage leveren aan de beoordeling van de voedselveiligheid van ggo's. Dat was precies het doel van dit onderzoeksprogramma, namelijk om verbeterpunten te identificeren in de methodes die de Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (oftewel EFSA, de *European Food Safety Authority*) gebruikt om de veiligheid van ggo's te beoordelen. EFSA gebruikt nu al een eerdere versie van dit soort equivalentietoetsen voor een beperkte verzameling metabolieten om de samenstelling van nieuwe gewassen met bekende gewassen te vergelijken.

Als het nieuwe gewas binnen de bandbreedte van de bekende gewassen valt, dan worden deze nieuwe rassen als even veilig beoordeeld als reeds bekende rassen. Als ze buiten de grenzen van acceptabele variatie vallen, vraagt EFSA om aanvullende veiligheidstoetsen. Visser: "Maar er zijn wel honderden tot duizenden stofjes die je zou kunnen meten. Daarom was een aanscherping van de statistische methode nodig. De echte vraag moet zijn: is het zinvol? Moeten we alles meten wat we kunnen? In hoeverre is de voedselveiligheid erbij gebaat? Testen blijft nodig, maar plattesten omdat je de tests nu eenmaal kunt doen, gaat te ver." Het vernieuwde protocol is aan EFSA voorgesteld. EFSA is op dit moment terughoudend met technische vernieuwing gezien de lopende discussie over veredelingstechnieken in Europa. Toch vindt Visser het belangrijk om input te geven: "EFSA bepaalt of ze het opnemen of niet."

Van proces naar product

Visser ziet de Europese ggo-regelgeving dan ook als het grote struikelblok. Op dit moment vallen *gene edited* planten onder de ggo-regelgeving (zie kader), maar volgens Visser is het stilleggen van genen via CRISPR-Cas uiteindelijk niet te onderscheiden van natuurlijke

Project

Onderzoek naar de veiligheid door ontwerp (*safety by design*) in nieuwe plantenveredelingstechnieken door het vergelijken van modificaties op basis van natuurlijke genen met klassieke veredelingsmethoden.

Projectleider

Prof. dr. Richard Visser

Projectpartners

Wageningen University & Research

Gebruikerscommissie

NAV, Avebe, Stichting Wageningen Research, HZPC, C. Meijer BV, Averis Seeds BV, Plantum, COGEM, RIVM, Ministerie van IenW

Looptijd

31 december 2017 tot 31 januari 2023

mutatie of traditionele veredelingstechnieken zoals bestraling. Het valt dus niet goed te controleren of nieuwe gewassen tot stand gekomen zijn met behulp van nieuwe dan wel klassieke veredelingstechnieken. Hij is bezorgd dat Europa wordt ingehaald: "De buitenwereld staat niet stil en veel landen hebben hun regels al aangepast. Zelfs landen als Japan en Korea die strikte wetgeving voor ggo's hebben, veranderen van positie en stellen bepaalde toepassingen vrij. De vraag is: als die producten straks op de Europese markt komen, hoe ga je er dan mee om?"

New Breeding Technologies: Europese ontwikkelingen

In Europa woedt al langer een discussie over de vraag of gewassen die gemaakt zijn met behulp van moderne mutagenesetechnieken zoals *gene editing* onderhevig zijn aan de strenge verplichtingen van de Europese ggo-regelgeving. In juli 2018 deed het Europese Hof van Justitie uitspraak over deze vraag. Het Hof stelde dat gewassen verkregen door moderne technieken als *gene editing* niet vrijgesteld zijn van de verplichtingen van Richtlijn 2001/18, die bepaalt dat ggo's niet zonder vergunning in het milieu mogen worden geïntroduceerd of op de markt gebracht.

De Hofuitspraak leidde tot uiteenlopende reacties. De voorstanders van *gene editing* waren vooral teleurgesteld. Zij wijzen erop dat gewassen die gemaakt zijn met moderne precisietechnieken aan de strenge Europese milieueisen moeten voldoen, terwijl gewassen die gemaakt zijn met behulp van conventionele technieken zoals bestraling of chemische behandeling wel vrijgesteld zijn, omdat deze mutagenesetechnieken volgens het Hof hun veiligheid reeds hebben bewezen. Maar die conventionele methodes zijn veel minder nauwkeurig.

Om de impasse in de vergunningsverleningspraktijk van de Europese ggo-regelgeving te doorbreken, zette de Europese Commissie een onderzoek op naar de status van nieuwe veredelingstechnieken. In 2021 concludeerde de Commissie dat de regelgeving niet langer in lijn is met de wetenschappelijke ontwikkelingen (de ggo-richtlijn stamt uit 2001). Naar verwachting komt de Europese Commissie in de loop van 2023 met een voorstel voor nieuwe wetgeving.



Volgens Visser is het zinvoller om af te stappen van een regelgeving die gebaseerd is op de methode die gebruikt is. In plaats daarvan stelt hij een productgebaseerde benadering voor: "De Europese regelgeving is gebaseerd op technieken. Dus als je *gene editing* toepast, moet het gewas als ggo behandeld worden. Maar bij *gene editing* vind je de wijziging helemaal niet terug. Je moet kijken naar het product. Het maakt niet uit hoe je het maakt, maar wat je hebt gemaakt. Uiteindelijk zijn we als burger en consument gediend met producten waarvan we weten dat ze veilig zijn."



De effectiviteit van *gene editing* in planten

CRISPR-Cas: precies pas?

Met *gene editing* kan je het genetisch materiaal van planten naar believen knippen en plakken.

Maar hoe specifiek werkt deze nieuwe gentechniek nu eigenlijk? Zijn er ook onverwachte bijwerkingen?

Dat wilde het onderzoeksteam onder leiding van plantenbiotechnoloog Gerco Angenent weten.

Ze verkenden de mogelijke onvoorziene gevolgen van CRISPR-Cas in tomaat en zandraket.

Knutselen met DNA

CRISPR-Cas is een nieuwe gentechniek die het mogelijk maakt om erfelijk materiaal op relatief eenvoudige wijze te veranderen. Het is letterlijk knippen in DNA om eigenschappen te veranderen. Maar hoe weten we of dat knippen door CRISPR-Cas niet tot onvoorziene gevolgen leidt? Met andere woorden: hoe specifiek is deze techniek? Dat onderzocht het onderzoeksteam onder leiding van prof. dr. Gerco Angenent, groepsleider Plant Developmental Systems aan de Wageningen University & Research.

Het onderzoeksteam onderzocht hoe efficiënt en nauwkeurig CRISPR-Cas is in tomaat en zandraket (*Arabidopsis thaliana*, een veelgebruikte modelplant). Het doel was om beter zicht te krijgen op eventuele onbedoelde veranderingen in het DNA als gevolg van deze nieuwe veredelingsstechniek. Een beter beeld van de mogelijke onbedoelde gevolgen van *gene editing* zou ook kunnen helpen bij de beoordeling van de risico's van *gene edited* planten.

Worst case scenario

De onderzoekers brachten eerst – bij wijze van *worst case scenario* – in kaart wat mogelijke onverwachte gevolgen van CRISPR-Cas zouden kunnen zijn. Een van de mogelijkheden is dat CRISPR-Cas zogeheten 'off-target'-mutaties veroorzaakt. Dat zijn veranderingen op andere plekken in het genoom dan waar een CRISPR-Cas-aanpak zich op richt, de zogenaamde 'target'. Een andere mogelijkheid is dat er zoveel in het genoom geknipt wordt dat het genoom zelf instabiel wordt, of zelfs een heel chromosoom (de drager van het erfelijk materiaal van een organisme) verloren gaat. Of andersom, dat er een groter stuk

genetische code wordt ingeplakt dan bedoeld. En tenslotte zou herschikking van de basenparen in het genoom kunnen plaatsvinden.

Niet voorspelbare off-targets door CRISPR-Cas zijn uiterst zeldzaam

Vervolgens probeerde het team van Angenent vast te stellen in hoeverre deze effecten ook daadwerkelijk optreden. Ze deden proeven in het lab en ze verkenden de bestaande literatuur op het gebied van *gene editing* om erachter te komen welke onbedoelde veranderingen plaatsvonden, hoe vaak dat gebeurde, en op welke plek in het genoom.

Kleine deleties

Uit het onderzoek bleek dat *off-target* mutaties door CRISPR-Cas wel plaatsvinden, maar in alle gevallen op een voorspelbare manier: op plaatsen in het genoom die lijken op het DNA van de target. Het onderzoeksteam ontwikkelde een methode om plekken op het genoom te vinden waar DNA-breuken, en dus mogelijk *off-target* mutaties, plaatsvinden. Deze methode, GUIDE-seq, kan breuken over het hele genoom identificeren. GUIDE-seq is onbevooroordeeld (*unbiased*): waar de meeste onderzoeken alleen zoeken naar mutaties op de plekken in het genoom die lijken op de *target site*, kijkt GUIDE-seq naar het hele genoom.

Niet elke breuk leidt tot modificatie

Met behulp van GUIDE-seq werden zeer sporadisch DNA-breuken geconstateerd op andere plekken in het genoom, maar het was niet mogelijk een onderscheid te maken tussen breuken die van nature ontstaan in het DNA en de breuken die CRISPR-Cas veroorzaakt. In planten die niet in aanraking waren geweest met CRISPR-Cas bleken net zo veel breuken plaats te vinden. Daar komt nog bij dat niet elke breuk tot een modificatie leidt. De onderzoekers concludeerden hieruit dat niet voorspelbare *off-targets* door CRISPR-Cas uiterst zeldzaam zijn en zeker niet meer voorkomen dan breuken of veranderingen in het DNA die van nature voorkomen, bijvoorbeeld bij het kruisen van rassen in een veredelingsprogramma.



Voorspelbare locaties

Bij conventionele mutagenesetechnieken zoals bestraling of chemische behandeling vinden veel meer willekeurige mutaties plaats, met onduidelijke gevolgen. Overigens vindt na klassieke mutagenese selectie plaats van de geschikte plantenlijnen. Lijnen met onduidelijke gevolgen en met consequenties voor smaak, veiligheid, worden niet doorontwikkeld tot een commercieel ras.

De *off-target* mutaties van *gene editing* blijken ook op voorspelbare locaties plaats te vinden, namelijk op plekken waar de volgorde van baseparen in het DNA lijkt op de volgorde waar het Cas-systeem knipt. Wel waren er aanwijzingen dat CRISPR-Cas in sommige gevallen meer wegknipt dan voorzien, maar bij die mogelijk grotere deleties ontstonden geen levensvatbare planten.

De kans op *off-targets* kan volgens de onderzoekers verder verkleind worden door het Cas-systeem nog nauwkeuriger te programmeren, zodat alleen de *target* geknipt wordt. Ook zijn de onbedoelde effecten op te sporen door de volledige genoomsequentie van de nieuwe planten te analyseren.

De frequentie van *off-target* mutaties bij CRISPR-Cas is niet hoger dan wat er van nature in een genoom voorkomt

Toekomstige regelgeving?

Gene editing lijkt op basis van dit onderzoek dus nauwkeuriger dan klassieke veredelingsstechnieken. Onbedoelde effecten zijn zeldzaam, en zijn niet te onderscheiden van kleine DNA veranderingen die van nature voorkomen. CRISPR-Cas zou dus veilig gebruikt kunnen worden in de plantenveredeling. In hoeverre helpt deze kennis regelgevers en risicobeoordelaars bij het opstellen van voorstellen voor toekomstige regelgeving op dit gebied?

Vooralsnog lopen de meningen van experts uiteen: er gaan geluiden op om een versimpelde *case-by-case* veiligheidsbeoordelingsprocedure te ontwikkelen voor *gene edited* planten, gezien de lage kans op *off-target* mutaties. Anderen zijn van mening dat meer onderzoek nodig is naar de mogelijke *off-target* effecten van *gene editing*.

Het wachten is op de nieuwe voorstellen van de Europese Commissie over de status van nieuwe gentechnieken voor plantenveredeling (zie kader). In de tussentijd is de groep van Angenent hard aan het werk om via nationale en Europese onderzoeksprojecten de overgebleven kennisleemtes op te vullen. Daarbij helpt het de onderzoekers als beleidsmakers helder aangeven welke vragen zij nog hebben.

Project

Specificiteit en bijwerkingen van mutagenese met behulp van nuclease-geïnduceerde breuken en Cas9-gemedieerde bewerkingen van het epigenoom in planten: identificatie en analyse van risico's en inbouw van intrinsieke veiligheid.

Projectleider

Prof. dr. Gerco Angenent

Projectpartners

Wageningen University & Research, Universiteit van Leiden

Gebruikerscommissie

Plantum, Wageningen Food Safety Research (voorheen RIKILT), Sciensano (BE), Vlaams Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) (BE), Vrije Universiteit Amsterdam, Ministerie van IenW, RIVM

Looptijd

1 november 2017 tot 30 november 2022

Wie is wie in biotechnologie?

Verscheidende instanties op nationaal en Europees niveau zijn betrokken bij de veiligheidsregelgeving, risico-beoordeling, vergunningverlening, toezicht en handhaving voor onderzoek en toepassingen van biotechnologie.

Voor Nederland zijn dat onder andere:

IenW: Het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat is verantwoordelijk voor een schone en veilige leefomgeving. Ook voor de veiligheid van biotechnologie en ggo's.

COGEM: De Commissie Genetische Modificatie adviseert de Nederlandse regering over mogelijke risico's van werkzaamheden met ggo's voor mens en milieu. Bureau GGO kan de COGEM ook om advies vragen als er vragen zijn over een vergunningaanvraag. Ook informeert de COGEM over ethische en maatschappelijke onderwerpen rond genetische modificatie.

RIVM: Het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu zet zich in voor een gezonde bevolking in een gezonde leefomgeving. Het RIVM doet onafhankelijk wetenschappelijk onderzoek naar gezondheid, zorg, milieu en veiligheid. Het RIVM signaleert ontwikkelingen op het gebied van biotechnologie, de veiligheid van ggo's, risicobeoordelingen en vergunningverlening en adviseert de verschillende ministeries daarover.

Bureau GGO: Bureau GGO van het RIVM voert de ggo-vergunningverlening uit. En is het aanspreekpunt voor alle betrokken partijen die werken met ggo's. Bureau GGO beoordeelt voor ingeperkt gebruik de kennisgevingen en verzorgt de vergunningverlening voor werkzaamheden met ggo's. Voor introductie in het milieu en marktaanvragen verzorgt Bureau GGO alle inhoudelijke voorbereidingen, waaronder de risicobeoordeling. Daarnaast is Bureau GGO het aanspreekpunt voor alle betrokken partijen bij werkzaamheden met ggo's en ondersteunt Bureau GGO het ministerie van IenW in hun beleid. Bureau GGO bevordert de koppeling tussen het beleid en de regelgeving aan de ene kant en signalen uit de praktijk aan de andere kant.

CCMO: De Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek waarborgt de bescherming van proefpersonen bij medisch-wetenschappelijk onderzoek. Dat doet de CCMO door toetsing aan de wettelijke bepalingen en met inachtneming van het belang van de voortgang van de medische wetenschap.

ILT: De Inspectie Leefomgeving en Transport houdt toezicht en kan handhaven op het veilig gebruik van ggo's in laboratoria, bij veldproeven, bij onderzoek met genterapie en door controles op importstromen.

NVWA: De Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit houdt toezicht op de veiligheid van voedsel en consumentenproducten, dierenwelzijn en natuur. Wanneer zij in een levensmiddel een niet-toegelaten ggo of een fout geëtiketteerd ggo vindt, zal de NVWA hierop handhaven.

TTW: De Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) is de belangrijkste Nederlandse wetenschapsfinancier. Het NWO-domein Toegepaste en Technische Wetenschappen (TTW) zet zich in voor het bevorderen van technisch-wetenschappelijk onderzoek met toepassing en impact voor mens en maatschappij.

Op Europees niveau zijn andere instanties betrokken, waaronder:

EU: De Europese Unie (EU) stelt eisen aan de activiteiten met ggo's. Dat doet het in verordeningen en richtlijnen. De verordeningen gelden rechtstreeks in alle EU-landen. De richtlijnen worden verwerkt in de nationale wetgeving van de lidstaten.

EFSA: De European Food Safety Authority is verantwoordelijk voor de risicobeoordeling van genetisch gemodificeerde gewassen op de Europese markt.

EMA: De European Medicines Agency is verantwoordelijk voor de toelating van geneesmiddelen op de Europese markt.

Colofon

Het onderzoeksprogramma Biotechnologie en Veiligheid

Om voorbereid te zijn op nieuwe technieken en toepassingen van biotechnologie heeft het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat in samenwerking met NWO-domein Toegepaste en Technische Wetenschappen een onderzoeksprogramma opgezet: 'Biotechnologie en Veiligheid'. Met dit programma wilde het ministerie de kennis verzamelen om nieuwe en toekomstige toepassingen van biotechnologie goed te kunnen beoordelen op hun veiligheid voor mens, dier en milieu.

Met dit programma zijn van 2018 tot 2023 tien onderzoeksprojecten gefinancierd. Deze projecten onderzochten mogelijk nadelige effecten, gevaren en risico's van nieuwe en toekomstige biotechnologische toepassingen en spitsten zich toe op verschillende thema's binnen de medische, agrarische en industriële sector. Daarnaast richtten de onderzoeken zich op inherente veiligheid van biotechnologie, waarbij wetenschappers bij het bedenken en ontwerpen van nieuwe technieken al stilstaan bij veiligheid en die veiligheid inbouwen in de nieuwe techniek. Een groot aantal kennisinstellingen en andere partijen uit binnen-, maar ook buitenland werkten aan deze projecten.

Dit magazine kwam tot stand in opdracht van het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat. Het geeft een beeld van de opbrengsten van de tien onderzoeksprojecten. De verzamelde gegevens en inzichten kunnen dienen als richtsnoer voor nieuwe wet- en regelgeving en voor toekomstbestendig beleid op het gebied van biotechnologie.

Tekst, samenstelling en opmaak

Daan Schuurbijs en Emily van de Vijver
De Proeffabriek

Beeld

Cover	Natali_Mis/Shutterstock.com
Pagina 8	Eigen collectie Rathenau Instituut
Pagina 11	Jose Luis Calvo/Shutterstock.com
Pagina 12	Dr. Norbert Lange/Shutterstock.com
Pagina 14	Kateryna Kon/Shutterstock.com
Pagina 16	MattL_Images/Shutterstock.com
Pagina 19	Roman Moskalenko
Pagina 20	Fotogrin/Shutterstock.com
Pagina 23	Natali_Mis/Shutterstock.com
Pagina 26	Rattiya Thongdumhyu/Shutterstock.com
Pagina 30	Eigen collectie Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
Pagina 32	mihalec/Shutterstock.com
Pagina 36	Lightspring/Shutterstock.com

Dit is een uitgave van het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
Rijnstraat 8 | 2515 XP
Postbus 20901 | 2500 EX | Den Haag

www.rijksoverheid.nl/ienw
Mei 2023