

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

DATUM 16 juni 2009
KENMERK CGM/090616-02
ONDERWERP Aanbieding signalering 'Zinkvinger aan de pols; ontwikkelingen en implicaties van de zinkvingertechnologie'

Geachte mevrouw Cramer,

Hierbij bied ik u de signalering "Zinkvinger aan de pols; ontwikkelingen en implicaties van de zinkvingertechnologie" aan.

Samenvatting:

De COGEM monitort voortdurend op nieuwe technieken binnen de biotechnologie. In dit kader signaleert zij een nieuwe ontwikkeling binnen de genetische modificatie: de zinkvingertechnologie. In de onderhavige signalering geeft de COGEM een globaal overzicht van de ontwikkelingen op dit gebied. Daarnaast wordt aandacht besteed aan potentiële risico's van zinkvingers en aan de mogelijke gevolgen van zinkvingers voor de regelgeving omtrent genetisch gemodificeerde organismen (ggo's).

Met zinkvingers wordt het mogelijk om erfelijk materiaal op een zeer gerichte wijze te veranderen. Deze technologie is daarom veelbelovend en kan voor zowel de medische sector als de plantenbiotechnologie van groot belang zijn. Daarnaast komen nu de eerste praktische toepassingen in zicht.

Vanuit het werkveld zijn mogelijk vragen te verwachten of het gebruik van zinkvingers al dan niet onder de ggo-regelgeving valt. Van een aantal werkzaamheden is het aannemelijk dat deze onder de regelgeving zullen vallen. Echter, er is één toepassing die meer aandacht behoeft, namelijk het gebruik van zogenaamde zinkvingernucleases die als eiwit aan een gastheercel worden toegediend. Hierbij worden wijzigingen in het erfelijke materiaal van de cel aangebracht, waardoor er sprake is van genetische modificatie. Echter, deze werkzaamheden vertonen overeenkomsten met een techniek die al vele jaren geleden is vrijgesteld van de ggo-regelgeving, de chemische mutagenese. Het is dus de vraag of het gebruik van zinkvingernucleasen in eiwitvorm wel onder de regelgeving moet vallen.

In Europa is een werkgroep opgericht die onder meer onderzoekt of een aantal technieken onder de ggo-regelgeving moeten vallen. Deze werkgroep besteedt ook aandacht aan de zinkvingertechnologie. De onderhavige signalering kan een bijdrage leveren aan het bepalen van een standpunt over zinkvingers.

De volledige signalering treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

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

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Zinkvinger aan de pols

Ontwikkelingen en implicaties van de zinkvingertechnologie

COGEM signalering CGM/090616-02

Commissie Genetische Modificatie (COGEM)

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

Samenvatting

Sinds de jaren '70 van de vorige eeuw is het met genetische modificatie mogelijk om erfelijk materiaal op een gewenste manier te veranderen. Maar het blijkt nog een uitdaging om de wijziging op de juiste plaats in het genoom aan te brengen. Vaak worden namelijk ook op ongewenste plaatsen in het genoom veranderingen aangebracht. De komst van nieuwe technieken kunnen dit nadeel ondervangen. Een voorbeeld hiervan is de zogenaamde *zinc finger*-technologie. Een *zinc finger* (oftewel zinkvinger) is een DNA-bindend eiwit dat specifieke basenvolgorde in het DNA herkent en hieraan bindt. Bij de ontdekking van de eerste zinkvinger kon nog niet vermoed worden dat twintig jaar later het gebruik van deze zinkvingers door velen zou worden gezien als een mogelijke doorbraak binnen de genetische modificatie. Wetenschappers verwachten namelijk dat het met deze eiwitten mogelijk wordt om erfelijk materiaal zeer gericht én zeer efficiënt te wijzigen.

Zowel de medische sector als de plantenbiotechnologie zetten hoog in. Wetenschappers proberen de techniek steeds verder te verbeteren en de eerste praktische toepassingen komen in zicht. De COGEM wil de overheid met deze signalering op de hoogte brengen van de ontwikkelingen op dit gebied en mogelijke beleidsimplicaties hiervan.

Het is onduidelijk of de toepassing van zinkvingers in alle gevallen onder de regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vallen, of moeten vallen. Er lijken overeenkomsten te zijn met technieken die zijn vrijgesteld van de regelgeving. Omdat dit tot vragen vanuit het werkveld zou kunnen leiden, besteedt de COGEM in deze signalering ook aandacht aan de regelgeving.

Om erfelijk materiaal te veranderen, wordt een zinkvinger gekoppeld aan een zogenaamd effectoreiwit. Veel gebruikte effectoreiwitten zijn nucleasen of transcriptiefactoren. Een complex van een zinkvinger met een nuclease wordt zinkvingernuclease genoemd en een complex van een zinkvinger met een transcriptiefactor wordt aangeduid als zinkvingertranscriptiefactor. Wanneer een dergelijk complex bindt aan het genoom dan wordt het erfelijke materiaal op, of bij, de bindingsplaats veranderd (zinkvingernuclease) of wordt de expressie van genen beïnvloedt zonder het DNA te wijzigen (zinkvingertranscriptiefactor). Dit alles maakt zinkvingers belangrijk voor bijvoorbeeld het herstellen van fouten in het DNA, het vervangen van genen en het stimuleren of remmen van de expressie van specifieke genen.

Onderzoekers zetten zinkvingers in bij een breed scala aan toepassingen. Zo onderzoekt de medische sector het gebruik van zinkvingergenen als genterapeutikum. Ook wordt getracht met zinkvingers een therapie voor aids te ontwikkelen. De plantenbiotechnologie probeert met zinkvingers onder meer infecties met virussen te remmen. Daarnaast willen wetenschappers eigenschappen van planten verbeteren, zoals het ontwikkelen van planten met een verbeterde voedingswaarde.

Voordat zinkvingers breed toepasbaar zullen worden, is een verdere verbetering van de techniek noodzakelijk. Momenteel is de specificiteit van de zinkvingers nog niet voldoende om slechts één plaats in het erfelijke materiaal te herkennen. Als een

zinkvinger op een specifieke plaats een verandering in het genoom teweegbrengt, kan dit mogelijk tot celschade leiden.

Omdat de ontwikkeling van de technologie zich nog relatief in het beginstadium bevindt, is er op dit moment weinig bekend over potentiële milieurisico's van zinkvingers. Naar de mening van de COGEM zijn risico's vergelijkbaar met die van andere modificatietechnieken. Ook bij deze technieken kunnen onbedoelde veranderingen in het genoom van een organisme ontstaan. Mogelijkerwijs zijn de risico's van het gebruik van zinkvingers kleiner dan bij gebruik van andere technieken omdat de wijze waarop zinkvingers veranderingen aanbrengen gericht is.

De vraag rijst of alle toepassingen van zinkvingers onder de regelgeving voor ggo's vallen. Om een antwoord te kunnen geven op deze vraag worden vier situaties onderscheiden. Dit onderscheid wordt gemaakt op basis van het werkingsmechanisme (het effectoreiwit) en toedieningsvorm van de zinkvingers aan een gastheercel. In de onderstaande tabel zijn de vier situaties uitgewerkt.

Werkingsmechanisme	Zinkvingernuclease		Zinkvingertranscriptiefactor	
	Toedieningsvorm	Eiwit	Nucleïnezuur	Eiwit
Effect	Verandering van sequentie	Verandering van sequentie	Regulatie van genen	Regulatie van genen
Opmerking	Methode vertoont overeenkomst met vrijgestelde technieken			Geen sequentie-verandering, maar wel een ggo, omdat nucleïnezuur wordt toegediend
GGO volgens Regelgeving?	waarschijnlijk	ja	nee	ja

Uit de tabel kan opgemaakt worden dat drie van de vier situaties hoogstwaarschijnlijk eenvoudig in te delen zijn. Echter, één situatie behoeft mogelijk meer aandacht. Dit betreft het gebruik van zinkvingernucleases welke in eiwitvorm aan een cel worden toegediend. Hierbij lijkt er sprake te zijn van genetische modificatie, aangezien veranderingen in het erfelijke materiaal worden aangebracht. Echter, er wordt geen nucleïnezuur in een cel gebracht en daarnaast vertonen de werkzaamheden vanuit wetenschappelijk oogpunt overeenkomsten met een techniek die al vele jaren geleden is vrijgesteld van de ggo-regelgeving, de chemische mutagenese. Een opmerkelijk verschil is dat zinkvingers op een zeer gerichte wijze veranderingen kunnen aanbrengen, terwijl met chemische mutagentia geen voorspellingen te doen zijn over de plaats van de mutaties. Het is dus de vraag of het gebruik van zinkvingernucleasen in eiwitvorm wel onder de regelgeving moet vallen.

Verder is het de vraag of werkzaamheden die leiden tot epigenetische veranderingen ook onder de ggo-regelgeving zullen of moeten vallen. In de epigenetica wordt de

sequentie van het erfelijke materiaal niet verandert, maar is het wel de intentie dat de modificatie zal worden doorgegeven aan nakomelingen.

De zinkvingertechnologie is een van de nieuwe technieken waarbij de grenzen tussen genetische modificatie en conventionele technieken vervagen. Door deze technieken komt de ggo-regelgeving onder druk te staan. Om politiek en beleid hierover te informeren, monitort de COGEM op nieuwe technieken. In dit kader heeft de COGEM in 2006 een signalering uitgebracht over het vervagen van grenzen bij nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie. Naar aanleiding daarvan is een Europese werkgroep opgericht die van een aantal technieken, waaronder zinkvingers, onderzoekt of deze onder de ggo-regelgeving moeten vallen. Deze signalering beoogt bij te dragen aan het bepalen van een standpunt van de regering en van de Europese werkgroep door te wijzen op de verschillen en overeenkomsten van de zinkvingers met andere nieuwe modificatie technieken. .

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
1 Inleiding.....	9
2 Zinkvingers lijken oplossing voor technische problemen	11
2.1 Zinkvingers herkennen fragmenten in het erfelijke materiaal	11
2.2 Zinkvingers veranderen en reguleren erfelijk materiaal gericht	12
2.2.1 Zinkvingernucleasen knippen DNA op een specifieke plaats	12
2.2.2 Zinkvingertranscriptiefactoren reguleren genexpressie specifiek.....	13
2.3 Zinkvingers worden op verschillende manieren toegediend aan een organisme.....	14
3 Zinkvingers kennen veelbelovende toepassingen.....	15
3.1 Zinkvingers bieden toepassingen in de medische sector	15
3.1.1 Toepassing van zinkvingernucleasen als genterapeuticum.....	15
3.1.2 Genregulatie door zinkvingertranscriptiefactoren als therapie	16
3.2 Zinkvingers bieden toepassingen in de plantenbiotechnologie	17
3.2.1 Verbetering zinkvingernucleasen en achterhalen van genfunctie.....	18
3.2.2 Zinkvingertranscriptiefactoren verbeteren eigenschappen van de plant.....	18
4 Off-target effecten en milieurisico's van zinkvingers verdienen aandacht	21
4.1 Gebruik van zinkvingers kent off-target effecten in het organisme	21
4.2 Off-target effecten zijn moeilijk aan te tonen.....	22
4.3 Milieurisico's van zinkvingertechnologie en overige modificatietechnieken komen overeen	22
5 Zinkvingers kunnen invloed hebben op de ggo-regelgeving.....	25
5.1 Vallen zinkvingers onder de ggo-regelgeving?	25
5.1.1 Het gebruik van zinkvingers in nucleïnevorm	25
5.1.2 Het gebruik van zinkvingers in eiwitvorm	26
5.2 Epigenetische veranderingen door zinkvingers	27
5.3 Versoepeling van de regelgeving voor zinkvingers misschien mogelijk.....	28
6 Conclusie	31
Referenties.....	33

1 Inleiding

Al sinds de jaren '70 van de vorige eeuw is het met genetische modificatie mogelijk om erfelijk materiaal specifiek te veranderen. Het blijkt echter nog een uitdaging om de gewenste wijziging op de juiste plaats aan te brengen.^{1,2} Vaak worden namelijk ook op ongewenste plaatsen veranderingen in het DNA aangebracht. Maar de wetenschappelijke ontwikkelingen verlopen in een hoog tempo en de komst van nieuwe technieken kunnen dit nadeel ondervangen. Een voorbeeld hiervan is de zogenaamde *zinc finger*-technologie.

In 1985 werden *zinc fingers* (oftewel zinkvingers), een bepaald soort eiwitten, voor het eerst ontdekt in klauwkikkers (*Xenopus laevis*).³ Toen kon nog niet vermoed worden dat twintig jaar later het gebruik van deze zinkvingers door velen zou worden gezien als een mogelijke doorbraak binnen de genetische modificatie. Wetenschappers verwachten dat het met deze eiwitten mogelijk wordt om erfelijk materiaal zeer gericht én zeer efficiënt te wijzigen.

De zinkvingertechnologie is veelbelovend en kan voor zowel de medische sector als de plantenbiotechnologie van groot belang zijn. Nu de eerste praktische toepassingen in het verschiet liggen, wil de COGEM de overheid op de hoogte brengen van deze interessante innovatie. Deze signalering gaat daarom in op de manier waarop zinkvingers werken, op (eventuele) toepassingen en op mogelijke aandachtspunten ter verbetering van de techniek.

De komst van nieuwe technologieën kan een aanleiding vormen voor vragen vanuit het werkveld omtrent de grenzen van de regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's). Mogelijk komt de regelgeving onder druk te staan. Om politiek en beleid hierover te informeren, monitort de COGEM op nieuwe technieken. In dit kader heeft de COGEM in 2006 een signalering over nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie uitgebracht.⁴ Deze signalering heeft geleid tot de oprichting van een Europese werkgroep die onder meer zal onderzoeken of een aantal technieken onder de ggo-regelgeving moeten vallen. Deze werkgroep besteedt ook aandacht aan de zinkvingertechnologie.

Of werkzaamheden met zinkvingers in alle gevallen onder de ggo-regelgeving vallen, is de vraag. Daarom zal de COGEM in deze signalering ook hierop ingaan. Daarnaast wordt aandacht besteed of versoepeling van de regelgeving voor de zinkvingertechnologie mogelijk aan de orde is. Met deze signalering wil de COGEM een bijdrage leveren aan een standpuntbepaling door de Nederlandse overheid en de werkzaamheden van de Europese werkgroep.

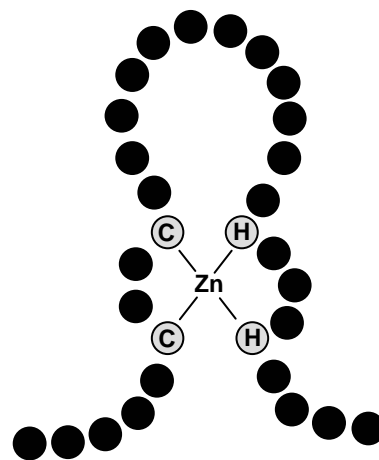
2 Zinkvingers lijken oplossing voor technische problemen

Zinkvingers herkennen specifieke DNA sequenties en zijn daarom van nut bij het veranderen van het erfelijke materiaal, zoals het herstellen van fouten, op gewenste plaatsen. Ook behoort het gericht toevoegen van DNA-fragmenten aan het genoom tot de mogelijkheden. Naast het veranderen van erfelijk materiaal, is het verder mogelijk om de genexpressie te reguleren. Zinkvingers lijken met dit alles een oplossing te vormen voor eventuele specificiteits- en efficiëntieproblemen van de gangbare genetische modificatietechnieken. Hoe werken zinkvingers eigenlijk?

2.1 Zinkvingers herkennen fragmenten in het erfelijke materiaal

‘Cys₂His₂ Zinkvingers’, kortweg zinkvingers, zijn van nature onderdeel van sommige zogenaamde transcriptiefactoren (factoren die betrokken zijn bij het proces waarbij de informatie in het DNA wordt vertaald in eiwitten) van de meeste eukaryoten. Recent is hun aanwezigheid ook aangetoond in prokaryoten.^{5,6} Een zinkvinger bestaat uit dertig aminozuren, die door een zink ion gestabiliseerd worden. De driedimensionale structuur van het eiwit doet denken aan een vinger, vandaar de naam zinkvinger (zie figuur 1).

Een zinkvinger is een DNA-bindend domein dat een specifieke volgorde van drie (of zelfs vier) basenparen in het erfelijke materiaal herkent.^{5,7} Naast de binding van zinkvingers aan DNA, zijn sommige zinkvingers in staat om aan RNA of eiwitten te binden.⁶



Figuur 1: schematische weergave van een zinkvinger.

Uit verder onderzoek is gebleken dat het koppelen van meerdere zinkvingers (tot zogenaamde zinkvingereiwitten), met elk een specifieke bindingsplaats, leidt tot zinkvingers die langere sequenties op een gerichte wijze herkennen. Dit verhoogt sterk de kans op het herkennen van een unieke sequentie in het genoom. Wetenschappers maken momenteel veelal gebruik van drie tot vier aan elkaar gekoppelde zinkvingers, waardoor het mogelijk is om fragmenten van negen en twaalf basenparen te herkennen. Het koppelen van zes of zeven zinkvingers zou voldoende moeten zijn om in het menselijke genoom statistisch unieke sequenties van achttien of vierentwintig basenparen te herkennen.^{7,8,9} Ook is duidelijk welke zinkvinger kan worden gebruikt voor binding aan een gewenst DNA-triplet.⁵ Op basis hiervan kunnen nu voor elk gekozen DNA-fragment zinkvingers ontworpen worden.

Vanwege de specifieke herkenning van fragmenten in het erfelijke materiaal, worden momenteel binnen verschillende takken van wetenschap, zoals in de medische sector en de plantenbiotechnologie, op grote schaal de mogelijkheden onderzocht om zinkvingers in te zetten voor het veranderen van het genoom.

Overigens wordt voor de leesbaarheid van de onderhavige signalering niet gesproken over zinkvinger-eiwitten, maar kortweg over zinkvingers. Met de term zinkvinger kan dus zowel een enkele zinkvinger als een aantal gekoppelde zinkvingers bedoeld worden.

2.2 Zinkvingers veranderen en reguleren erfelijk materiaal gericht

Enkel herkenning van een DNA sequentie is niet voldoende om de genexpressie of de sequentie van een gen te wijzigen. Hiervoor is de koppeling van een zinkvinger aan een zogeheten effectoreiwit noodzakelijk. Afhankelijk van het gewenste effect dat men wil bereiken, kunnen nucleasen, transcriptieactivators, transcriptierepressors of methylases aan zinkvingers gekoppeld worden.

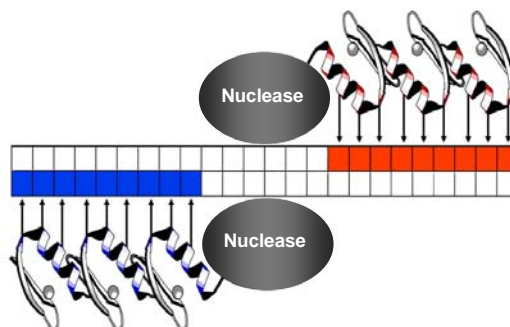
2.2.1 Zinkvingernucleasen knippen DNA op een specifieke plaats

Het effectoreiwit waar momenteel veel onderzoek naar wordt verricht is het zogenoemde Fok1 endonuclease. Dit is een enzym dat DNA kan ‘knippen’ en dat pas als een dimeer biologisch actief is. Door dit nuclease te koppelen aan een zinkvinger ontstaat een zinkvingernuclease. Twee zinkvingernucleasen samen zijn in staat om op een gewenste plaats in het DNA een dubbelstrengs breuk te induceren (zie figuur 2). Dergelijke eiwitten kunnen gebruikt worden om bijvoorbeeld fouten in het erfelijke materiaal gericht te herstellen. Aangezien een breuk dodelijk kan zijn voor een cel, treedt een van nature aanwezig DNA-herstelmechanisme in werking om de breuk te repareren.² Een cel heeft hiervoor verschillende mechanismen tot zijn beschikking, namelijk homologe recombinatie en non-homologous end-joining (zie kader).

Afhankelijk van het organisme en het celtype heeft een bepaald mechanisme de voorkeur.¹⁰ Via non-homologous end-joining worden chromosoomfragmenten aan elkaar ‘gelast’, waarbij kleine inserties en deleties kunnen ontstaan. Via homologe recombinatie wordt de breuk hersteld met behulp van een homolog voorbeeld.

Uit onderzoek blijkt dat het aanbrengen van een dubbelstrengsbreuk met zinkvingernucleasen het anders zeer inefficiënte proces van homologe recombinatie tot wel 50.000 maal versterkt.¹¹ Deze bevinding maakt het gebruik van zinkvingernucleasen zeer populair.

Om kleine fouten in het erfelijke materiaal te herstellen, kan gebruik gemaakt worden van het fenomeen homologe recombinatie. Hierbij dient een ‘normaal’ of



Figuur 2: schematische weergave van twee zinkvingernucleasen gebonden aan het DNA; elke zinkvingernuclease bestaat uit drie zinkvingers zodat negen baseparen herkend worden (1). Ter plaatse van de nucleases treedt een breuk op, waarna het herstelmechanisme in werking treedt.

‘gezond’ DNA fragment als voorbeeld. Deze sequentie kan reeds aanwezig zijn in het genoom, maar kan ook als DNA-fragment samen met de zinkvingernucleasen worden ingebracht.¹¹

Naast het herstellen van mutaties, worden zinkvingernucleasen ook ingezet om een plaatsgerichte insertie (ook wel ‘gene targeting’ genoemd) van een gen of DNA-fragment te bewerkstelligen. Zodoende kunnen bijvoorbeeld afwijkende genen worden vervangen of hersteld. Hiertoe wordt in eerste instantie een breuk geïnduceerd waarna toegediend erfelijk materiaal tijdens het herstel van de breuk via homologe recombinatie op de plaats van de breuk ingebouwd wordt.¹¹ Activatie van het herstelmechanisme door zinkvingernucleasen stimuleert het inbouwen van een DNA-fragment 100 tot 10.000 maal ten opzichte van een plaatsgerichte insertie zonder gebruik van zinkvingernucleasen.⁹

Daarentegen wordt gebruik gemaakt van het herstelmechanisme non-homologous end-joining om op een bepaalde plaats in het erfelijk materiaal juist mutaties aan te brengen (‘targeted mutagenesis’).¹² De mutatie treedt dan op de plaats van de breuk.¹² Door de mutatie zal het gen niet meer naar behoren functioneren. Wetenschappers kunnen op deze manier de functie van het uitgeschakelde gen bestuderen.¹³

Homologe recombinatie

Homologe recombinatie staat bekend als een zeer precies mechanisme om breuken in DNA te herstellen.⁽⁵⁾ Het vormt een soort copy - paste proces waarbij een niet-beschadigde homologe DNA-sequentie als informatiebron voor het herstel dient.⁽⁵⁾ Als homologe DNA sequentie kan een vergelijkbare sequentie in het genoom dienen, bijvoorbeeld de sequentie op de zusterchromatide.⁽⁵⁾ Van nature verloopt homologe recombinatie in het genoom van zoogdier- en plantencellen zeer inefficiënt.⁽¹¹⁾

Non-homologous end-joining

Een andere manier waarop, vooral planten, een dubbelstrengsbreuk herstellen, berust op het aan elkaar plakken van de gebroken DNA strengen, het zogenaamde non-homologous end-joining. Dit vergt geen of zeer weinig sequentiehomologie, en resulteert daarom vaak in deleties of inserties op de plaats van de breuk.^(10,51)

2.2.2 Zinkvingertranscriptiefactoren reguleren genexpressie specifiek

Naast het induceren van genetische veranderingen in het genoom door middel van zinkvingernucleasen, is het ook mogelijk om met zinkvingers de genexpressie te reguleren, zonder daarbij het gen zelf te modifieren.¹⁴ Hiertoe worden zinkvingers gekoppeld aan een transcriptiefactor.

Regulatie van de genexpressie door zinkvingertranscriptiefactoren kan op verschillende manieren plaatsvinden. Afhankelijk van de aard van het gekoppelde effectoreiwit, kan binding van zinkvingertranscriptiefactoren aan een specifieke DNA-sequentie de expressie van een gen remmen of juist stimuleren.¹⁴ Het betreft hier effectoreiwitten als transcriptierepressors of transcriptieactivators.

Hierbij is de aandacht van wetenschappers niet alleen gericht op een tijdelijke remming of stimulering van de genactiviteit, ook het induceren van overerfbare effecten wordt bestudeerd. Deze effecten worden epigenetische effecten genoemd. De basenvolgorde van het erfelijke materiaal is niet veranderd, maar de activiteit van het DNA wel.¹⁵

2.3 Zinkvingers worden op verschillende manieren toegediend aan een organisme

Er zijn twee manieren om zinkvingers en hun effectoreiwitten aan een cel toe te dienen. De eerste methode, die nog in ontwikkeling is, is het inbrengen van zinkvingers in de vorm van een recombinant eiwit. Verwacht wordt dat het gebruik van deze technieken in de toekomst sterk zal toenemen.⁹

Ten tweede kan het gen dat codeert voor de zinkvingereffectoreiwit aan een cel toegevoegd worden. Hoewel het mogelijk is om het nucleïnezuur direct in de cel te injecteren, wordt dit vaak met behulp van een vector in een cel gebracht.^{16,17,9} Welke vector hiervoor het meest geschikt is, is onder meer afhankelijk van het type cel en het organisme dat de zinkvinger toegediend krijgt. Grofweg is er een onderscheid te maken tussen cellen van enerzijds planten en anderzijds (zoog)dieren en micro-organismen. Voor de laatste groep wordt als vector vooral gebruik gemaakt van plasmiden en verzwakte virussen. Het toevoegen van zinkvingers en hun effectoreiwitten aan plantencellen wordt op verschillende manieren gedaan. Wetenschappers maken bijvoorbeeld gebruik van de bacterie *Agrobacterium tumefaciens* of 'particle bombardment'. Het is daarnaast mogelijk om alleen plasmide-DNA in een cel te brengen. Uit een getransformeerde cel kan vervolgens een plant gekweekt worden. Het is ook mogelijk om slechts enkele cellen van een plant, bijvoorbeeld een aantal cellen van een blad, te wijzigen.⁴

3 Zinkvingers kennen veelbelovende toepassingen

In de loop der jaren heeft de genetische modificatie een sterke ontwikkeling doorgemaakt en heeft de techniek zich verder verfijnd. Wetenschappers zijn steeds op zoek naar snellere methoden en naar modificatietechnieken die gericht zijn. Het ideaal is de techniek zo te verbeteren dat op elke gewenste plek in het genoom de juiste veranderingen kunnen worden aangebracht. Bovendien zou dit moeten plaatsvinden met een hoge efficiëntie. Met het gebruik van zinkvingers kan mogelijk een belangrijke stap in deze richting gezet worden.

Op dit moment wordt vooral veel werk verzet om de zinkvingertechnologie verder te verbeteren. Experimenten vinden veelal plaats in cellijnen, maar ook steeds meer in organismen, zoals wormen¹⁸, zebrafissen^{16,17}, fruitvliegen¹⁹ en planten.^{20,37,38} Bij verschillende van deze organismen is het gelukt om het erfelijke materiaal te wijzigen door zinkvingers direct in het embryo te injecteren.^{16,17,19} Dit heeft tot gevolg dat de wijziging in het DNA wordt doorgegeven aan nakomelingen. Inmiddels is de zinkvingertechnologie ook doorgedrongen tot de medische sector en de plantenveredeling, waar het mogelijk zou kunnen leiden tot veelbelovende toepassingen.

3.1 Zinkvingers bieden toepassingen in de medische sector

Op medisch gebied wordt veel onderzoek verricht naar het gebruik van zinkvingers. In de meeste gevallen bevindt het onderzoek zich echter nog in de ontwikkelingsfase. Toch zijn er al enkele studies beschreven waarbij het gebruik van zinkvingernucleasen en zinkvingertranscriptiefactoren vergevorderd is en wordt toegepast in humane cellen.^{21,13,22} Hieronder wordt nader ingegaan op enkele toepassingen van zinkvingernucleasen en zinkvingertranscriptiefactoren.

3.1.1 Toepassing van zinkvingernucleasen als genterapeuticum

Bij elke medische therapie wordt gestreefd naar een optimale werking met een zo hoog mogelijke veiligheid voor de patiënt. Bij genterapie bijvoorbeeld wordt erfelijk materiaal in cellen gebracht om een 'gezond' gen toe te voegen of om een defect gen te repareren. In de huidige klinische studies wordt het erfelijke materiaal meestal gewijzigd met behulp van bepaalde verzwakte virussen. Het genoom van de virussen wordt in het humane genoom ingebouwd en daarmee ook het gewenste gen. Het therapeutische gen blijft zodoende actief en stabiel aanwezig in de cel.

Een risico van deze strategie is dat het verzwakte virus op een verkeerde plaats in het genoom terecht komt en daardoor bijvoorbeeld oncogenen activeert. Hierdoor kan de behandelde cel uitgroeien tot een tumor. Het is in de praktijk gebleken dat dit een reëel risico is. Bij een genterapiestudie in Frankrijk en het Verenigd Koninkrijk hebben vijf van de twintig patiënten met X-SCID (X-Severe Combined Immunodeficiency Syndrome) na behandeling leukemie gekregen.²³ Het ingebrachte gen bleek geïntegreerd te zijn in de nabijheid van een oncogen dat betrokken is bij de vorming van bloedcellen. Naar alle waarschijnlijkheid is overactivering van dit gen de

oorzaak van het ontstaan van leukemie bij deze patiënten. Mede door dergelijke nadelige gevolgen zijn de hooggespannen verwachtingen van genterapie de laatste jaren enigszins bijgesteld. Echter, gezien de specificiteit van zinkvingernucleasen en de relatief hoge efficiëntie van de gencorrectie zouden zinkvingernucleasen een positieve bijdrage kunnen leveren in de ontwikkeling van genterapeutica. De zinkvinger technologie lijkt daarom een veelbelovend alternatief voor de huidige genterapie-strategieën.²⁴

Een eerste stap in deze richting is in 2005 gemaakt met het aantonen van de efficiënte gencorrectie in humane cellen door zinkvingernucleasen.¹ In een preklinische studie is de mutatie in het defecte *IL2R γ* gen, verantwoordelijk voor de ziekte X-SCID, gerepareerd in ongeveer 18% van de met zinkvingernucleasen behandelde cellen.¹ De zinkvingernucleasen zijn via plasmiden de cellen ingebracht, alwaar de fout in het genoom hersteld is.¹ Enkele jaren later is dit experiment herhaald met een virale vector in plaats van een plasmide en werd de mutatie in 39% van de cellen hersteld.²⁵

Daarnaast zijn de eerste stappen gezet naar het verkrijgen van een potentiële therapie tegen het virus (HIV-1) dat AIDS veroorzaakt. Het doel is om bepaalde cellen resistent te maken tegen een infectie met HIV-1 door een celreceptor dusdanig te veranderen dat HIV niet meer kan binden aan de cel. Individuen met een natuurlijk veranderde celreceptor blijken namelijk immuun te zijn voor HIV-infecties.²⁶ Wanneer deze verandering met behulp van zinkvingernucleasen wordt aangebracht in cellijnen, blijken deze na 70 dagen nog ongevoelig te zijn voor HIV-1.²⁶ De therapie is het meest effectief wanneer zinkvingernucleasen met behulp van een adenovirus, een virus dat niet integreert in het genoom, de cel wordt ingebracht.²⁶ Het biotechbedrijf dat dit onderzoek uitvoert, Sangamo Biosciences, heeft recentelijk in de Verenigde Staten toestemming gekregen om dit onderwerp middels een klinische genterapiestudie nader te bestuderen.²² Sangamo bezit vele patenten op het gebied van de ontwikkeling en het gebruik van zinkvingers.

3.1.2 Genregulatie door zinkvingertranscriptiefactoren als therapie

Zowel bij experimenten in het laboratorium als in de kliniek worden zinkvingertranscriptiefactoren in toenemende mate ingezet om genen te reguleren. Het gebruik van zinkvingertranscriptiefactoren wordt als zeer waardevol gezien, omdat veel ziektes het gevolg zijn van geïnactiveerde genen of genen met een afwijkende expressie.^{14,28} De werking van zinkvingertranscriptiefactoren is in 1994 voor het eerst aangetoond in een tumorcellijn van muizen, waarbij de expressie van het betrokken oncogen specifiek geblokkeerd kon worden. Het resultaat was dat de tumorcellijn niet verder groeide.²⁷ Daarnaast worden zinkvingertranscriptiefactoren ook ingezet om een therapie te ontwikkelen tegen AIDS. Als gevolg van de onderdrukking van de promotor van HIV-1 door zinkvingertranscriptiefactoren is het mogelijk om de virale replicatie in cellijnen sterk te remmen.²⁸

Inmiddels zijn in de Verenigde Staten de eerste klinische studies bij het Office of Biotechnology Activities van de National Institutes of Health aangemeld waarin gebruik wordt gemaakt van zinkvingertranscriptiefactoren.²⁹ Eén van de studies betreft

een klinische fase I studie voor patiënten met ischemie.³⁰ Deze patiënten hebben aangetaste bloedvaten waardoor de doorbloeding van de ledematen verminderd is. Voor deze aandoening bestaat geen adequate behandeling en in het ergste geval kan het verloop van de ziekte amputatie van de aangetaste ledematen noodzakelijk maken. In de klinische studie wordt getracht om de gevolgen van ischemie te beperken door de vorming van nieuwe bloedvaten (angiogenese) te stimuleren. Deze studie is gestart naar aanleiding van positieve resultaten die verkregen zijn in onderzoek bij muizen. Wetenschappers zijn er in geslaagd om een gen (coderend voor Vascular Endothelial Growth Factor) dat belangrijk is bij de angiogenese te stimuleren met zinkvingertranscriptiefactoren.³¹

Tevens is een klinische fase II studie gestart naar de regulatie van hetzelfde eiwit in de behandeling van diabetische neuropathie (een aandoening van de gevoelszenuwen), een complicatie bij diabetes patiënten.³² Tussentijdse resultaten lieten zien dat de behandeling veilig is, maar verschillen tussen patiënten behandeld met zinkvingertranscriptiefactoren of een placebo waren nog niet waarneembaar.³²

3.2 Zinkvingers bieden toepassingen in de plantenbiotechnologie

Binnen de plantenveredelingswereld wordt voortdurend gestreefd naar verbetering van bestaande gewassen. Toen de genetische modificatie haar intrede deed, werd deze techniek gebruikt om gewassen te verbeteren en om rassen met nieuwe eigenschappen te ontwikkelen. Met de huidige modificatietechnieken is het echter moeilijk te voorspellen waar het gen van interesse in het genoom van de plant zal inserteren. Dit is een nadeel omdat het plantengenoom regionen kent met een hoge of een lage transcriptionele activiteit. De plaats van integratie is zodoende mede bepalend voor de expressie van het gen van interesse (het zogenaamde positie-effect). Voor veredelaars zou het wenselijk zijn als de plaats van insertie specifiek bepaald kan worden. De mate van expressie kan dan beter voorspeld worden.

Daarnaast kan door plaatsgerichte insertie worden voorkomen dat een gen inserteert in een coderende regio van het genoom waardoor genen worden geïnactiveerd of nieuwe gencombinaties ontstaan. Kortom, indien de plaats van geninsertie kan worden bepaald, dan kunnen de eigenschappen van de plant beter voorspeld worden en zal de ontwikkeling van een plant sneller en daardoor kostenefficiënter verlopen. Het proces kan zelfs met één tot twee jaar verkort worden.³³

In veruit de meerderheid van de onderzoeken worden zinkvingers gekoppeld aan nucleasen of transcriptiefactoren. Het blijkt echter ook mogelijk om zinkvingers te binden aan een fluorescerend label.³⁴ Op deze manier kan een specifieke sequentie in het genoom van bijvoorbeeld een plant via *live* 'imaging' technieken zichtbaar gemaakt worden. Op deze manier kan een sequentie microscopisch bestudeerd worden.

Dat de ontwikkelingen veel potentie hebben, blijkt uit het feit dat het biotechnologiebedrijf Dow AgroSciences sinds enkele jaren gebruik maakt van de zinkvingertechnologie.³⁵ Hiertoe hebben ze een overeenkomst gesloten met het bedrijf Sangamo BioSciences. Sangamo maakte in 2008 bekend dat de zinkvingertechnologie ingezet kan worden voor de snelle en precisie ontwikkeling van bijvoorbeeld nieuwe of verbeterde voedingsmiddelen.³³ De beide bedrijven hebben bekend gemaakt dat ze

voornemens zijn om te werken aan producten die gezonder zijn of een betere voedingswaarde bezitten. Daarnaast willen ze de technologie gebruiken om planten resistent te maken tegen een scala aan plaaginsecten en ziektes. Ten slotte wordt eraan gedacht om planten ‘op maat’ te ontwikkelen voor gebruik in de biobrandstofindustrie.³³

3.2.1 *Verbetering zinkvingernucleasen en achterhalen van genfunctie*

De afgelopen twee decennia zijn veel pogingen ondernomen om plaatsgerichte insertie in planten te bewerkstelligen.¹⁰ In het begin was de efficiëntie van de techniek erg laag waardoor het niet goed toepasbaar bleek. De belangrijkste reden was de voorkeur van de plant om DNA op een niet homologe wijze in het plantengenoom te integreren. Inmiddels is veel onderzoek verricht en blijkt uit de literatuur dat het gebruik van zinkvingernucleasen de efficiëntie van de insertie drastisch verhoogt.³⁶ Zo is het gelukt om genen coderend voor herbicide-tolerantie met behulp van zinkvingernucleasen efficiënt op de gewenste plaats in het genoom van maïs in te brengen.³⁷ Nakomelingen van deze planten brengen ook de betreffende eigenschap tot expressie.³⁷

Zinkvingernucleasen worden binnen de plantenbiologie ook gebruikt voor het specifiek aanbrengen van mutaties. Wetenschappers gebruiken deze methode om bijvoorbeeld genfuncties te veranderen. Een voorbeeld hiervan is het aanbrengen van puntmutaties in enkele genen van de tabakspiant waardoor deze tolerant wordt voor bepaalde herbiciden.³⁸

Daarnaast trachten wetenschappers specifieke mutaties aan te brengen om de functie van specifieke genen te achterhalen. Een methode om de genfunctie te kunnen analyseren is het creëren van ‘loss-of-function’ mutaties waardoor een genfunctie bepaald kan worden. Deze mutanten worden vervaardigd door op specifieke plaatsen mutaties aan te brengen met behulp van zinkvingernucleasen en het reparatiemechanisme non-homologous end-joining. De mutatie zal dan optreden op de plaats waar de breuk zich bevond.¹⁰ Door de mutatie zal het gen niet meer optimaal functioneren.

3.2.2 *Zinkvingertranscriptiefactoren verbeteren eigenschappen van de plant*

Naast het gebruik van zinkvingernucleasen, worden ook zinkvingertranscriptiefactoren binnen de plantenbiotechnologie gebruikt. Onderzoekers zetten zinkvingertranscriptiefactoren in om de expressie van genen te beïnvloeden en zo een plant met het gewenste fenotype te krijgen.^{39,40} Dit wordt vergemakkelijkt als effectieve zinkvingertranscriptiefactoren voorhanden zijn, wat niet altijd het geval is. Daarom trachten wetenschappers om werkende zinkvingertranscriptiefactoren proefondervindelijk te achterhalen. Aan een groot aantal planten wordt elk een bepaalde zinkvingertranscriptiefactor toegediend, waarna wordt gekeken welke plant het gewenste fenotype heeft verkregen. Uit deze plant wordt vervolgens de zinkvinger weer geïsoleerd. Deze effectieve zinkvinger kan gebruikt worden voor verder onderzoek.⁴¹

Hoewel het huidige onderzoek zich met name richt op de verbetering van de technologie in planten, zijn er al enkele toepassingen beschreven. Eerder in dit hoofdstuk is al ingegaan op het remmen van virusinfecties bij mensen, inmiddels is ook

in planten de eerste stap hiertoe gezet. Een voorbeeld betreft het gebruik van zinkvingertranscriptiefactoren om een infectie met het *Beet severe curly top virus* te remmen. In een modelsysteem met de zandraket (*Arabidopsis thaliana*) remmen zinkvingertranscriptiefactoren de replicatie van het virus. Hierdoor verkregen de planten resistentie tegen het virus en waren er in 84% van de gevallen geen symptomen waarneembaar.⁴²

Verder speculeert men over toepassingen van zinkvingertranscriptiefactoren bij het verkrijgen van planten met een verbeterde smaak of voedingswaarde. Daarnaast wordt gedacht aan het onderdrukken van de expressie van genen coderend voor allergene eiwitten. Bovendien ziet men mogelijkheden om zinkvingertranscriptiefactoren in te zetten ter stimulering of remming van de expressie van genen betrokken bij allerlei ziekte- en stresstoleranties.

4 Off-target effecten en milieurisico's van zinkvingers verdienen aandacht

Uit de literatuur blijkt dat er grote verwachtingen zijn van zinkvingers.⁴³ Maar de technologie kent op dit moment ook nog nadelen en beperkingen. Het gebruik van zinkvingers vereist een grote kennis over de zinkvingerbiologie. Het ontwerpen van geschikte nucleasen die specifieke breuken in het DNA kunnen aanbrengen is een lastige opgave. Bovendien is het construeren van transcriptiefactoren voorzien van specifieke zinkvingers voor plantensystemen moeilijker te realiseren dan de constructie voor zoogdiersystemen.⁴⁰ Voordat de technieken breed toepasbaar zijn, is nader onderzoek noodzakelijk. Bovendien is de ervaring met zinkvingers nog relatief beperkt, waardoor eventuele risico's moeilijk aan te geven zijn.

4.1 Gebruik van zinkvingers kent off-target effecten in het organisme

Nadelen die op grond van de huidige kennis benoemd kunnen worden, hebben vooral betrekking op off-target effecten van zinkvingers. Dit betekent dat zinkvingers aspecifiek binden aan erfelijk materiaal, met mogelijk ongewenste wijzigingen tot gevolg.^{5,9,13} Off-target effecten kunnen verschillende oorzaken hebben. Enkele worden hieronder nader toegelicht.

Een van de belangrijkste oorzaken van off-target effecten is een gebrek aan specificiteit van de zinkvinger. De specificiteit van de zinkvinger moet dermate hoog zijn dat het erfelijke materiaal slechts op één plaats herkend wordt. Als de specificiteit niet voldoende hoog is, kan de zinkvinger binden aan een DNA-fragment dat niet geheel homolog is aan de doelsequentie. Deze binding op zich kan de normale genexpressie of cellulaire processen al verstoren.¹³ Daarnaast kan het induceren van een breuk op een ongewenste plaats in het genoom ook schadelijke gevolgen hebben voor de cel.^{5,9,13}

Momenteel is de specificiteit nog niet altijd hoog genoeg waardoor een zinkvinger-nuclease niet enkel op de gewenste plaats in het genoom breuken aanbrengt, maar ook elders in het genoom 'knijpt'. Deze breuken worden voornamelijk via het onzorgvuldige mechanisme non-homologous end-joining hersteld met ongewenste mutaties als gevolg. Onderzoek naar de vermindering van off-target effecten gaat onverminderd door.⁴⁴

Off-target effecten kunnen ook ontstaan wanneer te veel zinkvingers aanwezig zijn in een cel. Na toediening van zinkvingers in de vorm van nucleïnezuur aan een cel, worden zinkvingereiwitten geproduceerd. De kans bestaat dat grote hoeveelheden eiwitten gevormd worden, terwijl slechts enkele moleculen al effectief zijn om een effect te induceren. Experimenten in fruitvliegen hebben aangetoond dat overproductie van de zinkvingereiwitten kan leiden tot het afsterven van de cel. Door de hoge concentratie binden zinkvingers op een aspecifieke wijze aan het DNA. Dit kan leiden tot ongewenste breuken op diverse plaatsen in het genoom.⁵ Bovendien is het aannemelijk dat een cel doodgaat als er teveel breuken in het erfelijke materiaal zijn ontstaan.⁵

Of het nu gaat om *gene targeting* of *targeted mutagenesis*, het is altijd wenselijk dat zinkvingers slechts kortstondig hun werk kunnen doen. Mogelijk zal in de toekomst daarom meer gebruik gemaakt worden van de toediening van zinkvingers in de vorm van plasmide DNA, eiwitten of mRNA dat codeert voor zinkvingernucleasen.⁹

4.2 Off-target effecten zijn moeilijk aan te tonen

Zoals hierboven beschreven is, kunnen off-target effecten ontstaan bij het gebruik van zinkvingers. Het opsporen van deze effecten is moeilijk. In geval van genetische veranderingen zou een genomanalyse eventueel uitsluitsel kunnen bieden. Echter, wanneer epigenetische veranderingen zijn ontstaan door de specifieke binding van zinkvingers, dan is het controleren op off-target effecten zeer lastig.

4.3 Milieurisico's van zinkvingertechnologie en overige modificatietechnieken komen overeen

Bij de gangbare transformatietechnieken wordt een milieurisicoanalyse uitgevoerd om te bepalen of handelingen met ggo's risico's voor mens en milieu opleveren. Maar wat zijn eigenlijk de risico's van zinkvingers?

Zinkvingernucleasen induceren mutaties op een specifieke wijze. Hoewel off-target effecten momenteel nog niet volledig uit te sluiten zijn, trachten wetenschappers de technologie steeds verder te verbeteren. Naar de mening van de COGEM zijn risico's vergelijkbaar met die bij andere technieken welke gebruikt worden bij genetische modificatie. Het is namelijk bekend dat ook de gangbare technieken onbedoelde mutaties in het genoom van organismen kunnen veroorzaken. De COGEM merkt op dat in de traditionele veredeling tevens veel planten zijn ontwikkeld met behulp van mutagenese; een techniek die specifiek is. Door gebruik te maken van chemische mutagenen, zoals ethylmethaansulfonaat, (EMS) of door toepassing van röntgen- of UV-stralen zijn vele gewassen verkregen met verbeterde eigenschappen. Denk hierbij bijvoorbeeld aan een verhoogde opbrengst, koude tolerantie of ziekteresistentie.³⁵ Gebruik van bestralingsmethoden kan leiden tot grote veranderingen in het genoom zoals deleties en de toepassing van EMS leidt veelal tot puntmutaties. Tevens kunnen met genetische modificatie genen ingebracht of verwijderd worden. Het gen wordt op een willekeurige wijze in het genoom ingebouwd, waarbij mogelijk onbedoelde effecten kunnen optreden.⁴⁵ Naar alle verwachting zal in de toekomst het inbouwen van genen met behulp van zinkvingers veel gericht zijn dan met de huidige genetische modificatie technieken. Hoogstwaarschijnlijk zullen risico's dan ook kleiner zijn.

Verder is het de vraag of er risico's kunnen ontstaan voor personen tijdens het gebruik van zinkvingers in zowel plant als mens. Te denken valt aan de toediening van een genterapeuticum op basis van zinkvingers waarbij verplegend personeel door een prikaccident besmet raakt. In het geval dat de zinkvinger zich in eiwitvorm bevindt, lijken de gevolgen niet af te wijken van andere therapieën. Ook is dit vergelijkbaar met een eventueel accident met restrictie-enzymen (enzymen die in het erfelijke materiaal

kunnen knippen). Met deze enzymen wordt wereldwijd al jarenlang gewerkt in vele laboratoria, zonder dat melding gemaakt is van nadelige gevolgen. Als de zinkvinger zich in DNA-vorm bevindt, dan zijn risico's niet volledig uit te sluiten. Het DNA zou zich mogelijk kunnen inbouwen in het genoom.

Verder kan na toediening van de zinkvinger aan de patiënt eventueel 'shedding' (uitscheiding) van de zinkvinger optreden. Hierbij is het de vraag is of dit een risico vormt voor de omgeving van de patiënt of het bredere milieu.

5 Zinkvingers kunnen invloed hebben op de ggo-regelgeving

Om mens en milieu te beschermen tegen potentiële ongewenste effecten bij werkzaamheden met ggo's zijn Europese richtlijnen opgesteld. Deze richtlijnen zijn geïmplementeerd in de Nederlandse wetgeving via de Wet Milieubeheer, het Besluit GGO en de Regeling GGO. In de huidige regelgeving wordt een ggo gedefinieerd als een organisme, met uitzondering van menselijke wezens, waarvan het genetische materiaal veranderd is op een wijze welke van nature door voortplanting en/of natuurlijke recombinitie niet mogelijk is.⁴⁶ Bovendien is er sprake van genetische modificatie als bepaalde technieken worden toegepast. Het betreft hier recombinant DNA- en RNA-technieken waarbij gebruik wordt gemaakt van gastheer/vector-systemen, technieken waarbij genetisch materiaal dat buiten het organisme is geprepareerd rechtstreeks in een organisme wordt gebracht (bijvoorbeeld via micro-injectie), en celfusie- of hybridisatietechnieken.

De regelgeving voor ggo's is opgesteld op basis van de stand van zaken van twintig jaar geleden. Destijds zijn een aantal technieken vrijgesteld van de regelgeving met als argument dat hiermee al jarenlange ervaring was opgedaan. Sommige van deze technieken werden al sinds circa 1930 commercieel toegepast voor de veredeling van planten.⁴⁷ Vrijgestelde technieken zijn celfusie en protoplastfusie tussen kruisbare verwanten, zelfklonering van niet pathogene micro-organismen, gebruik van mutagenen en chemische agentia.

De vraag is of alle toepassingen van de zinkvingertechnologie onder de definitie van genetische modificatie en daarmee onder de regelgeving voor ggo's vallen. Deze vraag is niet altijd eenvoudig of eenduidig te beantwoorden. Mede omdat hierbij zowel juridische al wetenschappelijke argumenten een rol spelen.

5.1 Vallen zinkvingers onder de ggo-regelgeving?

Wetenschappers trachten met zinkvingertranscriptiefactoren de expressie van genen te reguleren. Zinkvingernucleasen worden daarentegen gebruikt om erfelijk materiaal te wijzigen. Dit kan het veranderen van een sequentie betekenen, maar ook het verwijderen of toevoegen van erfelijk materiaal. Of werkzaamheden onder de ggo-regelgeving vallen, is niet alleen afhankelijk van het soort zinkvinger, maar ook van de vorm waarin de zinkvingers worden toegediend aan een cel. Hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen de toediening in de vorm van eiwitten of in de vorm van nucleïnezuur. Dit alles leidt tot vier situaties welke hieronder verder uitgewerkt worden en welke kort samengevat zijn in tabel 1.

5.1.1 *Het gebruik van zinkvingers in nucleïnevorm*

Wanneer zinkvingers aan een cel worden toegediend als nucleïnezuur, dan is volgens de Europese wetgeving sprake van genetische modificatie.⁴⁷ Er is namelijk nucleïnezuur in een gastheercel gebracht en daarnaast kan dit leiden tot veranderingen in het erfelijke materiaal. Dit is dus zowel van toepassing op zinkvingernucleasen als op zinkvingertranscriptiefactoren, ondanks dat in deze laatste situatie sprake is van de regulatie van de genexpressie en niet van een sequentieverandering.

5.1.2 *Het gebruik van zinkvingers in eiwitvorm*

Hieronder wordt ingegaan op de vraag of het gebruik van enerzijds zinkvingertranscriptiefactoren in eiwitvorm en anderzijds zinkvingernucleasen in eiwitvorm onder de ggo-regelgeving valt.

Het gebruik van zinkvingertranscriptiefactoren in eiwitvorm

Indien de toediening van zinkvingertranscriptiefactoren aan een cel in eiwitvorm plaatsvindt, zullen wijzigingen in de sequentie van het erfelijke materiaal niet optreden. Het gebruik van zinkvingertranscriptiefactoren heeft namelijk tot doel om genexpressie te reguleren. Er lijkt daarom geen sprake te zijn van genetische modificatie. Deze redeneertrant volgend vallen de werkzaamheden niet onder de Europese richtlijnen.

Overigens zijn er medicijnen op de Europese markt met een vergelijkbare werking. Deze medicijnen vallen niet onder de ggo-regelgeving. Een voorbeeld is Vidaza (azacitidine) dat de synthese van DNA en RNA blokkeert. Het middel wordt onder andere toegepast bij patiënten met bepaalde vormen van kanker.^{48,49}

Deze medicijnen zijn weer een teken dat de grenzen tussen conventionele technieken en genetische modificatie vervagen.

Het gebruik van zinkvingernucleasen in eiwitvorm

Het gebruik van zinkvingernucleasen als eiwit lijkt genetische modificatie te zijn, aangezien veranderingen in het erfelijke materiaal worden aangebracht. Het minimale effect van zinkvingernucleasen is de inductie van een breuk in het genoom. Daarmee lijkt dit alles onder de Europese wetgeving en dus onder de ggo-regelgeving te vallen.

Echter, het is de vraag of het gebruik van zinkvingernucleasen die als eiwit aan een cel worden toegediend daadwerkelijk onder de ggo-regelgeving (moeten) vallen. Ten eerste wordt geen nucleïnezuur in de cel gebracht. Ten tweede komen de effecten die bereikt worden met zinkvingers vanuit wetenschappelijk oogpunt overeen met de effecten bewerkstelligd via een techniek die vrijgesteld is van de regelgeving, het gebruik van chemische mutagentia. Hierbij moet worden opgemerkt dat met zinkvingernucleasen op zeer gerichte wijze veranderingen in het erfelijke materiaal aan te brengen zijn. Met chemische mutagentia zijn geen voorspellingen te doen over de plaats van de mutaties. Aangezien het gebruik van zinkvingernucleasen in eiwitvorm grotendeels vergelijkbaar is met chemische mutagentia, is het de vraag of werkzaamheden met zinkvingernucleasen in eiwitvorm onder de ggo-regelgeving moet vallen of dat er deze redeneertrant volgend voldoende rechtvaardiging is voor vrijstelling.

Een ander aspect dat speelt bij zinkvingernucleasen in eiwitvorm, is dat deze momenteel worden ingezet om kleine mutaties aan te brengen. Maar hoe zit het als de technologie in de toekomst gebruikt wordt om een heel gen te verwijderen? Gaat de vergelijking met chemisch mutagenese dan nog op? Ook met bestralingsmethoden is het mogelijk om grote veranderingen in het DNA aan te brengen. Dient het wel of niet onder de regelgeving te vallen? En waar ligt de grens? Met deze vragen wordt geraakt aan de keus of het modificatieproces dan wel de eigenschappen van het modificatieproduct bepalend moeten zijn. Hierop wordt in paragraaf 5.3 nader ingegaan.

Werkingsmechanisme	Zinkvingernuclease		Zinkvingertranscriptiefactor	
	Eiwit	Nucleïnezuur	Eiwit	Nucleïnezuur
Toedieningsvorm				
Effect	Verandering van sequentie	Verandering van sequentie	Regulatie van genen	Regulatie van genen
Opmerking	Methode vertoont overeenkomst met vrijgestelde technieken			Geen sequentie-verandering, maar wel een ggo, omdat nucleïnezuur wordt toegediend
GGO volgens Regelgeving?	waarschijnlijk	ja	nee	ja

Tabel 1: Samenvatting van de verschillende situaties

5.2 Epigenetische veranderingen door zinkvingers

De laatste jaren vindt steeds meer onderzoek plaats naar de mogelijkheid om met zinkvingertranscriptiefactoren en -nucleasen epigenetische wijzigingen in het genoom aan te brengen. Hoewel dit alles niet leidt tot een verandering in de sequentie, is het de intentie dat de verandering in de cel behouden blijft en dat deze zal worden doorgegeven aan nakomelingen.

Overigens is het bij planten mogelijk om het gen coderend voor de zinkvinger en het effectoreiwit, beide ingebracht om de epigenetische verandering aan te brengen, weer te verwijderen. Hiertoe worden in eerste instantie de gemodificeerde planten gekruist met onveranderde planten. Vervolgens vindt selectie plaats op de nakomelingen die wel over de epigenetische verandering beschikken, maar niet over de genen coderend voor de zinkvinger of het effectoreiwit. Het resultaat is dus een nakomeling die zelf geen transgenen meer bevat, maar waarvan de ouderplanten wel vervaardigd zijn middels recombinant-DNA-technieken.

De vraag is of werkzaamheden die leiden tot epigenetische veranderingen ook onder de ggo-regelgeving zullen of moeten vallen. Het is denkbaar dat de genexpressie van een cel wordt gewijzigd door het toedienen van zinkvingertranscriptiefactoren in eiwitvorm. Hierbij wordt geen nucleïnezuur in een cel gebracht, vindt geen wijziging van erfelijk materiaal plaats, maar wordt mogelijk toch een overerfbaar effect bereikt. Hoewel het resultaat van de epigenetische verandering mogelijk gelijk is aan het resultaat van genetische modificatie, lijkt het dat niet te zijn. Dit is opnieuw een voorbeeld waarbij de grens tussen genetische modificatie en conventionele technieken vervaagt.

De COGEM heeft in 2006 een onderzoek laten verrichten naar de stand van zaken op het gebied van de epigenetica.⁵⁰ Destijds werd geconcludeerd dat het te vroeg was om nadere uitspraken over eventuele milieurisico's te doen. Zij achtte het echter noodzakelijk om de ontwikkelingen op dit gebied te blijven monitoren. De COGEM is voornemens om het onderwerp epigenetica dit jaar opnieuw onder de loep te nemen. Er

zal aandacht besteedt worden aan de huidige stand van zaken op het gebied van de epigenetica. Hierbij zal ook de ggo-regelgeving aan de orde komen.

5.3 Versoepeling van de regelgeving voor zinkvingers misschien mogelijk

Zoals al gemeld is, lijken veel werkzaamheden met zinkvingers onder de ggo-regelgeving te vallen. Er zijn echter toepassingen waarbij de grenzen tussen genetische modificatie en conventionele technieken vervagen. Daarnaast zijn er toepassingen die overeenkomsten vertonen met technieken die vrijgesteld zijn van de ggo-regelgeving. Een voorbeeld hiervan is het gebruik van zinkvingernucleasen in eiwitvorm, omdat het resultaat vergelijkbaar is aan het effect van chemische mutagenese. Hierbij wordt opgemerkt dat het gebruik van zinkvingers veel gericht is. Dit maakt dat potentiële risico's voor mens en milieu vermoedelijk kleiner zijn dan bij gebruik van chemische mutagenese. Echter, het gebruik van chemische mutagenese is vrijgesteld van de regelgeving vanwege de jarenlange ervaring met de techniek. Deze uitgebreide ervaring is nog niet verkregen met zinkvingers.

Verder speelt bij een mogelijke versoepeling van de regelgeving voor zinkvingers ook de wijze waarop de ggo-regelgeving momenteel wordt geïmplementeerd een rol. In Europa is destijds gekozen om voor ggo's een specifieke regelgeving te ontwerpen om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen. De gedachte hierbij was dat door middel van genetische modificatie organismen met nieuwe eigenschappen kunnen worden gemaakt die niet eerder in het milieu aanwezig waren. Dergelijke regelgeving wordt als procesgebaseerde regelgeving aangeduid, omdat de wijze van productie, - het proces -, de reden vormt voor regelgeving. In landen als de Verenigde Staten en Canada is er voor gekozen om ggo's in de algemene regelgeving onder te brengen. Hierbij staan de eigenschappen van een organisme, - het product -, centraal. De eigenschappen vormen de aanleiding voor toepassing van regelgeving (productgebaseerde regelgeving), ongeacht de wijze waarop en de technieken waarmee het organisme geproduceerd is. 'Proces' staat in deze definities dus voor de wijze of technieken waarmee een organisme vervaardigd is. 'Product' staat voor het organisme en zijn eigenschappen. Sommige moderne biotechnologische technieken leiden tot producten, zoals gewassen, die niet te onderscheiden zijn van conventionele veredelingsproducten. Alleen de wijze waarop ze geproduceerd zijn, is anders. In de EU vallen deze gewassen onder de ggo-regelgeving. In landen als de Verenigde Staten en Canada worden deze producten of gewassen echter níet als ggo gezien.

Bij een strikte procesbenadering vallen veel voorbeelden van de zinkvingertechnologie onder de ggo-regelgeving hoewel het eindresultaat – het product – mogelijk niet herkenbaar is als een ggo. Dit geldt voor meerdere nieuwe technieken. In juni 2009 brengt de COGEM een signalering uit over deze problematiek.

Zoals al eerder is gemeld, is het streven om zinkvingers te ontwikkelen die in staat zijn om op elke gewenste plaats in het genoom, en met een hoge efficiëntie, wijzigingen aan te brengen. Echter, op dit moment is de specificiteit nog zelden zo hoog dat zinkvingers op een unieke plaats in het genoom wijzigingen aanbrengen.^{9,13} Wetenschappers

verwachten dat dit in de toekomst sterk zal verbeteren; fragmenten van achttien of vierentwintig basenparen zouden voldoende moeten zijn om een statistische unieke sequentie in het menselijke genoom te herkennen.^{9,8} Daarnaast werken onderzoekers ook hard aan de verbetering van gebruikte vectoren. Zij trachten bijvoorbeeld om de efficiëntie te verbeteren en het expressieniveau te reguleren.⁹

Als de productie van zeer specifieke zinkvingers en verbeterde vectoren in de toekomst mogelijk wordt dan is het de verwachting dat potentiële risico's voor mens en milieu verminderen. Dit betekent wellicht dat in de toekomst versoepeling van de ggo-regelgeving mogelijk wordt voor sommige toepassingen van zinkvingers.

In Europa is een werkgroep opgericht naar aanleiding van de COGEM signalering 'Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie'.⁴ Deze werkgroep onderzoekt of een aantal nieuwe technieken, waaronder zinkvingers, onder de ggo-regelgeving moeten vallen. Met deze signalering wil de COGEM een bijdrage leveren aan het bepalen van een standpunt van de werkgroep.

6 Conclusie

Zinkvingers vormen een nieuwe methode voor het veranderen van erfelijk materiaal. De meeste werkzaamheden met zinkvingers vallen onder de ggo-regelgeving. Alleen bij het gebruik van zinkvingertranscriptiefactoren die in eiwitvorm aan een cel worden toegediend, lijkt er geen sprake te zijn van genetische modificatie.

Mogelijk zou de regelgeving voor deze technieken op korte of lange termijn aangepast kunnen worden. Ten eerste doordat enkele werkzaamheden vrijgesteld zouden kunnen worden vanwege overeenkomsten met andere vrijgestelde technieken zoals chemische mutagenese. Ten tweede zal in de toekomst de zinkvingertechnologie hoogstwaarschijnlijk sterk verbeteren, waardoor potentiële risico's verder afnemen. Mogelijkerwijs zou dit kunnen leiden tot een versoepeling van de regelgeving. Zo ver is het echter nog niet.

De COGEM wil met deze signalering de overheid op de hoogte brengen van de stand van zaken over zinkvingers. Daarnaast kan de signalering een bijdrage leveren aan het bepalen van een beleidsstandpunt in nationaal en Europees verband of zinkvingers al dan niet onder de ggo-regelgeving (moeten) vallen.

De COGEM zal in de toekomst blijven monitoren op nieuwe technieken om mogelijke gevolgen voor mens en milieu en de eventuele consequenties voor de ggo-regelgeving tijdig te signaleren.

Referenties

1. Urnov FD *et al.* (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435: 646-651
2. Kumar S *et al.* (2006). Gene targeting in plants: fingers on the move. *Trends Plant Sci* 11(4): 159-161
3. Miller J (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* 4:1609-1614
4. COGEM (2006). Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie. Advies en signalering (CGM/061024-02)
5. Porteus MH & Carroll D (2005). Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature biotechnol* 23: 967-973
6. Papworth M *et al.* (2006). Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* 366(1): 27-38
7. Visser AE *et al.* (2006). Step into the groove: engineered transcription factors as modulators of gene expression. *Adv Genet* 56: 131-161
8. Klug A (2005). Towards therapeutic applications of engineered zinc finger proteins. *FEBS letters* 579: 892-894
9. Cathomen T & Joung JK (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* 16(7): 1200-1207
10. Lloyd A. *et al.* (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *PNAS* 102: 2232-2237
11. Durai S *et al.* (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 33(18): 5978-5990
12. Lloyd A *et al.* (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *PNAS* 102: 2232-2237
13. Carroll D (2008). Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther* 15: 1463-1468
14. Gommans WM *et al.* (2005). Engineering zinc finger protein transcription factors: the therapeutic relevance of switching endogenous gene expression on or off at command. *J Mol Biol* 354: 507-519
15. Verschure PJ *et al.* (2006). Step out of the groove: epigenetic gene control systems and engineered transcription factors. *Adv Genet* 56: 163-204
16. Meng X *et al.* (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnol* 26(6):695-701
17. Doyon Y *et al.* (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnol* 26(6): 702-708
18. Morton J *et al.* (2006). Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells. *PNAS* 103: 16370-16375
19. Beumer KJ *et al.* (2008). Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *PNAS* 105(50): 19821-19826
20. Cai CQ *et al.* (2009). Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol* 69: 699-709
21. ClinicalTrials.gov (U.S. National institute of health). clinicaltrials.gov/ (3 februari 2009)

22. Sangamo BioSciences (2009). Sangamo BioSciences initiates phase 1 trial of CCR5-ZFP therapeutic to treat HIV/AIDS. investor.sangamo.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=363201 (3 februari 2009)
23. Hacein-Bey-Abina S *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302: 415-419
24. High KA (2005). Gene therapy; the moving finger. *Nature* 435: 577-579
25. Lombardo A *et al.* (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature Biotechnol* 25(11): 1298-1306
26. Sangamo BioSciences (2006). Sangamo BioSciences announces positive HIV/CCR5-ZFN data in presentation at 46th annual interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. investor.sangamo.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=241557 (3 februari 2009).
27. Choo Y (1994). In vivo repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature* 372: 642-645
28. Blancafort P *et al.* (2004). Designing transcription factor architectures for drug discovery. *Mol Pharmacol* 66: 1361-1371
29. NIH Office of Biotechnology activities (2008). Human gene transfer protocol. oba.od.nih.gov/oba/rac/PROTOCOL.pdf (9 februari 2009)
30. Edwards Lifesciences (2005). Edwards Lifesciences announces clinical trial initiated for therapy to treat critical limb ischemia. www.edwards.com/newsroom/nr20050623.htm (27 januari 2009)
31. Rebar EJ (2002). Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. *Nature Med* 8(12): 1427-1432
32. Sangamo Biosciences (2008). Sangamo Biosciences announces results from diabetic neuropathy clinical trial SB-509-601. investor.sangamo.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=346858 (16 februari 2009).
33. Dow AgroSciences (2008). Dow AgroSciences announces early exercise of option for commercial license with Sangamo BioSciences for plants. investor.sangamo.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=317375 (20 januari 2009)
34. Lindhout BI *et al.* (2007). Live cell imaging of repetitive DNA sequences via GFP-tagged polydactyl zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res* 35(16): e107
35. Dow AgroSciences (2005). Dow AgroSciences, Sangamo BioSciences announce research and commercial licence agreement in plant agriculture. www.dowagro.com/newsroom/corporatenews/2005/20051005a.htm (20 januari 2009)
36. Wright DA *et al.* (2005). High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J* 44: 693-705
37. Shukla VK *et al.* (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 29 april (Epub ahead of print)
38. Townsend JA *et al.* (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 29 april (Epub ahead of print)
39. Stege JT *et al.* (2002). Controlling gene expression in plants using synthetic zinc finger transcription factors. *Plant journal* 32: 1077-1086
40. Homes-Davis R *et al.* (2005). Gene regulation *in planta* by plant-derived engineered zinc finger protein transcription factors. *Plant molecular biology* 57: 411-423

41. Lindhout BI *et al.* (2006). Employing libraries of zinc finger artificial transcription factors to screen for homologous recombination mutants in Arabidopsis. *Plant J* 48: 475-483
42. Sera T (2005). Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc finger proteins. *J Virol.* **79**: 2614-2619
43. Wu J *et al.* (2007). Custom-designed zinc finger nucleases: what is next? *Cell Mol Life Sci* 64: 2933-2944
44. Miller JC *et al.* (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnol* 25(7): 778-785
45. Kohn DB *et al.* (2009). Gene therapy fulfilling its promise. *N Engl J Med* 360(5): 518-521
46. Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad (2001)
47. VROM (2007). Verantwoord veredelen met genetische modificatie – ontwikkelingen in plantenveredelingstechnieken en de ggo-regelgeving.
48. EMEA (2009). EPARs for authorised medicinal products for human use: Vidaza. www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/vidaza/vidaza.htm (19 mei 2009).
49. EMEA (2008). Assessment report for Vidaza. (EMEA/593162/2008)
50. COGEM (2006). Aanbieding onderzoeksrapport “Epigenetics in context” (CGM/061017-06)
51. Gorbunova V & Levy AA (1999). How plants make ends meet: DNA-double-strand break repair. *Trends Plant Sci* 4(7): 263-269