

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 09 mei 2019
KENMERK CGM/190509-01
ONDERWERP Adviserende brief 'inschaling laboratoriumexperimenten met gene drives' en
aanbieding onderzoeksrapport

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

In 2015 verschenen er verschillende publicaties over genetisch gemodificeerde organismen die op zo'n manier waren veranderd dat de aangebrachte modificatie zich versneld door een populatie van een soort zou kunnen verspreiden. Deze organismen waren met behulp van CRISPR-Cas9 voorzien van een zogenaamde 'gene drive'.

Wanneer bij laboratoriumwerkzaamheden een dergelijk individu zou ontsnappen en in een natuurlijke populatie terecht zou komen, zou dit onomkeerbaar leiden tot het veranderen of uitroeien van de gehele populatie of soort. Daarom werden in Nederland laboratoriumexperimenten met CRISPR-gene drives op het hoogste inperkingsniveau ingeschaald.^{1,2} Of gene drives zich daadwerkelijk efficiënt door natuurlijke populaties kunnen verspreiden en deze strenge inschaling gerechtvaardigd is, wordt echter betwijfeld.³

Het is bekend dat gene drives ook van nature voorkomen in uiteenlopende organismen, zoals fruitvliegen, muggen en muizen. Naar deze gene drives wordt al decennialang onderzoek gedaan. Omdat de daarbij verkregen inzichten relevant zijn voor het beoordelen van de risico's van 'synthetische' gene drives, heeft de COGEM literatuuronderzoek laten uitvoeren naar de eerder uitgevoerde experimenten. Tevens is de beschikbare kennis over 'synthetische' gene drives, zoals de CRISPR-gene drives, in kaart gebracht.

¹ Staatscourant (2016). Regeling van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu van 15 juni 2016, nr. IENM/BSK-2016/107788, tot wijziging van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 (aanpassing bijlagen 2,4, 5 en 11). Nr. 31027; 16 juni 2016

² Kamerbrief (2016). Beleid ten behoeve van een nieuwe ontwikkeling in de biotechnologie. Kenmerk IENM/BSK-2015/225461

³ DeFrancesco L (2015). Gene drive overdrive. Nat. Biotechnol. 33(10): 1019-1021



Er blijkt een klein aantal veldexperimenten te zijn uitgevoerd met gene drives. Bij deze experimenten werden gene drives gebruikt om insecten (vrijwel altijd muggen) te bestrijden. De mate waarin dit lukte, wisselde. Bij geen van de veldexperimenten werden negatieve effecten op de mens of het milieu waargenomen en de gene drives verspreidden zich niet naar andere populaties. Er zijn verschillende aspecten die de verspreiding van gene drives kunnen belemmeren, zoals de biologie en populatiedynamiek van het organisme, de efficiëntie van de drive en de aan een gene drive verbonden 'fitnesskosten'.

Er zijn nog geen veldexperimenten uitgevoerd met 'synthetische' gene drives. Uit de beschikbare gegevens blijkt dat insecten gemakkelijk resistent worden tegen CRISPR-gene drives waardoor de verspreiding van deze gene drives wordt belemmerd.

Op basis van het uitgevoerde literatuuronderzoek concludeert de COGEM dat, mede door het ontstaan van resistente organismen, de kans verwaarloosbaar klein is dat wanneer bij laboratoriumonderzoek een enkel organisme met een CRISPR-gene drive ontsnapt, een gehele populatie zal worden veranderd of uitgeroeid. De COGEM adviseert om het inschalingsartikel waarmee experimenten met organismen met CRISPR-gene drives op het hoogste inperkingsniveau worden ingeschaald, te beperken tot organismen met CRISPR-gene drives die speciaal zijn ontworpen om het ontstaan van resistentie te voorkomen of te doorbreken.

Aanleiding

In 2016 is besloten om de Regeling ggo milieubeheer 2013 aan te passen en werkzaamheden waarbij een organisme met een CRISPR-gene drive zou kunnen ontstaan op het hoogste inperkingsniveau (IV) in te schalen, omdat het uit een laboratorium ontsnappen van een organisme met een CRISPR-gene drive er onomkeerbaar toe zou leiden dat een CRISPR-gene drive zich door een gehele populatie zou verspreiden met mogelijk ernstige gevolgen voor het milieu.^{1,2} Er werd ook toen echter al door verschillende wetenschappers betwijfeld of CRISPR-gene drives zich daadwerkelijk efficiënt door natuurlijke populaties zouden kunnen verspreiden.³

Gene drives komen in verschillende organismen van nature voor en er wordt al decennialang onderzocht hoe deze gene drives ingezet zouden kunnen worden om ongewenste insecten, zoals malariamuggen, te bestrijden. Om inzicht te krijgen in de kennis en ervaringen die bij dit onderzoek zijn opgedaan, onder meer met betrekking tot de verspreiding van gene drives, heeft de COGEM literatuuronderzoek laten uitvoeren. Dit onderzoek is uitgevoerd door Perseus BVBA en heeft geresulteerd in het bijgevoegde onderzoeksrapport '[Gene drives – experience with gene drive systems that may inform an environmental risk assessment](#)' (CGM 2018-03).



Onderzoeksresultaten

Onderzoek met gene drive systemen

Gene drives komen van nature onder meer voor bij schimmels, planten, insecten en zoogdieren. In deze organismen zijn verschillende gene drive systemen aangetroffen, zoals 'transposons', 'underdominance', 'MEDEA', 'homing endonucleases' en 'meiotic drives'. Normaal gesproken wordt een genetische sequentie aan de helft van de nakomelingen overgedragen. Een gene drive wordt echter aan meer dan de helft van de nakomelingen overgedragen. Hierdoor neemt de frequentie waarin de gene drive in een populatie aanwezig is toe. De mate waarin deze frequentie toeneemt, is afhankelijk van de gene drive, het organisme en de omgevingsfactoren.

Al sinds de jaren 70 van de vorige eeuw wordt onderzocht hoe gene drives toegepast kunnen worden om de genetische samenstelling van organismen in een populatie te veranderen (zogenaamde wijzigingsdrives) of de organismen in een populatie te bestrijden (zogenaamde suppressie-drives). Het merendeel van de gene drive systemen is alleen in het laboratorium onderzocht. Enkele gene drive systemen, namelijk 'underdominance gene drives' (cytoplasmatische incompatibiliteit en translocaties) en de symbiotische bacterie *Wolbachia*⁴, zijn in het veld toegepast om schadelijke insecten (meestal muggen) te bestrijden.

Bij deze veldexperimenten bleek de doelpopulatie niet volledig bestreden of vervangen te worden, onder andere doordat de organismen met een gene drive een lage fitness hadden, er te weinig organismen met een gene drive werden uitgezet, of doordat insecten uit naburige populaties de doelpopulatie binnenkwamen. De gene drives verspreidden zich bij deze veldexperimenten niet naar andere populaties.

'Synthetische' gene drives

In het onderzoeksrapport wordt ook ingegaan op 'synthetische' gene drives, zoals CRISPR-gene drives. CRISPR-gene drives behoren tot de zogenaamde 'homing endonuclease gene drives' en kunnen zowel gebruikt worden voor het veranderen van de genetische samenstelling van organismen in een populatie (wijzigingsdrives) als voor het bestrijden van organismen in een populatie (suppressie-drives). In sommige gevallen kan de CRISPR-gene drive zelf het gewenste effect teweegbrengen. In andere gevallen wordt een gen dat het gewenste effect teweegbrengt ('cargo gene') aan de CRISPR-gene drive gekoppeld.

CRISPR-gene drives zijn in het laboratorium zeer efficiënt, maar nog niet in het veld onderzocht. De onderzoekers constateren dat door het specifieke werkingsmechanisme van CRISPR-gene drives organismen gemakkelijk resistent worden tegen deze gene drives. In het onderzoeksrapport worden verschillende voorbeelden gegeven van laboratorium-experimenten waarbij resistente organismen ontstonden. Ook wordt opgemerkt dat in natuurlijke populaties organismen aanwezig kunnen zijn die van nature resistent zijn tegen CRISPR-gene drives.

⁴ Hoewel de bacterie *Wolbachia* strikt genomen niet aan de definitie van een gene drive voldoet, verspreidt zij zich op eenzelfde manier en maakt zij daarom deel uit van het onderzoek



Verspreiding van gene drives in het milieu

Bij de eerder uitgevoerde veldexperimenten verspreidden de gene drives zich niet naar andere populaties. De onderzoekers noemen verschillende aspecten die de verspreiding van een gene drive kunnen belemmeren, zoals de biologie en populatiedynamiek van het organisme, de efficiëntie van de drive en de fitnesskosten die de gene drive en het 'cargo gen' (indien aanwezig) met zich meebrengen. Ook de aanwezigheid van resistente organismen, die al van nature aanwezig kunnen zijn of kunnen ontstaan, belemmeren de verspreiding van een gene drive. Hierdoor achten de onderzoekers het niet waarschijnlijk dat de introductie van een organisme met een gene drive onomkeerbaar leidt tot het uitroeien of veranderen van alle organismen van een bepaalde soort.

Recent onderzoek naar het tegengaan van resistentie

CRISPR-gene drives maken een enzym, endonuclease, dat op een specifieke plaats in het DNA breuken maakt, zodat de gene drive kan worden overgedragen. Bij het repareren van deze breuken kan er een sequentie ontstaan die niet langer door de gene drive herkend wordt waardoor de gene drive niet aan het organisme of diens nakomelingen overgedragen kan worden en ze dus resistent zijn geworden. Omdat resistente organismen de verspreiding van gene drives verhinderen, wordt door onderzoekers onderzocht hoe het ontstaan van resistentie kan worden tegengegaan.

Om de kans op het ontstaan van resistentie zoveel mogelijk te beperken, wordt onderzoek gedaan naar gene drives waarbij de aanwezigheid van het endonuclease zoveel mogelijk wordt beperkt tot de fase waarin de gene drive wordt overgedragen (tijdens de vorming van de geslachtscellen).⁵ Het bovenstaande is echter niet voldoende om het veranderen van de herkenningssequentie volledig te voorkomen.

Daarom worden gene drives ontwikkeld die meerdere sequenties in het DNA herkennen.^{5,6} Een verandering van één van de herkenningssequenties veroorzaakt dan niet direct resistentie, want de gene drive kan nog steeds via de andere herkenningssequenties overgedragen worden. Hoewel dergelijke gene drives het ontstaan van resistentie tegengaan, blijkt het ontstaan van resistentie niet volledig te worden voorkomen.^{5,6} Dit komt onder andere doordat deze gene drives soms slechts één van de herkenningssequenties blijken te gebruiken. Daarnaast blijken deze gene drives minder efficiënt en vaak slechts gedeeltelijk te worden overgedragen.^{5,6} Hieruit blijkt dat het zeer lastig is om een goed functionerende gene drive te ontwikkelen waar geen resistentie tegen ontstaat. Er zijn op dit moment nog geen voorbeelden van gene drives waarbij dit is gelukt.

Ook worden er speciale gene drives ontwikkeld waarbij resistente organismen zich niet kunnen voortplanten, zodat het ontstaan van resistentie de verspreiding van de gene drive niet verhindert. Bij twee experimenten met een dergelijke gene drive, die dusdanig ontworpen was dat door het ontstaan van resistentie de muggen steriel werden, bleek deze gene drive in beide gevallen in staat om een in een gaaskooi gehouden groep malariamuggen

⁵ Champer J *et al.* (2018). Reducing resistance allele formation in CRISPR gene drive. PNAS 115 (21): 5522-5527

⁶ Oberhofer G *et al.* (2018). Behavior of homing endonuclease gene drives targeting genes required for viability or female fertility with multiplexed guide RNAs. PNAS 115 (40): E9343-E9352



(*Anopheles gambiae*) te elimineren.⁷ Dit resultaat werd al na een beperkt aantal generaties (8 en 12) bereikt, doordat er bij het begin van het experiment al relatief veel muggen met een gene drive aanwezig waren en de groep muggen relatief klein was. Hoewel er ook bij deze gene drive muggen waren waarbij de herkenningsequentie van de gene drive was veranderd, konden deze muggen zich inderdaad niet voortplanten en werd de verspreiding van de gene drive niet belemmerd. De onderzoekers merken op dat verder onderzoek nodig is om te bepalen of deze gene drive ook een wilde populatie muggen kan elimineren.

Uit onderzoek met gg-muggen blijkt dat deze muggen onder natuurlijke omstandigheden vaak minder fit zijn dan hun wilde soortgenoten. Dit zou de verspreiding van de gene drive kunnen belemmeren. Ook zijn de verschillen in sequenties in muggen uit natuurlijke populaties groter, waardoor er binnen een populatie al muggen aanwezig kunnen zijn, die de sequentie die de gene drive herkent niet hebben en daardoor resistent zijn. De onderzoekers hebben dit geprobeerd te ondervangen door voor hun gene drive een herkenningsequentie te gebruiken die in vrijwel alle malariamuggen (*A. gambiae* complex) voorkomt. Sommige wilde malariamuggen (2,9% van 756 gevangen malariamuggen uit Sub-Sahara Afrika) blijken echter niet de exacte herkenningsequentie, maar een sequentie die hiervan één nucleotide verschilt, te bevatten. Deze sequentie wordt nog steeds door de gene drive herkend,⁷ maar het is niet uitgesloten dat er elders malariamuggen zijn die een sequentie hebben die niet door de gene drive wordt herkend. De onderzoekers merken op dat ook tegen hun gene drive in de loop van de tijd resistentie zou kunnen ontstaan. Het is niet uitgesloten dat er uiteindelijk een mug ontstaat waarbij de herkenningsequentie op zo'n manier is veranderd dat deze niet meer door de gene drive herkend wordt, maar wel tot fertiele muggen leidt.⁷

COGEM advies

De COGEM concludeert op basis van de onderzoeksresultaten dat het beeld dat gene drives na introductie in het milieu onherroepelijk leiden tot het uitroeien of het veranderen van populaties of soorten, in werkelijkheid genuanceerder ligt. Het aantal veldproeven dat met gene drives is uitgevoerd, is beperkt, maar er zijn geen aanwijzingen dat gene drives zich onbelemmerd in het milieu kunnen verspreiden.

CRISPR-gene drives zijn nog niet in het veld onderzocht, maar tegen deze gene drives ontstaat gemakkelijk resistentie. Er wordt op dit moment onderzoek gedaan naar CRISPR-gene drives die het ontstaan van resistentie tegengaan of kunnen doorbreken. Het is echter nog niet gelukt om een goed functionerende CRISPR-gene drive te ontwikkelen waartegen zich geen resistentie ontwikkelt. Wel is er een CRISPR-gene drive gemaakt die speciaal is ontworpen zodat resistente organismen zich niet kunnen voorplanten en de verspreiding van de CRISPR-gene drive niet belemmeren. Er is nog niet onderzocht of deze gene drive zich onder natuurlijke omstandigheden in wilde muggenpopulaties goed kan verspreiden.

⁷ Kyrou K *et al.* (2018). A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36: 1062-1066



Op basis van het uitgevoerde literatuuronderzoek merkt de COGEM op dat zorgen dat onderzoekers onbedoeld een CRISPR-gene drive zouden kunnen creëren die tot milieurisico's zou kunnen leiden, ongegrond zijn. Er zijn geen aanwijzingen dat het uit een laboratorium ontsnappen van een organisme met een CRISPR-gene drive een gehele populatie kan veranderen of uitroeien. Ook bij CRISPR-gene drives die speciaal zijn ontworpen om het ontstaan van resistentie te voorkomen of te doorbreken, is het de vraag of zij zich in natuurlijke populaties goed kunnen verspreiden en tot grootschalige effecten zouden kunnen leiden, maar voor deze CRISPR-gene drives kan dit op dit moment niet worden uitgesloten.

Gezien het bovenstaande adviseert de COGEM om het inschalingsartikel waarmee experimenten met organismen met CRISPR-gene drives op het hoogste inperkingsniveau worden ingeschaald, te beperken tot organismen met CRISPR-gene drives die speciaal zijn ontworpen om het ontstaan van resistentie te voorkomen of te doorbreken.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW