



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Cogem
postbus 578
3720 AN Bilthoven

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX DEN HAAG

Uw kenmerk
SAS/2003025696

Uw brief van
16 september 2003

Kenmerk
CGM/050707-02

Datum
7 juli 2005

Onderwerp
Advies "Toepassingen van oligonucleotiden"

Geachte heer Van Geel,

Hierbij bied ik u het advies aan getiteld "Toepassingen van oligonucleotiden, effecten en potentiële genoomveranderingen", naar aanleiding van de adviesvraag (SAS/2003025696) van het ministerie van VROM.

Samenvatting

Oligonucleotiden zijn korte RNA en/of DNA stukjes die toegediend kunnen worden aan mensen, dieren of planten om processen in de cel te reguleren. Oligonucleotiden kunnen afhankelijk van de samenstelling binden aan DNA, RNA of eiwitten, waardoor de expressie van genen gereguleerd of de sequentievolgorde in het DNA veranderd kan worden. De COGEM is gevraagd om de toepassingen van oligonucleotiden in kaart te brengen die, bedoeld of onbedoeld, kunnen leiden tot genetische modificatie van cellen.

Tot de oligonucleotiden die bedoeld een interactie aangaan met DNA behoren chimeraplastie-oligonucleotiden, chemisch gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden, niet-gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden, 'branched' oligonucleotiden, 'triple helix forming' oligonucleotiden en integrerende recombinant dubbelstrengs DNA oligonucleotiden. De COGEM is van mening dat dergelijke oligonucleotiden kunnen leiden tot sequentieveranderingen in het genoom, waarbij een zeer kleine kans bestaat dat ook onbedoelde sequentiemodificaties geïnduceerd worden.

Daarnaast zijn er oligonucleotiden die een interactie aangaan met RNA of eiwitten, zoals antisense RNA oligonucleotiden, siRNA, CpG oligonucleotiden, eiwitbindende oligonucleotiden en aptameren. De COGEM is van mening dat de kans dat sequentieveranderingen in het genoom geïnduceerd worden door deze groep oligonucleotiden verwaarloosbaar klein is.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

cc. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Toepassingen van oligonucleotiden

Effecten en potentiële genoomveranderingen

COGEM advies CGM/050707-02

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).

Dit advies is voorbereid door een werkgroep bestaande uit:

Dr. B.P.H. Peeters (<i>voorzitter</i>)	Animal Sciences Group, Wageningen Universiteit en Researchcentrum, Lelystad; COGEM-lid
Prof. dr. B. Berkhout	Humane Retrovirologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
Dr. D.A. Bleijs	Coördinator subcommissie Medisch Veterinair van de COGEM
Dr. J.T. den Dunnen	Humane en Klinische Genetica, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden
Prof. dr. R.C. Hoeben	Moleculaire Celbiologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden; Voorzitter subcommissie Medisch Veterinair van de COGEM
Prof. dr. H. te Riele	Moleculaire Biologie, Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam

Adviseur namens het ministerie van VROM:

Dr. J.E.N. Bergmans	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bureau GGO, Bilthoven
---------------------	--

INHOUDSOPGAVE

Samenvatting	3
1. Inleiding	5
1.1 Oligonucleotiden	5
1.2 Adviesvraag	7
2. Overzicht oligonucleotiden	11
2.1 Interacties op RNA niveau	12
2.2 Interacties op DNA niveau	15
2.3 Interacties op eiwitniveau	20
3. Sequenties betrokken bij gelokaliseerde recombinatie	21
4. Effecten van oligonucleotiden	23
4.1 Interacties van oligonucleotiden op DNA niveau	23
4.2 Interacties van oligonucleotiden op RNA- of eiwitniveau	25
4.3 Minimaliseren van neveneffecten oligonucleotiden	28
5. Conclusies	31
Referenties	33

Samenvatting

In toenemende mate wordt in de planten- en medische biotechnologie gebruik gemaakt van oligonucleotiden. Oligonucleotiden zijn moleculen die opgebouwd zijn uit de bouwstenen (nucleotiden) van het erfelijk materiaal (DNA en/of RNA). De lengte van oligonucleotiden kan variëren van enkele tientallen tot meer dan honderd nucleotiden. De sequenties waaruit oligonucleotiden bestaan kunnen overeenkomen met cellulaire sequenties die volledig, gedeeltelijk of helemaal niet coderen voor eiwit.

Oligonucleotiden komen van nature veelvuldig voor in plantaardige en dierlijke cellen. In laboratoria kunnen oligonucleotiden chemisch gesynthetiseerd worden. Hierbij worden ze vaak chemisch gemodificeerd om ze stabiel te maken. Oligonucleotiden kunnen toegepast worden om de expressie van genen te moduleren, waardoor de hoeveelheid geproduceerd eiwit verandert of waardoor alternatieve eiwitten gevormd worden. Daarnaast worden oligonucleotiden gebruikt om gericht mutaties in het genoom van cellen te induceren. Dit vindt plaats door een specifieke interactie tussen het oligonucleotide en het homologe DNA. Een derde toepassing van oligonucleotiden is het gebruik als adjuvans voor het stimuleren van een afweerreactie in mensen of dieren.

Oligonucleotiden kunnen een interactie aangaan met DNA, RNA of eiwitten. Interacties met het genoom hebben doorgaans tot doel om gericht sequentieveranderingen in het DNA aan te brengen. Naast deze bedoelde interacties met het genoom is een kans aanwezig dat het oligonucleotide onbedoelde interacties aangaat met het genoom waardoor ongewenste sequentiemodificaties zouden kunnen optreden. Over het optreden van onbedoelde modificaties is in de literatuur weinig bekend. De efficiënte van recombinatie waardoor dergelijke sequentiemodificaties kunnen ontstaan is echter laag. Tevens zal een groot gedeelte van de ontstane fouten in de basenvolgorde van het genoom gerepareerd worden door het cellulaire DNA mismatch-herstelsysteem.

Oligonucleotiden voor de regulatie van genexpressie op RNA niveau zijn meestal volledig homolog aan de doelwitsequentie. Dergelijke oligonucleotiden zijn vaak chemisch gemodificeerd waardoor ze minder snel worden afgebroken en ze niet meer herkend worden door recombinatie-enzymen. Hierdoor is het onwaarschijnlijk dat homologe recombinatie van chemisch gemodificeerde oligonucleotiden met het genoom op zal treden. Oligonucleotiden die een interactie hebben op RNA niveau zouden echter wel onbedoelde interacties aan kunnen gaan met mRNA, waardoor de eiwitproductie verstoord wordt. Ook zijn er aanwijzingen dat epigenetische

effecten, zoals methylering van het genoom, door toedoen van oligonucleotiden kunnen optreden.

Aangezien een aantal toepassingen van oligonucleotiden momenteel of in de nabije toekomst mogelijk gebruikt zullen worden in mensen, dieren en planten, is de COGEM door het ministerie van VROM gevraagd om die toepassingen van oligonucleotiden in kaart te brengen die - al dan niet bedoeld of onbedoeld - kunnen leiden tot genetische modificatie van cellen.

Oligonucleotiden die bedoeld een interactie aangaan met DNA kunnen leiden tot sequentieveranderingen in het genoom. Daarbij is de COGEM van mening dat een zeer kleine kans aanwezig is, dat ook onbedoelde sequentiemodificaties geïnduceerd worden. De COGEM is voorts van mening dat de kans dat sequentieveranderingen in het genoom geïnduceerd worden door oligonucleotiden die een interactie aangaan met RNA of eiwitten, verwaarloosbaar klein is.

1. Inleiding

Zowel in de medische- als in de plantenbiotechnologie wordt voor diverse doeleinden in toenemende mate gebruik gemaakt van oligonucleotiden. Dit zijn moleculen die zijn opgebouwd uit de verschillende nucleotiden van het DNA of RNA. Met behulp van oligonucleotiden is het bijvoorbeeld mogelijk om de expressie van genen te reguleren (1-5). Deze toepassing is begin jaren negentig in eerste instantie bestudeerd in de nematode *Caenorhabditis elegans* (6). Oligonucleotiden kunnen ook gebruikt worden om specifiek delen van het erfelijk materiaal te veranderen (1; 2; 7).

De potentie van oligonucleotiden werd al snel duidelijk. Op medisch gebied kunnen ze als therapeuticum gebruikt worden voor de behandeling van verschillende aandoeningen variërend van kanker tot malaria (8-10). Dit alles heeft geleid tot de ontwikkeling van een spectrum aan oligonucleotiden die toegepast worden voor diverse doeleinden. Gezien het toenemende gebruik van oligonucleotiden, is de COGEM door het ministerie van VROM gevraagd om die toepassingen van oligonucleotiden in kaart te brengen die al dan niet bedoeld of onbedoeld kunnen leiden tot fenotypische of genotypische veranderingen van cellen in planten, dieren of mensen.

In de volgende paragraaf worden de verschillende oligonucleotiden en technieken die momenteel gangbaar zijn in de medische- en/of plantenbiotechnologie kort beschreven. Hierbij worden de verschillende toepassingen belicht en wordt een indeling gemaakt van interacties van de moleculen op RNA-, DNA-, of eiwitniveau. In het tweede hoofdstuk zal in detail hierop worden ingegaan. In het derde hoofdstuk wordt, zoals verzocht in de adviesvraag, een overzicht gegeven van sequenties die betrokken zijn bij gelokaliseerde recombinatie. De adviesvraag van het ministerie van VROM is in de laatste paragraaf van het huidige hoofdstuk geciteerd. In het vierde hoofdstuk wordt ingegaan op de effecten van de verschillende typen oligonucleotiden, waarbij het induceren en ontstaan van sequentiemodificaties in het genoom centraal staat. Ten slotte worden in het laatste hoofdstuk de conclusies weergegeven.

1.1 Oligonucleotiden

De lengte van oligonucleotiden kan variëren van enkele tientallen tot meer dan honderd nucleotiden. Door hun beperkte grootte coderen oligonucleotiden over het algemeen niet voor eiwit. De sequenties waaruit oligonucleotiden bestaan

kunnen echter volledig of gedeeltelijk overeenkomen met genomische sequenties die coderen voor eiwit. Oligonucleotiden komen voor in planten en dieren, waarbij ze meestal een rol spelen bij de regulatie van genexpressie. Oligonucleotiden kunnen chemisch gesynthetiseerd worden en kunnen voor diverse toepassingen gebruikt worden.

Toepassingen en interacties

In principe kunnen er drie toepassingen van oligonucleotiden in planten, dieren of mensen onderscheiden worden. De eerste toepassing betreft oligonucleotiden die de genexpressie moduleren, waardoor de hoeveelheid geproduceerd eiwit verandert of waardoor alternatieve eiwitten gevormd worden. Een oligonucleotide kan op basis van homologie bijvoorbeeld binden aan de promoter van een gen. Hierdoor wordt het DNA niet meer vertaald in boodschapper RNA (mRNA) en stopt de eiwitproductie. Het mRNA dient als blauwdruk voor de eiwitsynthese. Tevens kan een oligonucleotide op basis van homologie direct een interactie aangaan met het mRNA, waardoor ook de eiwitproductie geblokkeerd kan worden. Deze technieken staan bekend als 'antisense' RNA, 'RNA interference' en 'RNA silencing' (11). Daarnaast kan de eiwitproductie gemoduleerd worden doordat oligonucleotiden aan cellulaire eiwitten binden die de genexpressie reguleren, zoals transcriptiefactoren. Een andere mogelijkheid is dat door de interactie van het oligonucleotide met het mRNA een alternatief eiwit geproduceerd wordt doordat het mRNA verkort ('exon skipping') of verlengd ('exon inclusion') wordt. Een markant voorbeeld van modulatie van genexpressie onder invloed van oligonucleotiden in planten is de regulatie van bloemkleur en bloeitijd (3; 12). De van nature blauwe bloemen van de tuinplant *Torenia* (*Torenia hybrida*) kunnen veranderd worden in witte bloemen door toediening van oligonucleotiden die interfereren met de expressie van een gen dat betrokken is bij de vorming van bloemkleur (12)

Een tweede toepassing van oligonucleotiden heeft tot doel om gericht mutaties in het genoom in cellen te induceren. Mutaties kunnen veroorzaakt worden wanneer een oligonucleotide in één of enkele nucleotiden verschilt ('mismatch') met een homolog stuk DNA van de gastheer. Doordat het oligonucleotide hybridiseert met het DNA kan er een uitwisseling tussen het oligonucleotide en het genoom (recombinatie) optreden. Hierdoor wordt de sequentie van het 'mismatch' nucleotide in het DNA ingebouwd en is er sprake van een sequentiemodificatie. De kans op homologe recombinatie neemt toe naarmate meer sequenties in het oligonucleotide aanwezig zijn die homolog zijn aan sequenties in het genoom. In oligonucleotiden kunnen ook specifieke sequenties voorkomen die als substraat kunnen dienen voor enzymen betrokken bij recombinatie (13). Een voorbeeld van een techniek die gericht is op het aanbrengen van nucleotideveranderingen in het genoom is chimera-plastie (7;

14). Hierbij wordt een complex oligonucleotide gebruikt dat bestaat uit zowel RNA als DNA. Ook met later ontwikkelde eenvoudiger oligonucleotiden kunnen genen in cellen van planten, dieren, en ook mensen, gemodificeerd worden. Hierdoor zouden oligonucleotiden gebruikt kunnen worden bij gentherapie, waarbij een defect of verstoord gen gerepareerd kan worden (4; 15).

De derde toepassing van oligonucleotiden betreft het gebruik bij het opwekken van een afweerreactie. Door een bepaalde samenstelling van oligonucleotiden worden ze door het menselijk lichaam als lichaamsvreemd herkend. Hierdoor zal het immuunsysteem geactiveerd worden. Van deze adjuverende eigenschap van oligonucleotiden wordt gebruik gemaakt bij immuuntherapie tegen bijvoorbeeld kanker. Bij een dergelijke therapie wordt het immuunsysteem geactiveerd om kankercellen te vernietigen (9; 16).

Bepaalde toepassingen van oligonucleotiden hebben tot doel om gericht sequentieveranderingen in het DNA aan te brengen. Naast deze bedoelde interacties met het genoom is er in principe een kans aanwezig dat de oligonucleotide onbedoelde interacties aangaat. Hierdoor zouden ongewenste sequentiemodificaties kunnen optreden. Deze kans is groter bij oligonucleotiden die geheel of gedeeltelijk homolog zijn aan sequenties in het genoom, dan bij oligonucleotiden die geen homologie vertonen. Van synthetische fosfothioaat oligonucleotiden, die chemisch gemodificeerd zijn en geen enkele bekende homologie hebben met genomisch DNA, heeft de COGEM in het verleden geconcludeerd (17), dat de kans verwaarloosbaar klein is dat hierdoor veranderingen in het genoom optreden.

1.2 Adviesvraag

De adviesvraag van het ministerie van VROM richt zich op de genetische effecten van toepassingen van oligonucleotiden. Specifiek wordt gevraagd om in kaart te brengen welke technieken courant zijn of ontwikkeld worden. Tevens wordt gevraagd welke genetische interacties bij toepassing van de technieken kunnen plaatsvinden en welke daarvan kunnen leiden tot genetische modificatie. De adviesvraag van het ministerie van VROM is hieronder in cursief geciteerd.

De afgelopen tijd is een aantal malen gediscussieerd over de genetische gevolgen van toepassingen van oligonucleotiden. Deze discussie richt zich op chimeraplastie, dit zijn hybride DNA/RNA moleculen die worden gebruikt voor gerichte mutagenese van het genoom, poly GC fosfothioaat oligonucleotiden die worden gebruikt als adjuvans bij een immuunrespons, maar die ook een

interactie met het genoom kunnen hebben, en 'antisense' fosforothioaat oligonucleotiden die een interactie hebben met mRNA, maar die eveneens een interactie met het genoom kunnen hebben. De indruk bestaat dat dit slechts drie voorbeelden zijn uit een breed scala van toepassingen van nucleïnezuren, die leiden tot fenotypische of genotypische veranderingen van een cel langs andere wegen dan de direct bedoelde inbouw van nucleïnezuren in een genoom, die plaats vindt bij de 'klassieke' technieken van genetische modificatie.

Gelet op de noodzaak om tijdig te anticiperen op voortschrijdende ontwikkelingen in de biotechnologie, is het nodig om een goed beeld te hebben over de manier waarop en de mate waarin deze (nieuwe) technieken kunnen leiden tot veranderingen in genomen. Het gaat om een breed scala aan technieken, waarbij het steeds de vraag is in hoeverre toediening van nucleïnezuren aan levende biologische systemen kan leiden tot blijvende veranderingen in de genetische informatie van de cellen.

De volgende opsomming geeft de breedte van het scala aan.

- 1) Toediening van nucleïnezuren die volledige coderende sequenties bevatten.*
 - a) DNA moleculen, bijvoorbeeld complete plasmiden, die aan cellen worden toegevoegd met het doel om een tijdelijke expressie te krijgen van daarop aanwezige coderende sequenties. Men spreekt van 'DNA vaccinatie', al gaat het niet steeds om toepassingen met het doel om het immuunsysteem te activeren. Het gaat om recombinant DNA moleculen, die in de ontvangende cel geen repliconfunctie hebben, en die geen speciale sequenties dragen die tot doel hebben om integratie van het DNA in het genoom te bewerkstelligen. Het DNA wordt 'naakt' toegediend, of gecomplexeerd aan of in dragers, zoals liposomen.*
 - b) RNA moleculen, die 'naakt' worden toegediend, of 'ingepakt' bijvoorbeeld in virusmantels ('virus like particles'). Het kan daarbij gaan om mRNA dat men tijdelijk tot expressie wil laten komen, of om (delen van) virale genomen.*
- 2) Toediening van oligonucleotiden die geen of slechts een deel van een coderende sequentie bevatten. De sequentie kan, al dan niet volledig, homoloog zijn aan sequenties in het genoom, of geen bewuste homologie dragen.*
 - a) Volledig homologe sequenties, die tot doel hebben om via verschillende mechanismen te interfereren met in de cel aanwezig homoloog mRNA.*
 - b) Homologe sequenties met een of meerdere mismatches, die aanleiding kunnen geven tot door de mismatches bepaalde mutaties.*
 - c) Sequenties zonder bedoelde homologie, die slechts 'toevallig' een interactie zullen hebben met het genoom.*

3) *Inbouw in het genoom van korte sequenties die substraat zijn voor enzymen betrokken bij gelokaliseerde recombinatie. Voorbeeld is de lox sequenties gebruikt in het cre/lox systeem.*

Voor al deze systemen geldt dat in risico-analyses over het algemeen goed is vast te stellen wat de bedoelde effecten zullen zijn, maar dat er ook andere genetische interacties plaats kunnen vinden waarvan de gevolgen minder makkelijk zijn vast te stellen.

Gevraagd wordt om in kaart te brengen welke technieken courant zijn of ontwikkeld worden. Daarnaast wordt gevraagd welke genetische interacties er, al dan niet bedoeld, bij toepassing van de technieken plaats kunnen vinden en welke daarvan kunnen leiden tot veranderingen in het genetisch materiaal.

Het is vermoedelijk van belang om na te gaan of de overwegingen verschillen afhankelijk van de vraag of er bij de toepassingen virale sequenties betrokken zijn.

Het eerste gedeelte van de adviesvraag, betreffende de toediening van nucleïnezuren die volledig coderende sequenties bevatten, is onlangs door de COGEM in een advies getiteld "Integratie en verspreiding van naakt DNA" behandeld (18). Derhalve zal het onderhavige advies alleen ingaan op het tweede en derde gedeelte van de adviesvraag inzake oligonucleotiden en sequenties die recombinatie actief kunnen bevorderen.

2. Overzicht oligonucleotiden

Het onderhavige advies richt zich primair op oligonucleotiden die chemisch gesynthetiseerd en eventueel gemodificeerd zijn en toegediend zullen worden aan (cellen van) planten, dieren of mensen. In het laboratorium kunnen oligonucleotiden gemaakt worden door chemische koppeling van vijf verschillende nucleotiden. Nucleotiden zijn opgebouwd uit een fosfaatgroep, een suiker (deoxyribose voor DNA en ribose voor RNA) en één van de basen: adenine (A), thymine (T), cytosine (C), guanine (G) en uracil (U). Oligonucleotiden worden vaak chemisch gemodificeerd om ze stabiel te maken. Door de chemische modificatie worden de oligonucleotiden minder snel door enzymen (nucleasen) afgebroken en blijven zodoende langer in een cel functioneel aanwezig.

Chemische modificatie van oligonucleotiden kan in principe op drie manieren plaatsvinden. Ten eerste door veranderingen aan te brengen in de basen. Ten tweede door modificaties op de 2'-positie van de ribose, en tot slot door modificatie of vervanging van de fosfaatgroep (11).

Een voorbeeld van een chemische modificatie zijn fosforothioaat-oligonucleotiden (PS), waarbij zuurstofatomen van de fosfaatgroep, die niet betrokken zijn bij de fosfo-diesterbinding, vervangen zijn door zwavelatomen. De voornaamste nadelen van deze zogenaamde eerste generatie oligonucleotiden is hun lage affiniteit voor het doelwit RNA en hun toxische bijwerkingen. In de laatste jaren zijn andere modificaties ontwikkeld waarmee een hogere stabiliteit, een betere affiniteit voor het doelwit RNA en een lagere toxiciteit worden verkregen. Tot de tweede generatie oligonucleotiden behoren 2'-O-methyl RNA (OMe) en 2'-O-methoxy-ethyl RNA (MOE). Bij deze oligonucleotiden zijn veranderingen aangebracht aan de 2' positie van de ribose. Derde generatie oligonucleotiden zijn opgebouwd uit nucleotiden waarbij de chemische samenstelling van de fosfaatverbindingen of suikergroepen vaak drastisch veranderd zijn. Tot deze groep van oligonucleotiden behoren onder andere nucleïnezuren waaraan peptiden zijn toegevoegd, N^{3'}-P^{5'}-fosforoamidaat (NP), 2'-fluoro-arabino nucleïnezuren (FANA), 'locked' nucleïnezuren (LNA), morfolino fosfoamidaat (MF), cyclohexeen nucleïnezuren (CeNA) en tricyclo-DNA (tcDNA) (11; 19-23). Verdere ontwikkelingen, waarbij extra moleculen aan oligonucleotiden gekoppeld worden, zijn volgens de geraadpleegde deskundigen zeker te verwachten.

Oligonucleotiden kunnen op diverse manieren aan cellen, dieren of planten toegediend worden. De methoden wijken weinig af van de methoden die

gebruikt worden om bijvoorbeeld cellen te transfecteren met plasmiden. Vaak wordt gebruik gemaakt van een transfectiemiddel zoals lipofectamine (24). Ook de koppeling van peptiden aan het oligonucleotide is een manier om opname door de cel te bevorderen (23). Door de aanwezigheid van een eiwitstructuur in de oligonucleotide zal de opname via receptoren op de cel plaatsvinden. Het voordeel van deze methode is dat van tevoren redelijkerwijs bepaald kan worden welke cellen de oligonucleotiden opnemen, aangezien verschillende celtypen andere receptoren bezitten.

In de literatuur is een groot aantal verschillende soorten oligonucleotiden vermeld met elk hun eigen werkingsmechanisme. Hiertoe behoren oligonucleotiden die chemisch gemodificeerd zijn of ongemodificeerde oligonucleotiden. In het voorgaande hoofdstuk zijn op globale wijze de interacties van oligonucleotiden met RNA, DNA of eiwitten beschreven. In de onderstaande paragrafen worden de verschillende oligonucleotiden op een meer gedetailleerde manier belicht.

2.1 Interacties op RNA niveau

Tot de oligonucleotiden die een interactie aangaan op RNA niveau behoren onder andere 'antisense' oligonucleotiden en 'short interfering' RNA's. In de literatuur is een groot aantal toepassingen van 'antisense' oligonucleotiden beschreven.

'Antisense' oligonucleotiden

'Antisense' RNA oligonucleotiden hebben meestal een lengte van 15 tot 20 basen. Deze RNA moleculen kunnen enkelstrengs en chemisch gemodificeerd zijn (11). Recent zijn ook circulaire 'antisense' oligonucleotiden beschreven (RNA lasso's van SomaGenics) (25). De oriëntatie van de oligonucleotiden is 'antisense' zodat ze kunnen binden aan een complementair mRNA molecuul dat een sense oriëntatie heeft. 'Antisense' oligonucleotiden worden toegepast om de productie van bepaalde eiwitten in de cel te reguleren, om het proces van RNA-splicing te beïnvloeden via 'exon-skipping' of 'exon-inclusion', of om RNA moleculen aan elkaar te plakken via 'trans-splicing'.

Regulatie eiwitproductie

Indien de juiste nucleotidenvolgorde wordt gekozen, kan een 'antisense' oligonucleotide binden aan een complementair mRNA molecuul dat verantwoordelijk is voor de productie van een specifiek eiwit. Als gevolg daarvan kan de synthese van een eiwit onderdrukt worden. Naast het blokkeren van de translatie van het mRNA kan hybridisatie van het 'antisense'

oligonucleotide aan het mRNA leiden tot het activeren van een bepaald enzym (RNase H). Het gevolg hiervan is dat het mRNA wordt afgebroken. Het netto resultaat in beide situaties is dat het mRNA niet meer vertaald kan worden in eiwit en dat de activiteit van het betreffende gen geblokkeerd is. Dit kan bijvoorbeeld een gen zijn dat codeert voor een eiwit dat gekoppeld is aan een ziekteproces (8; 11; 26; 27). In planten kan het een gen betreffen dat betrokken is bij de regulatie van de bloemkleur (12). Hierdoor wordt dus het fenotype van een cel beïnvloed (11). In 1998 is het eerste 'antisense' oligonucleotide medicijn Vitragene (Fomivirsen) op de markt gekomen voor de behandeling van cytomegalovirus-geïnduceerde infectie van de retina van patiënten met AIDS (28).

Regulatie RNA splicing

'Antisense' oligonucleotiden kunnen niet alleen het niveau van de eiwitproductie in een cel reguleren, maar kunnen ook het proces van RNA-splicing manipuleren (29). Deze technieken worden 'exon-skipping' en 'exon-inclusion' genoemd. Tijdens de vertaling van DNA in RNA worden zowel de eiwitcoderende sequenties van een gen (exonen) als de niet-eiwitcoderende sequenties (intronen) overgeschreven. Vervolgens worden door middel van RNA-splicing de intronen uit het primaire RNA transcript gehaald. Dit gebeurt middels het doorknippen en het weer aan elkaar plakken van het RNA, zodat een korter mRNA molecuul ontstaat met alleen de coderende stukken van het gen. Het doel van 'exon-skipping' en 'exon-inclusion' is het beïnvloeden van het proces van RNA-splicing en wel zodanig dat een bepaald vooraf gedefinieerd mRNA molecuul wordt gemaakt (29). Gevolg van toediening van dergelijke 'antisense' oligonucleotiden is dat een bepaald exon niet meer in het RNA wordt opgenomen ('exon-skipping') of dat een extra exon wordt toegevoegd ('exon-inclusion'), wanneer het gebruik van een specifieke knipplaats in het RNA wordt verschoven. Het werkingsmechanisme van 'exon-skipping' is grotendeels onbekend. Het meest waarschijnlijk is dat de herkenning door het spliceosoom van een exon-intron overgang in het primaire RNA wordt verstoord óf dat er sequenties die noodzakelijk zijn voor de splicing worden gemaskeerd door de binding van de 'antisense' oligonucleotide. Een andere mogelijkheid is dat de driedimensionale vouwing van het RNA verstoord wordt die nodig is voor de RNA-splicing. Hierdoor wordt het exon in het geheel niet herkend en overgeslagen. Naast het beïnvloeden van de RNA-splicing, leidt het gebruik van 'antisense' oligonucleotiden ook altijd tot een gedeeltelijke afbraak van het RNA.

Bij gentherapie kan het doel van 'exon-skipping' of 'exon-inclusion' bijvoorbeeld zijn om een mRNA molecuul, dat niet meer in een volledig of functioneel eiwit vertaald kan worden als gevolg van een mutatie in het DNA, weer functioneel te maken. Daarnaast kunnen ongewenste transcripten die

verantwoordelijk zijn voor de productie van schadelijke eiwitten geblokkeerd worden. Ook kan een exon in het mRNA opgenomen worden dat normaal niet door het proces van de RNA-splicing wordt herkend ('exon-inclusion of essence') (25; 29). De techniek kan ook worden ingezet om mRNA transcripten te genereren waarvan géén functioneel eiwit kan worden afgelezen ('gene silencing'). Het overslaan van meerdere exonen tegelijk behoort ook tot de mogelijkheden. Deze techniek wordt experimenteel toegepast, onder andere bij de spierziekte van Duchenne (30; 31). Het effect van 'exon skipping' is in muizen na het inbrengen van het oligonucleotide ongeveer een maand zichtbaar (31).

Regulatie RNA trans-splicing

Bij 'trans-splicing' wordt gebruik gemaakt van chimere 'antisense' oligonucleotiden die homoloog zijn aan twee verschillende RNA's (32; 33). Deze oligonucleotiden zijn afgeleid van zogenaamde groep I ribozymen. Dit zijn natuurlijk voorkomende katalytische RNA moleculen, die in staat zijn zichzelf als intron uit een primair RNA molecuul te verwijderen, waarna de flankerende sequenties weer aan elkaar geplakt worden (32). Groep I ribozymen kunnen zodanig gemodificeerd worden dat ze sequentie-specifiek een RNA molecuul herkennen en hieraan een andere RNA molecuul bevestigen ('trans-splicing'). Hierdoor kan bijvoorbeeld een verkort en niet-functioneel mRNA molecuul, dat ontstaan is als gevolg van een mutatie in het DNA, verlengd worden. In tegenstelling tot het verkorte mRNA molecuul, kan dit correcte mRNA molecuul wel vertaald worden in eiwit (33). Het doel van deze techniek is dus om twee verschillende RNA moleculen aan elkaar te rijgen tot één nieuw gewenst RNA molecuul. 'Trans-splicing' geeft interessante mogelijkheden voor de behandeling van ziekten waarbij mRNA moleculen gerepareerd dienen te worden. Een voorbeeld is de mogelijke therapie voor patiënten met de spierziekte myotone dystrofie, waarbij een cruciaal mRNA transcript (myotone dystrofie proteïne kinase) defect is (34).

Short interfering RNA

Short interfering RNA's (siRNA) zijn oligonucleotiden die evenals 'antisense' oligonucleotiden in staat zijn om een specifiek mRNA molecuul te inactiveren, waardoor de eiwitproductie gereguleerd kan worden (35). Het oligonucleotide bestaat doorgaans uit volledig complementaire RNA ketens van elk ongeveer 21 nucleotiden die chemisch zijn gesynthetiseerd en daarna aan elkaar gepaard zijn. Evenals 'antisense' oligonucleotiden werkt siRNA sequentie-specifiek. Bij een volledige homologie wordt het doelwit RNA afgebroken, en bij een gedeeltelijke homologie wordt de vertaling van het mRNA in eiwit geblokkeerd. siRNA is in korte tijd een veel gebruikte methode geworden voor de

manipulatie van genexpressie via modulatie van het mRNA in plaats van het DNA. De geraadpleegde deskundigen verwachten dat binnenkort veel chemisch gemodificeerde siRNA moleculen getest worden die wellicht de opname van RNA in de cel of de stabiliteit in de cel kunnen verhogen (10). Daarbij wordt siRNA niet alleen toegepast voor regulatie van de expressie van cellulaire genen, maar ook als therapie tegen RNA (of retro-) virussen. Aan virus geïnfecteerde cellen kunnen siRNA oligonucleotiden toegediend worden die complementair zijn aan het virale genoom. Hierdoor kan de virusreproductie geblokkeerd worden en zal het virus zich niet meer in de cellen kunnen vermeerderen. Op deze manier is het mogelijk om een virale infectie te onderdrukken (35-37).

2.2 Interacties op DNA niveau

Tot de oligonucleotiden die een interactie aangaan op DNA niveau behoren onder andere RNA/DNA oligonucleotiden voor chimeraplastie, chemisch gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden, niet-gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden, 'branched' oligonucleotiden, 'triple helix forming oligonucleotiden' en integrerende recombinante dubbelstrengs DNA oligonucleotiden.

Chimeraplastie

Bij chimeraplastie wordt gebruik gemaakt van gedeeltelijk dubbelstrengs oligonucleotiden van ongeveer 25 nucleotiden bestaande uit een enkelstrengs RNA molecuul dat gehybriseerd is aan een complementair enkelstrengs DNA molecuul. Bij chimeraplastie is de sequentie van de RNA/DNA hybride identiek aan het doelwit DNA in het genoom, behalve de één à twee nucleotiden die gemodificeerd moeten worden. Het doel van de techniek is om op een specifieke plaats in het DNA een verandering aan te brengen.

Chimeraplastie is voor het eerst beschreven in 1996 (7; 14). Het leek een oplossing te zijn voor één van de voornaamste hindernissen bij DNA modificaties middels oligonucleotiden. Korte enkelstrengs DNA sequenties worden namelijk snel afgebroken door cellulaire nucleasen en de interactie tussen de oligonucleotide en het cellulaire doelwit DNA is instabiel. Daarom bestaat het RNA deel uit 2'-O-methyl ribose residuen die de hybride oligonucleotide mogelijk minder gevoelig maken voor intracellulaire afbraak. Bovendien werd verondersteld dat bij chimeraplastie zowel de DNA als de RNA sequentie kan hybridiseren met complementaire sequenties in het genoom en zodoende een stabielere structuur vormt dan de paring van één enkelstrengs sequentie met z'n chromosomale complement.

Echter later werd duidelijk dat enkel de DNA streng van de hybride betrokken is bij genmodificatie (38). Waarschijnlijk wordt de hybridisatiereactie gestimuleerd door het homologe recombinatie eiwit Rad51 (39), terwijl voor de overdracht van genetische informatie de aanwezigheid van het DNA mismatch-hersteleiwit MSH2 vereist is (40). Het cellulaire DNA mismatch-herstelsysteem herstelt hybridisatiefouten tussen de verschillende nucleotiden in het DNA. Dit heeft geleid tot de hypothese dat genmodificatie het gevolg is van een mismatch-herstelreactie, waarbij de genetische informatie op de oligonucleotide als sjabloon wordt gebruikt (41).

Chimeraplastie heeft grote verwachtingen gewekt op het vlak van genterapeutische toepassingen in de medische- en plantenbiotechnologie (42). Inmiddels zijn ongeveer dertig wetenschappelijke artikelen in de literatuur verschenen waarin toepassingen van chimeraplastie worden beschreven, zowel in planten (43; 44) als in dierlijke cellen in weefselkweek (7; 41; 45; 46). Met de RNA/DNA hybride oligonucleotide is bijvoorbeeld in een B-cel lijn van het immuunsysteem de sikkelcelanemie mutatie in de helft van de blootgestelde cellen hersteld (7). Tevens wordt er melding gemaakt van de correctie van een puntmutatie in het dystrofingeen in spierweefsel van een hond en de modificatie van een levergen in de rat (47; 48). Een belangrijke waarneming is dat het betreffende RNA/DNA hybride geen effect heeft op de mutatiefrequentie in het op het X-chromosoom gelegen hypoxanthine fosforibosyltransferase (HPRT) gen. Dit is een aanwijzing dat chimeraplastie sequentiespecifiek is en geen willekeurige insertie van de oligonucleotide in het genoom (in dit geval het HPRT gen) veroorzaakt (7).

Desondanks blijken in zeer veel andere laboratoria RNA/DNA hybride oligonucleotiden ineffectief om genen te modificeren, waarbij de eerder gemelde efficiëntie niet gehaald wordt (42; 49; 50). Ook zijn er ernstige twijfels over de kwaliteit van de vroege publicaties waarin hoge efficiënties het gevolg zouden kunnen zijn geweest van PCR artefacten (42; 50). Vanwege de slechte reproduceerbaarheid worden RNA/DNA hybride oligonucleotiden heden ten dage nauwelijks meer gebruikt.

Chemisch gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden

Dit type oligonucleotiden bestaan uit enkelstrengs DNA van ongeveer veertig nucleotiden (ssDNA oligonucleotiden) die chemisch gemodificeerd zijn door toevoeging van drie 2'-O-methyl uracil residuen, of door 3-6 fosforothioaat verbindingen. Chemisch gemodificeerde ssDNA oligonucleotiden worden gebruikt om gericht mutaties in het genoom aan te brengen. In celvrije extracten van plantaardige of dierlijke cellen blijkt een ssDNA oligonucleotide het genoom efficiënter te modificeren dan een bij chimeraplastie gebruikt RNA/

DNA hybride oligonucleotide (51). Het RNA gedeelte van het hybride oligonucleotide is blijkbaar niet noodzakelijk voor modificatie van het DNA (51).

Anders dan bij chimeraplastie, blijkt bij het gebruik van het mismatch-herstel eiwit MSH2, noch zijn partners MSH6 of MSH3 essentieel te zijn voor genmodificatie met gemodificeerde ssDNA oligonucleotiden (51). Kennelijk vindt overdracht van genetische informatie met chemisch gemodificeerde ssDNA oligonucleotiden op een andere manier plaats dan met de RNA/DNA hybride oligonucleotiden. In dierlijke cellen is aangetoond dat chemisch gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden van 35-60 nucleotiden een efficiëntie hebben van 0,05-1% in de substitutie van één enkele nucleotide in een chromosomaal gelegen reporter-gen (52). Het feit dat de 'antisense' oriëntatie van het oligonucleotide 10^3 maal effectiever bleek te zijn dan de sense (complementaire) oriëntatie, is een indicatie dat transcriptie of het verschil in synthese van de 'leading' en de 'lagging strand' een rol speelt bij genmodificatie met chemisch gemodificeerde ssDNA oligonucleotiden (52).

Niet-gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden

Recentelijk is gevonden dat de chemische of andere modificaties waarmee ssDNA oligonucleotiden zijn toegerust niet essentieel zijn voor genmodificatie. Ook een normale, niet-chemisch gemodificeerde, samenstelling van deoxyribonucleotiden kan gebruikt worden voor genmodificatie in bijvoorbeeld embryonale stamcellen van muizen (53). De efficiëntie van de genmodificatie wordt echter sterk onderdrukt door het cellulaire DNA mismatch-herstelsysteem (53). In afwezigheid van het DNA mismatch-hersteleiwit MSH2 wordt de efficiëntie van genmodificatie in cellen, die blootstelling aan de oligonucleotide overleefden, verhoogd van ongeveer 10^{-7} naar 5×10^{-5} . Tegen de verwachtingen in blijkt dat in dit specifieke systeem de efficiëntie van genmodificatie verlaagd wordt wanneer de ssDNA oligonucleotiden chemische gemodificeerd zijn door fosforothioaat verbindingen of door het toevoegen van 2'-O-methyl uracil residuen (51; 53).

Hoewel het mechanisme van deze vorm van genmodificatie door oligonucleotiden nog niet is opgehelderd, wordt verondersteld dat de enkelstrengs oligonucleotide kan hybridiseren met de homologe sequentie in het genoom tijdens replicatie van het DNA. De sequentie van het oligonucleotide is identiek aan de sequentie in het genoom, behalve de één à twee nucleotiden die gemodificeerd moeten worden. De oligonucleotide zou tijdens de replicatie van het DNA gebruikt worden als initiator voor de DNA synthese. Echter, de fout in de hybridisatie, als gevolg van de één à twee verschillende nucleotiden, die gevormd is tussen de sequentie van de oligonucleotide en de complementaire genomische sequentie activeert het DNA mismatch-herstelsysteem. Dit leidt tot afbraak van de zojuist aangemaakte DNA streng, inclusief de oligonucleotide

sequentie. Op deze manier zou het DNA mismatch-herstelsysteem genmodificatie middels oligonucleotiden onderdrukken (54-56).

'Branched' oligonucleotiden

Zogenaamde 'branched' oligonucleotiden zijn gemodificeerde DNA oligonucleotiden die bestaan uit vertakkingen, waardoor oligonucleotiden ontstaan met dubbelstrengs en enkelstrengs DNA stukken (57). Deze 'branched' oligonucleotiden vormen mogelijk een goed substraat voor homologe recombinatie gemedieerd door het recombinatie eiwit Rad51. Het mechanisme waarmee 'branched' oligonucleotiden sequentie-specifieke mutaties in het genoom veroorzaken, is niet duidelijk. De vertakte oligonucleotiden zijn chemisch gemodificeerd middels fosforothioaat verbindingen. Hoewel met deze techniek genmodificatie is gevonden, blijken cellen de blootstelling aan dergelijke toxische oligonucleotiden nauwelijks te overleven. Tevens is in de literatuur beschreven dat 'branched' oligonucleotiden ook het proces van mRNA splicing kunnen beïnvloeden (58).

'Triple helix forming' oligonucleotiden

'Triple helix forming' oligonucleotiden (TFO's of drievoudige helix vormende oligonucleotiden) zijn enkelstrengs DNA moleculen die in staat zijn een specifieke binding aan te gaan met de DNA dubbelhelix (59). Door deze interactie ontstaat een drievoudige (triple) helixstructuur in het genoom. De binding van de derde streng is relatief zwak ten opzichte van de dubbelstrengs binding van het genoom, maar is sequentie-specifiek en kan onder andere worden versterkt door modificatie van de nucleotiden. TFO's bestaan uit specifieke nucleotiden en binden altijd aan de streng van het DNA die rijk is aan purines (adenine en guanine nucleotiden) (22; 60). De oligonucleotiden kunnen toegepast worden om de genexpressie te reguleren of om modificaties in het genoom te induceren.

Regulatie genexpressie

Regulatie van de genexpressie met behulp van TFO's kan zowel plaatsvinden door interferentie met de RNA transcriptie, als door modificatie van het DNA als gevolg van recombinatie en mutagenese. TFO's kunnen worden gebruikt voor het verhinderen van de binding van bepaalde transcriptiefactoren aan het DNA die betrokken zijn bij RNA transcriptie (21; 60). Ook is het mogelijk om TFO's te gebruiken die interfereren met de aanmaak of verlenging (elongatie) van RNA transcripten. In beide gevallen wordt de synthese van specifieke mRNA's en daarmee de synthese van specifieke eiwitten geblokkeerd (22).

Sequentiemodificatie

TFO's kunnen ook worden gebruikt voor doelgerichte modificatie van het erfelijk materiaal (60-62). Het gebruik van ongemodificeerde TFO's kan leiden tot mutaties onder invloed van enzymen die de ontstane drievoudige helixstructuur herkennen en gaan repareren. Soms worden door deze enzymen fouten gemaakt tijdens het herstellen van de dubbel-helix.

Een andere toepassing van TFO's betreft het gebruik van chemische mutagenticia die gekoppeld kunnen worden aan deze oligonucleotiden. In dat geval is het doel van de TFO om het mutagens naar een specifieke sequentie in het genoom te brengen (61). TFO's met daaraan gekoppeld DNA-splitsende chemicaliën kunnen worden gebruikt om dubbelstrengs breuken in het DNA te introduceren. Herstel van de breuk door middel van recombinatie kan leiden tot de introductie van sequentiemodificaties.

Over het algemeen is de frequentie waarmee specifieke sequentie-varianten kunnen worden aangebracht relatief laag. Dit is onder andere het gevolg van de slechte opname en transport van TFO's naar de celkern. Directe micro-injectie van TFO's in de celkern levert een recombinatiefrequentie op van 1-2%. Dit is een factor 10^3 hoger dan de achtergrond. Transfectie van cellen, in plaats van micro-injectie, geeft een recombinatiefrequentie die slechts zeven maal hoger is dan de achtergrond recombinatiefrequentie. Door het aanbrengen van chemische modificaties aan de TFO's kan de binding aan het DNA verbeterd worden (11).

Integrerende recombinant dubbelstrengs DNA oligonucleotiden

Integrerende recombinant oligonucleotiden bestaan uit gedeeltelijk complementaire oligonucleotiden die *in vitro* worden gecombineerd tot dubbelstrengs DNA oligonucleotiden. De vervaardigde oligonucleotiden zijn identiek aan het DNA in het genoom, met uitzondering van één of enkele nucleotiden die gemodificeerd dienen te worden. Dergelijke oligonucleotiden worden gebruikt bij een mutagenese techniek die tot nu toe alleen nog is toegepast in gist (63). Ten behoeve van selectie van de cellen waarin een mutatie is aangebracht, vindt bij deze techniek modificatie van het genoom in twee stappen plaats. In eerste instantie wordt een markersequentie in het genoom geïntegreerd door middel van "klassieke" homologe recombinatie. Daarna worden de integrerende recombinant oligonucleotiden aan de cellen toegevoegd. Hierdoor kunnen specifieke deleties of mutaties aangebracht worden onder invloed van het recombinatiesysteem van gist. Selectie van gemodificeerde cellen is mogelijk, omdat in de eerste stap de in het genoom geïntegreerde marker tijdens dit proces verwijderd wordt. Het proces is afhankelijk van een functioneel Rad52 eiwit dat betrokken is bij vrijwel alle vormen van homologe recombinatie in gist (63).

2.3 Interacties op eiwitniveau

Naast gerichte interacties op DNA en RNA niveau zijn er oligonucleotiden die geen interactie aangaan met DNA of RNA maar juist wel gericht een interactie aangaan met eiwitten, zoals transcriptiefactoren. In deze categorie vallen CpG oligonucleotiden, dubbelstrengs DNA oligonucleotiden voor eiwitinteracties en aptameren.

CpG oligonucleotiden

CpG oligonucleotiden bestaan uit ongeveer twintig fosforothioaat oligonucleotiden en bevatten geen coderende delen of primersequenties (9; 16). Het enige doel van deze oligonucleotiden is de adjuvante werking van CpG (64-67). Door de samenstelling van deze oligonucleotiden worden ze door het menselijk lichaam als lichaamsvreemd herkend. Hierdoor zal het immuunsysteem geactiveerd worden om de oligonucleotiden op te ruimen. Van deze eigenschap wordt gebruikt gemaakt bij immunotherapie tegen bijvoorbeeld kanker. Bij een dergelijke therapie wordt het immuunsysteem geactiveerd om kankercellen te vernietigen. Vaak is de mobilisatie van het afweersysteem niet voldoende en kan dit verhoogd worden door toediening van CpG oligonucleotiden. CpG oligonucleotiden worden momenteel wereldwijd in vele klinische studies toegepast in combinatie met andere therapeutica (9; 16; 65).

Eiwitbindende oligonucleotiden

Oligonucleotiden kunnen dusdanig ontworpen worden dat ze binden aan eiwitten in de cel (68; 69). Het doel van deze techniek is om specifiek bepaalde transcriptie factoren weg te vangen waardoor transcriptie van bepaalde genen wordt voorkomen. Hierdoor kan de productie van een bepaald eiwit of serie eiwitten geblokkeerd worden. De toegepaste sequenties kunnen identiek zijn aan genomische sequenties, maar zijn bedoeld voor nucleotiden-eiwit interacties en niet voor interacties met DNA of RNA.

Aptameren

Aptameren zijn synthetische enkelstrengs RNA of DNA moleculen die zijn geselecteerd uit een willekeurige verzameling van synthetische RNA of DNA fragmenten. De oligonucleotiden hebben als eigenschap dat ze specifiek binden aan andere moleculen (70; 71). Er zijn aptameren geselecteerd die binden aan nucleïnezuren, eiwitten, co-factoren, chemische stoffen en zelfs aan hele organismen. Aptameren kunnen net als andere oligonucleotiden chemisch gemodificeerd worden. Toepassing van aptameren is primair gericht op het beïnvloeden van fysiologische processen en niet op het veranderen van de sequentievолgorde van het genoom.

3. Sequenties betrokken bij gelokaliseerde recombinatie

Naast een overzicht van de verschillende oligonucleotiden die courant zijn of ontwikkeld worden, wordt tevens in de adviesvraag van het ministerie van VROM verzocht om een overzicht van sequenties die door enzymen herkend worden die homologe recombinatie stimuleren. Dit zijn enzymen die in staat zijn om DNA te herrangschikken. Hiertoe behoren plaats-specifieke recombinasen, DNA helicases, transposasen en DNA topoisomerasen. Bij plaats-specifieke recombinatie treedt er recombinatie op tussen twee verschillende DNA segmenten op specifieke plaatsen gekatalyseerd door recombinase enzymen. Plaats-specifiek wil zeggen dat de sequentie van het DNA bepalend is voor het optreden van recombinatie. Er bestaat tussen de verschillende organismen een grote verscheidenheid aan systemen (> 300) die recombinatie bevorderen (72-74). Op basis het mechanisme dat toegepast wordt voor het recombinatieproces kunnen twee families van plaats-specifieke recombinasen onderscheiden worden.

De eerste familie bestaat uit de λ -integrasen (Int) of tyrosine recombinasen, waaronder de meest bekende en toegepaste bacteriofaag λ , de bacteriele XerC en XerD recombinasen, het Cre-*loxP* mechanisme van bacteriofaag P1 en het Flp-*FRT* recombinase van gist (*Saccharomyces cerevisiae*) (13; 74). Beide laatstgenoemde systemen maken gebruik van respectievelijk het *loxP* ('locus of crossover (x) in P1) en *FRT* ('Flp ('flip') recombinase recognition target') structuur in het DNA. De sequentie van *loxP* en *FRT* bestaat uit een twee palindroom structuren van 13 basenparen (ATAACTTGGTATA voor *loxP* en GAAGTTCCTATTC voor *FRT*) die gescheiden worden door 8 basenparen (13; 75). In zoogdiercellen blijken *loxP* sequenties aanwezig te zijn, waardoor het mogelijk is om het Cre-*loxP* mechanisme te gebruiken voor therapieën met bijvoorbeeld oligonucleotiden (76). Het bacteriofaag λ recombinase maakt gebruik van de *attP* sequentie op het genoom van de bacteriofaag en de *attB* sequentie op het bacteriegenoom. Met behulp van het recombinase enzym kan er vervolgens uitwisseling plaatsvinden. De beide sequenties van ongeveer 9 tot 13 basenparen hoeven niet geheel identiek te zijn om recombinatie mogelijk te maken (74).

De andere familie plaats-specifieke recombinasen zijn de resolvable en invertasen, oftewel serine recombinasen. Hiertoe behoren onder andere de recombinase systemen PhiC31, R4, TP901-1 en A118 (73; 77-80). Het PhiC31 systeem afkomstig van *Streptomyces spp.* wordt met name gebruikt voor plaats-specifieke recombinatie in, onder andere, muizen en humane cellen. De recombinatie sequentie *attP* is namelijk nog functioneel indien enkele basen verschillend zijn ten opzichte van de oorspronkelijke *attP* sequentie (75; 79).

Daarnaast kan recombinatie gestimuleerd worden door de VDJ ('Variable, Diverse, Joining' segmenten) -recombinatie signaalsequentie. Dit systeem is betrokken bij de ontwikkeling van unieke receptoren in immunologische cellen (81-83). De recombinatie signaalsequentie (RSS) bestaat uit twee geconserveerde sequenties van 7 basenparen (5'-CACAGTG) en 9 basenparen (5'-ACAAAACC) die gescheiden worden door 12 of 23 basenparen. De recombinatie wordt gekatalyseerd door de RAG (recombinatie activerende genen) eiwitten (83).

4. Effecten van oligonucleotiden

Oligonucleotiden kunnen in de cellen van levende organismen (variërend van planten tot mensen) een interactie aangaan met DNA, RNA of eiwit. Oligonucleotiden worden ontworpen om bewust te binden aan een specifieke plaats op het erfelijk materiaal, of aan een bepaald eiwit. Naast deze bedoelde interacties kan het echter ook voorkomen dat oligonucleotiden ergens anders binden, waardoor mogelijk onbedoelde sequentieveranderingen optreden. Van de drie toepassingsgebieden van oligonucleotiden, zoals in de voorgaande hoofdstukken beschreven, hebben de interacties op DNA niveau in principe tot doel om veranderingen aan te brengen in het genoom. De voorbestemde interacties van oligonucleotiden op RNA- of eiwitniveau hebben niet tot doel om het genoom te modificeren. Het is echter theoretisch mogelijk dat dergelijke oligonucleotiden, evenals oligonucleotiden die interfereren op DNA niveau, onbedoelde interacties kunnen aangaan met het DNA. Bij deze 'off target' interacties is het de vraag hoe groot de kans is dat er als gevolg van deze interacties sequentieveranderingen van het erfelijk materiaal optreden. In de hieronder weergegeven analyse wordt onderscheid gemaakt tussen interacties van oligonucleotiden op DNA niveau en interacties op RNA- of eiwitniveau.

4.1 Interacties van oligonucleotiden op DNA niveau

Oligonucleotiden die bestemd zijn om een interactie aan te gaan op DNA niveau hebben meestal tot doel om modificaties in het genoom te bewerkstelligen. Hieronder vallen chimeraplastie oligonucleotiden, enkelstrengs DNA oligonucleotiden al dan niet chemische gemodificeerde, 'branched' oligonucleotiden, integreerbare recombinante oligonucleotiden en drievoudige helix vormende oligonucleotiden (7; 51; 53; 57; 59; 63). Chimeraplastie is eerder aan de orde geweest in een werkgroep van de COGEM op 17 december 2001. De COGEM heeft destijds geconcludeerd dat chimeraplastie kan leiden tot gerichte genomische sequentiemodificaties in onder andere bacteriën, planten en dieren.

Het aanbrengen van een gerichte sequentiemodificatie in het DNA vindt meestal plaats middels homologe recombinatie of tijdens DNA replicatie. Het veroorzaken van sequentieveranderingen is mogelijk indien de sequentievolgorde van een oligonucleotide niet volledig identiek is aan de doelwitsequentie in het genoom.

Volledig homologe oligonucleotiden daarentegen kunnen doorgaans geen gerichte modificaties in het genoom aanbrengen. Dit zijn bijvoorbeeld oligonucleotiden, zoals bepaalde drievoudige helix vormende oligonucleotiden,

die tot doel hebben om de genexpressie te regelen door te hybridiseren met de promoter van een gen.

Uit het voorgaande kan geconcludeerd worden dat DNA oligonucleotiden, die op één of enkele nucleotiden na volledig homologoog zijn aan sequenties in het DNA, in levende organismen kunnen leiden tot sequentiemodificaties.

Onbedoelde interacties

'Off target' effecten van oligonucleotiden die een interactie aangaan op DNA niveau kunnen op verschillende manieren optreden. Ten eerste kan de bedoelde nucleotideverandering niet exact zijn. Hierbij wordt het te modificeren nucleotide in het genoom niet veranderd door het beoogde nucleotide. Daarnaast kan elders in het genoom, dat gedeeltelijk homologoog is aan het oligonucleotide, een sequentieverandering optreden tengevolge van de interactie met het oligonucleotide. Bij deze onbedoelde effecten speelt onder andere het mismatch-herstelsysteem een prominente rol (40; 41; 53). Zoals de naam al aangeeft herstelt dit systeem hybridisatiefouten tussen de verschillende nucleotiden in het DNA.

Bij het bewust introduceren van een modificatie vormt de aanwezigheid van het DNA mismatch-herstelsysteem een belangrijk obstakel. De efficiëntie van sequentiemodificatie met niet-gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden wordt in afwezigheid van het systeem met een factor 500 verhoogd (53). Echter, de afwezigheid van het mismatch-herstelsysteem verhoogt niet alleen de frequentie van de bedoelde modificatie, maar ook 'off-target' modificaties als gevolg van hybridisatie van de oligonucleotide met slechts matig homologe sequenties elders in het genoom. Afwezigheid van het mismatch-herstelsysteem zou kunnen leiden tot een verhoogde kans op onbedoelde sequentieveranderingen. Bovendien leidt de afwezigheid van het mismatch-herstelsysteem tot een toename van het aantal spontane mutaties die het gevolg zijn van fouten die gemaakt worden tijdens de replicatie van het DNA.

RNA/DNA- en chemisch gemodificeerde DNA oligonucleotiden worden gebruikt in aanwezigheid van het mismatch-herstelsysteem (51). Echter, de effectiviteit waarmee het DNA mismatch-herstelsysteem sequentiemodificatie door oligonucleotiden onderdrukt is sterk afhankelijk van de precieze modificatie. Sommige modificaties vormen een complexe mismatch die niet meer door het DNA mismatch-herstelsysteem kan worden hersteld (56). Zulke complexe mismatches kunnen ontstaan tengevolge van hybridisatie van de oligonucleotide met een niet-doelwit sequentie in het genoom. Dus ook in aanwezigheid van het mismatch-herstelsysteem zouden onbedoelde modificaties kunnen ontstaan.

De hierboven genoemde overwegingen zijn overwegend theoretisch. Tot nu toe is in de beschikbare literatuur nagenoeg geen informatie aanwezig over de frequentie van willekeurige mutagenese door toepassing van oligonucleotiden. De reden is dat in het algemeen de door de oligonucleotide geïnduceerde modificaties worden geselecteerd of gescreend met behulp van PCR. Met deze techniek kunnen alleen van tevoren bepaalde stukken op het DNA worden geanalyseerd, waardoor de kans zeer klein is dat willekeurige mutaties gevonden worden. De efficiëntie van oligonucleotide-gemedieerde genmodificatie is, - met uitzondering van de variabele efficiënties bij chimera-plastie -, relatief laag en wordt geschat op één gebeurtenis in elke 10^3 tot 10^7 behandelde cellen (7; 42; 84). Willekeurige integratie van oligonucleotide sequenties in het genoom is tot op heden niet gerapporteerd, maar het is de vraag of er wel voldoende onderzoek naar is gedaan. Slechts in één studie is gekeken naar het effect van blootstelling aan een oligonucleotide (chimeraplastie) op de mutatiefrequentie in het hypoxanthine fosforibosyl-transferase (HPRT) gen. In dit onderzoek werd geconcludeerd dat een willekeurige, niet-gerelateerd gen (HPRT) niet gemuteerd werd door toediening aan de cellen van een oligonucleotide dat homoloog was met het hemoglobine β^S gen (7).

Concluderend kan gesteld worden dat sequentiemodificaties geïnduceerd kunnen worden door oligonucleotiden die bewust een interactie aangaan op DNA niveau en die niet volledig homoloog zijn aan de doelwit sequentie. Daarbij is theoretisch niet uit te sluiten dat, ook bij volledig homologe oligonucleotiden, onbedoelde effecten optreden. In de literatuur is hierover weinig bekend. De frequentie waarmee onbedoelde sequentiemodificaties met oligonucleotiden optreden zal waarschijnlijk zeer laag zijn.

4.2 Interacties van oligonucleotiden op RNA- of eiwitniveau

Tot de groep van oligonucleotiden die interfereren met RNA of eiwitten behoren onder andere 'antisense' oligonucleotiden, 'short interfering' RNA's (siRNA), CpG oligonucleotiden, aptameren en eiwit bindende oligonucleotiden (11; 35; 65; 68; 71; 85). Dergelijke oligonucleotiden zijn niet primair bedoeld om te hybridiseren met het DNA. In de literatuur zijn tot nu toe géén aanwijzingen gevonden dat toepassing van bijvoorbeeld siRNA leidt tot modificatie van het genoom.

Oligonucleotiden die binden aan RNA of eiwitten kunnen ook neveneffecten hebben. Dergelijke ongewenste effecten kunnen onderverdeeld

worden in enerzijds onbedoelde interacties op RNA- of eiwitniveau en anderzijds onbedoelde interacties op DNA niveau met het genoom.

Onbedoelde interacties op RNA- of eiwitniveau

Voor siRNA is aangetoond dat er ongewenste effecten kunnen optreden door interactie van siRNA moleculen met mRNA's die een gedeeltelijke homologie vertonen (86-88). Een analyse met behulp van 'microarray' technieken heeft aangetoond dat dergelijke 'off target' effecten ten gevolge van kruisreacties tussen siRNA's en partieel homologe mRNA's relatief frequent voorkomen (89). Het resultaat van dergelijke interacties van siRNA met andere mRNA's is dat de activiteit van het betreffende gen geblokkeerd wordt. Volledige homologie met het doelwit mRNA blijkt niet essentieel te zijn voor het beïnvloeden van de regulatie van de genexpressie (89). Tijdens de synthese van oligonucleotiden treden in de sequentie ongeveer 1 tot 3 fouten per 1000 nucleotiden op (90). Daarbij zijn vaak grote aantallen (10^5 tot 10^8) oligonucleotiden in de cel nodig om het gewenste effect te bewerkstelligen. Hierdoor is er een reële kans aanwezig is dat onvoorziene interacties met andere mRNA moleculen optreden (89; 91). In een andere studie daarentegen worden resultaten gepresenteerd die erop wijzen dat RNAi juist wél specifiek is (92). Deze verschillende waarnemingen kunnen mogelijk verklaard worden door het verschil in sequentie van de gebruikte oligonucleotiden en de frequentie waarmee partieel homologe sequenties in het genoom voorkomen.

Met 'antisense' oligonucleotiden, die toegepast worden om het proces van RNA-splicing te reguleren ('exon-skipping', 'exon-inclusion' en 'trans-splicing'), kunnen in principe onbedoelde effecten optreden, wanneer 'antisense' oligonucleotiden ook de splicing van andere genen veranderen. Tevens kunnen er fouten optreden door de ribozymen tijdens het proces van RNA trans-splicing, waardoor andere dan de gewenste RNA-moleculen aan elkaar gezet worden. Ribozymen zijn oligonucleotiden die enkel aangrijpen op RNA moleculen, waardoor veranderingen in het genoom niet waarschijnlijk zijn. Maar voor zover bekend in de literatuur is hier nog geen gericht onderzoek naar uitgevoerd.

Onbedoelde interacties op DNA niveau

Niet alleen voor oligonucleotiden die bedoeld een interactie aangaan met het genoom, maar ook voor de overige oligonucleotiden die interfereren op RNA- of eiwitniveau, is het de vraag of er geen interacties kunnen plaatsvinden tussen de oligonucleotiden en het genoom. Dergelijke ongewenste interacties zouden kunnen leiden tot sequentieveranderingen in het DNA.

Bij het blokkeren van mRNA's met 'antisense' oligonucleotiden wordt een enkelstrengs (al dan niet gemodificeerd) oligonucleotide gebruikt dat qua

nucleotiden volgorde volledig complementair is met het te inactiveren mRNA. Hetzelfde oligonucleotide zou in theorie tevens een interactie kunnen aangaan met DNA sequenties van het gen dat codeert voor het betreffende mRNA. Aangezien de sequentie geheel homolog is zou een eventuele interactie waarschijnlijk géén aanleiding geven tot sequentiemodificatie. Het blijft echter onduidelijk wat er gebeurt indien de oligonucleotide gedeeltelijk homolog is met andere genomsequenties. Dit zal ondermeer afhangen van de mate van homologie en van de chemische samenstelling van de oligonucleotide.

Chemisch gemodificeerde oligonucleotiden lijken een dusdanige samenstelling te hebben dat expressie van eiwit sequenties door dergelijke oligonucleotiden en integratie in het genoom nagenoeg uitgesloten is (20). De COGEM heeft over de toepassing van 'antisense' fosforothioaat-oligonucleotiden in het verleden geconcludeerd dat deze chemisch gemodificeerde oligonucleotiden geen aanleiding kunnen geven tot nucleotideveranderingen in het genoom (17). Daarnaast is de commissie van mening dat CpG oligonucleotiden een dusdanige samenstelling hebben dat het uitgesloten is dat dergelijke oligonucleotiden in het genoom integreren of op een andere wijze het genoom modifieren (93). Het is onwaarschijnlijk dat eventuele homologe integratie van chemisch gemodificeerde oligonucleotiden zal leiden tot gerichte veranderingen in de sequentievolvergorder van het DNA, aangezien deze oligonucleotiden niet als substraat dienen voor recombinatie- en replicatie-enzymen (94).

Bij chimera-plastie is aangetoond dat alleen het DNA gedeelte van de RNA/DNA hybride oligonucleotide noodzakelijk en toereikend is voor modificatie van het DNA. Het RNA gedeelte van het hybride oligonucleotide was niet in staat om sequentiemodificaties te induceren (51). Dit is een aanwijzing dat RNA oligonucleotiden, zoals 'antisense' oligonucleotiden, het genoom niet kunnen modifieren. De kans op willekeurige integratie van 'antisense' oligonucleotiden in het genoom, met gerichte mutaties als gevolg, kan mede op grond van de chemische samenstelling van 'antisense' oligonucleotiden nagenoeg uitgesloten worden (11; 20). Wanneer dit toch optreedt, zal het aanwezige DNA mismatch-herstelsysteem in de meeste gevallen zorgen voor herstel van een eventuele mutatie (95).

Naast het induceren van modificaties in de sequentie van het DNA kunnen oligonucleotiden ook epigenetische veranderingen teweegbrengen (96-101). Een vorm van epigenetische verandering is DNA-methylering waarbij bepaalde nucleotiden in het DNA voorzien worden van een methylgroep. Op plaatsen in de chromosomen waar het DNA sterk gemethyleerd is staan de genen over het algemeen uitgeschakeld. Gebieden op de chromosomen daarentegen die weinig gemethyleerd zijn, bevatten daarentegen actieve genen (96). Toediening van een

oligonucleotide aan de insulineachtige groeifactor-2 (IGF-2) promoter leidt tot sterke afremming van de mRNA transcriptie als gevolg van methylering van het gen (99). Tevens zijn bepaalde RNAi en siRNA oligonucleotiden in staat om het genoom epigenetisch te veranderen (97; 98; 100). Blijkbaar hebben oligonucleotiden niet alleen invloed op de sequentievolvergadering van het DNA, maar ook op de methyleringsstatus waardoor de genexpressie beïnvloed wordt. Onder bepaalde omstandigheden zijn epigenetische effecten ook overerfbaar (102).

Gezien de beperkte kennis rond epigenetica en de daarmee gepaard gaande onzekerheden, heeft de COGEM dit onderwerp opgenomen in haar onderzoeksprogramma voor dit jaar. In het rapport zal nader ingegaan worden op epigenetische effecten en de mogelijke implicaties met betrekking tot de risico's voor mens en milieu. In een vervolgtraject zal de COGEM de conclusies en mogelijke aanbevelingen uit het betreffende rapport nader uitwerken.

Samenvattend kan gesteld worden dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er veranderingen in de sequentie van het genoom optreden bij de toepassing van oligonucleotiden die bedoeld zijn om te interfereren met RNA of eiwitten, zoals transcriptiefactoren.

4.3 Minimaliseren van neveneffecten oligonucleotiden

De consequenties van onbedoelde sequentiemodificaties kunnen variëren van geen enkel effect tot in het ergste geval het ontstaan van autoimmuunziekten of tumorvorming. Om willekeurige ongewenste modificatie te minimaliseren zijn diverse methodieken ontwikkeld voor het selecteren van oligonucleotiden die zo specifiek mogelijk zijn (91; 103; 104). Het zorgvuldig selecteren van de gekozen oligonucleotide-sequentie, dat wil zeggen het gebruik van in het genoom unieke sequenties, voorkomt dergelijke neveneffecten grotendeels. Voor het ontwerpen van siRNA oligonucleotiden wordt onder andere gebruik gemaakt van computermodellen en databanken (88; 91; 105). Tevens zijn er bepaalde voorwaarden opgesteld waaraan oligonucleotiden moeten voldoen om optimaal te functioneren, waarbij de onbedoelde effecten minimaal zijn (106).

Eén van de methoden om een oligonucleotide te screenen op de eventuele aanwezigheid van partieel homologe sequenties in het genoom, is een zogenaamde 'BLAST search'. De complete genoomsequentie van het doelorganisme dient echter bekend te zijn om alle mogelijke (gedeeltelijk) homologe plaatsen te kunnen identificeren en analyseren. Wanneer deze worden gevonden, kan er voor gekozen worden om een nieuw oligonucleotide te ontwerpen. De theoretische kans dat een oligonucleotide van 20 nucleotiden

elders op het genoom kan hybridiseren waarbij vier mismatches worden toegestaan is $4,3 \times 10^{-9}$ ($= 4^{16}$, elk van de 16 nucleotiden kan bestaan uit A, C, G of T). Hierbij is geen rekening gehouden met eventuele repeterende sequenties in het genoom, waardoor een sequentiecombinatie vaker voor kan komen. In het algemeen geldt dat hoe groter het genoom van een organisme is, des te groter de kans is dat een oligonucleotide elders kan hybridiseren. Daarbij zal het effect van de modificatie in niet-coderende gebieden naar verwachting kleiner zijn dan het effect van sequentiemodificaties in genregulatie- en eiwitcoderende regio's (genen). Hierbij kan een gen geïnactiveerd of juist geactiveerd worden, waardoor de regulatie van celdeling verstoord zou kunnen worden. Dat zou theoretisch kunnen leiden tot tumorvorming.

5. Conclusies

Oligonucleotiden zijn in staat om in cellen interacties aan te gaan met eiwitten, DNA of RNA. Het doel van toediening van oligonucleotiden aan levende organismen is om ofwel gericht mutaties aan te brengen in het erfelijk materiaal, ofwel de regulatie van de genexpressie te beïnvloeden, ofwel een afweerreactie op te wekken. Bij al deze toepassingen is een theoretische kans aanwezig dat (on)bedoeld mutaties in het genoom geïnduceerd worden.

Oligonucleotiden kunnen gebruikt worden om gericht sequentiemodificaties in het genoom te induceren. Daarbij is een minimale kans aanwezig dat, ook bij volledig homologe oligonucleotiden, onbedoelde effecten optreden. In de literatuur is hierover weinig bekend. De reden hiervoor is enerzijds dat het niet is onderzocht of anderzijds dat ongewenste effecten niet zijn waargenomen en derhalve niet gerapporteerd zijn. Omdat de inductie van bedoelde genetische modificaties met behulp van oligonucleotiden al zeer ineffectief is, wordt de kans op onbedoelde sequentiemodificaties als zeer laag ingeschat. Bovendien zal een groot gedeelte van de ontstane fouten in de sequentievolgorde van het genoom gerepareerd worden door het DNA mismatch-herstelsysteem.

Daarnaast zijn er oligonucleotiden die tot doel hebben om een interactie aan te gaan op RNA of eiwit niveau. Oligonucleotiden voor de regulatie van genexpressie op RNA niveau zijn meestal volledig homogoloog aan de doelwitsequentie. Dergelijke oligonucleotiden zijn vaak chemisch gemodificeerd, waardoor ze niet meer als substraat kunnen dienen voor recombinatie- en replicatie-enzymen. Hierdoor is het onwaarschijnlijk dat integratie van chemisch gemodificeerde oligonucleotiden met het genoom op zal treden. Daarnaast zijn er sterke aanwijzingen dat RNA oligonucleotiden niet in staat zijn om sequentieveranderingen in het genoom te induceren. Voor enkele oligonucleotiden, waaronder CpG oligonucleotiden en 'antisense' fosforothioaat-oligonucleotiden, heeft de COGEM in het verleden al geconcludeerd dat deze oligonucleotiden geen sequentieveranderingen in het genoom kunnen veroorzaken (17; 93).

Oligonucleotiden die een interactie hebben op RNA niveau kunnen echter wel onbedoelde interacties aangaan met mRNA, waardoor de eiwitproductie verstoord wordt. Daarnaast kan de methylering van het genoom door toedoen van oligonucleotiden gemodificeerd kan worden. De COGEM heeft het onderwerp epigenetica en de mogelijke implicaties met betrekking tot de risico's voor mens en milieu opgenomen in haar onderzoeksprogramma voor dit jaar. De conclusies en aanbevelingen die uit het rapport mogelijk naar voren komen zal de COGEM in een vervolgtraject nader uitwerken.

Concluderend is de COGEM van mening dat oligonucleotiden die bedoeld een interactie aangaan met DNA kunnen leiden tot gerichte sequentieveranderingen in het genoom. Tot deze categorie behoren chimeraplastie-oligonucleotiden, chemisch gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden, niet-gemodificeerde enkelstrengs DNA oligonucleotiden, 'branched' oligonucleotiden, 'triple helix forming' oligonucleotiden en integrerende recombinant dubbelstrengs DNA oligonucleotiden. Daarbij is volgens de COGEM een zeer kleine kans aanwezig, dat naast de beoogde ook onbedoelde sequentiemodificaties geïnduceerd worden.

Met betrekking tot oligonucleotiden die tot doel hebben om te interfereren met RNA of eiwitten, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat sequentieveranderingen in het genoom optreden als gevolg van dergelijke oligonucleotiden. Tot deze groep behoren 'antisense' RNA oligonucleotiden, siRNA, CpG oligonucleotiden, eiwitbindende oligonucleotiden en aptameren.

Oligonucleotiden staan bij zowel de medische- als de plantenbiotechnologie in de belangstelling en het onderzoeksveld kan zich snel ontwikkelen. Wanneer nieuwe technologische ontwikkelingen met betrekking tot oligonucleotiden hiertoe aanleiding geven, zal de COGEM hierover rapporteren.

Referenties

1. Dagle, J. M. and Weeks, D. L. (2001). Oligonucleotide-based strategies to reduce gene expression. *Differentiation* **69**, blz. 75-82
2. Liu, L., Parekh-Olmedo, H., and Kmiec, E. B. (2003). The development and regulation of gene repair. *Nat Rev Genet* **4**, blz. 679-89
3. Kusaba, M. (2004). RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotechnol* **15**, blz. 139-43
4. Hohn, B. and Puchta, H. (1999). Gene therapy in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, blz. 8321-3
5. Romer, S., Lubeck, J., Kauder, F., Steiger, S., Adomat, C., and Sandmann, G. (2002). Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metab Eng* **4**, blz. 263-72
6. Guo, S. and Kempfues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, blz. 611-20
7. Cole-Strauss, A., Yoon, K., Xiang, Y., Byrne, B. C., Rice, M. C., Gryn, J., Holloman, W. K., and Kmiec, E. B. (1996). Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* **273**, blz. 1386-9
8. Cheng, J. C., Moore, T. B., and Sakamoto, K. M. (2003). RNA interference and human disease. *Mol Genet Metab* **80**, blz. 121-8
9. Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., and Hammerling, G. J. (2001). NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **167**, blz. 5247-53
10. Brummelkamp, T. R. and Bernards, R. (2003). New tools for functional mammalian cancer genetics. *Nat Rev Cancer* **3**, blz. 781-9
11. Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **270**, blz. 1628-44
12. Fukusaki, E., Kawasaki, K., Kajiyama, S., An, C. I., Suzuki, K., Tanaka, Y., and Kobayashi, A. (2004). Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference. *J Biotechnol* **111**, blz. 229-40
13. Ghosh, K. and Van Duyne, G. D. (2002). Cre-loxP biochemistry. *Methods* **28**, blz. 374-83

14. Yoon, K., Cole-Strauss, A., and Kmiec, E. B. (1996). Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, blz. 2071-6
15. Rando, T. A. (2002). Oligonucleotide-mediated gene therapy for muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* **12 Suppl 1**, blz. S55-60
16. Warren, T. L., Bhatia, S. K., Acosta, A. M., Dahle, C. E., Ratliff, T. L., Krieg, A. M., and Weiner, G. J. (2000). APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells. *J Immunol* **165**, blz. 6244-51
17. COGEM advies CGM/030403-01, Toepassing van antisense fosforothioaat-oligonucleotiden
18. COGEM advies CGM/041223-02, Integratie en verspreiding van naakt DNA
19. Petersen, M. and Wengel, J. (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* **21**, blz. 74-81
20. Hertoghs, K. M., Ellis, J. H., and Catchpole, I. R. (2003). Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **31**, blz. 5817-30
21. Milne, L., Perrin, D. M., and Sigman, D. S. (2001). Oligoribonucleotide-based gene-specific transcription inhibitors that target the open complex. *Methods* **23**, blz. 160-8
22. Knauert, M. P. and Glazer, P. M. (2001). Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum Mol Genet* **10**, blz. 2243-51
23. Flierl, A., Jackson, C., Cottrell, B., Murdock, D., Seibel, P., and Wallace, D. C. (2003). Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence-conjugated peptide nucleic acid. *Mol Ther* **7**, blz. 550-7
24. Lysik, M. A. and Wu-Pong, S. (2003). Innovations in oligonucleotide drug delivery. *J Pharm Sci* **92**, blz. 1559-73
25. Cartegni, L. and Krainer, A. R. (2003). Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* **10**, blz. 120-5
26. Wang, H., Prasad, G., Buolamwini, J. K., and Zhang, R. (2001). Antisense anticancer oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* **1**, blz. 177-96
27. Agrawal, S. and Kandimalla, E. R. (2001). Antisense and/or immunostimulatory oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* **1**, blz. 197-209

28. Marwick, C. (1998). First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *JAMA* **280**, blz. 871
29. Sazani, P. and Kole, R. (2003). Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest* **112**, blz. 481-6
30. van Deutekom, J. C., Bremmer-Bout, M., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Baas, F., den Dunnen, J. T., and van Ommen, G. J. (2001). Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* **10**, blz. 1547-54
31. Bremmer-Bout, M., Aartsma-Rus, A., de Meijer, E. J., Kaman, W. E., Janson, A. A., Vossen, R. H., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T., and van Deutekom, J. C. (2004). Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol Ther* **10**, blz. 232-40
32. Sun, L. Q., Cairns, M. J., Saravolac, E. G., Baker, A., and Gerlach, W. L. (2000). Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* **52**, blz. 325-47
33. Einvik, C., Fiskaa, T., Lundblad, E. W., and Johansen, S. (2004). Optimization and application of the group I ribozyme trans-splicing reaction. *Methods Mol Biol* **252**, blz. 359-71
34. Phylactou, L. A. (2004). Repair of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) transcripts by trans-splicing ribozymes. *Methods Mol Biol* **252**, blz. 373-83
35. Joost Haasnoot, P. C., Cupac, D., and Berkhout, B. (2003). Inhibition of virus replication by RNA interference. *J Biomed Sci* **10**, blz. 607-16
36. Reigadas, S., Ventura, M., Andreola, M. L., Michel, J., Gryaznov, S., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S., and Astier-Gin, T. (2003). An oligonucleotide complementary to the SL-B1 domain in the 3'-end of the minus-strand RNA of the hepatitis C virus inhibits in vitro initiation of RNA synthesis by the viral polymerase. *Virology* **314**, blz. 206-20
37. Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, blz. 356-63
38. Gamper, H. B. Jr, Cole-Strauss, A., Metz, R., Parekh, H., Kumar, R., and Kmiec, E. B. (2000). A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* **39**, blz. 5808-16
39. Liu, L., Cheng, S., van Brabant, A. J., and Kmiec, E. B. (2002). Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. *Nucleic Acids Res* **30**, blz. 2742-50

40. Cole-Strauss, A., Gamper, H., Holloman, W. K., Munoz, M., Cheng, N., and Kmiec, E. B. (1999). Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res* **27**, blz. 1323-30
41. Kmiec, E. B. (2003). Targeted gene repair -- in the arena. *J Clin Invest* **112**, blz. 632-6
42. Taubes, G. (2002). Gene therapy. The strange case of chimeraplasty. *Science* **298**, blz. 2116-20
43. Zhu, T., Peterson, D. J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczyński, C. L., and Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, blz. 8768-73
44. Beetham, P. R., Kipp, P. B., Sawycky, X. L., Arntzen, C. J., and May, G. D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, blz. 8774-8
45. Kren, B. T., Cole-Strauss, A., Kmiec, E. B., and Steer, C. J. (1997). Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology* **25**, blz. 1462-8
46. Alexeev, V. and Yoon, K. (1998). Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* **16**, blz. 1343-6
47. Bartlett, R. J., Stockinger, S., Denis, M. M., Bartlett, W. T., Inverardi, L., Le, T. T., thi Man, N., Morris, G. E., Bogan, D. J., Metcalf-Bogan, J., and Kornegay, J. N. (2000). In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* **18**, blz. 615-22
48. Kren, B. T., Chen, Z., Felsheim, R., Roy Chowdhury, N., Roy Chowdhury, J., and Steer, C. J. (2002). Modification of hepatic genomic DNA using RNA/DNA oligonucleotides. *Gene Ther* **9**, blz. 686-90
49. Tran, N. D., Liu, X., Yan, Z., Abbote, D., Jiang, Q., Kmiec, E. B., Sigmund, C. D., and Engelhardt, J. F. (2003). Efficiency of chimeraplast gene targeting by direct nuclear injection using a GFP recovery assay. *Mol Ther* **7**, blz. 248-53
50. van der Steege, G., Schuilenga-Hut, P. H., Buys, C. H., Scheffer, H., Pas, H. H., and Jonkman, M. F. (2001). Persistent failures in gene repair. **19**, blz. 305-6
51. Gamper, H. B., Parekh, H., Rice, M. C., Bruner, M., Youkey, H., and Kmiec, E. B. (2000). The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* **28**, blz. 4332-9

52. Igoucheva, O., Alexeev, V., and Yoon, K. (2001). Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther* **8**, blz. 391-9
53. Dekker, M., Brouwers, C., and te Riele, H. (2003). Targeted gene modification in mismatch-repair-deficient embryonic stem cells by single-stranded DNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **31**, blz. 27
54. Ellis, H. M., Yu, D., DiTizio, T., and Court, D. L. (2001). High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, blz. 6742-6
55. Zhang, Y., Muyrers, J. P., Rientjes, J., and Stewart, A. F. (2003). Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol* **4**, blz. 1
56. Li, X. T., Costantino, N., Lu, L. Y., Liu, D. P., Watt, R. M., Cheah, K. S., Court, D. L., and Huang, J. D. (2003). Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**, blz. 6674-87
57. Olsen, P. A., McKeen, C., and Krauss, S. (2003). Branched oligonucleotides induce in vivo gene conversion of a mutated EGFP reporter. *Gene Ther* **10**, blz. 1830-40
58. Carriero, S. and Damha, M. J. (2003). Inhibition of pre-mRNA splicing by synthetic branched nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **31**, blz. 6157-67
59. Uil, T. G., Haisma, H. J., and Rots, M. G. (2003). Therapeutic modulation of endogenous gene function by agents with designed DNA-sequence specificities. *Nucleic Acids Res* **31**, blz. 6064-78
60. Seidman, M. M. and Glazer, P. M. (2003). The potential for gene repair via triple helix formation. *J Clin Invest* **112**, blz. 487-94
61. Nagatsugi, F., Sasaki, S., Miller, P. S., and Seidman, M. M. (2003). Site-specific mutagenesis by triple helix-forming oligonucleotides containing a reactive nucleoside analog. *Nucleic Acids Res* **31**, blz. e31
62. Vasquez, K. M., Dagle, J. M., Weeks, D. L., and Glazer, P. M. (2001). Chromosome targeting at short polypurine sites by cationic triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* **276**, blz. 38536-41
63. Storici, F., Lewis, L. K., and Resnick, M. A. (2001). In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat Biotechnol* **19**, blz. 773-6
64. Klinman, D. M., Currie, D., Gursel, I., and Verthelyi, D. (2004). Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* **199**, blz. 201-16

65. Juffermans, N. P., Leemans, J. C., Florquin, S., Verbon, A., Kolk, A. H., Speelman, P., van Deventer, S. J., and van der Poll, T. (2002). CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect Immun* **70**, blz. 147-52
66. Marshall, J. D., Fearon, K. L., Higgins, D., Hessel, E. M., Kanzler, H., Abbate, C., Yee, P., Gregorio, J., Cruz, T. D., Lizcano, J. O., Zolotarev, A., McClure, H. M., Brasky, K. M., Murthy, K. K., Coffman, R. L., and Nest, G. V. (2005). Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species. *DNA Cell Biol* **24**, blz. 63-72
67. Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L., and Krieg, A. M. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* **34**, blz. 251-62
68. Tomita, N., Azuma, H., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Morishita, R. (2004). Application of decoy oligodeoxynucleotides-based approach to renal diseases. *Curr Drug Targets* **5**, blz. 717-33
69. Gambari, R. (2004). Biological activity and delivery of peptide nucleic acids (PNA)-DNA chimeras for transcription factor decoy (TFD) pharmacotherapy. *Curr Med Chem* **11**, blz. 1253-63
70. Patel, D. J., Suri, A. K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R. A., and Nonin, S. (1997). Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J Mol Biol* **272**, blz. 645-64
71. Wilson, D. S. and Szostak, J. W. (1999). In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem* **68**, blz. 611-47
72. Tronche, F., Casanova, E., Turiault, M., Sahly, I., and Kellendonk, C. (2002). When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett* **529**, blz. 116-21
73. Smith, M. C. and Thorpe, H. M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol* **44**, blz. 299-307
74. Groth, A. C. and Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol* **335**, blz. 667-78
75. Branda, C. S. and Dymecki, S. M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* **6**, blz. 7-28
76. Thyagarajan, B., Guimaraes, M. J., Groth, A. C., and Calos, M. P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**, blz. 47-54
77. Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B., and Calos, M. P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, blz. 5995-6000

78. Olivares, E. C., Hollis, R. P., and Calos, M. P. (2001). Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells. *Gene* **278**, blz. 167-76
79. Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S., and Calos, M. P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* **21**, blz. 3926-34
80. Stoll, S. M., Ginsburg, D. S., and Calos, M. P. (2002). Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells. *J Bacteriol* **184**, blz. 3657-63
81. Weaver, D., Boubnov, N., Wills, Z., Hall, K., and Staunton, J. (1995). V(D)J recombination: double-strand break repair gene products used in the joining mechanism. *Ann N Y Acad Sci* **764**, blz. 99-111
82. Bassing, C. H., Swat, W., and Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**, blz. S45-55
83. Swanson, P. C. (2004). The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes. *Immunol Rev* **200**, blz. 90-114
84. Vasquez, K. M., Marburger, K., Intody, Z., and Wilson, J. H. (2001). Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, blz. 8403-10
85. Grainge, I. and Jayaram, M. (1999). The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. *Mol Microbiol* **33**, blz. 449-56
86. Saxena, S., Jonsson, Z. O., and Dutta, A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**, blz. 44312-9
87. Snove, O. Jr and Holen, T. (2004). Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, blz. 256-63
88. Qiu, S., Adema, C. M., and Lane, T. (2005). A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* **33**, blz. 1834-47
89. Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**, blz. 635-7
90. Binkowski, B. F., Richmond, K. E., Kaysen, J., Sussman, M. R., and Belshaw, P. J. (2005). Correcting errors in synthetic DNA through consensus shuffling. *Nucleic Acids Res* **33**, blz. 55
91. Snove, O. Jr, Nedland, M., Fjeldstad, S. H., Humberstet, H., Birkeland, O. R., Grunfeld, T., and Saetrom, P. (2004). Designing effective siRNAs with off-target control. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, blz. 769-73

92. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N., and Fesik, S. W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, blz. 6347-52
93. COGEM advies CGM/021017-09, Oligonucleotiden als adjuvant bij vaccinaties
94. Dale, S. J. and Felix, I. R. (1996). Oligonucleotide-directed mutagenesis using an improved phosphorothioate approach. *Methods Mol Biol* **57**, blz. 55-64
95. Marra, G. and Schar, P. (1999). Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J* **338** (Pt 1), blz. 1-13
96. Scarano, M. I., Strazzullo, M., Matarazzo, M. R., and D'Esposito, M. (2005). DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol*
97. Kawasaki, H., Taira, K., and Morris, K. V. (2005). siRNA Induced Transcriptional Gene Silencing in Mammalian Cells. *Cell Cycle* **4**, blz.
98. Matzke, M. A. and Birchler, J. A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* **6**, blz. 24-35
99. Yao, X., Hu, J. F., Daniels, M., Shiran, H., Zhou, X., Yan, H., Lu, H., Zeng, Z., Wang, Q., Li, T., and Hoffman, A. R. (2003). A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* **111**, blz. 265-73
100. Freitag, M. and Selker, E. U. (2005). Controlling DNA methylation: many roads to one modification. *Curr Opin Genet Dev* **15**, blz. 191-9
101. Kawasaki, H. and Taira, K. (2005). Transcriptional gene silencing by short interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther* **7**, blz. 125-31
102. Santoro, R. and Lucia, F. D. (2005). Many players, one goal: how chromatin states are inherited during cell division. *Biochem Cell Biol* **83**, blz. 332-43
103. Smart, N., Scambler, P. J., and Riley, P. R. (2005). A rapid and sensitive assay for quantification of siRNA efficiency and specificity. *Biol Proced Online* **7**, blz. 1-7
104. Yiu, S. M., Wong, P. W., Lam, T. W., Mui, Y. C., Kung, H. F., Lin, M., and Cheung, Y. T. (2005). Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics* **21**, blz. 144-51
105. Chalk, A. M., Warfinge, R. E., Georgii-Hemming, P., and Sonnhammer, E. L. (2005). siRNAdb: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Res* **33 Database Issue**, blz. D131-4

106. Tuschl, T., Elbashir, S., Harborth, J., and Weber, K. (2004). The siRNA user guide. Selection of siRNA duplexes from the target mRNA sequence. (Internet: <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>)