

SYNTHETISCHE BIOLOGIE - UPDATE 2013

ANTICIPEREN OP ONTWIKKELINGEN
IN DE SYNTHETISCHE BIOLOGIE



COGEM SIGNALERING

CGM/130117-01

SYNTHETISCHE BIOLOGIE

- UPDATE 2013

ANTICIPEREN OP

ONTWIKKELINGEN IN

DE SYNTHETISCHE BIOLOGIE

COGEM

Januari 2013



Colofon


Ontwerp: Avant la lettre, Utrecht

Foto: Ivar Pel

© COGEM 2013

Delen uit deze publicatie mogen voor niet-commerciële doeleinden worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Commissie Genetische Modificatie (COGEM), 2013. Synthetische Biologie – Update 2013: Anticiperen op ontwikkelingen in de synthetische biologie. COGEM signalering CGM/130117-01

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).



Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W. Mansveld
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 17 januari 2013
KENMERK CGM/130117-01
ONDERWERP Aanbieding signalering "Synthetische Biologie – Update 2013"

Geachte mevrouw Mansveld,

Hierbij bied ik u de signalering "Synthetische Biologie – Update 2013: anticiperen op de ontwikkelingen in de synthetische biologie" (CGM/130117-01) aan.

SAMENVATTING

Synthetische biologie als nieuw onderzoeksveld heeft in de afgelopen jaren sterk de aandacht getrokken. Enerzijds wordt synthetische biologie gezien als een technologie die nieuwe mogelijkheden biedt voor (bio)technologische applicaties en onderzoek. De eerste toepassingen waaronder de productie van biobrandstoffen, bioplastics, medicijnen en vaccins worden binnen enkele jaren op de markt verwacht. Anderzijds worden er zorgen geuit over de beheersbaarheid van de eventuele risico's verbonden aan deze technologie.

De COGEM heeft eerder signaleringen uitgebracht over synthetische biologie, voor het eerst in 2006. Daarnaast heeft zij op nationaal en internationaal niveau activiteiten ontplooid om dit veld te monitoren. De afgelopen vier jaar hebben zich een aantal ontwikkelingen voorgedaan die aanleiding zijn geweest voor de COGEM om een update uit te brengen van haar laatste rapport uit 2008. In de voorliggende signalering worden de ontwikkelingen van de afgelopen vier jaar (2008 – 2012) in kaart gebracht en wordt gekeken wat de mogelijkheden en uitdagingen per subveld zijn. Verkend wordt hoe met mogelijke toekomstige knelpunten in de risicoanalyse kan worden omgegaan.

De COGEM signaleert dat de huidige risicoanalysemethodiek op dit moment voldoet voor het onderzoek dat plaatsvindt in het veld van synthetische biologie. Indien de huidige trends zich doorzetten kan de toekomstige risicoanalyse mogelijk bemoeilijkt worden door een toename van de complexiteit van de interacties, het vervagen van de grens tussen donor en gastheer en het ontbreken van een natuurlijke referentie als kader van risico's en risicoperceptie.

Deze ontwikkelingen kunnen ertoe leiden:

- dat in de toekomst het referentiekader van een bekend en gekarakteriseerd gastheerorganisme ontbreekt, of;
- dat de ingebrachte eigenschappen en de interacties met het gastheerorganisme onvoorspelbaar worden.

Op kortere termijn kan de toename van schaalgrootte en snelheid bovendien leiden tot:

- praktische en organisatorische problemen in relatie tot de huidige casusgewijze benadering.

Onderzoekers moeten bij vergunningaanvragen de benodigde data aanleveren voor het uitvoeren van de risicoanalyse. Juist naarmate de vraagstellingen complexer worden, zullen wederzijdse leerprocessen tussen onderzoekers en risicobeoordelaars een belangrijk punt van aandacht vormen. Risicobeoordelaars en vergunningverleners moeten hierbij tijdig aangeven welke typen van gegevens aangeleverd moeten worden om een milieurisicoanalyse te kunnen uitvoeren. Het spanningsveld tussen praktische hanteerbaarheid van de veiligheidsmaatregelen bij onderzoek en het veilig werken met genetische modificatie vraagt daarbij mogelijk om een intensiever contact tussen vergunningverleners, risicobeoordelaars en aanvragers of onderzoekers.

De overheid kan een faciliterende rol spelen in deze processen door aandacht te besteden aan de risicoanalysemethodiek bij het opstellen van onderzoeksprogramma's.

Daarnaast is een mogelijk administratief knelpuntesignaleerd door een toename van de schaalgrootte en snelheid van de ontwikkelingen. Hierdoor kan de casusgewijze beoordeling zoals deze nu wordt gehanteerd in de knel komen. Door nader onderzoek, bijvoorbeeld naar hoe andere Europese of internationale vergunningverleners hiermee omgaan, kunnen mogelijk ideeën en oplossingen worden opgedaan om de administratieve last van de casusgewijze benadering te beperken.

De volledige signalering treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



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



SAMENVATTING

In deze signalering worden recente ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie over de periode 2008 – 2012 in kaart gebracht en wordt gekeken wat de mogelijkheden en uitdagingen van vijf werkvelden binnen de synthetische biologie zijn. Daarnaast wordt onderzocht of er knelpunten in de (toekomstige) risicoanalyse te verwachten zijn en hoe oplossingen daarvoor kunnen worden uitgewerkt.

Synthetische biologie als nieuw onderzoeksveld heeft in de afgelopen jaren sterk de aandacht getrokken. Enerzijds wordt synthetische biologie gezien als een technologie die nieuwe mogelijkheden biedt voor (bio)technologische applicaties en onderzoek. De eerste toepassingen waaronder de productie van biobrandstoffen, bioplastics, medicijnen en vaccins worden binnen enkele jaren op de markt verwacht. Anderzijds worden er zorgen geuit over de beheersbaarheid van de eventuele risico's verbonden aan deze technologie.

De COGEM heeft de afgelopen jaren verschillende signaleringen uitgebracht over synthetische biologie. Daarnaast heeft zij op nationaal en internationaal niveau activiteiten ontplooid om dit veld te monitoren. De afgelopen vier jaar hebben zich een aantal ontwikkelingen voorgedaan die aanleiding zijn geweest voor de COGEM om een update uit te brengen van haar laatste rapport uit 2008. De focus van deze signalering ligt op mogelijke knelpunten die zich kunnen voordoen in de milieurisicoanalyse ten gevolge van deze ontwikkelingen.

In hoofdstuk 2 wordt op basis van een onderverdeling van de belangrijkste werkvelden of subvelden van synthetische biologie, een update gegeven van de mogelijkheden en uitdagingen van de ontwikkelingen. Deze subvelden zijn *Synthetic genomics*, *Metabolic pathway engineering*, Minimaal genoom organisme, Protocellen en Xenobiologie.

- ***Synthetic genomics*** betreft het synthetiseren van artificieel DNA om genen of een volledig genoom te maken. Deze technologie maakt diverse ontwikkelingen mogelijk binnen de andere subvelden van synthetische biologie; het is een zogeheten *enabling technology*. Recente ontwikkelingen betreffen onder andere de grootschalige productie van mutanten zoals *Multiplex Automated Genome Engineering* en toepassingen in de ontwikkeling en productie van vaccins. Uitdagingen in dit subveld liggen al geruime tijd bij de foutloze synthese van langere stukken DNA.
- ***Metabolic pathway engineering*** is gericht op de productie van hoogwaardige chemicaliën, plastics, brandstoffen, farmaceutische componenten en geur- en smaakstoffen in aangepaste organismen. Hierbij zijn vooral producten interessant

die in hun natuurlijke vorm slechts in kleine hoeveelheden geproduceerd worden of lastig te bewerken zijn. Het ontwerpen en inbouwen van specifieke functies staat in dit subveld centraal. Door zijn diversiteit trekt dit subveld professionals aan uit verschillende vakgebieden, waaronder biochemie, nanotechnologie en ICT. Recent onderzoek op het gebied van *metabolic pathway engineering* is gericht op de productie van biobrandstoffen en bioremediatie van schadelijke stoffen in het milieu. Uitdagingen worden gevormd door de complexiteit van de interacties binnen metabole netwerken en het geschikt maken van een organisme voor industriële productie.

- Een **minimaal genoom organisme** is een modelorganisme dat alleen nog de meest essentiële genen voor overleving bevat. Onderzoek op dit gebied is zowel gericht op fundamentele vragen over het ontstaan van leven als op de ontwikkeling van een ideaal productieorganisme. De afgelopen jaren is men er onder andere in geslaagd zo'n 20% van het genoom van *Mycoplasma genitalium* en van *Escherichia coli* te verwijderen zonder dat dit de essentiële functies van het organisme aantastte. In enkele gevallen had het verwijderen van de genen zelfs een gunstig effect op de groei van de bacteriën. Een van de uitdagingen op dit gebied is het feit dat er geen set van genen bekend is die universeel essentieel lijkt te zijn.
- Een **protocel** is het meest eenvoudige kunstmatige chemische model van een levende cel, opgebouwd uit organische en/of anorganische elementen die de functie van sommige maar niet noodzakelijk alle natuurlijke celcomponenten en moleculen nabootst. Omdat deze cellen van de grond af worden opgebouwd, worden ze onder de *bottom-up* benadering van synthetische biologie geschaard. Het onderzoek is voornamelijk gericht op fundamenteel onderzoek naar het functioneren van cellen. Daarnaast worden toepassingen op het gebied van *drug delivery* systemen genoemd. Voor de ontwikkeling van een autonoom functionerende protocel die vergelijkbaar is met een natuurlijke cel moeten nog vele drempels genomen worden. De afgelopen jaren is men er in geslaagd om zowel de replicatie van een informatiedrager (DNA) als van de celmembranen te laten plaatsvinden waarmee de eerste aanzet tot een replicerende protocel is gegeven.
- **Xenobiologie** richt zich op de chemische aanpassing van de bestaande genetische code door de chemische samenstelling van nucleïnezuren te veranderen of niet van nature voorkomende aminozuren in eiwitten in te bouwen. Het onderzoek is enerzijds gericht op het beantwoorden van fundamentele vragen, anderzijds is het onderzoek gericht op het verkrijgen van artificiële systemen en de ontwikkeling van medische toepassingen, zoals eiwitten met unieke farmacologische eigenschappen. Het meeste onderzoek op het gebied van xenobiologie bevindt zich nog in de experimentele fase. In 2011 slaagden onderzoekers er voor het eerst in om een aangepaste vorm van DNA (XNA) *in vitro* te repliceren.

In hoofdstuk 3 wordt op basis van de uitgangspunten van de risicoanalyse van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) onderzocht waar zich mogelijke knelpunten kunnen voordoen bij de huidige en toekomstige ontwikkelingen binnen de synthetische biologie. Naast de recente ontwikkelingen beschreven in hoofdstuk 2 worden ook de resultaten besproken van de workshop die de COGEM in 2011 organiseerde in samenwerking met het Rathenau Instituut. Tijdens deze workshop bogen wetenschappers en risicobeoordelaars zich aan de hand van een aantal cases over de vraag of en welke knelpunten zich kunnen voordoen in de milieurisicoanalyse en welke gegevens nodig zouden zijn om deze op te lossen.

De huidige milieurisicobeoordeling gaat uit van een casusgewijze beoordeling en berust op kennis van het gebruikte gastheer/donorsysteem. Het resulterende ggo wordt vergeleken met het wildtype gastheerorganisme (het uitgangsgenorganisme als de 'natuurlijke' referentie). In de risicobeoordeling worden verschillende stappen onderscheiden waarbij de mogelijke gevaren en de kans van het optreden van het gevaar worden ingeschat (samen vormen zij het risico), evenals de mogelijkheden om het gevaar in te perken door specifieke maatregelen. De methodologie van de risicoanalyse bij ggo's bestaat daardoor uit een weging van de combinatie van informatie over het ggo (gastheer en donorsequentie) en de aard van de werkzaamheden.

Op dit moment blijken er zich geen grote knelpunten in de milieurisicobeoordeling van toepassingen in de synthetische biologie voor te doen. Bij de huidige toepassingen is zowel voldoende kennis over het uitgangsgenorganisme als de ingebrachte eigenschappen beschikbaar.

Het recente onderzoek is indicatief voor de richting van het onderzoek en de toepassingen die in de toekomst verwacht kunnen worden. Indien de huidige trends zich doorzetten kan de toekomstige risicoanalyse mogelijk bemoeilijkt worden door een toename van de complexiteit van de interacties (*metabolic pathway engineering*), het vervagen van de grens tussen donor en gastheer (minimaal organisme) en het ontbreken van een natuurlijke referentie (protocellen en xenobiologie).

Deze ontwikkelingen kunnen ertoe leiden dat in de toekomst:

- het referentiekader van een bekend en gekarakteriseerd gastheerorganisme ontbreekt (minimaal organisme, protocellen en xenobiologie), of;
- de ingebrachte eigenschappen en de interacties met het gastheerorganisme onvoorspelbaar worden (*metabolic pathway engineering*).

Op kortere termijn kan de toename van schaalgrootte en snelheid (*synthetic genomics*) bovendien leiden tot:

- praktische en organisatorische problemen in relatie tot de huidige casusgewijze benadering.

In hoofdstuk 4 wordt bekeken welke opvallende ontwikkelingen of trends zich hebben voorgedaan in de maatschappelijke discussie over synthetische biologie. In dit


hoofdstuk wordt onder andere gesignaleerd dat er de afgelopen jaren een verbreding van de discussie plaats heeft gevonden. De thema's in de discussie over synthetische biologie zijn de afgelopen jaren veranderd van meer fundamenteel naar bredere vraagstukken over duurzaamheid en rechtvaardigheid. Daarnaast wordt ingegaan op de rol van *framing* door onderzoekers en media over de ontwikkelingen binnen de synthetische biologie. De COGEM signaleert dat het *framen* van een technologie als revolutionair en spectaculair niet alleen media-aandacht creëert, maar ook kan leiden tot disproportionele reacties en maatregelen op het vlak van sociale en ethische reflectie en regelgeving. Nauwkeurigheid en realisme in informatievoorziening zijn en blijven daarmee een belangrijk aandachtspunt bij alle onderzoek dus ook bij synthetische biologie.

In het laatste hoofdstuk 5 concludeert de COGEM dat de ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie de afgelopen vier jaar een grote sprong hebben gemaakt. Enkele belangrijke doorbraken waren de eerste 'synthetische' cel (2010); de creatie van een replicerende semi-synthetische protocel (2011) en de creatie van een alternatief genetisch alfabet (xenobiologie) dat in staat is tot *in vitro* replicatie (2011).

De COGEM signaleert dat de huidige risicoanalysemethodiek op dit moment voldoet voor het onderzoek dat plaatsvindt in het veld van synthetische biologie. Deze conclusie is in lijn met diverse andere rapporten die de afgelopen jaren zijn gepubliceerd door zusterorganisaties van de COGEM in andere Europese landen. Door de recente ontwikkelingen te blijven monitoren, wordt beter mogelijk om meer specifiek aan te wijzen waar zich in de toekomst mogelijke knelpunten kunnen gaan voordoen indien de huidige trends en het huidige onderzoek doorzetten.

De COGEM signaleert dat veel onderzoekers hun werk niet meer onder de synthetische biologie scharen maar onder specifieke subvelden. Synthetische biologie is nooit een goed gedefinieerd en duidelijk afgebakend onderzoeksgebied geweest, terwijl die onduidelijkheid bij de subvelden niet speelt. Echter door het wegvallen van de noemer synthetische biologie onttrekken de ontwikkelingen zich deels aan het oog van derden en ontstaat het risico dat de aandacht wegvalt voor het oplossen van toekomstige problemen in de milieurisicoanalyse. Ook kan het bredere publiek overvallen worden door toepassingen en producten die voor hen onverwacht op de markt verschijnen en mogelijk op bezwaren en weerstand stuiten.

De COGEM wijst op het belang van een goede wisselwerking en communicatie tussen wetenschappers en risicobeoordelaars. Onderzoekers moeten bij vergunningaanvragen de benodigde data aanleveren voor het uitvoeren van de risicoanalyse. Juist naarmate de vraagstellingen complexer worden, zullen wederzijdse leerprocessen tussen onderzoekers en risicobeoordelaars een belangrijk punt van aandacht vormen. Risicobeoordelaars en vergunningverleners moeten hierbij tijdig aan geven welke typen van gegevens aangeleverd moeten worden om een milieurisicoanalyse te kunnen uitvoeren.



ren. In relatie tot de drie eerder genoemde knelpunten kunnen risicobeoordelaars bij het ontbreken van een referentieorganisme meer expliciet maken welke informatie en eigenschappen van een nieuw organisme benodigd zijn voor de risicoanalyse. Het spanningsveld tussen praktische hanteerbaarheid van de veiligheidsmaatregelen bij onderzoek en het veilig werken met genetische modificatie vraagt daarbij mogelijk om een intensiever contact tussen vergunningverleners, risicobeoordelaars en aanvragers of onderzoekers.

De overheid kan een faciliterende rol spelen in deze processen door aandacht te besteden aan de risicoanalysemethodiek bij het opstellen van onderzoeksprogramma's.

Daarnaast is een mogelijk administratief knelpunt gesignaleerd door een toename van de schaalgrootte en snelheid van de ontwikkelingen. Hierdoor kan de casusgewijze beoordeling zoals deze nu wordt gehanteerd in de knel komen. Door nader onderzoek, bijvoorbeeld door te kijken hoe andere Europese of internationale vergunningverleners hiermee omgaan, kunnen mogelijk ideeën en oplossingen worden opgedaan om de administratieve last van de casusgewijze benadering te beperken.



INHOUD

1.	Introductie	12
1.1	Eerdere COGEM adviezen 2006 en 2008	12
1.2	Ontwikkelingen sinds 2008	13
1.3	Leeswijzer	14
2.	Synthetische biologie – stand van zaken	14
2.1	DNA synthese (Synthetic genomics)	16
2.2	Metabolic pathway engineering	21
2.3	Minimaal genoom (top-down)	25
2.4	Protocel (bottom-up)	28
2.5	Chemische synthetische biologie (xenobiologie)	31
3.	Risicobeoordeling synthetische biologie	36
3.1	Risicobeoordeling ggo's als uitgangspunt	36
3.2	Expertmeeting risicobeoordeling synthetische biologie	39
3.2.1	<i>Opzet workshop</i>	39
3.2.2	<i>Resultaten workshop</i>	40
3.3	Toekomstige uitdagingen risicobeoordeling synthetische biologie	41
3.3.1	<i>De case-by-case benadering</i>	41
3.3.2	<i>Complexiteit interactie</i>	42
3.3.3	<i>Grens donor/ontvanger</i>	42
3.3.4	<i>Natuurlijke referentie</i>	43
3.3.5	<i>Wet- en regelgeving: GGO of niet?</i>	44
3.4	Benodigde data/gegevens milieurisicoanalyse synthetische biologie	45
4.	Maatschappelijke discussie synthetische biologie	46
4.1	Verbreding discussie synthetische biologie	47
4.2	Communicatie & framing	48
4.3	Governance & beheersing technologie	49
5.	Conclusie & Discussie	52
5.1	Ontwikkelingen	52
5.2	Risicobeoordeling	53
5.3	Risicomanagement	54
5.4	Beleid	55
	Verklarende Woordenlijst	58
	Bijlage 1) Synthetische biologie: productie van industriële en natuurlijke grondstoffen	62

Bijlage 2) Lijst expertmeeting COGEM & Rathenau Instituut - 29 juni 2011	64
Bijlage 3) Fasering ontwikkeling van technologie, maatschappelijke discussie en beleidsvorming	65
Literatuur	68



1

INTRODUCTIE

Al vanaf het moment dat de term synthetische biologie werd toegekend aan specifieke subvelden van onderzoek, bestaat er discussie over de definitie van deze technologie. Wat is synthetische biologie en welke technieken en toepassingen vallen hieronder? Synthetische biologie wordt bijvoorbeeld gedefinieerd als het streven naar het bouwen en aanpassen van complexe kunstmatige biologische systemen om natuurlijke biologische verschijnselen te onderzoeken en in te zetten voor een verscheidenheid aan toepassingen.^{1,2,3,4,5,6} Enkele jaren geleden schaalden grote groepen wetenschappers hun werk onder de synthetische biologie. De laatste tijd lijkt er een trend de andere kant op en geven diverse onderzoekers aan dat hun werk onder een ander specifiek werkveld valt. In ieder geval kan worden gesteld dat synthetische biologie een onderzoeksveld is waarvan de verwachtingen hooggespannen zijn. Synthetische biologie wordt gezien als een technologie die nieuwe mogelijkheden biedt voor (bio)technologische applicaties en onderzoek. De technologie richt zich enerzijds op het veranderen van bestaande organismen en anderzijds op het ontwerpen en bouwen van nieuwe organismen. Globaal kunnen de volgende subvelden worden geïdentificeerd waarbinnen synthetische biologie een centrale rol speelt: *synthetic genomics*, *metabolic pathway engineering*, minimaal genoom organisme, protocellen en xenobiologie. Omdat (gedeeltelijk) synthetische organismen vervaardigd zijn op een manier die niet door voortplanting of natuurlijke recombinatie mogelijk is, valt de technologie onder de wet- en regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo's). Van begin af aan zijn twijfels geuit of de bestaande risicoanalysemethodiek, zoals die toegepast wordt bij ggo's, ook in de toekomst volstaat voor synthetische biologie. Daarnaast spelen andere aspecten zoals ethiek en *biosecurity*, sterker dan bij genetische modificatie, een rol in de discussie. De ontwikkelingen hebben geleid tot een publiek debat over het creëren van nieuwe levensvormen en de mogelijke risico's en onzekerheden die dit met zich mee kan brengen. De Commissie Genetische Modificatie (COGEM) heeft zowel in 2006 als in 2008 een signalering uitgebracht over synthetische biologie.



1.1 EERDERE COGEM ADVIEZEN 2006 EN 2008

In 2006 signaleerde de COGEM voor het eerst over synthetische biologie in **“Synthetische biologie; een onderzoeksveld met voortschrijdende gevolgen”** (CGM/060228-03). Het onderzoeksveld was relatief nieuw en speelde zich hoofdzakelijk af in de Verenigde Staten. In Nederland vond op dat moment nog weinig onderzoek op dit terrein plaats. De COGEM signaleerde dat synthetische biologie als tech-

nologie op een bepaald punt grenzen zou kunnen overschrijden, waardoor eventuele risico's niet met de bestaande risicoanalysemethodiek in te schatten zijn. Indien een risicoanalyse niet mogelijk is worden de activiteiten op het hoogste inperkingsniveau ingeschaald. Dit zou een belemmering kunnen vormen om dergelijk onderzoek in Nederland uit te voeren. Met het tijdig opstellen van een adequate risicoanalysemethodologie, worden verrassingen in een later stadium voorkomen, blijft de veiligheid gewaarborgd en worden wetenschappelijke ontwikkelingen niet onnodig gefrustreerd. Daarom wees de COGEM met deze signalering in een vroegtijdig stadium op de complexe problematiek van dit onderwerp.

De media-aandacht en het aantal wetenschappelijke publicaties over het onderwerp synthetische biologie namen tussen 2006 en 2008 verder toe. In de media werd door onder meer wetenschappers gespeculeerd over toekomstige ontwikkelingen waarbij bijna niets onmogelijk leek. Anderen waarschuwden juist voor de eventuele gevolgen van deze nieuwe en baanbrekende technologie. In 2008 signaleerde de COGEM op verzoek van de toenmalige minister van VROM opnieuw over synthetische biologie. De minister vroeg de COGEM onder meer of de huidige risicoanalyse-systematiek en het beoordelingskader voor ggo's ook toepasbaar zou zijn voor de aankomende ontwikkelingen in de synthetische biologie en wanneer dit mogelijk niet meer het geval zou zijn. Daarnaast vroeg zij op welke wijze de overheid de maatschappelijke discussie over synthetische biologie het beste kon faciliteren. In de signalering **“Biologische machines? Anticiperen op ontwikkelingen in synthetische biologie”** (CGM/080925-01) gaf de COGEM een antwoord op deze vragen. Zij concludeerde dat de bestaande risicoanalysemethodiek voor ggo's de komende jaren ook toepasbaar is op de ontwikkelingen in de synthetische biologie. Deze conclusie was ondermeer gebaseerd op de verwachting dat de komende jaren alleen met biologisch ingeperkte en apathogene organismen gewerkt zou worden, waarvan de functie van de gebruikte genen bekend is. De COGEM verwachtte dat een introductie in het milieu van een (gedeeltelijk) synthetisch organisme voorlopig niet aan de orde zou zijn. De COGEM stelde dat gelijktijdig met de ontwikkelingen tevens de kennis zou toenemen, waardoor het in de meeste gevallen mogelijk zou blijven om een risicoanalyse te doen. Echter, de COGEM signaleerde dat bij het inbouwen van meervoudige complexe metabole routes in organismen of het gebruik van genen met deels of geheel onbekende functies, de risicobeoordeling moeilijker uitvoerbaar zal worden. Waar eventuele knelpunten zich specifiek zouden gaan voordoen, was op dat moment nog niet te voorzien.

1.2 ONTWIKKELINGEN SINDS 2008

Synthetische biologie heeft zich sinds 2008 verder ontwikkeld op diverse gebieden en de eerste toepassingen hebben de markt bereikt. De COGEM heeft deze ontwikkelingen de afgelopen jaren op de voet gevolgd. In het kader hiervan organiseerde de COGEM in 2011 samen met het Rathenau Instituut een expertmeeting om op basis

van recente ontwikkelingen een meer gedetailleerd beeld te krijgen van eventuele knelpunten in de milieurisicobeoordeling. Daarnaast heeft de COGEM contact gezocht met een aantal Europese zusterorganisaties om samen de ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie te monitoren. Eind 2012 organiseerde de COGEM samen met de Franse *Haut Conseil des Biotechnologies* (HCB), de Belgische *Biosafety and Biotechnology Unit* (SBB) en de Duitse *Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit* (ZKBS) een internationale workshop voor wetenschappers en risicobeoordelaars om specifieke vragen rondom de risicoanalyse van synthetische biologie te identificeren en waar mogelijk te beantwoorden. Een verslag van deze bijeenkomst volgt begin 2013.

1.3 LEESWIJZER

In de eerste signalering van de COGEM zijn een aantal vragen gesteld over de wijze waarop synthetische biologie zich zou kunnen ontwikkelen en welke vraagstukken daarbij een rol gaan spelen. Deze vragen zijn deels beantwoord in de tweede signalering (2008). In deze derde signalering wordt een update en verdere uitwerking gegeven van de volgende vragen:

- Welke ontwikkelingen komen er op ons af op het gebied van synthetische biologie?
- (Waar) Kunnen zich knelpunten voordoen bij het hanteren van de huidige risicoanalyse voor ggo's?
- Welke kennis is nodig om die knelpunten op te lossen?
- Zijn er praktische en werkbare beheersingsmaatregelen voor deze knelpunten?
- Welke mogelijkheden zijn er om dit beleidsveld in de toekomst structureel in de gaten te houden?



2

SYNTHETISCHE BIOLOGIE – STAND VAN ZAKEN

In dit hoofdstuk wordt een niet-uitputtend overzicht geschetst van de belangrijkste ontwikkelingen sinds 2008. Naar verwachting zal synthetische biologie de komende jaren in toenemende mate een rol gaan spelen in de industriële sector (biobrandstoffen en *bioplastics*), de voedingssector (geur- en smaakstoffen) en de farmaceutische sector (medicijnen en vaccins).⁷ Op medisch gebied wordt bovendien verwacht dat synthetische biologie zal bijdragen aan de karakterisering van pathogenen, het analyseren van ziektebeelden, diagnostiek en screening. De toepassing van synthetische biologie zal volgens wetenschappers leiden tot kortere ontwikkelingstrajecten, verhoogde precisie en een dalende productieprijs.⁸ Hoewel het zwaartepunt van synthetische biologie in de VS ligt en in mindere mate in Europa, staat het onderzoek ook in andere delen van de wereld (zoals China) niet stil.⁹ De afgelopen jaren zijn diverse samenwerkingsverbanden en spin-off bedrijven opgestart en de eerste toepassingen bereiken de markt (zie kader: *Voorbeelden toepassingen synthetische biologie*). Ondanks uitgebreide R&D trajecten, vooral in de industriële sector, is het aantal producten van synthetische biologie dat commercieel op de markt verkrijgbaar is nog vrij beperkt.

Voorbeelden toepassingen synthetische biologie

- DuPont werkt samen met suikerproducent Tate & Lyle aan de productie van bioplastic door synthetische- / gg-gist maïssuikers te laten omzetten in een grondstof voor de productie van bioplastic. Dit plastic wordt verkocht onder de naam Sorona en onder andere gebruikt in tapijten. , Daarnaast werkt Dupont aan de productie van vanille, stevia (een zoetstof) en palmolie.^{10,11}
- Genencor (DuPont) gebruikt synthetische biologie om een metabole route in te bouwen in *Escherichia coli* voor de productie van isopreen (Biolisoprene), een grondstof voor de productie van synthetisch rubber. Het bedrijf werkt samen met autobandenproducent Goodyear om Biolisoprene geschikt te maken voor commerciële productie.¹²
- Solazyme richt zich op de productie van biobrandstoffen met behulp van synthetische biologie. Het bedrijf claimt algen te hebben geconstrueerd die suiker omzetten in biodiesel tot ruim 80% van hun eigen gewicht. In 2010 produceerde Solazyme ruim 80.000 liter biodiesel in algen voor de Amerikaanse marine.¹³
- Amyris Biotechnologies, mede opgericht door UC Berkely biotechnoloog Jay Keasling, richt zich op de productie van artemisinine (de precursor van antimalariamiddelen) en de productie van >

chemische producten en biobrandstoffen. Er wordt gewerkt aan de productie van Farnesene, de bouwsteen voor een variëteit aan chemische producten, detergens, cosmetica, parfum en industriële smeermiddelen.¹⁴

- Synthetic genomics Vaccines Inc. werd in 2010 opgericht door synthetische biologie goeroe Craig Venter (VS). Hij sloot een contract met farmaceut Novartis om synthetische virussen te creëren voor vaccinontwikkeling.¹⁵

Verwacht wordt dat met synthetische biologie op termijn diverse industriële en natuurlijke grondstoffen vervangen kunnen worden (zie bijlage 1: Synthetische biologie: productie van industriële en natuurlijke grondstoffen). Een recente inventarisatie van het Woodrow Wilson Institute (VS) bevestigt dat de productie van diverse grondstoffen door synthetische organismen in de pijplijn zit.¹⁶ Daarnaast is het gebruik van synthetische biologie gericht op het verkennen en optimaliseren van de mogelijkheden die de technologie biedt in bestaande onderzoeksgebieden.

Hoewel over de definitie van synthetische biologie nog steeds verschillende meningen bestaan, kunnen globaal de volgende subvelden worden geïdentificeerd waarbinnen synthetische biologie een centrale rol speelt (zie tabel 1: Overzicht subvelden synthetische biologie).^{9,17}

TABEL 1: OVERZICHT SUBVELDEN SYNTHETISCHE BIOLOGIE

DNA synthese / Synthetic genomics

De synthese van artificieel DNA (oligo's, genen of een volledig genoom).

Toepassing: faciliteren andere toepassingen zoals metabolic pathway engineering.

Metabolic pathway engineering

Het toepassen van combinaties van genen om een nieuwe of aangepaste functie te introduceren in een organisme.

Toepassing: fundamenteel onderzoek, productie hoogwaardige chemicaliën, biobrandstoffen, farmaceutische producten (bijvoorbeeld artemisinine), bioremediatie.

Minimaal genoom

Het maken van een modelorganisme waarin alleen de meest essentiële functies nog worden uitgevoerd (top-down).

Toepassing: creëren modelorganismen, fundamenteel onderzoek.

Protocellen

Het maken van een gedeeltelijke of volledige synthetische cel (bottom-up).

Toepassing: fundamenteel onderzoek, ontwikkeling drug delivery systems.

Xenobiologie

Chemische synthetische biologie, ofwel het introduceren van een alternatief genetisch alfabet.

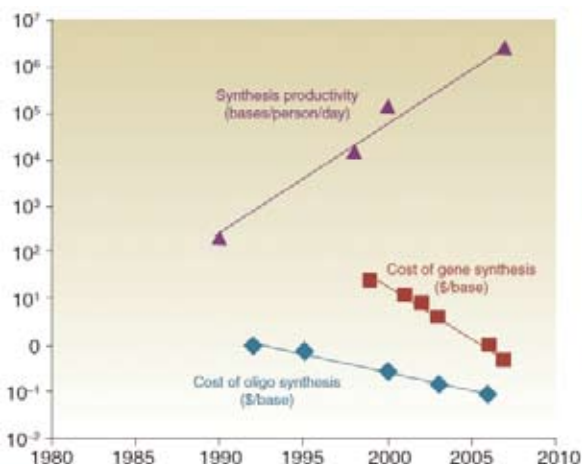
Toepassing: fundamenteel onderzoek, productie van moleculen met specifieke eigenschappen.

De inzet van technieken uit de synthetische biologie strekt zich uit over een zeer breed toepassingsgebied. Het is daarom onmogelijk om een uitputtend overzicht te geven van al het recente onderzoek over de afgelopen jaren. In de volgende paragrafen wordt een indruk gegeven van zowel de mogelijkheden als de uitdagingen per werkveld aan de hand van een toelichting en enkele concrete voorbeelden uit de recente literatuur.

2.1 DNA SYNTHESE (SYNTHETIC GENOMICS)

Synthetic genomics is het ontwerpen en synthetiseren van grotere stukken DNA (genen of volledige genomen). Gesynthetiseerde DNA constructen worden gebruikt voor fundamenteel onderzoek en bieden mogelijkheden op het gebied van geneesmiddelenontwikkeling, industriële en agronomische toepassingen. Bij *Synthetic genomics* wordt voornamelijk gewerkt met eencellige (prokaryote) organismen. Daarnaast werkt men aan het synthetiseren van zogeheten mini-chromosomen die mogelijkheden bieden voor het veranderen van eukaryote meercellige organismen.^{18,19,20}

De synthese van stukken DNA (oligonucleotiden) met behulp van gespecialiseerde machines is al bijna 25 jaar mogelijk. Echter, de capaciteit, nauwkeurigheid en snelheid van de synthese zijn vooral de afgelopen jaren exponentieel toegenomen. Sinds de mogelijkheid bestaat om DNA te synthetiseren in afwezigheid van een natuurlijke sjabloon, hebben de technieken en machines voor DNA synthese en de aaneenkoppeling van grotere fragmenten zich snel ontwikkeld.^{21,22,23} Lange stukken DNA kunnen steeds sneller gesynthetiseerd worden tegen een steeds lagere prijs (zie figuur 1: *Productiviteit van oligonucleotiden synthese en de prijs van oligo's en genen*).^{24,25} Vrijwel elk gen of stuk DNA kan tegenwoordig worden besteld bij commerciële bedrijven. Niet alleen het namaken van bestaande genen, maar ook het aanpassen, introduceren van nieuwe onderdelen en het herschikken van genetische informatie is vergemakkelijkt door de vooruitgang op het gebied van DNA synthese.



Figuur 1: Productiviteit van oligonucleotiden synthese en de prijs van oligo's en genen (Figuur: Carlson R, (2009). The changing economics of DNA synthesis. Nature Biotechnology commentary 27:12, 1091-1094).

Het is nog niet mogelijk om foutloos onbeperkt lange stukken DNA in één keer te synthetiseren. Daarom worden kortere stukken DNA geproduceerd die vervolgens aan elkaar gekoppeld worden. Hier zijn verschillende technieken voor ontwikkeld. De meest gebruikte technieken voor DNA synthese (van 'klein naar groot') zijn:²⁷

- Chemische koppeling van nucleotiden (synthese van kleine fragmenten tot 200 basen);
- Gebruik van DNA ligases (koppeling van kleine fragmenten met overlappende sequenties);
- Polymerisatie (gebaseerd op *Polymerase Chain Reaction* (PCR)) voor fragmenten tot 15 kilobasenparen (kbp);
- Recombinatie (koppeling van grote DNA fragmenten (vanaf 100 kbp) of constructie van een volledig genoom *in vitro* of *in vivo* (bijvoorbeeld in gistcellen)).

De maximale lengte van de directe chemische synthese van een aaneengesloten stuk DNA ligt in 2012 rond de 230 kbp.²⁸ Tussen 1970 en 2008 nam het langst mogelijke gesynthetiseerde DNA toe van 75 basen naar 582.970 basenparen (bp) (zie tabel 2: *Omvang de novo gesynthetiseerd DNA 1955 - 2010*). Het langste DNA dat tot nog toe gesynthetiseerd is, betreft het volledige genoom van *Mycoplasma mycoides* in 2010. Dit DNA is 1,08 megabaseparen (Mbp) (1.080.000bp) lang. Met dit genoom werd in hetzelfde jaar het eerste 'synthetische' organisme gecreëerd (zie kader: *Synthia; het eerste 'synthetische' organisme*).²⁹

TABEL 2: OMVANG DE NOVO GESYNTHETISEERD DNA 1955 - 2010

Jaar	Oligo/gene target	omvang (basen / bp)
1955	Dinucleotide dTdT	2
1962	Tetranucleotides TTTT	4
1965	Dodecanucleotides	12
1970	Yeast alanine tRNA	77
1976	Escherichia coli tyrosine suppressor tRNA	207
1981	Human interferon alpha	514
1986	Bovine rhodopsin	1.057
1990	Redesigned pUC19	2.050
1995	pUC182Sfi	2.703
2002	Poliovirus type 1 Mahoney 9PV1(M)	7.501
2004	DEBS gene cluster	31.656
2008	<i>Mycoplasma genitalium</i>	582.970
2010	<i>Mycoplasma mycoides</i>	1.080.000

Bron: Carr PA, Church GM (2009). Genome Engineering. Nature Biotechnology review 27; 12 december 2009 (supplementary table).

Synthia; het eerste 'synthetische' organisme

In juli 2010 publiceerden onderzoekers van het J. Craig Venter Institute hun geslaagde poging om een cel met een volledig gesynthetiseerd genoom te maken.^{30,31} Aan het project, dat ruim 40 miljoen dollar kostte, werd 15 jaar gewerkt door een team van 25 wetenschappers. Met behulp van DNA synthese werden 1078 DNA cassettes (1080 bp per stuk) gemaakt en vervolgens geklooneerd in *E. coli*. Deze cassettes werden in drie stappen aan elkaar gekoppeld in gist (*Saccharomyces cerevisiae*) om het volledige genoom van *Mycoplasma mycoides* te reconstrueren. Vervolgens werd het samengevoegde genoom (1,08 Mbp) van *M. mycoides* in een lege cel (het chassis) van de aanverwante bacterie *M. capricolum* gebracht. Daarna bleek het organisme in staat om zich onder laboratoriumomstandigheden te handhaven en voort te planten. De sequentie van het gesynthetiseerde genoom bevat enkele 'watermerken' van het J. Craig Venter Institute en werd *M. mycoides* JCVI-syn1.0 genoemd.

Mogelijkheden

Het synthetiseren van omvangrijke stukken DNA, genen of zelfs een volledig genoom, is een zogeheten *enabling technology* die de andere ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie mogelijk maakt. Zo kunnen grote hoeveelheden mutanten gesynthetiseerd en gescreend worden (zie kader: *High throughput synthese van mutanten*) en kunnen synthetische virussen gegenereerd worden (zie kader: *Synthetische virussen en vaccinontwikkeling*). Het gesynthetiseerde DNA kan worden ingezet voor bijvoorbeeld *metabolic pathway engineering* en de ontwikkeling van minimale organismen of protocellen (zie paragraaf 2.2, 2.3 en 2.4). Het synthetiseren van DNA wordt grotendeels uitbesteed aan gespecialiseerde bedrijven. Het nauwkeurig kunnen synthetiseren van DNA in elke gewenste sequentie draagt bij aan het ontwerpaspect van synthetische biologie. Naar verwachting zal de focus van DNA synthese in de toekomst verschuiven van het reconstrueren van kopieën van bestaande genen (net als bij genetische modificatie) naar het ontwerpen van nieuwe genetische circuits en functies (kenmerkend voor synthetische biologie).²⁶ Andere faciliterende technologieën voor synthetische biologie zijn onder andere eiwitsynthese, *-omics* technieken en informatica.³²

High-throughput synthese van mutanten

Multiplex Automated Genome Engineering (MAGE) is een techniek waarbij gelijktijdig een groot aantal synthetische DNA-sequenties op verschillende locaties in het chromosoom worden ingebracht.^{33,34} Dat gebeurt in opeenvolgende cycli, volledig geautomatiseerd, en in evoluerende celpopulaties. Op dit moment kunnen ongeveer tien van deze cycli per dag worden doorlopen. Vervolgens worden de cellen getest op genotype en/of fenotype en kan de cyclus >

worden herhaald met de subset van cellen die de genomische sequenties van interesse bevatten. Om een mogelijke toepassing van MAGE te demonstreren heeft men een *E. coli* stam 'gevoed' met twintig endogene genen die zijn betrokken bij de 1-deoxy-D-xylulose-6-phosphate (DXP) pathway voor de productie van Lycopeen, een antioxidant. Daarnaast werden vier genen geïntroduceerd om secundaire *pathways* te beïnvloeden of uit te schakelen in de bacterie. Door middel van MAGE werden dagelijks 4,3 miljard variaties van *E. coli* met in totaal 24 genen gecreëerd en gescreend. In vijftig cycli werden 15 miljard genetische varianten geproduceerd. Na screening bleken diverse bacteriën een sterk (tot 5 keer) verhoogde Lycopeen productie te hebben.³⁵ MAGE biedt mogelijkheden voor de productie en optimalisatie van industriële en chemische grondstoffen, biobrandstoffen en farmaceutische componenten.

Uitdagingen

Er bestaan diverse uitdagingen op het gebied van DNA synthese. De foutmarges van de chemische synthese van DNA zijn nog steeds relatief groot ten opzichte van de natuurlijke situatie. In het huidige chemische synthese proces ligt de foutmarge rond de 10^{-2} tot 10^{-3} (ofwel 1-10 fouten per kbp). Ter vergelijking: de natuurlijke foutmarge van DNA replicatie in prokaryote en eukaryote cellen ligt tussen de 10^{-7} tot 10^{-8} dankzij de diverse *proofreading* en *mismatch repair* systemen.^{37,38,39,40,41,42,43} Hierbij wordt de DNA sequentie tijdens de replicatie nagelopen en worden eventuele verkeerd geplaatste basen vervangen. Bij chemische synthese geldt over het algemeen dat hoe groter het gesynthetiseerde stuk DNA is, hoe meer fouten deze bevat. Het blijkt lastig om de foutmarge in het initiële synthese proces verder omlaag te brengen. Wel zijn er diverse methoden ontwikkeld om fouten op te sporen en te verwijderen. De inserties en deleties die ontstaan, kunnen worden opgespoord en verwijderd door bijvoorbeeld *size-exclusion* technieken. Met deze technieken worden DNA moleculen op basis van grootte en moleculair gewicht van elkaar gescheiden. Deze methoden werken echter niet bij fouten die geen verandering in grootte of gewicht teweeg brengen (evenals bij evenveel deleties als inserties). Bij het synthetiseren van kleinere stukken DNA of genen, kan door middel van nucleotidenvolgordebepaling, testen op genexpressie en *functional screening* een selectie worden gemaakt van klonen die geen fouten bevatten. *Functional screening* is echter alleen effectief voor eiwit-coderende regionen in het DNA. Ook *silent* mutaties worden niet opgemerkt met deze techniek.³⁷

Bij het synthetiseren van kleine aantallen van grote stukken DNA is het maken van een selectie van foutloze stukken niet altijd mogelijk of wenselijk (kostentech- nisch) en wordt geprobeerd de fouten te herstellen.²⁷ Hierbij kunnen, mits een template beschikbaar is, *DNA Mismatch recognition proteins* worden gebruikt en technieken als *nuclease excision en polymerase resynthesis*, of *site directed mutagenesis*.^{27,33}

Synthetische virussen & vaccinontwikkeling

De snelle vooruitgang in DNA-sequencing en -synthese biedt mogelijkheden voor het synthetiseren van virussen en het ontwikkelen van vaccins.²³ In 2002 werd het poliovirus gesynthetiseerd en later de niet meer circulerende 1918 stam van het griepvirus.²¹ Het gemeenschappelijke doel van deze strategie is de eigenschappen van deze virussen verder te onderzoeken en deze kennis te gebruiken om mensen en dieren in de toekomst te beschermen tegen virale ziekten. De verwachtingen in dit veld zijn enerzijds hooggespannen.²³ Anderzijds worden kritische vragen gesteld over deze toepassingen met het oog op mogelijk bioterrorisme. Omdat genoomsynthese onafhankelijk van een natuurlijke template kan worden uitgevoerd, is het mogelijk oude en niet meer circulerende virussen te maken. Bovendien kunnen wijzigingen in de structuur en functie van genetische informatie van een virus makkelijker worden doorgevoerd. De volledige sequenties van ruim 3000 virussen zijn bekend en beschikbaar in de *Viral Genome Resource Database* voor onderzoek.⁴⁴ Naast onderzoek is de synthese van (delen van) virussen gericht op de ontwikkeling van vaccins. Onderzoekers bleken in staat om een effectief niet-replicerend subunit vaccin te maken tegen Ebola bij muizen door middel van DNA synthese van een deel van het virus.⁴⁵

Het bedrijf Evolva in Zwitserland gebruikt DNA synthese om massaal (combinaties van) synthetische chromosomen van planten, dieren en schimmels in gist in te bouwen om te onderzoeken of er interessante producten, zoals voedseladditieven of farmaceutische producten, geproduceerd kunnen worden.⁴⁶ Uit ongeveer een miljard combinaties komen zo'n 10.000 interessante gistvarianties die verder onderzocht worden. Het Zwitserse bedrijf Novartis werkt samen met het Amerikaanse bedrijf Synthetic genomics Vaccines Inc. om gedurende een driejarig project vaccins te ontwikkelen met behulp van synthetic genomics (zie kader: *Voorbeelden toepassingen synthetische biologie*).⁴⁷

2.2 METABOLIC PATHWAY ENGINEERING

Metabolic pathway engineering is sterk verbonden met genetische modificatie, maar gaat een stap verder doordat volledige nieuwe of meervoudige *pathways* worden geïntroduceerd in een organisme. Bij genetische modificatie gaat het tot nog toe om het aanpassen of introduceren van één of enkele genen. *Metabolic pathway engineering* gaat meer uit van het principe van engineering en is gericht op de productie van hoogwaardige chemicaliën, plastics, brandstoffen, farmaceutische componenten en geur- en smaakstoffen. Hierbij zijn vooral producten interessant die in hun natuurlijke vorm slechts in kleine hoeveelheden geproduceerd worden of lastig te bewerken zijn.

Metabolic pathway engineering trekt door zijn diversiteit professionals aan uit verschillende vakgebieden, zoals biochemie, nanotechnologie en informatica. In dit sub-

veld speelt DNA synthese en het standaardiseren van specifieke DNA constructen een belangrijke rol. De ontwikkeling van zogeheten *biobricks* is een van de eerste initiatieven om synthetische genetische circuits te registreren en te standaardiseren.⁴⁸ Het is een *open source* database waar iedereen zijn 'genetische onderdelen' kan onderbrengen.⁴⁹ De onderdelen zijn DNA sequenties met een specifieke (gen)functie zoals promoters, functionele genen en terminators. Vooral de deelnemers aan de jaarlijkse IGEM³ competitie maken gebruik van deze database (*zie kader: Bacteriesticker geeft aan wanneer vlees bedorven is*). Een kritiekpunt op de *biobricks* is dat veel van de geregistreerde onderdelen niet grondig zijn gekarakteriseerd en niet altijd werken zoals ontworpen.⁵⁰ Om dit probleem te adresseren werd in 2009 de *International Open Facility Advancing Biotechnology* (BioFab) opgericht. Het doel van dit publiek gefinancierde platform is het optimaliseren van bestaande onderdelen/*biobricks* door professionals.⁵¹

Bacteriesticker geeft aan wanneer vlees bedorven is

In 2012 won een team studenten van de Rijksuniversiteit Groningen de jaarlijkse *International Genetically Engineered Machine* (IGEM) competitie.^{52,53} De groep ontwikkelde een bacterie die van kleur verandert wanneer er bederf optreedt in vleeswaren. Het bederf van vlees wordt veroorzaakt door bacteriën waarbij specifieke stoffen vrijkomen. De bacterie *Bacillus subtilis* is in staat deze stoffen in zeer kleine hoeveelheden te detecteren. De Groningse studenten zochten uit welke eigen genen van de bacterie actief worden zodra die bedorven vlees 'ruikt'. Vóór de genen in kwestie zit in het DNA een promotor, een stukje DNA dat genen daar vlak achter aanschakelt. Door een gen voor een geel pigment vlak achter deze promotor in te bouwen, maakt de bacterie alleen pigment aan als hij bederf herkent. Omdat het niet wenselijk is om vlees in de supermarkt direct in contact te brengen met genetisch gemodificeerde bacteriën, ontwierpen de studenten een plastic omhulsel voor de bacteriën (een 'sticker') die wel de geurstoffen van het vlees doorlaat, maar andersom niet de aangepaste *B. subtilis* bacteriën. Zodra het vlees begint te bederven, kleurt de sticker helder geel.

Om geschikt te zijn voor standaardisering en toepassing bij *metabolic pathway engineering* moeten *biobricks* over een groot aantal specifieke eigenschappen beschik-

³ De *International Genetically Engineered Machine* (IGEM) competitie is een wedstrijd voor jong wetenschappelijk talent op het gebied van synthetische biologie. De opdracht is om een innovatieve biologische machine te maken met behulp van gestandaardiseerde DNA constructen ofwel *biobricks*. Enkele voorbeelden van projecten die onder de IGEM vlag tot stand zijn gekomen zijn biosensoren, bioremediatoren en lichtgecontroleerde cellen.

ken zoals specificiteit, orthogonaliteit, sensitiviteit, robuustheid, compatibiliteit en instelbaarheid. Het gebruik van computermodellen zal in de toekomst een belangrijke rol gaan spelen bij de standaardisatie en het rationele ontwerp van synthetische organismen met nieuwe functies. Onlangs werden de resultaten gepubliceerd van een onderzoek naar het eerste computermodel van een volledige bacterie. Wetenschappers maakten een computermodel van de bacterie *Mycoplasma genitalium*, waarin een aanzienlijk aantal moleculaire interacties van het organisme in kaart zijn gebracht op basis van 1900 experimenteel bepaalde parameters.⁵⁴

Mogelijkheden

Metabolic pathway engineering is, naast fundamenteel onderzoek, vooral gericht op de productie van hoogwaardige stoffen en biobrandstoffen (zie kader: *Productie van biobrandstoffen in bacteriën en algen*), de productie van fijnchemicaliën (bijvoorbeeld riboflavine, succinate) of medicijnen.^{55,56,57,58} Daarnaast worden de mogelijkheden van *metabolic pathway engineering* benut voor de detectie en vernietiging van schadelijke stoffen (zie kader: *Bacterie detecteert en vernietigt herbicide in milieu*). Een groot aantal bedrijven wereldwijd is zich bewust van deze potentiële mogelijkheden, blijkt uit een recente inventarisatie van het Woodrow Wilson Institute naar de ontwikkelingsstatus van de productie van diverse biologische stoffen in synthetische organismen waaronder biobrandstoffen (biodiesel, ethanol, butanol), chemische stoffen (nylon, plastic), voedingsstoffen (vanille, citrus, stevia) en farmaceutische producten (vaccins, antibiotica, antimalaria middelen, diabetesmedicatie).¹⁶ Dit werkveld binnen de synthetische biologie is zeer divers en laat zich goed illustreren aan de hand van de verschillende voorbeelden in deze sectie.

Productie van biobrandstoffen in bacteriën en algen

Er wordt volop gewerkt aan de productie van biobrandstoffen in bacteriën en algen.⁵⁹ Amerikaanse onderzoekers van Harvard University werken aan de productie van biobutanol in cyanobacteriën.⁶⁰ Isobutanol (biobutanol genoemd indien geproduceerd in een biologisch systeem) is een alcohol die wordt gebruikt in de chemische industrie als oplosmiddel en als brandstof. Onderzoeker Bokinsky heeft met zijn team een *E. coli* bacterie aangepast die cellulose en hemicellulose uit plantmateriaal kan omzetten naar voorlopers voor biobrandstoffen voor onder meer diesel en vliegtuigbrandstoffen.⁶¹

In de inleiding van dit hoofdstuk is aangegeven dat het eerste vliegtuig op biobrandstoffen uit gg-algen al heeft gevlogen. Het betreft biobrandstof van het bedrijf Solazyme. In 2010 produceerde Solazyme voor de Amerikaanse marine ruim 80.000 liter biodiesel in algen. Ook andere bedrijven, zoals Amyris, richten zich op de productie van biodiesel en vliegtuigbrandstoffen.⁶²

Bacterie detecteert en vernietigt herbicide in milieu

Amerikaanse onderzoekers gebruikten synthetische biologie om een *E. coli* stam zo aan te passen dat deze de capaciteit kreeg om het herbicide Atrazine op te sporen in het milieu en te metaboliseren.^{63,17} Het herbicide Atrazine is milieuvervuilend en kan schadelijk zijn voor dieren. De onderzoekers gebruikten een synthetische *switch* (een Atrazine-bindend molecuul en riboswitch) die kan binden aan de Atrazine moleculen en vervolgens van vorm verandert. Dit leidt tot een verandering in genexpressie die gevolgd wordt door de expressie van een '*Atrazine-degrading*' gen afkomstig uit een andere bacterie. Deze toepassing bleek onder laboratoriumomstandigheden succesvol om in petrischaaltjes Atrazine op te sporen en af te breken.

Ook het herprogrammeren van genen kan gezien worden als een vorm van *pathway engineering*. Toepassingen uit deze hoek bieden bijvoorbeeld nieuwe mogelijkheden voor vaccinonderzoek (zie kader: *Synthetic Attenuated Virus Engineering*).

Synthetic Attenuated Virus Engineering

Synthetic Attenuated Virus Engineering (SAVE) biedt nieuwe mogelijkheden voor de productie van vaccinkandidaten voor een breed scala aan virussoorten. De wildtype virussen worden geattenueerd (verzwakt) door het herprogrammeren van delen van het genoom zodat codonparen gesuboptimaliseerd worden, maar nog wel coderen voor de aminozuurvolgorde van het wildtype virus. Deze sequenties bevatten honderden nucleotidenwijzigingen in vergelijking met het wildtype en worden gegenereerd door middel van chemische synthese. De resulterende virussen zijn niet in staat zich efficiënt te vermenigvuldigen.⁶⁴ De resultaten van onderzoek met polio- en influenzavaccins zijn tot nu toe veelbelovend.^{65,66}

Uitdagingen

Het standaardiseren van onderdelen om deze vervolgens toe te passen als kant en klare bouwstenen in organismen om gewenste producten te verkrijgen klinkt in populair wetenschappelijke artikelen vaak eenvoudiger dan het werkelijk is. Het werkelijk standaardiseren van DNA constructen staat nog in de kinderschoenen. De meeste toepassingen op het gebied van *metabolic pathway engineering* zijn tot nu toe tot stand gekomen door maatwerk.

Sinds het synthetiseren van genen steeds eenvoudiger is geworden, is de nadruk (en de moeilijkheid) meer komen te liggen op het ontwerpaspect. Het gaat niet alleen om de introductie van de losse bouwstenen, maar ook om het optimaliseren en afstemmen

van deze onderdelen om te voorkomen dat er een *bottleneck* ontstaat en bepaalde tussenproducten zich ophopen in het organisme. Ontworpen genetische circuits zijn uiteindelijk geen geïsoleerde onderdelen maar functioneren in de context van het hele genoom. De complexiteit van de introductie van metabole routes met combinaties van genen lag in 2011 rond de 10 tot 15 geïntroduceerde genen.

Naast de productie van interessante componenten bestaan er nog andere uitdagingen. Om een product geschikt te maken voor commercialisatie, moet de efficiëntie en kosten/baten balans van het productieproces beter dan de bestaande productie zijn. Voor diverse chemische en natuurlijke grondstoffen bestaat een *proof of principle* voor de productie in synthetische/gg-micro-organismen, maar laat een marktintroductie op zich wachten omdat de kosten/baten balans (nog) niet opweegt tegen de bestaande productie. Een van de meest genoemde succesvoorbeelden van *metabolic pathway engineering* is wellicht de productie van de antimalaria precursor artemisinine in gistcellen. Het feit dat er in dit project circa 150 mensenjaren aan tijd zijn geïnvesteerd, geeft echter ook de complexiteit van dergelijke processen aan.⁶⁸ Het antimalariamiddel dat door Amyris werd ontwikkeld, zal geproduceerd worden door farmaceut Sanofi-Aventis. Het product is al enkele jaren aangekondigd en wordt in 2013 op de markt verwacht.⁶⁹

2.3 MINIMAAL GENOOM (TOP-DOWN)

Een minimaal genoom organisme is een organisme dat slechts beschikt over het meest essentiële erfelijke materiaal om te kunnen overleven in voedingsmedium. In het laboratorium worden zoveel mogelijk niet-essentiële genen verwijderd (*top-down* benadering). Het erfelijke materiaal van het organisme is daardoor dusdanig minimalistisch dat het een specifiek kweekmedium nodig heeft om te functioneren en om zich te kunnen vermenigvuldigen. Deze minimale organismen zijn hierdoor sterk biologisch ingeperkt en alleen in staat zich te handhaven onder laboratoriumomstandigheden.

Over de vraag hoeveel en welke genen essentieel zijn voor het functioneren van een organisme wordt al geruime tijd nagedacht. In 1989 stelde André Goffeau een lijst op van een aantal minimale functies die de cel nodig heeft om te functioneren. Hij schatte in dat een minimaal genoom met genen voor de functies van replicatie, transcriptie, translatie, metabolisme, transport en een celmembraan ongeveer 500 kbp in beslag zou nemen en uit ongeveer 250 genen zou bestaan.⁷⁰ Dit is mogelijk een onderschatting voor een volledig autonoom functionerend organisme. Als uitgangspunt voor onderzoek naar het minimaal genoom wordt gekeken naar bestaande organismen met een klein genoom. De op dit moment kleinst bekende volledig autonoom functionerende bacterie is *Pelagibacter ubique* (1,3 Mbp / 1389 genen).⁷¹ Er zijn een aantal andere bacteriën met verschillende habitats die eveneens rond dit genenaantal zitten. Op basis hiervan wordt geschat dat de minimale set aan genen voor prokaryote cellen rond de 1400 ligt.^{72,73} De enige soorten met een kleiner genoom zijn bijvoorbeeld

endocellulaire symbionten en parasitaire eencellige organismen (zoals *M. genitalium*) die voor een deel van hun functies afhankelijk zijn van een gastheercel. Het aantal genen dat essentieel is voor deze bacteriën wordt geschat op ongeveer 300.⁷⁴

In het onderzoek op het gebied van minimale organismen worden verschillende strategieën toegepast, zoals sequentievergelijkingen tussen verwante soorten micro-organismen en geninactivatie of gendeleties om niet-essentiële genen te identificeren.³² Ook wordt gewerkt aan mathematische modellen om te voorspellen welke genen minimaal noodzakelijk zijn voor een cel om te kunnen functioneren onder laboratoriumomstandigheden. In 2012 werden de resultaten gepubliceerd van een computermodel voor een minimale cel met 241 essentiële genen. Het model is gebaseerd op de *E. coli* bacterie.⁷⁵

Mogelijkheden

Onderzoek naar de minimale cel is vooral gericht op de vraag welke genen essentieel zijn voor overleving. Het verwijderen van genen maakt het mogelijk om fundamentele processen in een organisme te bestuderen en vragen te beantwoorden als: wat zijn de functies van afzonderlijke genen en welke interacties bestaan er tussen de genproducten onderling? Wat zijn de minimale vereisten voor 'leven'? Voor dit onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van de parasitaire bacterie *M. genitalium* (zie kader: *Mycoplasma genitalium* minimaal genoom).

Mycoplasma genitalium minimaal genoom

Al geruime tijd wordt door verschillende onderzoeksgroepen intensief onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van de parasitaire bacterie *Mycoplasma genitalium* als minimale cel. Het genoom van de bacterie bestaat uit 582.970 bp en bevat 482 eiwit coderende genen (totaal 524 genen). Hoewel de bacterie als productieplatform minder geschikt is (door relatief trage groei en weinig robuust celmembraan (plasmamembraan)), is het door zijn kleine genoom een geschikt startpunt voor de zoektocht naar de minimale cel. Onderzoekers van het J. Craig Venter Instituut identificeerden zo'n 100 genen in het genoom van *M. genitalium* die hoogstwaarschijnlijk niet essentieel zijn. Een minimale *M. genitalium* zou daarmee theoretisch uit 381 genen bestaan. De afgelopen jaren is verder gewerkt aan computermodellen en simulaties om een minimale versie van *M. genitalium* verder uit te werken.⁷⁶ Onderzoekers van Stanford University en het J. Craig Venter Institute publiceerden in 2012 de resultaten van een succesvolle computersimulatie van de levenscyclus van de bacterie. In het model zijn achtentwintig categorieën moleculaire interacties ondergebracht, waaronder DNA, RNA, eiwitten en metaboliëten. De simulatie voor één celdeling kost zo'n 10 uur (ongeveer evenveel als de werkelijke celdeling van *M. genitalium*) en genereert een halve gigabyte aan data.⁵⁴

Naast onderzoek gericht op het ultieme minimale organisme wordt gewerkt aan minimale organismen die kunnen dienen als modelorganisme of 'chassis' voor het inbouwen van nieuwe functies. Opgemerkt moet worden dat een minimaal organisme niet per definitie tevens een ideaal modelorganisme is. Een modelorganisme moet in staat zijn tot een robuuste en efficiënte productie van een gewenst molecuul, terwijl een minimaal organisme enkel de essentiële genen bezit om te kunnen functioneren. Een modelorganisme kan fungeren als optimaal 'chassis' voor het 'inpluggen' van (gesynthetiseerde) genen en *metabolic pathways* voor de productie van hoogwaardige stoffen.⁷⁷ Als mogelijke gastheren voor een dergelijk 'chassis' of productieplatform worden bijvoorbeeld *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* of *Pseudomonas putida* genoemd.⁷⁸ Onderzoekers zijn er in geslaagd om zo'n 15 tot 30% van het genoom van *E. coli* te verwijderen (zie kader: *Escherichia coli* minimaal genoom).⁷⁹ Daarnaast wordt gewerkt aan een eukaryoot modelsysteem van synthetische gist *S. cerevisiae*.⁸⁰ In het *Synthetic yeast genome project 2.0* vervangen onderzoekers systematisch natuurlijke chromosomen door gesynthetiseerde genomen.^{81,80}

Escherichia coli minimaal genoom

De bacterie *Escherichia coli* (4640 kbp; 4434 genen) wordt gezien als een geschikte kandidaat voor een minimale cel die tevens als productiesysteem kan fungeren. *E. coli* wordt ook wel het werkpaard van de genetische modificatie genoemd omdat al lange tijd met dit organisme gewerkt wordt. De bacterie heeft een robuuste celwand, een efficiënte replicatie en een relatief eenvoudig celdelingsmechanisme. Bovendien bestaat er veel kennis over de functie van de afzonderlijke genen in het genoom van *E. coli*. In 2005 wisten Japanse onderzoekers een *E. coli* stam te creëren met slechts 70% van het oudergenoom.⁸² De resulterende bacterie vertoonde echter een afwijkende celmorfologie en een toename in verdubbelingstijd. Later slaagden Japanse onderzoekers erin om het *E. coli* genoom te reduceren met 22% van het totale genoom zonder significante effecten op de ontwikkeling van de bacterie.⁸³ In 2006 verwijderden onderzoekers uit Hongarije ruim 700 genen uit het *E. coli* genoom (ongeveer 15%).⁷⁹ De bacterie heeft een vergelijkbare groei en eiwitproductie als het wildtype. Daarnaast bleek het verwijderen van de genen zelfs enkele positieve effecten te hebben, zoals een lagere mutatiegraad, hoge electroporatie-efficiëntie en een betere genstabiliteit. Amerikaanse onderzoekers onderzochten de geschiktheid van één van de Hongaarse deletiemutanten als industrieel productieorganisme.⁸⁴ Zij concludeerden dat zowel de groeicurve als de productie van recombinante eiwitten van de deletiemutant weinig verschilde van de ouderstam. In 2008 maken Japanse onderzoekers een deletiemutant waarbij 1080 van de 4396 coderende regionen (~25%) werden verwijderd.⁸⁵ De resulterende cel (MGF-01) bleek onder laboratoriumomstandigheden langer door te groeien dan het wildtype en minder snel in een stationaire groeifase te belanden door de hoge celdichtheid.

Uitdagingen

Fundamenteel onderzoek naar de minimale cel is gericht op de vraag welke genen essentieel zijn voor overleving. Er bestaat echter geen consensus over de vraag of er universele essentiële genen zijn (dat wil zeggen genen die voorkomen in alle bekende bacteriën).⁸⁶ Onderzoek naar deze genen werd bijvoorbeeld gedaan door met behulp van *comparative genomics* te kijken naar gedeelde genen tussen soorten die mogelijk universeel konden zijn. Echter, hoe meer soorten vergeleken werden, hoe lager het aantal overeenkomsten.⁸⁷ Naast *M. genitalium* zijn diverse intracellulaire symbiotische bacteriën bekend met een nog kleiner genoom (bijvoorbeeld *Candidatus hodgkinia cicadicola*, 144 kbp, 188 genen) die zowel nieuwe inzichten bieden als vragen oproepen over de functie en werking van essentiële genen.⁸⁸ Deze bacteriën missen een deel van de genen nodig voor de celwandsynthese (en zijn daardoor afhankelijk van een gastheercel) of genen betrokken bij DNA reparatie. Deze meest kleine genomen bevatten wel genen die verantwoordelijk zijn voor replicatie, transcriptie en translatie.

Uit onderzoek blijkt dat relatief grote delen van het erfelijke materiaal verwijderd kunnen worden zonder dat dit onder laboratoriumomstandigheden aanwijsbare consequenties heeft voor de bacteriële cel. Anderzijds zijn er gevallen bekend waarbij een kleine wijziging of deletie gevolgen heeft voor de fitness en zelfs een puntmutatie fataal kan zijn. Veel fundamentele functies worden bovendien op verschillende manieren en door verschillende genen uitgevoerd in verschillende organismen terwijl bepaalde nagenoeg universele genen verwijderd kunnen worden zonder schijnbare fatale gevolgen.⁸⁹

2.4 PROTOCEL (BOTTOM-UP)

Cellen zijn de kleinste levende eenheden in de natuur. Het zijn ingewikkelde structuren bestaande uit miljoenen moleculen die met elkaar samenwerken om de cel te laten functioneren.⁹⁰ Een protocel is het meest eenvoudige kunstmatige chemische model van een dergelijke levende cel, opgebouwd uit organische en/of anorganische elementen die de functie van sommige maar niet noodzakelijk alle natuurlijke celcomponenten en moleculen nabootsen.⁹¹ Omdat deze cellen van de grond af worden opgebouwd, worden ze onder de *bottom-up* benadering van synthetische biologie geschaard.

Een ideaal protocel model bevat alle essentiële onderdelen om aan de minimale voorwaarden van een cellulaire levensvorm te voldoen. Een cel kan functioneel worden gedefinieerd als bestaande uit een aantal zelforganiserende subsystemen: een stofwisselingssysteem, een vorm van erfelijke informatie voor reproductie en een omhulsel dat het systeem bij elkaar houdt. Hierdoor zijn de cellen in staat om zichzelf te onderhouden, te groeien, te repliceren en te evolueren.^{92,93} Er is nog geen protocel ontwikkeld die voldoet aan al deze criteria. Protocellen worden voorts nog niet gedefinieerd als levende organismen, maar als chemische entiteiten.

Protocelmodellen worden opgebouwd door een membraan-achtige structuur te combineren met één of meerdere componenten die celfuncties nabootsen in een cytoplasma-achtige omgeving. De modellen kunnen bestaan uit diverse componenten zoals vetzuren (bijvoorbeeld fosfolipiden)⁹², organische onderdelen (DNA, RNA, polymerases)⁹⁴ of nanotechnologische componenten.⁹⁵ Natuurlijke membranen zijn eveneens opgebouwd uit fosfolipiden. Vetmoleculen kunnen zich spontaan tot celachtige bolletjes (micellen of liposomen) formeren wanneer zij in water opgelost worden.⁹⁶ Van dit mechanisme wordt veelvuldig gebruik gemaakt in de creatie van modellen voor het membraan van een protocel (zie kader: *Protocel modellen: celmembraan*).

Protocelmodellen: celmembraan

De membranen van protocelmodellen bestaan doorgaans uit een combinatie van hydrofobe en hydrofiele structuren die zich in een waterige vloeistof arrangeren als een membraan en bolletjes of primitieve 'cellen' vormen.⁹⁷ In protocelonderzoek gericht op het onderzoeken en nabootsen van het celmembraan wordt gewerkt aan zowel relatief eenvoudige modellen (micellen) met behulp van oliedruppels in vloeistof^{98,99} als aan meer complexe dubbele membraanstructuren (liposomen).¹⁰⁰ Liposomen vormen een dubbele membraanstructuur van hydrofiele en hydrofobe delen (bijvoorbeeld met behulp van fosfolipiden). Micellen bestaan uit een lipide *monolayer* met hydrofiele kop en een hydrofobe staart of kern (bijvoorbeeld een vetzuur). De vorming van nieuwe micellen kan geïnduceerd worden door veranderingen in pH¹⁰¹, samenstelling van de oplossing¹⁰², door het toepassen van elektrische velden¹⁰³ of door het vormen van covalente bindingen. Wanneer de protocel niet in staat is om nieuwe membraanstructuren te vormen bij deling, zal deze zich opdelen en steeds kleiner worden. Onderzoek op het gebied van vermeerdering of replicatie van protocellen richt zich op de synthese van nieuwe fosfolipiden binnen een liposoom met behulp van membraan enzymen. Voor de synthese van eiwitten wordt onder andere gebruik gemaakt van *in vitro* transcriptie en translatiesystemen (bijvoorbeeld PURE).^b

Naast onderzoek gericht op membraan-modellen, worden protocellen geconstrueerd gericht op het nabootsen van replicatie en evolutie.

^b *Protein synthesis Using Recombinant Elements* (PURE) is een commercieel verkrijgbaar systeem gebaseerd op geïsoleerde en gezuiverde componenten uit *E. coli* dat de minimale componenten bevat voor *in vitro* translatie van eiwitten.

Mogelijkheden

Protocelmodellen worden gebruikt voor het verkrijgen van kennis over de structuur, functie, dynamiek en evolutie van cellen.¹⁰⁴ Daarnaast worden protocellen genoemd als mogelijke platformcellen voor de productie van chemische componenten of voor de ontwikkeling van *drug delivery* systemen in de medische sector.^{105,106}

Er zijn wereldwijd diverse groepen die werken aan het maken van protocelmodellen vanuit verschillende disciplines (chemie, biotechnologie en nanowetenschappen). Wetenschappers zijn er in geslaagd om losse elementen van cellen na te bootsen of enkele elementen in een liposoom samen te brengen.^{100,107,108} Zo is het onder andere mogelijk gebleken om in een liposoom een klein enkelstrengs DNA molecuul te vermenigvuldigen met behulp van een polymerase en gelijktijdig de cel zelf te laten repliceren (zie kader: *Protocelmodellen: replicatie*),¹⁰⁹ om eiwitten tot expressie te brengen die in het lipidemembraan worden opgenomen en zo de opname van voedingsstoffen verbeteren¹¹⁰ en om een RNA sequentie te repliceren met behulp van eiwitten die in hetzelfde RNA molecuul gecodeerd staan.¹¹¹

Protocelmodellen: replicatie

In het najaar van 2011 publiceerde de onderzoeksgroep van Tadashi Sugawara (Japan) de resultaten van hun onderzoek naar de productie van een zelfreplicerende artificiële cel.¹¹² Het is de eerste deels artificiële cel die in staat is tot een vorm van replicatie waarbij zowel de informatiedragende component (DNA, RNA) als het membraancompartiment vermeerderd worden. Daarvoor waren alleen de afzonderlijke processen tot stand gebracht in protocelmodellen. De cel van de Japanse onderzoekers bestaat uit korte stukjes DNA die omringd zijn door een artificiële celwand bestaande uit fosfolipiden. Elk stukje DNA is geladen en wordt aangetrokken door de tegengesteld geladen (hydrofobe) fosfolipiden die het membraan vormen. Vervolgens wordt een PCR geïnitieerd waarmee extra kopieën van het DNA worden gegenereerd in de 'cel' die eveneens worden aangetrokken door de celwand. De replicatie van het DNA initieert tevens de vorming van extra fosfolipiden vanuit een aanwezige precursor waardoor zich dochtercellen vormen om het nieuwe DNA heen, die uiteindelijk loskoppelen van de 'moedercel'. Het resultaat is een identieke kopie van de oorspronkelijke cel. Opgemerkt moet worden dat er een verschil is tussen replicatie en reproductie. Replicatie is het maken van een exacte kopie of kloon, terwijl bij reproductie of voortplanting sprake is van evolutie en verandering van het resulterende organisme.

Uitdagingen

Ondanks de behaalde successen en recente ontwikkelingen is een daadwerkelijk autonome cel die beschikt over alle gewenste eigenschappen en functies nog niet ontwikkeld. In de vorige paragraaf over de minimale cel zijn al diverse uitdagingen

omschreven rondom het identificeren van essentiële genen. De ideale protocol moet ten opzichte van bestaande cellen minder complex en daardoor gemakkelijker aan te passen, te controleren en te onderhouden zijn.

Om effectief te kunnen functioneren, moet een protocol een effectief mechanisme voor celreproductie en een lage mutatiesnelheid hebben. Ook een robuuste celstructuur is van groot belang, vooral wanneer een protocol voor productiedoeleinden is bedoeld. De celwand/celmembraan moet in dat geval in staat zijn om te functioneren onder hoge celdichtheid en productiecondities kunnen weerstaan zonder dat cellysis of groeivertraging optreedt. Dit kan bijvoorbeeld bij de productie van alcoholen of hydrocarbonaten een probleem zijn. De celwand of celmembraan moet stevig zijn, maar daarnaast eveneens semipermeabel om de toe- en afvoer van stoffen te reguleren.¹¹³ Veel membraanmodellen hebben daarom overeenkomsten met 'natuurlijke' cellen, zoals de samenstelling, de grootte en de mogelijkheid om vormveranderingen (splitsen en samensmelten) te ondergaan.^{91,90} In 'natuurlijke' cellen zorgen functie-specifieke eiwitten onder andere voor transport van voedings- en afvalstoffen in en uit de cel. Artificiële lipidemembranen beschikken echter niet over de geavanceerde en variabele permeabiliteit van natuurlijke cellen. Hierdoor kwam een protocolmodel waarin DNA werd gerepliceerd tot stilstand toen de geïncorporeerde nucleïnezuren op waren.¹¹⁰ Andere systemen zijn in staat om te repliceren, maar delen daarbij de aanwezige moleculen op, zodat de dochtercellen steeds minder elementen bevatten ('*death by dilution*').¹¹⁴ Andere uitdagingen voor de ideale protocol als productieorganisme zijn onder andere de mogelijkheid tot meetbare en controleerbare interacties en een voorspelbare systeemkinetiek. Eerder genoemde computermodellen van cellen in dit rapport kunnen hier in de toekomst mogelijk een bijdrage aan leveren.^{54,75}

2.5 CHEMISCHE SYNTHETISCHE BIOLOGIE (XENOBIOLOGIE)

Dit subveld binnen de synthetische biologie richt zich op de chemische aanpassing van de bestaande genetische code door de chemische samenstelling van nucleïnezuren te veranderen of te vervangen.

Zoals bekend is, is het nucleïnezuur DNA (desoxyribonucleïnezuur) opgebouwd uit ketens van nucleotiden. Elk nucleotide bestaat uit een fosfaatgroep, een suikergroep en één van de vier basen Adenine (A), Thymin (T), Cytosine (C) of Guanine (G). Het DNA codeert voor de erfelijke eigenschappen door de unieke volgorde van deze nucleotiden. DNA is dubbelstrengs, waarbij de tegenover elkaar liggende ketens complementair zijn. Met behulp van RNA-polymerase wordt DNA herschreven naar RNA. RNA bestaat uit één keten van nucleotiden (enkelstrengs) en heeft de base Thymin vervangen door de gedemethyleerde vorm: Uracil (U). Bij de translatie lezen de ribosomen de basenvolgorde in het RNA af en vertalen dit naar een aminozuurvolgorde. Een keten van aminozuren vormt een peptide wat gevouwen wordt tot een eiwit met een

specifieke functie. De in de natuur voorkomende eiwitten hebben twintig verschillende aminozuren als basis. Een combinatie van drie basen (ook wel triplet of codon genoemd) codeert voor één aminozuur en meerdere tripletten kunnen coderen voor het zelfde aminozuur. Immers, de vier basen (ATGC of AUGC) in het DNA/RNA bieden 64 (4^3) mogelijkheden in codons van drie letters, die coderen voor de twintig verschillende aminozuren.

Het ontwikkelen van orthogonale biologische systemen wordt chemische synthetische biologie of kortweg xenobiologie genoemd. Een volledig orthogonaal systeem is gebaseerd op biochemische reacties die niet kunnen interfereren met het natuurlijke DNA systeem. Daarom worden deze systemen genoemd als ultieme bioveiligheidsmaatregel door sommige onderzoekers.^{115,116,117} Er zijn nog geen levende organismen gecreëerd die gebaseerd zijn op een alternatief genetisch alfabet. De tot nog toe ontwikkelde xenobiologische systemen zijn gedeeltelijk orthogonaal.

Er worden verschillende indelingen gemaakt van de ontwikkelingen binnen de xenobiologie. Er wordt bijvoorbeeld een onderscheid gemaakt tussen de ontwikkeling van alternatieve nucleïnezuren die nog wel herkend worden door natuurlijke DNA en RNA polymerases en nucleïnezuren die niet meer compatibel zijn met het bestaande systeem. Een andere indeling kan gemaakt worden op basis van het type verandering dat wordt aangebracht in het DNA:

- **Aanpassen van de DNA structuur en opbouw:** vorming xDNA (expanded DNA) en yDNA (wide DNA). Bijvoorbeeld door toevoegen van een extra benzeenring of fluorescentiemolecuul;¹¹⁸
- **Vervangen van de backbone:** vorming xeno-nucleïnezuren (XNA's); Bijvoorbeeld Glycol Nucleic Acid (GNA) of Threose Nucleic Acid (TNA);¹¹⁹
- **Uitbreiding van de codons:** Bijvoorbeeld vier basen (ATGC) naar zes basen (ATGCPZ);¹²⁰ Bijvoorbeeld codons van vier in plaats van drie basen.¹²¹

Deze mogelijkheden worden in onderstaande paragrafen nader toegelicht aan de hand van enkele voorbeelden.

Mogelijkheden

Het onderzoek is enerzijds gericht op het beantwoorden van fundamentele vragen (*Wat was het allereerste nucleïnezuur? Waarom zit er (desoxy)ribose in nucleïnezuren en niet glucose? Waarom bestaan er 20 aminozuren en niet 10 of 15?*).¹²² Anderzijds is het onderzoek gericht op het verkrijgen van artificiële systemen en de ontwikkeling van medische toepassingen, zoals eiwitten met unieke farmacologische eigenschappen (zie kader: *groeihormoon met onnatuurlijk aminozuur*).

Groeihormoon met onnatuurlijk aminozuur

Mensen die geen groeihormoon (hGH) aanmaken, worden behandeld met een recombinant groeihormoon. Dit hormoon is zeer klein en wordt daardoor snel uitgescheiden, waardoor er dagelijkse injecties nodig zijn. Een manier om de halfwaardetijd van het hormoon te verlengen, is door er polyethyleenglycol (PEG) aan te koppelen. Hierdoor is het molecuul te groot om direct door de nieren weggefilterd te worden. De koppeling van PEG met het hormoon is een complex chemisch proces. In 2011 zijn wetenschappers erin geslaagd om een onnatuurlijk aminozuur (p-acetylphenylalanine (pAcF)) dat goed aan PEG hecht in het groeihormoon te plaatsen, waardoor beide moleculen veel makkelijker aan elkaar gekoppeld kunnen worden.¹²³ Inmiddels zijn er klinische proeven met dit groeihormoon gedaan, waarbij patiënten slechts één keer in de week in plaats van dagelijks werden geïnjecteerd. De onderzoekers verwachten dat de technologie benut kan worden voor het ontwikkelen van nieuwe en het optimaliseren van bestaande geneesmiddelen.

Het meeste onderzoek op het gebied van xenobiologie is gericht op fundamentele vragen en bevinden zich nog in de experimentele fase. Hieronder komen een aantal ontwikkelingen van alternatieve samenstellingen van DNA aan bod: het modificeren van de suikergroepen van het DNA, het uitbreiden van de basen in het DNA en het inbouwen van 'onnatuurlijke' aminozuren.^{124,125}

Uitbreiding van het genetische alfabet: gemodificeerde suikergroepen (XNA's)

De ruggengraat of *backbone* van DNA bevat de suikergroep Desoxyribose (de D uit DNA). Bij RNA is dit de suikergroep ribose (de R uit RNA). XNA onderzoek richt zich op het vervangen van deze suikergroepen met andere componenten. De ontstane nucleïnezuren worden xenonucleïnezuren of XNA's genoemd. Met de X in XNA wordt de onnatuurlijke component aangeduid die de suikergroep vervangt. Voorbeelden zijn Glycerol Nucleic Acid (GNA), Threose Nucleic Acid (TNA), Peptide Nucleic Acid (PNA), Hexitol Nucleic Acid (HNA) en Cyclohexenyl Nucleic Acid (CNA).

De XNA moleculen bevatten nog wel de conventionele basenparen A, C, T en G en behouden daardoor de mogelijkheid om te paren met DNA en RNA. In 2011 werd voor het eerst aangetoond dat er polymerases waren die XNA konden omzetten naar DNA en weer terug naar XNA (zie kader: *Replicatie van XNA moleculen*).⁹⁴ XNA moleculen worden niet of moeilijk herkend door natuurlijke nucleasen (de enzymen die DNA en RNA afbreken). Deze moleculen bieden potentie om geneesmiddelen te ontwikkelen die minder snel afgebroken worden.

Replicatie van XNA moleculen

In 2012 zijn wetenschappers erin geslaagd om zes verschillende XNA moleculen te genereren vanuit een DNA template met behulp van gemuteerde polymerases.⁹⁴ Hiervoor werden XNA nucleotiden vermengd met duizenden DNA polymerases. Binnen deze mix van polymerases bleken sommigen in staat om XNA moleculen te synthetiseren op basis van de DNA template. Deze polymerases werden vervolgens gefilterd en gezuiverd. Tevens slaagden de wetenschappers erin om polymerases te creëren die XNA omzetten in DNA. Dit onderzoek toont aan dat het mogelijk is om genetische informatie op te slaan in onnatuurlijke nucleïnezuren en door te geven aan een volgende generatie via een XNA – DNA – XNA route. In dit systeem wordt XNA eerst omgezet in DNA. Vervolgens wordt het DNA vermenigvuldigd via PCR en weer omgezet in XNA. De volgende uitdaging is om op efficiënte wijze XNA moleculen te genereren zonder tussenkomst van DNA.

Uitbreiding van het genetische alfabet: extra basen (ATGCPZ)

Ander onderzoek is gericht op het uitbreiden van het genetische alfabet middels het inbouwen van nieuwe basen. De nucleïnezuren die hieruit voortkomen bevatten naast de conventionele basenparen A, C, T en G een extra basenpaar (bijvoorbeeld P en Z) (zie kader: *Onnatuurlijke basenparen*).¹²⁶

Onnatuurlijke basenparen

De conventionele basenparen A-T en C-G zijn aan elkaar gekoppeld door waterstofbruggen. Er is altijd gedacht dat deze verbindingen noodzakelijk waren voor efficiënte DNA replicatie. Echter, uit recent onderzoek blijkt dit niet het geval te zijn.¹²⁶ Wetenschappers zijn erin geslaagd een onnatuurlijk basenpaar te maken dat via hydrofobe krachten aan elkaar verbonden is. Onderzoeker Yang (V5) en zijn team publiceerden de resultaten van een onderzoek waarbij twee artificiële nucleotiden waren gemaakt die *in vitro* efficiënt konden worden gerepliceerd. De nieuwe code bestond uit zes bases (ATGCPZ) in plaats van de standaard vier (ATGC). Twee synthetische DNA nucleotiden (met basen P en Z) konden naast de standaard vier basen worden ingevoegd en gerepliceerd. Deze studie toont aan dat het nieuwe basenpaar bij *in vitro* experimenten functioneel equivalent is aan een natuurlijk basenpaar. In vervolgonderzoek willen Yang *et al* een *E. coli* stam modificeren die plasmiden met P-Z basen accepteert.

Inbouwen van onnatuurlijke aminozuren

Naast het aanpassen van de backbone van DNA (suikergroepen en basen), kan men het triplet codon uitbreiden en hiermee onnatuurlijke aminozuren (UAA's) in eiwitten

inbouwen.¹²⁷ Een codon is een serie van drie opeenvolgende basen (A, C, G of T voor DNA en A, C, G of U voor RNA), dat codeert voor één van de aminozuren waar eiwitten uit worden opgebouwd. Er bestaan 61 codons die coderen voor twintig verschillende aminozuren (sommige codons coderen voor hetzelfde aminozuur). Daarnaast zijn er drie stopcodons die het translatieproces beëindigen. Theoretisch is maar één stopcodon nodig en kunnen er 63 (64 minus één stopcodon) verschillende aminozuren gecreëerd worden door codon modificatie. Het aantal bekende natuurlijke eiwitsequenties is relatief klein (~6,5 miljoen) ten opzichte van het theoretische aantal mogelijke eiwitsequenties op basis van een gemiddelde lengte van 500 aminozuren voor een eiwit.¹¹⁶ Wetenschappers zijn erin geslaagd om ruim 40 nieuwe aminozuren te incorporeren in *E. coli*, gist en dierlijke cellen die normaliter niet in eiwitten voorkomen.^{128,129,130,131} Daarnaast is gebleken dat codons bestaande uit vier in plaats van drie basen functioneel kunnen zijn.¹²¹ Dit breidt de mogelijkheden voor nieuwe eiwitten uit. De introductie van onbekende aminozuren in eiwitten biedt volgens onderzoekers mogelijkheden voor bijvoorbeeld hyperstabiele en protease-bestendige eiwitten (proteases zijn enzymen die eiwitten afbreken).¹²³

Uitdagingen

XNA's zijn lastig te produceren in grote hoeveelheden en worden doorgaans niet gerepliceerd door natuurlijke polymerases. Voor het verkrijgen van een biologisch functioneel systeem dat gebaseerd is op onnatuurlijke nucleïnezuren is het van essentieel belang dat dit nucleïnezuur gelezen, geïnterpreteerd en vermenigvuldigd kan worden. Hier zijn polymerases voor nodig die de onnatuurlijke basen en/of suikergroepen kunnen herkennen en deze efficiënt kunnen inbouwen in opeenvolgende generaties. In 2011 werd voor het eerst onderzoek gepubliceerd waarbij gemodificeerde polymerases hiertoe *in vitro* in staat waren.⁹⁴ Een ander probleem met betrekking tot replicatie is dat bij pogingen om onnatuurlijke componenten in te bouwen in de natuurlijke code deze de neiging hebben terug te evolueren naar het oude systeem. Daarnaast moeten de bouwstenen voor onnatuurlijke nucleïnezuren (XNA's) beschikbaar zijn voor succesvolle replicatie. Hoewel het toepassen van alternatieve nucleotiden vooral gericht is op het beantwoorden van fundamentele vragen over het ontstaan van leven, roept dit subveld ook nieuwe vragen op. Een orthogonaal systeem dat niet kan interfereren met het natuurlijke DNA systeem wordt door enkele onderzoekers genoemd als ultieme bioveiligheidsmaatregel. Omdat er nog zoveel onbekend is over deze nieuwe systemen en hun functioneren, zal onderzoek gedaan moeten worden naar de consequenties voor levende systemen en het milieu (*Is een stabiele replicatie en functioneren van cellen met een (deels) orthogonaal systeem mogelijk?, (Hoe) evolueert het organisme of de cel?, Wat zijn mogelijke interacties met bestaande organismen en wat zijn de consequenties?*).



3

RISICOBEOORDELING SYNTHETISCHE BIOLOGIE

In 2008 verzocht de toenmalige minister van VROM, Jacqueline Cramer, de COGEM om aan te geven of de bestaande risicobeoordeling voor ggo's ook toepasbaar is op toekomstige synthetische organismen. In haar reactie concludeerde de COGEM des tijds dat toepassingen van de synthetische biologie beoordeeld kunnen worden met de (bestaande) wet- en regelgeving voor genetische modificatie, waarbij het voorzorgsprincipe volstaat. De veiligheidsmaatregelen (werk- en inperkingsvoorschriften) die gehanteerd worden voor ggo's en wildtype pathogenen zijn ook toepasbaar om synthetische organismen in te perken. De COGEM gaf aan dat de huidige risicoanalysemethodiek voor werkzaamheden met synthetische organismen de komende jaren nog voldoet. De verwachting was dat op korte termijn alleen werkzaamheden met biologisch ingeperkte en apathogene organismen zouden plaatsvinden. De COGEM signaleerde echter dat op langere termijn (ca. tien jaar) er mogelijk ontwikkelingen zijn waarvoor de huidige risicoanalyse niet meer volstaat.

De afgelopen jaren zijn er verschillende artikelen in de literatuur verschenen die vragen oproepen over de risicoanalyse en welke gegevens er nodig zijn om een risico-inschatting te kunnen maken.¹³² Op basis van de ontwikkelingen omschreven in hoofdstuk 2 en de resultaten van een expert meeting uit 2011, wordt in dit hoofdstuk onderzocht wanneer de huidige risicoanalyse mogelijk niet meer voldoet. Bij de verschillende subvelden van synthetische biologie spelen de volgende kernvragen steeds een rol:

- Kunnen de risico's ingeschat worden?
- Welke gegevens zijn nodig om een risico-inschatting te kunnen maken?
- Is het nemen van technische veiligheidsmaatregelen mogelijk om risico's te beheersen?



3.1 RISICOBEOORDELING GGO'S ALS UITGANGSPUNT

De ggo-regelgeving met de bijbehorende (milieu)risicoanalyse wordt gebruikt als uitgangspunt voor de risicobeoordeling van synthetische biologie. In de risicobeoordeling kunnen verschillende stappen onderscheiden worden waarbij de mogelijke gevaren en de kans van het optreden van het gevaar worden ingeschat (samen vormen zij het risico), evenals de mogelijkheden om het gevaar in te perken door specifieke maatregelen. De methodologie van de risicoanalyse bij ggo's bestaat over het algemeen uit

een weging van de combinatie van informatie over het ggo, eventuele gastheer(cellen) en de aard van de werkzaamheden. De volgende elementen spelen een sleutelrol in de milieurisicoanalyse:

Genetisch Gemodificeerd Organisme (GGO)

De benodigde informatie over het ggo bestaat uit informatie over de samenstellende componenten. Dit zijn:

- Het ontvangende organisme (acceptor-organisme, de *recipient* of gastheer);
- Het insert (het 'vreemde' DNA dat wordt ingebracht);
- De mogelijke vectorsequenties die gebruikt zijn om het insert in te brengen.

In de regel wordt gesteld dat wanneer het insert niet codeert voor een schadelijk genproduct, de werkzaamheden met het ggo onder hetzelfde inperkingsniveau kunnen plaatsvinden als waaronder werkzaamheden met het uitgangsgenorganisme (wildtype) worden uitgevoerd.

Recipient (ontvanger)

De recipiënt of ontvanger is het gastheerorganisme waarin het gen (of genen) geplaatst worden. Voor de risicobeoordeling is van belang te weten wat de eigenschappen van dit organisme zijn. Is het gastheerorganisme bijvoorbeeld pathogeen voor mens, dier of plant en in welke mate?

Organismen worden geclassificeerd naar mate van pathogeniteit. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Werkzaamheden met pathogenen zullen al naar gelang de indeling in pathogeniteitsklasse en afhankelijk van de aard van de werkzaamheden onder steeds hogere inperkingsmaatregelen plaatsvinden.

Insert (donor)

Het insert is het gen (of genen) die in het ontvangende organisme wordt (worden) gebracht. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen ongekaracteriseerde sequenties en gekarakteriseerde sequenties. Bij ongekaracteriseerde sequenties is informatie over de herkomst essentieel. Indien de herkomst (donororganisme) onbekend is, kan niet worden vastgesteld of er potentieel schadelijke sequenties overgedragen kunnen worden. In dat geval zal het problematisch zijn om een volledige risicoanalyse uit te voeren. Wanneer het donororganisme wel is gespecificeerd, blijft er een verschil bestaan tussen ongekaracteriseerde en gekarakteriseerde sequenties. Bij het gebruik van ongekaracteriseerde sequenties moet eerder aangenomen worden dat het om schadelijke sequenties gaat. Als uitgangspunt zal dan een *worstcase scenario* worden gehanteerd met de bijbehorende veilig-

heids- of inperkingsmaatregelen. Indien het insert een gekarakteriseerde sequentie betreft kan de sequentie op schadelijkheid beoordeeld worden. Voor een aantal van de schadelijke sequenties zijn duidelijke criteria te geven. Voor een toxine is dit bijvoorbeeld de bepaling van de LD50. Voor andere sequenties is dit minder duidelijk en zal op basis van een *expert opinion* bepaald worden of het gebruik van een bepaalde sequentie tot risico voor mens en milieu kan leiden en er strengere veiligheidsmaatregelen vereist zijn.

Vector

De vector is het systeem dat gebruikt wordt om het ggo te construeren. Dat wil zeggen om het insert in de ontvanger te krijgen. Vectoren kunnen bijvoorbeeld bestaan uit een stukje bacterieel DNA, plasmide, of een virus. Voor de milieurisicobeoordeling is het van belang dat de vector goed omschreven is en dat deze niet in staat is zelfstandig genetisch materiaal naar andere organismen over te dragen. In de beoordeling wordt gekeken of het insert de relevante eigenschappen van de vector (kan) verander(t)(en).

Referentie

De referentie of comparator is het organisme waarmee het ggo of het synthetische organisme vergeleken wordt. Dit is een belangrijk aspect in de uiteindelijke afweging in de milieurisicoanalyse omdat gekeken wordt of het nieuwe organisme meer, gelijkwaardige of minder risico's met zich meebrengt dan zijn natuurlijke referentie. In de *Guidance* documenten van de European Food Safety Authority (EFSA) wordt de positie van de comparator in de risicoanalyse onder meer als volgt omschreven: *"The overall Environmental Risk Assessment (ERA) strategy for genetically modified (GM) organisms seeks to deploy appropriate methods and approaches to compare the GM organism and by-products with their non-GM comparators and with other wild types with some history of familiarity in order to determine environmental effects."*

Aard van het gebruik

Eveneens essentieel voor de risicobeoordeling is de aard van het gebruik van het ggo. Er kunnen diverse werkzaamheden met ggo's worden onderscheiden en er kan in verschillende omgevingen gewerkt worden (bijvoorbeeld in het laboratorium, in kassen of in het open veld). De aard van de werkzaamheden kan leiden tot een andere inschatting of beheersingsmaatregelen. Speciale handelingen of grootschalige productie vragen om specifieke of aanvullende voorschriften. Hetzelfde geldt voor het gebruik in een laboratorium ten opzichte van toepassingen waarbij het nieuwe of aangepaste organisme in het milieu wordt gebracht.

3.2 EXPERTMEETING RISICOBEOORDELING SYNTHETISCHE BIOLOGIE

De COGEM heeft in 2011 in samenwerking met het Rathenau Instituut een expertmeeting georganiseerd om de vraagstukken rondom de risicobeoordeling van synthetische biologie nader onder de loep te nemen. Het doel van deze bijeenkomst was tweeledig. Ten eerste wilde de COGEM toetsen of haar conclusie uit 2008 (nog) correct was, namelijk dat de toepassingen van synthetische biologie op de korte termijn in het huidige beoordelingskader voor ggo's getoetst kunnen worden. Ten tweede wilde de COGEM meer specifiek aan kunnen geven waar in de toekomst problemen kunnen ontstaan met de risicobeoordeling van toepassingen in de synthetische biologie.

3.2.1 Opzet workshop

De bijeenkomst werd georganiseerd en voorgezeten door een externe moderator (Huib de Vriend, LIS Consult). Nederlandse deskundigen op het gebied van synthetische biologie en risicoanalyse en enkele medewerkers van de COGEM en het Rathenau Instituut namen deel aan de meeting (zie *bijlage lijst expertmeeting 29 juni 2011*). Tijdens de bijeenkomst werden zes cases besproken aan de hand van *factsheets* en onderliggende literatuur. De cases waren gekozen op basis van representatie van de aspecten die kenmerkend zijn voor de actuele ontwikkelingen op het gebied van de synthetische biologie:

1. *High-throughput* synthese van mutanten (MAGE)³⁵
2. *Metabolic pathway engineering*: productie biobutanol in *E.coli*^{133,134}
3. Minimaal genoom organisme¹³⁵
4. Xenobiologie^{136,116}
5. Optimalisering natuurlijke processen: fotosynthese in algen^{137,138}
6. Symbiose: zebravis met fotosynthesecapaciteit^{139,140}

De eerste vier casussen sluiten direct aan op de beschreven subvelden van synthetische biologie in hoofdstuk 2. Tijdens de workshop zijn twee casussen (nr. 5 en 6) meegenomen die zich niet één op één laten onderbrengen in de eerder genoemde subvelden. De productiviteitsverhoging van fotosynthese in algen ligt dicht tegen de toepassingen van genetische modificatie aan, en is daarmee realistisch voor het type onderzoek dat op dit moment plaatsvindt en waarvan wellicht op afzienbare termijn toepassingen te verwachten zijn in het milieu. De casus over de symbiose tussen een zebravis en een gg-cyanobacterie met fotosynthesecapaciteit is een opmerkelijke en enigszins futuristische toepassing. Gezien de mogelijke grote implicaties van deze casus is ervoor gekozen om deze eveneens mee te nemen in de workshop.

Protocellen werden in deze workshop niet behandeld, omdat het onderzoek ten tijde van de workshop voornamelijk gericht was op protocellen bestaande uit chemische, niet-replicerende onderdelen en daarmee minder relevant was voor de risicoanalyse.

Eind 2011 en in 2012 zijn er echter verschillende artikelen gepubliceerd op het gebied van semi-synthetische cellen die in staat zijn tot replicatie. Daarom wordt verderop in deze signalering alsnog op deze ontwikkeling ingegaan.

3.2.2 Resultaten workshop

Per casus is gediscussieerd over de vraag of een risicobeoordeling mogelijk is en welke data over het betreffende organisme hiervoor benodigd zijn. De algemene conclusie was dat het bestaande beoordelingskader voldoet zolang er sprake is van goed gekarakteriseerde gastheerorganismen als uitgangspunt.¹⁴¹ Dat is bij verschillende van de besproken cases (bijvoorbeeld 2 en 3) doorgaans het geval. In situaties waarin mogelijk met minder bekende organismen of genen gewerkt gaat worden, zoals in het geval van *high throughput synthese* of xenobiologie (casus 1 en 4), is een goede karakterisering van het gastheerorganisme een belangrijk aandachtspunt.

Opgemerkt werd dat de conclusie dat het huidige risicobeoordelingskader voldoet, veelal uitgaat van toepassingen betreffende ingeperkt gebruik (laboratoriumwerkzaamheden) waarbij diverse ingeperkingsmaatregelen mogelijk zijn. Wanneer sprake is van introductie in het milieu, zullen er nieuwe, meer complexe vragen rijzen betreffende het organisme en de interacties met het ontvangende ecosysteem. Bij meervoudige of minder doelgerichte grootschalige modificaties, evenals bij het gebruik van sequenties waarvan de referentie naar een bekend organisme ontbreekt, zullen interacties op systeemniveau een grotere uitdaging voor de risicobeoordeling gaan vormen. Met een toename van de mogelijkheden op het gebied van synthetische biologie zal echter de kennis op dit gebied toenemen en de risicoanalyse gefaciliteerd worden.

In twee van de besproken cases (3 en 6) is sprake van een situatie waarin het onderscheid tussen gastheer en donor problematisch kan worden in het kader van de risicobeoordeling. Het eerste geval betreft het tot stand brengen van een symbiose tussen zebrafisembryo's en gg-cyanobacteriën. Aan de hand van deze casus rees de vraag hoe moet worden omgegaan met toekomstige situaties waarin twee systemen op (radicaal) nieuwe manieren en in gemodificeerde vorm worden samengebracht. Hierbij werden andere mogelijkheden genoemd die, indien toegepast in soortgelijk onderzoek, een uitdaging kunnen vormen voor de milieurisicoanalyse, zoals het gebruik van endofyten^c voor het maken van nieuwe combinaties in planten of van endosymbionten^d in insecten. In het tweede geval ging het om het tot stand brengen van een minimaal genoomorganisme als 'chassis' voor het opbouwen van een organisme waarin een grote hoeveelheid nieuwe eigenschappen wordt ingebouwd (combinatie met

^c Symbiotische schimmel die in planten voorkomt en deze bijvoorbeeld beschermt tegen insectenvraat.

^d Organisme dat symbiotisch leeft in de cellen of in het lichaam van een gastheerorganisme.

metabolic pathway engineering). Dit roept de vraag op of het gastheerorganisme nog steeds leidend moet zijn voor de risicobeoordeling of dat de geïntroduceerde genen het uitgangspunt moeten vormen.

Opgemerkt moet worden dat de conclusie van de workshop inherent is aan de discussiëring van bestaande casussen. De risico's kunnen worden ingeschat, want het onderzoek wordt immers al uitgevoerd. Dit is een bewuste keuze geweest om 1) te verifiëren of de korte termijn ontwikkelingen nog in de pas lopen met de bestaande milieurisicobeoordelingsmethode en 2) de discussie zo concreet mogelijk te houden door deze te voeren op basis van bestaande en beschikbare data. Een extrapolatie van het huidige onderzoek heeft echter een aantal vragen naar voren gebracht omtrent de toekomstige risicobeoordeling. Op basis van deze vragen kunnen mogelijke knelpunten specifiek aangeduid worden.

3.3 TOEKOMSTIGE UITDAGINGEN RISICOBEOORDELING SYNTHETISCHE BIOLOGIE

Op basis van de geschetste recente ontwikkelingen in hoofdstuk 2 en de resultaten van de expertmeeting, wordt in deze paragraaf stilgestaan bij mogelijke toekomstige knelpunten in de risicoanalyse. Zoals toegelicht in de eerste paragraaf van dit hoofdstuk gaat de huidige milieurisicobeoordeling uit van een casusgewijze beoordeling en berust op een gastheer/donorsysteem waarbij beide (deels) bekend zijn. Het resulterende ggo wordt vergeleken met het wildtype gastheerorganisme.

Tot nu toe zijn de toepassingen van synthetische biologie goed te beoordelen met de bestaande milieurisicobeoordeling. Het recente onderzoek is indicatief voor toepassingen die in de toekomst verwacht kunnen worden. In deze paragraaf wordt een vooruitblik gegeven of en waar de risicoanalyse mogelijk in de problemen kan komen indien de huidige trends zich doorzetten. Als een risicoanalyse niet mogelijk is, leidt dit niet per definitie tot risico's voor mens en milieu, maar mogelijk wel tot een belemmering van de ontwikkeling van het wetenschapsveld synthetische biologie. De werkzaamheden zullen dan namelijk op het hoogste inperkingsniveau ingeschaald moeten worden. Dit betekent dat de experimenten onder tal van beperkingen en alleen tegen aanzienlijke kosten uitgevoerd kunnen worden.

3.3.1 De case-by-case benadering

Door een toename van de schaal waarop en de snelheid waarmee variaties van een organisme of organismen met nieuwe eigenschappen worden geproduceerd, kan het lastig worden deze binnen de bestaande regelgeving en wettelijke termijnen casusgewijs te beoordelen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn bij *high-throughput* synthese van mutanten (zie kader: *High-throughput synthese van mutanten (MAGE)*, hoofdstuk 2). In situaties waarbij variaties in één gen of in één beperkt functiegebied wor-

den gecreëerd hoeft dit geen probleem op te leveren omdat de risicoanalyse binnen een bepaalde marge kan worden uitgevoerd. Er is echter onderzoek bekend waarbij willekeurig grote hoeveelheden sequenties van planten, dieren, bacteriën, virussen en schimmels worden gebruikt in micro-organismen op zoek naar interessant materiaal.¹⁴² Een combinatie van schaalgrootte en onbekendheid van sequenties van meerdere donororganismen kan de casusgewijze beoordeling onder druk zetten wanneer vergunningbeoordelaars worden overspoeld met complexe aanvragen. Daarbij is het de vraag of het zowel mogelijk is om alle variaties te beoordelen en of het nodig is om alle interacties te onderzoeken.

3.3.2 Complexiteit interactie

Bij *metabolic pathway engineering*, waarbij meervoudige genen of metabole routes worden ingebouwd in een organisme, worden vragen over de interactie van de producten van deze genen zeer relevant. Een complicerende factor is een organisme dat meerdere genen van meerdere donoren tot expressie brengt. Wanneer de resulterende organismen bedoeld zijn voor introductie in het milieu, wordt de milieurisicobeoordeling in snel tempo meer complex. In geval van introductie in het milieu zijn meer parameters betrokken dan bij ingeperkt gebruik. Hoe meer er verandert in het organisme, hoe complexer het aantal mogelijke effecten op het milieu kan zijn. In geval van meervoudige modificaties gaat het niet alleen om de modificaties op zich, maar ook om de interactie tussen deze modificaties en de effecten daarvan op het organisme en het milieu of ecosysteem. Verwacht wordt dat de toenemende kennis over *metabolomics* in de toekomst een belangrijke rol zal gaan spelen bij het analyseren van deze interacties.

3.3.3 Grens donor/ontvanger

Een minimaal organisme kan enkel nog de meest essentiële fysiologische functies zelf uitvoeren en is voor alle andere functies afhankelijk van kunstmatige (laboratorium) omstandigheden. Vanuit veiligheidsoogpunt zal een minimaal organisme in principe een gering risico vormen en sterk biologisch ingeperkt zijn. Onderzoek bevestigt dat dit in het merendeel van de gevallen zo zal zijn. Er zijn echter resultaten bekend van minimale organismen die onder laboratoriumcondities voor specifieke eigenschappen (bijvoorbeeld groeisnelheid) efficiënter gingen functioneren na het verwijderen van genen (zie *kaders paragraaf 2.3*). Opgemerkt moet worden dat een dergelijk effect niet specifiek is voor synthetische biologie of genetische modificatie, noch heeft het per definitie een verhoogd risico tot gevolg. Wanneer de deleties een effect hebben op genen betrokken bij de pathogeniteit of virulentie, kan dit echter wel een aandachtspunt zijn in de risicoanalyse. Uit ander onderzoek is gebleken dat het verwijderen van specifieke genen (bijvoorbeeld avirulentiegenen bij plantpathogene schimmels) kan leiden tot een verhoogde pathogeniteit.¹⁴³ Een ander voorbeeld betreft de evolutie van het pathogene organisme *Yersinia pestis* (builenpest), waarbij deleties een belangrijke rol hebben gespeeld in de opkomende pathogeniteit.^{144,145}

Het onderzoek naar minimale organismen is onder andere gericht op het creëren van een modelorganisme of 'chassis' om als productieplatform te gebruiken. Doorgaans worden voor dit onderzoek organismen gekozen die in de laagste pathogeniteitsklasse zitten en waarbij het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is. Wanneer in een minimaal organisme meervoudige metabole routes worden ingebouwd, kan de risicobeoordeling complexer worden en kan op een gegeven moment de vraag worden gesteld of het uitgangsgenorganisme nog steeds als referentie kan worden genomen in de risicoanalyse.

3.3.4 Natuurlijke referentie

In de huidige milieurisicoanalyse wordt het ggo vergeleken met het uitgangs- of gastheerorganisme (de 'natuurlijke' *comparator*). De beoogde toepassingen van *metabolic pathway engineering* onderzoek liggen onder andere in de productie van biobrandstoffen in algen (in het milieu) of het detecteren en opruimen van milieuvuiling. Wanneer meervoudige nieuwe (niet in de natuur voorkomende) metabole routes in planten en micro-organismen worden gebouwd, kan het ontbreken van een *comparator* of referentieorganisme een knelpunt vormen in de risicoanalyse. Tenzij de aanvrager overtuigend kan aantonen op basis van experimentele data dat het nieuwe organisme geen nadelige eigenschappen heeft voor mens en milieu.

Het ontbreken van een natuurlijke referentie geldt eveneens voor toepassingen van xenobiologie, waarbij de samenstelling van nucleotiden wordt veranderd. Xenobiologie wordt in de literatuur genoemd als een mogelijk geschikte wijze van biologische inperking van synthetische organismen (*genetic firewall*). Hierbij lijkt er vanuit te worden gegaan dat er geen risico's kleven aan de toepassing zelf. Het meeste onderzoek op dit vlak vindt momenteel plaats onder ingeperkte omstandigheden in het laboratorium. Organismen die volledig gebaseerd zijn op een alternatieve vorm van DNA zijn nog niet bekend. Een eventuele toepassing in levende organismen of een introductie in het milieu kan echter nieuwe vragen oproepen in de milieurisicoanalyse. *Hoe kunnen de interacties met het milieu worden getest en welke gegevens moeten verzameld worden? Waarmee moeten de data vergeleken worden?* Door het uitbreiden van het aantal en het type biomoleculen zoals XNA's, zijn bestaande databases met allergenen en toxines mogelijk ontoereikend als vergelijking. Gesteld kan worden dat er nog zeer weinig bekend is over het functioneren van cellen op basis van andere nucleotiden en hun interactie met de omgeving. *Hoe kan worden onderzocht of de benodigde bouwstenen voor het orthogonale organisme niet in het milieu aanwezig zijn waardoor het organisme toch kan overleven? Is er een verhoogd risico op ongebreidelde verspreiding mogelijk juist wanneer er geen interactie is met andere 'natuurlijke' organismen (en daardoor geen biologische inperking)?*

Bij protocolmodellen geldt eveneens dat een natuurlijke referentie of gegevens over interactie met andere organismen of het milieu ontbreken. Een daadwerkelijke autonome protocol die in staat is tot groei, reproductie en evolutie is nog niet gemaakt en verwacht wordt dat dit nog vele jaren zal duren. De ontwikkelingen op het gebied van

protocellen worden pas interessant vanuit milieurisico-oogpunt wanneer er een dergelijke protocol ontwikkeld is.

3.3.5 Wet- en regelgeving: GGO of niet?

In Nederland is de ggo-regelgeving specifiek voor de productie van en handelingen met ggo's en niet voor het werken met wildtype pathogene organismen. In andere Europese landen vallen beide organismen onder dezelfde wet- en regelgeving. Bij een aantal subvelden van synthetische biologie (bijvoorbeeld protocellen en xenobiologie) kan de vraag gesteld worden of deze vallen onder de definitie van een ggo of genetisch materiaal. Zoals geschetst wordt er bij protocellen zowel gewerkt aan volledige synthetische cellen als aan semi-synthetische cellen die DNA bevatten. Dit roept de vraag op wanneer sprake is van een levend organisme en wanneer niet. Bij xenobiologie kan bijvoorbeeld de vraag zijn wat de status is van XNA/orthogonale systemen ten opzichte van conventionele nucleïnezuren (DNA, RNA) zoals omschreven in de ggo-regelgeving.

3.4 BENODIGDE DATA/GEGEVENS MILIEURISICOANALYSE SYNTHETISCHE BIOLOGIE

Naast een inventarisatie van mogelijke knelpunten die zich kunnen voordoen in de risicoanalyse van synthetische biologie, is er steeds de vraag welke informatie of kennis nodig is om deze knelpunten op te lossen of welke maatregelen er mogelijk zijn om de risico's te beheersen. Bij ingeperkt gebruik in laboratoria kunnen diverse maatregelen genomen worden om het organisme biologisch of fysiek in te perken. Bij het ontbreken van specifieke informatie kan bovendien uit voorzorg gekozen worden voor extra maatregelen. Opgemerkt moet worden dat deze voorzorgsmaatregelen een belemmering kunnen vormen voor het onderzoek en in principe niet wenselijk zijn. Wanneer een synthetisch organisme geïntroduceerd wordt in het milieu zijn de mogelijkheden tot inperking echter gelimiteerd. Daarom is het vooral bij deze toepassingen van belang om over voldoende gegevens te beschikken om een goede risicoanalyse te kunnen maken. In een recent verschenen artikel in *Nature* (*Dana GV et al. (2011)*) werd een eerste aanzet gegeven voor een aantal onderzoeksrichtingen die kunnen bijdragen aan het verzamelen van gegevens die benodigd zijn voor de risicoanalyse van synthetische biologie.

- Onderzoek naar de fysiologische verschillen van natuurlijke en synthetische organismen en de wijze waarop zij interactie hebben met hun omgeving. Hierbij kan bijvoorbeeld gekeken worden naar de mogelijke productie van nieuwe toxische stoffen of schadelijke metabolieten.
- Onderzoek naar de mogelijke veranderingen in habitat, voedselketens en biodiversiteit door de introductie (al dan niet doelbewust) van synthetische organismen in

het milieu. Verwacht wordt dat de eerste synthetische organismen die in het milieu gebracht worden, gericht zijn op bioremediatie. (Hoe) kunnen zij concurreren met reeds aanwezige organismen en wat is het effect?

- Synthetische organismen kunnen evolueren en zich aanpassen en hierdoor mogelijk nieuwe ecologische niches invullen. Het is daarom van belang te onderzoeken hoe gemakkelijk en hoe snel een synthetisch organisme en zijn genetische materiaal zich kunnen aanpassen aan de omgeving. Daarnaast moet worden onderzocht of het organisme kan persisteren, verspreiden of zijn gedrag kan aanpassen aan de natuurlijke omgeving.
- Tenslotte dient te worden onderzocht wat de mogelijkheden zijn voor genoverdracht van de synthetische organismen. Micro-organismen zijn in specifieke situaties in staat om genetisch materiaal onderling uit te wisselen of vrij DNA uit de omgeving op te nemen. Met de introductie van nieuw of andere vormen van DNA is het van belang gegevens te hebben over de mogelijke compatibiliteit met natuurlijke organismen of de aanwezigheid van vreemd DNA in het milieu. Meer inzicht in dit proces kan bijdragen aan de risicoanalyse.

Op basis van de analyse in dit hoofdstuk kan het belang van het identificeren van een referentieorganisme of een functie, waarmee het synthetische organisme of de cel kan worden vergeleken, worden toegevoegd. Indien deze niet beschikbaar is, kan het lastig zijn om een uiteindelijke afweging te maken van de eventuele risico's en te bepalen welke inperkende maatregelen nodig zijn om het onderzoek uit te kunnen voeren. Bij nieuwe ontwikkelingen in de synthetische biologie zal de nadruk vaker liggen op de gegevens die aanvragers zelf overleggen om aan te tonen dat de milieurisico's verwaarloosbaar klein zijn. Naast de bovengenoemde onderzoeksrichtingen en combinaties daarvan, kan het gaan om specifieke experimentele data gericht op het aantonen van biologische inperking of de ontwikkeling van nieuwe tools om biologische inperking te bereiken.



4

MAATSCHAPPELIJKE DISCUSSIE SYNTHETISCHE BIOLOGIE

In de jaren dat de COGEM zich bezighoudt met het monitoren van de ontwikkelingen binnen de synthetische biologie, heeft de maatschappelijke discussie over dit onderwerp zich verbreed. Hieronder een overzicht:

2006 De COGEM signaleerde in 2006 over synthetische biologie als nieuwe ontwikkeling in het werkveld van de biotechnologie. Gesignaleerd werd dat deze technologie vergelijkbare of zelfs sterkere maatschappelijke bezwaren zou kunnen oproepen dan die tegen genetische modificatie. Vragen over de toelaatbaarheid van het creëren van nieuwe levensvormen ('spelen voor God') en de fundamentele vraag wat 'leven' is, zouden naar verwachting bij synthetische biologie sterker een rol gaan spelen. Ook stelde de COGEM de vraag over mogelijk misbruik van de technologie aan de orde (bioterrorisme).

2008 Op verzoek van de toenmalige minister van VROM bracht de COGEM in 2008 de mogelijke ontwikkeling van het maatschappelijke debat rondom synthetische biologie in kaart. Dit deed zij vanuit het perspectief van de technologische hype, de fases van een ethische discussie en de beleidscyclus (zie *bijlage 3: Fasering ontwikkeling van technologie, maatschappelijke discussie en beleidsvorming*). Geconcludeerd werd dat de wereld op dat moment in de hype-fase zat waarin alles mogelijk leek met synthetische biologie. De maatschappelijke discussie was gericht op fundamentele vragen over de grenzen tussen mens en machine en de vraag wat leven is. Daarnaast begonnen er vragen op te komen over sociale verhoudingen, gezondheid en welzijn en keuzevrijheid. De COGEM gaf aan dat in deze fase actieve deelname of organisatie van maatschappelijk debat weinig zinvol is. Zij stelde voor de ontwikkelingen te monitoren en de belangrijkste discussiepunten verder te laten uitkristalliseren.

2012 Uit recente rapporten blijkt dat synthetische biologie anno 2012 nog steeds onderwerp van discussie is, al lijkt het onderwerp minder vaak in de populaire media terug te komen. Een aantal niet-gouvernementele organisaties (NGO's) blijft zich actief met het onderwerp bezighouden. Verschillende NGO's hebben in 2011 opgeroepen tot een moratorium.¹⁴⁶ De commercialisatie van synthetische biologie is volgens hen prematuur, omdat er nog teveel onbekend is over de werking en effecten. Zij roepen op tot specifieke regelgeving. Niet alleen NGO's maar ook het wetenschappelijke werkveld en overheidsinstanties buigen zich opnieuw over de vraag of de bestaande kaders voor regelgeving en toezicht nog steeds voldoen. Zo ook de COGEM. In dit hoofdstuk wordt

aandacht besteed aan de verbreding van de maatschappelijke discussie over synthetische biologie in de afgelopen jaren, het belang van communicatie en beeldvorming over synthetische biologie, en de status van initiatieven op het gebied van *Governance*.

4.1 VERBREDING DISCUSSIE SYNTHETISCHE BIOLOGIE

Initieel werden in de discussie rondom synthetische biologie vooral fundamentele vragen gesteld over wat leven is en in hoeverre men hiermee mag experimenteren. Daarnaast speelden vragen over veiligheid en bioterrorisme een voorname rol in de discussie. Er lijkt de afgelopen jaren een verbreding te zijn in de discussie rondom synthetische biologie. Anders dan de eerdere discussie over meer fundamentele vragen (*Wat is leven? Wat is het verschil tussen mens en machine? Speelt men voor God en mag dat?*) en vragen over de risico's, richt de discussie zich op bredere vraagstukken rondom rechtvaardigheid, duurzaamheid en keuzevrijheid. Het gaat niet alleen over risico's en voordelen, maar ook over bij wie de voordelen terecht komen, hoe de risico's beleefd worden en wie de risico's draagt. Terugkerende elementen zijn:

Rechtvaardigheid: het vervangen van natuurlijke grondstoffen door productie in synthetische organismen zou boeren in ontwikkelingslanden de kans ontnemen om een markt op te zetten of te behouden voor de conventionele teelt van deze producten.¹⁴⁶ Het gaat hierbij bijvoorbeeld om vanille, artemisinin, palmolie en natuurlijke rubber. In Bijlage 1 is een overzicht te vinden van de stoffen die mogelijk in de toekomst door synthetische organismen geproduceerd kunnen worden. Er moet worden opgemerkt dat dit argument deels een dubbel karakter heeft. Zo worden rubber en vanille al geruime tijd met andere methoden synthetisch geproduceerd en bestaan tegen de natuurlijke productie van palmolie kritische argumenten ten aanzien van duurzaamheid en het verdwijnen van biodiversiteit.

Duurzaamheid: speelt ook in positieve zin een rol in de discussie over synthetische biologie. Zo worden nieuwe organismen voorgesteld die goedkoper, efficiënter en minder milieubelastend stoffen kunnen produceren die van nut zijn voor de mens.

Keuzevrijheid: wanneer de productie van natuurlijke (plantaardige) grondstoffen wordt overgenomen door synthetische organismen, roept dit vragen op over de beoordeling en etikettering van deze stoffen in voedingsmiddelen en medicijnen.¹⁴⁸ In Europa geldt bijvoorbeeld dat stoffen die gemaakt worden door gg-micro-organismen, maar die geen delen meer van deze organismen bevatten, niet geëtiketteerd hoeven te worden. Dit geldt naar verwachting ook voor organismen die met behulp van synthetische biologie specifieke stoffen produceren. Synthetische biologie valt tot nog toe onder de regelgeving voor ggo's, maar wordt net als nanotechnologie door velen gezien als een 'nieuwe technologie' waardoor vragen over etikettering en keuzevrijheid opnieuw op tafel kunnen komen te liggen.

Risicobeleving: Naast de technisch wetenschappelijke risico's die beschreven zijn in hoofdstuk 3, kunnen risico's ook breder worden opgevat. Het gaat om zogeheten *soft impacts* van technologische innovatie.¹⁴⁹ Dit zijn bijvoorbeeld veranderingen die op individueel of sociaal niveau worden ervaren wanneer consumenten te maken krijgen met producten van synthetische biologie. Op dit moment zijn er nog weinig tot geen commerciële producten van synthetische biologie op de markt. Om vat te krijgen op die risico's, is het belangrijk om te zijner tijd de interactie te bestuderen die nieuwe technieken aangaan met de sociale omgeving waarvoor ze zijn bedoeld. Dit is van belang omdat het succes van synthetische biologie mede afhankelijk is van de acceptatie door het publiek. Hoe worden de eventuele risico's van een nieuwe technologie ervaren en geldt dit voor de technologie zelf of is dit afhankelijk van de toepassing? De risicobeleving van de toepassing van synthetische biologie voor biobrandstoffen zal waarschijnlijk anders zijn dan bij de toepassing van synthetische biologie in vaccins of voedsel. Ook de bestaande discussies over deze onderwerpen kunnen hierbij een rol spelen, zoals de houding van mensen ten opzichte van een nationaal vaccinatieprogramma.

Instrumentalisering: door de combinatie van verschillende kennisgebieden zoals bio(techno)logie, chemie, ICT en robotica kunnen conceptuele grenzen worden overschreden. Waar in de biotechnologie voorheen de focus lag op het nabootsen en combineren van natuurlijke systemen, verschuift deze nu naar de functie van een object of organisme waarbij een grote diversiteit aan kennisvelden wordt in gezet. De nadruk komt meer te liggen op het design- en engineering-aspect. Dit is kenmerkend voor synthetische biologie. Door de ontwikkelingen op het gebied van bijvoorbeeld protocellen of de combinatie van biotechnologie en nanotechnologie kunnen de grenzen tussen organisme en machine of tussen leven en niet-leven vervagen. De ontwikkelingen in de synthetische biologie roepen zowel concrete als fundamentele vragen op die niet specifiek zijn voor synthetische biologie of genetische modificatie. Waar voorheen vragen werden gesteld over het 'spelen voor god' en het 'creëren' van nieuw leven, worden nu ook vanuit niet-religieuze hoek vragen geformuleerd die betrekking hebben op instrumentalisering en de morele status van 'nieuwe' organismen of objecten die bijvoorbeeld een combinatie zijn van levend en niet levend materiaal (zie *kader paragraaf 4.2*). Uit de bovenstaande voorbeelden blijkt dat de vragen en discussiepunten rondom de ontwikkelingen en toepassingen van synthetische biologie de afgelopen jaren, zoals verwacht, concreter zijn geworden en verder zijn uitgekristalliseerd.

4.2 COMMUNICATIE & FRAMING

In de media werd en wordt aandacht besteed aan synthetische biologie waarbij meer dan eens krachtige en tot de verbeelding sprekende titels worden gebruikt om de aandacht van de lezer te trekken. De elementen creatie (*playing god*), knutselen/speel-

sheid, kunstmatigheid en hybride levensvormen (organisch/anorganisch) zijn hierin terugkerende thema's:

- **'Playing God' is vital if we are to create a better future for all** (The Guardian, 27 juli 2012)
- **'Robo-mosquitoes' in Margaritaville** (Miami Herald, 13 augustus 2012)
- **Enzymes grow artificial DNA** (Nature, 19 april 2012)
- **Synthetic biology: genetic engineering on steroids** (TechCentral, 16 maart 2012)
- **Synthetic biology and the rise of the 'spider-goats'** (The guardian, 14 januari 2012)
- **Life's code rewritten in four letter words** (NewScientist, 17 februari 2010)
- **What to make with DNA origami?** (Nature, 10 maart 2010)

Hoewel veel lezers inderdaad aangetrokken worden door de spannende titels, kan deze vorm van *framing* nadelen hebben in de communicatie. *Framing* is het herformuleren van een onderwerp of ontwikkeling om deze begrijpelijk te maken voor de (geïnteresseerde) leek en burger. Het is daarmee een essentieel onderdeel van veel communicatie over ingewikkelde onderwerpen. Het type *frame* of kader dat bewust of onbewust gekozen wordt, kan grote invloed hebben op de reactie van het bredere publiek en de indruk die bij hen wordt achtergelaten over een bepaalde technologie of ontwikkeling. Een voorbeeld:

Kunstmatige kwal van rattenhartcellen

In juli 2012 publiceerden onderzoekers van het California Institute of Technology (VS) de resultaten van een onderzoek waarbij dierlijke cellen waren gebruikt in een synthetische mal om een pulserend systeem te creëren onder invloed van een elektrisch veld.¹⁵⁰ Een siliconen mal in de vorm van een kwal werd bekleed met hartcellen van een rat en in een vloeistof geplaatst. De onderzoekers noemden de semi-synthetische objecten '*medusoids*'. Wanneer de *medusoids* in een elektrisch veld worden geplaatst kunnen deze zich als een kwal voortbewegen in twee slagen. In de eerste slag trekken de spiercellen zich samen waarmee de *medusoid* de karakteristieke klokvorm krijgt zoals die bij kwallen te zien is. In de tweede slag ontspannen de spiercellen geleidelijk en krijgt de *medusoid* zijn oorspronkelijke vorm terug.

De aanpak van de onderzoekers betreft een vorm van *reverse bioengineering* waarbij wordt uitgegaan van de vorm en functie van een organisch onderdeel in plaats van het nabootsen van een bestaand systeem. Het onderzoek is een *proof of concept* waarbij verschillende disciplines werden ingezet zoals design & architectuur, robotica, computermodellen, chemie en biotechnologie. De beoogde toepassing van dit baanbrekende onderzoek is het testen van medicijnen, zoals hartmedicatie.

In de media werd, mede dankzij de *framing* van de onderzoekers zelf ("**We Took a Rat Apart and Rebuilt It as a Jellyfish**" (The Atlantic, 22 juli 2012)), vooral de creatie van een levend wezen en het hybride aspect van de *medusoid* benadrukt. De media-aandacht die hierdoor ont- >

stond heeft echter ook tot gevolg dat vooral, en eigenlijk onterecht, het creatie-aspect van deze doorbraak onthouden werd, in plaats van dat men de werkelijke implicaties en het doel van het onderzoek begrijpt, zoals het testen van hartmedicatie en een vermindering van gebruik van proefdieren. De beeldvorming kan een negatieve lading krijgen van de 'gestoorde onderzoeker' die bizarre experimenten doet in het lab zoals het creëren van monsters.

Framing kan zowel bewust als onbewust worden ingezet en is bijna onvermijdelijk: vrijwel iedere uitspraak kent wel een zeker frame (denkraam) van veronderstellingen. Het is van belang dat onderzoekers zich hiervan bewust zijn in hun communicatie naar buiten alvorens zij hun wetenschappelijke onderzoeksresultaten populariseren. Het *framen* van een technologie als revolutionair en spectaculair creëert niet alleen media-aandacht, maar kan ook leiden tot disproportionele reacties en maatregelen op het vlak van sociale en ethische reflectie en regelgeving. Dit effect kan versterkt worden bij onderwerpen die door delen van de maatschappij als controversieel ervaren worden. Hypes en overdreven claims kunnen volgens sommige onderzoekers contraproductief zijn voor het ontwikkelen van een ethisch verantwoorde regelgeving waar de betrokken *stakeholders* nu en in de toekomst mee uit de voeten kunnen.⁴ Nauwkeurigheid in informatievoorziening is en blijft daarmee een van de belangrijke aandachtspunten bij alle onderzoek en dus ook bij synthetische biologie.

4.3 GOVERNANCE & BEHEERSING TECHNOLOGIE

De afgelopen jaren zijn er zowel op EU als internationaal niveau bijeenkomsten georganiseerd met als doel de ontwikkeling en inbedding van synthetische biologie te structureren en te komen tot een verantwoorde manier van *governance*.¹⁵² Dit heeft tot vele publicaties geleid waarin wordt gezocht naar een manier om effectief om te gaan met voortschrijdende technologie, kennis en inzicht.^{153,155,154} De afgelopen 7 jaar zijn er zo'n 40 rapporten wereldwijd gepubliceerd over *governance* van synthetische biologie.¹⁵⁵ Ook de COGEM heeft hier enkele jaren geleden in een onderzoeksrapport aandacht aan besteed.¹⁵⁶ Door een vroegtijdige signalering vanuit het wetenschappelijke veld en betrokken instanties zijn de afgelopen jaren activiteiten ontplooid om de bioveiligheid van synthetische biologie te monitoren.^{157,158} Enkele Europese voorbeelden van organisaties die de afgelopen jaren rapporten over de bioveiligheid, ethiek en *governance* van synthetische biologie hebben uitgebracht:

- 2012 Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, Biosafety and Biotechnology Unit (ISP-WIV)
- 2012 Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS)
- 2010 The European Academies of Science Advisory Council (EASAC)

- 2010 Schweizerischen Akademie der Technischen Wissenschaften (SATW)
- 2009 The European Group on Ethics and New Technologies (EGE)
- 2009 Royal Academy of Engineering (UK)
- 2009 Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Deutsche Akademie der Technikwissenschaften, Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften
- 2008 Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (KNAW), Gezondheidsraad (GR) en Raad voor Gezondheid Onderzoek (RGO)

Een pasklaar antwoord op vragen over hoe *governance* georganiseerd moet worden, wie daarin welke verantwoordelijkheid heeft en wanneer regelgeving moet worden aangepast of beperkingen moeten worden opgelegd, blijkt echter moeilijk te geven. Duidelijk is dat een integrale aanpak van convergerende technologieën als synthetische biologie gewenst is. De ontwikkeling, introductie en inbedding van een nieuwe technologie als synthetische biologie is een interactief en deels onvoorspelbaar proces dat wellicht alleen stap voor stap bekeken kan worden. Naast het voorzorgsprincipe wordt het belang van de volgende sleutelementen genoemd bij *governance* van synthetische biologie:

- Proportionaliteit (de balans tussen risico's en voordelen voor de maatschappij);
- *Distributive justice* (de verdeling van voordelen en de lasten van nadelige effecten);
- Procedurele rechtvaardigheid (diegenen die voordelen danwel nadelen kunnen ondervinden van de technologie moeten betrokken worden bij het besluitvormingsproces).^{159,160}

De maatschappelijke discussie over synthetische biologie heeft zich in de afgelopen jaren verbreed en verder uitgekristalliseerd naar meer concrete vraagstukken. Deze verbreding kan echter tot (te) grote divergentie leiden in de discussie waardoor specifieke aspecten ondergesneeuwd raken of onderbelicht blijven. De *framing* en popularisering van wetenschapsresultaten in de populaire media spelen een belangrijke rol in de beeldvorming van het publiek, maar kan afleiden van de werkelijke ontwikkelingen en implicaties daarvan. Nauwkeurigheid en duidelijkheid omtrent de ontwikkelingen en toepassingen in de synthetische biologie zijn van groot belang om meer richting te geven aan een verantwoorde manier van *governance*.



5

CONCLUSIE & DISCUSSIE

In de eerste signalering van de COGEM over synthetische biologie (2006) werden een aantal vragen gesteld over de wijze waarop het gebied van synthetische biologie zich zou kunnen ontwikkelen en welke vraagstukken op het gebied van bioveiligheid en ethiek daarbij zouden komen kijken. In 2008 formuleerde de toenmalige minister van VROM een aantal soortgelijke vragen aan de COGEM. Hoewel een deel van deze vragen destijds is beantwoord, gaf de COGEM aan dat een exact antwoord op sommige vragen nog niet te geven is, omdat niet te voorzien is hoe bepaalde ontwikkelingen zullen verlopen. Tijdens de expertmeeting die de COGEM in 2011 organiseerde in samenwerking met het Rathenau instituut, zijn een aantal van deze vragen opnieuw gesteld. Op basis van de resultaten van de workshop en de inventarisatie van de laatste ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie wordt in deze conclusie een resumé van de belangrijkste vragen besproken en waar mogelijk nader beantwoord.

Wat is synthetische biologie?

Al vanaf het moment dat de term synthetische biologie werd toegekend aan specifieke subvelden van onderzoek, bestaat er discussie over de precieze definitie van deze technologie. Wat is synthetische biologie en welke technieken en toepassingen vallen hieronder? Op dit moment is er nog steeds geen eenduidige definitie. Dit hangt wellicht samen met een andere ontwikkeling. Waar enkele jaren geleden ineens grote groepen wetenschappers hun werk onder de synthetische biologie schaalden, lijkt hier nu een trend in te zien die de andere kant op gaat. Opvallend is namelijk dat veel onderzoekers hun werk tegenwoordig niet meer onder de synthetische biologie scharen. Eerder worden de specifieke subvelden genoemd zoals *metabolic engineering* of protocol onderzoek. Dit kan ertoe bijdragen dat de ontwikkelingen op dit gebied zich onttrekken aan het oog van het bredere publiek tot het moment dat de toepassingen op de markt gaan verschijnen.



5.1 ONTWIKKELINGEN

Welke ontwikkelingen komen er op ons af op het gebied van synthetische biologie en op welke termijn zullen deze ontwikkelingen naar verwachting gaan spelen?

De ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie hebben de afgelopen vier jaar een grote sprong gemaakt. Enkele belangrijke doorbraken waren:

- De eerste 'synthetische' cel (2010);
- De creatie van een replicerende semi-synthetische protocol (2011);
- De creatie van een alternatief genetisch alfabet (xenobiologie) dat in staat is tot *in vitro* replicatie (2011);
- De introductie van meer complexe *pathways* in organismen (2008 -2012);
- De eerste toepassingen bereiken de markt (bijvoorbeeld bioplastic Sorona, zie hoofdstuk 2).

Ondanks een aantal recente doorbraken op het gebied van xenobiologie en protocellen wordt verwacht dat daadwerkelijke toepassingen nog vele jaren op zich zullen laten wachten. De geschetste ontwikkelingen van de afgelopen vier jaar zijn in lijn met hetgeen verwacht werd ten tijde van de laatste signalering (2008) van de COGEM over dit onderwerp. De hype-fase lijkt af te zwakken, nu blijkt dat veel concrete toepassingen op de (consumenten)markt minder binnen bereik liggen dan eerder gedacht. Dit heeft onder meer te maken met de uitdagingen die geschetst zijn in hoofdstuk 2. Terwijl de wetenschappelijke ontwikkelingen gestaag doorgaan, is tevens een fase aangebroken waarbij de aandacht voor synthetische biologie in de populaire media wat afneemt.

5.2 RISICOBEOORDELING

Waar doen zich knelpunten voor bij het hanteren van de huidige methodiek van risico-analyse voor ggo's?

Uit de expertmeeting die de COGEM samen met het Rathenau Instituut organiseerde in 2011 blijkt, dat de huidige risicoanalysemethodiek nog voldoet voor het onderzoek dat plaatsvindt in het veld van synthetische biologie. Deze conclusie is in lijn met diverse andere rapporten die de afgelopen jaren zijn gepubliceerd door zusterorganisaties van de COGEM in andere Europese landen (zie paragraaf 4.3). Door de recente ontwikkelingen te monitoren, wordt beter mogelijk om meer specifiek aan te wijzen waar zich in de toekomst mogelijke knelpunten kunnen gaan voordoen indien de huidige trends en onderzoek doorzetten. Hierbij moet gedacht worden aan:

- Vervagen grens donor / ontvanger (*metabolic pathway engineering* / minimaal genoom);
- Ontbreken natuurlijke referentie ((*metabolic pathway engineering* / xenobiologie/ protocol);
- Karakterisering insert, sequenties ((*metabolic pathway engineering*);
- Bemoeilijking casuswijze beoordeling door schaalgrootte en snelheid (*high-throughput*).

Daarnaast kunnen er een aantal vragen gaan spelen die betrekking hebben op de toepasbaarheid van de bestaande regelgeving. Zijn de resulterende cellen of organismen die voortkomen uit synthetische biologie altijd een ggo? Vallen producten die van of door (gedeeltelijk) synthetische organismen worden geproduceerd onder de bestaande regelgeving (bijvoorbeeld voor etikettering)? Het gaat hier bijvoorbeeld over de productie van voedsel, brandstoffen, en geur- en smaakstoffen. Maar ook de productie van traditionele medicinale plantenextracten (bijvoorbeeld artemisinine).¹⁶¹

Welke kennis is nodig om die knelpunten op te lossen?

In hoofdstuk 3.4 is een eerste aanzet gegeven voor een aantal onderzoeksrichtingen die kunnen bijdragen aan het verzamelen van gegevens die benodigd zijn voor de risicoanalyse van synthetische biologie:

- Onderzoek naar de fysiologische verschillen van natuurlijke en synthetische organismen en de wijze waarop zij interactie hebben met hun omgeving;
- Onderzoek naar de mogelijke veranderingen in habitat, voedselketens en biodiversiteit door de introductie (al dan niet doelbewust) van synthetische organismen in het milieu;
- Onderzoeken naar de mogelijkheden van (deels) synthetische organismen om zich aan te passen aan de omgeving (persistentie, verspreiding en gedrag);
- Onderzoek naar de mogelijkheden voor genoverdracht van de synthetische organismen.

Ook het identificeren van een referentieorganisme of een functie, waarmee het synthetische organisme of de cel kan worden vergeleken is van belang voor het uitvoeren van een risicoanalyse. Bij nieuwe ontwikkelingen in de synthetische biologie zal de nadruk vaker liggen op de gegevens die aanvragers zelf overleggen om aan te tonen dat de milieurisico's verwaarloosbaar klein zijn. Naast de bovengenoemde onderzoeksrichtingen en combinaties daarvan kan het gaan om specifieke experimentele data gericht op het aantonen van biologische inperking of de ontwikkeling van nieuwe tools om biologische inperking te bereiken.

5.3 RISICOMANAGEMENT

Zijn er praktische en werkbare beheersingsmaatregelen voor deze knelpunten te bedenken?

De bestaande maatregelen die gelden bij ggo's zijn tevens toepasbaar bij de beoordeling van de in dit rapport omschreven ontwikkelingen op het gebied van synthetische biologie. Bijvoorbeeld:

- Passende inschaling;
- Biologische en fysieke inperkingsmaatregelen;
- Terughoudendheid met introductie in het milieu.

Dat wil zeggen dat er een passend veiligheidsniveau moet worden gekozen en wanneer er onzekerheid is over de specifieke risico's het voorzorgsprincipe zou moeten gelden. Om de risico's te beheersen, kan eveneens gekeken worden naar biologische en fysieke inperkingsmaatregelen. De COGEM signaleert dat sommige onderzoekers die werkzaam zijn op het gebied van synthetische biologie een alternatief alfabet voor DNA/RNA (xenobiologie) zien als de ideale biologische inperkingsmethode. Omdat er nog weinig informatie voorhanden is over deze alternatieve bouwstenen en de wijze waarop zij zich zullen gedragen in het milieu, zal deze toepassing als inperkingsmethode met voorzichtigheid tegemoet moeten worden getreden.


De COGEM signaleerde dat door de toename van schaalgrootte en snelheid de casuswijze beoordeling van vergunningaanvragen in de knel kan komen. In dit kader wijst de COGEM op het belang om de internationale ontwikkelingen in de gaten te houden en bij andere landen en organisaties te kijken hoe zij hiermee omgaan.

5.4 BELEID

Welke noodzaak en mogelijkheden zijn er om in de toekomst dit beleidsveld structureel in de gaten te houden?

Tot zover gaan de ontwikkelingen rondom synthetische biologie gelijk op met de ontwikkeling van kennis. Omdat synthetische biologie een verbinding vormt tussen een aantal moderne technologieën (chemie, informatica en bio(techno)logie en tot nieuwe toepassingen zal gaan leiden in de toekomst, blijft het van belang de ontwikkelingen te monitoren om tijdig te (h)erkennen waar zich mogelijke problemen kunnen voordoen in de milieurisicoanalyse.

Het op de hoogte blijven van internationale ontwikkelingen speelt hierbij een belangrijke rol. Een aantal Europese adviesorganen (De Franse *Haut Conseil des Biotechnologies* (HCB), de Belgische *Biosafety and Biotechnology Unit* (SBB) en de Duitse *Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit* (ZKBS)) heeft samen met de COGEM een netwerk opgezet om binnen en waar mogelijk buiten Europa een vinger aan de pols te houden. De genoemde aspecten in paragraaf 3.3 die in de toekomst de milieurisicoanalyse zouden kunnen bemoeilijken, kwamen onder andere aan de orde bij de Europese workshop die in december 2012 georganiseerd is in samenwerking met deze



organisaties. Een verslag van deze bijeenkomst volgt begin 2013. Tijdens de Nederlandse expertmeeting in 2011 is daarnaast opgemerkt dat een goede wisselwerking tussen onderzoekers en risicobeoordelaars van belang is. Onderzoekers moeten bij vergunningaanvragen de benodigde data aanleveren voor het uitvoeren van de risicoanalyse. Dit roept de vraag op in hoeverre onderzoekers in het veld in staat zijn om van te voren in te schatten welke informatie risicobeoordelaars nodig hebben bij nieuwe ontwikkelingen en vraagt om een goede wisselwerking en dialoog tussen beide groepen. Juist naarmate de ontwikkelingen complexer worden zullen dit soort leerprocessen (en de organisatie daarvan) voor de toekomst een belangrijk punt van aandacht zijn.

Risicobeoordelaars en vergunningverleners moeten hierbij tijdig aan geven welke typen van gegevens aangeleverd moeten worden om een milieurisicoanalyse te kunnen uitvoeren. In relatie tot de drie eerder genoemde knelpunten kunnen risicobeoordelaars bij het ontbreken van een referentieorganisme meer expliciet maken welke informatie en eigenschappen van een nieuw organisme benodigd zijn voor de risicoanalyse. Het spanningsveld tussen praktische hanteerbaarheid van de veiligheidsmaatregelen bij onderzoek en het veilig werken met genetische modificatie vraagt daarbij mogelijk om een intensiever contact tussen vergunningverleners, risicobeoordelaars en aanvragers of onderzoekers.

De overheid kan een faciliterende rol spelen in deze processen door aandacht te besteden aan de risicoanalysemethodiek bij het opstellen van onderzoeksprogramma's.

Daarnaast is een mogelijk administratief knelpunt gesignaleerd door een toename van de schaalgrootte en snelheid van de ontwikkelingen. Hierdoor kan de casusgewijze beoordeling zoals deze nu wordt gehanteerd in de knel komen. Door nader onderzoek, bijvoorbeeld door te kijken hoe andere Europese of internationale vergunningverleners hiermee omgaan, kunnen mogelijk ideeën en oplossingen worden opgedaan om de administratieve last van de casusgewijze benadering te beperken.





VERKLARENDE WOORDENLIJST

Biobricks

Biobricks zijn gestandaardiseerde en uitwisselbare DNA sequenties met een gedefinieerde structuur en functie. Deze DNA onderdelen zijn ontworpen om toegepast te worden in levende cellen zoals bacteriën om een specifieke functie te bewerkstelligen (een biologisch systeem).

Biologische inperking

Eigenschappen van een organisme die er voor zorgen dat de overleving en de verspreiding van dat organisme in het milieu beperkt wordt. Hiertoe behoren ook de eigenschappen van een gastheer/vectorsysteem, welke de overdracht van de vector beperken.

Chassis / minimaal genoom organisme

Het minimaal genoom organisme is een modelorganisme dat alleen nog over de meest essentiële genen voor overleving beschikt om te kunnen functioneren onder laboratoriumomstandigheden. Onderzoek op dit gebied is zowel gericht op fundamentele vragen over het ontstaan van leven als op de ontwikkeling van een ideaal productieorganisme. Een minimaal genoom organisme dat is bedoeld als productieorganisme wordt ook wel een 'chassis-genoom' genoemd dat kan worden uitgebreid met extra genen om een specifieke functie te vervullen.

Donororganisme

Organisme waaruit de in een gastheerorganisme te brengen genetische informatie oorspronkelijk afkomstig is.

Framing

Framing is het bewuste en onbewuste gebruik van conceptuele kaders of denkramen in de communicatie. Vrijwel iedere uitspraak kent wel een zeker *frame* (denkraam) van veronderstellingen. Anders dan bij het gebruik van argumenten als overtuigingsmiddel, gaat het bij *framing* vooral om de associaties bij het beeld. Bij framing worden woorden en beelden zo gekozen, dat impliciet een aantal aspecten van het beschrevene worden uitgelicht.

Fysische inperking

Voorzieningen aangebracht aan werkruimten, installaties en apparatuur waardoor verspreiding van organismen, waaronder genetisch gemodificeerde organismen, wordt tegengegaan. De inperking wordt verdeeld in vier verschillende veiligheidsniveaus.

Gastheerorganisme

In geval van genetische modificatie wordt het organisme waarin genetisch materiaal van een donororganisme wordt ingebracht de gastheer genoemd.

Governance

Governance is een oorspronkelijk Engelstalig begrip dat duidt op de handeling of de wijze van besturen, de gedragscode, het toezicht op organisaties. De Wereldbank definieert *Governance* als “de uitoefening van politiek gezag en het gebruik van institutionele middelen om de zaken en de problemen van de maatschappij te beheren”.

In vitro

Het uitvoeren van biologische technieken onder laboratoriumomstandigheden buiten een levend organisme. In vitro betekent ‘in glas’ en stamt nog uit de tijd dat glazen reageerbuizen e.d. gebruikt werden.

In vivo

Het uitvoeren van experimenten in een levend systeem.

Laboratoriumomstandigheden

Wanneer een organisme wordt gehouden onder laboratoriumomstandigheden betekent dit dat het organisme leeft in een volledig gecontroleerde en beheersbare omgeving waarin de benodigde elementen voor overleving (voedingsstoffen, zuurstof) gereguleerd worden. Het organisme staat niet bloot aan invloeden van buitenaf zoals concurrentie of bedreiging van andere organismen.

LD50

LD50 (van median Lethal Dose for 50% of subjects) is de hoeveelheid van een stof die bij 50% van een populatie tot de dood leidt. De stof wordt in een keer toegediend en hierdoor is de LD50 een maat voor de acute giftigheid en zegt niets over de lange termijn toxiciteit van de stof. De LD50 wordt meestal opgegeven in µg of mg per kg levend weefsel.

De Novo

Latijns voor ‘vanaf het begin’. In de context van dit rapport wordt met *de novo* DNA synthese bedoeld dat een reeks chemisch gesynthetiseerde base(paren) één voor één aan elkaar gekoppeld wordt. Een andere methode is om geïsoleerde stukken DNA uit organismen aan elkaar te koppelen. Dit valt niet onder *de novo* synthese.

Metabolic Pathway Engineering

Metabolic pathway engineering is het ontwerpen en inbouwen van specifieke functies in een bestaand organisme. Dit subveld is gericht op de productie van hoogwaardige chemicaliën, plastics, brandstoffen, farmaceutische componenten en geur- en smaakstoffen in aangepaste organismen.

Omics

-omics is een achtervoegsel dat vaak gebruikt wordt voor verschillende onderzoeksgebieden in de biologie zoals *genomics* (de kwantitatieve studie van genen, regulerende

en coderende sequenties), *transcriptomics* (RNA en genexpressie), *proteomics* (eiwitexpressie) en *metabolomics* (metabolieten en metabole netwerken). Gegevens uit onderzoek op het gebied van de verschillende *-omics* gebieden worden bijvoorbeeld gebruikt om de mogelijke bedoelde en onbedoelde verschillen op compositieniveau tussen een ggo en zijn natuurlijke referentie te bestuderen.

Orthogonaal biologisch system / Xenobiologie

In de wiskunde zegt men van twee objecten dat zij orthogonaal zijn, als zij loodrecht op elkaar staan. In de statistiek wordt met de term ook wel volledige afwezigheid van correlatie tussen twee variabelen bedoeld. De ontwikkeling van orthogonale systemen is gericht op het creëren van andere of nieuwe levensvormen door het aanpassen van de basis van levende cellen (het DNA). Dit wordt ook wel xenobiologie genoemd. Een volledig orthogonaal systeem zou functioneren op basis van biochemische reacties die niet kunnen interfereren met natuurlijke systemen.

Protocel

Een protocel is het meest eenvoudige kunstmatige chemische model van een levende cel, opgebouwd uit organische en/of anorganische elementen, die de functie van sommige maar niet noodzakelijk alle natuurlijke celcomponenten en moleculen nabootst. Omdat deze cellen van de grond af worden opgebouwd, worden ze onder de bottom-up benadering van synthetische biologie geschaard.

Synthetische biologie

Synthetische biologie is een onderzoeksveld dat zich richt op het veranderen van bestaande organismen met als doel het verkrijgen van nuttige functies, en tevens op het ontwerpen en synthetiseren van kunstmatige genen en complete biologische systemen.

Synthetic Genomics

Synthetic genomics betreft het chemisch synthetiseren van artificieel DNA om genen of een volledig genoom te maken.

Voorzorgsprincipe

Dit principe is vastgelegd bij "het verdrag van Rio". Het principe stelt dat nieuwe technologieën niet zonder voorzorgen mogen worden toegepast als ze risico's voor het milieu of de gezondheid lijken op te leveren, zelfs als wetenschappelijk onderzoek die risico's (nog) niet onomstotelijk heeft vastgesteld.

Wild-type

Het natuurlijke voorkomende geno- of fenotype van een bepaald organisme (of gen).

Xenobiologie (zie orthogonal biologisch systeem)





BIJLAGE 1

SYNTHETISCHE BIOLOGIE: PRODUCTIE VAN INDUSTRIËLE EN NATUURLIJKE GRONDSTOFFEN

Bron: International Civil Society Working Group on Synthetic Biology (2011). A submission to the convention on biological diversity's subsidiary body on scientific, technical and technological advice (SBSTTA) on the potential impacts of synthetic biology on the conservation and sustainable use of biodiversity.

Natural compound	Institution/Firm developing synthetic biology production	Stage of development	Natural product sourced from	Synthetic biology production based in	Market size (estimates)
Artemisinin (Artemisia annua)	Amyris/Sanofi Aventis; Riken Institute	To be commercialized 2012 by Sanofi	China, Vietnam, Cameroon, Ethiopia, Kenya, Mozambique, Tanzania, Uganda and Zambia	USA, Czech Republic, South Africa, Japan	Global supply and demand for artemisinin ~ 120-140 MT
Joboba Oil (Simmondsia chinensis)	LS9 Inc.	Pre-commercial	Argentina, Australia, Chile, Egypt, India, Israel, Mexico, Peru, South Africa, USA	USA	~5,000 tons of jojoba is used in personal care products worldwide
Liquorice (Glycyrrhiza glabra)	RIKEN Institute, Tokiwa Phytochemical Co.	Proof of principal	India, Spain, Iraq, Iran, Turkey, Russia, China, Mongolia, Kazakhstan	Japan	20,839 tons of liquorice dried extract (2004)
Palm Oil (Elaeis species)	Solazyme/Unilever, Sunthetix Genomics Inc./Genting group	R&D	Malaysia, Indonesia, Thailand, Colombia, Benin, Kenya, Ghana	USA	48 million tons of palm oil (accounts for 30% of global production of oils and fats)
Natural Rubber (Hevea brasiliensis)	Amyris/Michelin; Genencor/Dupont/Goodyear Tire & Rubber Co.; GlycosBio/Bio-XCell Sdn BHD (Malaysia)	To be commercialized 2013 (Genencor) or 2014 (GlycosBio)	Thailand, Malaysia, Indonesia, India, Vietnam, China, Sri Lanka, Cambodia, Papua New Guinea, Philippines	USA,	8,9 million metric tons (demand for isoprene per annum)
Pyrethrin (Tanacetum cinerariaefolium)	Wageningen University	R&D	Kenya, Tanzania, Australia, Japan, Dalmatia, Ecuador, Rwanda, Uganda, Papua New Guinea	Netherlands	2850 tons of pyrethrum flowers harvested worldwide (2000)

Natural compound	Institution/Firm developing synthetic biology production	Stage of development	Natural product sourced from	Synthetic biology production based in	Market size (estimates)
Stevia (Stevia rebaudiana)	Evolve Inc., Vineland Research	Pre-commercial, R&D	Paraguay, Brazil, Argentina, USA, Uruguay, Israel, China, Thailand	Switzerland, USA, Canada	worldwide sales of stevia extract 3,500 tons (2010)
Taxol (Taxus brevifolia)	University of California Berkely	Proof of principal	USA/Canada	USA	N/A
Vanilla (Vanilla planifolia)	Evolve Inc.	Scale-up. To be commercialized 2014.	Madagascar, Comoros, Reunion, Indonesia, French	Denmark, Switzerland	Approx. US \$ 200 million



BIJLAGE 2

LIJST EXPERT MEETING COGEM & RATHENAU INSTITUUT - 29 JUNI 2011

Naam

Dr. Hans Bergmans
Prof. dr. Roel Bovenberg
Prof. Dr. Jeroen Cornelissen
Prof.dr. Gerrit Eggink
Prof. Dr. Ron Fouchier
Prof. Dr. Ir. Vitor Martins dos Santos
Dr. Ben Peeters
Prof. Dr. Jos van Putten
Prof. Dr. Rob Verpoorte
Drs. G. van Willigen

Instelling

RIVM/bGGO
Rijksuniversiteit Groningen
Universiteit Twente
Wageningen UR
Erasmus MC
Wageningen UR
Centraal Veterinair Instituut
Universiteit Utrecht
Rijksuniversiteit Leiden
LUMC

Organisatie

Dr. Ir. Frank van der Wilk	COGEM
Drs. ing. Ruth Mampuy	COGEM
Dr. Dirk Stemerding	Rathenau Instituut
Mr. Drs. Virgil Rerimassie	Rathenau Instituut
Ir. Huib de Vriend	LIS Consult



BIJLAGE 3

FASERING ONTWIKKELING VAN TECHNOLOGIE, MAATSCHAPPELIJKE DISCUSSIE EN BELEIDSVORMING

Technologie Technology Hype Cycle - Gartner)	Technology trigger	Peak of inflated expectations	Trough of dissillusionment	Slope of enlightenment	Plateau of productivity
Ethische discussie (Kamerstuk 21 319 - Ritzen)	Signalering	Articulatie	Gezaghebbende toedeling van waarden		Analyse en fundering van waarden
Beleids- formulering (Beleids- cyclus - Winsemius)	Erkenning		Beleids- formulering	Oplossing	Beheer
Omschrijving	Eerste berichten verschijnen in de (populair) wetenschappelijke tijdschriften en media. De ontwikkelingen en technische mogelijkheden die werkelijk zullen plaats- vinden zijn nog niet te overzien.	Meer bekend over het verloop van ontwikkelingen en technische mogelijk- heden - media-aandacht neemt explosief toe. Besproken in kranten, op tv en in radio programma's. Stakeholders gevraagd hun (expert) mening te geven. Publiek en belangengroepen spreken verwachtingen uit over mogelijke toepassingen of uiten hun bezorgdheid hierover.	Media-aandacht neemt af, zowel gouden bergen als doem-scenario's lijken geen werke- lijkheid te worden. Hoewel toepassingen op de markt uitblijven beginnen deze, buiten het zicht van de media, wel concrete vormen aan te nemen.	De eerste toepassingen van de technologie komen op de markt en zichtbaar in de media. Media- aandacht neemt weer toe.	Geoliede machine, de technologie brengt nieuwe toepassingen voort die in de samenleving worden gebracht / geïmplementeerd.
Wetenschappers / bedrijven	Informerende van overheid en media over de ontwikkelingen. Zelf nadenken over mogelijke implicaties, risico's en ethisch-maatschappelijke aspecten.	Informerende van overheid en media over de stand van zaken in de ontwikkelingen. Verantwoordelijkheid nemen naar burger toe betreffende veiligheid en wenselijkheid van toepassingen en dit uitdragen.	De associatie tussen wetenschap en bedrijfleven neemt toe nu meer concrete toepassingen in zicht komen. Deze partijen moeten overheid en media informerende.	Informerende van overheid en media over de stand van zaken. Aanbieders van toepassingen evaluerende: voldoen de toepassingen aan de eerder gedane uitspraken, beloften en verwachtingen?	Informerende en evaluerende.
NGO's	Kennis nemen van de berichten in de media en laten zich verder informerende. Waar mogelijk onderwerp agenderende.	Articulatie van (on-) mogelijkheden en discussiepunten. Mogelijke interactie met de media om deze punten naar voren te brengen.	Aandacht voor het onderwerp neemt af, maar verdwijnt niet. Belangengroepen blijven hun standpunt ventilerende.	Aandacht voor het onderwerp neemt weer toe, Agendering van discussiepunten meer toegespitst op concrete toepassingen.	Aandacht voor het onderwerp blijft bestaan. Uitingen van specifieke standpunten vinden plaats, maar vinden minder weerklink in de media en bij betrokken partijen.

Technologie Technology Hype Cycle - Gartner)	Technology trigger	Peak of inflated expectations	Trough of dissillusionment	Slope of enlightenment	Plateau of productivity
Ethische discussie (Kamerstuk 21 319 - Ritzen)	Signalering	Articulatie	Gezaghebbende toedeling van waarden		Analyse en fundering van waarden
Beleids- formulering (Beleids- cyclus - Winsemius)	Erkenning		Beleids- formulering	Oplossing	Beheer
Media	Publiek informeren, aanspreken met interessante verhalen				
Burgers	Publiek wordt geconfronteerd met de eerste berichten in de media. Geschetste toepassingen lijken ver in de toekomst te liggen en spreken aan tot de verbeelding	Publiek geconfron- teerd met een scala aan mogelijke toepassingen - doemscenario's en gouden bergen. Hiermee kan zij brainstormen over de wenselijkheid van toepassingen – ethische en -maat- schappelijke vragen worden gearticu- leerd. Burgers verenigen zich in belangengroepen om hun standpunt kracht bij te zetten.	Aandacht bij het bredere publiek neemt af, er komen geen of nauwelijks nieuwe vragen bij. Door het uitblijven van concrete toe- passingen ontstaat de indruk dat het zo'n vaart niet zal lopen.	Publiek wordt geconfronteerd met de eerste toepassingen en de aandacht neemt weer toe. Publiek en/of belangengroepen spreken hun mening uit over deze toe- passingen.	Technologie is ingebed in de maatschappij, toepassingen worden op de markt gebracht zonder grote ophof bij de burger. Een aantal van hen blijft principiële bezwaren maken tegen de technolo- gie met argumen- ten die in de signalering en articulatiefase naar voren kwamen.
Overheid	Zich laten infor- meren teneinde te kunnen signa- leren en erkennen of er iets nieuws aan zit te komen. Er kunnen in deze fase vragen opkomen over veiligheid en risico's. De over- heid moet actie ondernemen / zich laten informeren om deze vragen te kunnen beantwoorden.	Informatie kunnen geven over de ont- wikkelingen en hoe zij de veiligheid van haar burgers waar- borgt. De overheid articuleert op basis van de ingewonnen informatie welke mogelijkheden en knelpunten er kunnen ontstaan door de nieuwe technologie. Bijvoor- beeld op het gebied van risico manage- ment, maar ook juridisch, econo- mische, ethische en maatschappelijke aspecten. De overheid moet een besluit nemen of zij de ontwikke- lingen wil stimuleren d.m.v. subsidies of onderzoekspro- gramma's.	Realiseren dat in dit stadium de eerste toepassingen vorm krijgen. Geinformeerd blijven over de stand van zaken. Welke scenario's zijn rea- listisch en op welke termijn. Op ethisch- maatschappelijk vlak zijn de vragen uitge- kristalliseerd die een rol spelen bij de technologie. Welke partijen zijn geëigend om hier iets over te zeggen? Nieuw beleid ontwik- kelen of bestaand beleid aanpassen?	De veiligheidspro- blematiek is uitgekristalliseerd. Implementatie van geformuleerd beleid. Evaluatie en leerproces staan centraal. De overheid moet een vinger aan de pols houden of de geïdentificeerde problemen en het ontwikkelde beleid aansluiten. De komst van nieuwe (onverwachte) ontwikkelingen zal het misschien nood- zakelijk maken om de risicoanalyse op enkele punten te wijzigen.	Monitoring en beleidsaanpassin- gen doen in geval onverwachte situaties optreden. Geinformeerd blijven over verwachtingen en bezorgdheden die spelen bij de burger.



LITERATUUR

1. Bedau MA *et al.* (2009). Social and ethical checkpoints for bottom-up synthetic biology, or protocells. *Syst Synth Biol* (2009) 3:65–75.
2. Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK *et al.* (2006). Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Mol Syst Biol* 2:0028.
3. Endy D (2005). Foundations for engineering biology. *Nature* 438:449–453.
4. European Commission (2005). Synthetic biology: Applying engineering to biology. Report of a NEST High-Level Expert Group. Project report EUR 21796.
5. Serrano L (2007). Synthetic biology: promises and challenges. *Mol Syst Biol* 3:158.
6. Purnick PEM, Weiss R (2009). The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:410–422.
7. The International civil society working Group on synthetic biology (2011). A submission to the convention on biological diversity's subsidiary body on scientific, technical and technological advice (SBSTTA) on the potential impacts of synthetic biology on the conservation and sustainable use of biodiversity.
8. Weber W, Fussenegger M (2011). Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nature Genetics reviews* vol 13 jan. 2012.
9. Pei L, Schmidt M, Wei W (2011). Synthetic biology: An emerging research field in China. *Biotechnol Adv.* 2011 November; 29(6-3): 804–814.
10. Iles A, Martin AN (2012). Expanding bioplastics production: sustainable business innovation in the chemical industry. *Journal of Cleaner production* – first online may 2012.
11. Dupont (2012). DuPont™ Sorona® Renewably Sourced Fiber in Mohawk's Smart-Strand® Silk™ Carpet. *DuPont News*, February 27, 2012.
12. Dupont (2009). Goodyear Research Collaboration. Internet: <http://biosciences.dupont.com/about-us/collaborations/goodyear/> (bezocht 10 december 2012).
13. Solazyme website. Internet: <http://solazyme.com/fuels> (bezocht 10 december 2012).
14. Bullis K (2012). Why Amyris is Focusing on Moisturizers, Not Fuel, for Now. *Technology review news* 9 mei 2012.
15. Synthetic Genomics (2010). Synthetic Genomics Inc. and J. Craig Venter Institute Form New Company, Synthetic Genomics Vaccines Inc. (SGVI), to Develop Next Generation Vaccines. *Synthetic Genomics press release* 7 oktober 2010.
16. Synthetic Biology Project / Woodrow Wilson Institute (2012). Inventory of synthetic biology products – existing and possible. Draft; 27 juli 2012).
17. Schmidt M, Pei L (2011). Synthetic Toxicology: Where Engineering Meets Biology and Toxicology. *Toxicol. Sci.* (2011) 120 (suppl 1): S204-S224.
18. Macnab S, Whitehouse A (2009). Progress and prospects: human artificial chromosomes. *Gene Therapy* 16. 1180–1188.
19. Carlson SR *et al.* (2007). Meiotic transmission of an in vitro assembled autonomous maize minichromosome. *Plos genet.* 3, 1965-1974.

20. Kazuki Y *et al.* (2010). Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Therapy* (2011) 18, 384–393.
21. Cello J, Paul AV, Wimmer E (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA, generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 297, 1016–1018.
22. Tumpey TM *et al.* (2005). Characterization of the reconstructed 1918 spanish influenza pandemic virus. *Science* 310, 77–80.
23. Wimmer E *et al.* (2009). Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat. Biotechnology*. 27, 1163–1172.
24. GenScript USA Inc. (2012). GenScript Launches a Premier Gene Synthesis Service “Gene-Brick™” for Building Large DNA Fragments™. Press release 14 juni 2012.
25. GenScript USA Inc. (2012). GenScript Sponsors iGEM – The Largest Competition in Synthetic Biology Field. Press release 28 mei 2012.
26. Carlson R (2009). The changing economics of DNA synthesis. *Nature biotechnology commentary*. vol. 27:12 1091 – 1094.
27. Carr PA, Church G (2009). Genome engineering. *Nature Biotechnology* 27, 1151 – 1162 (2009).
28. DNA2.0. Internet: <https://www.dna20.com/index.php?pageID=17> (bezoekt 10 december 2012).
29. Gibson DG *et al.* (2008). Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. *Science* 29 February 2008: Vol. 319. no. 5867, pp. 1215 – 1220.
30. Gibson DG *et al.* (2010). Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized genome. *Science* 329, 52 (2010).
31. J. Craig Venter Institute website. Overview first self-replicating synthetic bacterial cell. Internet: <http://www.jcvi.org/cms/research/projects/first-self-replicating-synthetic-bacterial-cell/> (bezoekt 10 december 2012).
32. Pauwels K. *et al.* (2012). Synthetic Biology, latest developments, biosafety considerations and regulatory challenges. Publicatie van Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid; biosafety and biotechnology unit. September 2012.
33. Tian J, Ma K, Saaem I (2009). Advancing high-throughput gene synthesis technology. *Mol Biosyst.* 2009 Jul;5(7):714–22.
34. Wang HH *et al.* (2012). Genome Scale promoter engineering by coselection MAGE. *Nat. Methods.* 9 591 – 593.
35. Wang HH *et al.* (2009). Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* 460, 894–898 (13 August 2009).
36. Matzas M *et al.* (2010). High-fidelity gene synthesis by retrieval of sequence verified DNA identified using high-throughput pyrosequencing. *Nature Biotechnology* 28 november 2010.
37. Ma S, Saaem I, Tian J (2012). Error correction in gene synthesis technology. *Trends in Biotechnology*, maart 2012 vol. 30, no 3.
38. Schofield MJ, Hsieh P (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 579–608.

39. Li GM (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85-98.
40. Tian J *et al.* (2004). Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature* 432, 1050-1054.
41. Carr PA *et al.* (2004). Protein-mediated error correction for de novo DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 32, e162.
42. Hoover DM, Lubkowski J (2002). DNA Works: an automated method for designing oligonucleotides for PCR based gene synthesis. *Nucleic Acids Res.* 30, e43.
43. Xiong AS *et al.* (2004). A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 32, e98.
44. NCBI virus genome database. Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome.cgi?taxid=10239> (bezoekt 10 december 2012).
45. Phoolcharoen W *et al.* (2011). A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal ebola virus challenge. *PNAS* published online before print December 5, 2011.
46. Hawthorne F (2012). Bioterrorist battles. A Swiss-based firm may have a back-door way to thwart a bioterrorist attack—by fighting the flu. *The scientist* January 2012.
47. Gen News (2010). Novartis Teams with Synthetic Genomics Vaccines to Develop Flu Seed Virus Banks. *News* 7 oktober 2010.
48. Biobricks Foundation website. Internet: <http://biobricks.org/about-foundation/> (bezoekt 10 december 2012).
49. Registry of Standard Biological Parts website. Internet: http://partsregistry.org/Main_Page (bezoekt 10 december 2012).
50. Kean S (2011). A lab of their own. *Science News* Vol. 333 no. 6047 pp. 1240-1241.
51. International Open Facility Advancing Biotechnology (BIOFAB) website. Internet: <http://biofab.org/about> (bezoekt 10 december 2012).
52. IGEM competitie Team Groningen. Internet: <http://2012.igem.org/Team:Groningen/Project> (bezoekt 10 december 2012).
53. Jaspers A (2012). Bacterie waarschuwt voor bedorven vlees. *Wetenschap* 24 nieuws november 2012.
54. Karr JR *et al.* (2012). A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype. *Cell*, Volume 150, Issue 2, 389-401, 20 July 2012.
55. Rude MA, Schirmer A (2009) New microbial fuels: a biotech perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 274–281.
56. Baker D *et al.* (2006). Engineering life: building a fab for biology. *Sci. Am.* 294, 44–51 (2006).
57. Curran KA, Alper HS (2012). Expanding the chemical palate of cells by combining systems biology and metabolic engineering, *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 4, 289-297, 2012.
58. Planson AG, Carbonell, P, Grigoras I *et al.* (2012). A retrosynthetic biology approach to therapeutics: from conception to delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:948-956, 2012.


59. Zhang F, Carothers JM, Keasling J (2012) Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nature Biotechnology* 30:354-359, 2012.
60. Ducat DC, Way JC, Silver PA (2011). Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology* Volume 29, Issue 2, February 2011, p. 95-103.
61. Bokinsky *et al.* (2011). Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pre-treated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. *PNAS early edition*. *PNAS* November 28, 2011.
62. Amyris website - biofuels. Internet: <http://www.amyris.com/en/markets/fuels> (bezocht 10 december 2012).
63. Sinha J, Reyes SJ, Gallivan JP (2010). Reprogramming bacteria to seek and destroy an herbicide. *Nat. Chem. Biol.* 6, 464–470.
64. Mordechai M, Mueller S, Wimmer E (2011). Synthetic Attenuated Virus Engineering (SAVE) A Novel Strategy to Generate Viral Vaccine Candidates. *GIT laboratory journal*, 18 januari 2011.
65. Coleman JR (2008). Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* 320, 1784-1787).
66. Mueller S *et al.* (2010). Live attenuated influenza virus vaccines by computer aided rational design. *Nat. biotechnol.* 28, 723-726.
67. Liang J, Luo Y, Zhao H (2011). Synthetic biology: putting synthesis into biology. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol Med.* 2011 Jan-Feb;3(1):7-20.
68. Kwok R (2010) Five hard truths for synthetic biology. *Nature* 2010 463: 288-290.
69. Amyris website - artemisinin. Internet: <http://www.amyris.com/en/markets/artemisinin> (bezocht 10 december 2012).
70. Danchin A (1989). Complete Genome sequencing: future and prospects in: BAP 1988-1989 (Goffeau A., ed.) pp.1-24, Commission of the European Communities, Brussels.
71. Internet: http://en.wikipedia.org/wiki/Pelagibacter_ubique (bezocht 10 december 2012).
72. Porcar M *et al.* (2011). The Ten Grand challenges of synthetic life. *Syst Synth Biol.* 2011 June; 5(1-2): 1–9.
73. Podar M *et al.* (2008). A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol.* 2008; 9(11):R158.
74. Glass JI *et al.* (2006). Essential genes of a minimal bacterium. *P Natl Acad Sci USA.* 2006;103(2):425–430.
75. Shuler ML, Foley P, Atlas J (2012). Modeling a minimal cell. *Methods Mol. Biol.* 881, 573 – 610.
76. Suthers PF *et al.* (2009). A Genome-Scale Metabolic Reconstruction of *Mycoplasma genitalium*, iPS189. *PLoS Comput Biol* 5(2): e1000285.
77. Baker M (2011). Synthetic Genomes: The next step for the synthetic genome. *Nature* vol. 473 P403-408, 19 mei 2011.
78. Royal Academy of Engineering (2009). *Synthetic biology: scope, applications and implications*. London.

79. Pósfai G *et al.* (2006). Emergent Properties of Reduced-Genome *Escherichia coli*. *Science* 312, 1044 (2006)..
80. Dymond JS *et al.* (2011). Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature* 477,471–476(22 September 2011).
81. Dymond J, Boeke J (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMbLE system and genome minimization. *Bioengineered bugs* 3, 168-171.
82. Hashimoto M *et al.* (2005). Cell size and nucleoid organisation of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Molecular Biology* (2005) 55(1), 137-149.
83. Mizoguchi H, Mori H, Fuji T (2007). *Escherichia Coli* minimum genome factory. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46, 157-167.
84. Sharma SS (2007). Recombinant protein production in an *Escherichia coli* reduced genome strain. *Metabolic Engineering* Volume 9, Issue 2, March 2007, Pages 133–141.
85. Mizoguchi H *et al.* (2008). Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. *DNA Res* 2008;15:277–284.
86. Danchin A (2012). Scaling up synthetic biology: do not forget the chassis. *FEBS letters*. Volume 586, Issue 15, 16 July 2012, Pages 2129–2137.
87. Juhas M, Eberl L, Glass JL (2011). Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends in cell biology* October 2011, vol. 21 no. 10.
88. McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NP (2009). Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. *PLoS Genet.* 5, e1000565 (2009).
89. McCutcheon, JP, Moran NP (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Microbiology reviews* vol. 10 January 2012.
90. Walde P (2010). Building artificial cells and protocell models: experimental approaches with lipid vesicles. *Bioessays*. 2010 Apr;32(4):296-303.
91. Rasmussen S, Bedau MA, Chen L *et al.* (2009). Protocells: Bridging nonliving and living matter. Cambridge: The MIT Press.
92. Dzieciol AJ, Mann S (2012). Designs for life: protocell models in the laboratory. *Chem Soc Rev.* 41:79-85...
93. Jewett MC, Forster AC (2010). Update on designing and building minimal cells. *Curr Opin Biotechnol.* 21: 697–703.
94. Pinheiro VB *et al.* (2011). Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science* 336, 341-344.
95. Bertrand OJN *et al.* (2012). Active, motor-driven mechanics in a DNA gel. *PNAS* vol. 109 no. 43.
96. Schrum JP, Zhu TF, Szostak JW (2010). The Origins of Cellular Life. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Sep;2(9).
97. Budin I, Devaraj NK (2012). Membrane Assembly Driven by a biomimetic coupling reaction. *Journal of the American Chemical Society* 134, 751-753.
98. Caschera F, Rasmussen S, Hanczyc MM (2012). An Oil Droplet Division-Fusion Cycle. *ChemPlusChem*, DOI: 10.1002/cplu.201200275.

99. Hanczyc M (2011). The line between life and not-life. TED talk may 2011. TED-Salon London Spring 2011.
100. Kuruma Y (2009). A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. Volume 1788, Issue 2, February 2009, Pages 567–574.
101. Walde P *et al.* (1994). Autopoietic self-reproduction of fatty acid vesicles. *Am. Chem. Soc.* 116, 11649-11654.
102. Pautot S *et al.* (2003). Spontaneous Formation of Lipid Structures at Oil/Water/Lipid Interfaces. *Langmuir* 19, 10281-10287.
103. Angelova M, Dimitrov DS (1986). Liposome electro formation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81, 303-311.
104. Xu J, Sigwordth FJ, Lavan DA (2010). Synthetic protocells to mimic and test cell function. *Adv. Mater.* 22, 120 – 127.
105. Liu *et al.* (2009). Porous nanoparticle supported lipid bilayers (protocells) as delivery vehicles. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 1354 – 1355.
106. Zepik HH *et al.* (2008). Lipid vesicles as membrane models for toxicological assessment of xenobiotics. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 1-11.
107. Stano P *et al.* (2011). Compartmentalized reactions as a case of soft-matter biotechnology: synthesis of proteins and nucleic acids inside lipid vesicles. *J. Mater. Chem.*, 2011,21, 18887-18902.
108. V. Noireaux, Y. T. Maeda, A. Libchaber (2011). Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2011, 108, 3473-3480.
109. Shohda K, Sugawara T (2006). DNA polymerization on the inner surface of a giant liposome for synthesizing an artificial cell model. *Soft Matter* 2: 402-408.
110. Noireaux V, Libchaber A (2004). A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17669-17674.
111. Kita H *et al.* (2008). Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. *Chem Bio Chem* 9:2403-2410.
112. Kurihara K *et al.* (2011). Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nature Chemistry* 3, 775–781.
113. Foley PL, Shuler ML (2010). Considerations for the design and Construction of a synthetic platform cell for biotechnological applications. *Biotechnol Bioeng.* 2010 Jan 1;105(1):26-36.
114. Luisi PL (2006). (Book). *The Emergence of Life. From Chemical Origins to Synthetic Biology*. Cambridge University Press.
115. Herdewijn P, Marlière P (2009). Toward safe genetically modified organisms through the chemical diversification of nucleic acids. *Chem Biodivers.* 2009 Jun;6(6):791-808.
116. Schmidt M (2010). Xenobiology: a new form of life as the ultimate biosafety tool. *Bioessays* 32: 322–331.
117. Acevedo-Rocha CG, Budisa N (2011). On the Road towards Chemically Modified

- Organisms Endowed with a Genetic Firewall. *Angewandte Chemie International Edition* Volume 50, Issue 31.
118. Krueger *et al.* (2007). Synthesis and Properties of Size-expanded DNAs: Toward Designed, Functional Genetic Systems. *Acc Chem Res.* 2007 February ; 40(2): 141–150.
 119. Pinheiro VB, Holliger P (2012). The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers. *Curr Opin Chem Biol.* 2012 16:245-52.
 120. Yang Z *et al.* (2011). Amplification, mutation and sequencing of a six-letter synthetic genetic system. *J Am Chem Soc.* 133: 15105-15112.
 121. Neumann H *et al.* (2010). Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet decoding ribosome. *Nature Letter Nature* 464, 441-444.
 122. Joyce GF (2012). Towards an alternative biology. *Science* Vol. 336 no. 6079 pp. 307-308.
 123. Cho H *et al.* (2011). Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 9060-5.
 124. Schmidt M, De Lorenzo V (2012). Synthetic constructs in/for the environment: Managing the interplay between natural and engineered Biology. *FEBS letters.* *FEBS Letters* 586 (2012) 2199–2206.
 125. Marlière P *et al.* (2011). Chemical Evolution of a Bacterium's Genome. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 7109–7114.
 126. Malyshev DA *et al.* (2012). Efficient and sequence-independent replication of DNA containing a third base pair establishes a functional six-letter genetic alphabet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 24;109(30): 12005-10.
 127. Voloshchuk N, Montclare JK (2009). Incorporation of unnatural amino acids for synthetic biology. *Mol. BioSyst.*, 2010, 6, 65–80.
 128. Wang Q *et al.* (2009). Expanding the genetic code for biological studies. *Chem. Boil.* 16, 323-336.
 129. Young TS, Schultz PG (2010). Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 11039-11044.
 130. Minnich EC (2009). Unnatural amino acids: better than the real thing? *F1000 Biol Rep.* 2009; 1: 88.
 131. Kazane S *et al.* (2012). Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (10), 3731-3736.
 132. Dana GV *et al.* (2011). Synthetic biology: Four steps to avoid a synthetic-biology disaster. *Nature* 483,29.
 133. Atsumi S, Taizo H, Liao JC (2008). Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* Vol. 451, p. 86-90, 3 January 2008.
 134. Atsumi S, Hegashide W, Liao JC (2009). Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde, *Nature Biotechnology* 27, p. 1177-1180.
 135. Zhang L, Chang S, Wang J (2010). How to make a minimal genome for synthetic minimal cell. *Protein Cell* 2010, 1(5): 427–434, DOI 10.1007/s13238-010-0064-4.

136. Joyce, GF (2002). The antiquity of RNA-based evolution, *Nature* 418, 214-221 (11 July 2002).
137. Beer, LL. et.al. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology* 2009:20, p. 264-271.
138. Ort DR, Zhu X, Melis A (2011). Optimizing Antenna Size to Maximize Photosynthetic Efficiency. *Plant Physiology*, January 2011, Vol. 155, pp. 79–85.
139. Agapakis, CM et.al. (2011). Towards a Synthetic Chloroplast. *PLoS ONE*, April 2011, Vol. 6 (4), pp. 1-8.
140. Silver P et al. (2011). Synthetic Biology and Light-Dependent Systems. Lecture at the 5th International Synthetic Biology Conference, 15 June 2011, Stanford, Cal.
141. Stemerding D. (2012). Verslag expertbijeenkomst biosafety synthetische biologie op 29 juni 2011. 12 januari 2012 (niet gepubliceerd).
142. Naesby M et al. (2009). Yeast artificial chromosomes employed for random assembly of biosynthetic pathways and production of diverse compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell factories* 8:45.
143. Marmeisse R et al. (1993). Disruption of the Avirulence Gene *avr9* in two races of the tomato pathogen *cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *CF9*. *Molecular plant-microbe interactions* vol. 6 no 4, 412-417.
144. Gillen A, Sherwin F (2006). The origin of the bubonic plague. *Journal of Creation* vol. 20.
145. Wren BW (2003). The *Yersinia* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* vol. 1.
146. ETC Group (2012). The principles for the oversight of synthetic biology.
147. Gaskell G et al. (2011). The 2010 Eurobarometer on the Life Sciences. *Nat. biotechnol.* 29, 113-114.
148. Bubela T, Huguen G, Einsiedel E (2012). Synthetic biology confronts publics and policy makers: challenges for communication, regulation and commercialization. *Trends in Biotechnology*, march 2012, vol, 30, no 3.
149. Van der Burg S (2009). Taking the “Soft Impacts” of Technology into Account: Broadening the Discourse in Research Practice. *Social Epistemology: A Journal of Knowledge, Culture and Policy*. Volume 23, Issue 3-4.
150. Nawroth JC et al. (2012). A tissue engineered jellyfish with biomimetic propulsion. *Nature biotechnology* 30: 8.
151. Brouwers L (2012). Wetenschappers maken zwemmende kunstkwad van rattenhartcellen en rubber. *NRC wetenschap* 24 juli.
152. European Commission (2010). Workshop on Synthetic Biology: From Science to governance. 18-19 March 2010, Brussels.
153. The Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues (2010). *New Directions: The Ethics of Synthetic Biology and Emerging Technologies*.
154. International Risk Governance Council (2010). *Guidelines for the Appropriate Risk Governance of Synthetic Biology*.
155. Zhang JY, Marris C, Rose N (2011). The Transnational Governance of Synthetic



Biology Scientific uncertainty, cross-borderness and the 'art' of governance. The London School of Economics and Political Science.

156. Deining Maatschappelijke communicatie (2006). Governance van biotechnologie: de veranderende rol van wetenschappelijke adviescolleges. COGEM onderzoeksrapport CGM 2006-01.
157. KNAW (2007). Een gedragscode voor biosecurity. Rapport van de werkgroep biosecurity.
158. International association synthetic biology (2009). The IASB Code of Conduct for Best Practices in Gene Synthesis Cambridge, MA. Nov. 3, 2009.
159. Nuffield Council on Bioethics (2011). Biofuels; ethical issues, Nuffield Press.
160. Brown S (2009). The new deficit model. Nat. nanotechnol. 4, 609-611.
161. International Gene Synthesis Consortium website. Internet: <http://www.genesynthesisconsortium.org/> (bezocht 10 december 2012).



POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN
TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

