



Commissie Genetische Modificatie

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

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

Uw kenmerk

Uw brief van

Kenmerk

Datum

CGM/050202-05

5 februari 2005

Onderwerp

Signalering Transgene muggen

Geachte heer Van Geel,

Hierbij bied ik u de signalering 'Transgene muggen als wapen in de strijd tegen malaria' aan. De COGEM informeert met deze signalering de Nederlandse overheid in een vroegtijdig stadium over de ontwikkelingen op het gebied van genetisch gemodificeerde muggen als ziektebestrijders. Het vrijlaten van dergelijke transgene muggen in het ecosysteem vraagt om een nieuwe benaderingswijze.


Samenvatting

De wetenschappelijke ontwikkelingen op het gebied van bestrijding van malaria met transgene muggen, die niet langer in staat zijn om de malariaparasiet over te dragen naar de mens, zijn hoopgevend en brengen het moment van vrijlaten van transgene muggen in het ecosysteem dichterbij. Doorgaans worden bij het in het milieu brengen van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) maatregelen getroffen om de gevolgen voor de omgeving zoveel mogelijk te beperken. Met de inzet van transgene muggen als bestrijdingsmethode voor malaria is het tegenovergestelde het geval. Vervanging van de van nature voorkomende muggenpopulaties door genetisch gemodificeerde muggen is voor succes noodzakelijk. Vrijlating vraagt dan ook om een nieuwe benaderingswijze en het maken van nieuwe afwegingen. Dit laatste is een mondiale aangelegenheid en gaat derhalve ook de Nederlandse overheid aan. Enerzijds in haar rol als financier van onderzoek en van ontwikkelingshulp en anderzijds als participant in internationale verdragen.

Het vrijlaten van transgene muggen is alleen aanvaardbaar als de veiligheid voor mens en milieu niet in het geding komt en er een goede kans bestaat dat het beoogde effect behaald kan worden. Kennis om aan te tonen dat het vrijlaten van transgene refractoire muggen veilig is én dat het bestrijden van malaria met deze muggen haalbaar is ontbreekt vooralsnog. Meer onderzoek is vereist. Het hanteren van een stappenplan vergelijkbaar aan het Nederlandse stappenplan voor introducties in het milieu van ggo's is een geschikte methode. Na laboratorium- en kasproeven is de laatste stap het vrijlaten van transgene muggen in een geïsoleerd gebied. Alleen bij voldoende garanties ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid is een volgende stap gerechtvaardigd.

Deze signalering wordt u toegezonden in het kader van de wettelijke taak van de COGEM u te informeren over belangrijke ethische en maatschappelijke aspecten samenhangend met genetische modificatie.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a horizontal line underneath the name.

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

- cc. Dr. C. P. Veerman, Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit,
A.M.A. van Ardenne- Van der Hoeven, Minister van Ontwikkelingssamen-
werking,
Drs. C. Ross-Van Dorp, Staatssecretaris van Volksgezondheid, Welzijn en
Sport,
Drs. M. Rutte, Staatssecretaris van Onderwijs, Cultuur en Wetenschappen.

Transgene muggen als wapen in de strijd tegen malaria

COGEM signalering CGM/050202-05

Commissie Genetisch Modificatie (COGEM)

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

Inhoudsopgave

Samenvatting	3
1 Inleiding	7
1.1 Poging om malaria uit te roeien	7
1.2 Biotechnologie en malaria	9
2. Vrijlaten van transgene muggen vraagt om nieuwe afwegingen.....	13
2.1 Standpuntbepaling in een vroegtijdig stadium.....	14
2.2 Het maken van afwegingen is een mondiale aangelegenheid.....	15
2.3 De transgene mug als trendsetter	15
2.4 Het debat rond transgene muggen.....	16
2.5 Informeren van de Nederlandse overheid	19
3 Achtergrondinformatie en wetenschappelijke vorderingen	21
3.1 Malaria; de ziekte.....	21
3.2 De productie van transgene refractoire muggen	23
3.2.1 De zoektocht naar geschikte genen.....	25
3.3 Verspreiding van het transgen door de populatie	27
3.3.1 (Symbiotische) bacteriën	29
3.3.2 Transposons	32
4 De gevolgen voor het milieu	35
4.1 Geografische verspreiding	35
4.2 Overdracht van andere ziekteverwekkers	37
4.3 Aanpassing van de parasiet aan een andere vector	39
4.4 Effect op de voedselketen	40
4.5 Verspreidingsmechanisme	41
4.5.1 (Symbiotische) bacteriën	41
4.5.2 Transposons	42
5 Risicomanagement	45
6 Conclusies	47
Referenties	49
Geraadpleegde deskundigen	49
Literatuur.....	50

Samenvatting

De komst van een scala aan moderne biotechnologische technieken en het beschikbaar komen van de volledige genoomsequenties van de malariaparasiet, de malariamug en het menselijke genoom hebben nieuwe ontwikkelingen op het gebied van malariabestrijding in gang gezet. Eén van deze nieuwe terreinen is het inzetten van genetisch gemodificeerde muggen. Door genen met een antiparasitaire werking in de mug in te bouwen hopen onderzoekers de overdracht van de malariaparasiet naar de mens tegen te gaan. Eenmaal vrijgelaten in gebieden waar malaria heerst, zullen deze zogeheten transgene refractoire muggen nog wel mensen steken om bloed te zuigen, maar geen malaria overbrengen. Het ultieme doel is om de van nature voorkomende muggenpopulatie te vervangen door deze transgene muggen en daarmee één van 's werelds meest dodelijke ziekten uit te bannen.

Transgene muggen vragen om nieuwe afwegingen in een vroeg stadium

Doorgaans worden bij het in het milieu brengen van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals het verbouwen van transgene gewassen, maatregelen getroffen om de gevolgen voor de omgeving zo veel mogelijk te beperken. Met de inzet van transgene muggen als bestrijdingsmethode is het tegenovergestelde het geval. Om het doel te bereiken is het noodzakelijk om een verandering in het ecosysteem te veroorzaken, namelijk het vervangen van de wilde muggenpopulatie. De keerzijde hiervan is dat de verspreiding van transgene muggen niet volledig controleerbaar is en niet valt terug te draaien. Vrijlating vraagt dan ook om een nieuwe benaderingswijze en het maken van nieuwe afwegingen.

De ontwikkelingen op het gebied van transgene muggen volgen elkaar snel op. Successen met transgene refractoire muggen in combinatie met malaria bij ratten zijn al geboekt. Vertalen van deze resultaten naar humane malaria lijkt slechts een kwestie van tijd en maakt het noodzakelijk om in dit stadium af te wegen of en onder welke voorwaarden de verspreiding van transgene muggen acceptabel en mogelijk is.

Garanties ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid

Het vrijlaten en verspreiden van ggo's met als doel de van nature voorkomende populatie te veranderen of zelfs te vervangen roept ethische bezwaren op. De mens creëert nieuwe organismen en zet de natuur naar zijn hand. Echter, het feit dat het hier bestrijding van een ziekte betreft die jaarlijks miljoenen slachtoffers eist, maakt dat voor velen deze bezwaren geen beletsel zijn voor vrijlating. Hierbij dient aangetekend dat vrijlating wel onder strikte voorwaarden moet geschieden. Alleen als de veiligheid voor mens en milieu niet in het geding komt en er een goede kans bestaat dat het beoogde effect behaald kan worden, is

vrijlaten van transgene muggen in de natuur aanvaardbaar. Vervanging van de van nature voorkomende populaties door transgene muggenpopulaties is voor succes noodzakelijk.

Kennis om aan te tonen dat het vrijlaten van transgene refractoire muggen veilig is én bestrijden van malaria met deze muggen haalbaar is, ontbreekt vooralsnog. Hierdoor blijven vragen, met name over de gevolgen van eventuele gedragsveranderingen van de mug of de parasiet, veelal onbeantwoord. Zo ook de vraag in hoeverre ingrijpen effect heeft op de verspreiding van andere ziekteverwekkers. Geopperd wordt dat door een verstoorde interactie tussen mug en parasiet de mug andere (on)bekende levensbedreigende ziekteverwekkers zou kunnen overdragen.

Ook het potentiële vermogen van de parasiet om zich binnen afzienbare tijd te weren tegen geneesmiddelen roept vragen op. Mogelijk kan de malariaparasiet op den duur resistentie opbouwen tegen de ingebrachte antiparasitaire genen van de mug. Behalve het risico dat hierdoor de bestrijding van malaria met transgene muggen dreigt te mislukken, bestaat de angst dat de mug en daarmee malaria zich later over grotere gebieden kan gaan verspreiden. Het snelle aanpassingsvermogen van de parasiet roept daarnaast de vraag op in hoeverre de parasiet in staat is zich aan te passen aan een andere gastheer. Overdracht van de malariaparasiet door andere of meerdere gastheren zou kunnen leiden tot een bredere verspreiding van malaria.

De huidige kennis, veelal gebaseerd op het gedrag en eigenschappen van niet-transgene muggen, is niet toereikend om de bovengenoemde mogelijke gevaren uit te sluiten maar geeft vooralsnog ook geen aanleiding om ze als aannemelijk te beschouwen.

De wisselwerking tussen de malariamug en de malariaparasiet is specifiek tot uniek te noemen. Gegevens die erop wijzen dat deze specificiteit eenvoudig te doorbreken is, ontbreken. Hoewel muggen van meerdere genera zich voeden met humaan bloed en daarmee verschillende ziekteverwekkers opnemen, zijn alleen muggen van het genus *Anopheles* in staat de humane malariaparasiet over te dragen. Dit geldt evenzo voor andere ernstige humane ziekteverwekkers en hun vectoren.

De malariamug stelt specifieke eisen aan zijn omgeving en is daardoor gebonden aan bepaalde streken. Wil een transgene mug zich in nieuwe gebieden vestigen dan zal dit gepaard moeten gaan met verandering van meerdere eigenschappen. Daarbij zal de ziekte malaria zich alleen verspreiden als ook de parasiet zich onder de nieuwe omstandigheden weet te handhaven.

Dat de malariaparasiet in staat zal zijn de werking van de ingebouwde genen te omzeilen is minder onwaarschijnlijk. Het inbouwen van meerdere genen, die ingrijpen in verschillende ontwikkelingsstadia van de parasiet, lijkt hiervoor

echter een oplossing te bieden. Ook de keuze voor een mechanisme om de genen versneld door de muggenpopulatie te verspreiden moet er voor zorg dragen dat resistentie niet vroegtijdig wordt doorbroken.

Het hanteren van deze criteria alleen biedt echter geen garantie. Tevens zullen experimenten moeten aantonen dat de inzet van transgene muggen als bestrijdingsmethode haalbaar is. Ondermeer moet gekeken moeten of het ingebouwde gen stabiel aanwezig blijft, het gen inderdaad een antiparasitaire werking heeft en verspreiding door de populatie plaatsvindt. Ook het feit dat de huidige kennis niet toereikend is om garanties te bieden ten aanzien van veiligheid vraagt om meer onderzoek. Experimenten moeten aantonen dat een eventueel afwijkend gedrag van de mug of de parasiet geen nadelige gevolgen heeft voor mens of milieu.

Veiligheids- en haalbaarheidsmanagement

Voorafgaand aan het vrijlaten van muggen lijkt een stapsgewijze benadering, vergelijkbaar met het Nederlandse stappenplan dat gehanteerd wordt bij het in het milieu brengen van ggo's, de aangewezen methode om antwoorden te geven op bovenstaande vragen. Deze benadering biedt de mogelijkheid om stapsgewijs inperkingen op te heffen. Bij voldoende garanties ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid is een volgende stap gerechtvaardigd.

Dit zal in de praktijk betekenen dat de eerste fase van toetsen zich afspeelt in het laboratorium. Laboratoriumexperimenten moeten duidelijkheid geven over bijvoorbeeld de stabiliteit van het ingebouwde gen maar ook over het effect van het ingebouwde gen op de interactie met andere bekende ziekteverwekkers.

In de daaropvolgende stap worden experimenten in zogeheten biosfeerkassen uitgevoerd. Dit biedt de mogelijkheid om onder semi-natuurlijke omstandigheden eventueel afwijkend gedrag van de transgene mug waar te nemen. Ook de werking van het mechanisme waarmee ingebouwde genen door de populatie worden verspreid kan in deze fase worden getest.

Het is raadzaam de biosfeerkassen in eerste instantie te plaatsen in gebieden waar buiten de kas de leefomstandigheden voor de mug zeer ongunstig zijn. Muggen die eventueel ontsnappen kunnen zich dan niet verspreiden of overleven. Experimenten in biosfeerkassen in gebieden waar malaria voorkomt wordt als vervolgstap gezien.

Na uitvoerig onderzoek in kassen zal het vrijlaten van de mug in zijn natuurlijke omgeving de volgende stap zijn. Door te kiezen voor een geïsoleerd gebied, zoals een eiland, kunnen onverwachte effecten bekeken worden en kan verdere verspreiding nog worden tegen gegaan.

Het maken van afwegingen is een mondiale aangelegenheid

Het maken van afwegingen en het nemen van besluiten voorafgaand aan het vrijlaten van transgene muggen is een mondiale aangelegenheid. Malaria kan alleen bestreden worden door een wereldwijde aanpak. Daarbij vindt de verspreiding van de muggen plaats in het ecosysteem en kunnen eventuele gevolgen grensoverschrijdend zijn. Dit betekent dat naast landen waarin malaria voorkomt óf landen die bijdragen aan de ontwikkeling van transgene muggen, overige landen eveneens een rol moeten krijgen bij de besluitvorming.

De ontwikkelingen op het gebied van transgene muggen gaan ook Nederland aan. De Nederlandse overheid, en afgeleide organisaties zoals NWO, kunnen geconfronteerd worden met financieringsaanvragen voor onderzoek. Daarnaast kan de overheid tijdens internationale fora in het kader van het Biodiversiteitsverdrag of in het kader van activiteiten op het gebied van ontwikkelingshulp gevraagd worden haar standpunt ten aanzien van deze materie kenbaar te maken. Dit betekent dat zij een (indirecte) rol zal spelen bij het opstellen van criteria voor een verantwoorde vrijlating van transgene muggen.

De COGEM wil middels het onderliggende document de Nederlandse overheid in een vroeg stadium informeren en daarmee een bijdrage leveren aan de totstandkoming van haar standpunt. Enerzijds door de technische ontwikkelingen op het gebied zichtbaar te maken en daarmee meer inzicht te verschaffen in het haalbaarheidsvraagstuk. Anderzijds door nader in te gaan op eerder genoemde veiligheidsaspecten.

De malariamug als trendsetter

Het bestrijden van een ziekte met ggo's beperkt zich niet tot malaria. Ook voor de bestrijding van andere door insecten overgedragen humane ziekten wordt het gebruik van ggo's als mogelijkheid geopperd of vinden ontwikkelingen op dit gebied al plaats. Evenals voor de bestrijding van dierziekten en zoogdierplagen. Ook hier geldt dat voor succesvolle bestrijding verspreiding van ggo's in het milieu nodig is. Hoewel de signalering zich richt op het vrijlaten van transgene muggen ter bestrijding van malaria gelden veel van de genoemde elementen, afwegingen en randvoorwaarden eveneens voor andere toepassingen. Immers het vrijlaten van transgene muggen kan een precedentwerking hebben op verspreiden van andere genetisch gemodificeerde organismen om effecten in het ecosysteem te bewerkstelligen.

1 Inleiding

Met naar schatting twee tot drie miljoen doden en vijfhonderd miljoen infecties per jaar, is malaria één van de meest levensbedreigende ziekten ter wereld. Vooral kinderen jonger dan vijf jaar in Afrika ten zuiden van de Sahara zijn het slachtoffer.

De veroorzaker van malaria is een ééncellige parasiet genaamd *Plasmodium*. Deze parasieten worden overgedragen via beten van muggen die zich voeden met bloed. Doordat de muggen zich verschillende malen voeden op meerdere personen kunnen in korte tijd veel mensen geïnfecteerd raken.

Een malaria-infectie leidt vaak tot blijvende schade aan de hersenen of een ernstige chronische vorm van bloedarmoede. Herhaalde infecties leiden slechts tot een gedeeltelijke immuniteit die verdwijnt wanneer gedurende een langere periode de mens vrij blijft van infectie. Ook zwangerschap maakt dat de opgebouwde immuniteit verdwijnt, waardoor zwangere vrouwen extra vatbaar voor infecties zijn.

De malariaproblematiek speelt zich af in de tropen. Het merendeel van de slachtoffers valt in Afrika, waar geld voor effectieve bestrijding ontbreekt. Pogingen van getroffen landen om hun economie te versterken en de armoede te bestrijden worden belemmerd door malaria. Hoge percentages volwassenen kunnen vanwege de gevolgen van een malaria-infectie niet volwaardig productief meedraaien in de maatschappij. Schoolgaande kinderen lopen vanwege de gevolgen van malaria een leerachterstand op of zijn niet in staat onderwijs te volgen. Malaria en armoede houden deze landen in een ijzeren greep.¹

1.1 Poging om malaria uit te roeien

In het midden van de vorige eeuw werd in grote gebieden malaria met succes uitgeroeid. Het gebruik van het bestrijdingsmiddel DDT om muggen te doden en het actief opsporen van besmette personen gevolgd door een behandeling met het geneesmiddel chloroquine zorgde ervoor dat malaria verdween in de meer gematigde streken, waaronder Europa en Zuidoost Azië.² Zo dateert het laatste geval van Malaria in Nederland, overigens een onschuldige niet-dodelijke malariavariant, uit 1961.³ Pogingen om op vergelijkbare wijze malaria in ontwikkelingslanden uit te roeien faalden. De hoge aantallen infecties en muggen in deze streken stonden een effectieve bestrijding in de weg. Het gebrek aan geld voor medicijnen en insecticiden en het gebrek aan medische voorzieningen zoals klinieken en goed opgeleid medisch personeel in deze landen droegen daar aan bij. Bovendien werd door gebrek aan goede infrastructuur en logistiek, verspreiding van medicijnen, insecticiden of

klamboes bemoeilijkt. Hierdoor bleven vooral de armsten in ver afgelegen dorpen in de tropen verstoken van hulp. Vanaf de zestiger jaren kreeg malaria dan ook de naam een tropische ziekte of een armoedeziekte te zijn.

De ontwikkelingen op het gebied van nieuwe medicijnen en nieuwe insecticiden voor de bestrijding van malaria verliepen de afgelopen decennia moeizaam. Eén van de redenen hiervoor is de relatief geringe interesse van het bedrijfsleven. Hoewel het hier een ziekte betreft die miljoenen treft én de afzetmarkt voor een goedwerkend middel groot is, zijn de ontwikkelkosten hoog en moeilijk terug te verdienen door de geringe koopkracht van de getroffen. De potentiële gebruikers c.q. overheden van door malaria gekwelde landen, kunnen deze hoge kosten niet opbrengen. Voor de ontwikkeling van nieuwe middelen zijn ontwikkelingslanden derhalve hoofdzakelijk afhankelijk van de inspanningen van relatief kleine onderzoeksgroepen vaak afkomstig uit Westerse landen met doorgaans een beperkte financiering.

In de toestand van veel van de zwaar door malaria getroffen gebieden is in de loop der jaren weinig veranderd. Mocht er in de jaren zestig al sprake zijn geweest van een lichte afname van het aantal malariaslachtoffers dan lijkt deze afname te niet gedaan. Het aantal slachtoffers van malaria is de afgelopen jaren gestegen. Een belangrijke oorzaak hiervoor is het in onbruik raken van het bestrijdingsmiddel DDT vanwege de ernstige bijwerkingen voor mens en milieu als wel de logistieke en financiële problemen bij de bestrijdingscampagnes. Daarbij bleek in een aantal gebieden DDT zijn effectiviteit verloren te hebben doordat muggen resistentie tegen het middel ontwikkelden. Ook de toenemende resistentie van parasieten tegen het goedkope geneesmiddel chloroquine leidt tot een toename van het aantal slachtoffers. Pogingen om de ziekte in te dammen worden verder bemoeilijkt door het nog niet voorhanden hebben van een goed werkend vaccin.

Daarnaast zijn in de afgelopen decennia de economische vooruitzichten in veel van deze ontwikkelingslanden niet tot nauwelijks verbeterd. Hoewel wereldwijd initiatieven worden ondernomen om hierin verbetering te brengen zijn problemen betreffende infrastructuur en de aanwezigheid van medische voorzieningen e.d. nog steeds actueel.⁴

Terug op de agenda

Na jaren van verminderde interesse is malaria weer terug op zowel de politieke agenda's als die van gezondheidsorganisaties. Zo startte de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) in samenwerking met de Verenigde Naties (VN) en de Wereldbank in 1998 met het grootschalige bestrijdingsproject 'Roll Back Malaria (RBM)'. Een initiatief waar 44 Afrikaanse landen zich achter hebben

geschaard. Het streven van het RBM-project is om in 2010 het aantal malariaslachtoffers gehalveerd te hebben. Hiervoor moet minimaal 60% van de malariapatiënten toegang hebben tot medicatie, beschermd worden tijdens de zwangerschap en voorzien zijn van een (met insecticide geïmpregneerde) klamboe. Hoewel de wil aanwezig is, is de vooruitgang die geboekt wordt helaas bescheiden en lijken de doelstellingen niet gehaald te worden.

Toegang tot medicatie blijft een groot probleem. Ook bij gebruik van het middel ‘sulphadoxine pyrimethamine’ welke als een financieel acceptabele vervanger wordt gezien van chloroquine is inmiddels resistentie geconstateerd.

Het verspreiden van met insecticide-geïmpregneerde klamboes lijkt een succes, maar evenals voor DDT ontwikkelen muggen resistentie tegen de toegepaste insecticiden. Daarbij ontbreken veelal de financiële middelen om de bevolking blijvend van geïmpregneerde klamboes te voorzien.²

Naast dat huidige bestrijdingsprogramma's zich richten op het verminderen van het contact tussen de mens en de mug, wordt geprobeerd in te grijpen in de habitat van muggenpopulaties. Door onderzoek te verrichten naar het gedrag van de mug, waaronder het voedingsgedrag en het paringsgedrag, hopen onderzoekers meer zicht te krijgen op welke wijze en op welke momenten de levenscyclus verstoord kan worden. Ook meer kennis over de broedplaatsen van de mug en het gedrag van muggenlarven moeten hiertoe bijdragen. De mug legt zijn eieren in het water en ook het larvale stadium vindt in het water plaats. Bestrijding van de mug kan derhalve ook met relatief eenvoudige methoden aangepakt worden, zoals het verwijderen van poelen of het afdekken van waterputten. Recent Nederlands onderzoek heeft aangetoond dat biologische bestrijding van volwassen muggen met een schimmel eveneens effectief kan zijn.⁵

1.2 Biotechnologie en malaria

De komst van een scala aan moderne biotechnologische technieken en het vrijkomen van de volledige genoomsequenties van de malariaparasiët (*Plasmodium falciparum*)⁶, de malariamug (*Anopheles gambiae*)⁷ en het menselijke genoom⁸ maken het mogelijk meer gedetailleerd naar de organismen afzonderlijk en naar de onderlinge interacties te kijken. Gebruik van recent ontwikkelde methoden, zoals RNAi, waardoor genen ‘aan en uit’ gezet kunnen worden, maken het mogelijk de functie van genen en hun aandeel in processen te bepalen.

Deze nieuwe ontwikkelingen op het gebied van de biotechnologie hebben er mede toe bijgedragen dat de laatste jaren de interesse voor malaria weer is toegenomen. De ontwikkelingen hebben de hoop op een goede afloop weer op

doen laaien en de interesse van geldschieters gewekt. Niet alleen de financiering vanuit overheidsinstanties maar ook vanuit particuliere fondsen is gestegen. Zo stelt de 'Bill and Belinda Gates Foundation' 250 miljoen dollar beschikbaar voor wetenschappelijk onderzoek ten behoeve van bestrijding van armoede en ziekten in ontwikkelingslanden. Een deel van dit geld komt ter beschikking van onderzoek naar bestrijding van malaria en de ontwikkeling van een vaccin.⁹

Biotechnologisch 'cocktailvaccin'

Met het gebruik van een verzwakte parasiet (bijvoorbeeld verkregen door de parasiet een aantal malen te bestralen) als vaccin kan 100% protectie worden bereikt. Echter één van de grootste beperkingen hierbij is productie op grote schaal.

De huidige vaccins zijn gebaseerd op slechts enkele kenmerkende eiwitten van de parasiet. Eiwitten waarvan bekend is dat ze (gedeeltelijke) immuniteit oproepen bij de mens. Vaak bieden deze vaccins slechts gedeeltelijke bescherming. Zo biedt het tot op heden meest succesvolle vaccin bij circa 60% van de gevaccineerde mensen bescherming tegen de malariaparasiet.¹⁰ Echter, momenteel bevinden zich meerdere eiwitvaccins in de humane klinische testfase. De komende jaren zullen moeten uitwijzen in hoeverre met vaccins of combinaties aan vaccins hogere beschermingspercentages gehaald kunnen worden.

Tijdens zijn verblijf in de mens ondergaat de parasiet een aantal gedaanteverwisselingen. Door een vaccin te ontwikkelen gericht tegen meerdere stadia van de parasiet, een zogenaamd 'cocktailvaccin', wordt de kans dat de parasiet de resistentie doorbreekt sterk verkleind. Nieuwe biotechnologische technieken en meer kennis van het genoom van de parasiet en de mens bieden enerzijds de mogelijkheid meer gedetailleerd te kijken naar de wijze waarop de parasiet de resistenties weet te ontwijken en vereenvoudigt anderzijds de zoektocht naar nieuwe eiwitten voor vaccins.¹¹

Genetisch gemodificeerde muggen

De ontwikkelingen op het gebied van de biotechnologie geven een extra impuls aan het lopende malariaonderzoek en leiden daarnaast tot het betreden van nieuwe onderzoeksterreinen. Een innovatieve ontwikkeling op het gebied van malariabestrijding en genetische modificatie is het creëren van transgene muggen. De huidige technieken en kennis bieden onderzoekers de mogelijkheid om onderzoek te verrichten naar het creëren van muggen die niet langer in staat zijn de malariaparasiet over te dragen. Door de interactie tussen de mug en de parasiet te verstoren of rechtstreeks in te breken in de levenscyclus van de parasiet in de mug, wordt getracht zogeheten refractoire muggen te creëren. Deze transgene muggen zullen eender zijn aan de in het wild voorkomende

muggen met dat verschil dat deze ‘nieuwe’ muggen één gen of meerdere genen extra bezitten waardoor de parasiet niet in staat zal zijn zich in de mug te handhaven.

Door in de natuur de huidige populaties muggen te vervangen door deze transgene refractoire muggen willen wetenschappers malaria bestrijden.

Het stadium van een transgene refractoire mug die niet langer in staat is de humane parasiet over te dragen is nog niet bereikt, maar nieuwe ontwikkelingen volgen elkaar snel op. Onderzoekers verwachten dan ook binnen afzienbare tijd een transgene refractoire mug te kunnen produceren.

2. Vrijlaten van transgene muggen vraagt om nieuwe afwegingen

Het vrijlaten van transgene organismen in het milieu met als doel de van nature voorkomende populatie te vervangen en daarmee een humane ziekte te bestrijden is een nieuwe ontwikkeling op het gebied van genetische modificatie. In het milieu brengen van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) als zodanig is niet nieuw. Wereldwijd worden miljoenen hectares transgene gewassen verbouwd en ook bij genterapiestudies ten bate van de gezondheid van de mens is sprake van milieu-introducties van ggo's. Wel nieuw is het teweegbrengen van een effect in het milieu door introductie van een ggo. Waar bij de huidige introducties van ggo's in het milieu inspanningen worden verricht om de gevolgen voor het milieu te beperken is ingeval van transgene muggen het tegenovergestelde het geval. Succesvolle bestrijding van malaria vergt een snelle verspreiding van de transgene muggen en vervangen van de wilde populatie is het ultieme doel.

De keerzijde hiervan is dat een dergelijke verspreiding van ggo's niet volledig te reguleren en ook niet meer te stoppen zal zijn. Dit in tegenstelling tot de teelt van transgene gewassen of genterapiestudies waar bij ernstige negatieve gevolgen voor het milieu, het gewas van de akkers verwijderd of studies gestaakt kunnen worden.

Het verleden heeft talloze malen laten zien dat introductie van 'exoten' tot problemen kan leiden en dat deze moeilijk controleerbaar zijn. Een bekend voorbeeld hiervan is de invoer van de pad 'Queensland cane toad' in 1935 in Australië. De pad werd destijds geïntroduceerd als zijnde een effectieve bestrijdingsmethode tegen kevers die ernstige schade aanbrachten aan het suikerriet. De bestrijding faalde en de padden werden, door gebrek aan natuurlijke vijanden, een plaag. Daarbij produceren de padden toxines die zwaar toxisch zijn voor mens en dier en een bedreiging vormen voor diersoorten die zich voeden met kikkers en padden.¹² Ook dichterbij huis zijn voorbeelden te vinden. De opmars van de Japanse oesters, in 1964 geïntroduceerd in de Oosterschelde voor de oesterteelt, vormt meer dan veertig jaar later een bedreiging voor de inheemse platte (Zeeuwse) oesters. De aanwezigheid van Japanse oesters verstoort het biologisch evenwicht waardoor ook de mossel- en kokkelpopulaties worden bedreigd.¹³ Ook de introductie van de Amerikaanse vogelkers destijds ingevoerd ter verbetering van de Nederlandse bossen stuit op veel problemen. De boomsoort is zeer hardnekkig en afzagen leidt tot de vorming van meer spruiten. Hierdoor wordt de oorspronkelijke vegetatie verdrongen.¹⁴

Deze voorbeelden van introductie met een verkeerde afloop dienen slechts ter illustratie. Hoewel de transgene mug in zijn natuurlijke omgeving zal worden vrijgelaten en daardoor feitelijk niet als exoot kan worden bestempeld geven de

genoemde voorbeelden echter wel duidelijk weer dat een goede afweging voorafgaand aan introductie van belang is. Ook hier is veelal geen weg terug.

2.1 Standpuntbepaling in een vroegtijdig stadium

Hoewel de ontwikkelingen op het gebied van transgene muggen zich momenteel nog in de laboratoriumfase bevinden lijkt het, gezien de snelheid waarmee de ontwikkelingen elkaar opvolgen, zaak om afwegingen al in dit vroegtijdige stadium te maken. Enerzijds omdat in deze fase besluiten ten aanzien van financiering van vervolgonderzoek moeten worden gemaakt. Anderzijds om bij een positief besluit ten aanzien van de inzet van transgene muggen tijdig de juiste condities te scheppen waaronder introductie van deze muggen in het milieu kan plaatsvinden. Het integraal ethisch-maatschappelijk toetsingskader⁸⁶ zoals destijds voorgesteld door de COGEM kan behulpzaam zijn bij het maken van deze afwegingen.

Voorafgaand aan het besluit om financiering te verstrekken aan onderzoek ten behoeve van transgene muggen zal bekeken moeten worden wat de meerwaarde is van de inzet van transgene muggen ten opzichte van de huidige bestrijdingsmethoden en welke alternatieven er voor handen zijn. Belangrijke factoren die hierbij een rol spelen zijn elementen zoals de potentie van de nieuwe ontwikkeling, maar ook welke bezwaren kleven aan deze nieuwe techniek en of deze maatschappelijke weerstand oproept.

Een positief besluit ten aanzien van financiering van onderzoek naar transgene muggen vraagt tevens om een blik in de toekomst. Nagedacht zal moeten worden welke weg gevolgd moet worden om op een veilige en verantwoorde wijze muggen te introduceren in het milieu.

Eén van de belangrijkste voorwaarden voor een verantwoorde introductie is de garantie dat bestrijding van malaria met inzet van muggen naast veilig ook haalbaar is. Een zeer beperkte kans op succes zal gezien de omvang van een dergelijke introductie maatschappelijk niet aanvaardbaar zijn. Garanties op zowel het gebied van veiligheid als haalbaarheid moeten de schijn wegnemen dat Afrika als proefveld voor Westerse ontwikkelingen wordt aangewend. Verantwoorde introductie vergt daarom een goed voorlichtings- en communicatiebeleid.

Een belangrijke taak met betrekking tot het geven van garanties ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid is weggelegd voor wetenschappers. Van belang is dat de onderzoekswereld zijn verantwoordelijkheid neemt in deze en er voor zorgdraagt dat besluitnemers juist worden geïnformeerd. Dan alleen zal de politiek in staat zijn een goede nut-risico-afweging te maken.

Dat wetenschappers zich bewust zijn van deze taak blijkt uit de discussies die binnen de onderzoekswereld worden gehouden. Onderzoekers betrokken bij de

productie van transgene muggen worden openlijk, in vooraanstaande tijdschriften waaronder *Nature*¹⁵ en *Science*¹⁶, uitgedaagd de kritiek met name ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid te weerleggen. Deze discussie wordt nader toegelicht in paragraaf 2.4.

2.2 Het maken van afwegingen is een mondiale aangelegenheid

Aangezien het bestrijden van malaria alleen bereikt kan worden door een wereldwijde aanpak en de muggen vrijgelaten worden in het mondiale ecosysteem, is het te beperkt om te veronderstellen dat deze afwegingen louter en alleen gemaakt moeten worden door overheden van door malaria getroffen landen. Uiteraard is het eveneens onjuist te stellen dat de afweging uitsluitend moet worden gemaakt door overheden uit Westerse landen waar de biotechnologische ontwikkelingen hebben plaats gehad of die verantwoordelijk zijn voor de financiering.

Een gezamenlijke procedure leidend tot het nemen van een besluit waarbij zowel de Westerse wereld als ontwikkelingslanden worden betrokken lijkt derhalve noodzakelijk. Daarbij zullen landen die niet rechtstreeks betrokken zijn inzicht in deze procedure en waar mogelijk inspraak moeten krijgen. Immers introducties kunnen grensoverschrijdende gevolgen hebben. Ten eerste omdat de geïntroduceerde ggo's zich over landsgrenzen kunnen verplaatsen en ten tweede omdat de gevolgen van introductie zich niet hoeven te beperken tot de landen van introductie.

Voor het opstellen van deze procedure zal op mondiaal niveau overleg moeten worden gepleegd en internationale afspraken moeten worden gemaakt.

Met het onderschrijven van het protocol van Cartagena¹⁷ wordt het belang van goede internationale afspraken en transparante besluit- en afwegingsprocedures inzake bioveiligheid door veel landen onderkend. Echter het protocol is gericht op behoud van biodiversiteit en voorziet slechts in informatieverstrekking bij introductie van een ggo in het milieu waarbij grensoverschrijdende effecten kunnen optreden. Bovendien onderschrijven niet alle (mogelijk) betrokken landen het Cartagena protocol.

2.3 De transgene mug als trendsetter

De inzet van transgene muggen om malaria te bestrijden is geen ontwikkeling op zich. Ook voor de bestrijding van andere door insecten overgedragen ziekten bij de mens wordt het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen als mogelijkheid geopperd of vinden ontwikkelingen op dit gebied al plaats.¹⁸ Zo wordt geprobeerd de verschillende varianten van trypanosomiasis (o.a.

slaapziekte en Chagas disease) te bestrijden door de bacteriën in de maag van de ‘kissing bug’ (een bloedzuigende wantsensoort) genetisch te modificeren.¹⁹

De ontwikkelingen blijven niet beperkt tot de bestrijding van humane ziekte. Ook het bestrijden van dierziekten of zoogdierplagen door de inzet van genetisch gemodificeerde organismen maken onderdeel uit van deze nieuwe trend. Opmerkelijk hierbij is dat veel van de genoemde ‘plaagorganismen’ waartegen de genetisch gemodificeerde organismen zijn gericht, zoogdieren zijn die in het verleden als zijnde zeer gewenst zijn ingevoerd.

Waar het voor het bestrijden van veroorzakers van ernstige humane ziekten zoals malaria eenduidig is dat het hier organismen betreft die uitgeroeid moeten worden, ligt dit bij het bestrijden van plaagorganismen anders. Het betreffende organisme hoeft niet overal ongewenst te zijn. In het meest extreme geval wordt in een gebied het organisme als plaag gezien en bestreden en wordt elders alles in het werk gesteld om het organisme tegen uitsterven te behoeden.

Ook hier geldt in alle gevallen dat voor succesvolle bestrijding verspreiding van ggo’s in het milieu nodig is en dat op vergelijkbare wijze als voor het vrijlaten van transgene muggen nagedacht zal moeten worden welke weg gevolgd moet worden om tot een veilige en verantwoorde introductie te komen.

2.4 Het debat rond transgene muggen

Veel van de aspecten die van belang zijn voor een goede afweging zijn tevens elementen die een belangrijke rol spelen in de discussies betreffende de inzet van transgene muggen in de strijd tegen malaria. Deze discussies spelen zich tot nog toe voornamelijk af binnen de wetenschappelijke wereld. Dit komt overwegend doordat het onderzoek zich nog in de beginfase bevindt en minder zichtbaar is voor het grotere publiek en de politiek. Het ultieme doel, het maken van een competitieve transgene refractaire mug is nog niet bereikt en het loslaten van muggen in het milieu is daardoor nog niet aan de orde. Een doorbraak zal de aandacht van de media trekken waardoor hierin snel verandering kan optreden.

Veiligheid

Een centraal element in de discussie over de inzet van transgene muggen tegen malaria is veiligheid. Door sommige wetenschappers wordt de zorg uitgesproken dat de gevolgen voor het milieu, na loslaten van transgene muggen, niet te voorzien en onomkeerbaar zijn. De vrees bestaat dat de parasiet de geïntroduceerde resistentie zal doorbreken, meerdere muggen hierdoor malaria kunnen overdragen en dat het verspreidingsgebied van malaria vergroot wordt. Tevens roept het sleutelen aan het muggengenoem de vraag op of de mug in staat zal zijn andere ernstige ziekteverwekkers over te dragen, zoals

virussen verantwoordelijk voor gele koorts of het dengue virus. Hierbij wordt niet alleen gedacht aan bekende, maar ook aan nog onbekende ziekteverwekkers. Ook wordt de bedenking uitgesproken dat de parasiet zich aanpast aan een andere gastheer dan de mug. Een gastheer die wellicht nog meer schade aanricht dan de huidige vector. Volgens de tegenstanders kunnen zelfs laboratoriumonderzoeken of veldproeven dergelijke ongewenste gevolgen nimmer uitsluiten. Ook bestaat de angst voor onvoorziene gevolgen voor overige organismen in de voedselketen die bijvoorbeeld voor hun voedsel afhankelijk zijn van de mug.

Haalbaarheid

Niet alleen de mogelijke onvoorziene gevolgen maken dat een deel van de wetenschappelijke wereld sceptisch is, ook aan de haalbaarheid wordt door wetenschappers getwijfeld. De complexiteit van de interacties tussen de parasiet, de mug en de mens maakt dat zij niet geloven in een goede afloop. Bij de overdacht van malaria zijn vele muggensoorten betrokken die onderling niet uitkruisen. Verspreiden van het gen door al deze muggensoorten, noodzakelijk om malaria uit te roeien, zien zij daarom als een niet te nemen obstakel. Wetenschappers onderbouwen deze stelling met behulp van rekenkundige modellen^{20,21,22}, waarbij opgemerkt moet worden dat deze theoretisch van aard zijn en niet gevalideerd. Zij betreuren dat een deel van het toch al beperkte budget ten behoeve van malariabestrijding gependend wordt aan deze 'high-tech' muggen.

Ook het feit dat transgene muggen vaak een verlaagde vitaliteit hebben ten opzichte van niet-transgene muggen^{23,24} wordt in de haalbaarheidsdiscussie als tegenargument genoemd. Een verlaagde fitness zal in de regel ertoe leiden dat het gen verdwijnt waardoor de werkzaamheid te niet wordt gedaan.

Financiering

Hoewel een ander deel van de wetenschappelijke wereld de ontwikkelingen toejuicht, valt ook bij deze groep enige terughoudendheid te bespeuren. Zij erkennen dat hoewel ontwikkelingen op het gebied van transgene muggen elkaar in sneltreinvaart opvolgen, het stadium van loslaten in het milieu nog niet in zicht is. De voorstanders zijn echter van mening dat gezien de ernst van de malariaproblematiek en het gebrek aan vooruitgang in de bestrijding een investering in transgene muggen goed te verdedigen valt. Inzet van de huidige middelen hebben tot op de dag van vandaag malaria geen halt toegeroepen. Integendeel, het aantal slachtoffers is hoger dan ooit te voren. Zij zijn daarom van mening dat elke nieuwe poging om malaria te bestrijden een kans verdient. Mocht het inzetten van transgene muggen malaria niet kunnen uitroeien, dan

biedt wellicht een combinatie van transgene muggen en andere bestrijdingsmethoden een oplossing.

Daarnaast merken voorstanders op dat de kennis die met moleculair onderzoek ten behoeve van transgene refractoire muggen verworven wordt, tevens gebruikt kan worden bij het ontwikkelen van andere middelen en methoden ter bestrijding van malaria. Te denken valt hierbij aan nieuwe vaccins en insecticiden, maar ook het inzetten van transgene muggen ten behoeve van onderzoek naar het gedrag van de mug. De voorstanders onderstrepen dan ook het belang van financiering voor onderzoek naar genetische modificatie van muggen.

Maatschappelijke aanvaardbaarheid

Door velen wordt de vraag gesteld of Westerse landen Afrika mogen opzadelen met hun hoogtechnologische toepassingen. Hierbij wordt openlijk getwijfeld of het ontwikkelingsniveau van de betreffende landen voldoende hoog is om een goede afweging te kunnen maken. Gevreesd wordt dat ontwikkelingslanden ten onrechte hoop wordt gegeven terwijl de ontwikkelingen het niet waar kunnen maken. Tevens wordt gevreesd voor een toenemende technologiekloof. Ook in het geval van transgene muggen lijkt te gelden dat de technologieontwikkeling ten gunste valt van de kennisontwikkeling van de Westerse landen en niet van de betrokken ontwikkelingslanden. Anderen zijn echter van mening dat de inzet van transgene muggen een unieke kans biedt om door intensievere samenwerking tussen Noord en Zuid de kloof te verkleinen.

In tegenstelling tot genetische modificatie van grote dieren (met een hoge aaibaarheidsfactor) richt de discussie zich niet of nauwelijks op elementen zoals aantasting van de (soort)integriteit of het welzijn van de mug. De belangrijkste verklaring hiervoor lijkt te zijn dat muggen doorgaans als hinderlijk worden ervaren en geassocieerd worden met ernstige ziekten.

Dit neemt niet weg dat culturele en levensbeschouwelijke elementen eveneens een rol spelen in deze maatschappelijke discussie. Waarbij respect en waardering voor het milieu en het dier als belangrijkste argumenten tegen worden genoemd. Dit zijn echter elementen die niet specifiek van toepassing zijn op transgene muggen maar ook bij de algemene maatschappelijke discussie omtrent genetische modificatie van dieren naar voren komen.

Gedeelde belangen

De noodzaak om malaria een halt toe te roepen is onomstreden bij zowel voor- als tegenstanders van transgene muggen. Alle betrokkenen zijn ervan overtuigd dat de tijd dringt en dus op zeer korte termijn actie ondernomen moet worden, evenals dat hiervoor meer geld beschikbaar moet komen.

Spraakmakend onderzoek, zoals het produceren van transgene malaria-muggen, heeft de aandacht wereldwijd weer op malaria gevestigd. Naast biotechnologisch onderzoek profiteert hiervan ook aanverwant onderzoek. Ten eerste omdat met meer aandacht ook meer geld beschikbaar komt voor malariaonderzoek, en ten tweede omdat voorafgaand aan het loslaten van transgene muggen meer ecologische kennis vereist is. Dit laatste heeft geleid tot oprichting van samenwerkingsverbanden waarin ecologisch en biotechnologisch onderzoek aan elkaar gekoppeld zijn.

Ten aanzien van de veiligheid voor het milieu en haalbaarheid lijken zowel voorstanders als tegenstanders te redeneren vanuit een eender belang. De veiligheid voor zowel de mens als het milieu moet ten allen tijde voorop staan. Daarnaast moet, voorafgaand aan het loslaten van transgene muggen, met grote zekerheid gesteld kunnen worden dat malaria effectief bestreden kan worden.

2.5 Informeren van de Nederlandse overheid

Introducties in het milieu van transgene muggen ter bestrijding van malaria is een wereldwijde en daarmee dus ook een Nederlandse aangelegenheid. Aannemelijk is dat de Nederlandse overheid, of afgeleide organisaties als NWO, op korte termijn geconfronteerd zullen worden met financieringsaanvragen ten behoeve van onderzoek naar transgene muggen. Immers het betreft veelal Westerse onderzoeksgroepen die bij dit type onderzoek betrokken zijn en malariaonderzoek vindt al tientallen jaren binnen de Nederlandse onderzoeksinstellingen plaats.

Het mondiale karakter van dergelijke introducties in het milieu vraagt tevens om een standpunt van de Nederlandse overheid ten aanzien van de lange termijnsituatie. Aannemelijk is dat ook zij een (indirecte) rol zal spelen bij de bepaling welke condities geschapen moeten worden om introducties in het milieu met een bedoeld milieueffect op een veilige en verantwoorde wijze te laten plaatsvinden. Dat de Nederlandse overheid in internationale fora, in het kader van het Biodiversiteitsverdrag of in het kader van activiteiten op het gebied van ontwikkelingshulp, geconfronteerd zal worden met deze materie en gevraagd zal worden haar standpunt kenbaar te maken lijkt hierdoor reëel.

De COGEM wil middels deze signalering de Nederlandse overheid in een vroeg stadium informeren inzake de ontwikkelingen op het gebied van transgene refractoire muggen. Gezien de expertise van de COGEM ligt hierbij de nadruk op de veiligheidsaspecten. Door nader in te gaan op de in de discussie genoemde argumenten ten aanzien van veiligheid heeft de COGEM getracht meer inzicht te verschaffen welke elementen een rol spelen bij het maken van

afwegingen op dit vlak. Daarbij wordt tevens op indirecte wijze inzicht verschaft in de haalbaarheid van de transgene mug als bestrijdingsmethode.

Door het zichtbaar maken van deze elementen die van belang zijn voor een goede afweging tracht de COGEM tevens duidelijk te maken aan welke randvoorwaarden een introductie in het milieu van transgene muggen moet voldoen.

Hoewel de signalering zich richt op de introductie in het milieu van transgene muggen ter bestrijding van malaria zullen veel van de genoemde elementen, afwegingen en randvoorwaarden eveneens gelden voor tal van andere toepassingen. Een introductie in het milieu van ggo's ter bestrijding van andere ziekten dan malaria of van zoogdierplagen zoals beschreven in paragraaf 2.3 vragen om een vergelijkbare benaderingswijze. Deze signalering kan daarom als voorbeeld worden gezien voor deze nieuwe trend op het terrein van introducties in het milieu.

3 Achtergrondinformatie en wetenschappelijke vorderingen

3.1 Malaria; de ziekte

De ziekte malaria komt voor bij zowel mensen als dieren en wordt veroorzaakt door verschillende *Plasmodium* parasieten.

Er komen drie vormen van malaria voor bij de mens; *Malaria tropica*, *M. tertiana* en *M. quartana*. *M. tropica*, ook wel Falciparummalaria of hersenmalaria genoemd, is de meest voorkomende en meest dodelijke vorm. Deze vorm van malaria wordt veroorzaakt door de parasiet *Plasmodium falciparum*. Voor de overige twee vormen van malaria, *M. tertiana* en *M. quartana* zijn drie andere parasieten verantwoordelijk. De *Plasmodium* parasieten *P. vivax* en *P. ovale* veroorzaken *M. tertiana* en *P. malariae* veroorzaakt *M. quartana*. Infecties van *P. vivax* komen het meest voor van de drie. Bij deze laatste twee malariavormen blijven de symptomen veelal beperkt tot koortsaanvallen.²⁵

Zeer recent werd melding gemaakt van een eventuele vijfde parasiet die malaria bij de mens kan veroorzaken, te weten *P. knowlesi*. Getwijfeld wordt echter of het hier een nieuwe soort dan wel een variant van *P. malariae* betreft.²⁶

De malariaparasiet

De humane parasiet heeft de mug zowel nodig om overgedragen te worden naar de mens als om zijn levenscyclus rond te maken. Het overige deel van zijn levenscyclus brengt de parasiet door in de mens.

In de mens

Bij een beet van een geïnfecteerde mug injecteert de mug de parasiet, in de vorm van zogenaamde sporozoieten, in de bloedbaan van de mens. Direct daarna verplaatsen de sporozoieten zich naar de lever, dringen de levercellen binnen en ontwikkelen zich daar tot merozoïeten. In het geval van een besmetting van *P. falciparum* duurt deze metamorfose circa vijf tot zes dagen. De merozoïeten maken zich vervolgens vrij uit de lever, dringen rode bloedcellen binnen en vermenigvuldigen zich. Na ongeveer 48 uur barsten de bloedcellen open waarna de vrijgekomen merozoïeten nieuwe bloedcellen infecteren. De periode dat de parasiet zich in de lever bevindt vertoont de mens geen ziekteverschijnselen. Deze treden pas op bij het openbarsten van de bloedcellen en bij het vrijkomen van door de parasiet geproduceerde toxines in de bloedbaan. Enkele merozoïeten vormen mannelijke of vrouwelijke gametocyten. Wanneer een mug vervolgens bloed opneemt van een met malaria besmet persoon neemt zij de gametocyten op. De ontwikkelingsduur van de

parasiet in de mens is tien tot negentien dagen, afhankelijk van de parasietensoort.

In de mug

De gametocyten komen samen met het bloed in het maagdstelsel van de mug terecht. In de middendarm aangekomen veranderen de gametocyten in gameten. De mannelijke gameten versmelten met vrouwelijke gameten waardoor zygoten ontstaan. Om uiteindelijk weer als sporozoot met het speeksel mee overgedragen te worden naar de mens moet de zygoot in de mug nog een aantal veranderingen ondergaan en twee membranen passeren. De eerste passage om vanuit de middendarm naar de hemolymfe te komen en een tweede passage om vanuit de hemolymfe naar de speekselklieren.

Om het eerste membraan, het middendarmmembraan te kunnen passeren ontwikkelen de zygoten in de middendarm zich verder tot mobiele oökineten. De oökineten verplaatsen zich vanuit het lumen van de middendarm over het membraan ook wel epitheel genoemd, naar de hemolymfe. De hemolymfe is de holte in de mug waarin zich de verschillende organen bevinden. De oökineten nestelen zich aan de hemolymfezijde van het epitheel en differentiëren zich tot oöcysten. Na circa één tot twee weken rijpen komen uit deze oöcysten de sporozooten vrij. Hierna moet een tweede membraan, het speekselkliermembraan worden gepasseerd. Slechts een beperkt aantal sporozooten blijkt hiertoe in staat en komt in de speekselklieren terecht.^{27,28} Hierna kan de mug via het speeksel mensen infecteren met de parasiet en is de cyclus rond. Het gehele ontwikkelingsproces van gametocyt tot sporozoot duurt minimaal een week en is temperatuursafhankelijk.

In tegenstelling tot de mens ondervindt de mug relatief weinig hinder van de aanwezigheid van de parasiet. Hoewel met parasieten geïnfecteerde muggen wel een verminderde reproductie en een verminderde overlevingskans hebben zijn deze afnames beperkt.

De malariamug

Overdracht van de humane malariaparasieten vindt plaats door muggen van het genus *Anopheles*. Vrouwelijke muggen van dit genus hebben bloed nodig voor de ontwikkeling van de eieren die zij bij zich dragen.

De meeste *Anopheles* soorten zijn niet in staat plasmodium parasieten over te dragen en slechts een beperkt aantal combinaties *Plasmodium* en *Anopheles* kunnen malaria veroorzaken²⁹. In Afrika is de soort *A. gambiae* de belangrijkste vector van de parasiet *P. falciparum*. Echter ook andere soorten zoals *A. arabiensis*, *A. funestus* en *A. merus* kunnen deze dodelijke parasiet overbrengen. Dat *A. gambiae* de belangrijkste vector is komt onder meer door het verspreidingsgebied van deze muggensoort. In grote delen van Afrika, met

name in de streken waar het merendeel van de slachtoffers vallen (ten zuiden van de Sahara), wordt *A. gambiae* aangetroffen. Minder gunstige klimatologische en geografische omstandigheden voor *A. gambiae* maken echter dat in bepaalde gebieden de soorten *A. arabiensis* of *A. funestus* de belangrijkste overdragers van malaria zijn.³⁰

Malaria bij dieren

De ziekte malaria beperkt zich niet tot de mens maar wordt ook aangetroffen bij dieren. In apen, vogels, hagedissen en knaagdieren, waaronder ratten, zijn *plasmodium* parasieten aangetroffen. Opmerkelijk hierbij is dat malaria nooit is aangetroffen in gedomesticeerde dieren.³¹

Een zeer beperkt aantal humane malariaparasieten kan ook apen infecteren en vice versa. *P. falciparum* kan de nachtaap en het doodshoofdaapje infecteren en *P. vivax* chimpansees. Verondersteld wordt dat *P. malariae*, veroorzaker van het humane quartane malaria oorspronkelijk uit apen afkomstig is.³²

Overdracht van parasieten vindt bij dieren eveneens door muggen van het genus *Anopheles* plaats. Uitzondering hierop is malaria bij vogels waarbij overdracht voornamelijk plaatsvindt door muggen van het genus *Aedes*. Evenals voor de mens geldt dat dierlijke malariaparasieten zich niet in elke *Anopheles* soort kunnen ontwikkelen en dat de combinatie parasiet-mug uniek is of beperkt tot een aantal sterk verwante soorten.

Vogels en ratten als modelorganismen

Gezien de beperkte mogelijkheden om laboratoriumexperimenten uit te voeren met mensen in combinatie met de humane malariaparasiet vindt veel van het oriënterend onderzoek plaats met ratten- en vogelmalaria. Rattenmalaria wordt veroorzaakt door *P. bergheii* en wordt overgedragen door *A. stephensi*. De parasiet *P. gallinaceum* is de veroorzaker van malaria bij vogels en wordt overgedragen door *Aedes aegypti*. De voorkeur gaat hierbij uit naar onderzoek met ratten. Enerzijds omdat deze eenvoudig te houden en te kweken zijn, anderzijds omdat de rattenparasieten door muggen van hetzelfde genus; *Anopheles*, worden overgedragen.

3.2 De productie van transgene refractoire muggen

Veel van de gereedschappen nodig voor het vervaardigen van transgene muggen zijn in de afgelopen jaren ontwikkeld. Genen kunnen stabiel in het muggengenoem worden ingebouwd^{33,34,35} en zijn overdraagbaar naar het nageslacht.³⁶ Daarbij kunnen deze transgenen door het gebruik van specifieke promoters gericht tot expressie worden gebracht. Hierdoor wordt het mogelijk om de werking van het gen te beperken tot bepaalde organen/delen van de mug.

Tevens kan met het gebruik van een specifieke promotor het moment waarop het gen tot expressie komt worden bepaald. Een goed voorbeeld hiervan is het gebruik van de Carboxypeptidase (CP) promotor. Bij gebruik van deze promotor komt het gen tot expressie in de middendarm van de mug en wordt geactiveerd als de mug bloed opneemt.³⁴

Het grootste succes is tot op heden geboekt met transgene muggen die refractoir zijn voor de rattenmalariaparasiet. Onderzoekers creëerden transgene muggen van het soort *A. stephensi* die niet langer of slechts zeer beperkt in staat bleken te zijn de malariaparasiet *P. bergheii* over te dragen naar ratten.³⁴ Echter transgene *Anopheles* muggen refractoir voor de humane malariaparasiet *P. falciparum* zijn nog niet beschikbaar. De verwachting van deskundigen is dat hier op korte termijn verandering in zal optreden. Het vertalen van de resultaten gevonden voor rattenmalaria naar humane malaria lijkt slechts een kwestie van tijd.

Twijfels bestaan echter of op dergelijke wijze verkregen transgene refractoire muggen ook geschikt zijn voor de bestrijding van malaria. De refractoire *A. stephensi* muggen zijn ontstaan na inbouw van slechts één gen. Gezien de genetische diversiteit én het snelle aanpassingsvermogen van de malariaparasiet verwachten deskundigen dat dit onvoldoende is en snel doorbroken zal worden. Voor succes is het noodzakelijk dat alle parasieten gedurende een langere periode worden geblokkeerd. Indien een klein percentage van de parasieten, vanwege de genetische diversiteit binnen de parasietpopulatie in de mug, in staat is de blokkade te omzeilen, vindt selectie van deze ongevoelige parasieten plaats en wordt daarmee het refractoire karakter van de mug doorbroken. De overdracht van één of enkele parasiet(en) is namelijk voldoende om een infectie in de mens te veroorzaken en daarmee de cyclus rond te maken.³⁷

Het vermogen van de parasiet om zich snel aan te passen aan nieuwe situaties verhoogt eveneens de kans op het doorbreken van het refractoire karakter van de mug. Experimenten met malariaparasieten in knaagdieren onderstrepen dit fenomeen. Het uitschakelen van een oppervlakte-eiwit van de parasiet, in eerste instantie noodzakelijk verondersteld bij het passeren van het speekselklier-membraan, gaf niet het verwachte resultaat. De overdracht van de parasiet door de mug werd slechts geremd, niet geblokkeerd. De parasiet ging over op het produceren van een ander oppervlakte-eiwit dat vervolgens de rol van het uitgeschakelde eiwit overnam.³⁸

De wijze waarop de parasiet het humane immuunsysteem weet te omzeilen is eveneens een goed voorbeeld van het aanpassingsvermogen van de parasiet. Dit is tevens de reden dat een volledige immuniteit bij de mens niet wordt bereikt. Vergelijkbare aanpassingen treden op bij het gebruik van vaccins waardoor deze slechts gedurende korte periodes bruikbaar zijn.

Om de genetische variatie en het aanpassingsvermogen van de parasiet te omzeilen is het volgens deskundigen noodzakelijk om een combinatie aan genen in te bouwen. Waarbij een combinatie aan genen gericht op verschillende ontwikkelingsstadia van de parasiet de hoogste kans van slagen heeft.^{34,39}

3.2.1 De zoektocht naar geschikte genen

Een belangrijk deel van de zoektocht naar geschikte genen richt zich op het immuunsysteem van de mug. Niet alle muggen van het genus *Anopheles* dragen de plasmodiumparasiet over, het merendeel is van nature refractoir. Bij veel van deze refractoire muggen is het immuunsysteem in staat de binnendringende parasieten te vernietigen. Versterken van het afweermechanisme door het inbouwen in het muggengenoom van een transgen met antiparasitaire werking wordt daarom gezien als een mogelijkheid om refractoire muggen te produceren.

Daarnaast wordt gezocht naar genen die ingrijpen in de levenscyclus van de parasiet in de mug. Enerzijds naar genen die zorgen dat de parasiet geïnactiveerd wordt, bijvoorbeeld door het inbouwen van een gen coderend voor een voor de parasiet toxische stof. Anderzijds wordt geprobeerd genen te identificeren die coderen voor eiwitten die interacteren met de oppervlakte-eiwitten van de parasiet. Dergelijke interacties moeten de passages van de parasiet over de middendarm- en speekselkliermembraan tegengaan of gedaante verwisselingen zoals de vorming van oöcysten of sporozoieten verhinderen.

Ook wordt geopperd om veranderingen aan te brengen in de gastheervoorkeur en het steekgedrag van de mug. De soorten *A. gambiae* en *A. funestus* voeden zich hoofdzakelijk met humaan bloed en doen dit bij voorkeur binnenshuis. Een voorkeur voor een andere gastheer of buitenshuis voeden zou de overdracht van malariaparasieten tegen kunnen gaan. Genen die hierbij een rol spelen lijken echter nog niet geïdentificeerd en het is nog onduidelijk in hoeverre dergelijke modificaties realistisch zijn.

Versterken van het afweermechanisme van de mug

Een veel besproken en onderzocht afweermechanisme in insecten welke in actie komt bij binnendringen van ongewenste indringers is ‘melanotic encapsulation’. Een mechanisme dat zeer algemeen van aard en werkzaam tegen tal van ziekteverwekkers is. Voorafgaand aan vernietiging worden binnendringers zoals bacteriën, schimmels maar ook parasieten, ingekapseld. Onderzoek naar ‘melanotic encapsulation’ bij de mug heeft geleid tot het aanwijzen van gebieden op het genoom van de mug die betrokken zijn dit proces.⁴⁰

Naast dat genen van de mug betrokken zijn bij het proces van inkapselen lijkt de parasiet hier eveneens invloed op uit te oefenen. Onderzoekresultaten

suggereren dat de parasiet het afweermechanisme van de mug onderdrukt of componenten in het humane bloed bewerkt waardoor het afweermechanisme van de mug wordt geïnactiveerd.⁴¹ Bij muggen die gevoed werden met parasietgeïnfecteerd bloed bleek het inkapselmechanisme minder efficiënt te werken dan bij muggen waarvan het bloedmaal geen parasieten bevatte.⁴² De kennis van een dergelijke samenhang tussen de mug en de parasiet maakt dat onderzoekers genen betrokken bij het immuunsysteem van de mug als goede kanshebbers beschouwen voor het produceren van transgene refractoire muggen.

Op basis van kennis van het genoom van het modelorganisme *Drosophila melanogaster* zijn 242 genen van *A. gambiae* geïdentificeerd die betrokken zijn bij het immuunsysteem van de mug.⁴³ Daarnaast zijn gebieden op het genoom van de mug geïdentificeerd die betrokken zijn bij resistentie tegen de parasiet.⁴⁴

Methoden gebaseerd op 'RNA-interfering (RNAi)' en dsRNA-injecties maken het mogelijk om meer gedetailleerd naar genen te zoeken. Door het inbrengen van RNA-fragmenten corresponderend met een gen kan de werking van het bewuste gen worden onderdrukt. Hierdoor kan de functie van het gen en de rol van het gen in bepaalde 'pathways' worden bepaald.⁴⁵ Het inactiveren (knock-out) van ongeveer honderd genen gerelateerd aan het immuunsysteem van de mug, resulteerde in de vondst van drie genen die betrokken zijn bij de afweer van de mug tegen de parasiet. Het onderdrukken van twee van deze genen (het CTL4- of het CTLMA2-gen) maakt dat de mug respectievelijk 97% en 53% van de in de maag aanwezige parasieten vernietigde. Inactiveren van het derde gen; LRIM1, gaf een tegenovergesteld effect te zien. Het aantal parasieten in de vorm van oökineten nam toe.⁴⁶

Onderbreken van de levenscyclus van de parasiet in de mug

Voor het volbrengen van zijn levenscyclus in de mug is het passeren van twee membranen voor de parasiet essentieel. Eiwitten gelegen op deze membranen spelen bij deze passages een belangrijke rol evenals de oppervlakte-eiwitten van de parasiet. Blokkeren van de membraaneiwwitten van de mug of de oppervlakte-eiwitten van de parasiet kan de passage van de parasiet over de membranen verhinderen.

Het aantal *P. gallinaceum*-sporozieten (vogelmalaria) nam sterk af nadat een gen verantwoordelijk voor de productie van antilichamen, gericht tegen de oppervlakte eiwitten van de parasiet, in de mug tot expressie werd gebracht.⁴⁷ Hechten van deze antilichamen aan de parasiet maakten passeren van de membranen zo goed als onmogelijk. Vergelijkbare resultaten werden gevonden bij de rattenmalaria *P. berghei*.⁴⁸ In beide gevallen waren de genen verantwoordelijk voor de productie van de antilichamen niet in het muggengenoom ingebouwd. Stabiele inbouw in het genoom lijkt de volgende stap.

Ook genen afkomstig uit andere organismen of genen coderend voor synthetische eiwitten worden gezien als mogelijke kandidaatgenen voor het creëren van transgene refractoire muggen. Voorbeelden hiervan zijn genen coderend voor niet-mugeigen antimicrobiële eiwitten 'Defensin A'⁴⁹ en 'Cecropin A'.⁵⁰ Onderzoek heeft aangetoond dat naast een antimicrobiële werking deze eiwitten tevens een antiparasitaire werking hebben. Voor transgene *Aedes* muggen voorzien van het 'Defensin A'-gen werd remming van de ontwikkeling van oöcysten van *P. gallinaceum* waargenomen. Inbouw van deze genen in *Anopheles* muggen lijkt dan ook potentie te hebben.⁵¹

Door het in overmaat tot expressie brengen van het synthetische SM1-eiwit in een transgene *A. stephensi* mug werd transport van de parasiet over de membranen sterk gereduceerd.³⁴ Het SM1-eiwit vertoont duidelijke overeenkomsten met een mugeigen membraaneiwit.²⁸

Door dezelfde onderzoeksgroep werden goede resultaten verkregen met het inbouwen van het 'phospholipase A2' (PLA2)-gen afkomstig van bijen. De vorming van oöcysten van de rattenmalariaparasiet *P. bergheii* werd in deze transgene muggen met 87% verminderd.⁵² De stof PLA2 wordt bij slangen en bijen, maar ook bij andere insecten aangetroffen in het gif. De aanwezigheid van PLA2 voorkomt hechting van oökineten aan het middendarmmembraan.⁵³

Daarnaast wordt het inbouwen van genen verantwoordelijk voor het inactiveren van secretie-eiwitten van de parasiet genoemd. Secretie-eiwitten worden door de parasiet uitgescheiden in de mug en zijn voor de parasiet van essentieel belang om te overleven in de mug. Hoewel inbouw van dergelijke genen nog niet heeft plaatsgevonden lijkt de wijze van inactivatie wel mogelijkheden te bieden. Het aantal oöcysten werd sterk gereduceerd nadat het door de parasiet uitgescheiden enzym chitinase werd geïnactiveerd.⁵⁴ Daarnaast zijn zowel in het zygoten-, oökineten- als het sporozoietenstadium secretie-eiwitten gevonden die indien geïnactiveerd wellicht een negatief effect op de levenscyclus van de parasiet hebben.⁵⁵

3.3 Verspreiding van het transgen door de populatie

Met het vinden van het juiste gen of een combinatie van genen is het doel nog niet bereikt. Voor een succesvolle bestrijding van malaria met transgene muggen is het noodzakelijk dat transgenen zich versneld door de wilde muggenpopulatie verspreiden. Overerving naar het nageslacht via de 'normale' Mendeliaanse weg is niet toereikend. Bij een trage verspreiding van het transgen neemt de kans sterk toe dat de werking van het gen (of de genen) wordt doorbroken. Een snelle verspreiding lijkt daarom vereist.

Het hebben van een gen met een duidelijk voordeel voor de mug zou deze snelheid kunnen bewerkstelligen. Een gen met antiparasitaire werking lijkt dit

selectieve voordeel echter niet te kunnen bieden. Hoewel muggen zonder parasiet een langer leven beschoren zijn en meer nakomelingen krijgen is dit voordeel dusdanig klein dat algemeen aangenomen wordt dat dit onvoldoende is. Ook het feit dat muggen zonder parasiet minder vaak worden gedood lijkt hierin geen veranderingen te brengen. De speekselklieren van met de parasiet geïnfecteerde muggen scheiden minder van het enzym apyrase uit, waardoor geïnfecteerde muggen langer zuigen en vaker prikken. Door het intensievere contact met de mens stijgt de kans voor de geïnfecteerde mug om gedood te worden met 37,5%.⁵⁶

Een insecticideresistentiegen kan wel een selectief voordeel bieden. Na bestrijding met het insecticide waartegen de resistentie is gericht, zullen in een gemengde populatie alleen die muggen overleven die het resistentiegen bezitten. Door het anti-parasitaire gen te koppelen aan het insecticideresistentiegen kan de wilde populatie vervangen worden door een refractoire populatie. Deze strategie heeft echter een aantal nadelen. Voor proeven in laboratoria, in (biosfeer)kassen en in geïsoleerde gebieden met een beperkte populatie kan dit wellicht werken, maar om in grote gebieden op deze wijze muggenpopulaties te vervangen wordt als onuitvoerbaar gezien. Wil een dergelijke vervanging succesvol zijn dan moeten enorme aantallen muggen losgelaten worden.

Daarnaast lijkt het noodzakelijk om de ontstane niche direct op te vullen met transgene refractoire muggen. Herhaaldelijk spuiten met insecticide en daarmee opbouw van resistentie van de niet-transgene muggen tegen het insecticide moet worden vermeden.²³ Aangezien voor de huidige insecticiden veelal resistentie bestaat in de wilde muggenpopulatie, moet hierbij gebruik gemaakt worden van een niet eerder toegepast insecticide. Daarbij moet, om resistentieopbouw bij de wilde populatie tegen te gaan, de inzet van dit insecticide alleen gebruikt worden in combinatie met transgene muggen. Om een werkzaam insecticide niet breed beschikbaar te stellen is echter discutabel.

Een andere mogelijkheid naast het maken van transgene muggen met een selectief voordeel is het gebruik van mechanismen die in natuurlijke populaties voor een snelle verspreiding van genen zorgen. Aandacht gaat hierbij uit naar het gebruik van (symbiotische) bacteriën van de mug of het gebruik van transposons.

3.3.1 (Symbiotische) bacteriën

Insecten die zich voeden met relatief eenzijdige diëten, zoals bloed, huisvesten in veel gevallen symbiotische micro-organismen. Deze symbionten zijn vaak sterk gerelateerd aan hun gastheer. Ze synthetiseren voor de gastheer ontbrekende nutriënten en zijn op hun beurt voor voedingstoffen afhankelijk van hun gastheer. Omdat het hebben van de symbiont een voordeel biedt voor de gastheer vindt overdracht naar het nageslacht vaak op ingenieuze wijze plaats, waardoor tot zeer hoge percentages nakomelingen de symbiont bezitten. Deze nauwe band biedt de mogelijkheid om een transgen sneller dan via de normale ‘mendeliaanse overerving’ door de vectorpopulatie te verspreiden. Door symbionten te voorzien van genen met anti-parasitaire werking kan in de muggenpopulatie bestrijding van parasieten worden bereikt. Doordat hier niet de vector maar de bacterie in de vector genetisch wordt gemodificeerd spreken we niet van transgenese maar van paratransgenese.^{57,58}

Dat door het gebruik van transgene symbionten de overdracht van parasieten geremd kan worden én het gen zich door de vectorpopulatie verspreidt is aangetoond met de endosymbiont *Rhodococcus rhodnii* van de wants *Rhodnius prolixus*.¹⁹ Overdracht van de parasiet *Trypanosoma cruzi*, veroorzaker van de Zuid-Amerikaanse slaapziekte, door de wants werd door de aanwezigheid van de transgene bacterie sterk verminderd. Overdracht van de symbiont, al dan niet transgeen, vindt in dit geval via voedselopname plaats. Bij het aanprikken om bloed scheidt de wants afvalstoffen uit. Deze feces bevatten de symbiotische bacteriën. Wantsen die vervolgens dezelfde persoon prikken nemen tegelijkertijd met het bloed ook de feces en daardoor de symbionten op. Wantsen die gedurende het begin van hun levensfase de symbiont niet opnemen zullen niet overleven.

Wolbachia

Een andere potentiële kandidaat voor paratransgenese lijkt de bacterie *Wolbachia*. Vanwege de aanwezigheid in vectoren van vectoroverdraagbare ziekten zoals filariasis, encephalitis (hersenvliesontsteking) en dengue (knokkelkoorts) en vanwege hun ingenieuze verspreidingsmechanisme wordt *Wolbachia* genoemd als mogelijke hulpmiddel bij de bestrijding van ziekten.^{57,59,60,61}

Wolbachia's zijn intracellulaire bacteriën die voorkomen in pissebedden, mijten en nematoden en ongeveer 20% van de insectensoorten. De bacterie is wijdverspreid waarbij superinfecties; infecties met meer dan één *Wolbachia*soort, veelvuldig in insectenpopulaties voorkomen. Ook in tropische muggen wordt *Wolbachia* in grote hoeveelheden aangetroffen.

Hoewel de aanwezigheid van *Wolbachia* geen nadelige gevolgen lijkt te hebben voor de fitness van de gastheer, heeft deze wel gevolgen voor het reproductiegedrag van de gastheer. Het induceren van cytoplasmatische incompatibiliteit (CI), ook wel genetische incompatibiliteit (GI) genoemd, waardoor kruisingen tussen wel en niet-geïnfecteerde individuen resulteren in geen of steriele nakomelingen, en de inductie van partenogenese (voortplanting zonder bevruchting) zijn de meest voorkomende.

In muggen induceert *Wolbachia* genetische incompatibiliteit. Wanneer met *Wolbachia*-geïnfecteerde mannetjes paren met niet-geïnfecteerde vrouwtjes komen er geen nakomelingen, maar de reciproke kruising; niet-geïnfecteerde mannetje met een geïnfecteerd vrouwtje is fertiel en alle nakomelingen bezitten *Wolbachia*. Het met *Wolbachia*-geïnfecteerde vrouwtjes heeft een reproductievoordeel in vergelijking met ongeïnfecteerde vrouwtjes. Dit overwicht zorgt er voor dat het aantal met *Wolbachia*-geïnfecteerde muggen snel toeneemt. Dit unieke verspreidingsmechanisme maakt *Wolbachia*

***Wolbachia* en Genetische Incompatibiliteit**

Wolbachia's worden overgedragen naar het nageslacht via het cytoplasma van de eicellen. Hoewel *Wolbachia* in geïnfecteerde mannetjes niet voorkomt in het cytoplasma van de spermacel verandert deze onder invloed van *Wolbachia* op dusdanige wijze dat vertraagde pronucleusvorming optreedt. Kernversmelting tijdens bevruchting vindt op onvolledige wijze plaats waardoor geen nakomelingen worden verkregen.⁶² Bij de reciproke kruising; sperma van een niet-geïnfecteerd mannetje met een eicel van een met *Wolbachia*-geïnfecteerd vrouwtje, vindt de ontwikkeling van de mannelijke pro-nucleus en daardoor kernversmelting wel op de juiste wijze plaats. De nakomelingen zijn in het bezit van *Wolbachia*. Bij een kruising waarbij zowel de spermacel als de eicel geïnfecteerd zijn, treedt een zogeheten 'rescue' op. Ook in dit geval ontwikkelt de mannelijke pro-nucleï op de juiste wijze, is de kruising fertiel en zijn nakomelingen in het bezit van *Wolbachia*.

tot een potentiële kandidaat om genen versneld door een populatie te verspreiden. Vrijlaten van een beperkt aantal muggen voorzien van *Wolbachia* met het gewenste gen zou een kettingreactie teweeg kunnen brengen.

Een prettige bijkomstigheid is het brede celtropisme van *Wolbachia*. Naast geslachtscellen kunnen ook een tal van somatische cellen worden geïnfecteerd. Hierdoor kan *Wolbachia* gebruikt worden om het gen in verschillende weefseltypen tot expressie te laten brengen.

Naast inbouwen van het gewenste gen in het genoom van de *Wolbachia* wordt ook het gebruik van het zogeheten cytoplasmatisch element van *Wolbachia*, dat eveneens mee overgedragen wordt naar het nageslacht, genoemd als gereedschap voor genoverdracht.⁶¹ Toevoegen van het antiparasitaire gen aan het cytoplasmatisch element maakt verspreiding van het transgen eveneens mogelijk.

Resultaten met genetisch gemodificeerde *Wolbachia* zijn nog niet geboekt. Tot voor kort was een grote beperking het niet kunnen kweken van de *Wolbachia* buiten de gastheer. Recent werd gepubliceerd dat het mogelijk is *Wolbachia* in vitro in insectencellen te kweken.⁶⁰ Dit zou een aanzet kunnen zijn voor het genetisch modificeren en dus het gebruik van *Wolbachia* als expressiesysteem voor de verspreiding van transgenen. Tevens biedt dit de mogelijkheid om genen te identificeren die betrokken zijn bij het induceren van genetische incompatibiliteit. Gelijktijdig transformeren van het genoom van de mug met het gewenste transgen en het GI-gen van *Wolbachia* lijkt dan ook een mogelijkheid om transgene refractaire muggen te maken.

Stand van zaken voor Anopheles muggen

In muggen van het genus *Anopheles* zijn meerdere bacteriesoorten aangetroffen in het maagdarmsstelsel waaronder *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Serratia* en *Bacillus*. Onderzoekers⁴⁸ slaagden erin om met behulp van transgene *Escherichia*-bacteriën de overdracht van de rattenmalariaparasiet *P. bergheii* door de mug *A. stephensi* te remmen. De gebruikte bacterie, *Escherichia coli* leeft, hoewel aangetroffen in de maag van de mug, echter niet in symbiose met de mug. Transgenen gelegen op het genoom van deze bacterie komen daardoor slechts tijdelijk tot expressie.

Symbionten worden veelal aangetroffen in insecten die zich voeden met relatief eenzijdige diëten zoals bloed. Hoewel *Anopheles* muggen zich voeden met bloed, bestaat hun dieet niet uitsluitend uit bloed. Ze voeden zich tevens met bloem- en plantsappen. Bovendien zijn het alleen de vrouwtjesmuggen die zich voeden met bloed. Voor zover bekend zijn *Anopheles* muggen dan ook niet afhankelijk van symbionten.^{57,59} Overdracht van symbionten naar het nageslacht vindt voor zover bekend niet plaats.

Ondanks het feit dat het gebruik van *Wolbachia* potentie heeft²³, wordt van het gebruik van transgene *Wolbachia* in *Anopheles* muggen nog geen melding gemaakt. De ontwikkelingen op dit gebied lijken zich vooralsnog te beperken tot de zoektocht naar een geschikte *Wolbachia* soort. De zoektocht beperkt zich daarbij niet tot muggen van *Anopheles*, ook in andere organismen en muggensoorten wordt naarstig gezocht. Zo zijn *Wolbachia*'s aangetroffen in de muggen van de genera *Culex* en *Aedes*.⁶¹ Pogingen om *Wolbachia* van *Culex* naar *Anopheles* over te brengen mislukten. Verwacht wordt dat de kans van slagen toeneemt wanneer een betere opzuiveringsmethode voor *Wolbachia* beschikbaar komt. Het in vitro kunnen kweken maakt deze opzuivering op termijn wellicht mogelijk.

3.3.2 Transposons

Vanwege de afwezigheid van bruikbare bacteriën gaat de meeste aandacht uit naar het gebruik van transposons als verspreidingsmechanisme. Transposons, ook wel 'jumping genes' genoemd zijn DNA-fragmenten die zich vrij kunnen bewegen door het genoom van een cel. Deze DNA-fragmenten hebben het vermogen om tijdens de bevruchting van de eicel met een spermacel zich te repliceren en te verplaatsen tussen chromosomen. Hierdoor kan de meerderheid van de nakomelingen van een kruising tussen een individu met transposon en een individu zonder, het transposon bezitten.

Voor de meest bekende transposon, het P-element in de fruitvlieg *D. melanogaster*, werd deze verhoogde toename waargenomen. P-elementen werden ongeveer 50 jaar geleden voor het eerst aangetroffen in *D. melanogaster*. Sindsdien heeft het P-element zich verspreid over alle populaties van de soort en zijn momenteel nagenoeg alle fruitvliegen in het bezit van het P-element. Alleen oude laboratoriumstammen zijn nog P-elementvrij⁶³.

Onduidelijk is wat de drijfveer achter het mechanisme is. Een aanwijsbare reden voor het voorkomen van transposons ontbreekt en onduidelijk is of de gastheer een voordeel heeft bij het bezit ervan.

Transposons als vectorsysteem

Transposons worden vanwege hun unieke eigenschap veelvuldig gebruikt als vector bij transformatie-experimenten. Zo vindt het genetisch modificeren van insecten, waaronder muggen, met behulp van vectorsystemen plaats die gebaseerd zijn op transposons.

In een vroeg stadium worden embryo's geïnjecteerd met een plasmide voorzien van een gemodificeerd transposon waarin het transgen is ingebracht. Tussen de 'inverted repeats' van het transposon kan DNA met lengtes tot 15 kb worden geplaatst zonder verlies aan springvermogen.⁶⁴ Om tot een stabiele inbouw van het transgen te komen is de codering voor het enzym transposase verwijderd en in een tweede plasmide geplaatst; de zogeheten helperplasmide. Eenmaal

Werking van transposons

Op het transposon ligt onder meer de code voor het enzym transposase. De aanwezigheid van dit enzym geeft de transposon het vermogen om zich te dupliceren, uit het genoom te knippen en te reïntegreren elders in het genoom. Het enzym transposase bindt zowel aan de *inverted repeats* op de transposon als op de plek waar het transposon in het genoom naartoe getransporteerd zal worden. De keuze voor de te integreren plek in het gastheer-DNA is in veel gevallen willekeurig maar kan ook sequentie-gerelateerd zijn. De transposon en het genoom worden door het enzym geknipt op een wijze vergelijkbaar aan een restrictie-enzym die *sticky ends* achterlaat. Het transposon wordt vervolgens in de open plek geligeerd.

ingebouwd in het insectengenoom zal het transposon met het ingebouwde gen, zich vanwege de afwezigheid van transposase niet meer kunnen verplaatsen.

Voor muggen van de soorten *Aedes* en *Anopheles* is aangetoond dat het stabiel inbouwen van een gen met behulp van een op transposons gebaseerd vectorsysteem mogelijk is. In alle gevallen is, hoewel in muggen wel transposons zijn aangetroffen⁶⁵, gebruik gemaakt van een niet-mug eigen transposons. Transposons afkomstig uit andere insecten blijken niet alleen binnen de soort maar ook buiten de soort bruikbaar te zijn. Zo werden transgene muggen gemaakt met behulp van het minos-transposon afkomstig uit de fruitvlieg *Drosophila hydei*³³ het mariner-transposon van de fruitvlieg *D. melanogaster*⁶⁶ het hermes-transposon van de huisvlieg *Musca domestica*⁶⁷ en het PiggyBac-transposon van de mot 'cabbage looper'.^{52,34}

4 De gevolgen voor het milieu

Risico kan worden gedefinieerd als het product van de kans op een ongewenste gebeurtenis en het ongewenste effect dat hierbij optreedt. Doorgaans wordt bij genetische modificatie van dieren, waaronder insecten, ontsnappen en verspreiden als ongewenste gebeurtenissen ervaren. Hierbij kan gedacht worden aan het ontsnappen van transgene dieren voor onderzoeksdoeleinden uit kooien in laboratoria of het ontsnappen van transgene zalmen uit netten in zee. Als ongewenst effect wordt veelal het veranderen van (ecologische) eigenschappen van de wilde populatie genoemd en de eventuele effecten hiervan op het ecosysteem.

Bij de risicobeoordeling van transgene muggen die losgelaten worden in het milieu ten behoeve van malariabestrijding speelt een element zoals ontsnapping van transgene muggen geen rol. Het doel is namelijk om de oorspronkelijke wilde populatie te vervangen. Verspreiding van de transgene mug is zeer wenselijk en uitkruisen met de wilde populatie of vervangen van de wilde populatie is zelfs noodzakelijk om het gewenste resultaat te bereiken.

Het doel van de modificatie, het verkrijgen van refractoire muggen, lijkt als zodanig geen nadelige gevolgen voor de mens of het milieu met zich mee te brengen. Refractoire *Anopheles* muggen worden ook in de huidige wilde populatie al veelvuldig aangetroffen.^{44,68} De risicobeoordeling bij het vrijlaten van transgene muggen zal zich daarom moeten richten op veranderingen die de modificatie teweegbrengt in het gedrag of eigenschappen van de mug en op verspreiding van genen buiten de muggenpopulatie. Daarbij moeten de mogelijke nadelige effecten afgezet worden tegen de effecten die conventionele middelen ten behoeve van malariabestrijding met zich meebrengen.

Aangezien het stadium van transgene refractoire muggen nog niet is bereikt en tot op heden niet duidelijk is welke modificatie de meeste toekomst heeft, lijkt een algemene beschouwing hier op zijn plaats. De meest genoemde nadelige gevolgen voor het milieu van loslaten van transgene muggen dienen hierbij als uitgangspunt.

4.1 Geografische verspreiding

Een belangrijk element in de discussie met betrekking tot introductie in het milieu van transgene muggen betreft geografische verspreiding. De meest gestelde vraag hierbij is in hoeverre het inbouwen van genen met antiparasitaire werking ertoe kan leiden dat deze muggen andere of minder eisen aan hun omgeving stellen. Hierdoor zou het verspreidingsgebied van de mug en daarmee dat van de parasiet uit kunnen breiden.

Dat de dodelijke variant van de ziekte malaria (*P. falciparum*) zich niet over de hele wereld verspreidt, maar zich voornamelijk concentreert in Afrika, Azië en Latijns Amerika wordt voor een belangrijk deel bepaald door klimatologische factoren. De tropische muggen die in staat zijn de dodelijke *P. falciparum* parasiet over te dragen hebben relatief hoge temperaturen nodig om te overleven. Bij een omgevingtemperatuur beneden de 8°C zijn de muggen niet in staat te overleven. Ook de plasmodiumparasiet stelt strikte eisen aan zijn omgevingstemperatuur. De minimumtemperatuur voor de parasiet ligt tussen de 16 en 19°C. Zowel de mug als de parasiet gedijt het beste bij een temperatuur rond de 27°C.

Naast omgevingstemperatuur bepaalt ook regenval de aanwezigheid van malariamuggen. Niet alleen de hoeveelheid neerslag, maar ook de periode waarin regenval plaatsvindt, spelen een rol. Regenpoeltjes vormen voor de meerderheid van de soorten uitstekende broedplaatsen en regenval draagt bij aan het instandhouden van een relatief hoge luchtvochtigheid. Een lage luchtvochtigheid (minder dan 60%) verkort de levensduur van de mug. Een sterk verkorte levensduur voorkomt overdracht van de malariaparasiet. Om de parasiet over te brengen moet de mug na inname van de parasiet nog circa negen dagen leven. Dit is de tijd die de parasiet nodig heeft om zich in de mug te kunnen ontwikkelen.

Bovengenoemde factoren zijn de meer algemene eisen die muggen stellen aan hun omgeving. Zoals eerder gesteld hebben we hier niet te maken met slechts één maar met meerdere soorten die de parasiet kunnen overdragen. Soorten die alle specifieke eisen stellen aan hun omgeving en daardoor in bepaalde gebieden wel, en in andere gebieden niet kunnen overleven. Eeuwenlange adaptatie aan de omgeving heeft veelal geleid tot deze specificiteit.

Soorten variëren sterk in voorkeur voor factoren als broedplaatsen en luchtvochtigheid. Hoewel de meerderheid van de malariamuggen eieren in zoetwater legt, hebben een aantal soorten zoutwater nodig als broedplaats.³² Binnen de zoetwatersoorten kan onderscheid worden gemaakt tussen soorten die regenpoelen als broedplaats gebruiken en soorten die voorkeur hebben voor stromend water. Vergelijkbare verschillen zijn gevonden voor luchtvochtigheid.⁷⁰ In vochtige gebieden worden muggen van *A. gambiae* aangetroffen terwijl de soort *A. arabiensis* juist in droge tot gematigd vochtige gebieden wordt gevonden.^{70,71}

Dat het voorkomen van bepaalde muggensoorten geen momentopnames betreft blijkt onder meer uit een onderzoek uitgevoerd op het eiland Madagaskar. Het voorkomen van de soorten *A. gambiae* en *A. arabiensis* in de verschillende regio's op het eiland bleek 35 jaar na dato onveranderd.⁷¹

Mede gezien de grote variatie in eisen die verschillende soorten aan hun omgeving stellen en de wijze waarop de mug hierin volhardt, doet vermoeden dat hierbij meerdere genen en meerdere 'pathways' betrokken zijn. Daarbij geldt in het algemeen dat veel eigenschappen polygenetisch van aard zijn. Wil een transgene mug zich over een groter gebied verspreiden dan lijkt dit gepaard te moeten gaan met het ontregelen van meerdere genen of meerdere processen.

Mocht een transgene mug in staat blijken een nieuwe niche in te nemen dan betekent dit niet automatisch dat hiermee ook de ziekte malaria zich over grotere gebieden verspreidt. Zo lang het refractoire karakter van de transgene mug niet doorbroken wordt zal de mug de malariaparasiet niet naar deze niche verplaatsen. Daarbij vestigt de mug zich in een gebied waar de druk vanuit de parasiet om de resistentie te doorbreken niet aanwezig is of gering zal zijn.

Ingeval het refractoire karakter van de mug wel doorbroken wordt en de mug zich blijkt te kunnen vestigen in een nieuwe niche dan nog hoeft dit evenmin te betekenen dat de ziekte malaria zich naar dit gebied uitbreidt. De parasiet zal zich tevens onder de nieuwe omstandigheden moeten handhaven. Factoren zoals luchtvochtigheid en temperatuur moeten voor de mug dusdanig gunstig zijn dat deze een periode van minimaal negen dagen overleeft. Alleen dan zal de parasiet in staat zijn levenscyclus in de mug te voltooien en kan de parasiet overgedragen worden op de mens. Hierbij dient tevens te worden opgemerkt dat bij een te lage omgevingstemperatuur de parasiet ongeacht de levensduur van de mug niet zal kunnen overleven. Onder de huidige omstandigheden ligt de minimumtemperatuur voor de parasiet circa vijf graden hoger dan voor de mug.

4.2 Overdracht van andere ziekteverwekkers

Tropische muggen zijn overdragers van zeer ernstige ziekteverwekkers zoals de malariaparasiet, virussen waaronder dengue (knokkelkoorts) en gele koorts en draadwormen verantwoordelijk voor de ziekte filariasis.³⁴ De wijze waarop de overdracht van deze verschillende ziekteverwekkers door muggen plaatsvindt vertoont veel overeenkomstige elementen. Opname vindt via het bloed plaats en de ziekteverwekker heeft de mug nodig om zich te kunnen ontwikkelen dan wel te verspreiden. Daarbij verplaatsen genoemde ziekteverwekkers zich op vergelijkbare wijze door het lichaam van de mug. Deze overeenkomstige wijze van overdracht roept de angst op dat ingrijpen in de interactie tussen de malariaparasiet en de mug ook gevolgen heeft voor de interactie tussen de mug en andere ziekteverwekkers. De vrees bestaat dat de transgene muggen, hoewel niet langer overdrager van de malariaparasiet, in staat zal zijn andere levensbedreigende ziekteverwekkers over te dragen. Waarbij niet alleen gedacht wordt aan de al bekende ernstige ziekteverwekkers maar ook aan nu nog vrij

onschuldige ziekteverwekkers, of ziekteverwekkers waarvan het bestaan vooralsnog niet bekend is.

Hoewel overdracht op vergelijkbare wijze plaatsvindt, betekent dit niet dat alle muggen alle ziekteverwekkers overdragen. De combinatie ziekteverwekker en insect is zeer specifiek. Zo worden de virussen verantwoordelijk voor de ziekten gele koorts en dengue exclusief overgedragen door *Aedes* muggen⁷², de humane variant van malaria door *Anopheles* muggen en filariasis-veroorzakende nematoden voornamelijk door muggen van het soort *Mansonia* en *Culex*. Niet alleen tussen genera maar ook tussen soorten binnen een genus bestaan dergelijke verschillen. In de meeste gevallen handhaaft de ziekteverwekker zich optimaal in één of een klein aantal zeer verwante soorten. Als voorbeeld hiervan dient de malariaparasiet en zijn vector. Van de 240 bekende *Anopheles* soorten zijn er slechts 70 in staat *plasmodium* soorten over te brengen.

Ondanks het feit dat zowel de ziekteverwekkers als de verschillende muggensoorten in gebieden naast elkaar voorkomen en dus voeden op dezelfde gastheer heeft dit niet geleid tot uitbreiding van de vectorreeks. Zo dragen muggen van het genus *Culex*, hoewel een aantal zich voeden met humaan bloed, niet de humane malariaparasiet over.

Wil de soort als vector dienen voor de ziekteverwekker dan moet de ziekteverwekker in staat zijn zich te handhaven en te verplaatsen binnen de mug. De ziekteverwekker moet hierbij het immuunsysteem van de mug weerstaan en in staat zijn zich te verplaatsen vanuit het maagdarmsstelsel via het spijsverteringskanaal naar de speekselklieren.

Door het opvijzelen van het immuunsysteem van de mug door genetische modificatie proberen wetenschappers alsnog volledige afbraak van de malariaparasiet te realiseren. Wanneer door genetische modificatie veranderingen teweeg worden gebracht in de werking van mechanismen zoals ‘melanotic encapsulation’ lijkt een eventueel effect op andere ziekteverwekkers niet uit te sluiten. ‘Melanotic encapsulation’ bepaalt ten slotte in belangrijke mate of een insectensoort als vector van de ziekteverwekker wordt aangemerkt.

Ook voor het inbouwen van genen verantwoordelijk voor de aanmaak van de antimicrobiële eiwitten ‘defensin A’ of ‘cecropin A’ of genen coderend voor gifstoffen zoals PLA2 gelden dergelijke overwegingen. Deze eiwitten staan bekend om hun brede werkingsspectrum. De kans dat de werking van deze stoffen zich niet beperkt tot de malariaparasiet maar zich uitstrekt naar andere ziekteverwekkers lijkt daarom reëel. Echter dat hierdoor de mug zijn refractoire karakter ten aanzien van andere ziekteverwekker verliest lijkt minder aannemelijk. Zeker gezien het feit dat de toxische werking van laatst genoemde stoffen gericht is tegen de ziekteverwekker.

Of de mug een vector is voor een ziekteverwekker wordt eveneens bepaald door het vermogen van de ziekteverwekker om zich vanuit het maagdarmsstelsel te kunnen verplaatsen naar de speekselklieren. Een dergelijke verplaatsing vergt een specifieke interactie tussen de mug en de ziekteverwekker.²⁸ Het passeren van de membranen gaat gepaard met de herkenning van specifieke oppervlakte-eiwitten van de ziekteverwekker en specifieke sites op de te passeren membranen. Getracht wordt om door genetische modificatie de herkenningssites of de oppervlakte-eiwitten te blokkeren en daarmee passage van de parasiet onmogelijk te maken. Angst bestaat dat het blokkeren van receptoreiwitten op de membranen ertoe kan leiden dat andere ziekteverwekkers deze alsnog kunnen passeren. Overdracht van de reeds bekende ziekteverwekkers onder laboratoriumomstandigheden moet daarom goed onderzocht worden.

Om de kans op overdracht van andere ziekteverwekkers tegen te gaan geven veel deskundigen de voorkeur aan modificaties die specifiek gericht zijn tegen de malariaparasiet. Zij zijn van mening dat door in te grijpen op een voor de parasiet uniek mechanisme of stadium de kans op gevolgen voor de overdracht van andere ziekteverwekkers sterk verkleind wordt. De grootste kans van slagen voorzien zij wanneer de parasiet zich in het oökinetenstadium bevindt. Het aantal oökineten in de mug is vaak minder dan tien in tegenstelling tot het latere sporozietenstadium waarbij hoeveelheden van duizenden worden genoemd.⁴⁴ Bij dergelijke hoge aantallen neemt de kans op ‘ontsnappen’ toe.

4.3 Aanpassing van de parasiet aan een andere vector

Eén van de voornaamste redenen dat bestrijding van malaria een groot probleem is, is dat de parasiet in vrij korte tijd in staat is resistentie te ontwikkelen tegen geneesmiddelen. Dit snelle aanpassingsvermogen van de parasiet roept vragen op. Enerzijds de vraag of bij het gebruik van transgene muggen de parasiet op vergelijkbare wijze de aangebrachte modificaties weet te omzeilen. Anderzijds de vraag of de parasiet zich zal aanpassen aan andere muggensoorten of genera. Met name in het laatste geval zou dit de problematiek rond malaria kunnen verergeren. De habitat van de parasiet breidt zich uit waardoor het bestrijden wordt bemoeilijkt.

Het is niet onwaarschijnlijk dat bij het inbrengen van één enkel gen de parasiet in staat zal zijn zich in relatief korte tijd aan te passen, waardoor het refractoire karakter van de mug doorbroken wordt. Dat het doorbreken van dit karakter extra gevaren met zich meebrengt wordt echter betwijfeld. De mug zal de overdacht van de malariaparasiet hervatten en het ingebrachte gen verliest zijn kracht. Een dergelijke doorbreking wijkt niet af van de resistentie van de

parasiet tegen geneesmiddelen of insecticidenresistentie bij de mug. In het somberste geval is de bestrijding van malaria weer terug bij af.

Zoals in de vorige paragraaf al werd gesteld is de interactie tussen parasiet en muggen specifiek tot uniek te noemen. Hoewel meerdere muggensoorten zich voeden met bloed is de overdracht van de humane malariaparasiet slechts beperkt tot één soort; muggen van het genus *Anopheles*. Genera zoals *Aedes* of *Culex* voeden zich eveneens met malariabesmet humaan bloed, maar de parasiet weet zich, voor zover bekend, in deze muggensoorten niet te handhaven. Ook een groot aantal soorten binnen het genus *Anopheles* blijkt na opname van besmet bloed de humane malariaparasiet niet over te brengen. Herkenningsites op membranen van de middendarm en de speekselklier van de mug spelen hierbij een belangrijke rol. Een goed voorbeeld hiervan is een experiment waarbij speekselklieren tussen twee muggensoorten werden uitgewisseld. Na het implanteren van de speekselklier van *A. dirus*, overdrager van de parasiet *P. knowlesi*, in *A. freeborni* werden sporozoiëten in de speekselklier aangetroffen. Deze parasiet wordt normaal gesproken niet in de speekselklier van *A. freeborni* aangetroffen.⁷³ Ook het hoge percentage refractoire muggen binnen de soort *A. gambiae* en de grote aantallen parasieten die na bloedopname afgebroken worden in niet-refractoire muggen bevestigt dat aanpassen niet eenvoudig is.

De eenvoud waarmee adaptatie van de malariaparasiet aan geneesmiddelen plaatsvindt, weerspiegelt naar alle waarschijnlijkheid niet een mogelijke aanpassing van de parasiet aan andere soorten of muggen van andere genera. De complexiteit van het systeem lijkt hierbij in de weg te staan. Voldoende kennis ontbreekt echter om de mogelijke aanpassing van de parasiet aan een andere vector zonder meer uit te sluiten.

4.4 Effect op de voedselketen

Evenals elk ander organisme maakt de mug deel uit van de voedselketen. Muggen eten en worden gegeten. Volwassen muggen voeden zich met nectar en plantensappen en voor de ontwikkeling van de eieren voeden vrouwtjesmuggen zich tevens met bloed. Algen en bacteriën die in het water voorkomen vormen het belangrijkste voedsel voor muggenlarven. Vogels en amfibieën worden gezien als de belangrijkste predators van volwassen muggen. Muggenlarven die zich in water bevinden worden gegeten door onder meer vissen.

Om te beoordelen in hoeverre de aanwezigheid van transgene refractoire muggen effect heeft op andere organismen in de voedselketen moet op twee vragen antwoord worden gegeven. Ten eerste heeft het aanbrengen van een modificatie effect op het gedrag of de omvang van de muggenpopulatie en zo ja

in hoeverre heeft dit effect op andere organismen die voor hun voedsel afhankelijk zijn van de mug.

Zoals uit voorgaande paragrafen blijkt heeft de aanwezigheid van de parasiet effect op de frequentie en hoeveelheid bloed die vrouwtjesmuggen opnemen wanneer ze zich voeden. Hierdoor zullen transgene refractoire muggen minder vaak bloed opzuigen in vergelijking tot hun wilde met *Plasmodium*-geïnfecteerde soortgenoten en verhogen zij daarmee haar overlevingskans. Dit zal echter niet leiden tot een forse toename van het totaal aantal muggen aangezien in de wilde populatie slechts een klein percentage de parasiet bezit.

Anders zou het kunnen zijn wanneer de wilde populatie door gebruik van steriele transgene muggen wordt uitgeroeid en er een niche ontstaat. Deze niche zal opgevuld worden met andere (*Anopheles*) muggen of wellicht andere insecten. Naast het feit dat een (verhoogde) aanwezigheid van één of meerdere organismen een toename in ziekteverwekkers kan betekenen, kan dit ook van invloed zijn op de voedselketen. In welke mate deze effecten op zullen treden is onduidelijk en afhankelijk van de predator en de lokale omstandigheden. Hierbij dient opgemerkt te worden dat volwassen muggen een minder belangrijke rol spelen in de voedselketen dan larven. Deze laatste vormen een belangrijke voedselbron voor hogere aquatische organismen.

4.5 Verspreidingsmechanisme

Het verspreiden van het gen buiten de muggen van het genus *Anopheles* kan nadelige gevolgen met zich meebrengen en moet daarom ook meegenomen worden in de risicobeoordeling. Van eminent belang hierbij is het gebruikte verspreidingsmechanisme.

4.5.1 (Symbiotische) bacteriën

Of het gebruik van transgene bacteriën er toeleidt dat het gen zich buiten de muggenpopulatie kan verspreiden zal met name bepaald worden door het gastheerbereik van de genetisch gemodificeerde (symbiotische) bacterie. Wanneer gebruik wordt gemaakt van bacteriën die in symbiose leven met hun gastheer wordt de kans op ongewenste verspreiding van het transgen verkleind.⁵⁷ De afhankelijkheid van de symbiont ten opzichte van zijn gastheer gaat overdracht naar andere gastheren tegen.

Anders lijkt het te zijn wanneer de bacterie *Wolbachia* als verspreidingsmechanisme wordt gekozen. *Wolbachia* is wijdverspreid en heeft een groot gastheerbereik. Ze zijn aangetroffen in muggen, pissebedden, mijten, nematoden en ongeveer 20% van de insectensoorten. Uit studies naar het verspreidingsgedrag blijkt dat horizontale overdracht binnen insectenfamilies maar ook tussen

niet verwante insecten in het verleden heeft plaatsgehad. Zo werd overdracht van *Wolbachia* waargenomen in en tussen verschillende *Drosophila* soorten⁷⁴ en van de steekmug *Aedes albopictus* naar de fruitvlieg *Drosophila*.⁷⁵

Bij een eventueel gebruik van *Wolbachia* afkomstig uit een ander organisme dan *Anopheles* muggen lijkt, mede gezien het verleden van *Wolbachia*, horizontale overdracht terug naar dit organisme reëel. Ook dit kan betekenen dat het ingebouwde transgen zich buiten de *Anopheles* muggen verspreidt. In hoeverre dit risico's met zich meebrengt kan op voorhand niet worden voorspeld en is uiteraard sterk gerelateerd aan de ingebrachte genen of de aangebrachte modificatie.

4.5.2 Transposons

Om de risico's bij het gebruik van transposons te kunnen bepalen is kennis over de werking van transposons noodzakelijk. Hierbij moet onderscheid worden gemaakt tussen actieve en inactieve transposons. Inactieve transposons hebben het gen voor het enzym transposase verloren waardoor ze niet langer in staat zijn zich te verplaatsen binnen het genoom. Hierdoor wordt een stabiele integratie verkregen. Transposase-activiteit in de cel teweeg gebracht door een actief transposon kan deze stabiliteit echter opheffen. In de tot op heden geproduceerde transgene muggen is gebruik gemaakt van transposons vectoren waarbij de codering voor het transposase niet gelegen is op het transposon. Het ingebouwde transposon, voorzien van het gewenste gen, kan derhalve als inactief worden aangemerkt. Bij het toepassen van transposons als verspreidingsmechanisme voor transgenen lijkt het gebruik van actieve, springende transposons echter essentieel.

Springende transposons kunnen deleties, inserties en verplaatsing van gastheerspecifieke sequenties teweegbrengen. Hierdoor kunnen mutaties in het genoom ontstaan en genen worden uitgeschakeld. Waarbij het waarschijnlijk is dat sommige genen vaker 'geraakt' worden dan andere genen.⁶⁴ Opmerkelijk is dat insertie van een transposon niet altijd volledige inactivatie van het bewuste gen tot gevolg heeft. Soms leidt insertie tot een afwijkend fenotype. Tevens kunnen meervoudige inserties in het insectengenoom een onverwachte wijziging in de biologie van het insect als gevolg hebben.⁷⁶

Hoewel we hier spreken van actieve transposons betekent dit niet dat deze transposons ook altijd in beweging zijn. Normaliter bevindt de meerderheid van de transposons zich in een 'slapende' toestand. Stressvolle omstandigheden zoals een defecte genregulatie, of omgevingsstress kunnen ertoe leiden dat transposons geactiveerd worden en gaan springen. De gevolgen van een springend transposon beperken zich veelal tot een cel. Insertie van een

transposon in een essentieel gen leidt in veel van de gevallen alleen tot de dood van deze cel. Echter voor een aantal ernstige zeldzame erfelijke ziekten waaronder de immunodeficientieziekte SCID en Hemofilie A en B wordt de betrokkenheid van transposons gesuggereerd.⁷⁷

Het genoom van het merendeel van de organismen bestaat voor een groot percentage uit transposons. Transposons zijn aangetroffen in insecten, planten, gewervelde dieren en mensen. Naar schatting bestaat meer dan 35% van het DNA van de mens uit transposons. Voor bijvoorbeeld maïs worden veel hogere percentages tot zelfs 50% genoemd.

Het meest bekende en onderzochte transposon is het P-element van de fruitvlieg *Drosophila*. Dit P-element is specifiek voor de fruitvlieg. Pogingen om het P-element over te brengen naar andere insecten zijn mislukt.⁷⁸ Voor zijn activiteit is het p-element afhankelijk van de aanwezigheid van een gastheerspecifiek eiwit.

Het P-element is echter een uitzondering, in veel andere gevallen is een gastheerspecifieke factor niet noodzakelijk. Transposons zijn uitwisselbaar tussen genera maar ook tussen insectenordes. Zo werden transgene muggen gemaakt met van behulp transposons afkomstig uit meerdere soorten fruitvliegen^{33,66} de huisvlieg⁶⁷ en de koolrups^{52,34} zijn voor het produceren van transgene organismen. Met vectoren gebaseerd op *mariner*transposon werden vele organismen waaronder bacteriën, kippen en vissen genetisch gemodificeerd. Het vermogen van de *mariner* transposon om zich door horizontale overdracht te verspreiden lijken hier debet aan te zijn. *Mariner* transposons zijn aangetroffen in veel insectensoorten (15% van de 400 geteste soorten), duizendpoten, mijten, nematoden, en platwormen. Maar ook in mensen en andere gewervelde organismen.⁷⁹

Daarnaast toonden experimenten aan dat transposons tussen soorten binnen verschillende genera maar ook daar buiten kunnen springen. Aangetoond is dat transposons in staat zijn binnen het genus *Drosophila* te springen⁸⁰, dat een insectentransposon eveneens kan springen in een protozoa⁸¹ en dat een transposon afkomstig uit een nematode springt in het genoom van een vis. En ook in het humane genoom kunnen transposons afkomstig van andere organismen zoals vissen⁸² of nematoden⁶⁴ zich verplaatsen.

Zoals eerder al vermeld zijn in de mug transposons aangetroffen. Deze lijken echter niet geschikt voor gebruik als vector. Ook is geen transposon aangetroffen met een vergelijkbaar verspreidingsmechanisme als het P-element van de fruitvlieg *Drosophila*. Het is dan ook aannemelijk dat wanneer transposons ingezet gaan worden als verspreidingsmechanisme deze afkomstig zijn van een ander organisme. Deze transpososons zullen naar alle

waarschijnlijkheid niet afhankelijk zijn van gastheerspecifieke eiwitten. Het gebruik van een niet-gastheerspecifieke transposon brengt met zich mee dat ook in andere organismen dan de mug het transposon actief kan zijn. Horizontale overdracht naar het organisme waaruit de transposon is geïsoleerd, lijkt aannemelijk, maar ook overdracht naar andere organismen lijkt niet uitgesloten. In hoeverre een verspreiding van het transposon en daarmee van het gen risico's met zich meebrengt zal, evenals bij het gebruik van *Wolbachia*, sterk afhangen van het gen dat is ingebracht. Immers transposons komen van nature voor in organisme en een eventuele aanwezigheid lijkt dan ook geen verhoogd risico met zich mee te brengen.

5 Risicomanagement

Om de veiligheid voor de mens en het milieu te waarborgen wordt door wetenschappers een stapsgewijze benadering voorgesteld.⁸³ Het uitvoeren van laboratoriumexperimenten zal gevolgd worden door experimenten in zogeheten biosfeerkassen waarin de natuurlijke omstandigheden nagebootst worden. De volgende stap is het gebruik van een geïsoleerd gebied. Deze stapsgewijze benadering maakt het tevens mogelijk om voorafgaand aan het loslaten van transgene muggen in het milieu de haalbaarheid van bestrijding te toetsen. Alleen bij voldoende garanties ten aanzien van veiligheid én haalbaarheid is een volgende stap gerechtvaardigd.

Laboratoriumexperimenten

Als eerste stap kan een belangrijk deel van het onderzoek ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid op laboratoriumniveau worden uitgevoerd. Hierbij moet gedacht worden aan experimenten waarbij de stabiliteit van het ingebouwde gen of het effect van de modificatie op de fitness e.d. wordt bepaald. Tevens kan door het uitvoeren van laboratoriumexperimenten worden bepaald of de transgene mug in staat is bekende ernstige en minder ernstige ziekteverwekkers over te dragen.

Kasproeven

Na laboratoriumexperimenten lijkt de tweede stap het uitvoeren van experimenten in zogeheten biosfeerkassen, waarbij ontsnappen van muggen effectief kan worden tegengegaan. Door in de kassen de natuurlijke situatie zo veel mogelijk na te bootsen kunnen eventuele effecten op het gedrag van de mug op grotere schaal worden bepaald. Daarnaast bieden kassen de mogelijkheid om de werking van verspreidingsmechanismen te onderzoeken omdat de mug in staat is zijn volledige levenscyclus in de kas te voltooien. Op deze wijze is het mogelijk een zo natuurlijk mogelijke populatie op te bouwen.

Onderzoek naar het gedrag van malariamuggen vindt momenteel al in dergelijke kassen plaats, zij het zonder gebruik van transgene muggen.⁸⁴ Deze kassen hebben de toepasselijke naam ‘Malariasphere’ meegekregen. De kas is voorzien van vegetatie en water dat dienst doet als broedplaats. Ook is een simpele hut met bed aanwezig. Hierdoor wordt het mogelijk de volledige levenscyclus van de mug te volgen, inclusief de interactie met de mens.

Het Nederlandse onderzoeksorgaan NWO financierde onlangs de bouw van een duizend vierkante meter ‘biosfeer’ in Tanzania. De bedoeling is om hierin experimenten uit te voeren als voorbereiding op het loslaten van transgene muggen. Ook bij dit onderzoek worden in eerste instantie geen transgene muggen gebruikt.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat het raadzaam lijkt om in eerste instanties gebruik te maken van biosfeerkassen in gebieden waar buiten de kas de leefomstandigheden voor de mug zeer ongunstig zijn. Bij een eventueel ontsnappen van muggen zullen deze niet in staat zijn zich te verspreiden of te overleven. Als vervolgstap wordt het gebruik van kassen in de gebieden waar de muggen van nature voorkomen gezien.

Geïsoleerd gebied of eiland

Na uitvoerig onderzoek in kassen zal het loslaten van de mug in zijn natuurlijke omgeving de derde stap zijn. De meest voor de hand liggende optie hierbij is het uitvoeren van veldexperimenten in een geïsoleerd gebied of op een eiland. Behalve dat op grote schaal naar de haalbaarheid gekeken kan worden biedt het gebruik van een geïsoleerd gebied tevens de mogelijkheid om naar onverwachte effecten te kijken. Immers, in laboratoria en kassen kan de situatie buiten slechts nagebootst worden. Verdere verspreiding van de mug en de eventuele nadelige gevolgen blijven hierdoor beperkt.

Deze fase van testen wordt door velen als omstreden ervaren en een goede communicatie met de lokale bevolking is daarom essentieel. Daarbij moeten testen in de kassen hebben aangetoond dat de kans op succes duidelijk aanwezig is.

De zoektocht naar een geschikt eiland is al gestart. Zo wordt onder meer het eiland Bioko genoemd.⁸⁵ Het eiland Bioko is circa 1300 km² groot en gelegen op ruim 30 km voor de westkust van Centraal Afrika ter hoogte van Kameroen. De omstandigheden op dit eiland worden door onderzoekers als ideaal gezien. Malaria komt voor op dit eiland maar de problemen zijn relatief klein en controleerbaar. Bovendien vindt malariaonderzoek op dit eiland al plaats en is kennis over de daar voorkomende muggensoorten reeds aanwezig.

6 Conclusies

Het stadium van transgene refractoire muggen die niet langer de humane malariaparasiet overdragen is nog niet bereikt. De wetenschappelijke ontwikkelingen staan echter niet stil en successen met transgene refractoire muggen in combinatie met rattenmalaria bieden hoopgevende perspectieven. Deze ontwikkelingen kunnen een belangrijke doorbraak betekenen binnen het spectrum van bestrijdingsmethoden.

Het inzetten van transgene refractoire muggen in de strijd tegen malaria roept weerstand op. Argumenten ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid hebben hierbij de overhand. Gevreesd wordt dat malaria bij falen zich naar nieuwe gebieden kan uitbreiden, de mug overdrager wordt van andere ziekten of dat de parasiet zich aanpast aan een nieuwe gastheer. Daarnaast bestaat de angst voor nadelige gevolgen voor de voedselketen waarin de mug zich bevindt.

Veel van deze argumenten lijken niet zozeer gebaseerd op wetenschappelijke kennis, maar eerder op het ontbreken hiervan. Echter, kennis om de argumenten te weerleggen is doorgaans ook niet aanwezig. Meer onderzoek voorafgaand aan introductie in het milieu van transgene muggen naar met name het gedrag en de eigenschappen van de mug is dan ook essentieel.

Het uitvoeren van laboratoriumexperimenten gevolgd door experimenten in zogeheten biosfeerkassen en vervolgens het gebruik van een geïsoleerd gebied lijkt hiervoor de aangewezen methode. Deze benaderingswijze vertoont grote gelijkens met het stappenplan dat in Nederland wordt gehanteerd voor het in het milieu brengen van ggo's zoals transgene gewassen. Eventueel te verwachten nadelige effecten moeten in een zo vroeg mogelijk stadium uitgesloten worden.

Door het volgen van dit stappenplan wordt het eveneens mogelijk de haalbaarheid van de bestrijding van malaria met transgene muggen te bepalen. Immers als niet met grote zekerheid gesteld kan worden dat de methode effectief is, zal een ingreep van dergelijke omvang niet te verantwoorden zijn. Hierbij opgemerkt dat de meeste betrokkenen erkennen dat de inzet van transgene muggen waarschijnlijk niet voldoende zal zijn om malaria uit te roeien, maar dat transgene muggen wel een belangrijke bijdrage kunnen leveren.

Het terugdringen of uitroeien van malaria zal waarschijnlijk alleen mogelijk zijn door een brede inzet van middelen. De inzet van huidige middelen en bestrijdingswijzen, zoals geneesmiddelen en geïmpregneerde klamboes zullen hierbij een belangrijke rol blijven spelen. Ook nieuwe ontwikkeling zoals het produceren van een 'cocktail'-vaccin, gedragsinterventies en biologische bestrijding verdienen in dit kader ondersteuning.

Uiteraard is het te beperkt om te veronderstellen dat met garanties ten aanzien van veiligheid en haalbaarheid voldoende draagvlak is gecreëerd om transgene muggen los te laten. Aan inzet van dergelijke muggen kleven ethische en maatschappelijke bezwaren, die niet zonder meer ter zijde geschoven kunnen worden. Een verantwoorde introductie vergt derhalve goede communicatie en samenwerking met betrokkenen, evenals goede voorlichting. Hierbij moeten de door malaria getroffen landen in een vroegtijdig stadium worden betrokken.

Referenties

Geraadpleegde deskundigen

Prof. dr. M. Coosemans
Prins Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde
Departement Parasitologie

Prof. dr. M. Dicke
Wageningen Universiteit en Research Centrum
Leerstoelgroep Entomologie

Dr. C.J. Janse
Leids Universitair Medisch Centrum
Afdeling Parasitologie

Dr. ir. M.A. Jongsma
Wageningen Universiteit en Research Centrum
Plant Research International

Prof. H.J. van der Kaay
Emeritus professor in de Tropische Geneeskunde
Leids Universitair Medisch Centrum

Prof. dr. F.C. Kafatos
Directeur Generaal
The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg

Prof. dr. R.W. Sauerwein
Nijmegen Center for Molecular Life Sciences
Afdeling Medische Parasitologie

Dr. ir. W. Takken
Wageningen Universiteit en Research Centrum
Leerstoelgroep Entomologie

Literatuur

1. World Health Organisation (WHO) Back Malaria infosheets.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
2. Hemingway J, Bates I, 2003. Malaria: past problems and future prospects. *EMBO reports* 4, 29-31.
3. Van Der Kaay HJ, 2002. Welke invloed heeft de mens op de verspreiding van malaria? *Vademecum* 48.
4. Greenwood B, Mutabingwa T, 2002. Malaria in 2002. *Nature*, 415, 670-672.
5. Scholte EJ., Knols BGJ, and Takken W, 2005. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces bloodfeeding and fecundity. *J. Invert. Path.*, (In press).
6. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowmans S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan M, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya VB, Martin DMA, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos D, Ralph, SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Craig Venter J., Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B, 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
7. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JMC, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, Berardinis de V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chatuverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanigan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin J, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X, Woodford KJ, Wortman JR, Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang H, Zhao Q, Zhao S, Zhu SC, Zhimulev I, Coluzzi M, della Torre A, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Brey PT, Craig Venter C, Weissenbach J, Kafatos FC, Collins FH, Hoffman SL, 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129-149.
8. International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome *Nature* 409, 860 - 921.
9. Varmus H, Klausner R, Zerhouni, Acharya T, Daar AS. Singer PA, 2003. Policy Forum. Grand challenges in global health. *Science* 302, 398-399.
10. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, Mandomando I, Spiessens B, Guinovart C, Espasa M, Bassat Q, Aide P, Ofori-Anyinam O, Navia MM, Corachan S, Ceuppens M, Dubois MC, Demoitie MA, Dubovsky F, Menendez C, Tornieporth N, Ballou WR, Thompson R, Cohen J, 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364, 1411-1420.
11. Richie TL, Saul A, 2002. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature*, 415, 694-701.
12. Fact sheets: Cane toads, giant toads or marine toads.
www.amonline.net.au/factsheets/canetoad.htm

13. Kennislink. Een ongewenste vreemdeling.
<http://www.kennislink.nl/web/show?id=91890&showframe=content&vensterid=811&prev=91884>
14. NIOO-KNAW-persbericht. Van vogelkers naar bospest: bodemorganismen zijn handlangers van woekerende exoot.
http://www.knaw.nl/cfdata/nieuws/nieuws_detail.cfm?nieuws_id=209
15. Nature 2004. Volume 430.
16. Science 2002. Volume 298.
17. Protocol van Cartagena inzake bioveiligheid, VN protocol onder het Verdrag van Rio inzake biodiversiteit.
18. CBD, CCMO, COGEM, 2004. Achtergrondstudies Trendanalyse Biotechnologie 2004.
19. Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV, 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne *Chagas* disease. *International journal for parasitology* 31, 621-627.
20. Boëte C, Koella JC, 2002. A theoretical approach to predicting the success of genetic manipulation of malaria mosquitoes in malaria control. *Malaria journal*.
<http://www.malariajournal.com/content/1/1/3>
21. Boëte C, Koella JC, 2003. Evolutionary ideas about genetically manipulated mosquitoes and malaria control. *Trends in parasitology*, 19: 32-37.
22. Kiszewski AE, Spielman A, 1998. Spatially explicit model of transposon-based genetic drive mechanisms for displacing fluctuating populations of *anopheline* vector mosquitoes. *J Med Entomol* 35(4), 584-90.
23. Riehle MA , Srinivasan P, Moreira CK, Jacobs-Lorena M, 2003. Review: Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3809-3816.
24. Catteruccia F, Godfray H C, Crisanti A, 2003. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquito. *Science* 299, 1225-1227.
25. Janse CJ, Lieshout L. Malaria, algemene informatie.
www.lumc.nl/1040/research/malaria/algemeen-info.nl
26. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ, 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The lancet* 363, 1017-1024.
27. Ghosh A, Srinivasan P, Abraham EG, Fujioka H, Jacobs-Lorena M, 2003. Molecular strategies to study *Plasmodium*-mosquito interactions. *Trends in Parasitology* 19(2), 94-101.
28. Ghosh AK, Ribolla EM, Jacob-Lorena M, 2001. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13278-13281.
29. Shahabuddin M, Costero A, 2001. Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 231-240.
30. Coetzee M, Hunt RH, Braack LEO, Davidson G, 1993. Distribution of mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex, including malaria vectors, south of latitude 15°C. *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap*, 89, 227-231.
31. Nijmegen Center for Molecular Life Sciences (NCMLS)-website.
www.ncmls.kun.nl
32. White GB, 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 278-298.
33. Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A, 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405, 959-962.
34. Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M, 2002. Transgenic *anopheline* mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417, 452-455.

35. Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinski N, James AA, Jacobs-Lorena M, 2000. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. Proc. Natl. Acad. Sci 97, 10895-10898.
36. Berghammer AJ, Klingler M, Wimmer EA, 1999. A universal marker for transgenic insects. Nature 402, 370-371.
37. Jacobs-Lorena M, 2003. Interrupting malaria transmission by genetic manipulation of *anopheline* mosquitoes. Journal of vector borne diseases 40, 73-77.
38. Janse CJ, 2003. Persoonlijke communicatie.
39. James AA, 2003. Review. Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. The Journal of experimental biology 206, 3817-3821.
40. Zheng L, Cornel AJ, Wang R, Erfle H, Voss H, Ansorge W, Kafatos JC, Collins FH, 1997. Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *plasmodium cynomolgi* B. Science 276, 425-428.
41. Boëte C, Paul REL, Koella J C, 2002. Reduced efficacy of the immune melanization response in mosquitoes infected by malaria parasites. Parasitology 125, 93-98.
42. Lowenberger CA, Kamal S, Chiles J, Paskewitz S, Bulet P, Hoffmann JA, Christensen BM, 1999. Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector. Experimental parasitology 91, 59-69.
43. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Muller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC, 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. Science 298, 159-165.
44. Niaré O, Markianos K, Volz J, Oduol F, Touré A, Bagayoko M, Sangaré D, Traoré SF, Wang R, Blass C, Dolo G, Bouaré M, Kafatos FC, Kruglyak L, Touré YT, Vernick KD, 2002. Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. Science 298, 213-216.
45. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC, 2004. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Immunological reviews 198, 127-148.
46. Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC, 2004. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. Science 303, 2030-2032.
47. De Lara Capurro M, Coleman J, Beerntsen BT, Myles KM, Olson KE, Rocha E, Krettli AU, James AA, 2000. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. Am. J. of Trop. Med. Hyg. 62(4), 427-433.
48. Yoshida S, Ioka D, Matsuoka H, Endo H, Ishii A, 2001. Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. Mol. Biochem. Parasitol. 113(1): 89-96.
49. Cheng LL, Bartholomay LC, Olson KE, Lowenberger C, Vizioli J, Higgs S, Beaty BJ, Christensen BM, 2001. Characterization of an endogenous gene expressed in *Aedes Aegypti* using an orally infectious recombinant sindbis virus. Journal of insect science, available online insectscience.org/1.10
50. Shin SW, Kokoza VA, Raikhel AS, 2003. Review. Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. The Journal of Experimental Biology 206, 3855-3843.
51. Kokoza V, Ahmed A, Cho W-L, Jasinskiene N, James AA, Raikhel A, 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.
52. Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Abraham EG, Crisanti A, Nolan T, Catteruccia F, Jacobs-Lorena M, 2002. Bee Venom Phospholipase

- Inhibits Malaria Parasite Development in Transgenic Mosquitoes. *The journal of biological chemistry* 277, 40839-40843.
53. Zieler H, Keister DB, Dvorak JA, Ribeiro JMC, 2001. A snake venom phospholipase A2 blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *The Journal of Experimental Biology* 204, 4517-4167.
 54. Langer RC, Li F, Vinetz JM, 2002. Identification of novel *Plasmodium gallinaceum* zygote- and ookinete-expressed proteins as targets for blocking malaria transmission. *Infection and Immunity* 70, 102-106
 55. Matuschewski K, Ross J, Brown SM, Kaiser K, Nussenzweig V, Kappe SHI, 2002. Infectivity-associated Changes in the Transcriptional Repertoire of the Malaria Parasite Sporozoite Stage. *The Journal of Biological Chemistry* 277(44), 41948-41953.
 56. Anderson RA, Knols BG, Koella JC, 2000. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. *Parasitology* 120, 329-333.
 57. Beard CB, Durvasula RV, Richards FF, 1998. bacterial symbiosis in Arthropods and the control of disease transmission. *Emerging infectious diseases* 4, 581-591.
 58. Durvasula RV, Andrew Gumbs, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, Richards FF, Beard CB, 1997. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 3274-3278.
 59. Curtis CF, Sinkins SP, 1998. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology* 116, 111-115.
 60. Dobson SL, 2003. Reversing *Wolbachia*-based population replacement. *Trends in Parasitology* 19, 128-133.
 61. Townson H, 2002. *Wolbachia* as potential tool for suppressing filarial transmission. *Annals of Tropical medicines & Parasitology* 96, 117-127.
 62. Tram U, Sullivan W, 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296, 1124-1126.
 63. Engels WR. P-elements in *Drosophila*.
<http://engels.genetics.wisc.edu/Pelements/Pt.html>
 64. Schouten GJ, van Luenen HG, Verra NC, Valerio D, Plasterk RH, 1998. Transposon Tc1 of the nematode *Caenorhabditis elegans* jumps in human cells. *Nucleic Acids Research* 26, 3013-3017.
 65. Tu Z, 1997. Three novel families of miniature inverted-repeat transposable elements are associated with genes of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* *Proceedings of the National Academy of Science* 94, 7475-7480.
 66. Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA, 1998. *Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Science* 95, 3748-3751.
 67. Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornet AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH, 1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *Proceedings of the National Academy of Science* 95, 3743-3747.
 68. Sinden RE, 2002. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vector. *Cellular Microbiology* 4, 713.
 69. Reid C, 2000. Implications of Climate Change on Malaria in Karnataka, India, http://www.brown.edu/Research/EnvStudies_Theses/full9900/creid/index.htm
 70. Minakawa N, Sonye G, Mogi M, Githeko A, Yan G, 2002. The effects of climatic factors on the distribution and abundance of malaria vectors in Kenya. *Journal of Med. Entomol.* 39(6): 833-841.
 71. Léon Pock Tsy JM, Duchemin JB, Marrama L, Rabarison P, Le Goff G, Rajaonarivelo V, Robert V, 2003. Distribution of the species of the *Anopheles*

- gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. Malaria Journal: <http://www.biomedcentral.com/1475-2875/2/33>
72. Blair CD, Adelman Z, Olson KE, 2000. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 651-661.
 73. Rosenberg R, 1985. Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*34(4), 687-691.
 74. Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM, Karr TL, 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260, 1796-1799.
 75. Braig HR, Guzman H, Tesh RB, O'Neill SL, 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature* 367, 453-455.
 76. Alphey L, Beard CB, Billingsley P, Coetzee M, Crisanti A, Curtis C, Eggleston P, Godfray C, Hemingway J, Jacobs-Lorena M, James AA, Kafatos FC, Mukwaya LG, Paton M, Powell JR, Schneider W, Scott TW, Sina B, Sinden R, Sinkins S, Spielman A, Toure Y, Collins FH, 2002. Malaria Control with Genetically Manipulated Insect Vectors, *Science* 298, 119-121
 77. Sciencedaily-encyclopedia Transposon <http://en.wikipedia.org/wiki/Transposon>
 78. Handler AM, Gomez SP, O'Brochta DA, 1993. A functional analysis of the P-element gene-transfer vector in insects. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1993;22(3-4):373-84.
 79. Lozovsky ER, Nurminsky D, Wimmer EA, Hartl DL, 2002. Unexpected stability of *mariner* transgenes in *Drosophila*. *Genetics* 160, 527-535.
 80. Hartl DL, 2001. Discovery of the Transposable Element *Mariner*. *Genetics* 157, 471-476
 81. Gueiros-Filho FJ, Beverley SM, 1997. Trans-kingdom Transposition of the *Drosophila* Element *mariner* Within the Protozoan *Leishmania*. *Science* 276, 1716-1719.
 82. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z, 1997. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91(4), 501-510.
 83. Knols BGJ, Njiru BN, Mukabana RW, Mathenge EM, Killeen GF, 2003. Contained semi-field environments for ecological studies on transgenic African malaria vectors: benefits and constraints. In: *Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes*. Eds Takken W, Scott TW, volume 2, 91-106.
 84. Knols BG, Njiru BN, Mathenge EM, Mukabana WR, Beier JC, Killeen GF, 2002. MalariaSphere: A greenhouse-enclosed simulation of a natural *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) ecosystem in western Kenya. *Malaria journal*, <http://www.malariajournal.com/content/1/1/19>
 85. Spielman A. Practical considerations in the release of transgenic mosquitoes. <http://pewagbiotech.org/events/0920/bios/spielman.php> 20 Januari 2005.
 86. COGEM. CGM/030618-02. Naar een integraal ethisch-maatschappelijk toetsingskader voor moderne biotechnologie.