

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

**DATUM** 23 januari 2020  
**KENMERK** CGM/200123-02  
**ONDERWERP** Advies inschaling werkzaamheden gg-*Caenorhabditis elegans* met CRISPR-gene drive

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier 'Ontwikkeling van een gene drive in *C. elegans*' (IG 19-294\_2.8-000) van de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) nematoden (*Caenorhabditis elegans*), die een tegen het *dpy-10* gen gerichte CRISPR-gene drive bevatten. *C. elegans* nematoden waarbij de werking van dit gen verstoord is, zijn korter en dikker dan wild-type nematoden en bewegen zich minder gemakkelijk.

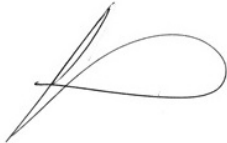
*C. elegans* is een vrijlevende nematode die wereldwijd voorkomt en zich voedt met bacteriën en kleine eukaryoten. De nematode wordt al decennialang in laboratoria onderzocht. *C. elegans* nematoden kunnen zich niet via aerosolen verspreiden en drogen bij een normale luchtvochtigheid snel uit.

De COGEM is van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden uitgevoerd kunnen worden op ML-II. Zij acht het niet noodzakelijk dat handelingen met de gg-*C. elegans* in een veiligheidskabinet worden uitgevoerd. Bij de werkzaamheden worden handschoenen gedragen. Ook gebruikt de aanvrager vochtabsorberend materiaal. Een gg-*C. elegans* nematode die daarop terecht komt, zal eraan vastkleven, uitdrogen en sterven. Op dit inperkingsniveau en met inachtneming van de aanvullende voorschriften is de COGEM van oordeel dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

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

*Met het oog op eventuele belangenverstremeling is het COGEM lid dr. H. de Cock niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies*

# Inschaling van werkzaamheden met gg-*Caenorhabditis elegans* met een CRISPR-gene drive

## COGEM advies CGM/200123-02

### 1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Universiteit Utrecht getiteld 'Ontwikkeling van een gene drive in *C. elegans*' (IG 19-294), is de COGEM gevraagd om te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *Caenorhabditis elegans* met een CRISPR-gene drive. De onderzoekers willen in een laboratoriumpopulatie de verspreiding van gene drives onder verschillende omstandigheden bestuderen en onderzoeken hoe resistentie tegen gene drives ontstaat.

### 2. Eerder COGEM advies

Werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen met een gene drive worden in Nederland in eerste instantie op het hoogste inperkingsniveau ingeschaald (IV). Een aanvrager kan vervolgens verzoeken om de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau te mogen uitvoeren.<sup>1,2</sup>

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met organismen met CRISPR-gene drives. In dit advies concludeerde de COGEM dat gemakkelijk resistentie tegen deze gene drives ontstaat en dat dit de verspreiding van de gene drive belemmert. De COGEM was - onder andere vanwege het ontstaan van resistente organismen - van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat een uit het laboratorium ontsnapt organisme met een CRISPR-gene drive een populatie verandert. Zij adviseerde daarom om organismen met deze CRISPR-gene drives niet langer op het hoogste inperkingsniveau (IV) in te schalen en de inschaling op het hoogste inperkingsniveau te beperken tot organismen met CRISPR-gene drives speciaal ontworpen om het ontstaan van resistentie tegen de gene drive te voorkomen of te doorbreken.<sup>3</sup>

### 3. *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans* is een vrijlevende nematode die wereldwijd hoofdzakelijk in vochtige, gematigde gebieden wordt aangetroffen. Ook in Nederland komt deze nematode voor. *C. elegans* voedt zich met bacteriën en kleine eukaryoten en komt voor in rottend plantmateriaal, composthopen en humus.

*C. elegans* is een modelorganisme dat al decennia in laboratoria wordt onderzocht. Het genoom van *C. elegans* (97 miljoen baseparen) werd in 1998 gepubliceerd.<sup>4</sup> In het laboratorium wordt *C. elegans* normaal gesproken op agarplaten gehouden, maar *C. elegans* kan ook in vloeibare cultures worden gekweekt.<sup>5</sup>

*C. elegans* larven die uit het ei komen, ontwikkelen zich onder ideale omstandigheden in drie dagen via vier larvale stadia (L1, L2, L3 en L4) tot een volwassen nematode. Wanneer *C. elegans* stress ervaart (door overbevolking, beperkte beschikbaarheid van voedsel of hitte) ontwikkelen L1 larven zich tot zogenaamde dauerlarven. In composthopen en humus worden vooral dauerlarven aangetroffen. Deze dauerlarven zijn resistent tegen verschillende vormen van stress, minder beweeglijk en kunnen meerdere maanden zonder voedsel overleven.<sup>6,7</sup> Ook kunnen dauerlarven, in

tegenstelling tot de andere levensstadia van *C. elegans*, in sommige gevallen uitdroging overleven.<sup>8</sup> Wanneer de stressvolle omstandigheden verdwijnen, ontwikkelen de dauerlarven zich tot volwassen nematoden.<sup>6,9</sup>

In natuurlijke populaties komen vooral hermafroditische nematoden voor. Zij zijn volledig diploïd en hebben, naast vijf paar autosomale chromosomen, één paar geslachtschromosomen (XX). Hermafroditische nematoden produceren als jong volwassene een beperkt aantal spermacellen en kunnen zichzelf daarmee bevruchten. Eén hermafroditische nematode kan door zelfbevruchting 200 tot 300 nakomelingen krijgen. Naast hermafroditische nematoden worden er ook mannelijke nematoden aangetroffen die met de hermafroditische nematoden kunnen paren. Mannelijke nematoden ontstaan spontaan (frequentie ongeveer 0,1%) en hebben één geslachtschromosoom (XO).<sup>6,10</sup>

#### **4. Voorgenomen werkzaamheden**

##### **4.1 gg-*C. elegans***

De aanvrager wil *C. elegans* genetisch modificeren met een CRISPR-gene drive gericht tegen het *dpy-10* gen. De aanvrager maakt hiervoor gebruik van een plasmide met drie expressiecassettes: 1) de Cas9/mCherry cassette die in de kiembaan tot expressie komt en codeert voor zowel het Cas9 endonuclease eiwit als het rode fluorescente eiwit mCherry; 2) de guideRNA cassette met een sgRNA van 20 nucleotiden gericht tegen het *dpy-10* gen van *C. elegans*; 3) de selectiecassette die codeert voor hygromycine-resistentie. De drie expressiecassettes worden geflankeerd door circa 600 baseparen die homoloog zijn aan de plaats van insertie in het *C. elegans* genoom, i.e. het *dpy-10* gen. Door de insertie wordt het *dpy-10* gen gedeeltelijk vervangen door de expressiecassettes en is dit gen niet langer actief.

De gene drive richt zich tegen het *dpy-10* gen, dat codeert voor een collageen dat zich in de huid (cuticula) van *C. elegans* bevindt. *C. elegans* heeft normaal gesproken regelmatige ringgroeven (*annuli and furrows*) in het oppervlak van de huid. *Dpy-10 C. elegans* mutanten hebben deze regelmatige ringgroeven niet. Zij zijn minder flexibel en kunnen moeilijker complexe bewegingen maken en van richting veranderen. Ook zijn zij korter en dikker dan wild-type nematoden.<sup>11</sup>

##### **4.2 Voorgestelde inperkingsniveau en aanvullende maatregelen**

Werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen met een gene drive worden in Nederland in eerste instantie op het hoogste inperkingsniveau ingeschaald (IV). Een aanvrager kan vervolgens verzoeken om de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau te mogen uitvoeren.<sup>1,2</sup>

De aanvrager heeft verzocht om de werkzaamheden uit te mogen voeren in een ML-II werkruimte met een ontheffing voor de aanwezigheid en het gebruik van een veiligheidskabinet van klasse II. Daarnaast heeft de aanvrager een aantal aanvullende werkvoorschriften voorgesteld:

- De werkzaamheden zullen op een specifiek toegewezen werkplek worden uitgevoerd, die bekleed is met vochtabsorberend materiaal.

- De agarplaten met de gg-*C. elegans* worden bewaard in een open doos zodat condensvorming wordt voorkomen. Deze doos is geplaatst in een tweede open doos met vochtabsorberend materiaal.
- Tijdens de werkzaamheden zullen handschoenen gedragen worden om te voorkomen dat gg-*C. elegans* wanneer deze op de handen terecht zou komen, bij het wassen van de handen in het riool terechtkomt. De handschoenen worden na het beëindigen van de werkzaamheden in ggo-afvalvaten gedeponeerd. Deze vaten zullen na hermetische sluiting en desinfectie van de buitenkant wekelijks ter onmiddellijke verbranding worden aangeboden bij een verbrandingsinstallatie.

## 5. Overwegingen en advies

De aanvrager is voornemens onderzoek uit te voeren met gg-*C. elegans* met een CRISPR-gene drive gericht tegen het *dpy-10* gen. Gene drives veranderen de frequentie waarmee sequenties na geslachtelijke voortplanting in nakomelingen voorkomen. Bij ongeslachtelijke voortplanting veranderen gene drives de frequentie, waarmee sequenties in nakomelingen voorkomen, niet. Natuurlijke *C. elegans* populaties bestaan voor het merendeel (ca. 99,9%) uit hermafrodiete nematoden die zich hoofdzakelijk via zelfbevruchting voortplanten.<sup>6</sup> Daarnaast merkt de COGEM op dat tegen CRISPR-gene drives gemakkelijk resistentie ontstaat, waardoor de verspreiding van een gene drive belemmerd wordt.

*C. elegans* droogt bij een normale luchtvochtigheid snel uit<sup>5</sup> en zal daarom niet overleven wanneer de nematode buiten de agarplaten, waarin zij normaal gesproken wordt gehouden, terechtkomt. Alleen bij een hoge luchtvochtigheid zou *C. elegans* enige tijd kunnen overleven.<sup>5</sup> Wild-type *C. elegans* nematoden zijn 250 µm (L1 larven) tot 1150 µm (volwassen) lang<sup>10</sup> en kunnen zich niet via aerosolen verspreiden.

Bij de werkzaamheden zullen handschoenen worden gedragen om te voorkomen dat gg-*C. elegans*, wanneer deze tijdens het uitvoeren van de werkzaamheden per ongeluk op de hand van een medewerker terecht zou komen, bij het handen wassen in het riool terechtkomt. Agarplaten met gg-*C. elegans* worden in een open doos bewaard en deze doos wordt in een tweede doos met vochtabsorberend materiaal geplaatst. Werkzaamheden met de gg-*C. elegans* worden uitgevoerd op een specifiek toegewezen werkplek die met vochtabsorberend materiaal is bekleed. Wanneer een gg-*C. elegans* nematode op het vochtabsorberend materiaal terecht zou komen, zal deze hieraan vastkleven, uitdrogen en sterven.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de kans op uitsleep van de gg-nematoden verwaarloosbaar klein is indien de voorgenomen werkzaamheden plaatsvinden op ML-II inperkingsniveau met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende werkvoorschriften. De COGEM acht het niet noodzakelijk dat handelingen met gg-*C. elegans* in een veiligheidskabinet worden uitgevoerd. Op dit inperkingsniveau en met inachtneming van de

aanvullende werkvoorschriften is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Staatscourant (2016). Regeling van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu van 15 juni 2016, nr. IENM/BSK-2016/107788, tot wijziging van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 (aanpassing bijlagen 2,4, 5 en 11). Nr. 31027; 16 juni 2016
2. Kamerbrief (2016). Beleid ten behoeve van een nieuwe ontwikkeling in de biotechnologie. Kenmerk IENM/BSK-2015/225461
3. COGEM (2019). Adviserende brief 'inschaling laboratoriumexperimenten met gene drives' en aanbieding onderzoeksrapport. COGEM advies CGM/190509-01
4. The *C. elegans* sequencing consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396): 2012-2018
5. Stiernagle T (2006). Maintenance of *C. elegans*. Wormbook doi/10.1895/wormbook.1.101.1, [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org) (gepubliceerd op 11 februari 2006)
6. Frézal L & Félix M-A (2015). *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife* 4: e05849. doi: 10.7554/eLife.05849
7. Wolkow CA & Hall DH (2011). Dauer behavior. WormAtlas doi:10.3908/wormatlas.3.3, [www.wormatlas.org/dauer/behavior/mainframe.htm#Gaglia2009](http://www.wormatlas.org/dauer/behavior/mainframe.htm#Gaglia2009)
8. Erkut C *et al.* (2012). How worms survive desiccation. Trehalose *pro* water. *Worm* 1:1 61-65
9. Ailion M & Thomas JH (2000). Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156(3): 1047-1067
10. Palikaras K and Tavernarakis N, *Caenorhabditis elegans* (Nematode). In: Stanley Maloy and Kelly Hughes, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* 2nd edition, Vol 1. San Diego: Academic Press; 2013. p. 404–408.
11. Shaw M *et al.* (2018). Three-dimensional behavioural phenotyping of freely moving *C. elegans* using quantitative light field microscopy. *PLoS ONE* 13(7): e0200108