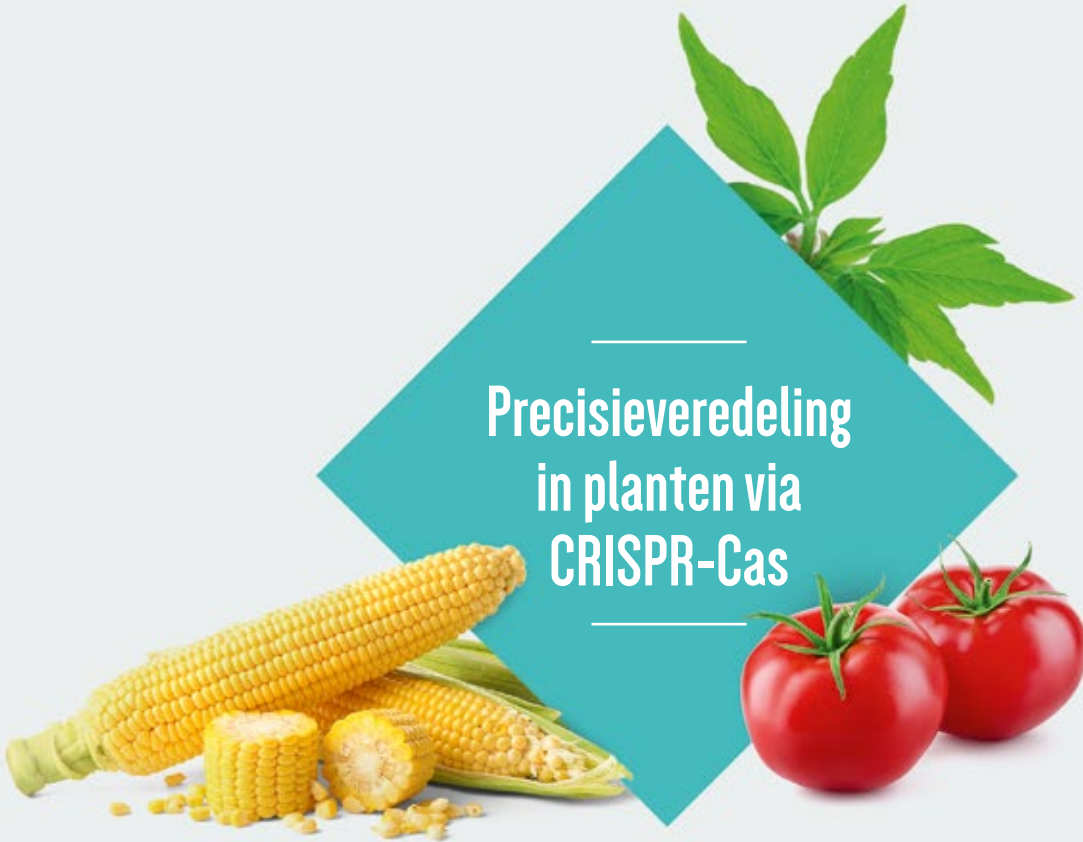




Precisieveredeling
in planten via
CRISPR-Cas



Inhoud

Samenvatting	3
Feiten en cijfers	4
1. CRISPR-Cas, een revolutie in genoombewerking	6
<i>Bacterie beschermt zich tegen virussen</i>	7
<i>Onderzoekers leren van bacterie</i>	8
<i>Gericht knippen ...</i>	8
<i>... en 'natuurlijk' plakken</i>	10
2. CRISPR-Cas versnelt onderzoek	12
<i>Een grote impact</i>	13
<i>Basisonderzoek in planten</i>	15
3. Toepassingen van genoombewerking	16
<i>Van plant tot gewas</i>	17
<i>CRISPR-Cas als precisieveredeling</i>	17
<i>Mutaties, bron voor genetische variatie</i>	18
<i>Ongezien nauwkeurig</i>	21
<i>Buitengewoon veelzijdig</i>	21
4. Onderscheid genoombewerking en klassieke genetische modificatie	24
<i>Geen vreemd DNA</i>	25
<i>Geen selectiemerkers</i>	25
<i>Europese regelgeving</i>	26
5. Besluit	28
Referenties	29

Samenvatting

Genoombewerking ('Genome editing' in het Engels) is een revolutionaire technologie om snel en precies veranderingen in het genetisch materiaal van levende wezens aan te brengen. Dit kan – in principe – in DNA van planten, microben, dieren, en mensen. Wetenschappers kunnen met deze technologie heel specifiek een DNA-letter veranderen, een stukje van meerdere DNA-letters vervangen door een ander stukje, of een geselecteerd gen aan- of uitschakelen.

Genoombewerking zorgt sinds enkele jaren voor een ommekeer in het onderzoek in de levenswetenschappen. Dat is voornamelijk te danken aan een zeer succesvolle vorm van de technologie: CRISPR-Cas (uitgesproken als 'krisper-kas'). Het vakblad Science riep CRISPR-Cas uit tot dé wetenschappelijke doorbraak van 2015.

Het systeem bestaat uit twee componenten: een 'gids' en een 'schaar'. Cas is de moleculaire schaar: het eiwit knipt DNA in stukken op een plaats in het genoom waar het door een CRISPR RNA-molecule naartoe wordt geleid. Dit mechanisme is op zich niet nieuw: bacteriën gebruiken CRISPR-Cas al heel lang om zich te beschermen tegen virussen. CRISPR-Cas is dus geen uitvinding van de mens, maar al miljoenen jaren geleden bedacht door de natuur. De mens gebruikt dit systeem nu om doelbewuste genoombewerking te realiseren.

Net zoals andere technieken voor genoombewerking stelt CRISPR-Cas wetenschappers in staat om heel precieze DNA-veranderingen aan te brengen zonder dat er sprake is van het inbouwen van 'soortvreemde' genen. CRISPR-Cas blinkt vooral uit omdat de techniek goedkoper, sneller, efficiënter en veelzijdiger is. Ondertussen wordt dit mechanisme in ontelbare labs over heel de wereld gebruikt. In de eerste plaats voor onderzoeksdoeleinden, maar naast basisonderzoek is de technologie ook een zeer verfijnd gereedschap voor genterapie en gewasveredeling. De eerste toepassingen in de geneeskunde en de landbouw zijn dan ook een feit.

In dit VIB-dossier staat centraal hoe de CRISPR-Cas-technologie vandaag al toepassingen heeft in de landbouw en welke toekomstige mogelijkheden zich aftekenen.

Het dossier is geschreven op mensenmaat. Ook wie geen specialist is in de moleculaire genetica, maar zich wil informeren en wil bijleren, zal er zijn gading in vinden. De kaderstukken zijn geschreven voor wie wat dieper wil ingaan op de achterliggende technologie, enkele toepassingen of markante discussiethema's.

Feiten en cijfers

In de kern van elke cel bevindt zich het DNA. Dit is de drager van de erfelijke eigenschappen en vormt het menu met de instructies van wat die cel is en kan. Het geheel van het DNA in de cel noemen we het 'genoom'. Een instructie noemen we een 'gen' (zie figuur 1 op pagina 9).

Het genoom is een aaneenschakeling van DNA-bouwstenen of DNA-letters. Het genoom van bijvoorbeeld de darmbacterie E. coli bestaat uit een opeenvolging van ongeveer 3 miljoen DNA-letters. Het genoom van de mens telt er 3,2 miljard.

Toch is de mens geen recordhouder op dat vlak. Dat is (voorlopig) de eenbes (Paris japonica) met 150 miljard DNA-letters. De eenbes is een plantje dat in sub-alpiene gebieden in Japan groeit. Het is onduidelijk waarom de eenbes zoveel DNA heeft.

Genen worden eerst gekopieerd naar RNA en vervolgens vertaald in eiwitten. Eiwitten hebben naast een structurele functie in de cel, ook een rol bij chemische omzettingen, transport van biomoleculen, communicatie en regulatie.

DNA is stabiel. Toch kan de opeenvolging van DNA-letters blijvend veranderen. We spreken dan van een mutatie. Mutaties kunnen van nature optreden in elk gen, op elk moment en in elke cel. Mutaties kunnen ook moedwillig worden aangebracht door de mens, bijvoorbeeld door de cel te bestralen of door genoombewerking.

Het woord mutatie heeft een negatieve connotatie. Mutaties kunnen de functie van een gen veranderen. Dat kan ten kwade zijn: een opeenstapeling van mutaties kan bij de mens leiden tot kanker en mutaties liggen aan de basis van erfelijke ziekten. Evengoed wordt de functie van een gen echter verbeterd door een mutatie. Het feit dat wij bijvoorbeeld koeienmelkeiwit kunnen verteren is het gevolg van een mutatie. Mutaties zijn daarom lang niet altijd negatief. Bovendien hebben veel mutaties zelfs geen enkel effect op de functie van een gen. We noemen ze neutrale mutaties.

Mutaties creëren variatie binnen een soort. Ze zijn dus essentieel voor levende wezens: zonder mutaties, zouden we geen evolutie noch biodiversiteit kennen. Er bestaat een delicate balans tussen DNA-stabiliteit en evolutie.

Genoombewerking is een methode om op een gerichte manier en op een vooraf bepaalde plaats in het genoom een mutatie aan te brengen.

Dat genoombewerking de laatste jaren breed is doorgebroken, is voornamelijk te danken aan een zeer succesvolle vorm van de technologie: CRISPR-Cas. CRISPR-Cas maakt het mogelijk DNA te wijzigen met ongekeerde precisie en efficiëntie.

Het tijdschrift Science riep CRISPR-Cas uit tot wetenschappelijk doorbraak van 2015. De technologie is ontwikkeld op basis van het CRISPR-Cas-verdedigingssysteem van bacteriën tegen virussen.

In CRISPR-Cas staat CRISPR voor Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats en Cas voor Caspr associated eiwit.



CRISPR-Cas, een revolutie in genoombewerking

Genoombewerking is een nieuwe ontwikkeling die de mogelijkheid biedt om veranderingen aan te brengen in specifieke genen, zowel in bacteriën als in schimmels, planten, dieren en mensen. Genoombewerking laat toe de DNA-sequentie van een cel of een organisme te veranderen door DNA-letters toe te voegen, te vervangen of te verwijderen.

Bacterie beschermt zich tegen virussen

Het verhaal van CRISPR begint in een bacterie. De initiële ontdekking van CRISPR-sequenties werd gerapporteerd in **1987** door wetenschappers uit Japan die het genoom van de bacterie *E. coli* onderzochten. Ze identificeerden vijf identieke stukjes DNA die zich herhaalden en die werden gescheiden door niet-repetitieve DNA-sequenties van identieke grootte. Op dat moment werden deze DNA-herhalingen gezien als een curiositeit. Men kon ze immers niet verklaren.

Toen wetenschappers het genoom van steeds meer bacteriesoorten onder de loep namen, zagen ze telkens deze herhaalde DNA-sequenties terugkomen. Onder meer in de bacteriën die gebruikt worden om kaas en yoghurt te maken, en in bacteriën die van nature voorkomen in onze darm. Ondertussen blijkt dat meer dan de helft van alle bacteriesoorten beschikken over CRISPR-sequenties.¹

De vaststelling dat deze regelmatige DNA-herhalingen steeds samen voorkomen met een gemeenschappelijke groep van genen (Cas-genen) versterkte het mysterie. In **2002** doopte een team Nederlandse microbiologen de DNA-regio met de herhalingen 'CRISPR', een acroniem van 'Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats' (geclusterde, regelmatig onderbroken, korte palindroomherhalingen) en de geassocieerde genen werden gelabeld als 'Cas'-genen, kort voor CRISPR-associated genen (met CRISPR geassocieerde genen).² Snel werd duidelijk dat de eiwitten, waarvoor de Cas-genen coderen, functioneren als moleculaire scharen die DNA kunnen knippen.

Verder onderzoek maakte in **2005** duidelijk dat de DNA-sequenties tussen de herhalingen bijna identiek zijn aan het genetisch materiaal van

virussen waarvan bekend is dat ze bacteriën infecteren, zogenoemde bacteriofagen.^{3, 4, 5} De CRISPR-regio bleek dus een soort van register van virale DNA-fragmenten door de bacterie ingebouwd in het eigen genoom. Vanaf toen werd geopperd dat CRISPR-Cas een defensiesysteem is waarmee bacteriën zich verdedigen tegen bacteriofagen. De bacterie verzamelt DNA-sequenties van binnendringende virussen en gebruikt die, in combinatie met Cas-eiwitten, om het DNA van die virussen te verknippen (zie figuur 2).

In **2007** konden wetenschappers voor de eerste keer experimenteel aantonen in de yoghurtmakende bacterie *Streptococcus thermophilus* dat CRISPR-Cas effectief een immunitietssysteem is dat weerstand biedt tegen virussen. Herhaaldelijke blootstelling van de bacteriën aan een virus deed bacteriën op termijn resistentie ontwikkelen. Die resistentie ging gepaard met de opname van stukjes virale genetische code in de CRISPR-regio van de bacteriën. Wanneer de wetenschappers de virale stukjes verwijderden uit de CRISPR-regio, was de resistentie in één klap verdwenen.

Over de jaren heen werden verschillende CRISPR-Cas systemen met verschillende kenmerken geïdentificeerd maar steevast is het mechanisme gelijklopend: uit het CRISPR-register in het DNA van de bacterie worden fragmenten afgeschreven (onder de vorm van RNA). Deze stukjes CRISPR RNA gaan op zoek naar virale genen om zich aan te binden. Vervolgens knipt het Cas-eiwit, geleid door de CRISPR RNA-sequentie, het virale gen in stukken (zie figuur 2). De verzameling stukjes virus-DNA dienen dus als geheugen. Zo kan de bacterie bij de volgende aanval snel het virus herkennen en het afweren.^{7, 8, 9}

Onderzoekers leren van bacterie

Gericht knippen ...

De grote doorbraak voor het gebruik van CRISPR-Cas als technologie om het genoom van microbe, plant en dier te bewerken kwam er in **2012** toen twee onafhankelijke onderzoekers - Jennifer Doudna (UC Berkeley in de VS) en Emmanuelle Charpentier (toen Universiteit van Umeå in Zweden, nu Max Planck Instituut in Duitsland) aantoonde dat je het CRISPR-Cas9-complex kan 'herprogrammeren'. Door de sequentie van het CRISPR RNA-molecule aan te passen, kan men het complex op elke gewenste plaats in het genoom laten knippen. Men moet ervoor zorgen dat de sequentie van het CRISPR-RNA matcht met de DNA-sequentie waar men wil knippen.^{8,9}

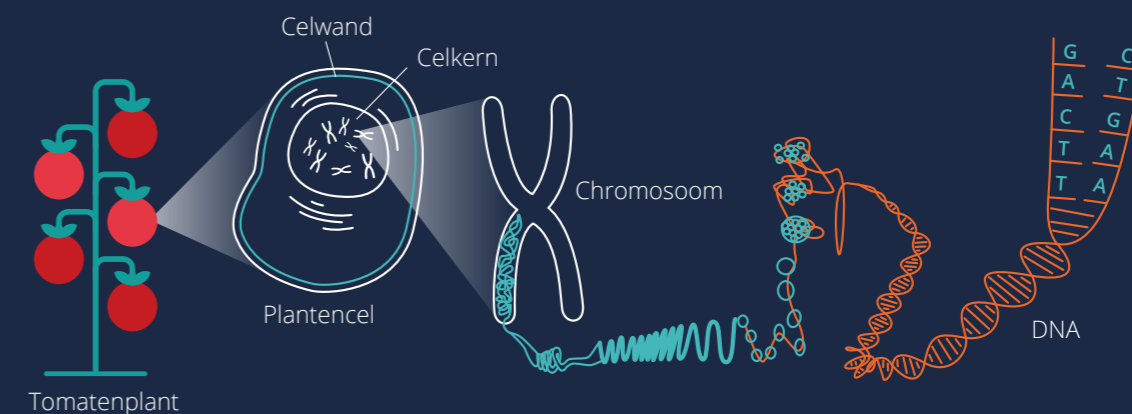
Kort daarna, in **2013**, toonden vijf onafhankelijke onderzoeksteams, met onder meer Feng Zhang en zijn collega's van het Broad Institute (MIT, VS), aan dat het CRISPR-Cas-systeem ook kan gebruikt worden om het DNA in cellen van mensen, muizen en zebrafissen te veranderen.^{11 12 13 14 15} De toepassing van CRISPR-Cas in zoogdiercellen betekende een kantelmoment in genoombewerking. Er volgden snel talloze publicaties waar het systeem werd gebruikt in verschillende organismen en voor verschillende toepassingen.

Later dat jaar (in augustus **2013**) werden vijf onderzoeksartikels gepubliceerd die de toepassing van CRISPR-Cas in planten bespraken.^{16 17 18 19 20} Deze eerste groep publicaties in planten toonde aan hoe immens veelzijdig de CRISPR-Cas-technologie is. Ze bleek niet alleen toepasbaar in *Arabidopsis thaliana* (zandraket), een plantje dat vaak door onderzoekers in het laboratorium wordt gebruikt, maar ook in voedingsgewassen zoals rijst. Later werden tomaat, tarwe, maïs en andere aan het lijstje toegevoegd.

CRISPR-Cas is niet de enige moleculaire technologie om genomen te bewerken. Er werden meerdere technieken ontwikkeld die ofwel gebruiken maken van andere moleculaire scharen dan Cas9 (Cas12, voorheen Cpf1 genoemd; Cas13, voorheen C2c2; ...) of die gebaseerd zijn op een ander mechanisme (o.a. oligonucleotide gedirigeerde mutagenese, TALEN technologie, ZFN technologie ...). Het zou ons echter te ver leiden om in dit dossier hierop dieper in te gaan. Voor een overzicht zie het VIB-dossier 'Van plant tot gewas: het verleden, heden en de toekomst van plantenveredeling'.



GENOOM STUURT CEL VANUIT DE KERN



Figuur 1. Genoom stuurt cel vanuit de kern

In de kern van elke cel bevindt zich het 'DNA', de drager van erfelijke informatie die het menu bevat met de instructies van wat een cel is en kan. Het geheel van het DNA in de cel noemen we het 'genoom'.

DNA, een dubbele draad die een helix vormt, zit in de kern verpakt onder de vorm van 'chromosomen'. Elke cel van, bij wijze van voorbeeld, een tomatenplant heeft 2x12 chromosomen of 2x12 'pakketjes DNA'. Uitgerold en achter elkaar geplaatst vormen die chromosomen een draad van ongeveer een halve meter lang met een diameter van 2 nm (nanometer) of 2 miljoenste van een millimeter.

Van zodra een cel deelt, krijgt elke dochtercel telkens het volledige genoom – alle DNA-pakketjes – van de oudercel. Dat vraagt flink wat kopieerwerk.

De DNA-lettercode bestaat uit 4 bouwstenen voorgesteld door de letters A, T, C en G. Een letter A op de ene DNA-streng zal steeds gepaard gaan met de letter T op de andere streng, en vice versa. Evenzo voor de letters C en G. Als we dus één streng aflezen, weten we ook de lettervolgorde van de andere – complementaire – streng. Het totale genoom van de rijstplant bestaat uit 370 miljoen DNA-letters, van de aardappel uit 840 miljoen en van tarwe uit 16 miljard letters. Ter vergelijking: het menselijk genoom telt 3,2 miljard DNA-letters.

Een opeenvolging van DNA-letters die codeert voor een 'instructie', noemen we een 'gen'.

Heel vaak is zo'n instructie het recept voor een 'eiwit'. De DNA-code of het gen wordt met andere woorden afgelezen en via een RNA-molecule vertaald in een eiwit. Eiwitten zijn belangrijk als structurelement van de cel, maar ook als uitvoerders van biochemische taken. Ze zorgen ervoor dat de cel voedingsstoffen omzet in energie, groeifactoren aanmaakt, een celwand produceert etc. Slechts een klein deel van het planten-DNA codeert effectief voor eiwitten. De rest van het DNA is belangrijk voor de regulatie van de afschrijving van DNA en vertaling naar eiwitten, het kopiëren van het DNA, het behoud van de structuur van het DNA en de chromosomen enz.

Afen toe sluipt er een foutje in het DNA-kopieerwerk. We noemen dat een 'mutatie'. Een fout in de code van een gen kan leiden tot een defect eiwit. Vaak leidt een mutatie echter niet tot een veranderd gen-product. Als deze mutaties worden doorgegeven aan de dochtercellen vergroot de variatie binnen de soort.

... en 'natuurlijk' plakken

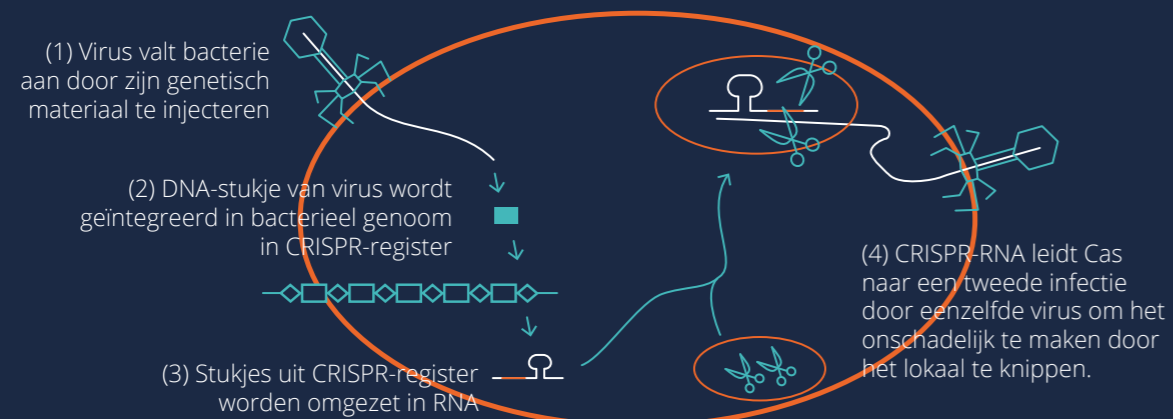
Breuken in DNA zijn schadelijk. Om die reden hebben levende wezens natuurlijke DNA-herstelmechanismen die breuken opsporen en vervolgens herstellen. Zo ook met breuken die door Cas worden veroorzaakt. Wanneer Cas heeft geknipt, kunnen zich twee natuurlijke scenario's van DNA-herstel voordoen: 'niet-homologe samenvoeging van de DNA-uiteinden' of 'homologie-gestuurd DNA-herstel'. De CRISPR-Cas-technologie kan gebruik maken van beide mechanismen.

In het geval van 'niet-homologe samenvoeging van de uiteinden' zet de cel specifieke eiwitten in om de twee eindjes van de DNA-breuk opnieuw aan elkaar te 'lijmen'. Dit proces is echter foutgevoelig en leidt vaak tot willekeurige mutaties op de plaats van het herstel: veelal verdwijnen één of enkele DNA-letters. Mogelijk wordt hierdoor de functie van het gen uitgeschakeld (zie figuur 3). Vaak is dat echter precies de bedoeling van de onderzoeker (zie volgende hoofdstuk).

Men spreekt over 'homologie-gestuurd DNA-herstel' of 'homologe recombinatie' wanneer de cel een andere DNA-sequentie gebruikt als mal om de breuk te herstellen. Voorwaarde is dat de uiteinden van dit extra stukje DNA in grote mate moeten overeenkomen met de DNA-sequenties rond de breuk. De breuk wordt dan hersteld door vervanging van de breukregio via het DNA-stukje dat als mal wordt aangeleverd. Hiermee wordt het DNA ter hoogte van de breuk

in zijn originele staat hersteld, of kan er doelbewust een wijziging worden ingebouwd, afhankelijk van de mal die je aanlevert.

CRISPR-CAS, DOOR BACTERIËN GEBRUIKT OM VIRUSSEN AF TE WEREN

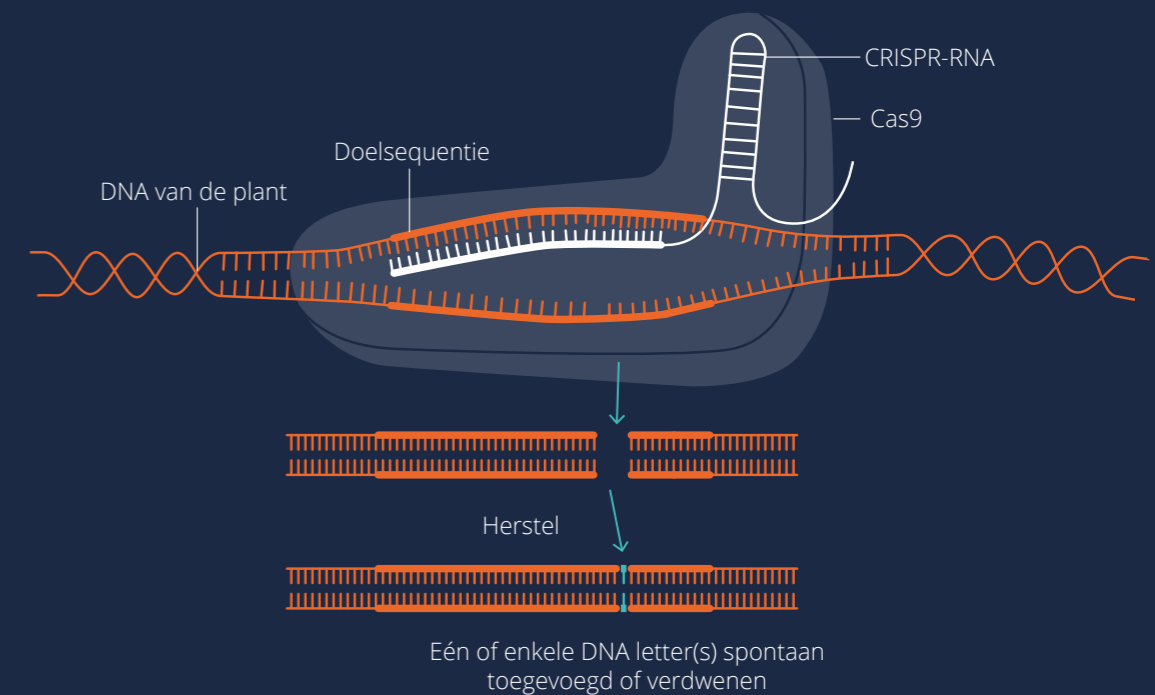


Figuur 2. CRISPR-Cas, door bacteriën gebruikt om virussen af te weren

Virussen bestaan uit een eiwitmantel met daarin genetisch materiaal. Een virus vermenigvuldigt zich door zijn genetisch materiaal in te brengen in een cel (bijvoorbeeld een bacterie) en gebruik te maken van de synthesemechanismen van die cel om virale eiwitten en genetisch materiaal aan te maken waardoor nieuwe virusdeeltjes ontstaan. Deze kunnen op hun beurt andere cellen infecteren.

Telkens nadat een bacterie door een virus wordt aangevallen (1), maar de aanval overleeft, bewaart de bacterie een stukje van het virus-DNA in zijn eigen DNA, meer bepaald in het CRISPR-register (2). De bacterie schrijft dit register over in CRISPR RNA-moleculen (3) die de Cas-eiwitten gidsen naar nieuw binnenkomend, voor de bacterie herkenbaar, virus-DNA. Cas verknipt het virale DNA en weert op die manier de virale aanval af (4). (Figuur gebaseerd op referentie¹⁰)

CRISPR-CAS, DOOR MENSEN GEBRUIKT OM DNA TE BEWERKEN



Figuur 3. CRISPR-Cas, door mensen gebruikt om DNA te bewerken

Het Cas-eiwit wordt door het gids-RNA naar een specifieke plaats op het DNA geleid waarna het een breuk veroorzaakt. De breuk in het DNA wordt vervolgens hersteld door de cel. Tijdens dit natuurlijk herstelproces worden vaak fouten gemaakt waardoor een of meerdere DNA-bouwstenen verdwijnen of toegevoegd worden. Er worden met andere woorden een of meerdere mutaties veroorzaakt.



2 CRISPR-Cas versnelt onderzoek

Genoombewerking is niet nieuw. Er bestaan al jaren verschillende technieken om wijzigingen in DNA aan te brengen. Wat CRISPR-Cas zo revolutionair maakt is dat het erg doelgericht, goedkoop en gemakkelijk is. Wetenschappers aan universiteiten en in bedrijven zijn daarom massaal aan de slag gegaan met CRISPR-Cas.

Een grote impact

Overal in de wereld zetten wetenschappers zich in om de moleculaire mechanismen en levensprocessen in virussen, bacteriën, planten, dieren en mensen te ontcijferen. Ze willen blootleggen hoe alles functioneert en hoe verschillende genen, eiwitten en biologische processen in elkaar grijpen. Dit basisonderzoek geeft inzicht in de oorsprong van aandoeningen als kanker, hersenen zenuwziekten, hart- en vaataandoeningen, ontstekingen en infecties. Op termijn leidt deze kennis tot nieuwe geneesmiddelen, vaccins, diagnostische testen en behandelingsmethoden (zie VIB-dossiers 'Ziekte van Alzheimer' en 'Kanker').

Gelijkaardige inzichten in de groei- en ziektemechanismen bij planten helpen om de opbrengst van landbouwgewassen te verhogen, schade door ziekten en plagen te voorkomen, of gewassen te beschermen tegen extreme omstandigheden zoals droogte.

Een belangrijk element in dit onderzoek is het aflezen, ontcijferen en in kaart brengen van het volledige genoom van organismen. Het in kaart brengen van genetische informatie gaat steeds sneller en wordt steeds goedkoper dankzij de introductie van nieuwe technieken en afleesmachines. Maar het is niet omdat je een genoom kan aflezen, dat je het ook volledig begrijpt. De uitdaging vandaag is dus het identificeren van de genen, het achterhalen van de functie van de corresponderende eiwitten, nagaan welke andere – niet voor eiwitten coderende – sequenties belangrijk zijn in het genoom, enzovoort.

Met CRISPR-Cas kunnen wetenschappers de functie van bepaalde sequenties of van een gen snel achterhalen. CRISPR-Cas laat hen toe het betreffende gen uit te schakelen en te kijken welke kenmerken van de cel of het organisme daardoor beïnvloed worden. We spreken dan van 'knock-outs'.

GESCHIL VOOR DE RECHTER

CRISPR-Cas is het onderwerp van een groot patentenconflict. Verschillende onderzoeksgroepen en bedrijven claimen dat ze een belangrijke bijdrage hebben geleverd tot de uitvinding en het gebruik van CRISPR-Cas als instrument om genomen te bewerken. Dat heeft gezorgd voor een complex patentlandschap, met tegenstrijdige argumenten over eigendom, inbreuk, en de wettigheid van patenten.

Kort nadat Jennifer Doudna en Emmanuelle Charpentier in 2012 aantoonde dat CRISPR-Cas kan gebruikt worden om DNA te bewerken⁹, vroegen ze een patent op de technologie aan bij het Amerikaanse octrooibureau (op 25 mei 2013). Het bureau kende echter een patent toe aan concurrent Feng Zhang. Die had zijn aanvraag pas in oktober 2013 ingediend, maar via een snellere procedure. Zhang had in 2013 de eerste toepassing van CRISPR-Cas op eukaryote cellen gepubliceerd.¹² Ondertussen claimen nog meer onderzoekers de eerste uitvinder te zijn: onder meer een Litouws team onder leiding van Virginijus Siksnys (Vilnius University) en Luciano Marraffini van de Rockefeller University (VS). Ook werden reeds honderden patenten ingediend over het gebruik van CRISPR-Cas voor specifieke toepassingen. De patentensituatie rond CRISPR-Cas is hierdoor erg complex.

De inzet van het patentdispuut is hoog: wie een patent op CRISPR-Cas krijgt toegewezen, kan bepalen of (en zo ja hoeveel) iemand moet betalen als hij of zij de methodologie gebruikt. De manier waarop met voorgaande revolutionaire doorbraken in de biotechnologie – zoals recombinant DNA, RNA interferentie en PCR – is omgegaan, kan hier richtinggevend zijn. Bovenstaande technologieën konden vrij gebruikt worden door academische en niet-commerciële onderzoeksgroepen, terwijl commerciële bedrijven toegang kregen tot niet-exclusieve licenties. Deze aanpak werkte de brede verspreiding van deze technieken in de hand en zou dus ook uitkomst kunnen bieden in de CRISPR-zaak.

Ook kunnen meerdere genen in een keer bestuurd worden door ze tegelijk uit te schakelen.

De gewenste sequentie voor het CRISPR-RNA kan snel en goedkoop worden aangemaakt – bijvoorbeeld door het online bij een van de talloze DNA- en RNA-productiebedrijven te bestellen. Via een koerierdienst worden de CRISPR-RNA-moleculen dan afgeleverd in het lab. Net zoals u en ik schoenen, boeken of kantoorartikelen online bestellen.

Het aangeleverde CRISPR-RNA wordt samen met Cas-eiwitten in de cellen ingebracht, waarna op een plaats in het genoom die homolog is aan het CRISPR-RNA een mutatie wordt aangebracht. De cellen met een mutatie worden vervolgens geselecteerd en verder opgegroeid in cultuur.

Basisonderzoek in planten

De opkomst van deze nieuwe technologie om genomen te bewerken, heeft een stroomversnelling in het plantenonderzoek teweeggebracht. Sinds de introductie van CRISPR-Cas wordt dit instrument door talloze labs wereldwijd gebruikt om functies van plantengenen te achterhalen en plantenkenmerken aan te passen. Dit gebeurt voornamelijk door mutaties te veroorzaken op een gewenste plaats in het planten-DNA waardoor een gen wordt uitgeschakeld. Wanneer de gewenste DNA-verandering is aangebracht, kunnen de onderzoekers de gemuteerde cellen laten uitgroeien tot volledige planten. Planten hebben immers de unieke eigenschap dat uit één enkele cel gemakkelijk een nieuwe plant kan worden opgekweekt.

Wanneer men dus het DNA van één plantencel kan aanpassen dan kan men hieruit een volledige, DNA-bewerkte plant verkrijgen. Soms gebeurt dit spontaan, in andere gevallen moet het proces gestimuleerd worden door het toevoegen van

plantenhormonen die zorgen voor de aanmaak van wortels en bladeren. In de tuinbouw wordt dit principe al eeuwen benut via technieken zoals enten en stekken.

De eerste planten waarin succesvol DNA-veranderingen werden aangebracht met CRISPR zijn *Arabidopsis thaliana* (zandraket), tabak, rijst en tarwe.^{17 18 19 20} Daarna volgden snel maïs²¹ en sorghum²².



Precisieveredeling in planten

CRISPR-CAS OM ZIEKTES BIJ DE MENS BETER TE BEGRIJPEN

Ook in biomedisch onderzoek wordt CRISPR-Cas wijdverspreid gebruikt om genfuncties te onderzoeken. Sinds de voltooiing van het menselijk genoomproject graaft de wetenschap steeds dieper in onze cellen. Systematisch tracht men de functies te achterhalen van de meer dan 20.000 genen in ons genoom. De CRISPR-Cas-technologie laat toe om vlot een gen uit te schakelen in zoogdiercellen, waaronder menselijke cellen in cultuur.

Om ziektes te kunnen doorgronden werken wetenschappers vaak met 'ziektomodellen'. Dit zijn proefdieren of cellijnen waarin een menselijk ziektebeeld nagebootst wordt door middel van genetische aanpassingen. Ook dit onderzoek is in een stroomversnelling geraakt dankzij CRISPR-Cas. Veel gebruikte proefdieren hiervoor zijn fruitvliegjes, zebravissen, muizen en ratten. Ziektomodellen zijn nodig om het ontstaan en de progressie van ziekten te bestuderen, en in een latere fase om geneesmiddelen en andere interventies te testen vooraleer ze aan mensen worden toegediend.²³



3 Toepassingen van genoombewerking

De veredelingssector staat klaar om genoombewerking te omarmen voor tal van redenen. De procedure is doelgerichter, sneller en preciezer dan klassieke plantenveredeling of zelfs dan genetische wijziging die we kennen van de ggo's (genetisch gewijzigde organismen). Genoombewerking heeft bovendien het grote voordeel dat producenten gemakkelijk genetische variatie in hun gewassen kunnen introduceren, wat het vertrekpunt is van elke vorm van veredeling. Ze kunnen dat bovendien doen zonder genen van andere organismen toe te voegen - iets wat de weerstand tegen ggo-gewassen in sommige regio's heeft aangewakkerd. Met genoombewerking hebben onderzoekers reeds paddenstoelen gemaakt die niet bruin worden wanneer ze gesneden zijn, maar ook ziekteresistente tarwe en tomaten.

Van plant tot gewas

Sinds het ontstaan van de landbouw – zo'n 10.000 jaar geleden – heeft de mens planten naar zijn hand gezet (zie ook VIB-dossier 'Van plant tot gewas: het verleden, heden en de toekomst van plantenveredeling'). Dat deed hij door de best presterende planten uit de natuur te selecteren en daarvan de zaden bij te houden om ze zelf op te kweken. Daarnaast werden interessante kenmerken die spontaan ontstonden, verankerd in bepaalde gewassen. Vaak ging die verankering tegen de natuurlijke selectie in, omdat werd gekozen voor kenmerken die de mens goed uitkwamen (hogere opbrengst, grotere vruchten, gewenste kleur, ...). De grote rijkdom aan gewassen die we vandaag telen en eten, hebben we voornamelijk te danken aan die menselijke selectie en tussenkomst.

Gewasverbetering blijft echter ook vandaag broodnodig. Wereldwijd staat de landbouw voor grote uitdagingen: het klimaat wordt wispelturiger; door droogte of overvloedige regenval wordt het in bepaalde regio's stilaan onmogelijk om het land efficiënt te bebouwen; maar ook kleine temperatuurstijgingen kunnen een grote impact hebben op de opbrengsten van bepaalde gewassen. Een tweede uitdaging is de toename van de wereldbevolking met een snelle wereldwijde uitbreiding van de middenklasse. Daardoor stijgt de vraag naar voedsel- en voeder gewassen. Willen we hieraan voldoen, dan zal de productie evenzeer moeten aangroeien. Kwekers anticiperen op deze uitdagingen door nieuwe rassen te kweken die voldoende opbrengen en beter droogte en/of groeien op bodems die vandaag minder geschikt zijn voor landbouw.

Tot slot moeten we de impact van de landbouw op mens en milieu verkleinen. Dit kan door op

een andere manier te bemesten en op een selectievere manier pesticiden te gebruiken. Dat komt de veiligheid en gezondheid van de boer en de consument ten goede, en spaart bijvoorbeeld nuttige insecten.

Op al deze vlakken is een grote rol weggelegd voor toekomstige plantenveredeling. Natuurlijke resistentiemechanismen tegen schimmels, bacteriën, en insecten kunnen ingebouwd worden in onze moderne en hoogrenderende gewassen. Dat verkleint hun afhankelijkheid van gewasbeschermingsmiddelen. Het veredelen van planten kan er ook voor zorgen dat ze efficiënter met water en bemesting omspringen.

CRISPR-Cas als precisieveredeling

Plantenveredelaars kunnen verschillende methodes van veredeling gebruiken: van selectief kruisen tot innovatieve methodes van genoombewerking.

In de loop van de 20ste eeuw werden er op grond van wetenschappelijke inzichten en toegenomen technologische mogelijkheden nieuwe technieken in de plantenveredeling geïntroduceerd. Zo maken hybriden, in-vitro technieken en merker-geassisteerde selectie al decennia lang een onderdeel uit van de veredeling, ongeacht voor welk type van landbouw de gewassen ontwikkeld worden.

In de voorbije jaren zijn nog bijkomende technieken uitgewerkt die een rol kunnen spelen in het ontwikkelen van nieuwe gewasvariëteiten met nuttige eigenschappen voor de boer, het leefmilieu, de verwerkers en/of de consument. Deze technieken worden gezamenlijk vaak 'new breeding technologies' (nieuwe veredelingsstechnieken)

nieken) genoemd (zie VIB-dossier 'Van plant tot gewas: het verleden, heden en de toekomst van plantenveredeling'). Genoombewerking is de nieuwste telg onder deze veredelingstechnieken. Een ding moet de lezer echter wel voor ogen houden: of deze methodes nu recent tot stand zijn gekomen of al duizenden jaren meegaan - alle technieken voor plantenveredeling hebben gevolgen voor het DNA van die plant.

Mutaties, bron voor genetische variatie

Spontane mutaties gevolgd door menselijke selectie

Tot het begin van de 20ste eeuw was plantenveredeling vooral een onbewust selectieproces waarbij zaden of knollen van de best aangepaste gewassen bewaard werden voor het volgende jaar. Dit selectief kruisen was gebaseerd op spontane DNA-mutaties die zich in de natuur voordoen. Deze mutaties kunnen te wijten zijn aan foutjes tijdens het verdubbelen van het DNA tijdens de celdeling of kunnen ontstaan onder invloed van straling, bijvoorbeeld van de zon. Niet elke wijziging aan de DNA-sequentie leidt echter tot nieuwe eigenschappen. In de meeste gevallen verandert er helemaal niets aan de uiterlijke kenmerken van de plant. Maar in bepaalde situaties kunnen wijzigingen in het DNA van een plant resulteren in nieuwe voordelige of nadelige eigenschappen. Deze wijzigingen dragen bij tot genetische variatie.

Deze veranderingen werden ook opgemerkt door onze voorouders. Er werd geselecteerd voor nieuwe interessante eigenschappen om op die manier gewassen te creëren met maximale voordelen voor de mens. De grote verscheidenheid in de huidige kolenfamilie is hier een mooi voor-

beeld van. Alle kolen (bloemkool, spruitjes, boerenkool, broccoli, etc.) zijn door spontane mutaties ontstaan uit dezelfde koolachtige voorouder. Het uitzicht van een bloemkool bijvoorbeeld wordt verkregen door slechts één verandering in één gen. Wanneer dit gen in andere planten wordt uitgeschakeld, krijgen ook hun bloemen een bloemkoolachtig uitzicht.²⁵

Mutatie-veredeling

Hoe groter de genetische variatie binnen een soort, hoe meer mogelijkheden er zijn om interessante kenmerken te vinden en samen te brengen. Naast de spontane DNA-mutaties, gingen plantenveredelaars rond de jaren 1930 over naar mutatie-veredeling om additionele variatie te introduceren en nieuwe gewassenmerken te creëren. Met dit type veredeling maakt men gebruik van straling of chemicaliën om met een hoge frequentie veranderingen aan te brengen in het planten-DNA. Op die manier vergroot men de genetische variatie beschikbaar voor plantenveredeling. Het resultaat van die bestralingen is een grote verzameling van zaden met verschillende willekeurige DNA-mutaties. Men gebruikt deze zaden vervolgens in jarenlange kweekprogramma's om de ongewenste mutaties kwijt te geraken en planten te identificeren met gewenste, verbeterde eigenschappen.

Klassieke mutatieverdeling heeft ondertussen geleid tot 3200 verbeterde gewasvariëteiten in meer dan 175 plantensoorten, waaronder rijst, maïs, tarwe, banaan, tomaat, pompoen en soja. De opvallende kleur van het vruchtvlees en de zoete smaak van de roze pompelmoes is een sprekend voorbeeld van een nieuw gewassenmerk gecreëerd door deze vorm van mutatieveredeling.

CRISPR-KLEEFMAÏS

Het zaadbedrijf Corteva Agriscience (een samensmelting van de bedrijven Dow, Dupont en Pioneer) neemt het voortouw met CRISPR-Cas-toepassingen in gewasveredeling. In de lente van 2016 ontwikkelden wetenschappers van het bedrijf een eerste commercieel gewas met deze technologie: een nieuwe generatie van kleeftmaïs (waxy corn in het Engels). Terwijl het zetmeel van gewone maïskorrels voor 25% uit amylose en voor 75% uit amylopectine bestaat, bevatten de korrels van kleeftmaïs bijna uitsluitend amylopectine (97%). Amylopectine-zetmeel is relatief gemakkelijk te verwerken en wordt veel gebruikt in de voedselverwerkingsindustrie en voor de productie van lijmen, bijvoorbeeld de lijm op kartonnen dozen en op de kleeftstrook van enveloppen. Het probleem was dat de eerste generatie kleeftmaïs – ontwikkeld via traditionele veredeling – een lagere opbrengst had ten opzichte van andere variëteiten. Dit werd nu verholpen dankzij CRISPR-Cas. De onderzoekers van Corteva Agriscience slaagden erin het waxy-gen te verwijderen (we spreken dus van een DNA-deletie) en dit in de meeste van de huidige elite-variëteiten. Hierdoor kan men veel sneller kleeftmaïsvariëteiten maken en kan het opbrengstverlies vermeden worden. Deze maïsvariëteiten worden over een paar jaar verwacht op de Amerikaanse markt, in afwachting van veldproeven en reglementaire toetsingen.

CRISPR-MAÏS, RESISTENT TEGEN DROOGTE

Naast een nieuwe versie van kleeftmaïs zet Corteva Agriscience CRISPR-Cas in om een maïssoort te ontwikkelen die beter tegen droogte kan.²⁶ Corteva Agriscience werkt hiervoor samen met het bedrijf van Jennifer Doudna, Caribou Biosciences. CRISPR-Cas werd gebruikt om het maïsgen ARGOS8 te veranderen zodat het in hogere mate wordt afgeschreven en de cellen meer ARGOS8-eiwit produceren. Dit eiwit is betrokken bij de controle van het plantestresshormoon ethyleen. Eerdere studies hadden aangetoond dat een hogere productie van het ARGOS8-eiwit leidt tot een betere opbrengst onder stressvolle groeiomstandigheden als droogte.

De eerste veldproeven met de resulterende maïshybriden vertoonden inderdaad toename in graanopbrengst onder droogtestress in vergelijking met controle-planten, en geen afname in opbrengst in normale omstandigheden. Er worden momenteel nog aanvullende veldproeven uitgevoerd op verschillende locaties om het commercieel potentieel in diverse omstandigheden te onderzoeken. Verwacht wordt dat deze droogtebestendige maïsvariëteiten over 5 tot 10 jaar op de markt kunnen komen.

PRECISIEVEREDELING IN DE PRAKTIJK

In het algemeen kunnen in het CRISPR-Cas-veredelingsproces 6 stappen worden onderscheiden. Nemen we tarwe als voorbeeld. De tarwesoorten die we vandaag telen, zijn zeer gevoelig aan de meeldauwschimmel. Met CRISPR-Cas is men erin geslaagd een tarwesoort te ontwikkelen die resistent is tegen meeldauw.²⁹

De 6 opeenvolgende fasen zijn:

- 1. Studie.** *Aan een succesvol resultaat van CRISPR-Cas-gebaseerde veredeling gaat steeds een gedetailleerde genetische studie vooraf. Het gewaskenmerk dat men wenst aan te passen, in het voorbeeld gevoeligheid voor infecties met meeldauw, wordt eerst ontrafeld op genetisch en moleculair niveau.*
- 2. CRISPR-design.** *Eens wetenschappers bepaald hebben welke DNA-verandering nodig is om de schimmelresistentie te verhogen in de plant, wordt een CRISPR-RNA-molecule ontworpen. Dit RNA-molecule bepaalt de plaats waar de mutatie wordt aangebracht.*
- 3. CRISPR en Cas binnenbrengen in de plantencel.** *Het DNA-knippend enzym en de leidende CRISPR-RNA-moleculen moeten binnengebracht worden in de plantencel hetzij via Agrobacterium-transformatie, of meer recent met behulp van plantenvirussen of rechtstreeks als eiwit-RNA complex.^{30,31} In beide laatste gevallen wordt er geen erfelijk materiaal ingebouwd in het planten-DNA. Na het uitvoeren van hun muterende taak worden Cas en CRISPR-RNA spontaan afgebroken door de plantencel. Het finale resultaat is een plant met een of meerdere mutaties in een of meerdere doelwit-genen. Die plant is niet te onderscheiden van een plant die mutaties spontaan of via klassieke mutatieveredeling heeft verkregen.*
- 4. Screening.** *In de volgende stap wordt nagegaan in welke cellen of stukjes plantenweefsel het CRISPR-Cas-systeem de gewenste wijziging(en) correct heeft uitgevoerd. Dit wordt vaak via DNA-technieken bepaald waarbij men rechtstreeks van het DNA afleest of de aanpassing gelukt is.*
- 5. Regeneratie tot plant.** *De gewijzigde cellen of stukjes plantenweefsel worden vervolgens opgekweekt tot een volledige plant.*
- 6. Klassieke kruisingsprogramma's.** *Tot slot wordt door klassieke veredelingsprocessen de gewenste mutatie in elite-variëteiten ingekruist.*



Gewassen verkregen via mutatieveredeling worden al lange tijd veilig geteeld en gegeten. Dankzij de lange geschiedenis en de rol in de productie van verbeterde gewasvariëteiten, wordt mutatieveredeling wereldwijd gezien als een veilige en betrouwbare manier om gewassen te produceren. Hierdoor worden producten die ontwikkeld werden via mutatieveredeling uitgezonderd van de ggo-regelgeving in Europa.

Met de klassieke mutatieveredelingsmethodes kunnen er gemakkelijk duizenden DNA-veranderingen veroorzaakt worden, waarvan er slechts één of enkele nuttig kunnen zijn.

Ongezien nauwkeurig

Genoombewerkingstechnieken zoals CRISPR-Cas worden in planten hoofdzakelijk toegepast om zeer gecontroleerde, precieze DNA-mutaties aan te brengen. We spreken in dat geval van precisieveredeling. Door zeer precies en efficiënt een gerichte DNA-verandering aan te brengen, kan een gen in de plant uitgezet of nét geactiveerd worden. Hiermee kunnen veredelaars ongewenste eigenschappen afzwakken of gewenste versterken. Dergelijke mutaties kunnen ook spontaan in de natuur voorkomen.

Het voordeel van genoombewerking ten opzichte van klassieke mutatieveredeling is dat enkel de gewenste mutatie(s) aangebracht worden en er nauwelijks tot geen bijkomende, ongewenste willekeurige mutaties ontstaan. Verschillende studies tonen aan dat er zelden ongewenste mutaties ontstaan tijdens genoombewerking van planten.^{27, 28} Indien deze toch voorkomen, worden ze opgespoord en uitgekruist. Genoombewerking kan je dus beschouwen als een geavanceerde vorm van mutatieveredeling. Je krijgt hetzelfde resultaat, maar dan wel sneller en doelgerichter. Een

bijkomend voordeel is dat verschillende kenmerken gelijktijdig kunnen aangepast worden met CRISPR-Cas.

Buitengewoon veelzijdig

CRISPR-Cas kan je bovendien op verschillende manieren inzetten als veredelingstechniek.

CRISPR-Cas wordt in planten voornamelijk gebruikt om gericht een kleine wijziging aan te brengen in de bestaande DNA-sequentie, zonder hierbij soortvreemd DNA in te bouwen. Een geavanceerde vorm van mutatieveredeling dus, die snel en gericht genetische variaties in een gewas induceert. De gewasvariëteiten verkregen via deze weg kunnen identiek zijn aan deze met klassieke veredeling.

Het is ook mogelijk om met CRISPR-Cas een 'transgen' in te bouwen in het gewas. Dit is een DNA-fragment afkomstig van een andere soort. Deze tweede toepassing lijkt heel veel op gewasveredeling via klassieke ggo-technologie. Toch is er een belangrijk verschil: met CRISPR-Cas kan de onderzoeker veel preciezer aansturen waar het nieuwe gen terecht komt in het planten-DNA. Met klassieke ggo-technologie daarentegen heeft hij/zij nauwelijks controle over de plaats waar het gen wordt ingebouwd (zie hoofdstuk 4 'Onderscheid genoombewerking en klassieke genetische modificatie'). Die willekeurige plaats kan soms reeds bestaande eigenschappen van de plant beïnvloeden. Om bij ggo-gewassen eventuele nadelige gevolgen van de willekeurige insertie te vermijden, wordt er daarom niet één, maar een aantal verschillende versies van het gemodificeerde gewas gemaakt. Die versies verschillen van elkaar in de plaats waar de extra genen in het genetisch materiaal van de plant zijn terechtgekomen. Dit was ook zo bij de ontwikkeling van bijvoorbeeld Gouden Rijst, rijst die genetisch gewijzigd werd om provitamine A

te produceren. De in eerste instantie gekozen versie bleek niet optimaal te presteren wat betreft opbrengst, omdat de ingebrachte provitamine A-genen de werking van een belangrijk gen verstoorden. Hierdoor moest er worden uitgeweken naar een andere versie. Dit heeft tot een aantal jaren vertraging geleid in de ontwikkeling van Gouden Rijst (zie VIB-dossier 'Gouden Rijst').

Deze verwikkelingen worden dus vermeden bij gebruik van een genoombewerkingsmethode als

CRISPR-Cas. Bovendien kan CRISPR-Cas gebruikt worden om verschillende transgenen op eenzelfde plaats in het genoom te introduceren waardoor ze als een geheel worden doorgegeven van moeder- naar dochterplant.



MEELDAUWRESISTENTE TARWE

De ontwikkeling van tarwe die resistent is tegen de destructieve schimmelziekte meeldauw is een mooi voorbeeld van de kracht van de genoombewerkings technologie. Vandaag gebruiken boeren pesticiden om meeldauw te bestrijden. In deze tarwesoort werden de genen verantwoordelijk voor de gevoeligheid aan meeldauw onklaar gemaakt zodat het pesticidegebruik sterk kan verminderd worden.²⁹

De gevoeligheid van tarwe voor meeldauw wordt bepaald door het tarwe-gen 'MLO'. Dit gen codeert voor een eiwit dat de schimmel gebruikt om plantencellen binnen te dringen. De MLO-eiwitten zijn met andere woorden de zwakke plek in de verdediging van tarwe tegen meeldauw. Het verantwoordelijke gen uitschakelen is een aantrekkelijke strategie om de plant resistent te maken. De moeilijkheid ligt echter in de grootte en complexiteit van het tarwe-genoom. Broodtarwe heeft bijvoorbeeld van ieder gen zes kopieën. Om tarwe resistent te maken tegen meeldauw moeten dus zes kopieën van het MLO-gen uitgeschakeld worden. Door gebruik te maken van straling of chemicaliën (klassieke mutatieveredeling, zie eerder) is dit ronduit ondoenbaar omdat men niet gericht kan werken. Chinese onderzoekers gingen de uitdaging aan via genoombewerking en slaagden in hun opzet.

Het Amerikaanse biotechnologiebedrijf Calyxt gaat deze tarwe commercieel ontwikkelen. Op proefvelden wordt momenteel getest of het gewassenmerk robuust is onder open lucht-condities op het veld. Tegelijkertijd wordt de schimmelresistentie in verschillende tarwevariëteiten gekruist via traditionele veredelingsmethodes. Indien alles goed verloopt zou deze tarwesoort tegen 2022 verkocht kunnen worden aan boeren.

POMPELMOES BESTAND TEGEN CITRUSKANKER

De kweek van citrusvruchten kent veel uitdagingen. Citruskanker veroorzaakt door de bacterie Xanthomonas citri is er daar één van. Het telen van resistente variëteiten is de meest effectieve manier om de ziekte te bestrijden. Traditionele veredeling van citrusbomen is echter een uitdagend en langdurig proces.

Onderzoekers van de Universiteit van Florida (VS) zijn erin geslaagd om in pompelmoesplanten het CsLOB1-gen via CRISPR-Cas uit te schakelen. Het eiwit waarvoor dit gen codeert, wordt door de bacterie ingeschakeld voor de eigen groei en vermenigvuldiging in de plant. Pompelmoesvariëteiten met uitgeschakeld CsLOB1-gen slagen erin om een infectie met de bacterie af te weren en zijn dus resistent tegen citruskanker.³²

VAN CRISPR-BANANEN OVER PINDA'S TOT SOJA EN SUIKERBIETEN ... EN WAT ER NOG MEER IN DE PIJPLIJN ZIT

Universiteiten en bedrijven sleutelen aan nog veel meer gewassen om nuttige variëteiten te verkrijgen: tarwe met verminderde glutenconcentratie, hypoallergene pinda's, ziekteresistente bananen, supersterke suikerbieten, meeldauwresistente druiven en tomaten, soja en koolzaad met een gezondere vetzuursamenstelling of tomaten met vijf keer meer lycopene uitgaande van wilde tomatenvariëteiten.

4 Onderscheid genoombewerking en klassieke genetische modificatie

Net zoals met ggo-technologie wordt genoombewerking ingezet om doelgericht een of enkele gewassenmerken aan te passen. Hier stopt echter de gelijkensis.

Geen vreemd DNA

Genetische modificatie van planten laat toe nieuwe genetische informatie in te bouwen in het DNA van een plant. Het nieuwe DNA-fragment kan afkomstig zijn van kruisbare soorten of van een soort waar het gewas in kwestie niet mee kan kruisen. De producten van deze methode worden genetische gewijzigde gewassen of ggo-gewassen genoemd, en de term ggo-technologie wordt dan ook vaak als synoniem gebruikt van genetische modificatie. Ondertussen werden verschillende ggo-gewassen ontwikkeld door bedrijven en publieke onderzoeksinstituten. Sinds 1996 worden wereldwijd ggo-variëteiten van verschillende gewassen zowel op grote schaal als op kleine schaal geteeld, vooral in Noord- en Zuid-Amerika en Azië.³³

In vergelijking met klassieke genetische modificatie, is genoombewerking doelgerichter, efficiënter en eenvoudiger. Bovendien laat het geen sporen na. Genen aan of uitzetten met CRISPR-Cas kan zonder in de uiteindelijke plant soortvreemd

DNA te introduceren (zie figuur 4). De CRISPR-Cas componenten kunnen als RNA-proteïne-complex worden binnengebracht. Nadat de componenten hun taak hebben verricht (namelijk de gewenste DNA-verandering aanbrengen) worden ze afgebroken in de cel. Omdat er in deze gevallen geen nieuwe stukken DNA geïntegreerd worden, spreken we van 'voetafdruk-vrije' DNA-bewerkingen.

Een andere manier van werken is de genen die coderen voor het CRISPR-Cas systeem via Agrobacterium-transformatie in de plant binnen te brengen. In dit geval is er initieel wel sprake van extra genen in het planten-DNA. Toch kan men opnieuw een finaal product bekomen dat geen extra, soortvreemde genen bevat door de geïntegreerde CRISPR-Cas-genen opnieuw uit te kruisen via een klassiek kruisprogramma. Ook dan blijft er geen spoor van de genoombewerking over, op de gewenste mutatie na.

Gewasvariëteit verkregen via mutatieveredeling



Gewasvariëteit verkregen via genoombewerking



Gewasvariëteit verkregen via genetische modificatie



Figuur 4. Schematische voorstelling van de verschillen op DNA-niveau tussen een gewas verkregen via mutatieveredeling, genoombewerking en genetische modificatie.

Geen selectiemerkers

Bij klassieke genetische modificatie wordt standaard een DNA-construct, een opeenvolging van verschillende genen, in de plant ingebracht dat naast het gewenste gen, ook genen voor selectiemerkers bevat. Deze merkers vergemakkelijken de selectie van plantencellen die het gewenste gen hebben opgenomen.

Een voorbeeld van vaak gebruikte selectiemerkers zijn genen voor antibioticumresistentie, herbicide-tolerantie of fluorescentie. Het is een belangrijke vooruitgang dat moderne veredeling geen selectiemerkers nodig heeft. Door massaal de DNA-sequenties van plantencellen af te lezen, kunnen biotechnologen vandaag merkervrij werken.

CRISPR-Cas laat dus toe zeer gericht een gewasmerk aan te passen, zonder het invoegen van selectiemerkers, soortvreemde genen of andere genomische littekens.

Europese regelgeving

Nochtans, vinden we dit onderscheid niet terug in de Europese regelgeving. In de context van het veredelen van planten kent Europa twee soorten regelgeving: een voor het op de markt brengen van nieuwe plantensoorten en daarnaast specifieke regelgeving voor ggo's. Sinds 2008 is er een debat aan de gang over de vraag of de producten van nieuwe veredelingstechnieken, zoals CRISPR-Cas, al dan niet onder de Europese ggo-regels vallen.

In juli 2018 oordeelde het Europese Hof van Justitie dat landbouwgewassen waarin met behulp van CRISPR-Cas mutaties zijn aangebracht wel degelijk als ggo moeten worden beschouwd. Zij moeten voldoen aan de uiterst strenge voorwaar-

den van de Europese ggo-richtlijn. Andere landen – buiten Europa – hebben ervoor gekozen om deze landbouwgewassen niet onder de ggo-wetgeving te laten vallen (zie kaderstuk 'Andere landen, andere keuzes').

Door wetenschappers en onderzoekers werd de uitspraak van het Hof op ongeloof onthaald. Zij begrijpen niet goed waarom met straling verkregen mutanten niet, maar CRISPR-Cas-mutanten wel onder deze regels vallen. CRISPR-Cas-mutanten zijn immers op zijn minst even veilig.

De uitspraak zorgt ervoor dat – alvast in Europa – de precisieveredeling een halt wordt toegevoerd. Twintig jaar ervaring met de ggo-regelgeving in Europa heeft immers geleerd dat de markttoelating voor de teelt van ggo-gewassen systematisch door de EU wordt geblokkeerd, ook al heeft EFSA, het Europees voedselveiligheidsagentschap, het gewas positief geëvalueerd.

Het vonnis creëert ook een probleem van handhaving van de wetgeving. Er zijn geen waterdichte detectiemethoden die het onderscheid kunnen aantonen tussen de wijzigingen die via de conventionele technieken of via genoombewerking werden gemaakt. De markttoegang van geïmporteerde CRISPR-gewassen controleren is schier onmogelijk.

ANDERE LANDEN, ANDERE KEUZES

De Amerikaanse overheid maakt radicaal andere keuzes als het op gewassen aankomt die verbeterd zijn dankzij CRISPR-Cas-technologie. Zo besloot de Amerikaanse overheid om de nieuwe kleeftmaïs van Corteva Agriscience (zie pag 19) toe te staan zonder regulerende goedkeuring, omdat het gewas niet voldoet aan de criteria voor een genetisch gewijzigd organisme van het agentschap. Ook voor de meeldauwresistente tarwe (zie pag 22) kreeg Calyxt toestemming voor verdere commercialisatie zonder het regulatieproces voor ggo-gewassen te moeten ondergaan.³⁵

Het wereldwijd succes van de CRISPR-technologie in de landbouw zal in grote mate afhangen van de positie van de overheid. Naast de VS, beoordelen ook Brazilië, Argentinië, Chili, Japan en Israël de producten van genoombewerking geval per geval en worden CRISPR-Cas-bewerkte gewassen niet automatisch onder ggo-gewassen geklasseerd. Integendeel, indien het gewas genetische combinaties bevat die evengoed kunnen verkregen zijn door kruising of willekeurige mutaties, concluderen ze dat het gewas niet-ggo is.

Het Committee on Sanitary and Phytosanitary (SPS) Measures van de Wereldhandelsorganisatie (WTO) publiceerde in november 2018 een nota rond genoombewerking. De nota stelt dat de nieuwe instrumenten voor genoombewerking de kosten en termijnen voor het op de markt brengen van nieuwe gewassen aanzienlijk kunnen verlagen, waardoor publieke onderzoekers en technologiebedrijven beter in staat zijn om lokale behoeften en uitdagingen te ondersteunen. Dit geldt in het bijzonder in ontwikkelingslanden. WTO-leden die dit initiatief tot nu toe hebben gesteund, zijn Argentinië, Australië, Brazilië, Canada, Colombia, de Dominicaanse Republiek, Guatemala, Honduras, Jordanië, Paraguay, de Verenigde Staten, Uruguay en Vietnam.³⁶

5 Besluit

De snelheid waarmee de genetica vooruitgaat is enorm: in minder tijd dan één mensenleven zijn we gegaan van de ontdekking van de dubbele helix-structuur van DNA (1953) door James Watson, Francis Crick en Rosalind Franklin, naar genetische manipulatie met restrictie-enzymen en PCR in de jaren 1980, grootschalige genomanalyse sinds 2000, en nu de ontwikkeling van genoombewerking.

Toekomstig basisonderzoek met CRISPR-Cas zal zich onder meer richten op de ontwikkeling van nieuwe methodes voor efficiënte en veilige toediening van Cas-eiwitten en hun gids-CRISPR-RNA's in cellen en weefsels van complexe organismen. De snelle vooruitgang in de technologie laat echter nu al toe om ongekend accurate veranderingen in DNA aan te brengen in zowat alle levende wezens.

Daarnaast zien tal van toepassingen het levenslicht. Zowel in de landbouw als in de gezondheidszorg. Nieuwe gewasvariëteiten worden in laboratoria klaargestoomd voor veldproeven of staan aan de vooravond van hun marktintroductie. In de gezondheidszorg hebben we nog nooit zo dicht gestaan bij een succesvolle implementatie van gentherapie als vandaag. Dankzij die nieuwe 'toolkit' voor genoombewerking waarover we vandaag beschikken.

De regelgeving is echter nog verre van uitgeklaard en lijkt, althans in Europa, niet in lijn met de wetenschappelijke kennis. Dit is een uitdaging voor beleids- en regelgevingsinstanties. Technologieën en hun producten evolueren snel en moeten continue overzien en gereguleerd worden. De effecten die ze hebben op het milieu en de risico's voor de gezondheid van mens en dier moeten tot een minimum worden beperkt. Regelgeving mag echter innovatie niet verlammen en investeringen in en ontwikkeling van nuttige producten blokkeren. Het overheidsbeleid moet proportioneel en niet-discriminerend zijn.

Daarnaast is een dialoog met de eindgebruiker – in dit geval de consument – belangrijk. Tweerichtingscommunicatie houdt ook in dat wetenschappers en de industrie luisteren naar de bezorgdheden en argumenten van de eindgebruikers. Niet alleen het wat, hoe en waarom moeten besproken worden, maar vooral moeten we samen nadenken en overleggen over waar we naartoe willen.

De kostprijs en het gemak van de nieuwe CRISPR-Cas-technologie laat een democratisch gebruik toe. Het volledige potentieel van deze technologie zal pas tot zijn recht komen wanneer ze in de handen komt van zoveel mogelijk verschillende veredelaars die met een diversiteit aan gewassen werken. Hierbij blijft het aangaan van de dialoog met de maatschappij hoe dan ook essentieel.

Referenties

- 1 Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Nov;13(11):722-36. doi: 10.1038/nrmicro3569.
- 2 Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002 Mar;43(6):1565-75.
- 3 Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005 Feb;60(2):174-82.
- 4 Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005 Mar;151(Pt 3):653-63.
- 5 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005 Aug;151(Pt 8):2551-61.
- 6 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.
- 7 Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011 Mar 31;471(7340):602-7. doi: 10.1038/nature09886.
- 8 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25;109(39):E2579-86.
- 9 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
- 10 Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell.* 2014 Apr 24;54(2):234-44. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- 11 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):823-6. doi: 10.1126/science.1232033.
- 12 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143.
- 13 Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 2013 Mar;31(3):230-2. doi: 10.1038/nbt.2507.
- 14 Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife.* 2013 Jan 29;2:e00471. doi: 10.7554/eLife.00471.
- 15 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013 Mar;31(3):227-9. doi: 10.1038/nbt.2501.
- 16 Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 2013 Oct;23(10):1229-32. doi: 10.1038/cr.2013.114.
- 17 Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol.* 2013 Aug;31(8):688-91. doi: 10.1038/nbt.2654.
- 18 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 2013 Aug;31(8):691-3. doi: 10.1038/nbt.2655.
- 19 Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013 Aug;31(8):686-8. doi: 10.1038/nbt.2650.
- 20 Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant.* 2013 Nov;6(6):1975-83. doi: 10.1093/mp/sst119.

- 21 Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*. 2014 Feb 20;41(2):63-8. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.001.
- 22 Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*. 2013 Nov;41(20):e188. doi: 10.1093/nar/gkt780. Epub 2013 Sep 2.
- 23 VIB Fact Series : Dossier Dierproeven.
http://www.vib.be/nl/educatie/Documents/vib_dossier_dierproeven_NL_2018_1003.pdf
- 24 Chilcoat D, Liu ZB, Sander J. Use of CRISPR/Cas9 for Crop Improvement in Maize and Soybean. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;149:27-46. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.005.
- 25 Kempin SA, Savidge B, Yanofsky MF. Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science*. 1995 Jan 27;267(5197):522-5.
- 26 Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J*. 2017 Feb;15(2):207-216. doi: 10.1111/pbi.12603.
- 27 Tang X, Liu G, Zhou J, Ren Q, You Q, Tian L, Xin X, Zhong Z, Liu B, Zheng X, Zhang D, Malzahn A, Gong Z, Qi Y, Zhang T, Zhang Y. A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biol*. 2018 Jul 4;19(1):84. doi: 10.1186/s13059-018-1458-5.
- 28 Peterson BA, Haak DC, Nishimura MT, Teixeira PJ, James SR, Dangl JL, Nimchuk ZL. Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis. *PLoS One*. 2016 Sep 13;11(9):e0162169. doi: 10.1371/journal.pone.0162169.
- 29 Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*. 2014 Sep;32(9):947-51. doi: 10.1038/nbt.2969.
- 30 Vainstein A, Marton I, Zuker A, Danziger M, Tzfira T. Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors. *Trends Biotechnol*. 2011 Aug;29(8):363-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.03.007.
- 31 Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*. 2015 Nov;33(11):1162-4. doi: 10.1038/nbt.3389.
- 32 Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White FF, Jones JB, Wang N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*. 2017 Jul;15(7):817-823. doi: 10.1111/pbi.12677.
- 33 ISAAA Brief 53 Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017 -
<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/53/download/isaaa-brief-53-2017.pdf>
- 34 Court of Justice of the European Union. Organisms obtained by mutagenesis are GMOs and are, in principle, subject to the obligations laid down by the GMO Directive.
<https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>
- 35 Ledford H. Gene-editing surges as US rethinks regulations. *Nature*. 2016 Apr 14;532(7598):158-9. doi: 10.1038/532158a.
- 36 World Trade Organization (WTO) International Statement On Agricultural Applications Of Precision Biotechnology, 26 October 2018, https://docs.wto.org/dol2fe/Pages/FE_Search/FE_S_S009-DP.aspx?language=E&CatalogueIdList=249838,249823,249748,249641,249507,249371,249321,249324,249267,249265&CurrentCatalogueIdIndex=6&FullTextHash=&HasEnglishRecord=True&HasFrenchRecord=True&HasSpanishRecord=True



Basisonderzoek in de levenswetenschappen, dat is de kernactiviteit van VIB. VIB is een onafhankelijke onderzoeksinstituting waar zo'n 1.500 topwetenschappers uit binnen- en buitenland baanbrekend basisonderzoek verrichten. Ze verleggen hiermee de grenzen van onze kennis over de moleculaire mechanismen die het functioneren van het menselijk lichaam, planten en micro-organismen regelen.

Dankzij een nauwe samenwerking met de Vlaamse universiteiten UGent, KU Leuven, UAntwerpen, Vrije Universiteit Brussel en UHasselt, en een stevig investeringsprogramma bundelt VIB de collectieve wetenschappelijke expertise van al zijn onderzoeksgroepen in één instituut. De resultaten van dat onderzoek worden via technologieoverdracht vertaald naar concrete toepassingen voor de samenleving zoals nieuwe diagnostica, geneesmiddelen, behandelmethodes en landbouwinnovaties. Deze toepassingen worden vaak ontwikkeld door jonge startbedrijven die ontstaan zijn uit VIB of via een samenwerking met bestaande bedrijven. Op die manier wordt er ook bijkomende tewerkstelling gecreëerd en slaan we de brug tussen onderzoek en ondernemerschap.

VIB neemt ook actief deel aan het publieke debat over biotechnologie door wetenschappelijk onderbouwde informatie te ontwikkelen en te verspreiden.

Meer info op www.vib.be.

VIB

Rijvisschestraat 120
9052 Ghent
Belgium
Tel. +32 9 244 66 11
Fax +32 9 244 66 10
info@vib.be
www.vib.be