COMMISSIE
COGEM
GENETISCHE
MODIFICATIE

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM	30 oktober 2014
KENMERK	CGM/141030-01
ONDERWERP	Signalering en advies CRISPR-Cas; revolutie uit het lab

Geachte mevrouw Mansveld,

Hierbij bied ik u de signalering en advies ‘CRISPR-Cas; revolutie uit het lab’ aan.

Samenvatting:
In de afgelopen jaren zijn grote vorderingen gemaakt met technieken waarmee gerichte veranderingen in het genoom kunnen worden aangebracht. Eén van de meest veelbelovende technieken is CRISPR-Cas. Dit *genome editing* systeem vindt in zeer korte tijd grootschalige toepassing in alle onderzoeksvelden van de levenswetenschappen. Met behulp van CRISPR-Cas kunnen gerichte veranderingen zoals mutaties, deleties en zowel kleine als grote inserties (transgenen) in het genoom worden aangebracht. CRISPR-Cas biedt grote kansen en mogelijkheden voor medische toepassingen, plantenveredeling en innovatie in de levenswetenschapen. Echter de EU ggo-regelgeving is niet toegesneden op de nieuwe technologische mogelijkheden. Hierdoor ontstaan onder meer problemen rond handhaafbaarheid, ontstaat een ongelijk speelveld voor bedrijven in de EU met bedrijven daarbuiten en komen innovatie en wetenschappelijk onderzoek in de knel. De snelle opmars en grote potentie van CRISPR-Cas zet deze problematiek op scherp.
De mogelijkheid om gericht veranderingen in het genoom aan te brengen kan ook tot nieuwe (ethische) vragen leiden, zoals waarom het niet toegestaan is om erfelijke ziekten bij de mens uit te bannen door genetische modificatie.
In de signalering wordt ingegaan op de technische aspecten van het CRISPR-Cas systeem, de mogelijkheden die het systeem biedt voor zowel medische als landbouwkundige toepassingen, de eventuele risico’s en de vraag of CRISPR-Cas toepassingen en hun producten onder de ggo-regelgeving vallen. Daarnaast wordt ingegaan op de noodzaak dat de EU tot een snel besluit komt over de status van de nieuwe biotechnologische technieken in het algemeen, en CRISPR-Cas in het bijzonder, en over de noodzaak van een eventuele herziening van de EU ggo-regelgeving.

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

Hoogachtend,

Prof. [redacted]
[redacted] COGEM

c.c. Drs. [redacted], Ministerie van IenM

CRISPR-Cas, revolutie uit het lab

COGEM signalering en advies CGM/141030-01

1. Inleiding

In de afgelopen jaren zijn er grote vorderingen gemaakt met technieken om gericht veranderingen in het erfelijk materiaal aan te brengen (‘*gene* of *genome editing’*). Deze nieuwe technieken leiden tot vragen over de grenzen en reikwijdte van de regelgeving voor genetisch gemodificeerde organismen (ggo’s). De COGEM heeft eerder in verschillende signaleringen en adviezen aandacht gevraagd voor deze nieuwe ontwikkelingen.

Een nieuwe technologie gebruik makend van het *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-associated protein (Cas)*, kortweg aangeduid met CRISPR-Cas of CRISPR, lijkt tot een stroomversnelling te leiden. In zeer korte tijd heeft CRISPR zijn weg gevonden in tal van onderzoeksvelden.[1] Het CRISPR-Cas systeem berust op de herkenning van specifieke sequenties in het genoom en het gebruik van een nuclease om breuken in het DNA aan te brengen.

1.1 Historie van genome editing

In 2002 werd voor het eerst de mogelijkheid beschreven om in de levende cel met behulp van sequentie specifieke nucleasen gerichte modificaties in het DNA aan te brengen. Er zijn sindsdien verschillende van deze nucleasen ontdekt, zoals *zinc finger* nucleasen, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) en het CRISPR-Cas systeem, waarbij het Cas9 eiwit de breuk in het DNA aanbrengt.[2]

In 2002 werden de *zinc finger* nucleasen voor het eerst gebruikt om specifieke veranderingen in het genoom van fruitvliegen (*Drosophila melanogaster*) aan te brengen.[3] In 2005 werden deze zinkvingernucleasen gebruikt om een mutatie te herstellen in humane cellen.[4] Vanaf 2008 werd deze techniek voor steeds meer toepassingen gebruikt. De COGEM heeft in 2009 een signalering uitgebracht over de toepassingen van zinkvingers.[5]

In 2010 is voor het eerst de toepassing van TALENs in gist beschreven.[6] Vanaf 2011 is deze techniek onder andere toegepast om veranderingen in de genomen van *Arabidopsis thaliana, Caenorhabditis elegans* en humane cellen aan te brengen.[7,8,9,10]

In 2012 is voor het eerst de toepassing van het CRISPR-Cas systeem beschreven. Sindsdien zijn er in korte tijd veel wetenschappelijke artikelen gepubliceerd met toepassingen waarbij dit systeem gebruikt wordt (zie tabel 1). Het is bijvoorbeeld mogelijk om humane stamcellen minder gevoelig te maken voor een infectie met HIV-1, genetische defecten te herstellen, en genen in en uit te schakelen in planten of dieren.[11,12,13,14] Het CRISPR-Cas systeem is veelbelovend en kan voor zowel de medische sector als de plantenbiotechnologie van groot belang worden.

De technologie biedt voordelen ten opzichte van eerder bestaande technieken als zinkvingers en TALEN, omdat er geen kennis van eiwittechnologie noodzakelijk is, protocollen om een CRISPR-Cas molecuul te maken relatief eenvoudig zijn, en de moleculen snel te synthetiseren zijn. Tal van fabrikanten bieden kits aan voor gene-editing met behulp van CRISPR-Cas. Hierdoor wordt *genome editing* een standaardtechniek beschikbaar voor elk onderzoekslaboratorium.

Tabel 1: Aantal wetenschappelijke publicaties over het CRISPR-Cassysteem[1]

2010	0
2011	1
2012	3
2013	100
2014[2]	235

1) zoektermen in PubMed: CRISPR Cas9
2) tot 30/9/2014

Het potentieel van deze technologie en de snelle verspreiding binnen de onderzoekswereld blijkt uit de exponentiële stijging van het aantal publicaties over CRISPR-Cas. Ook in Nederland wordt deze techniek gebruikt.

Deze signalering gaat in op de manier waarop het CRISPR-Cas systeem werkt, de mogelijke toepassingen van dit systeem, de eventuele (milieu)risico's, in hoeverre de ggo-regelgeving van toepassing is op deze nieuwe technologie en welke knelpunten er in de ggo-regelgeving ontstaan door de opkomst van CRISPR-Cas.

2. Het CRISPR-Cas systeem

Het CRISPR-Cas systeem kan specifieke DNA sequenties herkennen en kan daarom gebruikt worden om het erfelijk materiaal gericht te veranderen. Het is met dit systeem mogelijk om genexpressie te reguleren, (delen van) genen te verwijderen, nieuwe genen of DNA fragmenten te introduceren of om locaties van bepaalde sequenties binnen het genoom zichtbaar te maken. Het CRISPR-Cas systeem is specifiek, efficiënt en relatief gemakkelijk te gebruiken.

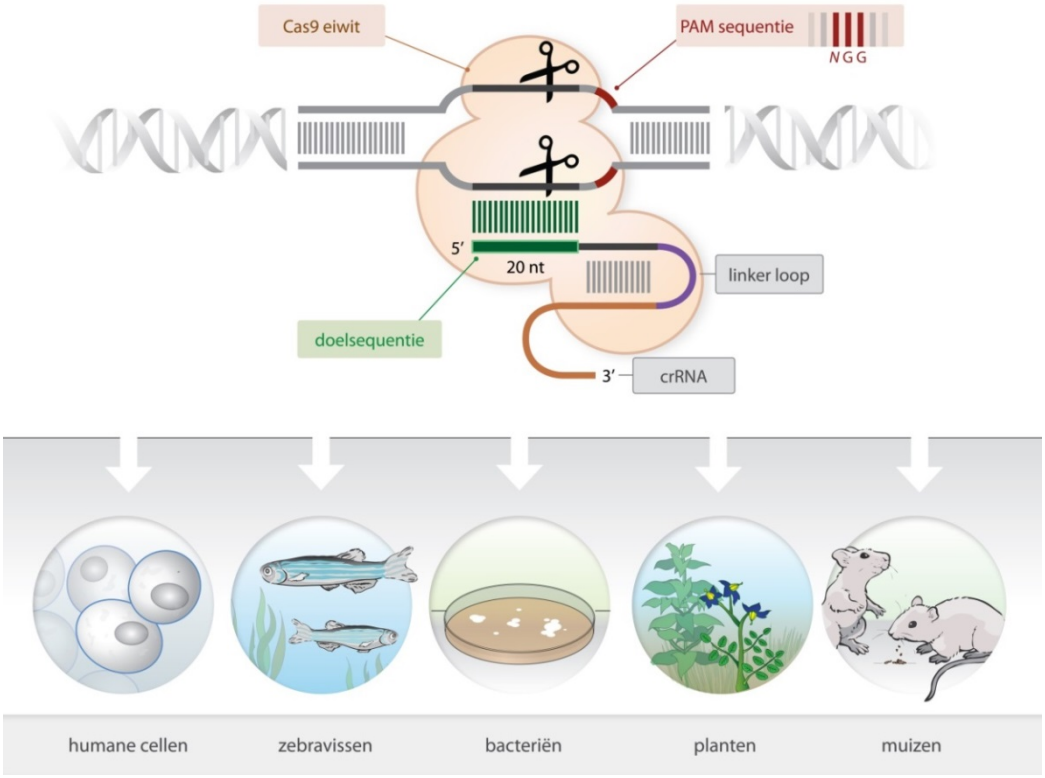
2.1 Het CRISPR-Cas systeem is afkomstig uit bacteriën

Het CRISPR-Cas systeem is afkomstig van *Streptococcus pyogenes* en is deel van het afweersysteem of immuunsysteem van deze bacterie. Soortgelijke systemen zijn ontdekt in 90% van de *Archaea* (oerbacteriën die net als bacteriën geen celkern hebben en waarvan het afschrijven van genen lijkt op dat van eukaryoten die wel een celkern hebben) en 40% van de bacteriën.[15,16,17]

Het CRISPR-Cas systeem bestaat uit twee RNA moleculen en een eiwit. Het eerste RNA molecuul kan aan een specifieke DNA volgorde van 20 nucleotiden binden, het tweede RNA molecuul bindt aan het eerste en kan vervolgens het Cas9 eiwit binden. Wanneer er een *protospacer adjacent motif* (PAM) aanwezig is naast de sequentie waaraan het eerste RNA aan bindt, klieft het Cas9 eiwit het dubbelstrengs DNA molecuul doormidden en veroorzaakt daarmee een dubbelstrengsbreuk in het DNA. Hiervoor beschikt het Cas9 eiwit over twee verschillende nucleasen die beide één van de DNA strengen knipt. De PAM sequentie bestaat uit de bases NGG, waarbij de N alle basen kunnen zijn.

2.2 Toepassing van het CRISPR-Cas systeem als 'genome editing tool'

In 2012 is beschreven dat beide RNA moleculen gecombineerd als één '*single guide*' RNA (sgRNA) werkzaam is in bacteriën (figuur 1).[18] In 2013 is ontdekt dat deze toepassing ook in eukaryote cellen toegepast kan worden.[19] De laatste ontdekking zorgde voor een snelle toename van onderzoek naar het CRISPR-Cas systeem. De toepassing van CRISPR-Cas als *gene* of *genome editing* systeem berust op de mogelijkheid om gericht op specifieke plaatsen in genoomsequenties breuken aan te brengen, en op het gebruik van de cellulaire DNA-reparatiemechanismen om mutaties en deleties aan te brengen of nieuwe sequenties in te bouwen.



Figuur 1: *Het CRISPR-Cas systeem*

2.2.1 DNA herstelmechanisme repareert een dubbelstrengsbreuk

Aangezien een breuk in het DNA dodelijk kan zijn voor een cel, treedt een van nature aanwezig DNA-herstelmechanisme in werking om de breuk te repareren.[20] Een cel heeft hiervoor verschillende mechanismen tot zijn beschikking, namelijk '*homologous directed repair*' (HDR) en '*non-homologous end-joining*' (NHEJ) (zie kader).

Homologous directed repair (HDR)

Homologe recombinatie is een zeer precies mechanisme om breuken in het DNA te herstellen.[20] Het vormt een soort *copy-paste* proces waarbij een niet-beschadigde homologe DNA-sequentie als informatiebron voor het herstel dient.[20] Als homologe DNA sequentie kan een vergelijkbare sequentie in het genoom dienen, bijvoorbeeld de sequentie op de zusterchromatide.[20]

Non-homologous end-joining (NHEJ)

Een andere manier waarop een dubbelstrengsbreuk hersteld kan worden, berust op het aan elkaar plakken van de gebroken DNA strengen, het zogenaamde non-homologous end-joining. Dit vergt geen of zeer weinig sequentiehomologie, en resulteert vaak in deleties of inserties op de plaats van de breuk.[20,21,22]

Het is met het CRISPR-Cas systeem mogelijk om specifieke mutaties of genen in een genoom te introduceren door middel van homologe recombinatie (HDR). Hiervoor moet gedurende de modificatie naast het sgRNA en het Cas9 gelijktijdig een DNA molecuul ingebracht worden dat, aan weerszijden van de 'in te brengen' sequentie, een grote mate van sequentie-overeenkomst vertoont met de sequenties aan beide zijden van de dubbelstrengsbreuk.[23] Daarnaast is het mogelijk om met behulp van CRISPR-Cas kleine inserties en deleties (*indels*) in het genoom te introduceren, doordat een aangebrachte breuk in het DNA via het mechanisme van NHEJ zal worden gerepareerd.

2.2.2 Het CRISPR-Cas systeem in eukaryote cellen

Om gerichte veranderingen in het genoom van eukaryote cellen te kunnen aanbrengen, moet er een methode of techniek zijn om het CRISPR-Cas systeem in de cel te brengen. Daarnaast hebben eukaryoten in tegenstelling tot prokaryoten (zoals bacteriën en archaea) een celkern. Het Cas9 wordt daarom van een signaal voorzien om het naar de celkern te transporteren.

Welke methode het meest geschikt is om de elementen van het CRISPR-Cas systeem in eukaryote cellen te introduceren, is onder meer afhankelijk van het type cel en het organisme waarin het geïntroduceerd moet worden. Voor zoogdiercellen zijn er andere methoden dan voor plantencellen. Bij planten wordt voornamelijk gebruik gemaakt van de bacterie *Rhizobium radiobacter* (voorheen *Agrobacterium tumefaciens)*.[24] Uit een getransformeerde cel kan vervolgens een plant gekweekt worden. Het CRISPR-Cas systeem kan ook constitutief in de cel tot expressie gebracht worden met behulp van een transformatievector die niet in het genoom ingebouwd wordt. Voor sommige

plantensoorten is het mogelijk om het CRISPR-Cas complex in protoplasten in te brengen (zonder tussenkomst van een vector of *R. radiobacter*) en uit de protoplasten een plant te laten ontwikkelen. Ook wordt gewerkt aan vectorsystemen gebaseerd op plantenvirussen om het CRISPR-Cas9 systeem in plantencellen te introduceren.[25]

Voor de introductie in zoogdiercellen worden verschillende methoden gebruikt om het CRISPR-Cas systeem in een cel te brengen. Een veel gebruikte methode is het inbrengen van een plasmide of andere DNA vector dat het gen coderend voor het Cas9 eiwit bevat en voor de productie van sgRNA zorgt.[23,26] Een andere methode is om het sgRNA (of beide afzonderlijke RNAs) samen met het mRNA dat codeert voor het Cas9 eiwit in de cel in te brengen.[27] Een derde methode bestaat uit het injecteren van het complex dat zowel het Cas9 eiwit als het sgRNA bevat.[21]

2.2.3 CRISPR-Cas sequenties niet aanwezig in het uiteindelijke organisme

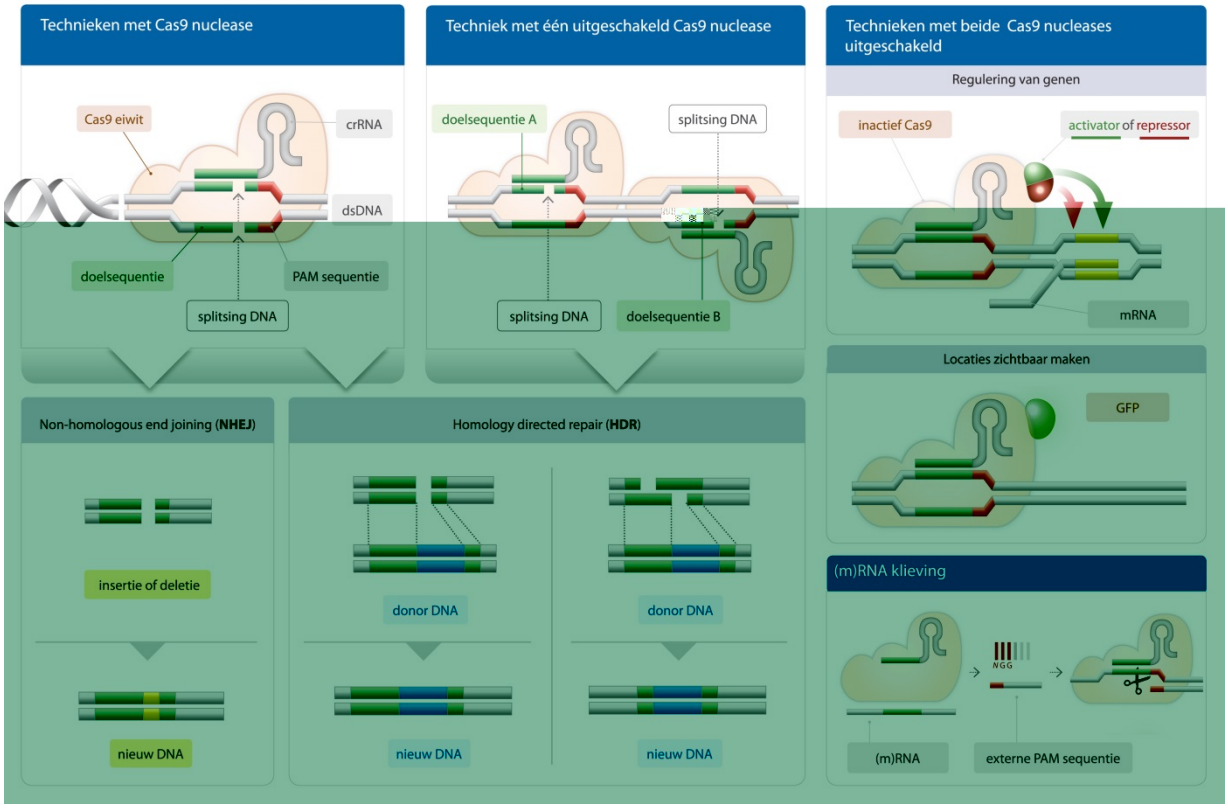
Naast de aangebrachte veranderingen in het genoom van de cel, zullen in een aantal gevallen ook de elementen van het CRISPR-Cas systeem (Cas9 gen en sgRNA coderende sequentie) zelf in het genoom ingebouwd worden. Dit is bijvoorbeeld het geval wanneer een plantencel genetisch gemodificeerd wordt en uit die cel een plant wordt opgekweekt. Echter in de meeste gevallen zal in het uiteindelijke organisme geen van de elementen van het CRISPR-Cas systeem meer aanwezig zijn. Ook bij het hierboven genoemde voorbeeld van de genetische gemodificeerde plant, ontstaan door middel van *R. radiobacter*-transformatie, kan na uitkruising de ingebouwde CRISPR-Cas sequenties kwijt geraakt worden door met nakomelingen verder te gaan die het construct niet bevatten, maar wel de gewenste genoomverandering. Eventuele herkenning of detectie van deze organismen is dan ook alleen mogelijk indien bekend is welke precieze veranderingen in het genoom zijn aangebracht.

3. Toepassingen van het CRISPR-Cas systeem

Genetische modificatie heeft de laatste jaren een sterke ontwikkeling doorgemaakt. Wetenschappers zijn steeds op zoek naar modificatietechnieken die efficiënter en specifieker zijn. Met het CRISPR-Cas systeem is een techniek beschikbaar gekomen waarmee het mogelijk is om op elke gewenste plek in het genoom de juiste verandering aan te brengen.

Het is met behulp van CRISPR-Cas mogelijk om op specifieke locaties in het genoom (figuur 2):

- kleine en grote deleties aan te brengen,
- puntmutaties aan te brengen,
- sequenties of genen in te bouwen.



Figuur 2: *Toepassingen van CRISPR-Cas*

Door één of beide nucleases van het Cas9 eiwit uit te schakelen, zijn variaties op deze toepassingen mogelijk:

- Wanneer één van de nucleases van het Cas9 eiwit uitgeschakeld is, kan er een enkelstrengsbreuk in het DNA molecuul geïntroduceerd worden. Door gebruik te maken van twee verschillende doelsequenties kunnen specifieke delen uit het DNA molecuul verwijderd worden.[28,29,30]

Ook is het mogelijk om de expressie van genen te beïnvloeden zonder veranderingen in genoomsequenties te induceren:

- Door gebruikt te maken van een Cas9 eiwit waarvan beide nucleases uitgeschakeld zijn, kan het wel aan het DNA binden, maar niet klieven. Wanneer aan het Cas9 specifieke domeinen (*activators* of *repressors*) gekoppeld zijn, kunnen genen gereguleerd worden.[31,32,33,34,35,36] Ten behoeve van onderzoeksdoeleinden is het met deze techniek ook mogelijk om bepaalde locaties op het DNA molecuul zichtbaar te maken.

Een verrassende ontwikkeling is dat CRISPR-Cas niet alleen ingezet kan worden als *genome editing* system, maar dat het ook aan (m)RNA kan binden en dit kan klieven:[37]

- Hiermee is het mogelijk om (m)RNA functies te onderzoeken, genexpressie te beïnvloeden zonder DNA sequenties te veranderen, maar ook om RNA virussen te bestrijden.

Met de mogelijkheid gerichte veranderingen in het genoom aan te brengen, komen tal van onderzoekstoepassingen (beter) binnen handbereik. De functie van genen kan onderzocht worden door '*knock out*' van genen, door gensequenties te veranderen of genen in te brengen; de regulatie van genen en de daarbij betrokken elementen kan beter onderzocht worden; '*reverse genetics*' wordt vergemakkelijkt, etc.[38]

Er zijn al veel experimenten uitgevoerd in cellijnen[19,39,40,41], maar er zijn ook experimenten uitgevoerd met fruitvliegen[42], zebravissen[21], zoogdieren[22,41,43,44,45,46,47], niet-humane primaten[27] en planten.[48,49,50,51] De COGEM verwacht dat er de komende jaren veel onderzoek met deze techniek uitgevoerd wordt en dat het snel tot commerciële toepassingen kan komen. Opgemerkt moet worden dat het hier een nog jonge technologie betreft en dat in de komende jaren nieuwe nu nog niet voorziene toepassingen op zullen komen. Hieronder worden enkele toepassingen van het CRISPR-Cas systeem beschreven.

3.1 Toepassingen van het CRISPR-Cas systeem in de medische sector

Vooral op medisch gebied wordt veel onderzoek verricht naar het gebruik van CRISPR-Cas. In veel gevallen bevindt het onderzoek zich nog in de ontwikkelfase. Toch zijn er al een aantal studies beschreven waarbij CRISPR-Cas gebruikt is voor de genetische modificatie van zoogdieren, zoals muizen[43,52], ratten[43,44,45], vee[53] en niet-humane primaten.[46] CRISPR-Cas biedt voordelen boven de huidige systemen om genetisch gemodificeerde (gg-) dieren te produceren. Door een CRISPR construct in eencellige embryo's te injecteren, kan een gg-dier verkregen worden. Dit betekent dat de 'ontwikkeltijd' verkort wordt van meer dan een jaar tot enkele weken.

Eén studie beschrijft de genezing van staar (cataract) bij muizen.[22] Staar erft dominant over, zodoende zal het nageslacht van een muis met en een muis zonder staar de ziekte hebben. In het genoom van de muizen ontbreekt één basenpaar waardoor er voortijdig een stopcodon wordt geïntroduceerd en een korter eiwit wordt gemaakt wat staar veroorzaakt. Om dit probleem op te lossen hebben onderzoekers bevruchte muizeneicellen geïnjecteerd met de componenten van het CRISPR-Cas systeem. Het gekozen sgRNA zorgt ervoor dat er een dubbelstrengsbreuk ontstaat naast het ontbrekende basenpaar. De onderzoekers hebben laten zien dat herstel van de dubbelstrengsbreuk zowel door HDR als door NHEJ plaatsvindt. Bij ongeveer de helft (36 van de 78 muizen) van de levend geboren muizenpups heeft genetische modificatie plaatsgevonden. Bij 67% (24 van de 36 muizen) werd het effect van de mutatie teniet gedaan, resulterende in goed zicht.

Het CRISPR-Cas systeem kan ook in volwassen dieren ingezet worden om een ziektemodelsysteem te ontwikkelen. Recent is aangetoond dat het mogelijk is om in levercellen van muizen oncogenen en *tumour suppressor* genen aan en uit te schakelen, waardoor een modelsysteem voor leverkanker ontstaat.[54] Daarnaast is het CRISPR-Cas systeem onlangs ook toegepast om volwassen muizen te genezen van een erfelijke leveraandoening.[55]

Toepassingen die een ziekte bij de mens kunnen genezen, komen steeds dichter bij. Er zijn verschillende onderzoeken gepubliceerd waarbij een genetische afwijking die veroorzaakt wordt door een fout op één plaats in het genoom gecorrigeerd is.[14,56] Naast therapeutische toepassingen waarbij gendefecten worden gecorrigeerd, wordt ook gedacht aan de inzet van CRISPR-Cas om genregulatie te beïnvloeden. Verder wordt onderzocht of het systeem gebruikt kan worden als antiviraal middel.[57] Of om bacteriën te bestrijden. Door CRISPR-Cas in te bouwen in een bacteriofaag, (een virus dat enkel bacteriën infecteert), kunnen specifieke bacteriën worden opgespoord, of specifieke sequenties zoals antibioticaresistentiegenen of virulentiefactoren.[58]

Voor de toepassing van CRISPR gebaseerde systemen als therapie moeten nog een aantal hordes overwonnen worden, zoals vermindering van aspecifieke activiteit door *off-target* binding en de ontwikkeling van efficiënte vectorsystemen om de systemen in de doelcellen te bezorgen. Een combinatie van CRISPR-Cas met virale expressievectoren zoals nu al in gebruik en in ontwikkeling voor gentherapie, kan een oplossing bieden voor dit laatste.[59]

3.2 Toepassing van het CRISPR-Cas systeem in de plantenbiotechnologie

De eerste toepassingen van CRISPR-Cas bij planten zijn beschreven in 2013. Deels betroffen het publicaties waarin aangetoond wordt dat het systeem werkzaam is in plantencellen en dat mutaties of gensequenties geïntroduceerd kunnen worden in modelsystemen als Arabidopsis of Tabak.

Voor Arabidopsis is onder meer gerapporteerd dat het mogelijk is om een inactief gen zo te veranderen dat het actief wordt, en dat deze eigenschap overerft naar een volgende generatie. Het is mogelijk om deze verandering aan te brengen zonder dat er andere wijzigingen in het genomisch DNA aangebracht worden.[60]

Naast modelsystemen wordt ook gewerkt aan belangrijke landbouwgewassen, zoals Tomaat[61] of gewone tarwe (*Triticum aestivum*). Omdat dit laatste gewas hexaploïd is (42 chromosomen (2n = 6x = 42)), is genetische modificatie een uitdaging. Veranderingen moeten op meerdere plaatsen in het genoom aangebracht worden. In een wetenschappelijke studie hebben onderzoekers laten zien dat het mogelijk is om gewone tarwe resistent te maken tegen de plantenziekte echte meeldauw door op meerdere chromosomen hetzelfde gen te modificeren. Ze hebben hierbij gebruik gemaakt van twee technieken, namelijk TALENs en het CRISPR-Cas systeem.[62] Polyploïdie komt voor bij meerdere belangrijke landbouwgewassen. Een toepassing die het mogelijk maakt om dezelfde modificaties op meerdere chromosomen gelijktijdig aan te brengen, is daarom zeer interessant voor plantenbiotechnologen en veredelaars.

Daarnaast komen dezelfde genen soms meerdere keren voor op het genoom. Deze zogenaamde paraloge genen zijn ontstaan door duplicaties en bevatten grotendeels dezelfde sequentie. Het gelijktijdig kunnen aanbrengen van mutaties in alle relevante versies van deze paraloge genen biedt veredelaars de mogelijkheid de daarmee verbonden eigenschappen van de plant te wijzigen.

Naast het wijzigen of inbrengen van gensequenties wordt ook gedacht aan het aanbrengen van mutaties in promotoren of andere regulatoire sequenties. Hierdoor kan de expressie van een gen verhoogd of verlaagd worden.

De grote potentie van de techniek samen met de relatieve eenvoud en gebruikersvriendelijkheid van het systeem, maakt dat het CRISPR-Cas systeem in zeer korte tijd breed wordt toegepast in de onderzoekswereld en de veredelingsindustrie. Dit lijkt een voorbode voor commerciële toepassingen in de landbouwsector.

4. Risico's van CRISPR-Cas

Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat er grote verwachtingen zijn van het CRISPR-Cas systeem. Over de eventuele risico's verbonden aan CRISPR en ontwikkelde toepassingen is, mede gezien de nog relatief beperkte ervaringen, weinig gepubliceerd.

4.1 'Off-target' effecten

Als belangrijkste nadeel of risico van het CRISPR-Cas systeem worden mogelijke *off-target* effecten genoemd.[63] Deze worden veroorzaakt doordat het sgRNA op de verkeerde plaats aan het erfelijk materiaal bindt. Wanneer het DNA vervolgens gekliefd en gerepareerd wordt, kunnen mutaties ontstaan op plaatsen waar dit niet de bedoeling is.[22] Deze mutaties kunnen ongewenste effecten veroorzaken, zoals het veranderen van een eiwitmolecuul.

De belangrijkste oorzaak van mogelijke *off-target* effecten is een mogelijk gebrek aan specificiteit van het sgRNA. De specificiteit moet dermate hoog zijn dat het erfelijke materiaal slechts op één plaats wordt herkend. Het sgRNA heeft een lengte van 20 nucleotiden. Gezien de grootte van het genoom van eukaryote organismen betekent dit dat deze bindingssequentie meerdere keren op het genoom kan voorkomen. Daarnaast kan het sgRNA soms ook op DNA sequenties binden die niet volledig identiek zijn. Wanneer de nucleotiden van het sgRNA verder van de PAM afligt is de kans hierop groter. In sommige gevallen is een overeenkomst van 15 van de 20 nucleotiden voldoende.[64,65,66] Op deze locaties kunnen dubbelstrengsbreuken ontstaan die kunnen zorgen voor ongewenste mutaties.

Eén van de belangrijkste manieren om *off-target* effecten te voorkomen, is te zorgen dat het sgRNA zo gekozen is dat het niet op een andere positie binnen het genoom kan binden. Dit kan door bio-informatische analyse van de genoomsequentie. Daarnaast zijn er computerprogramma's en web-tools beschikbaar die *off-target* binding kunnen voorspellen.[67,68,69]

Verder blijkt dat het aantal *off-target* effecten sterk afhangt van de experimentele condities, met name van de hoeveelheid (concentratie) van de aanwezige Cas9 eiwitten en sgRNAs. Hoge niveaus leiden tot meer *off-target* effecten.[63]

Een andere methode om *off-target* effecten te voorkomen, is om één van de nucleasen van het Cas9 eiwit uit te schakelen, waardoor één van de twee DNA strengen gekliefd wordt. Op deze manier zijn, om het DNA molecuul doormidden te knippen, twee sgRNA/Cas9 complexen nodig die naast elkaar binden op de complementaire strengen om een dubbelstrengsbreuk te kunnen bewerkstelligen. Door deze methode zullen *off-target* effecten minder vaak voorkomen, omdat er nu twee bindingsplaatsen nodig zijn voor een dubbelstrengsbreuk. Daarnaast wordt ook onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om de lengte van het sgRNA te variëren om *off-target* effecten te verminderen.[70]

In hoeverre *off-target* effecten daadwerkelijk een risico vormen, is nog de vraag. Onderzoeken naar toepassing van CRISPR-Cas in stamcellen, lieten zien dat *off-target* effecten zeldzaam zijn.[71,72,73,74] De meeste gevonden genoomveranderingen, zoals deleties en inserties, zaten op willekeurige plaatsen in het genoom en waren niet het gevolg van de CRISPR-Cas toepassing, maar traden op gedurende de celkweek.

4.2 Modificaties in het genoom

Het CRISPR-Cas systeem wordt gebruikt om veranderingen in het genoom van organismen te induceren. De op deze wijze geproduceerde organismen zullen inserties, deleties, puntmutaties, herschikkingen, of nieuwe sequenties en genen in hun genoom bevatten. Eventuele (milieu)risico's of nadelige effecten die deze genoomveranderingen met zich meebrengen, zijn niet gerelateerd aan de methode waarmee deze veranderingen zijn te weeg gebracht, maar aan de aard van de veranderingen zelf. De eventuele risico's moeten dan ook worden beoordeeld naar de aard van de verandering en niet als onderdeel van een veiligheidsbeoordeling van de techniek.

5. Ggo-regelgeving en CRISPR-Cas

Om mens en milieu te beschermen tegen potentiële ongewenste effecten bij werkzaamheden met ggo's zijn Europese richtlijnen opgesteld. Deze richtlijnen zijn in de Nederlandse wetgeving geïmplementeerd via de Wet Milieubeheer, het Besluit GGO en de Regeling GGO. In de huidige wetgeving wordt een ggo gedefinieerd als een organisme, met uitzondering van de mens, waarvan het genetisch materiaal is veranderd op een wijze die van nature door voortplanting en/of natuurlijke recombinatie niet mogelijk is. Bovendien is er sprake van genetische modificatie als bepaalde technieken worden toegepast. Het betreft hier recombinant DNA- en RNA-technieken waarbij gebruik wordt gemaakt van gastheer/vectorsystemen, technieken waarbij genetisch materiaal dat buiten het organisme is geprepareerd rechtstreeks in een organisme wordt gebracht (bijvoorbeeld via micro-injectie), en celfusie- of hybridisatietechnieken.

De regelgeving voor ggo's is opgesteld op basis van de stand van zaken van twintig jaar geleden. Destijds is een aantal technieken vrijgesteld van de regelgeving met als argument dat hiermee al jarenlange ervaring was opgedaan, zonder nadelige effecten. Sommige van deze technieken worden al sinds de jaren dertig van de vorige eeuw commercieel toegepast voor de veredeling van planten.

Vrijgestelde technieken zijn celfusie en protoplastfusie tussen kruisbare verwanten, zelfklonering van niet pathogene micro-organismen, en het gebruik van chemische mutagentia en straling om mutaties te induceren.

De vraag is of alle toepassingen van het CRISPR-Cas systeem onder de definitie van genetische modificatie en daarmee onder de regelgeving voor ggo's vallen. Deze vraag is niet eenvoudig of eenduidig te beantwoorden. Mede omdat hierbij zowel juridische als wetenschappelijke argumenten een rol spelen.

5.1 CRISPR-Cas producten kunnen niet eenduidig beoordeeld worden

Een aantal overwegingen wijst erop dat CRISPR-Cas en de producten daarvan onder de vigerende ggo-regelgeving vallen. Bij het CRISPR-Cas systeem:

1) worden veranderingen in de sequentie van het genoom aangebracht op onnatuurlijke wijze,
2) wordt een 'recombinant nucleïnezuurmolecuul' (RNA al dan niet in combinatie met een eiwit (Cas9)) dat buiten het organisme is geprepareerd in de cel van het organisme gebracht,
3) wordt bij sommige toepassingen naast de gewenste genoomverandering ook onderdelen van het CRISPR-Cas systeem in het genoom ingebouwd,
4) wordt bij andere toepassingen een vectorsysteem, bijvoorbeeld gebaseerd op een genetisch gemodificeerd virus, gebruikt om het CRISPR-Cas in de cel van het doelorganisme te introduceren.

Hier kan tegenin gebracht worden dat:

1) het aanbrengen van deleties, herschikkingen, puntmutaties en willekeurige kleine inserties ook spontaan in de natuur, of met behulp van chemische mutagentia of straling teweeg gebracht kunnen worden. De 'klassieke' mutagenese technieken zijn vrijgesteld van de ggo-regelgeving, omdat op grond van jarenlange ervaring de producten van deze technieken een '*history of safe use*' hebben. Omdat het gericht aanbrengen van mutaties e.d. aanzienlijk minder risico's met zich meebrengt dan induceren van willekeurige genoomveranderingen met mutagentia, heeft de COGEM eerder geadviseerd om 'gerichte mutagenese' ongeacht de methode vrij te stellen van de ggo-regelgeving.[75]
2) organismen met puntmutaties en *indels* in het genoom niet te onderscheiden zijn van 'niet gemodificeerde' organismen. De handhaafbaarheid van de ggo-regelgeving komt daardoor onder druk te staan. De COGEM heeft er eerder op gewezen dat dit kan leiden tot een verlies aan vertrouwen in de overheid.
3) toepassingen van CRISPR-Cas om genexpressie te beïnvloeden waarbij de werking berust op binding aan regulatiesignalen en de Cas9 nuclease-activiteit is verwijderd, niet tot wijzigingen in de genoomsequentie leiden en derhalve niet onder de ggo-regelgeving kunnen vallen.

Met betrekking tot de vraag of het sgRNA als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden, is het eerdere COGEM advies en signalering "De status van oligonucleotiden in de context van gerichte mutagenese" van belang.[76] Naar aanleiding van een adviesvraag van het voormalige

ministerie van VROM definieerde de COGEM een oligonucleotide als '*een enkel- of dubbelstrengs molecuul dat is opgebouwd uit de verschillende nucleotiden (of analogen daarvan) van het DNA en/of RNA met een lengte tot ongeveer 120 nucleotiden (of basenparen), dat al dan niet synthetisch is vervaardigd'*. De COGEM was van mening dat een oligonucleotide met een sequentie die identiek is aan, of slechts enkele nucleotiden verschilt van, genoomsequenties van de ontvangende cel niet als recombinant nucleïnezuur aangemerkt kan worden. Dit is een van de redenen dat de COGEM van mening is dat gerichte mutagenese met behulp van oligonucleotiden vrijgesteld kan worden van de ggo-regelgeving.
Het sgRNA bestaat uit een combinatie van twee RNA moleculen. Het eerste deel bestaat uit een fragment van 20 nucleotiden dat gelijk is aan de bindingssite op het genomische DNA. Het tweede deel is noodzakelijk om het Cas9 eiwit te binden. De actieve delen van het RNA-eiwitcomplex worden dus gevormd door een RNA sequentie die gelijk is aan de genomische sequentie en een eiwit dat het DNA knipt. In lijn met de ggo-regelgeving en het eerder genoemde COGEM advies, kan gesteld worden dat op grond van deze elementen de ggo-regelgeving niet van toepassing is en het CRISPR-Cas gelijk gesteld kan worden met chemische mutagentia. Anderzijds bestaat het RNA molecuul aanwezig in het CRISP-Cas complex uit een combinatie van twee verschillende delen waarvan één deel geen sequentieovereenkomst heeft met het genomische DNA van de ontvangende cel. Hierdoor kan het sgRNA als 'recombinant nucleïnezuur' gekwalificeerd worden.

5.2 Verschillende toepassingen vragen om een andere benadering

Uit de bovenstaande paragraaf blijkt de, al eerder door de COGEM gesignaleerde, beperking van de huidige EU ggo-regelgeving. De Europese benadering dat organismen onder de ggo-regelgeving vallen indien er gebruik is gemaakt van bepaalde 'recombinant DNA technieken' komt in de knel bij nieuwe technieken als CRISPR. Indien CRISPR wordt toegepast om een transgen in een organisme in te bouwen, is er geen twijfel dat de ggo-regelgeving van toepassing is en dat het betreffende ggo een risicoanalyse moet ondergaan. Echter, wanneer CRISPR wordt toegepast om puntmutaties of *indels* te induceren zal het resulterende organisme 'veiliger' zijn dan een product gemaakt met behulp van 'klassieke' mutagentia. Vrijstelling van de regelgeving (zoals geldt voor producten van chemische mutagentia en straling) lijkt dan ook voor de hand te liggen. In hoofdstuk 6 wordt hierop verder in gegaan.

Indien CRISPR-Cas wordt toegepast als geneesmiddel om de expressie van een gen te beïnvloeden, door aan de sequentie te binden maar deze niet te modificeren, is dit vergelijkbaar met geneesmiddelen die een effect hebben op genexpressie, en lijkt de ggo-regelgeving niet van toepassing.

6. Additionele overwegingen: mogelijke consequenties voor maatschappij, economie en beleid

6.1 Maatschappelijke discussie

De maatschappelijke weerstand tegen genetische modificatie is gericht tegen toepassingen in de landbouw en bij voedsel. De discussie over nieuwe biotechnologietechnieken lijkt zich tot nu toe vooral te hebben afgespeeld binnen het domein van landbouwtoepassingen. Vrijstelling van ggo-regelgeving of een andere beoordeling van de nieuwe technieken vond dan ook plaats binnen de context van een (veronderstelde) maatschappelijke afwijzing. De toepassing van CRISPR is veel breder, waarbij toepassingen in de medische sector zich mogelijk eerder zullen voordoen dan in de landbouwsector. Daarmee verandert mogelijk ook de maatschappelijke geladenheid van de discussie over de status van deze en vergelijkbare technieken.

6.2 'Proces-gebaseerde' regelgeving versus 'product-gebaseerde' regelgeving

De COGEM heeft in de afgelopen jaren verschillende keren aandacht besteed aan het feit dat de technologische ontwikkelingen niet langer in de pas lopen met de Europese regelgeving over genetische modificatie.[75,76,77]

In de EU is gekozen voor specifieke regelgeving voor ggo's. De EU regelgeving, zoals vastgelegd in EU Richtlijn 2001/18, wordt aangeduid als proces-gebaseerde regelgeving, omdat de wijze van productie (het proces) de aanleiding vormt voor regelgeving. Inherent aan dit soort regelgeving is dat de gebruikte technieken de scheidslijn voor de regelgeving vormen.

In Noord-Amerika is er voor gekozen om ggo's onder algemene al bestaande regelgeving te brengen. Dit soort regelgeving wordt aangeduid als product-gebaseerde regelgeving omdat de eigenschappen van het product of organisme bepalen of het gereguleerd moet worden. Met name in Canada geldt dat als bijvoorbeeld een gewas een nieuwe eigenschap heeft deze vergunningsplichtig is en veiligheidsbeoordelingen moet ondergaan, onafhankelijk of het gewas via conventionele veredeling of via genetische modificatie is ontstaan. Omgekeerd geldt hetzelfde, een gewas met een bekende eigenschap is nooit vergunningsplichtig.

In de COGEM signalering "EU-regelgeving updaten?" wordt ingegaan op de achtergronden van deze regelgevingsystemen en een aantal opties geïnventariseerd om de kloof tussen de EU ggo-regelgeving en de wetenschappelijke ontwikkelingen te overbruggen.[77]

Ontwikkelingen als CRISPR-Cas versterken de roep om de EU regelgeving te schoeien op een product-gebaseerde leest. Een product-gebaseerde regelgeving hoeft niet aangepast te worden aan de technologische en wetenschappelijke ontwikkelingen.

Het fundamenteel aanpassen van de EU-regelgeving is, gezien het gepolariseerde klimaat in Europa rond genetische modificatie en de verdeeldheid tussen de verschillende EU-lidstaten over

dit onderwerp, geen eenvoudige zaak. Daarnaast kunnen sommige toepassingen of producten die nu niet onder regelgeving vallen (want op conventionele wijze geproduceerd) dan wel vergunningsplichtig worden. Dit zal op weerstand uit onder meer het bedrijfsleven stuiten.

Anderzijds vraagt een proces-gebaseerde regelgeving om een regelmatige herziening van juridische definities aangaande de technieken die onder genetische modificatie vallen of tot een ggo leiden. Een technologie als CRISPR-Cas roept de vraag op of dit, - en zo ja, voor hoe lang nog -, mogelijk is. Daarnaast lijkt de besluitvorming in de EU hierover volledig vastgelopen. Mede naar aanleiding van de COGEM signalering over nieuwe plantenbiotechnologische technieken in 2006, heeft in opdracht van de Europese Commissie een EU werkgroep zich gebogen over de status van deze 'nieuwe' technieken. Tevens is de EFSA gevraagd om de risico's geassocieerd met deze technieken in kaart te brengen, en wordt een juridische analyse uitgevoerd. Zes jaar na de eerste bijeenkomst van de werkgroep, is nog steeds geen besluit genomen over de status van de nieuwe technieken.
De vraag dringt zich op of het komen tot een besluit in de EU over de status van technieken niet een even moeizaam proces is als een totale herziening van de gronden van de regelgeving.

Terwijl herziening en aanpassing van de regelgeving uitblijft, gaan de ontwikkelingen onverminderd voort, zoals blijkt uit CRISPR-Cas en TALEN. De kloof tussen wetenschap en regelgeving en de daarmee gepaard gaande problemen voor bedrijfsleven, wetenschappers en maatschappij worden steeds groter.

Er is onduidelijkheid over wat als ggo beschouwd moet worden, waardoor het Europese bedrijfsleven afziet van bepaalde innovaties. Er ontstaat een ongelijk speelveld voor het Europese bedrijfsleven ten opzichte van het bedrijfsleven in Noord-Amerika. Handelsconflicten en importproblemen liggen op de loer, omdat de verschillen van inzicht tussen de EU en landen met een product-gebaseerde regelgeving over wat als ggo bestempeld en gereguleerd moet worden, zich verdiepen. Doordat bij import producten niet herkenbaar zijn als ggo volgens de Europese juridische definitie en mogelijk niet als zodanig geëtiketteerd worden, komt de keuzevrijheid van de Europese consument in het geding en de geloofwaardigheid van de overheid onder druk te staan.[77]

6.3 Economische gevolgen

De CRISPR-Cas techniek is in het werkveld omarmd als snelle en eenvoudige methodiek voor *genome editing* bij zowel prokaryote als eukaryote organismen en in zowel het medische als landbouwkundige onderzoek. Ook biedt de techniek grote mogelijkheden voor industriële productie ('witte biotechnologie') vanwege de mogelijkheid om productieorganismen te verbeteren. CRISPR-Cas wordt ook gezien als een onmisbare techniek voor het opkomende veld van de synthetische biologie.[78,79,80] CRISPR-Cas zal daardoor een belangrijke rol gaan spelen in de innovatie over de gehele breedte van de biotechnologie. Dit brengt ook aanzienlijke economische implicaties met zich mee.

Indien toepassingen van CRISPR-Cas binnen Europa anders beoordeeld (lees: vallend onder de ggo-regelgeving) worden dan buiten Europa, kan dit ertoe leiden dat zowel commerciële als onderzoeksactiviteiten verdwijnen uit de EU. De maatschappelijke weerstand tegen gg-gewassen en het moeizame vergunningenbeleid, heeft er toe geleid dat bedrijven in Europa zich niet langer bezig houden met genetische modificatie in landbouwgewassen, en dat er nog nauwelijks onderzoek op dit gebied gedaan wordt door universiteiten en onderzoeksinstellingen in de EU lidstaten. De (publieke en private) financiering voor dit soort onderzoeksactiviteiten is weggevallen.

Eenzelfde scenario kan zich gaan voordoen rond nieuwe technieken als CRISPR. Bij genetisch modificatie van landbouwgewassen kan opgemerkt worden dat het slechts een deel van de markt trof, waarbij verdelingsbedrijven zich konden blijven richten op de conventionele veredeling. Daarbij hebben slechts een beperkt aantal lidstaten van de EU een significante plantenveredelingsindustrie. Technieken als CRISPR-Cas raken echter de gehele biotechnologie-sector, inclusief de medische sector. De potentiële economische consequenties zijn daarmee veel groter.

6.3.1 Intellectueel eigendom

De situatie rond het intellectuele eigendom van deze technologie is nog niet uitgekristalliseerd.[81,82] In 2014 is een octrooi voor een CRISPR-Cas toepassing toegekend aan het start-up bedrijfje Editas Medicine.[83] Verschillende andere instituten en wetenschappers hebben ook octrooiaanvragen ingediend over de technologie, verbeteringen (zoals verhoogde specificiteit), en toepassingen. Onderzoekers van de University of Minnesota (VS) hebben een octrooiaanvraag ingediend over *genome engineering* in planten.[84] Waarschijnlijk zijn er veel meer octrooiaanvragen die nog niet gepubliceerd zijn.[81] Ook moet er rekening mee gehouden worden dat eerder ingediende octrooiaanvragen op vergelijkbare technologieën of werkingsmechanismen van invloed kunnen zijn op de intellectuele eigendomssituatie van CRISPR-Cas.

Onzekerheid over intellectueel eigendom of beheersing van de technologie door één of enkele personen of organisaties kan remmend werken op de implementatie van de technologie en ertoe leiden dat commerciële toepassingen langer op zich laten wachten dan nu verwacht. Het kan ook vragen of maatschappelijke weerstand oproepen, of een potentieel zo belangrijke technologie in de handen mag zijn van een kleine groep van wetenschappers, instituten of bedrijven.

6.4 Kiembaangentherapie bij apen en mensen

Het genetisch modificeren van mensen door zogenaamde kiembaangentherapie, waarbij nakomelingen genetisch aangepast worden, is niet toegestaan in Europa. Tegen genetische modificatie van mensen bestaan ethische bezwaren. Daarnaast spelen ook praktische bezwaren een rol. Het is onduidelijk of kiembaangentherapie mogelijk is (en met welke efficiëntie) en bovendien zijn de risico's van (tot nu toe) willekeurige inbouw van het ingebrachte gen in het genoom van de nakomeling groot.

Begin 2014 publiceerden onderzoekers van het *Model Animal Research Center of Nanjing University* in China dat het hun gelukt was om apen genetisch te modificeren door met behulp van CRISPR-Cas gerichte mutaties aan te brengen in embryo's.[27] Verschillende onderzoeksgroepen hebben aangekondigd ook gg- apen te willen maken om deze, - naast de veel gebruikte gg-muizen en gg-ratten -, als modelsysteem voor onderzoek naar humane ziekten e.d. te gebruiken. Of het gewenst is dat gg-apen als ziektemodelsysteem opgang gaan vinden, is de vraag. Er zijn grote ethische bezwaren in de maatschappij tegen onderzoek met apen.

Met de ontwikkeling van een systeem om primaten gericht genetisch te modificeren, vervallen veel van de praktische bezwaren tegen genetische modificatie van de mens. Vanuit uit wetenschappelijk oogpunt is de stap van aap naar mens klein. Vanuit de wetenschap en patiënten(organisaties) zal de vraag ontstaan waarom kiembaan-gentherapie in bepaalde gevallen niet toegestaan is. Wegen de ethische bezwaren over verandering en mogelijke '*enhancement*' van de mens op tegen de mogelijkheid om erfelijke ziekten uit te bannen en de kinderwens van dragers van erfelijke ziekten mogelijk te maken?

Een vergelijkbare discussie speelt al over de zogenaamde drie-ouder kinderen bij mitochondriale ziektes. Mitochondriale ziektes overerven via de moederlijn. Door bij een IVF bevruchting een celkerntransplantatie uit te voeren naar een eicel van een gezonde donor die vervolgens bevrucht wordt met het sperma van de vader, wordt de ziekte uitgebannen. De *Engelse Nuffield Council on Bioethics* is van mening dat dit ethisch acceptabel is.[85] Begin 2014 heeft de Engelse regering conceptrichtlijnen gepubliceerd die celkerntransplantatie mogelijk moeten maken.

7. Conclusies

- CRISPR-Cas is een nieuwe techniek voor *gene* of *genome editing* die ongekend snel geadopteerd is binnen het wetenschapsveld van de biotechnologie. *Genome editing* wordt hiermee een standaardtechniek voor elk onderzoekslaboratorium binnen de levens-wetenschappen;
- De technologie is nog nieuw en in de toekomst zullen nog niet voorziene toepassingen ontwikkeld worden;

- Binnen het huidige EU juridische kader lijken toepassingen van CRISPR-Cas onder de ggo-regelgeving te vallen;
- CRISPR-Cas kan echter voor diverse doeleinden ingezet worden, waarbij een aantal van de toepassingen voor vrijstelling in aanmerking zou moeten komen;

- Nieuwe technieken als CRISPR-Cas tonen aan dat de huidige EU regelgeving over ggo's aan herziening toe is;

- De COGEM signaleert dat de Nederlandse overheid en de Europese Commissie zich gezien de wetenschappelijke en technische ontwikkelingen moeten bezinnen op herziening of aanpassing van de EU ggo-regelgeving;

- Een besluit of toepassingen en producten van CRISPR-Cas al dan niet onder de ggo-regelgeving vallen, kan grote gevolgen hebben voor de innovatie binnen de EU en de economische positie van het Europese bedrijfsleven;
- Gezien het grote belang van deze techniek voor zowel bedrijfsleven als de maatschappij (medische toepassingen, etc.) adviseert de COGEM dat de Nederlandse overheid zich sterk maakt voor een snel besluit over de juridische status van deze techniek en haar toepassingen en producten in de EU;

- De toegenomen technische mogelijkheden om gerichte aanpassingen in het genoom van plant, dier en mens aan te brengen, zullen ook ethische vragen oproepen, zoals waarom het niet toegestaan is om via genetische modificatie erfelijke ziektes bij de mens uit te bannen;

Referenties

1. Hsu PD et al (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 157: 1262-1278
2. Gaj T *et al*. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 31: 397-405
3. Bibikova M *et al*. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 161: 1169-1175
4. Urnov RD *et al*. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 435: 646-651
5. COGEM (2009). Zinkvinger aan de pols; ontwikkelingen en implicaties van de zinkvingertechnologie. COGEM signalering CGM/090616-02
6. Christian M *et al*. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics. 186: 757-761
7. Cermak T *et al*. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 39: e82
8. Wood AJ *et al*. (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science 333: 30
9. Mussolino C *et al*. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic Acids Res. 39: 9283–9293
10. Zhang F *et al*. (2011). Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat. Biotechnol. 29: 149–153
11. Ye L *et al*. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 111: 9591-9596
12. Jiang W *et al*. (2014). Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Arabidopsis thaliana and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. PLoS One. 9: e99225
13. Wang Y *et al*. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat. Biotechnol. doi: 10.1038/nbt.2969. [Epub ahead of print]
14. Schwank G *et al*. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell. 13: 653-658
15. Maeder ML *et al*. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. Nat. Methods 10: 977–979
16. Sorek R *et al*. (2008). CRISPR - a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. Nat. Rev. Microbiol. 6: 181-186
17. van der Oost J *et al*. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. Trends Biochem. Sci. 34: 401
18. Jinek M *et al*. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816
19. Cong L *et al*. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339: 819–823
20. Wyman C & Kanaar R (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. Annu. Rev. Genet. 40: 363–383

21. Hwang WY *et al.* (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31: 227-229
22. Wu Y *et al*. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell. 13: 659-662
23. Mali P *et al*. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339: 823–826
24. Feng Z *et al*. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Cell Res. 23: 1229-1232
25. Baltes NJ *et al.* (2014). DNA replicons for plant genomic engineering. The Plant Cell 26: 151-163
26. Jinek M *et al*. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471
27. Niu Y *et al*. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. Cell 156: 836-834
28. Ran FA *et al*. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154: 1380–1389
29. Mali P *et al*. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nat. Biotechnol. 31: 833–838
30. Cho SW *et al*. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Genome Res. 24: 132-141
31. Qi LS *et al*. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell 152: 1173–1183
32. Maeder ML *et al*. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. Nat. Methods 10: 977–979
33. Perez-Pinera P *et al*. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. Nat. Methods 10: 973–976
34. Cheng AW *et al*. (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. Cell Res. 23: 1163–1171
35. Gilbert LA *et al*. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell 154: 442–451
36. Tsai SQ *et al*. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. Nat. Biotechnol. 32: 569-576
37. O'Conell MR *et al* (2014). Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature. Doi: 10.1038/nature 13769 [Epub ahead of print]
38. Gersbach C (2014). Genome engineering: the next genomic revolution. Nature Methods 11: 1009-1011
39. Cho SW *et al*. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat. Biotechnol. 31: 230–232
40. Mali P *et al*. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nat. Methods 10: 957–963
41. Wang H *et al*. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 153: 910–918
42. Gratz SJ *et al*. (2013). Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. Genetics 194: 1029-1035

43. Li D *et al*. (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31: 681–683
44. Li W *et al*. (2013). Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. Nat. Biotechnol. 31: 684–686
45. Ma Y *et al*. (2014). Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. Cell Res. 24: 122–125
46. Shen H. (2013). Precision gene editing paves way for transgenic monkeys. Nature 503: 14–15
47. Yang D *et al*. (2014). Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. J. Mol. Cell Biol. 6: 97–99
48. Li JF *et al*. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. Nat. Biotechnol. 31: 688–691
49. Nekrasov V *et al*. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant Nicotiana benthamiana using Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat. Biotechnol. 31: 691–693
50. Shan Q *et al*. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31: 686–688
51. Jiang W *et al*. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Res. 41, e188
52. Wang H *et al*. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 153(4): 910–918
53. Tan W *et al*. (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110: 16526-16531
54. Xue W et al (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature 514: 380-384
55. Yin H *et al*. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. Nat. Biotechnol. 32: 551-553
56. Xie F *et al*. (2014). Seamless gene correction of β-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyback. Genome Res. 2014 Aug 5. pii: gr.173427.114. [Epub ahead of print]
57. Kennedy EM *et al.* (2014). Inactivation of the Human Papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. J. Virol. 88 (20): 11965-11972
58. Citorik RJ *et al.* (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nat. Biotechnol. Doi:10.1038/nbt.3011
59. Holkens M *et al* (2014). Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineerd nucleases. Nature Methods 11: 1051-1057
60. Jiang W *et al*. (2014). Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Arabidopsis thaliana and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. PLoS One 9: e99225
61. Brooks C *et al*. (2014).Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRISPR/Cas9 system. Pl ant Physiol. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.247577 [Epub ahead of print]
62. Wang Y *et al*. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat. Biotechnol. 2014 Jul 20. doi: 10.1038/nbt.2969. [Epub ahead of print]

63. Marx V (2014). Gene editing: how to stay on-target with CRISPR. Nature Methodology 11: 1021-1025
64. Fu Y *et al*. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat. Biotechnol. 31: 822-826
65. Hsu PD *et al*. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat. Biotechnol. 31: 827-832
66. Pattanayak V *et al*. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. Nat. Biotechnol. 31: 839-843
67. Xie S *et al*. (2014). sgRNAcas9: a software package for designing CRISPR sgRNA and evaluating potential off-target cleavage sites. PLoS One 9: e100448
68. Montague TG *et al*. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res. 42 (Web Server issue): W401-7
69. Zhu LJ *et al*. (2014). CRIPRSeek: a bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome editing systems. Plos One 9: e108424
70. Fu Y *et al*. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat. Biotechnol. 32: 279-284
71. Eisenstein M (2014). Hitting the mark. Nature Methods 11: 894
72. Smith C *et al.* (2014). Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. Cell Stem Cell 15: 12–13
73. Suzuki K *et al.* (2014). Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. Cell Stem Cell 15: 31–36
74. Veres A *et al.* (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. Cell Stem Cell 15: 27–30
75. COGEM (2006). Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie. COGEM signalering CGM/061024-02
76. COGEM (2010). De status van oligonucleotiden in de context van gerichte mutagenese. COGEM signalering CGM/100701-03
77. COGEM (2009). EU-regelgeving updaten? Wetenschappelijke ontwikkelingen werpen nieuw licht op de proces- en productbenadering. COGEM signalering CGM/090626-03
78. COGEM (2013). Synthetische Biologie - update 2013. COGEM signalering CGM/130117-01
79. Rusk N (2014). CRISPR circuits. Nature Methods 11: 710–711
80. Kiani et al (2014). CRISPR transcriptional repression devices and layered circuits in mammalian cells. Nature Methods 11: 723–726
81. Granahan P & Loughran CA (2014). CRISPR/Cas-9: An exciting addition to genomic editing. Life Sciences Law & Industry Report, March 2014. www.wolfgreenfield.com/files/granahan_and_loughran__crispr_cas9_.pdf
82. Fong T (2014). As CRISPR-Cas9 technology sets to take off, uncertainty swirls around IP landscape. Genome Web Daily News. June 18, 2014. www.genomeweb.com/rnai/crispr-cas9-technology-sets-take-uncertainty-swirls-around-ip-landscape
83. Sheridan C (2014). First CRISPR-Cas patent opens race to stake out intellectual property. Nat. Biotechnol. 32: 599-601

84. Patent application WO 2014144155 A1 (2014) Engineering plant genomes using CRISPR/Cas systems. (Filing date 18 Sept 2014; Regents of the University of Minesota, applicant)
85. Nuffield Council on Bioethics (2012). Novel techniques for the prevention of mitochondrial DNA disorders: an ethical review. http://nuffieldbioethics.org/project/mitochondrial-dna-disorders/#sthash.gWy0PFsP.dpuf