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 S.A.M. Dijksma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 8 maart 2017
KENMERK CGM/170308-01
ONDERWERP Advies CRISPR-Cas en gerichte mutagenese bij planten

Geachte mevrouw Dijksma,

De COGEM heeft in de afgelopen jaren verschillende adviezen en signaleringen uitgebracht over de toepassing van nieuwe biotechnologische technieken in de landbouw, waaronder signaleringen over de *gene editing* technieken CRISPR-Cas9 en zinkvingers.[1,2] Ook in de Trendanalyse biotechnologie 2016 is hieraan aandacht besteed.[3]
Het onderhavige advies, dat is opgesteld naar aanleiding van het verzoek van uw ministerie om op korte termijn te adviseren over de vrijstelling van de ggo-regelgeving van de toepassing van CRISPR-Cas9 voor gerichte mutagenese bij planten, is grotendeels een samenvatting van deze eerdere publicaties. Dit mede omdat er geen nieuwe weten-schappelijke ontwikkelingen zijn die leiden tot herziening van het eerdere standpunt van de COGEM dat in de regelgeving geen onderscheid gemaakt moet worden tussen gerichte mutagenese en klassieke mutagenese.

CRISPR-Cas9 en *gene editing* technieken
CRISPR-Cas9 is een zogenaamde *gene editing* techniek. Met CRISPR-Cas9 is het mogelijk om gericht veranderingen in het erfelijk materiaal van dieren, planten of micro-organismen aan te brengen (*gene editing*). Het CRISPR-Cas9 systeem bestaat uit een complex van RNA moleculen en eiwitten. De gids-RNA moleculen herkennen een specifieke plek in het genoom (DNA) van het betreffende organisme, waarna de (Cas9) eiwitten het DNA openknippen. Met CRISPR-Cas9 is het onder meer mogelijk om de expressie van genen te

1 COGEM (2014). Signalering en advies CRISPR-Cas; revolutie uit het lab. CGM/141030-01
2 COGEM (2009). Zinkvinger aan de pols; ontwikkelingen en implicaties van de zinkvingertechnologie COGEM signalering CGM/090616-02
3 Commissie Genetische Modificatie (COGEM), Gezondheidsraad, 2016. Trendanalyse biotechnologie 2016, Regelgeving ontregeld. COGEM; Bilthoven.

reguleren, gericht kleine veranderingen (mutaties) in het DNA aan te brengen (gerichte mutagenese), of (delen van) genen te verwijderen. Daarnaast kan CRIPR-Cas9 ook gebruikt worden om nieuwe genen of DNA-fragmenten op specifieke plekken in het genoom van een organisme te introduceren. Dit advies beperkt zich tot gerichte mutagenese.

Het CRISPR-Cas9 systeem is afkomstig uit de bacterie *Streptococcus pyogenes*, waarin het de bacterie beschermt tegen virusinfecties. Inmiddels zijn in andere bacteriën vergelijkbare systemen ontdekt die gebruikt kunnen worden om aan CRISPR-Cas9 verwante *gene editing* systemen te genereren. Daarnaast worden steeds nieuwe toepassingen of verbeteringen van het CRISPR-Cas9 systeem ontwikkeld, zoals het gebruik van andere eiwitten om de specificiteit te verhogen (zoals CRISPR-Cpf1[4]). Gezien de vele varianten van het systeem die ontwikkeld worden, kan beter gesproken worden over CRISPR-technologie in plaats van CRISPR-Cas9.

Eerder zijn *gene editing* technieken als *oligo-directed mutagenesis*, TALENs of zinkvingers (*Zinc fingers*) ontwikkeld. CRISPR-Cas9 heeft zich in zeer korte tijd een vaste plek verworven in het instrumentarium van wetenschappers. In vergelijking met eerdere technieken is het gemakkelijk toepasbaar, snel, efficiënt en zeer specifiek. De andere systemen worden echter ook nog steeds toegepast. Ook zullen in de nabije toekomst ongetwijfeld nog andere *gene editing* systemen ontwikkeld worden. Toepassing van deze verschillende *gene editing* systemen leidt tot dezelfde resultaten of producten.

De overwegingen in dit advies hebben daarom betrekking op *gene editing* technieken voor gerichte mutagenese bij planten en niet alleen op de toepassing van CRISPR-technologie.

Gerichte mutagenese door *gene editing* bij planten

Mutaties (veranderingen in het DNA) spelen een belangrijke rol in de evolutie. Door mutaties ontstaan nieuwe genen en veranderen de erfelijke eigenschappen van een organisme. In de natuur ontstaan mutaties tijdens de celdeling door fouten bij het kopiëren van DNA, en bij het niet altijd foutloze herstel van DNA beschadigingen. Bovendien kan bij de vorming van geslachtscellen recombinatie plaatsvinden tussen chromosomen.[5] Door deze herschikkingen in het DNA ontstaan mutaties en soms zelfs nieuwe genen. In de klassieke plantenveredeling wordt gebruik gemaakt van deze genetische variatie door mutanten te selecteren die gunstige eigenschappen met zich meebrengen. Voorbeelden hiervan zijn vele bloemkleuren en vormen in siergewassen en de grote variëteit in koolsoorten.[6]

Mutaties kunnen niet alleen via natuurlijke processen ontstaan, maar ook door de mens geïnduceerd worden. Het ongericht aanbrengen van mutaties in het DNA wordt al sinds de jaren dertig van de vorige eeuw toegepast in de plantenveredeling. Bij deze zogenaamde

---

4 Zetsche B *et al.* (2015). Cpf1 Is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163: 1–13

5 COGEM (2006). Nieuwe technieken in de plantenbiotechnologie. COGEM signalering CGM/061024-02

6 Kempin SA *et al*. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. Science 267: 522-525

klassieke mutagenese wordt met behulp van radioactieve straling of chemische stoffen (mutagentia) het DNA van de plant beschadigd. Hierbij worden op talloze willekeurige plekken in het DNA veranderingen geïntroduceerd. Hierna volgt een (langdurig) proces van selectie op mogelijk gunstige mutaties (eigenschappen) en terugkruisen met de oorspronkelijke plant om de voor de plant ongewenste en ongunstige effecten van de mutageneseprocedure kwijt te raken. Veel van de huidige variëteiten van voedingsgewassen (waaronder tarwe, rijst, bonen en soja) hebben in het verleden klassieke mutagenese ondergaan.[7]

Met de introductie van *gene editing* technieken, zoals CRISPR-technologie, de beschikbaarheid van de genoomsequenties van gewassen en de toegenomen kennis over de functie van genen, is het mogelijk geworden om te veredelen door gericht mutaties in het genoom aan te brengen. Gerichte mutagenese met behulp van *gene editing* biedt grote voordelen ten opzichte van de klassieke ongerichte mutagenese. Alleen de beoogde mutatie wordt teweeggebracht, terwijl bij klassieke mutagenese talloze willekeurige en meestal ongunstige mutaties optreden die door middel van het langdurige proces van terugkruisen moeten worden geëlimineerd. Daarnaast is met behulp van CRISPR-technologie mogelijk om alle genkopieën in de cel van de plant aan te passen. Dit biedt grote voordelen, met name bij (zogenaamde polyploïde) voedingsgewassen, zoals tarwe of aardappel, die meerdere van 'dezelfde' chromosomen en dus meerdere genkopieën bevatten.

Veiligheid van mutagenese

Klassieke mutagenese wordt al tachtig jaar toegepast en de meeste voedingsgewassen zijn ooit op deze wijze behandeld. Er is derhalve sprake van een '*history of safe use*' betreffende de producten van mutagenese. Bij gerichte mutagenese worden alleen de beoogde mutaties aangebracht, terwijl bij klassieke mutagenese talloze en veelal onbekende mutaties in het DNA ontstaan. De COGEM heeft eerder gesteld dat door de hoge specificiteit van gerichte mutagenese de eventuele risico's verbonden aan mutagenese verminderen.[5]

Detectie van gemodificeerde plantenvariëteiten

De wijze waarop gerichte mutagenese wordt uitgevoerd, is afhankelijk van de gebruikte techniek en de plantensoort. In sommige gevallen zal het noodzakelijk zijn om de genen van een *gene editing* systeem in de plant in te bouwen. Door in een later stadium de gemodificeerde plant terug te kruisen en te selecteren op nakomelingen, wordt een plant verkregen die wel de gewenste mutatie heeft maar niet de genen van het *gene editing* systeem bevat. Aan de hand van de mutaties in het eindproduct zelf kan niet of nauwelijks bepaald worden hoe dergelijke planten zijn geproduceerd.[8]

---

7 FAO/IAEA programme - Database of mutant variety and genetic stock (MVGS). http://mvgs.iaea.org

8 Bij planten waarbij meerdere genkopieën aanwezig zijn, kunnen wel aanwijzingen gevonden worden dat het gaat om producten van gerichte mutagenese. Hiervoor is het noodzakelijk dat de genoomsequentie van de betreffende plant wordt bepaald en vergeleken met die van de ongemodificeerde variëteit. Indien alle aanwezige genkopieën dezelfde mutatie bevatten is dat een sterke aanwijzing (maar geen bewijs) dat het gaat om gerichte mutagenese.

Daarmee zijn plantenvariëteiten die gemaakt zijn met behulp van gerichte mutagenese, niet te onderscheiden van planten gemaakt met behulp van klassieke ongerichte mutagenese of afkomstig zijn van spontane 'natuurlijke' mutanten.

Ggo-regelgeving en gerichte mutagenese

Of een plant al dan niet onder de EU ggo-regelgeving valt, heeft grote consequenties. Als deze onder de ggo-regelgeving valt en vergunningsplichtig is, moet een uitgebreid veiligheidsdossier opgebouwd worden voordat de plant op de markt gebracht mag worden. Hiermee zijn aanzienlijke kosten gemoeid, voor gg-gewassen bedragen deze vele miljoenen. Dergelijke bedragen zijn alleen op te brengen door grote bedrijven.[9,10] Of een innovatieve techniek als '*gene editing*' in Europa door bedrijven en instellingen toegepast zal worden, is dan ook vooral afhankelijk van de vraag of de resulterende producten onder de ggo-regelgeving vallen.

Of gerichte mutagenese door middel van *gene editing* technieken, zoals CRISPR-technologie, onder de EU ggo-regelgeving valt, is niet eenvoudig te beantwoorden. Het oordeel van de Europese Commissie over de status van 'de nieuwe biotechnologische technieken', waaronder gerichte mutagenese, laat al enige jaren op zich wachten. De Franse rechter heeft inmiddels prejudiciële vragen gesteld over de interpretatie van de Europese gg-regelgeving (met name Richtlijn 2001/18/EC) betreffende de status van onder meer gerichte mutagenese.

In de EU Richtlijn 2001/18[11] wordt de juridische definitie van een genetisch gemodificeerd organisme (ggo) gegeven: "*een organisme, met uitzondering van menselijke wezens, waarvan het genetische materiaal veranderd is op een wijze welke van nature door voortplanting en/of natuurlijke recombinatie niet mogelijk is*".
In Bijlage 1A van deze Richtlijn wordt verder verwezen naar een aantal technieken die leiden tot genetisch gemodificeerde organismen. Daarnaast staan in Bijlage 1B een tweetal technieken, waaronder mutagenese, waarvan de producten zijn vrijgesteld van de Richtlijn, onder voorwaarde dat er geen 'recombinant nucleïnezuurmoleculen' of ggo's bij deze technieken worden gebruikt. Gewassen gemaakt met behulp van mutagenese vallen niet onder de Richtlijn, omdat deze techniek al ruim voor de invoering van de ggo-regelgeving toegepast werd, en de gewassen een *history of safe use* hebben.

In de Richtlijn 2001/18 wordt gesproken over 'mutagenese' zonder dat gespecificeerd wordt op welke wijze dit plaatsvindt. Het ministerie van VROM heeft eerder in een adviesvraag aan de COGEM gesteld dat, gezien Bijlage 1B van de Richtlijn, voor de bepaling van de

---

9 Schenkelaars Biotechnology Consultancy (2008). Dossierkosten markttoelating genetisch gemodificeerde gewassen in de Verenigde Staten en de Europese Unie. COGEM onderzoeksrapport CGM/2008-05

10 McDougall P (2011). The cost and time involved in the discovery, development and authorisation of a new plant biotechnology derived trait. Crop Life International, Brussels

11 Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad

status van gerichte mutagenese met behulp van zogenaamde ‘oligonucleotiden’ de vraag centraal staat of deze korte stukken DNA een recombinant nucleïnezuur zijn. [12]

Naar aanleiding van deze adviesvraag heeft de COGEM destijds geconcludeerd dat een oligonucleotide dat gebruikt wordt in de *gene editing* techniek ‘*oligo-directed mutagenesis*’ niet als recombinant nucleïnezuur beschouwd moet worden, omdat de nucleotidenvolgorde (sequentie) van dit kleine stukje DNA gelijk is aan die van een DNA sequentie in het genoom van het te muteren organisme. [13] Bij CRISPR technologie wordt gebruik gemaakt van een RNA molecuul dat uit twee delen bestaat. Het eerste (actieve) deel is gelijk aan een sequentie in het genoom van het organisme, terwijl het tweede deel het eiwit bindt dat het DNA moet knippen. Dit RNA molecuul kan als recombinant aangemerkt worden, waardoor de producten van CRISPR-technologie onder de ggo-regelgeving zouden vallen. Bij de *gene editing* technieken van zinkvingers en TALENs wordt geen gebruik gemaakt van nucleïnezuren. Gerichte mutagenese met deze technieken valt daarmee niet onder de strekking van de Richtlijn 2001/18/EG en de resulterende producten lijken vrijgesteld van de ggo-regelgeving.[2]

Gezien het bovenstaande lijkt de juridische status van een plant verkregen van gerichte mutagenese afhankelijk van de gebruikte *gene editing* techniek, ondanks dat de resulterende planten verder exact gelijk zijn.

Regelgeving buiten Nederland

In de Verenigde Staten worden gewassen die gerichte mutagenese hebben ondergaan niet als ggo beschouwd en vallen zij niet onder de vergunningplicht of regelgeving.[14] Ook in de EU hebben sommige lidstaten unilateraal een afweging gemaakt over de status van planten die met behulp van gerichte mutagenese zijn ontwikkeld. In Duitsland en het Verenigd Koninkrijk, en Finland en Zweden zijn de beoordelende instanties van mening dat veldproeven met gewassen ontwikkeld met behulp van respectievelijk *oligo-directed mutagenesis* en CRISPR-technologie niet onder de ggo-regelgeving vallen.[15,16,17] Hieruit kan afgeleid worden dat bij de beoordeling in deze EU-lidstaten de vraag of er een recombinant nucleïnezuur is gebruikt, van ondergeschikt belang werd geacht. De Zweedse *Board of Agriculture* is van mening dat veldproeven met CRISPR-Cas9 gemuteerde *Arabidopsis* planten niet vergunningplichtig onder de ggo-regelgeving zijn, omdat de planten geen vreemd DNA bevatten.[15] Het Duitse ‘Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit’ (BVL) stelt dat gerichte mutagenese eender is aan klassieke mutagenese.[17]

---

12 Ministerie van VROM. Adviesvraag betreffende interpretatie ‘oligonucleotiden’, dd 29 april 2010

13 COGEM (2010). De status van oligonucleotiden in de context van gerichte mutagenese. COGEM advies en signalering CGM/100701-03

14 Waltz E (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. Nature 532: 293

15 Swedish Board of Agriculture, Plant and Environment Department (2015). http://www.upsc.se/documents/Information_on_interpretation_on_CRISPR_Cas9_mutated_plants_Final.pdf

16 Fladung M (2016). Cibus' herbicide-resistant canola in European limbo. Nature Biotechnol. 34: 473-474

17 BVL, 3 juni 2015 Widerspruch gegen CIBUS Raps-Bescheid zurückgewiesen

Uit het bovenstaande blijkt dat de juridische status van gerichte mutagenese met behulp van *gene editing* technieken zelfs binnen de EU verschillend wordt beoordeeld.

COGEM advies en signalering

Niet technieken maar de toepassing beoordelen
De COGEM adviseert om niet per type *gene editing* technologie te bekijken of deze onder de ggo-regelgeving valt, maar naar de aard van de toepassing (zoals gerichte mutagenese) te kijken. CRISPR-technologie is thans de meest succesvolle techniek, maar er zijn ook andere *gene editing* technieken waarmee dezelfde resultaten bereikt kunnen worden.

Vrijstelling gerichte mutagenese bij planten
De COGEM adviseert om planten verkregen door middel van gerichte mutagenese net als -planten die het product zijn van klassieke mutagenese- vrij te stellen van de ggo-regelgeving. De COGEM is van oordeel dat de veiligheid hiermee niet in het geding komt. Planten-variëteiten verkregen door middel van klassieke mutagenese kennen een lange *history of safe use*. Gerichte mutagenese is een nauwkeuriger techniek dan klassieke mutagenese en zal veel minder of zelfs geen additionele, onbekende genetische veranderingen induceren.

Ook vanuit het oogpunt van handhaafbaarheid is vrijstelling gewenst. Plantenvariëteiten geproduceerd met behulp van gerichte mutagenese zijn niet te onderscheiden van de producten van klassieke mutagenese of in het veredelingsproces geselecteerde spontane natuurlijke mutanten.

De COGEM signaleert dat er aanzienlijke economische belangen spelen rond een besluit over de status van gerichte mutagenese en dat er gevolgen zijn voor de handhaafbaarheid van de regelgeving. Indien in de EU en Nederland producten van gerichte mutagenese als ggo bestempeld worden, terwijl dit elders niet het geval is, zal deze toepassing in de EU geen en in andere landen wel doorgang vinden. Hierdoor ontstaat er een ongelijk speelveld voor de Nederlandse veredelingsindustrie.
Bij import van dergelijke gewassen zijn deze niet als zodanig herkenbaar. Omdat ze in hun land van ontwikkeling ook niet als ggo beschouwd en aangemerkt worden, zullen ze ongemerkt op de Europese markt verschijnen.
Het is daarbij ook niet geheel uit te sluiten dat deze planten gebruikt zullen worden in het reguliere veredelingsproces en dat daarmee de eigenschap ongemerkt en onbedoeld ingebouwd wordt in Nederlandse veredelingsproducten.

Noodzaak voor aanpassing EU ggo-regelgeving
De COGEM signaleert dat een besluit over vrijstelling van gerichte mutagenese slechts op korte termijn soelaas biedt. De benadering om per techniek of toepassing te besluiten of het onder de ggo-regelgeving valt is een doodlopende weg, omdat de regelgeving is gebaseerd

op de wetenschappelijke stand van zaken in de jaren negentig van de vorige eeuw. Sindsdien zijn de wetenschappelijke inzichten en mogelijkheden sterk toegenomen.
Het wetenschappelijke onderscheid tussen genetische modificatie en andere biotechnologische toepassingen vervaagt. Veel nieuwe biotechnologische technieken bevinden zich daarmee in een (juridisch) grijs gebied. De resulterende producten (zoals gewassen) van de verschillende technieken of toepassingen zijn vaak niet van elkaar te onderscheiden. Zoals uit dit advies blijkt, wordt zelfs het onderscheid tussen spontane natuurlijke mutanten en door de mens geïnduceerde mutanten steeds moeilijker te maken. Een herziening van de EU ggo-regelgeving is daarom dringend noodzakelijk, waarbij overwogen kan worden om de eigenschappen van het eindproduct meer centraal te stellen in plaats van de techniek waarmee of de wijze waarop het gemaakt is.[18]

Hoogachtend,

COGEM

c.c. Ministerie van IenM
Drs.

[18] COGEM (2009). EU-regelgeving updaten? Wetenschappelijke ontwikkelingen werpen nieuw licht op de proces- en productbenadering. Signalering CGM/090626-03