



## Inhoud

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Samenvatting</b>                                    | <b>3</b>  |
| <b>Feiten en cijfers</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>1. CRISPR-Cas, een revolutie in genoombewerking</b> | <b>6</b>  |
| <i>Bacterie beschermt zich tegen virussen</i>          | 7         |
| <i>Onderzoekers leren van bacterie</i>                 | 10        |
| <b>2. CRISPR-Cas versnelt onderzoek</b>                | <b>12</b> |
| <i>Het menselijk genoomproject</i>                     | 13        |
| <i>Functies van genen doorgelicht</i>                  | 13        |
| <i>Produce ren van ziektemodellen</i>                  | 15        |
| <b>3. Therapeutische toepassingen van CRISPR-Cas</b>   | <b>20</b> |
| <i>Erfelijke aandoeningen</i>                          | 21        |
| <i>Gentherapie, nieuwe stijl</i>                       | 22        |
| <i>Kanker</i>                                          | 27        |
| <i>CRISPR-Cas in immuuntherapie tegen kanker</i>       | 30        |
| <i>Infectieziekten</i>                                 | 33        |
| <b>4. Ethische en maatschappelijke discussie</b>       | <b>40</b> |
| <i>Genoombewerking bij embryo's</i>                    | 41        |
| <i>Wereldwijde veroordeling</i>                        | 43        |
| <i>Roep om internationale regulering</i>               | 44        |
| <b>5. Besluit</b>                                      | <b>45</b> |
| <b>Referenties</b>                                     | <b>46</b> |

# Samenvatting

Genoombewerking (*'Genome editing'* in het Engels) is een verzamelnaam voor een reeks revolutionaire technologieën om snel en precies veranderingen in het erfelijk materiaal van levende wezens aan te brengen. Dit kan – in principe – in het erfelijk materiaal (DNA) van planten, microben, dieren, en mensen. Wetenschappers kunnen met deze technologieën heel specifiek één DNA-letter veranderen, een reeks van meerdere DNA-letters vervangen door een andere reeks, of een welbepaald gen aan- of uitschakelen.

Genoombewerking zorgt sinds enkele jaren voor een stroomversnelling 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 in 2015 CRISPR-Cas uit tot dé wetenschappelijke doorbraak van het moment.

Het systeem bestaat uit twee componenten: een 'schaar' en een 'gids'. Cas is de moleculaire schaar. Het is een eiwit dat DNA in stukken knipt. Cas knipt echter enkel op een plaats in het genoom waar het door een CRISPR-molecule naartoe wordt geleid. CRISPR bestaat uit een RNA-molecule.

Hoewel wetenschappers het CRISPR-Cas-systeem nog maar recent hebben ontdekt, is het niet nieuw: bacteriën gebruiken het al heel lang om zich te beschermen tegen virussen. CRISPR-Cas is dus geen uitvinding van de mens, maar werd al miljoenen jaren geleden bedacht door de natuur. De mens kan – mits enkele aanpassingen – dit systeem nu gebruiken 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 ten opzichte van eerdere genoombewerkingstechnieken omdat het goedkoper, sneller, efficiënter en veelzijdiger is.

Inmiddels 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 gentherapie en gewasveredeling. De eerste toepassingen in de geneeskunde en de landbouw zijn dan ook al een feit.

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

Het dossier is geschreven op mensenmaat. Ook wie geen specialist is in de moleculaire genetica, maar zich wel 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, 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 8).*

*Het genoom is een aaneenschakeling van DNA-bouwstenen of DNA-letters. Het genoom van bijvoorbeeld de darmbacterie Escherichia 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. In het dierenrijk spant de axolotl (Ambystoma mexicanum), een salamander die in delen van Mexico leeft, de kroon met een genoom van 32 miljard DNA-letters of 10-keer meer dan de mens. Maar ook hij moet het afleggen tegen 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 kan de functie van een gen verbeterd worden door een mutatie. Het feit dat velen onder ons bijvoorbeeld de voedingsstoffen in koemelk kunnen verteren, is het gevolg van een mutatie die bij één of meerdere van onze voorouders is opgetreden. Mutaties zijn daarom lang niet altijd negatief. Bovendien hebben veel mutaties zelfs geen enkel effect op de functie van een gen. Dan noemen we ze neutrale mutaties.*

*Mutaties creëren bovendien variatie binnen een soort. Ze zijn dus essentieel voor levende wezens: zonder mutaties, zouden we geen evolutie, en dus geen 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 één of meerdere mutaties 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 ongekende precisie en efficiëntie.*

*Het tijdschrift Science riep in 2015 CRISPR-Cas uit tot de belangrijkste wetenschappelijk doorbraak van het moment. 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 Crispr associated eiwit.*

# CRISPR-Cas, een revolutie in genoombewerking

Genoombewerking biedt de mogelijkheid 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.

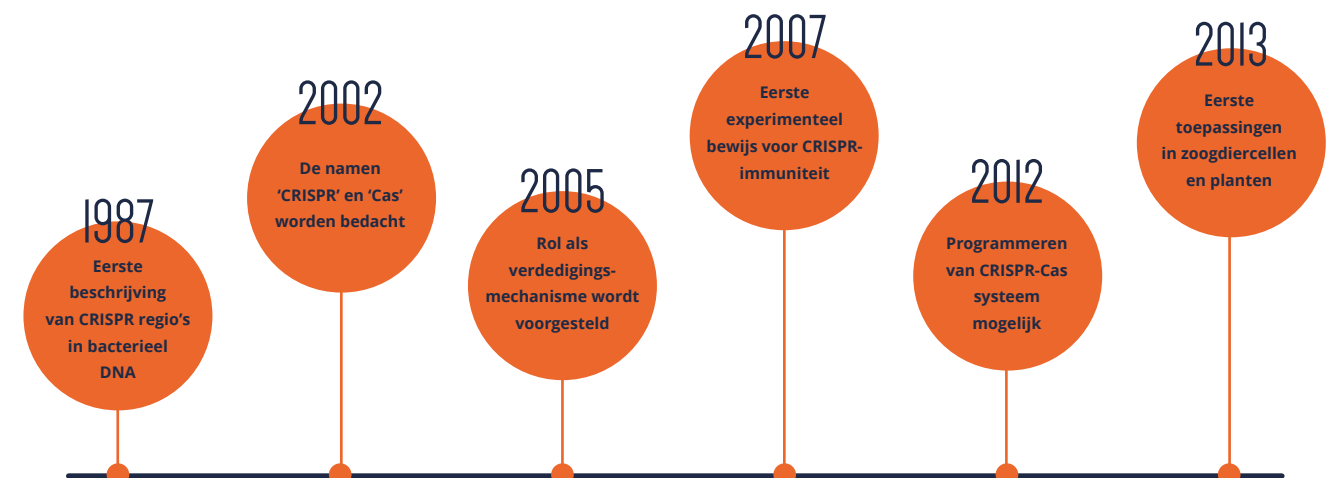
Toen wetenschappers het genoom van steeds meer bacteriesoorten onder de loep namen, zagen ze telkens deze herhaalde DNA-sequenties terugkomen. Onder meer in de bacteriën die gebruikt worden om kaas en yoghurt te maken, en in bacteriën die van nature voorkomen in onze darmen. Ondertussen blijkt dat meer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

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).<sup>2</sup> Snel werd duidelijk dat de eiwitten, waarvoor de CAS-genen coderen, functioneren als moleculaire scharen die DNA kunnen knippen.<sup>3</sup>

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.<sup>4 5 6</sup> 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 en zo onschadelijk te maken (zie figuur 2).

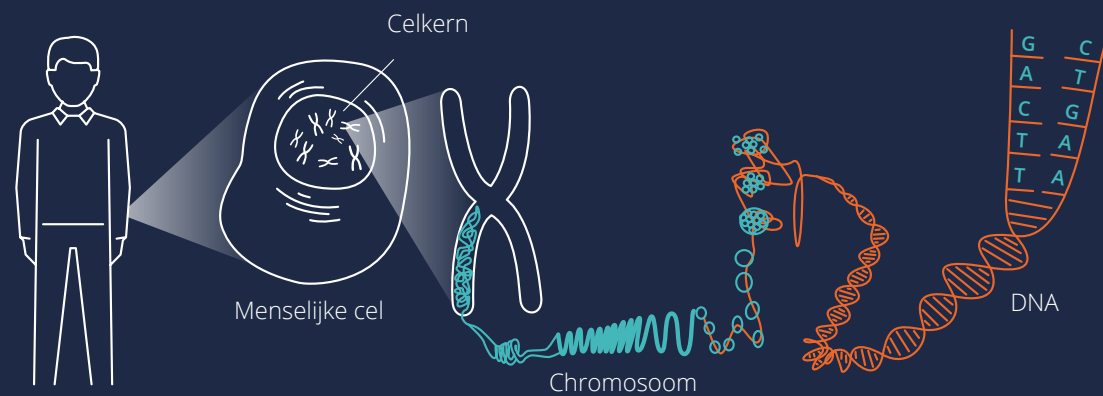
In 2007 konden wetenschappers voor de eerste keer experimenteel aantonen dat een bacterie, met name de yoghurt-makende bacterie



*Streptococcus thermophilus*, het CRISPR-Cas-systeem inderdaad gebruikt als afweer tegen virussen. Herhaaldelijke blootstelling van de bacteriën aan een virus deed bacteriën op termijn resistent worden. Die resistentie ging gepaard met de opname van stukjes virale genetische code in de CRISPR-regio in het DNA van de bacteriën. Wanneer de wetenschappers de virale stukjes verwijderden uit deze 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.<sup>8,9,10</sup>

## 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'. Het menselijk genoom telt 3,2 miljard DNA-letters.

DNA, een dubbele draad die een helix vormt, zit in de kern verpakt onder de vorm van 'chromosomen'. Elke cel van ons lichaam heeft 2x23 chromosomen of 2x23 'pakketjes DNA'. Van elk duo-pakketje is telkens één exemplaar afkomstig van elk van onze biologische ouders. Uitgerold en achter elkaar geplaatst vormen die chromosomen een draad van ongeveer twee 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.

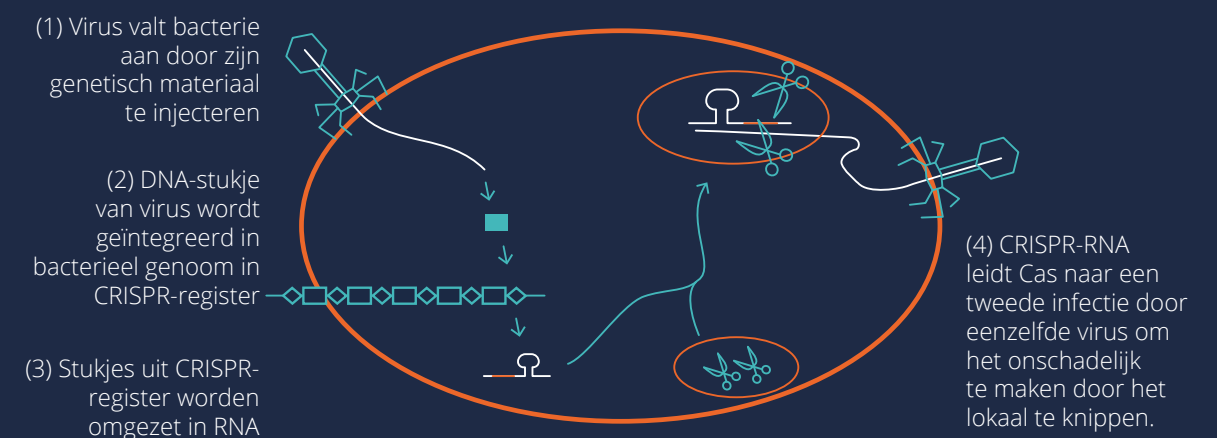
Als we dus één streng aflezen, weten we ook de lettervolgorde van de andere – complementaire – streng.

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 afgelezen en omgezet in een DNA-molecule dat wordt vertaald in een eiwit. Eiwitten zijn belangrijk als structuurelement van de cel, maar ook als uitvoerders van biochemische taken. Ze zorgen ervoor dat de cel voedingsstoffen omzet in energie, dat een spiercel kan samentrekken, een zenuwcel elektrische signalen doorgeeft, een speekselklier cel speeksel produceert etc.

Maar in werkelijkheid codeert slechts een klein deel van het menselijk-DNA effectief voor eiwitten. De rest van het DNA is belangrijk voor de regulatie van genexpressie, het kopiëren van het DNA, het behoud van de structuur van het DNA en de chromosomen enz.

Af en toe sluip er een foutje in het DNA-kopieerwerk. We noemen een dergelijk foutje een 'mutatie'. Een mutatie in een gen kan leiden tot een defect eiwit. Vaak echter leidt een mutatie niet tot een verandering in het eiwit. Dankzij mutaties vergroot de variatie binnen de soort en is ze beter aangepast aan veranderende omstandigheden en natuurlijke selectie.

## 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 nieuwe virussen aan te maken die 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 referentie 11)

## 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 een aantal onderzoekers - Jennifer Doudna (UC Berkeley in de VS), Emmanuelle Charpentier (toen Universiteit van Umeå in Zweden, nu Max Planck Instituut in Duitsland) en Virginijus Siksnys (Universiteit van Vilnius in Litouwen) - onafhankelijk van elkaar aantoonde dat je het CRISPR-Cas-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 overeenkomt met de DNA-sequentie waar men wil knippen.<sup>8 9 10</sup>

Kort daarna, in 2013, toonden vijf onafhankelijke onderzoeksteams, met onder meer Feng Zhang en zijn collega's van het Broad Institute (MIT, Boston, VS), aan dat het CRISPR-Cas-systeem ook kan gebruikt worden om het DNA in cellen van mensen, muizen en zebrafissen te veranderen.<sup>11 12 13 14 15</sup> 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.<sup>16 17 18 19 20</sup>

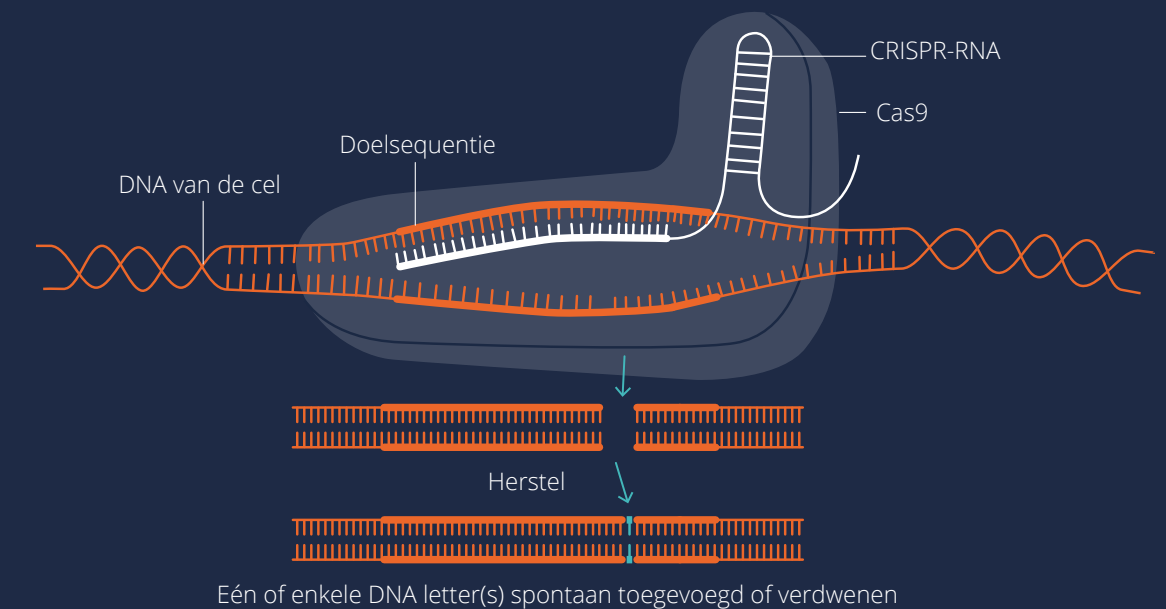
CRISPR-Cas is niet de enige moleculaire technologie om genomen te bewerken. Er werden meerdere technieken ontwikkeld die ofwel gebruik maken van andere moleculaire scharen dan Cas9 (Cas12, voorheen Cpf1 genoemd; Cas13, voorheen C2c2; enzovoort) of die gebaseerd zijn op een ander mechanisme (o.a. oligonucleotide 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'.

### ... en de natuur laten plakken

Breuken in DNA zijn schadelijk. Om die reden beschikken levende wezens over 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' en '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. Vaak is dat echter precies de bedoeling van de onderzoeker (zie volgend hoofdstuk).

## 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 zelf. Tijdens dit natuurlijk herstelproces worden vaak fouten gemaakt waardoor een of meerdere DNA-bouwstenen verdwijnen of toegevoegd worden. Deze fouten of mutaties kunnen ervoor zorgen dat het gen niet langer functioneel is.*

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 (zie figuur 3).



## 2 CRISPR-Cas versnelt onderzoek

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 om in het genoom van plant, dier of mens wijzigingen aan te brengen. Onderzoekers aan universiteiten en in bedrijven zijn daarom massaal aan de slag gegaan met CRISPR-Cas.

### Het menselijk genoomproject

Overal ter 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, hersen- en zenuwziekten, hart- en vaat-aandoeningen, ontstekingen en infecties. Op termijn leidt deze kennis tot nieuwe geneesmiddelen, vaccins, diagnostische testen en behandelingsmethoden (zie onder meer VIB Fact Series 'Alzheimer' en 'Kanker').

Een belangrijk element in dit fundamenteel biomedisch onderzoek is het aflezen, ontcijferen en in kaart brengen van het menselijk genoom. Dit titanenwerk begon met het Human Genome Project en het duurde meer dan 10 jaar om het eerste menselijke genoom van a tot z af te lezen. Ondertussen is het genoom van vele tienduizenden mensen in kaart gebracht. Dat gaat steeds sneller en wordt almaar goedkoper dankzij de introductie van nieuwe technieken en afleesmachines. Maar het is niet omdat je een genoom kan aflezen en alle 25.000 menselijke genen hebt ontcijferd, dat je het menselijk genoom ook volledig begrijpt. De uitdaging vandaag is de functie van die genen te achterhalen, en van de eiwitten of andere biomoleculen waarvoor ze coderen. Echter, niet alleen coderende sequenties zijn belangrijk. Andere genoomgebieden kunnen een rol spelen bij de regulatie van genen, de structuur en stabiliteit van chromosomen, de duplicatie van DNA, enzovoort. Ook deze gebieden worden intens onderzocht.

### Funcities van genen doorgelicht

Met CRISPR-Cas kunnen wetenschappers de functie van bepaalde sequenties of van een gen veel sneller achterhalen dan vroeger. CRISPR-Cas laat hen immers toe om het betreffende gen uit te schakelen en te kijken welke kenmerken van de cel of het organisme daardoor beïnvloed worden.<sup>21</sup> Ook kunnen meerdere genen in een keer bestudeerd worden door ze tegelijk uit te schakelen. Evenzo kan de sequentie van niet-coderende gebieden worden gewijzigd en nagegaan welke functie die veranderingen hebben op de cel. Enkele voorbeelden lichten het principe toe.

De CRISPR-Cas-aanpak werd meermaals gebruikt in culturen van kankercellen en in proefdieren voor de identificatie van genen die essentieel zijn voor de overleving van kankercellen.<sup>22 23 24</sup> Recent nog voerden onderzoekers van het Britse Wellcome Sanger Institute een uitgebreide CRISPR-Cas-screening uit op 339 kankercellijnen afkomstig van evenveel kankerpatiënten. Het ging om meer dan 30 verschillende kankertypes, van darmkanker over borstkanker tot pancreaskanker. In elk van de 339 cellijnen schakelden ze via CRISPR-Cas één voor één een totaal van 18.000 genen uit (bijna elk gekend gen dus). Vervolgens gingen ze voor elk van de uitgeschakelde genen na of de kankercellen doodgingen of bleven delen. Dit leverde een lijst op van vele honderden genen die essentieel blijken voor de overleving van kankercellen.<sup>26</sup> Elk van deze genen vormt een potentiële doel voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen kanker. Je kan deze genen – en/of de eiwitten waarvoor ze coderen – immers zien als schakelaars die de groei van kankercellen stimuleren. Door nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen die inwerken op deze schakelaars

kan men mogelijk de overleving van kankercellen beïnvloeden. Op een gelijkaardige manier bracht een uitgebreide screening met CRISPR-Cas aan het licht waarom tumoren van sommige patiënten resistent bleken voor immuuntherapie.<sup>27</sup>

Dit soort analyses wordt ook ingezet om eiwitten op te sporen die essentieel zijn voor infectieziektes zoals aids.<sup>28</sup> Het virus verantwoordelijk voor aids – hiv – herkent en infecteert menselijke witte

bloedcellen op basis van de aanwezigheid van welbepaalde receptoreiwitten aan het oppervlak van gastheercellen. De identificatie van deze ‘gastheerfactoren’ kan resulteren in nieuwe strategieën voor het voorkomen en behandelen van hiv-infecties. Dat blijkt onder meer uit recent Belgisch onderzoek.<sup>29</sup> Gelijkaardige benaderingen worden ook gebruikt om andere infectieziekten te bestuderen.<sup>30</sup>

## HOE IN DE PRAKTIJK MUTATIES AANBRENGEN?

*Hoe kan men in de praktijk veranderingen in het genoom aanbrengen met CRISPR-Cas? 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, kleren, 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 identiek is aan het gids-CRISPR-RNA, een mutatie wordt aangebracht. De cellen met een mutatie worden vervolgens geselecteerd en verder opgegroeid in cultuur.*

*Er bestaan vandaag ook ‘do-it-yourself’ CRISPR-Cas-kits (<http://www.the-odin.com/diy-crispr-kit/>) om in de klas, maar evengoed op de keukentafel thuis, te experimenteren met CRISPR-Cas in bacteriën.*

*Het gebruik van de kit buiten een laboratorium is toegestaan in België, mits aan bepaalde registratieverplichtingen uit de milieuwetgeving wordt voldaan (zie ook [https://www.standaard.be/cnt/dmf20190620\\_04470564](https://www.standaard.be/cnt/dmf20190620_04470564)).*

## Produceren van ziektemodellen

### Cellijnen en proefdieren

Om ziektes te doorgronden werken wetenschappers met ‘ziektemodellen’. Dit zijn cellen in cultuur of proefdieren waarin een menselijk ziektebeeld wordt nagebootst, bijvoorbeeld door middel van genetische aanpassingen. Veel gebruikte proefdieren hiervoor zijn muizen, ratten en zebrafissen. Ziektemodellen zijn nodig om de ontwikkeling en de progressie van een ziekte te bestuderen, en in een latere fase om medicijnen en andere interventies te testen. Deze kennis is broodnodig voor de ontwikkeling van nieuwe methodes om ziekten te voorkomen, te diagnosticeren en te behandelen. Veruit de meeste van de bestaande geneesmiddelen zijn mede dankzij deze modellen tot stand gekomen.

Wereldwijd zijn er vele duizenden van dergelijke ziektemodellen gemaakt, vooral in cellijnen maar ook in muizen. In de afgelopen twintig jaar was de procedure voor het maken van dergelijke modellen vrijwel ongewijzigd gebleven. Dankzij CRISPR-Cas kan men nu echter veel sneller en efficiënter diermodellen aanmaken om menselijke ziektes te bestuderen. Door embryo's te injecteren met de CRISPR-Cas-componenten kan men precieze genetische veranderingen aanbrengen rechtstreeks in het genoom van het proefdier (zie kaderstuk ‘Proefdieren in biomedisch onderzoek’, pagina 16). Op deze manier slaagde in 2013 een Amerikaans-Chinees onderzoeksteam er als eerste in om in één stap muizen te maken met meerdere mutaties. Vroeger duurde het jaren om die te maken, maar dankzij CRISPR-Cas kon dit in enkele weken.<sup>31</sup>

De technologie werd door hetzelfde onderzoeksteam ook gebruikt om genen aan en uit te zetten die samenhangen met een bepaald type kanker.<sup>32</sup> Er liggen vaak meerdere genetische veranderingen aan de basis van kanker en CRISPR-Cas is dus erg handig om al deze verschillende mutaties na te bootsen in een proefdier. Zo kan je de complexiteit van een tumor benaderen in een proefdier, hetgeen als model veel beter aansluit bij de tumoren in een mens dan celculturen.

Het gebruik van genoombewerkingstechnieken om proefdiermodellen voor een menselijke ziekte te genereren, blijft echter lang niet beperkt tot kanker. Met behulp van een combinatie van geavanceerde genoombewerkingsinstrumenten konden onderzoekers varkens met de ziekte van Huntington ontwikkelen.<sup>33</sup> Deze varkens vertonen niet alleen de selectieve hersenceldood die wordt gezien bij patiënten met de ziekte van Huntington, maar ook een breed scala aan andere symptomen die samenhangen met de ziekte. Neurodegeneratieve aandoeningen, zoals de ziekte van Huntington, zijn bijzonder lastig voor onderzoekers om te bestuderen, omdat men bij mensen geen monsters kan nemen uit het beschadigde orgaan – in dit geval de hersenen. In tegenstelling tot bijvoorbeeld lever-, nier-, long- of bloedziekten. Daarom blijven proefdieren erg belangrijk voor het bestuderen van hersenziektes (zie kader ‘Proefdieren in biomedisch onderzoek’).

# PROEFDIEREN IN BIOMEDISCH ONDERZOEK

## Noodzaak

Biomedische onderzoekers gebruiken lang niet altijd proefdieren. Vaak voeren ze experimenten uit in proefbuizen of op celculturen (in vitro onderzoek). Steeds vaker maken ze zelfs gebruik van computermodellen (in silico-onderzoek). Of het gaat om klinische studies, om epidemiologisch of zorggericht onderzoek. Toch is onderzoek op proefdieren (in vivo onderzoek) niet alleen belangrijk, maar zelfs onvermijdelijk, willen we ziekten begrijpen en effectieve behandelingen ontwikkelen.

Er zijn nu eenmaal belangrijke medische en wetenschappelijke vragen die artsen en onderzoekers uitsluitend kunnen beantwoorden via onderzoek op levende dieren waarin alle complexe interacties plaatsvinden tussen cellen, weefsels en organen (op de voorgaande pagina's werden diverse voorbeelden gegeven).

Het kan echter niet genoeg worden benadrukt dat onderzoek met proefdieren nu een van de meest gereguleerde onderzoeksactiviteiten is. Vaak denkt men dat het hier over onderzoek op apen, katten en honden gaat, maar de meest gebruikte proefdieren zijn muizen, fruitvliegen en zebrafissen, die speciaal voor onderzoek worden gekweekt. De dieren worden in de beste omstandigheden gehuisvest. Hun welzijn wordt zelfs individueel geregistreerd (bij bv. muizen) en opgevolgd. Vanzelfsprekend leidt dit tot een significante meeruitgave voor de laboratoria. Een reden te meer waarom onderzoekers zo 'zuinig' mogelijk zijn op hun proefdieren en alleen proefdieren inzetten wanneer er echt geen alternatieven zijn.

## Weloverwogen

Onderzoekers doen experimenten op dieren op een weloverwogen manier. Bij elk nieuw project wegen ze het gebruik van proefdieren zorgvuldig af tegenover het belang voor de gezondheid van mensen. Bovendien staat maximalisatie van dierenwelzijn op nummer één in de prioriteitenlijst:

- Onderzoekers mogen alleen met proefdieren werken als ze een scholing en training hebben gevolgd over dierenwelzijn en het ethisch gebruik van proefdieren in experimenten.
- Dierproeven kunnen alleen worden opgestart als ze de goedkeuring hebben van de 'ethische commissie dierproeven' van de betrokken universiteit. Daarbij moeten onderzoekers argumenteren waarom ze dieren nodig hebben voor het onderzoek, gedetailleerd de experimenten omschrijven die worden uitgevoerd, aangeven hoeveel dieren zullen gebruikt worden (en waarom dat aantal nodig is) en aantonen dat de experimenten voordien nog niet werden uitgevoerd.
- Van onderzoekers wordt verwacht dat zij strikt het 3V-principe toepassen: vervanging, vermindering en verfijning van dierenexperimenten. Concreet moeten ze er naar streven om dierproeven maximaal te vervangen door proeven in een reageerbuis, met celculturen of via computermodellen. Voorts moeten ze het aantal proefdieren tot een strikt minimum beperken en de experimenten op een dusdanige manier uitvoeren dat dierenleed zo beperkt mogelijk blijft en dierenwelzijn maximaal wordt ondersteund. Ook moet er worden gekozen voor proefdieren met een zo laag mogelijk bewustzijnsniveau: als een experiment dezelfde resultaten geeft bij fruitvliegen als bij muizen of ratten, moeten de onderzoekers stevast kiezen om het experiment uit te voeren op fruitvliegen.



Weloverwogen proefdierenonderzoek heeft dan ook zijn plaats in het zoeken naar oplossingen voor kanker, hart- en vaatziekten, hersenziekten en tal van andere aandoeningen. Een idee dat overigens ook wordt gedeeld door toonaangevende patiëntenorganisaties en organisaties die onderzoek ondersteunen (zie ook VIB Facts Series Dossier proefdieren).

## iPS-cellen

Naast diermodellen gebruiken onderzoekers ook cellijnen om ziektes te bestuderen. Een redelijk recente innovatie in onderzoek op cellijnen zijn iPS-cellen, een afkorting voor 'geïnduceerde pluripotente stamcellen'. Onderzoekers maken iPS-cellen door lichaamscellen – bijvoorbeeld huidcellen – van een volwassen mens te herprogrammeren tot stamcellen. Deze stamcellen kunnen ongelimiteerd delen en zijn in staat zijn zich te ontwikkelen tot verschillende celtypes. Het maakt hen uitermate interessant voor ziektemodellering.

Om dit te begrijpen moeten we even wat achtergrond geven in ontwikkelingsbiologie. Bij de ontwikkeling van een bevruchte eicel naar een volwassen individu worden stelselmatig verschillende genen geactiveerd en gedeactiveerd naarmate cellen verder differentiëren. Een huidcel onderscheidt zich van een levercel doordat ze een andere reeks genen heeft geactiveerd. En in een hersencel zijn weer andere genen actief dan in

een spiercel. Menselijke gedifferentieerde cellen hebben doorgaans niet meer de mogelijkheid om 'op hun stappen terug te keren'. Met andere woorden een huidcel zal steeds de karakteristieken van een huidcel behouden, ook al kweek je ze in het laboratorium op. Ze zal nooit de capaciteit herwinnen om zich om te vormen tot een zenuwcel of een hartspiercel.

Tenzij men erin slaagt om bepaalde genen opnieuw te activeren (bv. Oct4, Sox2, cMyc, Klf4, ...). Dan slaagt men er wel in om van een huidcel opnieuw een 'pluripotente stamcel' (iPS- cel) te maken en hieruit, mits de toevoeging van bepaalde groeifactoren, eender welk celtype te laten uitgroeien. Door lichaamscellen van een patiënt op deze manier terug pluripotent te maken, kan de moleculaire basis van de ziekte in een kweekschaltje onderzocht worden. Je kan dus bv. hersencellen van een parkinsonpatiënt bestuderen zonder een hersenbiopt te nemen. Een paar huidcellen nemen kan volstaan.

Deze baanbrekende technologie werd gecombineerd met CRISPR-Cas om iPS-cellen op maat te maken. Onderzoekers slaagden er recent in om CRISPR-Cas-gewijzigde iPS-cellijnen te maken om ziekten als amyotrofe laterale

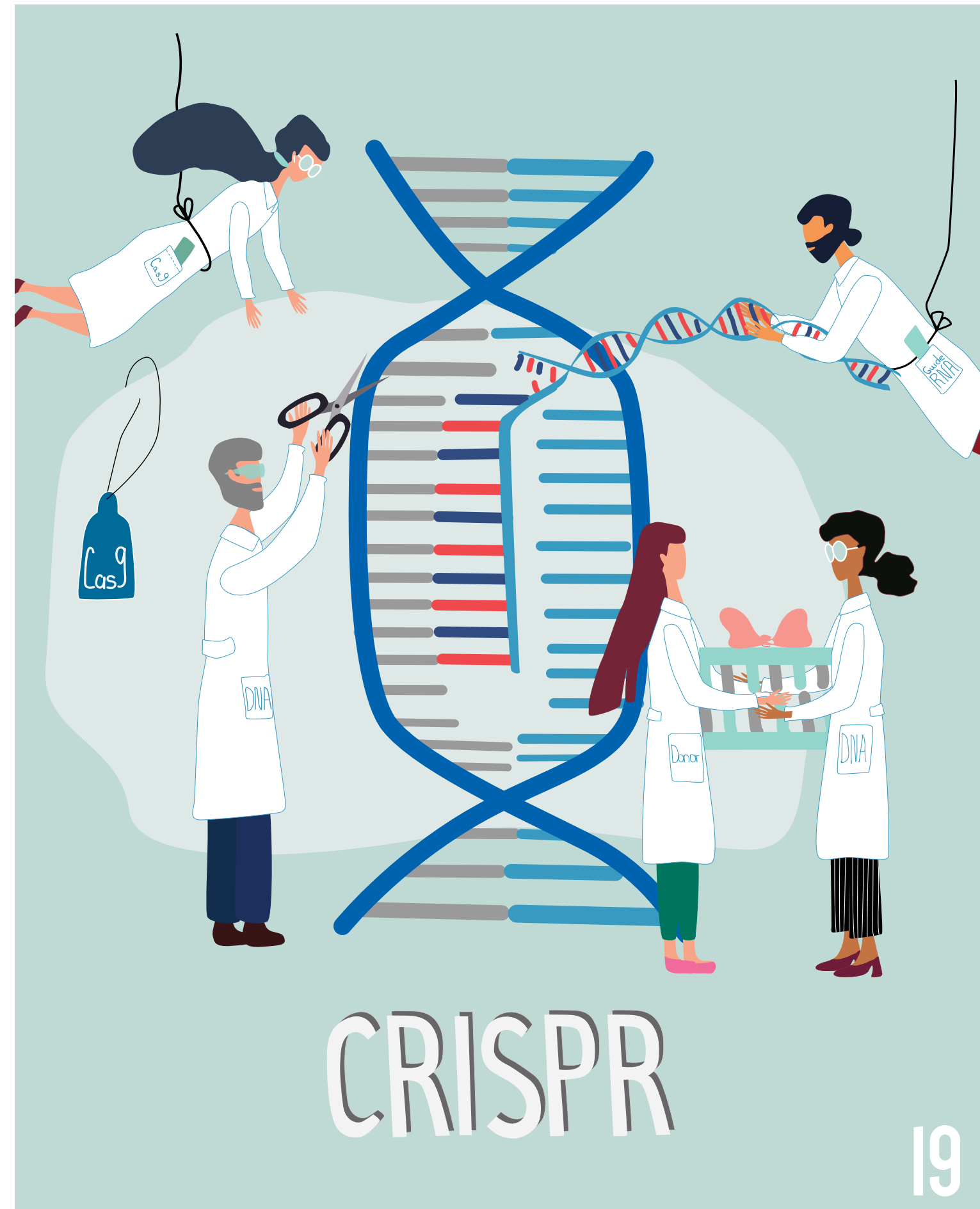
sclerose (ALS)<sup>34</sup>, de ziekte van Alzheimer<sup>35</sup>, GM1-gangliosidose (een biochemische stapelingsziekte die bij kinderen fataal kan zijn)<sup>36</sup> en erfelijke doofheid<sup>37</sup> te bestuderen.

## 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 bewerken<sup>10</sup>, 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.<sup>13</sup> Ondertussen claimen nog meer onderzoekers dat ze de échte uitvinders zijn: onder meer een Litouws team onder leiding van Virginijus Siksnys (Universiteit van Vilnius, Litouwen) 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 patentendispuut 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, kunnen 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.*



### 3 Therapeutische toepassingen van CRISPR-Cas

CRISPR-Cas brengt het genezen van erfelijke ziekten een stap dichterbij. De technologie heeft immers het potentieel om defecte genen in de cellen van patiënten te herstellen. Maar CRISPR-Cas heeft nog veel meer potentiële therapeutische toepassingen. Zo zijn er experimenten aan de gang om genoombewerking in te zetten bij de behandeling van kanker. Voorts is genoombewerking al gebruikt om afweercellen resistent te maken tegen hiv.<sup>38 39</sup>

Artsen zijn inmiddels gestart met klinische studies om therapieën op basis van genoombewerking in de praktijk te brengen. De eerste studies focusten zich op de bestrijding van verschillende vormen van kanker, erfelijke aandoeningen en infectieziekten. Het merendeel hiervan wordt geleid door Chinese onderzoekers. Er staan echter ook diverse Amerikaanse en Europese klinische studies op stapel.

## Erfelijke aandoeningen

### Een spelfout in je DNA

Het menselijk genoom is 3,2 miljard basenparen groot. Kleine foutjes in de DNA-code kunnen in bepaalde gevallen leiden tot erfelijke aandoeningen die van de ene generatie naar de volgende worden doorgegeven. Er zijn meer dan 5.000 van die erfelijke ziekten gekend. Eén op de 25 kinderen wordt geboren met zo'n aandoening. Gendefecten kunnen echter ook ontstaan tijdens de ontwikkeling van de foetus of na de geboorte.

Wetenschappers zijn al jaren op zoek naar DNA-foutjes die aan de basis liggen van genetische ziektes. Die zoektocht is in een stroomversnelling gekomen dankzij het humaan genoomproject. DNA-fouten opsporen is één ding, ze herstellen is nog iets heel anders. Mogelijk zorgt CRISPR-Cas voor een nieuwe stroomversnelling.

In theorie kan je met genoombewerking het foute stukje DNA in een patiënt vervangen door een correct gespeld stukje. In de proefbuis kon men snel aantonen dat de CRISPR-Cas-technologie ziekte-veroorzakende mutaties in verschillende weefsels kan elimineren. Maar de stap om

fouten te repareren in levende organismen is een immens grote stap. Al doen recente studies de hoop oplaaien.

Zo slaagden onderzoekers er in 2014 voor de eerste keer in een genetische leverafwijking in volwassen muizen te genezen met behulp van CRISPR-Cas.<sup>40</sup> Het ging om een muizenmodel voor de menselijke erfelijke stofwisselingsziekte tyrosinemie, veroorzaakt door een mutatie in het FAH-gen. Patiënten met deze ziekte kunnen het aminozuur tyrosine onvoldoende afbreken waardoor het zich ophoopt tot toxische concentraties. Het gevolg zijn lever- en nierstoornissen en vaak ook verstandelijke beperking.

De onderzoekers slaagden erin de levers van volwassen muizen rechtstreeks te behandelen met een corrigerend CRISPR-Cas-complex. Blijkbaar werd het gen in voldoende levercellen gecorrigeerd zodat de muizen niet langer leden aan tyrosinemie.

## GENTHERAPIE, 'OUDE STIJL' – EEN LANGE HISTORIE MET VALLEN EN OPSTAAN

*Reeds in 1972 pleitten de Amerikaanse artsen Theodore Friedmann en Richard Roblin voor onderzoek naar gentherapie als middel om mensen te helpen of zelfs te genezen die getroffen werden door een erfelijke aandoening. De theorie achter gentherapie is eenvoudig: het defecte gen wordt vervangen door een nieuw, goed werkend gen. Meer dan 45 jaar onderzoek toont echter aan dat dit eenvoudig idee bijzonder uitdagend en technisch zeer complex is, indien men het op een veilige en efficiënte manier wenst uit te voeren op mensen.*

*De eerste grote uitdaging is: hoe breng je het corrigerende gen binnen in de juiste lichaamscellen van de patiënt? Er is een probleem van selectiviteit en van doeltreffendheid. Om een defect in de lever te corrigeren, heeft het geen zin dat het gen ook in hersencellen terechtkomt. Integendeel zelfs, het is mogelijk dat het gen in de hersenen ongewenste bijwerkingen teweegbrengt. Het corrigerende gen moet selectief worden opgenomen en/of geactiveerd worden in het weefsel of het celtipe dat het echte doelwit is.*

Verder is het nodig dat voldoende levercellen het corrigerende gen opnemen, anders is er te weinig effect. Men kan er ook voor zorgen dat de cellen die het gen hebben opgenomen, een groeivoordeel hebben. Zo zullen ze niet-gecorrigeerde cellen na verloop van tijd 'overgroeien'. Maar dat kan een tweesnijdend zwaard zijn, want niemand wil er oncontroleerbare kankercellen van maken.

Op beide vlakken werd de voorbije decennia flink vooruitgang geboekt: uit klinische proeven met onschadelijk gemaakte virussen (zoals adeno-associated virussen (AAV) en lentivirussen) als 'verpakking' van het corrigerende DNA, blijkt dat voor verschillende aandoeningen het binnenbrengen van genen in de juiste targetweefsels veilig en effectief kan plaatsvinden.<sup>42</sup>

De volgende uitdaging is het stabiel inbouwen van therapeutische genen in het genoom zodat het behouden blijft in delende cellen. Een nieuw gen dat terecht komt op een willekeurige plaats in het genoom van een cel kan onvoorspelbare effecten hebben op genexpressie en onbedoelde effecten op buurcellen.

In de loop van de voorbije decennia werden vele honderden klinische studies bij patiënten uitgevoerd met bovenstaande klassieke vorm van gentherapie. Lang niet allemaal waren ze succesvol, al haalden enkele wel de eindmeet.

- Zo keurde het Europese geneesmiddelenagentschap (EMA) in 2016 het gebruik van Strimvelis goed, een vorm van gentherapie voor de behandeling van ADA-SCID, een ernstige stoornis van de afweer veroorzaakt door een defect in het gen voor adenosine deaminase.<sup>43</sup>
- In 2018 werd Luxturna goedgekeurd voor de behandeling van erfelijke retinale dystrofie, veroorzaakt door mutaties in het RPE65-gen.<sup>44</sup> Deze zeldzame ziekte leidt tot gezichtsverlies en blindheid.
- Begin 2019 gaf EMA een gunstig advies voor Zynteglo, een vorm van gentherapie om volwassenen en adolescenten met  $\beta$ -thalassemie te behandelen, een zeldzame ziekte die ernstige bloedarmoede (anemie) veroorzaakt.<sup>45</sup>
- Daarnaast werden zeker een 20-tal vormen van gentherapie door de Amerikaanse en/of de Europese overheid erkend als beloftevol. Ze hebben een goede kans om in de toekomst goedgekeurd te worden als 'geneesmiddel'. Het gaat hier zowel om behandelingen tegen kanker en bloedaandoeningen als tegen neurologische, lever-, spier- en oogziekten.<sup>42</sup>

## Gentherapie, nieuwe stijl

Bij de klassieke vormen van gentherapie, zoals beschreven in kaderstuk 'Gentherapie, 'oude stijl' – een lange historie met vallen en opstaan', worden doorgaans corrigerende genen ingebracht om het defecte gen te 'supplementeren'. Via de nieuwe techniek van genoombewerking met CRISPR-Cas wordt het defecte gen ter plaatse hersteld, zonder aan andere DNA-sequenties te raken. Sommigen zien in deze manier van

genherstel dan ook een geheel nieuwe vorm van gentherapie. Noem het misschien 'gentherapie, nieuwe stijl'.

De eerste therapeutische experimenten op basis van genoombewerking focusten vooral op bloedaandoeningen en immuunziekten. Het gaat hier concreet om 'ex vivo' therapieën (zie kaderstuk 'ex vivo' en 'in vivo' therapieën) waarbij bloedvormende

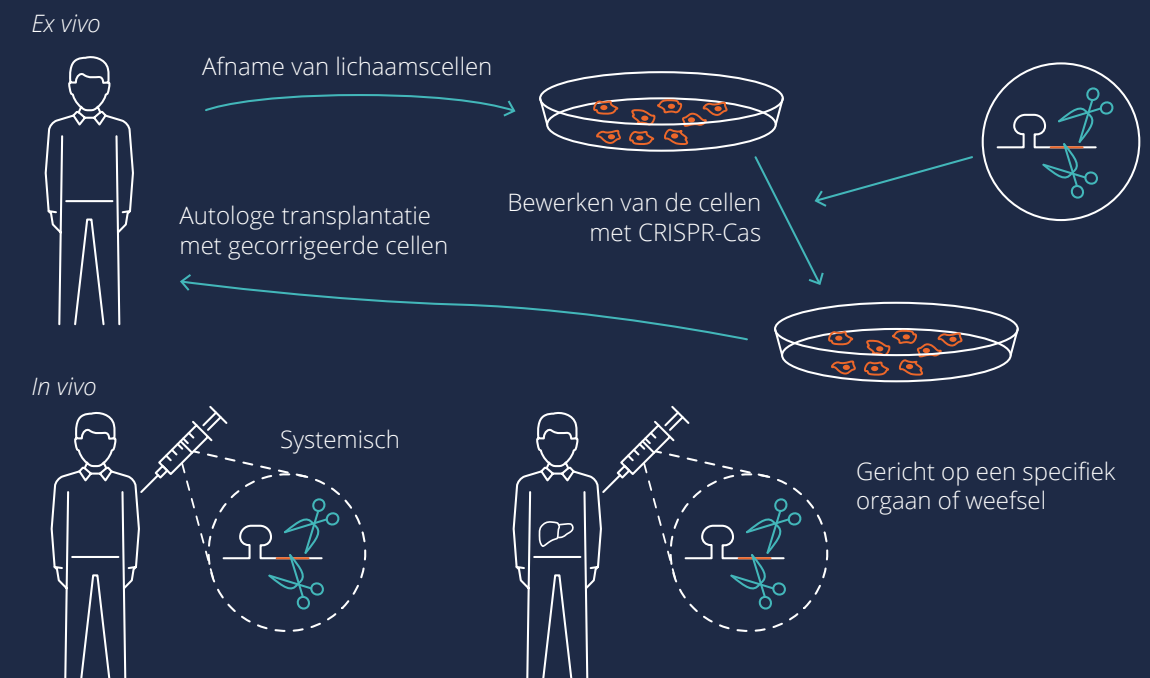
stamcellen uit het lichaam van de patiënt worden gehaald en in het laboratorium verder worden bewerkt. De stamcellen die zich ontwikkelen tot rode en witte bloedcellen kunnen immers relatief gemakkelijk uit het beenmerg worden geïsoleerd. Gendefecten in deze cellen kunnen dan in het

laboratorium hersteld worden. De gewijzigde cellen kunnen diverse selectie en controle-stappen ondergaan alvorens ze terug geïnjecteerd worden in de patiënt. Een kort overzicht van de stand van zaken van dit onderzoek, met thalassemie als voorbeeld, wordt hieronder weergegeven.

## EX VIVO OF IN VIVO GENOOMCORRECTIE

We onderscheiden verschillende methoden om correcties in het menselijk genoom aan te brengen:

- Ex vivo - men haalt zieke cellen uit het lichaam van de patiënt, herstelt de defecte genen in het laboratorium, en vervolgens worden deze gecorrigeerde cellen terug geïnjecteerd in de patiënt. Aangezien de behandeling buiten het lichaam gebeurt, noemt men deze manier van werken 'ex vivo'. Het voordeel van het wijzigen van cellen buiten het lichaam is dat ze kunnen worden gecontroleerd voordat ze terug worden ingebracht. Dit biedt een extra veiligheidsvoordeel. Soms wordt hier ook gesproken over celtherapie, omdat men een ziekte tracht te genezen via de toediening van hele cellen. Extra ten opzichte van 'gewone' celtherapie is wel dat hier een genoomcorrectie werd doorgevoerd, terwijl dit lang niet bij alle vormen van celtherapie het geval is.
- In vivo, systemisch of doelgericht - anderzijds kan men trachten het gen rechtstreeks in het lichaam van de patiënt te herstellen door het CRISPR-Cas-systeem (of andere systemen voor het uitvoeren van genoombewerkingen) zelf te injecteren in het lichaam van de patiënt. Men spreekt hier van 'in vivo' genoombewerking. Als alle lichaamscellen van de patiënt aan de genoomcorrectie worden onderworpen, spreekt men van een systemische correctie. Als de genoomcorrectie wordt gericht op een bepaald orgaan, weefsel of celtipe dan gaat het om een doelgerichte of 'targeted' methode.



Figuur 4. Genoomcorrectie in de proefbuis (ex vivo) of rechtstreeks in het lichaam (in vivo).

## β-thalassemie

β-thalassemie is een erfelijke vorm van bloedarmoede. Wereldwijd is het een van de meest voorkomende genetische ziektes. Door een mutatie in het gen voor β-globine wordt onvoldoende en/of abnormaal hemoglobine aangemaakt. Dit eiwit zorgt voor het transport van zuurstof in het bloed. Mensen die leiden aan β-thalassemie hebben levenslang bloedtransfusies nodig.

Wetenschappers van de Universiteit van California (VS) konden het gendefect verantwoordelijk voor de ziekte corrigeren in menselijke cellen. Onderzoekers namen hiervoor stamcellen uit het lichaam van een β-thalassemie-patiënt en gebruikten CRISPR-Cas om het β-globine-gen te herstellen. Alhoewel in dit onderzoek de bewerkte cellen nog niet werden terug geplaatst bij de patiënt, betekende het toch een belangrijke stap richting therapie van genetische ziektes op basis van genoombewerking.

Inmiddels wordt in ziekenhuizen in Canada, Duitsland en het Verenigd Koninkrijk een klinische studie opgestart waarbij het defecte β-globine-gen in bloedvormende stamcellen van patiënten met β-thalassemie wordt gecorrigeerd met behulp van CRISPR-Cas. De stamcellen worden eerst uit het beenmerg van de patiënten afgezonderd, vervolgens wordt in het lab het defecte gen gecorrigeerd, waarna de cellen worden teruggeplaatst. De resultaten van de studie worden verwacht tegen midden 2022.<sup>47</sup>

## Sikkelcelanemie

Sikkelcelanemie is net als β-thalassemie een erfelijke vorm van anemie die echter wordt veroorzaakt door een andere mutatie in het gen voor β-globine. Specifiek aan sikkelcelanemie is dat deze patiënten onder normale omstandigheden in hun

rode bloedcellen wel een hemoglobine-eiwit produceren dat in staat is om zuurstof te binden en te transporteren, maar bij een lage zuurstofdruk zal hun hemoglobine samenklonteren. Als gevolg van deze afwijking krijgen de rode bloedcellen een sikkelachtige vorm, vandaar de naam sikkelcelanemie. De rode bloedcellen verliezen dan hun soepelheid en worden sneller afgebroken. Bovendien riskeren ze om opeen te hopen en spontaan te blijven steken in kleine bloedvaten. Hierdoor ontstaan doorbloedingsstoornissen, lokale zuurstoftekorten en uiteindelijk kunnen weefsels en organen afsterven. Sikkelcelanemie treft wereldwijd ongeveer 3,2 miljoen mensen en leidde in 2013 tot 176.000 doden.

Amerikaanse onderzoekers slaagden er in 2016 in om met behulp van CRISPR-Cas het foute gen voor β-globine te corrigeren in bloedvormende stamcellen van patiënten met sikkelcelanemie. Ze brachten deze gecorrigeerde cellen ook in muizen in en zagen dat de cellen na 16 weken nog steeds 'gezond' hemoglobine produceerden.<sup>48</sup> Op dit ogenblik hebben drie Amerikaanse ziekenhuizen een gezamenlijke klinische studie in de steigers staan om deze technologie te testen bij 45 patiënten met sikkelcelanemie. Ook deze resultaten worden mid-2022 verwacht.<sup>49</sup>

Een Japans-Amerikaanse onderzoeksgroep volgt een heel andere strategie. In plaats van het gemuteerde gen voor β-globine te corrigeren, proberen zij het foetaal γ-globine-gen opnieuw te activeren. De rationale achter deze benadering is de volgende: in de rode bloedcellen van kinderen en volwassenen bestaat hemoglobine in feite uit een complex van vier eiwitten (twee ketens α-globine en twee ketens β-globine). Bij foetussen wordt hemoglobine echter gevormd door twee ketens α-globine en twee ketens γ-globine. Na de

geboorte wordt de expressie van het γ-globine op een steeds lager pitje gezet en van het β-globine stelselmatig opgevoerd. De Japans-Amerikaanse groep is er nu in geslaagd om in bloedvormende stamcellen het γ-globine-gen zodanig te wijzigen dat het niet langer wordt uitgeschakeld en de γ-globineketens de sikkelcel β-globine zullen vervangen bij kinderen en volwassenen.<sup>50</sup> Voorlopig gaat het nog om een experiment in de proefbuis. Vooraleer klinische proeven met mensen te starten, moet het proces verder verfijnd worden en uitgebreid worden getest bij proefdieren.

## Ziekte van Duchenne

De ziekte van Duchenne is een ernstige erfelijke aandoening van de spieren veroorzaakt door mutaties in het dystrofine-gen. De ziekte verloopt progressief en tast steeds meer spierweefsel aan, zowel skelet- als hart- en ademhalingspijnen. De

leeftijd waarop patiënten met Duchenne in een rolstoel terechtkomen ligt gemiddeld rond het tiende levensjaar. Op verdere leeftijd worden de ademhalingspijnen en de hartspier aangetast zodat ze vaak niet meer zonder ondersteuning kunnen ademen. Omdat het dystrofine-gen gelegen is op chromosoom X treft de ziekte vooral jongens (1 op 5 000). Meisjes kunnen drager zijn van de ziekte.

Begin 2016 maakten drie onafhankelijke onderzoeksteams bekend dat ze het dystrofine-gen hadden hersteld in spierweefsel van muizen met spierdystrofie via *in vivo* gencorrectie.<sup>51 52 53</sup> Hier werden dus niet eerst stamcellen in het laboratorium behandeld, maar gebeurde de toediening van het CRISPR-Cas-complex rechtstreeks in het spierweefsel van de dieren (doelgerichte benadering) of via de bloedsomloop (systemische benadering).



dering). De onderzoekers konden een gedeeltelijk functioneel dystrofine tot expressie brengen in het spierweefsel van de dystrofe muizen. Dit leidde tot een merkelijke verbetering van de spierontwikkeling, maar wel niet tot een volledig herstel.

De patiëntenorganisatie *CureDuchenne* gelooft sterk in deze benadering en financierde eigenhandig een nieuw start-up bedrijf, *Exonics Therapeutics*, gebaseerd op de technologie toegepast bij muizen. Ze hopen de CRISPR-Cas-correctie zo snel mogelijk bij mensen te kunnen uittesten. Er wordt geschat dat als 15% van de spiercellen gecorrigeerd kan worden, dit voldoende zou zijn om ziektevoortgang te stoppen. Hoewel de eerste proeven op mensen nog op zich laten wachten, bereikte *Exonics Therapeutics*, in samenwerking met onderzoekers van de Universiteit van Texas, in 2018 een opmerkelijk resultaat bij tien honden met spierdystrofie. Na een systemische toediening van dystrofine-corrigerend CRISPR-Cas zagen de onderzoekers de expressie van functioneel dystrofine toenemen met 3% tot 90% van het normale niveau, afhankelijk van het spiertype. In hartspierweefsel werd in sommige dieren zelfs een herstel tot 92% gemeten.<sup>54</sup>

De ziekte van Huntington

Een ander voorbeeld van een ziekte waar een systemische toediening van genoomcorrigerend CRISPR-Cas tot een verbetering van de symptomen zou kunnen leiden, is de ziekte van Huntington. Deze ziekte ontstaat door een mutatie in het huntingtine-gen (HTT-gen). Deze mutatie leidt tot de productie van een afwijkende, toxische vorm van het huntingtine-eiwit. Hierdoor sterven hersencellen in het striatum af. Dit is één van de dieper gelegen zenuwkernen in de hersenen die in staat voor het versterken, afremmen en bijsturen van de motorische activiteit.

De eerste symptomen van de ziekte treden meestal tussen het dertigste en vijftigste levensjaar op en omvatten ongecontroleerde bewegingen, evenwichtsproblemen, stemmingswisselingen en achteruitgang van geheugen en organisatievermogen. De klassieke gentherapie-aanpak waarbij een goedwerkende kopie van een gen wordt binnengebracht, zou voor deze ziekte niet werken. Het aanwezige gemuteerde HTT-gen zal immers nog steeds toxisch eiwit blijven produceren. Het komt er dus op aan om via genoombewerking het gemuteerde gen uit te schakelen of het te herstellen in zijn niet-gemuteerde vorm. En dat liefst in zoveel mogelijk cellen van het striatum.

Met het CRISPR-Cas-systeem konden Chinese onderzoekers een stukje van het gemuteerde gen verwijderen in een muismodel voor de ziekte van Huntington. Hierdoor verminderen de toxische opeenhopingen van het afwijkende huntingtine-eiwit.<sup>55</sup> De studie onthulde voorts dat de hersencellen in het striatum niet alleen langer overleven maar zelfs gedeeltelijk herstellen wanneer de genetische oorzaak van de toxische eiwitten was verwijderd. Verder merkten de onderzoekers dat de motorische vermogens van de CRISPR-Cas-geïnjekteerde muizen sterk verbeterden in vergelijking met zieke controle-muizen. Dezelfde onderzoeksgroep publiceerde in 2018 vergelijkbare resultaten in een varkensmodel voor de ziekte van Huntington.<sup>56</sup>

Bovenstaande voorbeelden vormen slechts een greep uit het grotere aantal aandoeningen die wetenschappers en artsen ooit hopen te behandelen met genoombewerking. Een uitgebreidere lijst vindt u in bijgevoegde tabel.

Tabel 1. Potentieel van CRISPR-Cas in genoomcorrectietherapie <sup>40</sup>

| Aandoening                                | Doelwitgen                        | Modelsysteem waarop het reeds werd toegepast       |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| Duchenne spierziekte                      | Dystrofine                        | Ratten, resusapen, muizen, honden, spierstamcellen |
| Mucoviscidose                             | CFTR                              | Intestinale stamcellen                             |
| Erfelijke tyrosinemie                     | FAH                               | Muizen                                             |
| Cataract                                  | Crygc                             | Muizen                                             |
| Longkanker                                | KRAS, p53, LKB1                   | Muizen                                             |
| Resistentie bij kanker                    | XPO1                              | T-ALL cellen                                       |
| Ernstige verstandelijke beperking         | DISC1                             | iPS cellen                                         |
| Autisme                                   | CHD8                              | iPS cellen                                         |
| Ziekte van Huntington                     | HTT                               | Varkens, muizen, iPS-cellen                        |
| Microdeletie en microduplicatie syndromen | 16p11.2 en 15q13.3 kopievarianten | iPS-cellen                                         |
| Epilepsie                                 | SCN1A                             | iPS-cellen                                         |
| Fragiel X-syndroom                        | FMR1                              | iPS-cellen                                         |
| β-Thalassemie/Sikkelcelanemie             | β-globine                         | Muizen, iPS-cellen                                 |
| Ureumcyclusdeficiëntie                    | OTC                               | Muizen                                             |
| Walker-Walburgsyndroom                    | LSPD                              | Muizen                                             |
| Hepatitis B (HBV)                         | HBV cccDNA                        | Muizen, cellijnen                                  |
| HIV-1                                     | HIV-1 LTR                         | Muizen, cellijnen                                  |
| Epstein-Barrvirus (EBV)                   | Laten EBV                         | Cellijnen                                          |
| Humaan papillomavirus (HPV)               | HPV oncogenen E6 en E7            | Muizen, cellijnen                                  |

Kanker

Ook voor de behandeling van kanker lijkt CRISPR-Cas beloftevol. Kanker is niet één, maar wel honderd ziekten. Wel gaat het altijd om een ongecontroleerde aangroei van abnormale cellen. Deze cellen negeren signalen en mechanismen die normaal hun groei afremmen. De oorzaak ligt bij veranderingen in het DNA waardoor de regulatie van de celgroei en celdeling ontregeld raakt. Door de opeenstapeling van DNA-veranderingen vormt een ‘normale’ lichaamscel zich geleidelijk om tot een kankercel (zie ook VIB Fact Series ‘Kanker’).

Erfelijke aandoeningen en kanker hebben dus als gemeenschappelijk kenmerk dat ze veroorzaakt worden door mutaties in het DNA. Logisch dan ook dat genoomcorrectie een mogelijke manier

is om kankerende cellen opnieuw tot de orde te roepen. Al is dat vlugger gezegd dan gedaan.

De groeigenen van de tumor als doelwit

Zoals eerder aangehaald vertonen kankercellen een afwijkende celcyclus. Deze cyclus stuurt de groei en deling van een cel, terwijl we van kankercellen weten dat ze ongeremd en ongecontroleerd delen. Recent slaagden Amerikaanse onderzoekers erin om de op hol geslagen celcyclus in kankercellen te doorbreken door met CRISPR-Cas een gen, Tudor-SN, uit te schakelen.<sup>57</sup> Tudor-SN beïnvloedt de celcyclus door het niveau aan bepaalde microRNA-moleculen te controleren. MicroRNA's zijn

moleculen die de expressie van duizenden genen finetunen. Door Tudor-SN uit te schakelen, werd de groei van de tumorcellen – althans in de proefbuis – afgeremd.

Andere onderzoekers gebruikten CRISPR-Cas-technologie om een gen in kankercellen binnen te smokkelen dat het geneesmiddel ganciclovir omzet in een toxisch product waardoor de kankercellen afsterven. De behandeling leek ook goed aan te slaan in muismodellen met kanker.<sup>58</sup>

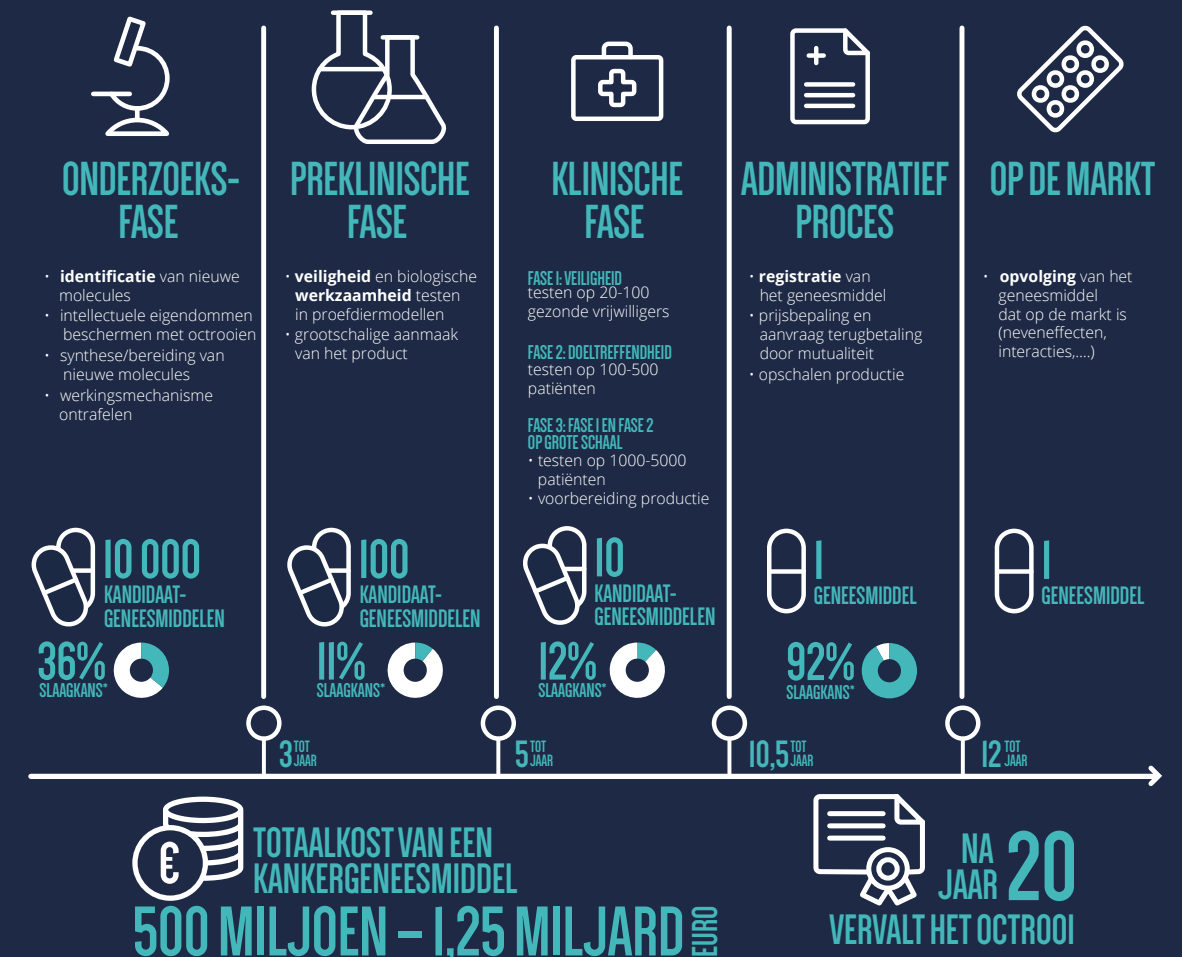
Zuid-Koreaanse onderzoekers waren dan weer succesvol in het uitschakelen van gemuteerd KRAS – een belangrijk oncogen – zodat de groei van de tumoren sterk werd afgeremd.<sup>59</sup>

Ondanks de vooruitgang in therapeutische benaderingen gebaseerd op de directe modificatie van het DNA van kankercellen, moeten we toch voorzichtig blijven en het therapeutische potentieel niet overschatten. Kankercellen zijn immers meesters in het omzeilen van behandelingen (zie VIB Fact Series ‘Kanker’). Ook tegen deze CRISPR-Cas-gebaseerde behandelingen zullen ze resistentie ontwikkelen, daar zijn kankerdeskundigen nu al van overtuigd.<sup>60</sup> Bovendien is nog veel extra werk en onderzoek nodig om deze potentiële behandelingen naar de kliniek te brengen. Want wat werkt in celculturen, in een muis of een rat, werkt daarom nog niet bij de mens. Vooraleer een nieuw geneesmiddel tot bij de patiënt geraakt, is er een tijdrovend, complex, intensief en duur proces aan voorafgegaan. (Zie ‘De ontwikkeling van een geneesmiddel’).

## DE ONTWIKKELING VAN EEN GENEESMIDDEL

De weg die een molecule aflegt om het tot een erkend geneesmiddel te brengen, is lang en complex. Voor het op de markt komt, wordt elk kandidaat-geneesmiddel uitgebreid getest op veiligheid en doeltreffendheid – doet het geneesmiddel wat we ervan verwachten en op een veilige manier? Deze evaluatie vindt eerst plaats in het laboratorium en op proefdieren (preklinische fase), en vervolgens in klinische studies, die we doorgaans onderverdelen in drie tot vier fasen:

- In een fase I-klinische studie wordt de veiligheid en werking van het geneesmiddel geanalyseerd op een klein aantal vrijwilligers. Er wordt gekeken of er ernstige nevenwerkingen optreden.
- Indien alles veilig blijkt, wordt in fase II-klinische studies op een kleine groep patiënten getest of het kandidaat-geneesmiddel effect heeft in het behandelen van de ziekte (vb. groeit de tumor minder snel, is er minder kans op uitzaaiingen, overleeft de patiënt langer, verbetert zijn levenskwaliteit).
- Indien fase-II hoopvolle resultaten oplevert, wordt een fase III-klinische studie uitgevoerd waarbij in een grote groep patiënten de veiligheid en de efficiëntie van het geneesmiddel verder wordt onderzocht. Enkel wanneer deze resultaten positief zijn, zal een kandidaat-geneesmiddel door de bevoegde overheidsinstanties worden toegelaten op de markt.
- In fase-IV, wanneer het geneesmiddel op de markt is, wordt nog een grotere groep patiënten opgevolgd om eventuele onontdekte bijwerkingen op lange termijn op te sporen.



\* slaagkans om naar de volgende fase te gaan

De ontwikkeling van een geneesmiddel in Europa duurt gemiddeld 12,5 jaar en kost om en bij de 500 miljoen tot 1,25 miljard euro. Door die ontwikkelingskostprijs en de hoge risicograad dat een geneesmiddel in een bepaalde fase toch niet brengt wat ervan verwacht wordt, is het voor overheidslaboratoria en -onderzoekscentra nagenoeg onmogelijk om dit hele traject eigenhandig af te leggen. Daarom kan een geneesmiddel bijna nooit worden ontwikkeld zonder de inbreng van het kapitaal én de specifieke expertise van de biotech- en de farmaceutische industrie, ook niet voor kankergeneesmiddelen.

## CRISPR-Cas in immuuntherapie tegen kanker

Een nieuwe telg onder de innovatieve kankerbehandelingen is immuuntherapie. Er zijn verschillende vormen van immuuntherapie, maar wat ze allen gemeenschappelijk hebben is dat ze de eigen afweercellen van de patiënt willen versterken en stimuleren om de kankerende cellen uit de weg te ruimen (zie VIB Fact Series 'Kanker').

### CAR-T-cellen

Een specifieke vorm van immuuntherapie, die recent zowel in Europa als de VS door de bevoegde geneesmiddelenautoriteiten werd goedgekeurd, is gebaseerd op de 'CAR-T-cel'-technologie. 'CAR' staat voor 'chimeer antigenreceptor' en 'T-cel' voor een klasse van witte bloedcellen die ook betrokken is bij het opruimen van kankercellen. De therapie bestaat eruit om de T-cellen bij de patiënt af te nemen en er vervolgens in het lab een nieuw gen in te planten zodat ze de kankercellen beter herkennen. Het ingeplante gen codeert voor een kunstmatig geconstrueerd receptoreiwit (vandaar 'chimeer antigenreceptor') dat specifieke eiwitten op de buitenzijde van kankercellen herkent. Eens de genetisch gewijzigde T-cellen opnieuw worden ingebracht in de patiënt zullen ze, aangestuurd door hun nieuw-ontworpen receptor, zich binden aan kankercellen en een mechanisme op gang brengen om deze te doden. Bovendien zullen deze T-cellen zich in het lichaam van de patiënt vermenigvuldigen zodat ze ook op lange termijn een anti-kankereffect teweeg brengen.<sup>61</sup>

Op dit ogenblik worden wereldwijd honderden bijkomende klinische studies uitgevoerd met CAR-T-cellen. De eerste goedgekeurde therapieën

waren vooral gericht tegen specifieke vormen van bloedkankers (leukemie) en lymfomen. Nieuwe studies focussen ook op vaste tumoren.

Een grote beperking voor deze therapievorm is het verplicht autologe gebruik van T-cellen: elke patiënt dient behandeld te worden met eigen T-cellen om het gevaar op afstoting te vermijden. Precies omdat telkens opnieuw lichaamseigen cellen van elke patiënt genetisch moeten gewijzigd worden, duurt de procedure lang, is ze complex en bovendien ontzettend duur.<sup>62</sup>

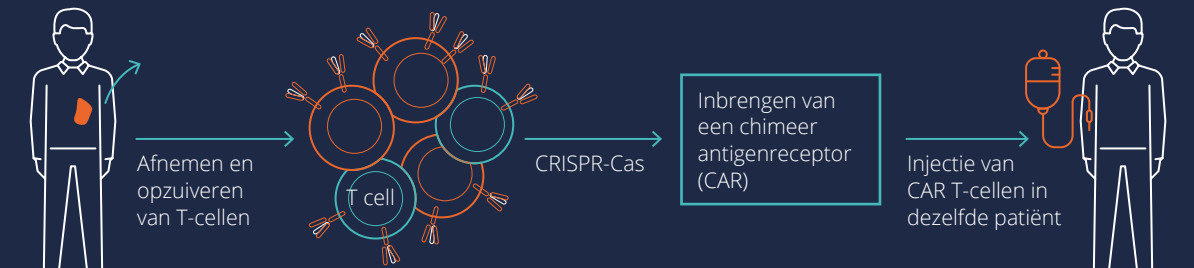
### Waar kan CRISPR-Cas het verschil maken in CAR-T-immuuntherapie?

Tot nu toe worden de CAR-genen in de T-cellen ingebracht via virale vectorsystemen – de gentherapie 'oude stijl', bij wijze van spreken. Zonder twijfel biedt CRISPR-Cas mogelijkheden als alternatieve strategie voor het inbouwen van CAR-genen.<sup>60</sup>

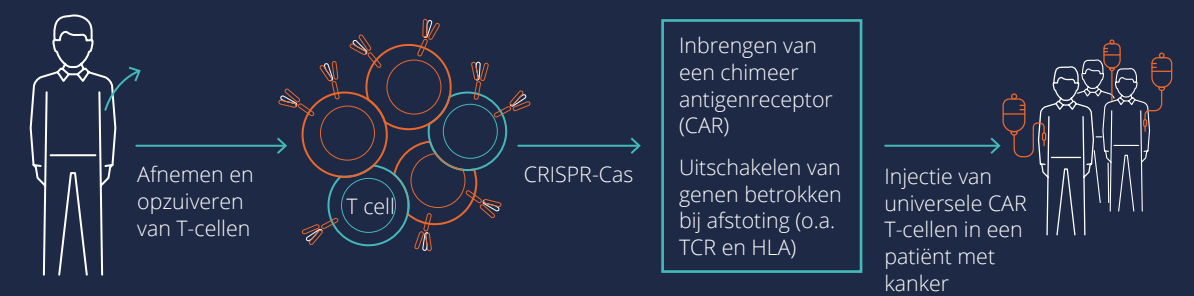
Maar meer nog wordt CRISPR-Cas gezien als een instrument om universele CAR T-cellen te produceren die bij patiënten geen afstoting veroorzaken. Dus niet langer CAR T-cellen op maat van elke patiënt, maar cellen die men bij wijze van spreken 'uit een rek van de ziekenhuisapotheek kan plukken' (zie ook figuur 5 'Mogelijke rol van CRISPR-Cas bij het produceren van autologe en universele CAR T-cellen' op pagina 31).

## MOGELIJKE ROL VAN CRISPR-CAS BIJ HET PRODUCEREN VAN AUTOLOGE EN UNIVERSELE CAR T-CELLEN

### A. Patiënt met kanker



### B. Donor zonder kanker



Figuur 5. Mogelijke rol van CRISPR-Cas bij het produceren van autologe en universele CAR T-cellen

A. Via een bloedafname worden T-cellen bij de patiënt met kanker afgezonderd en opgezuiverd. Met behulp van CRISPR-Cas wordt een chimeer antigenreceptor (CAR) ingebracht. Deze receptor verhoogt de anti-kankeractiviteit van de T-cellen. De CAR T-cellen worden bij dezelfde patiënt geïnjecteerd. Dit is sterk gelijkend op de bestaande CAR-T-therapie, alleen zou de inbreng van een CAR-gen met behulp van CRISPR-Cas gemakkelijker zijn.

B. Via een bloedafname worden T-cellen bij een kankervrije donor afgezonderd en opgezuiverd. Met behulp van CRISPR-Cas wordt een chimeer antigenreceptor (CAR) ingebracht. Eveneens via CRISPR-Cas worden 'afstotingsgenen' uitgeschakeld. Het gaat hier onder meer om genen die coderen voor de T-celreceptor (TCR) en het humaan leukocyten-antigensysteem (HLA). De universele CAR T-cellen kunnen vervolgens bij meerdere patiënten met kanker worden geïnjecteerd. Figuur gebaseerd op referentie <sup>60</sup>.

T-cellen zodanig behandelen dat ze niet langer afstotingsreacties oproepen, kan door genen uit te schakelen die verantwoordelijk zijn voor die afstotingsreacties. Een procedure die zeker niet onmogelijk is, want recent werden in een Londens ziekenhuis twee meisjes met leukemie behandeld met CAR T-cellen van een donor (zie 'Kinderen gered van leukemie door designercellen').<sup>63</sup> De meisjes maakten zelf nog te weinig gezonde T-cellen aan om die te gebruiken als basis van de CAR T-therapie. Daarom moest overgestapt worden op een donor. Hierbij werd de TALEN-technologie gebruikt, een methode voor genoombewerking die verwant is aan CRISPR-Cas.

### PD1-immuuntherapie tegen kanker

Niet alleen CAR T-cellen houden grote beloften in als immuuntherapie tegen kanker. Er zijn ook nog andere gelijkaardige therapieën in ontwikkeling (zie VIB Fact Series 'Kanker'). Ook hier kan CRISPR-Cas-genoombewerking een bijdrage leveren. Zo hebben Chinese onderzoekers CRISPR-Cas gebruikt om het PD1-eiwit onklaar te maken in T-cellen. PD1 is een receptoreiwit dat de reactiviteit van T-cellen tegen kankercellen afremt. T-cellen zonder dit eiwit reageren furieuzer op kankerende cellen. Chinese artsen testen nu deze vorm van immuuntherapie in klinische studies uit bij patiënten met long-, blaas-, prostaat- en nierkanker.<sup>64</sup> De eerste resultaten worden verwacht in de loop van 2020.

## Infectieziekten

Een derde domein in de geneeskunde waarin genoombewerking in de toekomst een belangrijke rol kan spelen zijn infectieziekten. Bijvoorbeeld om hiv en andere virale aandoeningen een halt toe te roepen of om het nijpende gebrek aan nieuwe antibiotica te helpen oplossen.

### Hiv en aids

Hiv, de veroorzaker van aids, infecteert en doodt afweercellen, meer specifiek de CD4<sup>+</sup> T-cellen. Maar hiv is eerder een sluipende dan een acute doder van T-cellen. Het virus bouwt immers zijn eigen genetisch materiaal in het genoom van zijn gastheer in. Het kan zich daar jaren schuilhouden onder de vorm van een 'provirus', om op onverwachte momenten opnieuw actief te worden en zichzelf te laten vertalen in nieuwe virusdeeltjes. Die zullen dan opnieuw andere afweercellen bedreigen. Antivirale hiv-therapie, die vandaag al bijzonder succesvol is, richt zich tegen de replicatie van virusdeeltjes in de gastheercel, maar slaagt er niet in om de 'slappende' provirussen aan te pakken.

Biedt CRISPR-Cas-genoombewerking een oplossing om hiv en aids, wereldwijd toch nog steeds een groot medisch probleem, definitief af te stoppen? Mogelijk wel, en dat op verschillende vlakken.

Onlangs slaagde een team van Chinese en Amerikaanse onderzoekers erin om met behulp van CRISPR-Cas hiv-provirussen onschadelijk te maken in muizen.<sup>65</sup> Het team liet als eerste zien dat hiv helemaal uit het lichaam van zoogdieren kan verwijderd worden. Na slechts één behandeling, bleek de techniek succesvol om alle sporen van de hiv-infectie uit te wissen. De volgende fase is om de studie te herhalen bij apen, een geschikter diermodel voor hiv-infecties en aids dan muizen.

CRISPR-Cas zou echter ook ingezet kunnen worden om binnenkomende virussen onmiddellijk te verknippen, zodat ze zichzelf niet kunnen vermenigvuldigen of zich niet kunnen nestelen als provirussen in het genoom van de gastheer. Dit werd met succes getest op celculturen, al slaagden de virussen er wel in om na een tijdje resistentie op te bouwen.<sup>66 67</sup>

Een derde strategie is om hiv de toegang tot de CD4<sup>+</sup> T-cellen te ontfangen. De virussen maken immers gebruik van receptoren op de buitenzijde van T-cellen om deze te infecteren. De belangrijkste receptoren en co-receptoren zijn CD4, CCR5 en CXCR4.

CD4 uitschakelen in menselijke T-cellen om zo de opname van hiv te voorkomen, zou een slecht idee zijn omdat CD4 een kritisch eiwit is om de afweer goed te laten functioneren. CCR5 en CXCR4 zouden echter wel goede kandidaten zijn. Er zijn immers mensen die van nature geen CCR5 aanmaken en die als gevolg daarvan immuun zijn voor hiv. De voorbije jaren toonden vooral Chinese onderzoekers in celculturen aan dat zowel het onklaar maken van CCR5 als van CXCR4 leidde tot langdurige resistentie tegen hiv-infectie.<sup>68 69</sup>

Ook de eerste klinische studies zijn onderweg: in het militair hospitaal van Peking (China) worden hiv-patiënten behandeld met hun eigen bloedstamcellen waarin het CCR5-gen werd uitgeschakeld.<sup>70</sup> Bovendien werd recent in China een tweeling geboren waarbij met opzet de CCR5-genen waren gewijzigd om te voorkomen dat de kinderen besmet zou worden door hun vader die hiv-positief was. Maar dat is een ander verhaal, waarop we in het volgende hoofdstuk in detail terugkomen.

### Herpesvirus

Het herpesvirus blijft eveneens levenslang latent in het lichaam omdat het virus zijn genoom inbouwt in dat van de gastheer. Herpesvirussen veroorzaken onder meer koortsblazen op de lippen, waterpokken en gordelroos. Tot hier toe bestaat er nog geen methode om het virus volledig te elimineren uit zijn gastheer. Het latent aanwezige virus vermenigvuldigt zich niet en blijft

Hiv-virussen (blauwe bolletjes) infecteren een witte bloedcel

onopgemerkt voor het afweersysteem. Tot het nu en dan opflakkerd.

De huidige behandelingen onderdrukken de symptomen, maar kunnen de infectie niet verwijderen. In 2016 konden Nederlandse onderzoekers de vermenigvuldiging van het virus indammen in zoogdiercellen met behulp van CRISPR-Cas.<sup>71</sup> In bijkomende experimenten werd het herpesvirus zelfs volledig verwijderd uit het genoom van de cellen.<sup>72</sup>

### Humaan papillomavirus (HPV)

Het humaan papillomavirus (HPV) veroorzaakt onder meer baarmoederhalskanker. Een normale besmetting verloopt via seksueel contact. Bij iemand die besmet is, is het moeilijk tot onmogelijk om het virus te verwijderen. Vandaar dat vrouwen best regelmatig een cervicovaginaal uitstrijkje laten nemen om te screenen op baarmoeder- of vaginale kanker. Sinds meer dan 10 jaar bestaan er ook vaccins tegen bepaalde HPV-stammen. Die vaccins worden in Vlaanderen (gratis) aangeboden aan alle meisjes in het eerste jaar van het secundair onderwijs, en vanaf het schooljaar 2019-2020 ook aan de jongens van dezelfde leeftijd.

In 2014 toonde een Chinese onderzoeksgroep aan dat ze cervicale kankercellen – die met HPV-waren geïnfecteerd – konden aanzetten tot cellulaire zelfdoding (apoptose) via een CRISPR-Cas geïnduceerde aanval op de virale HPV-genomen.<sup>73</sup> Ook in proefdiermodellen bleek hun methode effectief om de tumorgroei af te remmen.<sup>74</sup>

Recent werd aan de Universiteit van Guangdong (China) een klinische studie opgestart gebaseerd op een gelijkaardige CRISPR-Cas-genooibewerking. In de niet-invasieve behandeling krijgen 60 vrouwen die positief zijn voor de HPV16- en/of HPV18-

stammen een vaginale gel toegediend met daarin CRISPR-Cas tegen deze virussen.<sup>75</sup> Voorlopig zijn er nog geen resultaten over het klinisch onderzoek bekend en het primaire doel van deze studie is vooral om na te gaan of de behandeling veilig is.

### Potentieel levensreddend antibioticum

CRISPR kan ook dienen als een nieuw soort antibioticum.<sup>76</sup> Hoewel CRISPR-Cas van nature door bacteriën wordt gebruikt om zich te beschermen tegen binnendringende virussen, kan het ook zodanig worden geherprogrammeerd dat het DNA van bacteriën verknipt. Bacteriën hebben zelf overigens geen geavanceerd DNA-herstelsysteem zoals wij. Daarom zijn ze zeer gevoelig aan DNA-schade en leidt een CRISPR-Cas-aanval tegen bacterieel DNA in de meeste gevallen tot de vernietiging van de bacterie. Dit gegeven heeft de deuren geopend voor talrijke onderzoeksprojecten die nagaan of CRISPR-Cas kan ingezet worden als zeer specifiek antibioticum.<sup>77 78 79 80</sup>

Evenzeer kan CRISPR-Cas in bacteriestammen de genen uitschakelen die verantwoordelijk zijn voor antibioticumresistentie. Op deze manier worden de bacteriën opnieuw gevoelig gemaakt aan bestaande antibiotica. Dit zou een oplossing kunnen zijn tegen de huidige toename van multi-resistentie in talrijke bacteriestammen.<sup>81</sup>

Maar CRISPR-Cas kan ook worden ingezet om de samenstelling van de menselijke darmflora te wijzigen ten voordele van onze gezondheid of het voorkomen van onder meer obesitas.<sup>82 83</sup>

Het zijn slechts enkele mogelijkheden uit het grotere scala aan opportuniteiten die genooibewerking met zich meebrengt in het domein van de bacteriële infectieziekten.

## STOP MALARIA!

*Kan CRISPR-Cas worden ingezet om malaria te bekampen? Het zou welkom zijn, want de strijd tegen malaria wordt al meer dan 100 jaar met wisselend succes gevoerd: de ziekte doodt nog elk jaar een half miljoen mensen, vooral kinderen. Malaria maakt jaarlijks 200 miljoen mensen ziek.*

*Deze infectieziekte wordt veroorzaakt door eencellige parasieten van het geslacht Plasmodium. De parasieten worden overgedragen op mens en dier door muggen van het geslacht Anopheles.*

### CRISPR-Cas als ‘gene driver’

*Meerdere onderzoeksgroepen proberen CRISPR-Cas in te zetten als een ‘gene drive’-systeem om het aantal malariamuggen in risicovolle malariagebieden te doen dalen. Gene drive is een krachtige genetische techniek om gewenste DNA-veranderingen in populaties van wilde dieren, insecten of planten te verspreiden. Het is de bedoeling dat de gewenste DNA-verandering, naarmate de generaties vorderen, in steeds meer individuen aanwezig zal zijn. Hoewel het concept al meer dan 80 jaar geleden werd beschreven, zijn pas nu de instrumenten beschikbaar om het principe ook in werkelijkheid toe te passen.*

*Wetenschappers van het Imperial College in London (VK) maken in hun experimenten gebruik van drie genen in de mug Anopheles gambiae die, indien gemuteerd, leiden tot infertiliteit bij vrouwtjesmuggen. Weliswaar slechts op voorwaarde dat de vrouwtjes twee gemuteerde kopieën van het gen hebben (muggen erven van elk gen twee exemplaren, één van elke ouder-mug). De fertiliteit van mannetjesmuggen wordt niet beïnvloed door de mutatiestatus van de drie genen.*

### Natuurlijke selectie omzeild

*Onder normale natuurlijke selectie zouden dergelijke mutaties weinig kans op overleven hebben, want vrouwtjesmuggen met twee mutaties kunnen geen nakomelingen hebben. Het gevolg is dat vooral niet-gemuteerde kopieën worden doorgegeven aan het nageslacht. Door echter een complex CRISPR-Cas-DNA-fragment in te bouwen in het genoom van mannetjesmuggen, wisten de Britse onderzoekers de natuurlijke selectie te omzeilen en ervoor te zorgen dat gemuteerde versies van de fertiliteitsgenen de bovenhand krijgen (zie ook figuur 6 op de volgende pagina).*

*Het geheim van hun gene drive techniek zit verscholen in de inhoud van het ingebouwde CRISPR-Cas-DNA-fragment. Die bevat:*

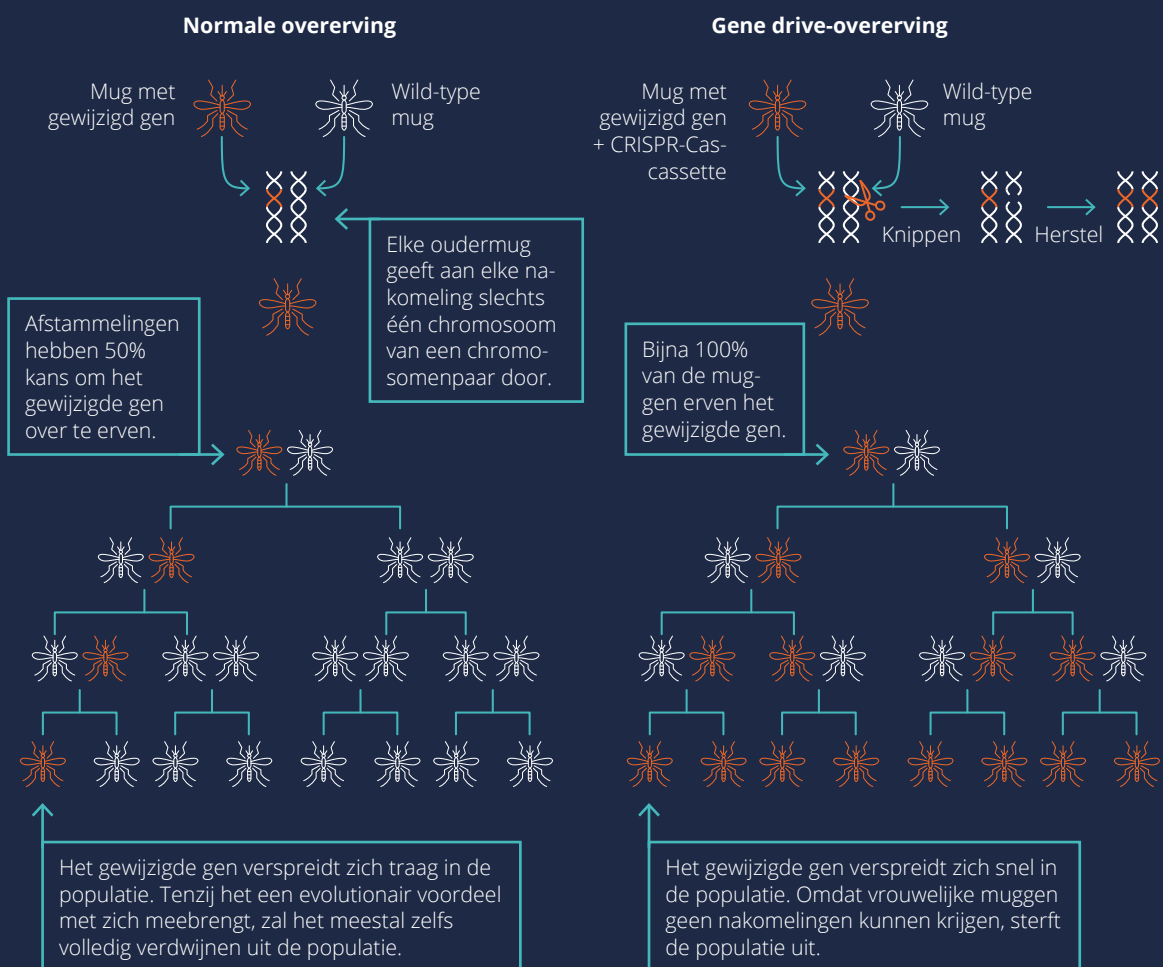
- een CRISPR-gidssequentie die bestaat uit een normaal stukje van het fertiliteitsgen
- de DNA-code voor een Cas-eiwit
- homologe, maar gemuteerde DNA-sequenties van het fertiliteitsgen

*Bij muggen met een CRISPR-Cas-fragment zal de CRISPR-gidssequentie op zoek gaan naar het normale fertiliteitsgen en ermee binden waarna het Cas-eiwit de DNA-streng zal knippen. Via homologe recombinatie (zie pag. 8) zal de gezonde kopie van het fertiliteitsgen worden vervangen door het gemuteerde fertiliteitsgen. Het gevolg is dat beide chromosomen nu een gemuteerd fertiliteitsgen dragen.*

Elke nakomeling van een dubbel gemuteerde mannetjesmug zal op één van beide chromosomen een fertiliteitsmutatie dragen naast een gezond gen van hun moeder (zie figuur 5). Maar ook bij hen zal het moleculaire genoombewerkingsmechanisme zich herhalen en zullen ze eindigen met twee gemuteerde fertiliteitsgenen. Vrouwelijke nakomelingen zullen zelf geen nakomelingen meer kunnen krijgen, de mannetjesmuggen wel.

Ondanks het evolutionaire nadeel zal de mutatie zich op deze manier toch razendsnel verspreiden en op termijn de muggenpopulatie uitroeien bij gebrek aan fertiele vrouwelijke muggen. Daarmee zou ook de overdracht van de malariaparasiet ingedijkt zijn. De onderstaande figuur maakt duidelijk hoe gene drive-overerving een gewenste mutatie veel sneller verspreidt over een populatie, zelfs al is dit een mutatie die de populatie op termijn uitroeit.

De Britse onderzoekers voerden ook een 'proof-of-concept'-experiment uit: onder gecontroleerde omstandigheden brachten ze 600 muggen samen, waarvan de helft een niet-gemuteerd genoom had en de andere helft de CRISPR-Cas-gene-drive-fragment droeg. Na vier generaties droeg 75% van de muggen de mutaties voor infertiliteit. Dit is in lijn met de theoretische verwachtingen van hoe de mutaties zich zouden verspreiden. Recent brachten ze nog verfijningen aan in hun technologie en toonden ze via een gecontroleerde veldproef aan dat een muggenpopulatie daadwerkelijk kan uitgeroeid worden.<sup>86</sup>



Figuur 6. Principes van een gene drive om gewenste mutaties in een populatie snel te doen toenemen. Figuur geïnspireerd op referentie 85.

## Voorbij malaria

Ook andere ziektes die verspreid worden door insecten of andere vectoren zouden op een gelijkaardige manier kunnen aangepakt worden. Denk aan knokkelkoorts, gele koorts, het West Nijlvirus, slaapziekte, de ziekte van Lyme, het Zika-virus etc. Gene drives kunnen in theorie niet alleen de verspreiding van een ziekte tegengaan, ze zouden ook pesticide- en herbicide-resistentie in insecten en onkruiden ongedaan kunnen maken, of schadelijke invasieve soorten onder controle houden.

## Risico's op vernietiging van ecosystemen

Maar lang niet iedereen is enthousiast over deze technologie. In het verleden zijn de malariaparasiet en de mug er telkens opnieuw in geslaagd om resistentie op te bouwen tegen door de mens uitgevonden middelen en technologieën om hen te bestrijden. Ook nu lopen we het risico dat de parasiet en de mug een uitweg vinden.<sup>87</sup> Dit argument wordt door de voorstanders gecounterd met het argument dat men niet één maar tegelijk drie fertiliteitsgenen zou kunnen uitschakelen, wat de kans op de opbouw van resistentie zou minimaliseren.

Andere onderzoekers maken zich grote zorgen omdat het elimineren van een hele populatie in de natuur ongekende gevolgen kan hebben voor het ecosysteem. Mogelijk dagen andere plagen op of stuikt het hele ecosysteem in elkaar. Bovendien is het niet uitgesloten dat het gids-CRISPR-RNA na verloop van tijd zodanig muteert dat het zich op een ander deel van het genoom richt of op andere organismen. Deze mutatie kan dan door populaties razen, met totaal onvoorspelbare effecten. Zij vragen dan ook dat de overheid maatregelen neemt om gene drive-experimenten in laboratoria en in de open natuur te onderwerpen aan strikte veiligheidsregels.<sup>87 88</sup>



## CRISPR-CAS IN DE LANDBOUW

*De technologie van genoombewerking vindt niet alleen toepassingen in de gezondheidszorg. Ook in het plantenonderzoek, gewasveredeling en de landbouw wordt gretig gebruik gemaakt van CRISPR-Cas. Door genen in planten uit te schakelen verwerven onderzoekers inzicht in hun groei- en ziektemechanismen, in welke genen bijdragen aan de opbrengst van landbouwgewassen in normale en extreme omstandigheden (bv. droogte) of welke rol ze spelen bij plagen en ziekten.*

*Voorts wordt CRISPR-Cas gezien als een instrument voor precisieveredeling: de technologie laat toe om op zeer gecontroleerde wijze DNA-veranderingen aan te brengen in planten en gewassen zodat ongewenste eigenschappen verzwakt kunnen worden en gewenste eigenschappen versterkt. Daarmee is genoombewerking een geavanceerde vorm van mutatieveredeling, zoals die al decennialang wordt toegepast. Bovendien onderscheidt CRISPR-Cas-veredeling zich op een aantal fundamentele vlakken van de 'klassieke' genetische modificatietechnologie.*

*Diverse gewassen werden al veredeld dankzij genoombewerking: van meeldauwresistente tarwe, druiven en tomaten, over pompelmoezen die bestand zijn tegen citruskanker, ziekteresistente bananen, soja en koolzaad met een gezondere vetzuursamenstelling tot maïs die droogtes beter verdraagt. De meeste van deze gewassen zitten wel nog in het onderzoekstadium, al is het de verwachting dat de eerste producten over enige tijd op de markt zullen komen.*

*Een overzicht van het gebruik van de CRISPR-Cas-technologie in de landbouw vindt u in de VIB Fact Series 'Precisieveredeling in planten via CRISPR-Cas'.*

# 4 Ethische en maatschappelijke discussie

De opkomst van CRISPR-Cas en gelijkaardige technieken om menselijke genomen te bewerken, zet ook diverse oude ethische en maatschappelijke discussies op scherp. De technologie kan bijvoorbeeld gebruikt worden om erfelijke ziekten in een embryo te genezen waarbij de gecorrigeerde genen worden doorgegeven aan volgende generaties. Deze vorm van genetische modificatie, die de menselijke kiembaan beïnvloedt, werd tot nu toe met veel omzichtigheid en reserve benaderd.

De technologie kan in principe ook voor niet-therapeutische doeleinden worden gebruikt. Wat als mensen de technologie gebruiken om hun kind volledig naar smaak te ontwerpen, met het gewenste uiterlijk, intelligentiepeil en karakter? Hoewel er geen eenduidige relatie bestaat tussen de meeste van die eigenschappen, talenten en competenties met welbepaalde genetische variaties, blijft het risico dat sommige ouders toch genetische kenmerken willen laten inbouwen die hun kinderen een voordeel geven.

## Genoombewerking bij embryo's

### Van moratorium ...

Tijdens een bijeenkomst in december 2015 boog een internationale groep wetenschappers en ethici zich over de ethische implicaties van het genetisch aanpassen van humane embryo's. De deelnemers vertegenwoordigden onder meer de Academies of Sciences and Medicine van de VS, de Royal Society van het VK en de Chinese Academy of Sciences. Op het einde van de bijeenkomst riepen de deelnemers op om niet te sleutelen aan het DNA van menselijke embryo's die bedoeld zijn voor implantatie (en dus het creëren van een zwangerschap), omwille van de 'onvoorziene effecten op toekomstige generaties'. Wel verklaarden ze dat er goede redenen zijn om genoombewerking van embryo's toe te laten voor basisonderzoek. Een totaalverbod op onderzoek naar genoombewerking wilden de wetenschappers dus niet, want de techniek belooft veel nuttige toepassingen.

De wetenschappelijke gemeenschap sprak dus zelf een vrijwillig moratorium uit over genoombewerking in menselijke embryo's met het doel genetisch gewijzigde kinderen te creëren. In diverse publicaties traden andere onderzoekers dit standpunt voor een moratorium bij.<sup>90 91</sup>

### ...over voorzichtige experimenten...

Een gelijkaardige aanbeveling maakten de Amerikaanse National Academies of Science, Engineering, and Medicine. In hun rapport, gepubliceerd in 2017, staat te lezen dat genoombewerking van menselijke embryo's op dit ogenblik alleen wenselijk is voor onderzoeksdoeleinden.<sup>92</sup> Wel achtten ze het waarschijnlijk dat in de toekomst de techniek aanvaard zal worden om embryo's te

veranderen vóór implantatie, op voorwaarde dat men er een ongeneeslijke ziekte mee wil behandelen én er geen haalbare alternatieven voorhanden zijn.

Ondertussen hadden meerdere onderzoeksgroepen al aangetoond dat het bewerken van genomen van menselijke embryo's technisch mogelijk was. In 2015 slaagden Chinese wetenschappers daar voor het eerst in.<sup>93</sup> Ze gebruikten voor die experimenten menselijke embryo's die niet levensvatbaar waren. Hun onderzoek was overigens geen sluitend succes: slechts iets meer dan de helft van de geteste embryo's bevatte de gewenste verandering in het DNA, en bovendien niet in alle cellen. De publicatie kreeg veel media-aandacht en startte een wereldwijd debat.

In 2016 kon een ander onderzoeksteam uit China de technologie gebruiken om menselijke embryo's resistent te maken tegen hiv<sup>94</sup>, en in hetzelfde jaar kreeg Kathy Niakan van het Francis Crick Instituut in London de toelating van de Britse overheid om CRISPR-Cas te gebruiken in onderzoek naar zeer vroege embryonale ontwikkeling. Concreet wilden de Britse wetenschappers diverse genen uitschakelen waarvan ze vermoedden dat ze een rol spelen bij die ontwikkeling van embryo's en foetussen. Met dit onderzoek hoopten de onderzoekers beter te begrijpen waarom sommige zwangerschappen vroegtijdig eindigen in een miskraam.<sup>95</sup> Ook het Karolinska Instituut kreeg van de Zweedse overheid de toestemming om via genoombewerking op embryo's meer te leren over de ontwikkelingsbiologie van menselijke embryo's.<sup>96</sup>



Nog recenter gebruikte een Amerikaans, Zuid-Koreaans en Chinees consortium van onderzoekers CRISPR-Cas om een ziekte-veroorzakende mutatie in het MYBPC3-gen te verbeteren in menselijke embryo's.<sup>97</sup> Mutaties in dit gen leiden bij patiënten tot hypertrofe hartspierziekte. In tegenstelling tot de eerdere studies, was de genoombewerking deze keer wel bijzonder succesvol want ze bleek geslaagd in alle cellen van de behandelde embryo's. In geen enkel van de bovenstaande studies werden de genoombewerkte embryo's gebruikt om een zwangerschap tot stand te brengen.

### ... tot een donderslag bij heldere hemel: de Chinese CRISPR-Cas-baby's

Op 26 november 2018 raakte in de media bekend dat de allereerste genoombewerkte baby's in China waren geboren: een tweeling, twee meisjes, genaamd Lulu en Nana. De genoombewerkings-procedure met CRISPR-Cas werd uitgevoerd door onderzoeker He Jiankui, als onderdeel van een *in vitro* fertilisatieprocedure. Nadat de spermacel in de eicel was geïntroduceerd, voegde He Jiankui ook componenten toe waarmee een doelgerichte kleine wijziging aan het CCR5-gen van het embryo werd doorgevoerd. Voordat het

embryo in de baarmoeder werd teruggeplaatst hebben de onderzoekers één cel ervan weggenomen en gecontroleerd of de gewenste wijziging effectief was doorgevoerd. Die controle zou nog eens zijn uitgevoerd nadat de baby's geboren waren. Bovendien werd nagegaan of er zich geen andere wijzigingen aan het erfelijk materiaal hadden voorgedaan.<sup>98</sup> Om de zekerheid op een succesvolle zwangerschap ter verhogen, plantte hij meerdere genoombewerkte embryo's in bij de aanstaande moeder.

He Jiankui verdedigde zijn aanpak twee dagen later tijdens een congres in Hong Kong ('The Second International Summit on Human Genome Editing'). Volgens de onderzoeker was de procedure gerechtvaardigd omdat de vader van de baby's hiv-drager was. Door een variatie aan te brengen in het CCR5-gen zouden de kinderen genetisch beschermd zijn tegen elke mogelijke hiv-infectie. Tegelijkertijd postte He Jiankui een videoboodschap op Youtube waarin hij zijn interventie uiteenzette ([www.youtube.com/watch?v=th0vnOmFltc&app=desktop](http://www.youtube.com/watch?v=th0vnOmFltc&app=desktop)). Daarnaast maakte de Chinese onderzoeker nog bekend dat een derde CRISPR-baby op komst was.

## Wereldwijde veroordeling

In plaats van applaus oogstte He Jiankui wereldwijde afkeuring. Nog voor het congres afsloot op 29 november, een dag na zijn uiteenzetting, brachten de organisatoren volgende verklaring: "We werden op de hoogte gebracht van het onverwachte en zeer verontrustende nieuws dat het genoom van menselijke embryo's werd bewerkt waarna ze werden geïmplant. Dit resulteerde in een zwangerschap en de geboorte van een tweeling. Zelfs als de genomwijzigingen werden geverifieerd, was de procedure onverantwoord en niet in overeenstemming met de internationale normen."<sup>99</sup>

Ook alle andere reacties waren ronduit afwijzend. Collega-wetenschappers, beleidsmakers, academische instellingen en artsorganisaties noemden He Jiankui's onderzoek misleidend, onverantwoord, in overtreding met de Chinese wet en internationale regels. Of simpel gezegd: het gaat hier om onethisch geëxperimenteer op mensen met een technologie die daar nog niet klaar voor was/is.<sup>100</sup>

Veel critici argumenteerden dat er in ethisch opzicht een onderscheid gemaakt wordt tussen genoombewerking voor 'zwaarwegende', levensbedreigende erfelijke ziekten waarvoor geen behandeling bestaat en voor genoombewerking die tot doel heeft om minder zwaarwegende zaken aan te pakken, of die zelfs tot doel hebben de mens te verbeteren ('enhancement'). De CCR5-modificatie kan volgens hen niet gezien worden als het behandelen of voorkomen van een (zware) erfelijke ziekte, en al zeker niet bij embryo's.

Bovendien zijn er onderzoekers die opmerken dat er maar weinig situaties zijn waarin genoombewerking van embryo's een medisch voordeel zou hebben tegenover de huidige gangbare techniek van pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD) om te vermijden dat erfelijke ziektes worden doorgegeven.<sup>101</sup> Bij PGD worden embryo's na *in vitro* fertilisatie getest op de aanwezigheid van een ziekte. Alleen embryo's

## WAAROM DE GEBOORTE VAN LULU EN NANA IN BELGIË EN WEST-EUROPA HOOGST ONWAARSCHIJNLIJK ZOU ZIJN

*Voordat een behandeling op de mens kan worden toegepast, moeten wettelijk gezien heel wat fasen doorlopen worden. Er moet eerst uitgebreid preklinisch onderzoek plaatshebben, daarna een aantal fasen van klinisch onderzoek, en daarna is er ook nog een markttoelating noodzakelijk vooraleer een behandeling in de praktijk grootschalig mag worden toegepast. Bovendien is het in veel landen wettelijk verboden om bij de mens genetische wijzigingen aan te brengen die doorgegeven worden aan het nageslacht ('kiembaan-gentherapie').*

*In België bestaat de Wet op onderzoek op embryo's in vitro, die het gebruik van embryo's voor onderzoeksdoeleinden reguleert. Onderzoek op embryo's is enkel onder zeer strikte voorwaarden toegelaten. De wet regelt niet het in de praktijk toepassen van therapieën op embryo's. Dat valt onder de reguliere wetgeving inzake het op de markt brengen van geneesmiddelen en andere therapieën.*

*Klinisch onderzoek dat betrekking heeft op genoombewerking bij de mens, moet altijd door een medisch-ethische commissie worden goedgekeurd. Het lijkt uiterst onwaarschijnlijk dat in België een ethische commissie genoombewerking voor een zwangerschap vandaag en in de nabije toekomst zou goedkeuren.*

zonder de mutatie worden teruggeplaatst in de baarmoeder. Ten opzichte van PGD lijkt genoombewerking technisch moeilijk, duur en onzeker en biedt ze weinig voordelen.

### Van de aardbol verdwenen

De gevolgen voor He Jiankui bleven niet uit: de Chinese autoriteiten verplichtten hem met onmiddellijke ingang zijn onderzoek stop te zetten. Enkele maanden later werd hij ontslagen door zijn werkgever, de Southern University of Science and Technology in Shenzhen. Referenties naar zijn onderzoek werden weggehaald van officiële Chinese websites, op Chinese sociale media worden discussies over de onderzoeker gecensureerd en er werd een gerechtelijk onderzoek tegen hem gestart.<sup>100</sup> Bovendien beloofde China haar regelgeving over genoombewerking bij mensen aan te passen.<sup>102</sup>

Ondertussen lijkt He Jiankui zelfs helemaal van de aardbodem verdwenen. Het Chinese stilzwijgen rond hem is zelfs zo opmerkelijk dat sommigen beginnen te twijfelen aan de echtheid van zijn bewerkingen. Zou het om een wetenschappelijke hoax gaan, vragen ze zich af.<sup>102</sup> Er is tot op dit ogenblik immers nog geen onafhankelijke wetenschappelijke bevestiging dat het DNA van Lulu en Nana ook werkelijk succesvol werd bewerkt. Het onderzoek van He Jiankui is evenmin in een peer reviewed wetenschappelijk tijdschrift gepubliceerd.

### Roep om internationale regulering

Vanuit diverse hoeken wordt gepleit voor een internationale regulering voor genoombewerking op embryo's, al zijn onderzoekers er zelf nog niet uit wat er nu precies moet gebeuren. Sommigen pleiten opnieuw voor een moratorium met een strikt verbod op genoombewerking van de menselijke kiembaan gedurende een bepaalde

periode.<sup>103</sup> Anderen, waaronder leiders van de Amerikaanse National Academy of Sciences, de National Academy of Medicine en de Britse Royal Society pleiten eerder voor een brede maatschappelijke consensus alvorens om het even wat te besluiten. Die globale consensus vinden zij nodig gezien de brede implicaties van erfelijke genoombewerking.<sup>104</sup> Zij hebben alvast een werkgroep van experts aan het werk gezet – bestaande uit onderzoekers en ethici – om specifieke standaarden en criteria op te stellen voor dit soort onderzoek. Tientallen wetenschappelijke instellingen over de hele wereld hebben hieraan hun medewerking toegezegd.

Ook de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) heeft de handen uit de mouwen gestoken. De WHO wil een wereldwijd register aanleggen van alle studies waarbij het menselijk genoom – ook dat van embryo's – bewerkt wordt. Zo kan ze het overzicht behouden over wie wat doet. Via dit register wil het onderzoekers ook verplichten transparant te zijn over hun werk. Aan organisaties die onderzoek sponsoren en aan uitgevers die onderzoeksresultaten publiceren, vraagt de WHO om erop toe te zien dat studies die ze respectievelijk financieel ondersteunen of waarover ze publiceren, geregistreerd zijn.<sup>105</sup> De hoofdredacteurs van de bladen *Nature*, *Science* en *Cell* hebben op dit voorstel alvast positief gereageerd.

In de komende maanden zal de WHO werken aan een internationaal raamwerk om het gebruik van genoombewerking met klinische doeleinden – zowel met als zonder beïnvloeding van de kiembaan – internationaal te regelen.

De toekomst zal uitwijzen waar we naartoe gaan met genoombewerking.

# 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 genoomanalyse 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. Dat helpt onderzoekers om diepgaande inzichten te krijgen in allerlei ziekten bij de mens.

Daarnaast zien tal van toepassingen het levenslicht. Zowel in de landbouw als in de gezondheidszorg. We hebben nog nooit zo dicht gestaan bij een succesvolle implementatie van gentherapie als vandaag, dankzij de nieuwe 'toolkit' voor genoombewerking waarover we nu beschikken. Maar ook op vlak van kanker en infectieziekten kan de nieuwe technologie ongekende opportuniteiten bieden.

Net als vele andere nieuwe technologieën werpt genoombewerking maatschappelijke en ethische vragen op. Bijvoorbeeld over het genetisch verbeteren van mens, dier en plant, of het doorgeven van bewerkte genomen aan volgende generaties.

De regelgeving daarover is nog verre van uitgeklaard en blijft daarom een uitdaging voor beleidsmakers en regelgevende instanties, zowel nationaal als internationaal. Technologieën en hun producten evolueren snel en moeten continue overzien en gereguleerd worden, dat is duidelijk. De mogelijk negatieve effecten die ze hebben op de gezondheid moeten tot een minimum worden beperkt. Regelgeving mag echter innovatie niet verlammen en investeringen in en ontwikkeling van nuttige nieuwe therapieën niet blokkeren.

Daarom is ook een dialoog met de eindgebruiker van die nieuwe technologieën – in dit geval de patiënt, de potentieel toekomstige patiënt, de burger, kortom, u en ik dus – belangrijk. Tweerichtingscommunicatie houdt in dat wetenschappers en artsen luisteren naar de bezorgdheden en argumenten van die eindgebruikers. Niet alleen het wat, hoe en waarom moeten besproken worden, maar vooral moeten we samen nadenken en overleggen over waar we naartoe willen.

# 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 Er zijn verschillende types van CAS-eiwitten en het zijn niet allemaal moleculaire schaaftjes. Sommige CAS-genen coderen ook voor helicasen, polymerasen, RNA/DNA-bindende eiwitten etc. Het CAS-gen waar we het in dit dossier over hebben is in hoofdzaak het CAS9-gen, en enkele verwante genen/eiwitten die zich als nucleasen – DNA-knippende eiwitten – gedragen.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 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 Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science.* 2014 Jan 3;343(6166):80-4. doi: 10.1126/science.1246981.
- 22 Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature.* 2014 Oct 16;514(7522):380-4. doi: 10.1038/nature13589.
- 23 Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H, Zhang F, Sharp PA. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell.* 2015 Mar 12;160(6):1246-60. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.038.
- 24 Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014 Jan 3;343(6166):84-87. doi: 10.1126/science.1247005.
- 25 Chow RD, Guzman CD, Wang G, Schmidt F, Youngblood MW, Ye L, Errami Y, Dong MB, Martinez MA, Zhang S, Renauer P, Bilguvar K, Gunel M, Sharp PA, Zhang F, Platt RJ, Chen S. AAV-mediated direct in vivo CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat Neurosci.* 2017 Oct;20(10):1329-1341. doi: 10.1038/nn.4620.
- 26 Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, Santos R, Rao Y, Sassi F, Pinnelli M, Ansari R, Harper S, Jackson DA, McRae R, Pooley R, Wilkinson P, van der Meer D, Dow D, Buser-Doepner C, Bertotti A, Trusolino L, Stronach EA, Saez-Rodriguez J, Yusa K, Garnett MJ. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature.* 2019 Apr 10. doi: 10.1038/s41586-019-1103-9.
- 27 Patel SJ, Sanjana NE, Kishton RJ, Eidizadeh A, Vodnala SK, Cam M, Gartner JJ, Jia L, Steinberg SM, Yamamoto TN, Merchant AS, Mehta GU, Chichura A, Shalem O, Tran E, Eil R, Sukumar M, Gujjarro EP, Day CP, Robbins P, Feldman S, Merlino G, Zhang F, Restifo NP. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature.* 2017 Aug 31;548(7669):537-542. doi: 10.1038/nature23477.
- 28 Park RJ, Wang T, Koundakjian D, Hultquist JF, Lamothe-Molina P, Monel B, Schumann K, Yu H, Krupczak KM, Garcia-Beltran W, Piechocka-Trocha A, Krogan NJ, Marson A, Sabatini DM, Lander ES, Hacohen N, Walker BD. A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat Genet.* 2017 Feb;49(2):193-203. doi: 10.1038/ng.3741.
- 29 Lampi Y, Van Looveren D, Vranckx LS, Thiry I, Bornschein S, Debyser Z, Gijssbers R. Targeted editing of the PSIP1 gene encoding LEDGF/p75 protects cells against HIV infection. *Sci Rep.* 2019 Feb 20;9(1):2389. doi: 10.1038/s41598-019-38718-0.
- 30 Kim J, Koo BK, Yoon KJ. Modeling Host-Virus Interactions in Viral Infectious Diseases Using Stem-Cell-Derived Systems and CRISPR/Cas9 Technology. *Viruses.* 2019 Jan 30;11(2). pii: E124. doi: 10.3390/v11020124.
- 31 Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013 May 9;153(4):910-8. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- 32 Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell.* 2014 Oct 9;159(2):440-55. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.014.
- 33 Yan S, Tu Z, Liu Z, Fan N, Yang H, Yang S, Yang W, Zhao Y, Ouyang Z, Lai C, Yang H, Li L, Liu Q, Shi H, Xu G, Zhao H, Wei H, Pei Z, Li S, Lai L, Li XJ. A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell.* 2018 May 3;173(4):989-1002.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.005.
- 34 Wang L, Yi F, Fu L, Yang J, Wang S, Wang Z, Suzuki K, Sun L, Xu X, Yu Y, Qiao J, Belmonte JCI, Yang Z, Yuan Y, Qu J, Liu GH. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene correction in amyotrophic lateral sclerosis patient iPSCs. *Protein Cell.* 2017 May;8(5):365-378. doi: 10.1007/s13238-017-0397-3.
- 35 Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, Olsen KM, Gregg A, Noggle S, Tessier-Lavigne M. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* 2016 May 5;533(7601):125-9. doi: 10.1038/nature17664.

- 36 Latour YL, Yoon R, Thomas SE, Grant C, Li C, Sena-Esteves M, Allende ML, Proia RL, Tifft CJ. Human GLB1 knockout cerebral organoids: A model system for testing AAV9-mediated GLB1 gene therapy for reducing GM1 ganglioside storage in GM1 gangliosidosis. *Mol Genet Metab Rep*. 2019 Sep 11;21:100513. doi: 10.1016/j.ymgmr.2019.100513.
- 37 Dong Y, Peng T, Wu W, Tan D, Liu X, Xie D. Efficient introduction of an isogenic homozygous mutation to induced pluripotent stem cells from a hereditary hearing loss family using CRISPR/Cas9 and single-stranded donor oligonucleotides. *J Int Med Res*. 2019 Apr;47(4):1717-1730. doi: 10.1177/0300060519829990.
- 38 Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015 Feb;21(2):121-31. doi: 10.1038/nm.3793.
- 39 Ahmad G, Amiji M. Use of CRISPR/Cas9 gene-editing tools for developing models in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2018 Mar;23(3):519-533. doi: 10.1016/j.drudis.2018.01.014.
- 40 Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliensky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014 Jun;32(6):551-3. doi: 10.1038/nbt.2884.
- 41 Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972 Mar 3;175(4025):949-55.
- 42 Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 2018 Jan 12;359(6372). pii: eaan4672. doi: 10.1126/science.aan4672.
- 43 Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolo M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaium A, Ferster A, Duppenhtaler A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Marktel S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo MG. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med*. 2009 Jan 29;360(5):447-58. doi: 10.1056/NEJMoa0805817.
- 44 Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, Wittes J, Pappas J, Elci O, McCague S, Cross D, Marshall KA, Walshire J, Kehoe TL, Reichert H, Davis M, Raffini L, George LA, Hudson FP, Dingfield L, Zhu X, Haller JA, Sohn EH, Mahajan VB, Pfeifer W, Weckmann M, Johnson C, Gewaily D, Drack A, Stone E, Wachtel K, Simonelli F, Leroy BP, Wright JF, High KA, Maguire AM. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Aug 26;390(10097):849-860. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31868-8.
- 45 Negre O, Eggmann AV, Beuzard Y, Ribeil JA, Bourget P, Borwornpinyo S, Hongeng S, Hacein-Bey S, Cavazzana M, Leboulch P, Payen E. Gene Therapy of the  $\beta$ -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the  $\beta$ (A(T87Q))-Globin Gene. *Hum Gene Ther*. 2016 Feb;27(2):148-65. doi: 10.1089/hum.2016.007.
- 46 Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, Kan YW. Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res*. 2014 Sep;24(9):1526-33. doi: 10.1101/gr.173427.114.
- 47 A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. NCT03655678.
- 48 DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, Heo SJ, Mitros T, Muñoz DP, Boffelli D, Kohn DB, Walters MC, Carroll D, Martin DI, Corn JE. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*. 2016 Oct 12;8(360):360ra134.
- 49 A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe Sickle Cell Disease. NCT03745287.
- 50 Traxler EA, Yao Y, Wang YD, Woodard KJ, Kurita R, Nakamura Y, Hughes JR, Hardison RC, Blobel GA, Li C, Weiss MJ. A genome-editing strategy to treat  $\beta$ -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med*. 2016 Sep;22(9):987-90. doi: 10.1038/nm.4170.
- 51 Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenbergh LH, Church GM, Wagers AJ. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):407-411. doi: 10.1126/science.aad5177.
- 52 Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):403-7. doi: 10.1126/science.aad5143.
- 53 Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, Bhattacharyya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. 2016 Jan 22;351(6271):400-3. doi: 10.1126/science.aad5725.
- 54 Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, Harron R, Stathopoulou TR, Massey C, Shelton JM, Bassel-Duby R, Piercy RJ, Olson EN. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2018 Oct 5;362(6410):86-91. doi: 10.1126/science.aau1549.
- 55 Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, Sun X, Qin Z, Jin P, Li S, Li XJ. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*. 2017 Jun 30;127(7):2719-2724. doi: 10.1172/JCI92087.
- 56 Yan S, Tu Z, Liu Z, Fan N, Yang H, Yang S, Yang W, Zhao Y, Ouyang Z, Lai C, Yang H, Li L, Liu Q, Shi H, Xu G, Zhao H, Wei H, Pei Z, Li S, Lai L, Li XJ. A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell*. 2018 May 3;173(4):989-1002.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.005.
- 57 Elbarbary RA, Miyoshi K, Myers JR, Du P, Ashton JM, Tian B, Maquat LE. Tudor-SN-mediated endonucleolytic decay of human cell microRNAs promotes G(1)/S phase transition. *Science*. 2017 May 26;356(6340):859-862. doi: 10.1126/science.aai9372.
- 58 Chen ZH, Yu YP, Zuo ZH, Nelson JB, Michalopoulos GK, Monga S, Liu S, Tseng G, Luo JH. Targeting genomic rearrangements in tumor cells through Cas9-mediated insertion of a suicide gene. *Nat Biotechnol*. 2017 Jun;35(6):543-550. doi:10.1038/nbt.3843.
- 59 Kim W, Lee S, Kim HS, Song M, Cha YH, Kim YH, Shin J, Lee ES, Joo Y, Song JJ, Choi EJ, Choi JW, Lee J, Kang M, Yook JJ, Lee MG, Kim YS, Paik S, Kim HH. Targeting mutant KRAS with CRISPR-Cas9 controls tumor growth. *Genome Res*. 2018 Jan 11. doi: 10.1101/gr.223891.117.
- 60 Yin H, Xue W, Anderson DG. CRISPR-Cas: a tool for cancer research and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Jan 21. doi: 10.1038/s41571-019-0166-8.
- 61 Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Jun;13(6):370-83. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.36.
- 62 Prasad V. Immunotherapy: Tisagenlecleucel - the first approved CAR-T-cell therapy: implications for payers and policy makers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Jan;15(1):11-12. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.156.
- 63 Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, Butler K, Rivat C, Wright G, Somana K, Ghorashian S, Pinner D, Ahsan G, Gilmour K, Lucchini G, Ingloft S, Mifsud W, Chiesa R, Peggs KS, Chan L, Farzaneh F, Thrasher AJ, Vora A, Pule M, Veys P. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017 Jan 25;9(374). pii: eaaj2013. doi: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.
- 64 Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*. 2016 Nov 24;539(7630):479. doi: 10.1038/nature.2016.20988.
- 65 Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X, Li F, Xiao W, Zhao H, Dai S, Qin X, Mo X, Young WB, Khalili K, Hu W. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Mol Ther*. 2017 May 3;25(5):1168-1186. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.012.
- 66 Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol Ther*. 2016 Mar;24(3):522-6. doi: 10.1038/mt.2016.24.
- 67 Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res*. 2018 Jan 15;244:321-332. doi: 10.1016/j.virusres.2017.07.020.
- 68 Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, Liu Y, Liu Y, Wang X, Li H, Lai W, He Y, Yao A, Ma L, Shao Y, Zhang B, Wang C, Chen H, Deng H. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther*. 2017 Aug 2;25(8):1782-1789. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.04.027.
- 69 Liu S, Wang Q, Yu X, Li Y, Guo Y, Liu Z, Sun F, Hou W, Li C, Wu L, Guo D, Chen S. HIV-1 inhibition in cells with CXCR4 mutant genome created by CRISPR-Cas9 and piggyBac recombinant technologies. *Sci Rep*. 2018 Jun 5;8(1):8573. doi: 10.1038/s41598-018-26894-4.
- 70 Safety of Transplantation of CRISPR CCR5 Modified CD34+ Cells in HIV-infected Subjects With Hematological Malignancies. NCT03164135.
- 71 van Diemen FR, Kruse EM, Hooykaas MJ, Bruggeling CE, Schürch AC, van Ham PM, Imhof SM, Nijhuis M, Wiertz EJ, Lebbink RJ. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections. *PLoS Pathog*. 2016 Jun 30;12(6):e1005701. doi: 10.1371/journal.ppat.1005701.
- 72 Chen YC, Sheng J, Trang P, Liu F. Potential Application of the CRISPR/Cas9 System against Herpesvirus Infections. *Viruses*. 2018 May 29;10(6). pii: E291. doi: 10.3390/v10060291.

- 73 Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, Wang L, Jiang X, Shen H, He D, Li K, Xi L, Ma D, Wang H. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:612823. doi: 10.1155/2014/612823.
- 74 Hsu DS, Kornepati AV, Glover W, Kennedy EM, Cullen BR. Targeting HPV16 DNA using CRISPR/Cas inhibits anal cancer growth in vivo. *Future Virol.* 2018 Jul;13(7):475-482. doi: 10.2217/fvl-2018-0010.
- 75 A Safety and Efficacy Study of TALEN and CRISPR/Cas9 in the Treatment of HPV-related Cervical Intraepithelial Neoplasia. NCT03057912
- 76 Gilbert N. Four stories of antibacterial breakthroughs. Old drugs and new tricks keep researchers one step ahead of antibiotic resistance. *Nature.* 2018 Mar 8;555(7695):S5-S7. doi: 10.1038/d41586-018-02475-3.
- 77 Gomaa AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio.* 2014 Jan 28;5(1):e00928-13. doi: 10.1128/mBio.00928-13.
- 78 Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014 Nov;32(11):1146-50. doi: 10.1038/nbt.3043.
- 79 Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol.* 2014 Nov;32(11):1141-5. doi: 10.1038/nbt.3011.
- 80 Bikard D, Barrangou R. Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Curr Opin Microbiol.* 2017 Jun;37:155-160. doi: 10.1016/j.mib.2017.08.005.
- 81 Goren M, Yosef I, Qimron U. Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system. *Drug Resist Updat.* 2017 Jan;30:1-6. doi: 10.1016/j.drug.2016.11.001.
- 82 Ramachandran G, Bikard D. Editing the microbiome the CRISPR way. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019 May 13;374(1772):20180103. doi:10.1098/rstb.2018.0103.
- 83 Franco-Tormo MJ, Salas-Crisostomo M, Rocha NB, Budde H, Machado S, Murillo-Rodríguez E. CRISPR/Cas9, the Powerful New Genome-Editing Tool for Putative Therapeutics in Obesity. *J Mol Neurosci.* 2018 May;65(1):10-16. doi: 10.1007/s12031-018-1076-4.
- 84 Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol.* 2016 Jan;34(1):78-83. doi: 10.1038/nbt.3439.
- 85 Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature.* 2015 Jun 4;522(7554):20-4. doi: 10.1038/522020a.
- 86 Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2018 Dec;36(11):1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245.
- 87 Callaway E. Mosquitoes engineered to pass down genes that would wipe out their species. *Website Nature.* 2015 Dec; doi:10.1038/nature.2015.18974
- 88 Oye KA, Esvelt K, Appleton E, Catteruccia F, Church G, Kuiken T, Lightfoot SB, McNamara J, Smidler A, Collins JP. Regulating gene drives. *Science.* 2014 Aug 8;345(6197):626-8. doi: 10.1126/science.1254287.
- 89 LaBarbera AR. Proceedings of the International Summit on Human Gene Editing: a global discussion-Washington, D.C., December 1-3, 2015. *J Assist Reprod Genet.* 2016 Sep;33(9):1123-7. doi: 10.1007/s10815-016-0753-x.
- 90 Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. *Biotechnology.* A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):36-8. doi: 10.1126/science.aab1028.
- 91 Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature.* 2015 Mar 26;519(7544):410-1. doi: 10.1038/519410a.
- 92 National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, National Academy of Medicine, National Academy of Sciences, Committee on Human Gene Editing: Scientific, Medical, and Ethical Considerations. *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2017 Feb 14.
- 93 Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May;6(5):363-372. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- 94 Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet.* 2016 May;33(5):581-588. doi: 10.1007/s10815-016-0710-8.
- 95 Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, Lea R, Elder K, Wamaitha SE, Kim D, Maciulyte V, Kleinjung J, Kim JS, Wells D, Vallier L, Bertero A, Turner JMA, Niakan KK. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* 2017 Oct 5;550(7674):67-73. doi: 10.1038/nature24033.
- 96 Plaza Reyes A, Lanner F. Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. *Development.* 2017 Jan 1;144(1):3-7. doi: 10.1242/dev.139683.
- 97 Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, Koski A, Ji D, Hayama T, Ahmed R, Darby H, Van Dyken C, Li Y, Kang E, Park AR, Kim D, Kim ST, Gong J, Gu Y, Xu X, Battaglia D, Krieg SA, Lee DM, Wu DH, Wolf DP, Heitner SB, Belmonte JCI, Amato P, Kim JS, Kaul S, Mitalipov S. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017 Aug 24;548(7668):413-419. doi: 10.1038/nature23305.
- 98 Cyranoski D. First CRISPR babies : six questions that remain. *Website Nature.* doi: 10.1038/d41586-018-07607-3
- 99 Cyranoski D. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature.* 2019 Feb;566(7745):440-442. doi: 10.1038/d41586-019-00673-1.
- 100 Scott CT, Selin C. What to Expect When Expecting CRISPR Baby Number Four. *Am J Bioeth.* 2019 Mar;19(3):7-9. doi: 10.1080/15265161.2018.1562793.
- 101 Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, Carroll D, Charo RA, Charpentier E, Cohen R, Corn J, Doudna J, Feng G, Greely HT, Isasi R, Ji W, Kim JS, Knoppers B, Lanphier E, Li J, Lovell-Badge R, Martin GS, Moreno J, Naldini L, Pera M, Perry AC, Venter JC, Zhang F, Zhou Q. CRISPR germline engineering--the community speaks. *Nat Biotechnol.* 2015 May;33(5):478-86. doi: 10.1038/nbt.3227.
- 102 Cyranoski D. China to tighten rules on gene editing in humans. *Website Naure.* doi: 10.1038/d41586-019-00773-y
- 103 Lander ES, Baylis F, Zhang F, Charpentier E, Berg P, Bourgain C, Friedrich B, Joung JK, Li J, Liu D, Naldini L, Nie JB, Qiu R, Schoene-Seifert B, Shao F, Terry S, Wei W, Winnacker EL. Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature.* 2019 Mar;567(7747):165-168. doi: 10.1038/d41586-019-00726-5.
- 104 Dzau VJ, McNutt M, Ramakrishnan V. Academies' action plan for germline editing. *Nature.* 2019 Mar;567(7747):175. doi: 10.1038/d41586-019-00813-7.
- 105 Reardon S. World Health Organization panel weighs in on CRISPR-babies debate. *Nature.* 2019 Mar;567(7749):444-445. doi: 10.1038/d41586-019-00942-z.

**Basisonderzoek in de levenswetenschappen**, dat is de kernactiviteit van VIB. VIB is een onafhankelijke onderzoeksinstituut 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 technologieovername vertaald naar concrete toepassingen voor de samenleving zoals nieuwe diagnostica, geneesmiddelen, behandelmethoden 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](http://www.vib.be).

---

## VIB

Rijvisschestraat 120

9052 Gent

België

Tel. +32 9 244 66 11

Fax +32 9 244 66 10

[info@vib.be](mailto:info@vib.be)

Meer info op [www.vib.be](http://www.vib.be)