

Potentiële Safe-by-Design Strategieën door Directed Evolution

Onderzoeksrapport voor het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat

Datum: 13-12-2019

Auteurs: W. Teunisse, dr. Z. Robaey, dr. L. Asveld

Biotechnology and Society Group, Technische Universiteit Delft

Dit onderzoek is gefinancierd door het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat

Inhoudsopgave	
Samenvatting: Safe-by-Design door Directed Evolution	2
1. Introductie	3
1.1 Het project	3
1.2 Evolutie.	4
2. Methodiek	5
3. Evolutie en veiligheid	7
3.1 Stand van zaken	7
3.2 Kansen in het gebruik van evolutie voor veiligheid	8
3.2.1 Auxotrofie en kill-switches	8
3.2.2 Stabiliteit vergroten door recombinitie te voorkomen	9
4. Hoe verder met evolutie als design principe?	9
4.1 Wat voegt evolutie toe aan de Safe-by-Design discussie	9
4.1.1 Veiligheids dimensies	9
4.1.2 Risicocategorieën	10
4.2 Bioremediatie voorbeeld	11
4.2.1 Controleerbaarheid	11
4.3 Generalisatie van de gevonden technieken	11
5. Conclusie	12
References	Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.

Samenvatting: Safe-by-Design door Directed Evolution

Bacteriën en schimmels (zoals gist) kunnen handig werk doen, zo gebruiken we ze bijvoorbeeld om bier en kaas te maken. Dankzij nieuwe ontdekkingen in de technische biologie (biotechnologie), kunnen we steeds beter bacteriën en schimmels ontwerpen die iets bijzonders kunnen. Bijvoorbeeld bacteriën die medicijnen, brandstof, of zelfs biologisch afbreekbaar plastic maken of schadelijke stoffen kunnen afbreken.

Deze nieuwe ontdekkingen in de biotechnologie hebben soms wel mogelijke risico's. We weten bijvoorbeeld niet wat er zou gebeuren als deze veranderde bacteriën ontsnappen. Het kan zijn dat ze schadelijk zijn voor mens of milieu.

Om deze risico's te verminderen, kunnen we veiligheid inbouwen. Tijdens het ontwerpen maken we de bacteriën of schimmels veilig(er). Daarom heet dit een Safe-by-Design strategie. Een voorbeeld van een veilig ontwerp is dat je met een soort druk op de knop de nieuwe bacterie of schimmel kan doden. Dit heet een '*kill-switch*'. Maar een van de moeilijkste dingen voor Safe-by-Design in de biotechnologie is dat bacteriën en schimmels evolueren. Dit betekent dat ze veranderen van generatie tot generatie, waardoor ze de werking van veiligheid, zoals een *kill-switch*, verliezen.

In dit project stellen we de vraag of we evolutie juist kunnen inzetten om de veiligheid te verbeteren. Een mogelijkheid is om door evolutie nieuwe veiligheidsmaatregelen te ontwerpen. Dat kan op een manier die 'directed evolution' ('gestuurde' evolutie) heet. Dit is vergelijkbaar met de evolutionaire verandering die ertoe leidde dat gazellen snel kunnen rennen. Het snel rennen is hierbij een uitkomst van evolutie. Eerst waren gazellen traag, maar doordat de langzame gazellen opgegeten werden door leeuwen, bleven alleen de snelle gazellen over. Deze kregen ook weer snelle(re) kinderen. Door de generaties heen zijn gazellen daardoor heel snel geworden.

Op dezelfde manier als het 'snel rennen' is ontworpen door evolutie, kan veiligheid in bacteriën misschien ook ontworpen worden door evolutie. Door dit soort proeven kan een bacterie die evolueert, de *kill-switch* niet meer verliezen. Op deze manier kunnen we bacteriën, schimmels, planten en dieren waarvan de genen zijn aangepast blijven gebruiken, terwijl ze van zichzelf veiliger blijven of worden.

1. Introductie

1.1 Het project

Safe-by-Design is een strategie voor risicomanagement waarbij vanaf het begin van een ontwerpproces geprobeerd wordt een ontwerp inherent veilig te maken (Robaey 2018). Dit heeft, in klassieke technische ontwerpen, zowel betrekking op de gebruikte materialen als de uit te voeren processen (Bouchaut en Asveld, aanstaande). Aangezien er in de biotechnologie steeds meer mogelijkheden zijn voor het gericht ontwerpen van organismen en processen, kan Safe-by-Design ook in de biotechnologie toegepast worden. In eerder onderzoek (Robaey, 2018) werd in kaart gebracht wat potentiële gevaren van biotechnologische toepassingen zijn en hoe Safe-by-Design strategieën kunnen bijdragen aan de omgang met deze gevaren. Hierin werden vier categorieën van gevaar beschreven zoals uitgelegd in textbox 1.

Textbox 1 Vier categorieën van gevaar zoals beschreven door Robaey (2018)

- 1) Persistentie, invasiviteit en onbedoelde effecten op andere organismen dan het doelorganisme:
Het risico dat een genetisch gemodificeerd organisme (GGO) een sterker dan verwacht effect heeft of blijft functioneren na de gewenste tijdsperiode. Dit kan een ongewenst effect hebben op andere organismen.
- 2) Genepool vervuiling:
Nieuw geïntroduceerde GGO's brengen nieuwe genetische informatie met zich mee en krijgen een eigen plek in het ecosysteem. Door de nieuwe competitie kunnen ze het evenwicht in de biodiversiteit van het ecosysteem verschuiven en onbedoeld een effect hebben op andere organismen.
- 3) Horizontale genoverdracht:
Nieuwe genetische eigenschappen van GGO's kunnen zich door middel van horizontale (laterale) gen overdracht verplaatsen tussen individuen en soorten. Hierdoor kunnen de eigenschappen van GGO's in andere organismen geïntroduceerd worden. Ook kan dit effect hebben op de biodiversiteit en de al bestaande soorten veranderen.
- 4) Pathogeniteit en toxiciteit voor andere levende organismen zoals planten, mensen en dieren:
Nieuw geïntroduceerde GGO's kunnen onverwacht pathogeen of toxisch zijn voor andere organismen in het ecosysteem.

In dit rapport is veiligheid gedefinieerd als het voorkomen of het verkleinen van de kans dat een of meer van de genoemde gevaren zich kunnen voordoen. Daarbij gaat dit rapport in op hoe *directed evolution* (zoals in 1.2 uitgelegd) gebruikt kan worden voor het ontwerpen van Safe-by-Design strategieën in biotechnologische toepassingen. Daarbij wordt bekeken hoe Safe-by-Design mechanismen gedijen bij de onzekerheden van het werken met levende organismen. Levende organismen zijn namelijk constant onderhevig aan evolutie: ze leven, muteren, geven genetische eigenschappen door met reproductie en wisselen genetische eigenschappen uit met andere organismen waardoor ze lastig controleerbaar en soms onvoorspelbaar zijn. In dit rapport betogen we dat evolutie niet altijd iets hoeft te zijn waar we mee moeten leren omgaan om veiligheid te bewerkstelligen. Evolutie kan namelijk ook een concept zijn dat we kunnen gebruiken om veiligheid te creëren. Dit kan bijvoorbeeld met *directed evolution*.

Daarmee is de hoofdvraag van dit rapport: Hoe kan *directed evolution* dienen als ontwerpprincipe om veiligheid te bewerkstelligen?

We beschrijven hoe evolutie gebruikt kan worden om veiligheidsmechanismen te ontwerpen en verbeteren. Ter conclusie worden er twee dimensies van veiligheid uitgelicht: stabiliteit en controleerbaarheid. Hierbij wordt bepaald welke van deze dimensies de meeste potentie heeft om door middel van *directed evolution* aangepakt te worden. Ook wordt gekeken hoe de met *directed evolution* te ontwerpen potentiële veiligheidsmechanismen een rol spelen in de aanpak van de genoemde categorieën van gevaar. Alle aspecten

worden vervolgens tastbaar gemaakt met een voorbeeld in de bioremediatie. Als laatste wordt er besproken hoe en of deze strategieën gegeneraliseerd kunnen worden binnen de biotechnologie.

1.2 Evolutie

Bij het werken met evolutie zijn een aantal concepten van groot belang. Evolutie drijft op variatie en selectie. Dit zijn geen gestuurde processen maar willekeurige gebeurtenissen. Met variatie wordt genetisch verschil bedoeld. Dit kan komen door willekeurige mutaties, bijvoorbeeld door fouten in het kopiëren van het genetisch materiaal, door blootstelling aan chemische stoffen of UV-straling. Ook kan variatie ontstaan door recombinatie. In mensen (en andere sexueel reproducerende organismen) vindt dit direct na de bevruchting plaats, waarbij het genetisch materiaal van vader en moeder gecombineerd wordt. Eencelligen kunnen genetische informatie uitwisselen tussen individuen. Dit heet laterale genoverdracht.

Door variatie ontstaat er ook verschil in het fenotype van een organisme, dit zijn alle niet-genetische eigenschappen van een organisme zoals het uiterlijk, het gedrag en de functies. De verandering in fenotype kan voordelig of nadelig zijn voor een individu. Fitness duidt aan hoeveel nakomelingen een individu krijgt. Een betere *fitness* wordt gekenmerkt daardoor het krijgen van meer nakomelingen en zegt daarmee iets over hoe goed een individu aangepast is aan de omstandigheden. Meer nakomelingen krijgen betekent dat een relatief groter deel van de populatie het genetisch materiaal meedraagt van de ouder(s). Hiermee wordt er onbewust geselecteerd voor dit *fittere* fenotype en daarmee het bijbehorend genetisch materiaal. Dit proces wordt omschreven als natuurlijke selectie.

Omstandigheden zoals klimaat, maar ook competitie met andere organismen zullen deze selectie bewerkstelligen. Deze omstandigheden vormen de selectiedruk. Een evolutionair pad is een specifieke opeenvolging van mutaties die samen tot een verandering in functie kunnen leiden. Daarbij zijn paden verschillend als er verschillende mutaties optreden of dezelfde mutaties in andere volgorde optreden. In het laatste geval kunnen twee verschillende paden wel tot dezelfde uitkomst leiden.

In een 'Directed Evolution' experiment wordt evolutie gebruikt om bijvoorbeeld een eiwit met een bepaalde functie te ontwerpen of te optimaliseren. *Directed evolution* richt zich daarbij op micro-organismen vanwege de snelle generatietijd waardoor de effecten van evolutie snel zichtbaar zijn. Soms vinden de experimenten ook zonder levende organismen plaats waarbij slechts het eiwit van toepassing gebruikt wordt. In beide gevallen wordt er gebruik gemaakt van een selectiedruk om de juiste individuen te selecteren en daardoor de soort verder in de 'juiste' richting te laten evolueren. Dit verschilt van een *rationele ontwerp* benadering. Rationeel ontwerp houdt in dat er actief specifieke mutaties in het genoom worden aangebracht waardoor het organisme een bepaalde eigenschap krijgt. Hiervoor moet bekend zijn welke mutaties leiden tot het gewenste resultaat.

Textbox 2: Hypothetisch voorbeeld van *directed evolution*

Stel men gebruikt een bepaald micro-organisme voor een industrieel proces. Dit proces zou sneller verlopen bij een hogere temperatuur. Helaas overleeft het micro-organisme de hogere temperatuur niet. Ook is niet bekend welke mutaties ertoe zouden leiden dat het organisme wel bij deze hogere temperatuur kan overleven. Daardoor kan er geen 'betere' versie van het organisme *rationeel ontworpen* worden. Ondanks dat men deze kennis niet heeft, kan *directed evolution* in het laboratorium wel worden ingezet. Hierbij kweekt men het organisme, terwijlover meerdere generaties langzaam de temperatuur verhoogd wordt. Het verhogen van de temperatuur vormt hierbij de selectiedruk, die selecteert voor de gewenste individuen. Door de temperatuurgradiënt zullen als eerste de individuen sterven die slecht tegen de warmte kunnen. Maar door variatie zullen er ook individuen zijn die hier beter tegen kunnen. Deze individuen zullen ook nakomelingen krijgen die gemiddeld gezien ook beter tegen de warmte kunnen, met daarbij

weer nieuwe variatie. Na vele generaties en het langzaam ophogen van de temperatuur, zal de soort zich aangepast hebben en beter bestand zijn tegen de hogere temperatuur.

Directed evolution is een experimentele methode waarmee men door middel van selectiedruk functies kan ontwerpen aan de hand van de gewenste uitkomst (vergelijkbaar met top down ontwerpen) in plaats van met specifieke mutaties in de bouwstenen (bottom up ontwerpen). Het voorbeeld illustreert dit omdat niemand de specifieke mutaties wist voor een organisme dat tegen hogere temperaturen kan, maar men weet wel de gewenste uitkomst, waardoor het doel toch bereikt kan worden.

Soms is het niet functioneel of kost het teveel tijd om af te wachten of spontane mutaties optreden in een organisme. Ook wanneer alleen een enkel eiwit gebruikt wordt, zonder organisme, zullen mutaties niet spontaan optreden. In die gevallen kunnen mutaties en variatie handmatig geïntroduceerd worden. Dit is met name functioneel als men naar een specifiek eiwit kijkt.

Het genetisch materiaal voor de productie van dit eiwit kan dan geproduceerd en vermeerderd worden met 'error prone-PCR' (polymerase chain reaction). Dit is een techniek die het genetisch materiaal voor het eiwit vaak kopieert (amplificeert), en daarbij veel willekeurige mutaties introduceert. Omdat de mutaties willekeurig zijn is dit geen rationeel ontwerp, men weet niet waar de mutaties toe zullen leiden maar selecteert de individuen die het dichtst bij het gewenste fenotype komen. Na de introductie van de mutaties kan het genetisch materiaal middels (bijvoorbeeld) de CRISPR techniek in het micro-organisme aangebracht worden. Dit kan het evolutieproces versnellen.

Ter conclusie kan *directed evolution* een functionele ontwerpstrategie zijn, met name bij gebrekkige kennis over de effecten van mutaties op de functie van een micro-organisme of een eiwit. Het moeilijkste van *directed evolution* is het ontwerpen van de juiste selectiedruk. Mocht er wel voldoende kennis zijn over welke mutaties leiden tot het gewenste effect is het efficiënter om gerichte mutaties aan te brengen (rationeel ontwerp).

2. Methodiek

Om een overzicht te geven van zowel de mogelijkheden als wat er al bereikt is op het gebied van veiligheid door *directed evolution* is er literatuuronderzoek gedaan en zijn er interviews afgenomen met experts op het gebied van evolutie of biologische veiligheid. De geïnterviewde experts zijn terug te vinden in tabel 1. Voor het literatuuronderzoek is Google Scholar gebruikt als zoekmachine. Belangrijke zoektermen waren verschillende combinaties van: '(directed) evolution', 'safety', 'biosafety' en 'predicting evolution'. Hierbij werd slecht één enkele wetenschappelijke publicatie gevonden (Schmidt, 2010) waarin genoemd wordt dat *directed evolution* de meest belovende methode is voor de constructie en bewerking van zogenaamd XNA (xenonucleic acid) en dat deze methode gebruikt kan worden voor het verbeteren van de veiligheid. Naast dit artikel waar evolutie rechtstreeks gekoppeld wordt aan veiligheid zijn er meerdere artikelen te vinden die onderzoek beschrijven dat nuttig zou kunnen zijn voor veiligheidsmaatregelen maar dit niet als zodanig benoemen. Het gaat dan wederom met name om onderzoek op het gebied van XNA (Marlière et al., 2011) en het optimaliseren van polymerase voor XNA (Loakes et al., 2009; Pinheiro et al., 2014). Het literatuuronderzoek is verder uitgebreid met suggesties en referenties uit de interviews en het doorzoeken van de referentiesecties van gebruikte publicaties.

Drie van de vier interviews zijn afgenomen via skype en middels skype opgenomen. De belangrijkste citaten uit het interview zijn getranscribeerd. Twee interviews zijn afgenomen in het Engels, daarvoor zijn de citaten vertaald, de originele citaten zijn als voetnoot toegevoegd.

Tabel 1: Overzicht van geïnterviewden en hun expertise

Geïnterviewde	Promotie onderzoek	Werkzaam bij	Onderwerp	Code
Markus Schmidt	Biotechnologie en risicoperceptie	Biofaction	'Technology assessments' en de sociale impact van biotechnologie	P1
Cécile van der Vlugt	Moleculaire fytopathologie	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)	Risicobeoordelingen van biotechnologie	P2
Bertus Beaumont	Moleculaire biologie	Assistant professor TU Delft	Experimentele evolutie	P3
Vitor Pinheiro	Bacteriële pathogenese	Associate professor KU Leuven	Creatie van functioneel XNA door middel van directed evolution	P4

3. Evolutie en veiligheid

3.1 Stand van zaken

Tot op heden is er weinig onderzoek gepubliceerd over het gebruik van evolutie voor veiligheid (zie methodiek, sectie 2). Ook tijdens de interviews werd bevestigd dat evolutie voor veiligheid niet een gangbaar idee is:

Ik heb daar nog nooit in de context van veiligheid over nagedacht. (P3)

Ik heb nog geen enkele publicatie gezien over biologische veiligheid met betrekking tot evolutie.¹(P4)

Dit komt waarschijnlijk omdat het technisch moeilijk is om, in het geval van *directed evolution*, een selectiedruk te bedenken die leidt tot het verbeteren van de veiligheid. Dit wordt ook benadrukt in P4, waarbij het niet veranderen van een organisme als veilig wordt gezien. Evolutie daarentegen, bestaat alleen door de mogelijkheid om te veranderen.

Evolutie als optimalisatie mechanisme is vooral effectief als het systeem zijn eigen evolutie kan uitvoeren. Het kan zo zijn dat de parameters voor het uitvoeren van evolutie tegengesteld zijn aan de parameters voor veiligheid. Evolutie is niet perse goed in het maken van iets dat robuust is en niet verandert.² (P4)

¹ I have not seen a single paper that discusses those things in the light of evolution.

² Because evolution as an optimization tool works most effectively if the system can do its own evolution. But the parameters for that to be efficient may be opposite to the safety parameters. Cause if you want something robust that doesn't change, that is not necessarily what evolution is good at.

3.2 Kansen in het gebruik van evolutie voor veiligheid

3.2.1 Auxotrofie en *kill-switches*

Dit stuk beschrijft manieren om *directed evolution* te gebruiken om veiligheidsmechanismen te optimaliseren. Klassieke veiligheidsmechanismen zoals *kill-switches* en chemische afhankelijkheid (auxotrofie), zijn mechanismen die de controle op een GGO kunnen vergroten. Een *kill-switch* is een systeem dat onder bepaalde omstandigheden geprogrammeerde celdoding initieert (Stirling et al, 2017). Het toevoegen van een *kill-switch* betekent echter over het algemeen een achteruitgang in de *fitness* van een organisme (Stirling et al, 2017). Onder selectiedruk zal het organisme ofwel naar een *fittere* situatie evolueren en dus het veiligheidsmechanisme, de *kill-switch*, verliezen ofwel sterven door competitie. Door het verliezen van het veiligheidsmechanisme is een deel van de populatie ongevoelig voor deze geplande celdoding (Molin et al, 1993), wat betekent dat een *kill-switch* alleen niet goed werkt. Stirling et al (2017) laten zien dat een hedendaagse *kill-switch* tot ongeveer 140 generaties in een modelorganisme stabiel blijft, dit staat gelijk aan ongeveer 2 dagen.

In dit geval zou *directed evolution* een methode kunnen zijn om het veiligheidsmechanisme onmisbaar te maken voor het organisme.

Kunnen we directed evolution gebruiken om een organisme fit te maken ondanks dat bepaalde veiligheidsmechanisme zijn geïncorporeerd? Kort door de bocht: ja. Laten we zeggen dat je een kill-switch gebruikt. De klassieke toxine-antitoxine, dat komt met een metabolische last (kost energie), de aanname is dat dit leidt tot nadeel in het milieu. Laten we zeggen dat je de eiwitproductie kan koppelen aan een essentieel enzym. Dit is totaal abstract. Ik ken geen enkel toxine-antitoxine systeem dat zich zou laten gebruiken als onderdeel van een fusie. Maar stel bijvoorbeeld dat je een anti-toxine kan coderen als een fusie met een essentieel enzym, terwijl je de toxine op een andere plek vestigt die ook essentieel is voor metabolisme. Dan kan je een systeem hebben waar er inderdaad een last is, maar die last is acceptabel voor de cel omdat de productie van het essentiële enzym een positief effect heeft op de fitness, terwijl het toxine nu in een zijmodule zit. Dus ik denk dat er manieren zijn om dit te ontwerpen.³ (P4)

Bij bovenstaande methode zou men een eiwit van het veiligheidsmechanisme integreren in een ander onmisbaar proces waardoor het organisme niet zomaar het veiligheidsmechanisme kan verliezen vanwege de bijkomende nadelige gevolgen voor het organisme (P3 & P4). Deze integratie gaat is waarschijnlijk het makkelijkst door een combinatie van rationeel ontwerp en evolutie experimenten. Eerst zal het eiwit van de *kill-switch* gefuseerd worden met een essentieel eiwit van het metabolisme. Vervolgens kan dit complex evolueren tot beide onderdelen van het fusie eiwit een essentiële functie hebben in het metabolisme terwijl de *kill-switch* functie gehandhaafd wordt. Hierbij geeft P3 aan dat *directed evolution* een geschikte ontwerp- en optimalisatiemethode is, omdat we nog niet genoeg kennis hebben om rationeel een essentiële eiwit-eiwit interactie te ontwerpen. *Directed evolution* geeft ons de mogelijkheid om te ontwerpen ondanks het gebrek aan kennis.

³ The short answer is yes. [...] Let's say you put in a kill switch. The classic toxin-antitoxin, that has a metabolic burden. Because of the metabolic burden, the assumption is; well, you're now at a disadvantage in the environment. But let's say that you can link this protein production with a more essential enzyme, now I am talking completely abstract, I don't know of any toxin - antitoxin system that would tolerate being part of a fusion, but for instance, if you can code the anti-toxin as a fusion with a core enzyme, while you put the toxin in a place still essential to metabolism, you can now have a system where, yes there is a burden, but that burden is accepted by the cell, because its expression of the core enzyme will improve its fitness, while the toxin is now contained in the side module. So I think there are ways of engineering.

De geïnterviewden beantwoordden ook de vraag of nog onbestaande variaties op *kill-switches* en auxotrofie ontworpen kunnen worden door middel van *directed evolution*. Daarbij werd voornamelijk het idee van nieuwe afhankelijkheden (auxotrofie) geopperd (P1 & P2). Wel was de kanttekening hierbij dat in bijna alle denkbare gevallen rationeel ontwerp en gerichte genetische modificatie functioneler is dan *directed evolution*.

3.2.2 Stabiliteit vergroten door recombinitie te voorkomen

In sommige gevallen wil men voorkomen dat het GGO andere organismen genetisch beïnvloedt en visa versa. Daarvoor moet men laterale (horizontale) informatieoverdracht tegengaan, een strategie die ook tijdens de interviews ter sprake kwam.

Prokaryoten⁴ beschikken over het vermogen om niet alleen over de generaties mutaties door te geven, maar ook tussen individuen genetische informatie uit te wisselen (laterale genoverdracht). In *Bacillus subtilis* is zelfs 16.6% van het genoom afkomstig van laterale genoverdracht (Ochman et al., 2000). Aangezien evolutie door laterale genoverdracht tot snellere verandering kan leiden dan puntmutaties (Vos et al., 2005) is laterale genoverdracht een potentieel doel voor veiligheid in biotechnologie.

Een mogelijkheid om laterale genoverdracht tegen te gaan is het aanpassen van de genetische code van een organisme waardoor genen na overdracht niet 'leesbaar' zijn voor het ontvangende organisme. Dit kan op drie manieren: 1) Het zodanig chemisch veranderen van de bouwstenen (ruggengraat, of nucleïnezuren van het DNA) dat dit leidt tot een chemisch gemodificeerd organisme met een zogenoemd xeno (vreemd) nucleïnezuur (XNA). 2) Het hercoderen van het genetisch materiaal zodat de drie letter codons niet meer overeenkomen met de zelfde gebruikelijke aminozuren. Of 3) Een combinatie van hercodering en chemische modificatie van het genetisch materiaal (Schmidt, 2019). Alle drie de mogelijkheden kunnen een belangrijke bijdrage leveren aan het verminderen van laterale genoverdracht en dragen daarmee bij aan de veiligheid (Acevedo-Rocha and Budisa, 2011; Budisa, 2014; Wright et al., 2015, 2013). *Directed evolution* wordt genoemd als een methode om deze modificaties aan te brengen in bestaande organismen (Schmidt, 2010). *Directed evolution* is met name handig omdat er nog geen kennis beschikbaar is over interacties tussen eiwitten en XNA, dit maakt rationeel ontwerp zeer lastig (P4). In eerder onderzoek werd een combinatie van rationeel ontwerp en zogenaamde chemische evolutie gebruikt om XNA te produceren (Marlière et al., 2011) en werd *directed evolution* toegepast voor het ontwikkelen van de benodigde eiwitten om het XNA te bewerken (Loakes et al., 2009; Pinheiro et al., 2014).

4. Hoe verder met evolutie als design principe?

4.1 Wat voegt evolutie toe aan de Safe-by-Design discussie

4.1.1 Veiligheids dimensies

Aan welke veiligheids dimensies dragen de veiligheidsmechanismen bij en welke potentiële risico's kunnen aangepakt worden met de veiligheidsmechanismen?

Om de functie van de veiligheidsmechanismen te duiden stellen wij twee dimensies van veiligheid voor:

- *De (genetische) stabiliteit;*

Hoe groot is de kans dat het micro-organisme zich aanpast met als gevolg dat de ontworpen functie van het micro-organisme verandert?

- *De controleerbaarheid;*

⁴ Eencellige organismen zonder celkern zoals bijvoorbeeld bacteriën

Kan de ontworpen functie opgeschaald of geremd worden indien gewenst en is de functie plaats- en tijdgebonden?

Hierbij wijzen stabiliteit en controleerbaarheid op de ontworpen eigenschap (katalyse van een bepaald proces - voor voedingsmiddelen, farmaceutische producten of bioremediatie doeleinden). Aan de hand van deze dimensies kunnen de gevonden veiligheidsmechanismen aangeduid worden zoals beschreven in tabel 2.

Tabel 2: Overzicht van de verschillende veiligheidsmechanisme in relatie met de veiligheidsdimensies

Mechanisme	Effect	Reden van effect
<i>Kill-switches</i> en auxotrofie	+ Controleerbaarheid	Het optimaliseren van <i>kill-switches</i> en auxotrofie kan bijdragen aan de <i>controleerbaarheid</i> van de ontworpen functie. Auxotrofie kan een functie namelijk plaats- en tijdgebonden maken en in bepaalde maten de groei van een micro-organisme reguleren. Zowel auxotrofie en <i>killswitches</i> kunnen de functie stoppen indien gewenst (tijdsgebonden).
Stabiliteit vergroten door recombinitie te voorkomen	+ Controleerbaarheid	Het verminderen van laterale gen overdracht kan bijdragen aan de <i>controleerbaarheid</i> . Mocht de ontworpen functie overgedragen worden aan een ander organisme betekent dit dat het niet meer controleerbaar is. Ook als het gebruikte micro-organisme nieuwe functies opneemt (door laterale gen overdracht) zou dit de kennis, over hoe schadelijk het micro-organisme is, verkleinen. Daarnaast draagt het wel bij aan de algemene genetische stabiliteit van het organisme, maar niet zozeer aan de stabiliteit van de ontworpen functie.

4.1.2 Risicocategorieën

Naast de duiding van de veiligheidsdimensies kunnen de gevonden mechanisme ook gebruikt worden voor verschillende risicocategorieën zoals ze zijn beschreven in Robaey (2018)⁵. Het optimaliseren van *kill-switches* of auxotrofie, voorkomt dat een micro-organisme evolueert tot iets dat schadelijk is. Daarmee draagt het bij aan de eerste, tweede en vierde categorie zoals in de inleiding beschreven. Het voorkomen van laterale gen overdracht draagt natuurlijkerwijs bij aan de derde risico categorie. Auxotrofie is wel een mechanisme dat kan helpen voorkomen dat een micro-organisme ontsnapt en voortbestaat buiten een bioreactor.

Ook kan er onderscheid gemaakt worden tussen het gebruik van de veiligheidsmechanismen in micro-organisme bij ingeperkt gebruik (bv. een bioreactor) of doelbewuste introductie (in de natuur). Hierbij zal een *kill-switch* en het tegengaan van laterale genoverdracht in een bioreactor veel minder belangrijk zijn. Het ontworpen organisme kan namelijk (als het goed is) niet in contact komen met andere soorten. Als men micro-organismen in de natuur wil gebruiken voor bijv. bioremediatie, zullen deze mechanismen veel belangrijker zijn omdat er geen andere manieren van controle zijn.

⁵ Zoals beschreven in de introductie zijn er vier risicocategorieën: 1) "Persistence, invasiveness and unintended effects on non-target organisms", 2) "Gene pool contamination", 3) "Horizontal gene transfer" en 4) "Pathogenicity and toxicity to other living organisms like plants, humans and animals".

4.2 Bioremediatie voorbeeld

. Om de toepassing van de verschillende veiligheidsmechanismen te illustreren, wordt de hypothetische afbraak van plastic door micro-organismen gebruikt. In een hypothetische situatie zou men in staat zijn een micro-organisme te ontwerpen met de functie om een bepaald soort plastic af te breken tot minder schadelijke componenten. De afbraak van het plastic is in dit geval 'de ontworpen functie'. Vervolgens kan dit micro-organisme op twee verschillende manieren ingezet worden. Ofwel, het plastic wordt verzameld en in een bioreactor door het micro-organisme afgebroken (ingeperkt gebruik), ofwel het micro-organisme wordt in zee losgelaten om ter plekke het plastic af te breken (doelbewuste introductie). Dit voorbeeld focust op doelbewuste introductie.

De doelbewuste introductie gaat gepaard met veel meer onzekerheden en risico's omdat er geen fysieke beperkingen zijn. Voordelen van de doelbewuste introductie kunnen zijn dat het zelf organiserend is en dat de af te breken stof niet getransporteerd hoeft te worden. Dat kan helpen in het geval van microplastics, die moeilijk te verzamelen zijn.

4.2.1 Controleerbaarheid

Daarbij is het belangrijk om voldoende controle te hebben over het afbreken van plastic. Het afbreken van plastic moet op een bepaalde plek gebeuren en mag niet overal plaatsvinden. Men wil niet dat ook het bruikbare plastic in huize, of fabrieken wordt afgebroken. De functie moet dus beperkt worden tot gebieden in de zee waar plastic afval voor komt. Daarbij is het wenselijk als men ook de afbraak snelheid kan reguleren, afhankelijk van de hoeveelheid plastic. Het voordeel van het gebruik van levende organisme is dat het zelfregulerend kan zijn. Om te zorgen dat de functie niet overal plaatsvindt moet zowel het organisme beperkt worden in zijn leefgebied, als voorkomen worden dat het organisme zijn functie doorgeeft aan een ander soort dat niet gecontroleerd kan worden in zijn leefgebied. Dit doorgeven van de functie kan voorkomen worden door het gebruikte organisme volledig te baseren op XNA in plaats van DNA, of het hercoderen van het DNA (zorgen dat codons gekoppeld worden aan andere aminozuren). Voor het gebruik van XNA moet een bestaand genoom chemisch gemodificeerd worden, het bouwen van een volledig synthetisch genoom ligt momenteel nog buiten de mogelijkheden. Deze aanpassing zorgt ervoor dat als andere organisme de genen voor het afbreken van plastic krijgen, ze dit niet kunnen gebruiken. Hierdoor blijft de functie beperkt tot het ontworpen micro-organisme.

Auxotrofie kan de omgevingen beperken waar het organisme kan leven. Een auxotrofie (hetzelfde geldt voor een *kill-switch*) kan ontworpen worden middels *directed evolution* en toegevoegd worden aan het micro-organisme met een gerichte bewerking (met bijvoorbeeld de CRISPR techniek). Een auxotrofie bestaat als een organisme bijvoorbeeld één van de chemische gemodificeerde aminozuren niet zelf kan produceren. Men voegt dit aminozuur dan toe in de gebieden waar plastic afgebroken moet worden. Hierdoor kan het micro-organisme alleen hier leven en niet ontsnappen naar andere gebieden. Ook kan de groei beperkt worden door slechts een beperkte hoeveelheid aminozuur toe te voegen.

Daarnaast moet er regelmatig een monster genomen worden om te controleren in hoeverre het organisme genetisch verandert. Mocht dit een ongewenste wending nemen kan middels een toegevoegde *kill-switch* het organisme gedood worden door een specifieke chemische stof toe te voegen. Als er gebruik gemaakt wordt van auxotrofie kan er ook gestopt worden met het toevoegen van het essentiële aminozuur.

4.3 Generalisatie van de gevonden technieken

De mechanismen zijn toepasbaar in alle gebieden waarbij levende, reproducerende micro organisme gebruikt worden. Voorbeelden hiervan kunnen onder andere gevonden worden in de katalyse van verschillende

reacties in de industrie (pharmaceutisch, levensmiddelen, chemische producten), bij het gebruik van (synthetische) levende vaccins of bij de afbraak van vervuilende of giftige stoffen (bioremediatie). De mechanisme zijn overbodig bij processen waarbij organisme niet reproduceren (zoals vaak bij genetisch gemodificeerde gewassen) omdat hierin geen evolutie plaatsvindt. Daarnaast zijn deze technieken sowieso een stuk lastiger toepasbaar in meercellige organisme.

5. Conclusie

Veiligheid is de waarde die tastbaar gemaakt kan worden door stabiliteit en controleerbaarheid. Deze twee concepten kunnen worden omgezet tot functies die men kan ontwerpen. In dit project zijn twee ideeën voor Safe-by-Design strategieën gevonden die door *directed evolution* gerealiseerd kunnen worden. Beide ideeën zullen verder onderzoek nodig hebben om functioneel als veiligheidsmechanisme te kunnen worden ingezet. Ten eerste, het tegengaan van laterale gen overdracht door het gebruik van XNA is gebaseerd op het vergroten van de controle over de ontworpen functie in een GGO. En ten tweede, het verbeteren van *kill-switches* en auxotrofie zorgt ervoor dat er meer mogelijkheden zijn om in te grijpen als evolutie een ongewenste wending maakt. Door het gebrek aan kennis, in zowel het gebruik van XNA (xeno nucleic acid) en in het essentieel maken van auxotrofie en *kill-switches*, is het (nog) niet mogelijk dit rationeel te ontwerpen waardoor *directed evolution* een uitkomst biedt.

Alhoewel Safe-by-Design soms gelijkgesteld wordt aan inherente veiligheid, is dit in biotechnologie een grote uitdaging. De gevonden strategieën dragen voornamelijk bij aan de controle die men over een ontworpen functie heeft, maar er blijft altijd een grote onzekerheid bij het werken met levende organisme de onderhevig zijn aan evolutie. Hierdoor is het naast *directed evolution* interessant om te kijken naar hoe evolutie als concept zelf invloed kan hebben op de veiligheid van GGO's. Kan evolutie na de introductie van het GGO ingezet, voorspeld, of beïnvloed worden om een organisme veiliger te maken? En Is inherente veiligheid überhaupt mogelijk in biotechnologie? Dit hangt samen met de vraag of Safe-by-Design strategieën noodzakelijk zijn voor biotechnologie zolang GGO's alleen toegepast worden in ingeperkt gebruik.

Daarnaast is het interessant om te kijken naar de kloof tussen de bewezen risico's en de verwachte risico's rond GGO's en evolutie. Dit omdat in de interviews vaak aangegeven wordt dat veel moleculair biologen zich geen zorgen maken over de veiligheidsrisico's bij het werken met GGO's. Dit is tegengesteld aan de publieke perceptie; waar GGO's als oncontroleerbaar gezien worden.

Referenties

- Acevedo-Rocha, C.G., Budisa, N., (2011). On the road towards chemically modified organisms endowed with a genetic firewall. *Angewandte Chemie International Edition* 50 6960–6962.
- Bouchaut, B., Asveld, L., (2019). Safe-by-Design: Stakeholders' perceptions and expectations of how to deal with uncertain risks of emerging biotechnologies. *Submitted manuscript*.
- Budisa, N., (2014). Xenobiology, new-to-Nature synthetic cells and genetic firewall. *Curr. Org. Chem.* 18, 936–943
- Loakes, D., Gallego, J., Pinheiro, V., Kool, E. T., Holliger, P., (2009). Evolving a Polymerase for Hydrophobic Base Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 131 14827-14837
- Marlière, P., Patrouix, J., Döring, V., Herdewijn, P., Tricot, S., Cruveiller, S., Bouzon, M., Mutzel, R., (2011). Chemical Evolution of a Bacterium's Genome. *Angewandte Chemie International Edition* 50(31) 7109-7114
- Molin, S., Boe, L., Jensen, L. B., Kristensen, C. S., Givskov, M., Ramos, J. L., Bej, A. K. (1993). SUICIDAL GENETIC ELEMENTS AND THEIR USE IN BIOLOGICAL CONTAINMENT OF BACTERIA *Annu. Rev. Microbiol.* 47 139-166

Ochman, H., Lawrence, G. L., Groisman, E. A., (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304 <https://doi.org/10.1038/35012500>

Pinheiro, V. B., Arangundy-Franklin, S., Holliger, P., (2014). Compartmentalized Self-Tagging for In Vitro-Directed Evolution of XNA Polymerases. *Current protocols in Nucleic Acid Chemistry* 57(1) 9.9.1-9.9.18 DOI: [10.1002/0471142700.nc0909s57](https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0909s57)

Robaey, Z., (2018). Dealing with risks of biotechnology: understanding the potential of Safe-by-Design. Report commissioned by the Dutch Ministry of Infrastructure and Water Management DOI: 10.13140/RG.2.2.13725.97769

Vos, M., Hesselman, M. C., te Beek, T. A., van Passel, M. W. J., Eyre-Walker, A., (2015). Rates of Lateral Gene Transfer in Prokaryotes: High but Why?. *Trends in Microbiology* 23(10) 598-605 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.006>

Schmidt, M. (2010). Xenobiology: A new form of life as the ultimate biosafety tool. *BioEssays* 32 322-331 <http://dx.doi.org/10.1002/bies.200900147>

Schmidt, M. (2019). A metric space for semantic containment: Towards the implementation of genetic firewalls. *BioSystems* 185 <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2019.104015>

Stirling, F., Bitzan, L., O'Keefe, S., Redfield, E., Oliver, J. W. K., Way, J., Silver, P. A., (2017) Rational Design of Evolutionarily Stable Microbial Kill Switches. *Molecular Cell* 68(4) 686-697 doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.033.

Wright, O., Delmans, M., Stan, G.B., Ellis, T., (2015). GeneGuard: a modular plasmid system designed for biosafety. *ACS Synth. Biol.* 4 307–316.

Wright, O., Stan, G.B., Ellis, T., (2013). Building-in biosafety for synthetic biology. *Microbiology* 159 1221–1235.