Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Federal Research Centre for Cultivated Plants

MRI
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

THÜNEN
Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

BfR
Bundesinstitut für Risikobewertung

Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft

- überarbeitete Fassung vom 23.02.2018 -

Bartsch, D.[1], Bendiek, J.[1], Braeuning, A.[2], Ehlers, U.[1], Dagand, E.[1], Duensing, N.[1], Fladung, M.[3], Franz, C.[4], Groeneveld, E.[5], Grohmann, L.[1], Habermann, D.[4], Hartung, F.[6], Keilwagen, J.[6], Leggewie, G.[1], Matthies, A.[1], Middelhoff, U.[1], Niemann, H.[5], Petersen, B.[5], Scheepers, A.[1], Schenkel, W.[1], Sprink, T.[6], Stolz, A.[1], Tebbe, C.[3], Wahler, D.[1], Wilhelm, R.[6]

[1] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
[2] Bundesinstitut für Risikobewertung
[3] Thünen-Institut
[4] Max Rubner-Institut
[5] Friedrich Löffler-Institut,
[6] Julius Kühn-Institut,

BVL_FO_04_0022_000_V1.1

Vorwort:

Die Züchtung von Pflanzen und Tieren sowie die Nutzung von Mikroorganismen für die Lebens- und Futtermittelherstellung sind eng mit technischen Methoden verbunden. Durch den wissenschaftlichen Fortschritt sind in den letzten Jahren neue molekularbiologische Techniken hinzugekommen, die einen schnelleren und effizienteren Züchtungs- und Entwicklungsfortschritt erlauben.

Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) hat in seinem „Grünbuch Ernährung, Landwirtschaft, Ländliche Räume“ vom Dezember 2016 das Ziel formuliert, zu den neuen molekularbiologischen Techniken eine fundierte Beurteilungsbasis zu schaffen. Auf Basis ihrer breiten Fachkompetenz haben die Ressortforschungseinrichtungen BVL, JKI, FLI, TI, MRI und BfR den vorliegenden Bericht zu grundlegenden naturwissenschaftlichen Fachzusammenhängen mit Sachstand 3. Juli 2017 erstellt. Darüber hinaus wurden über den Geschäftsbereich des BMEL hinaus Stellungnahmen des Bundesamtes für Naturschutz (BfN) und des Robert Koch-Institutes (RKI) berücksichtigt. Die Anmerkungen des BfN wurden nicht vollständig übernommen.

Dieser Bericht soll die Beurteilungsbasis und den Dialogprozess des BMEL in Deutschland und der EU unterstützen.

0 INHALTSVERZEICHNIS

0 Inhaltsverzeichnis 3
1 Zusammenfassung des Wissenschaftlichen Berichts 6
2 Einleitung 8
2.1 Zum Auftrag 8
2.2 Begriffe 9
2.3 Literatur: 12
3 Modul I: Eingrenzung des Diskussionsraums 13
4 Modul II: Spezifische Merkmale der *Genome Editing*-Techniken 14
4.1 Zusammenfassung Modul II: 14
4.2 Einleitung 14
4.3 Funktionsweise des *Genome Editing* 16
4.4 Techniken des *Genome Editing* 18
4.4.1 Meganukleasen 18
4.4.2 Zinkfingernukleasen 18
4.4.3 TALEN 19
4.4.4 CRISPR/Cas9 19
4.4.5 Oligonucleotide Directed Mutagenesis“ 19
4.4.6 „Base Editing“ 20
4.5 Vergleichende Betrachtung der methodenspezifischen Merkmale und Risiken 20
4.5.1 Unbeabsichtigte Effekte 21
4.5.2 Beeinflussung der Expression von Nicht-Ziel-Genen, pleiotrope Effekte 30
4.6 Beabsichtigte Effekte 34
4.6.1 Multiple Genomveränderungen 34
4.6.2 Beabsichtigte pleiotrope Effekte 38
4.7 Literatur 39
5 Modul III: Nachweis und Identifizierbarkeit 43
5.1 Zusammenfassung des Moduls III 43
5.2 Einleitung 43
5.3 Verfahren des *Genome Editing* im Rahmen des Berichts 45
5.4 Generelle Vorüberlegungen 46
5.5 Nachweis von genetischen Veränderungen, Identifizierung genomeditierter Organismen 47

5.5.1 Analyseverfahren für zielgerichteten Nachweis und die Identifizierung des genomeditierten Organismus 48
5.5.2 Analyseverfahren für den nicht-zielgerichteten Nachweis der Veränderung und Identifizierung des genomeditierten Organismus 50
5.5.3 Bioinformatische Analysen, statistische Betrachtungen und Wahrscheinlichkeit der Identifizierung des genomeditierten Organismus 52
5.6 Analyseverfahren zur Identifizierbarkeit der Technik 55
5.7 Rückverfolgbarkeit 55
5.8 Literatur 56
6 Modul IV: Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* 58
6.1 Zusammenfassung des Moduls IV: 58
6.2 Einleitung 58
6.3 Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in der Pflanzenzüchtung 60
6.3.1 Etablierte Verfahren in der Pflanzenzucht 60
6.3.2 Anwendung von DNA Nukleasen und ODM-Techniken bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen 61
6.3.3 Herbizidtoleranz 63
6.3.4 Krankheitsresistenzen 62
6.3.5 Geänderte Zucht- oder Produkteigenschaften 62
6.4 Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in der Tierzucht 64
6.4.1 Einführung in die landwirtschaftliche Tierzucht 64
6.4.2 Etablierte Verfahren der genetischen Modifikation bei Nutztieren 64
6.4.3 Anwendung von DNA-Nukleasen bei landwirtschaftlichen Nutztieren 65
6.4.4 Anwendungsmöglichkeiten des *Genome Editing* bei Nutztieren: 65
6.5 Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* bei Mikroorganismen, die bei der Herstellung von Lebens— bzw. Futtermitteln verwendet werden 69
6.5.1 Zielgerichtete Mutagenese 69
6.5.2 Genexpressions-Modulation 70
6.5.3 ‚Impfung' biotechnologisch wichtiger Stämme 70
6.5.4 Genotypisierung von Bakterienstämmen 70
6.5.5 CRISPR/Cas9 als antimikrobielles Agens? 71
6.6 Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in der Human- und Veterinärmedizin 72
6.7 Literatur: 73
7 Danksagung 78

BVL_FO_04_0022_000_V1.1

1 ZUSAMMENFASSUNG DES WISSENSCHAFTLICHEN BERICHTS

Der rapide wissenschaftliche Fortschritt auf dem Gebiet der Molekularbiologie hat in den letzten Jahren zu Methoden geführt, die unter dem Begriff *Genome Editing* zusammengefasst werden. Unter *Genome Editing* werden gerichtete und gezielte Änderungen der Nukleotidsequenz des Genoms von Organismen verstanden, wobei sich „gerichtet“ auf den Ort der Veränderung und „gezielt“ auf Ort und Art der Veränderung bezieht.

Die spezifischen Merkmale des *Genome Editings* sind für das international anerkannte Prinzip der ‚Vergleichenden Sicherheitsbewertung‘ sowie der technischen Nachweisbarkeit und Identifizierbarkeit von behandelten Organismen zu berücksichtigen. Dieser Bericht analysiert fachwissenschaftlich diese spezifischen Merkmale ohne eine – zurzeit umstrittene – rechtliche Einordnung vorzunehmen. Der Bericht gliedert sich in vier unabhängige Module

I. Eingrenzung des Diskussionsraums (Kapitel 3)
II. Spezifische Merkmale der *Genome Editing*-Techniken (Kapitel 4)
III. Nachweis von genetischen Veränderungen, Identifizierung genomeditierter Organismen und Identifizierbarkeit der Technik, mit der genetische Veränderungen erzeugt wurden (Kapitel 5)
IV. Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in den Bereichen Landwirtschaft, Ernährung, Human- und Veterinärmedizin (Kapitel 6)

Das *Genome Editing* stellt nach jetzigem Kenntnisstand eine deutliche Verbesserung in Präzision, Effizienz und Kontrollierbarkeit gegenüber bisherigen Genmodifikations- (Mutagenese) und Gentransferverfahren dar. Die Identifizierung eines *genom-editierten* Organismus und die Unterscheidung von anderen Organismen sind nur unter bestimmten Voraussetzungen und nur im Vergleich zu einer Referenz eindeutig möglich. Je geringer die Unterschiede zur Referenz werden, desto schwieriger ist die Identifizierungsmöglichkeit. Nur ergänzende Informationen über den Entwicklungsweg und die Änderungen erlauben im Einzelfall eine eindeutige Rückverfolgbarkeit. Ob nachgewiesene genetische Veränderungen durch Techniken des *Genome Editing* oder andere Techniken erzeugt wurden, ist nicht zweifelsfrei zu klären.

Die neuen *Genome Editing*-Methoden werden in der Pflanzen- und Tierzucht zur Förderung der Krankheitsresistenz, Toleranz gegen widrige Umweltbedingungen und zur Veränderung von Produkteigenschaften eingesetzt. Dies setzt eine umfassende Kenntnis des zu modifizierenden Genoms und der Funktionen voraus, um zielgerichtet Merkmale zu verändern. Das

Genome Editing ergänzt damit andere Züchtungsverfahren wie Kreuzung und Selektion, die in der Entwicklung von Sorten/Rassen mit komplexen Merkmalen von grundlegender Bedeutung sind. Bei der Tierzucht stehen in Bezug auf das *Genome Editing* zudem Tierschutz und der Einsatz von Nutztieren in der Biomedizin im Fokus. Bei Mikroorganismen sollen Stoffwechselwege beeinflusst oder neu gestaltet werden *(Metabolic Engineering)* und bestehende Produktionslinien durch Veränderung von Genaktivitäten modifiziert werden. Die Technik kann die Resistenz von mikrobiellen Kulturstämmen gegen Bakteriophagenbefall erhöhen oder sogar als antimikrobielles Agens dienen. Insgesamt ist von der Technik eine Beschleunigung der Züchtung zu erwarten mit dem Ergebnis, bestehende Zuchtziele schneller und effizienter erreichen zu können.

Das *Genome Editing* führt insbesondere beim Einsatz zeitgemäßer Verfahren sehr selten zu Nebeneffekten wie Off target-Effekten, Effekte auf angrenzende Gene bzw. pleiotrope Effekte. Für die Nebeneffekte gibt es zuverlässige und ausreichend sensitive Nachweisverfahren. Das *Genome Editing* stellt daher eine deutliche Verbesserung in Präzision, Effizienz und Sicherheit gegenüber klassischen Genmodifikations- (Mutagenese) und Gentransferverfahren dar. Dies bedeutet nicht, dass es bei klassischen Mutageneseverfahren zu erhöhten oder bisher unberücksichtigten Risiken kommt. Das Mutageneseverfahren wird seit langer Zeit angewendet und daraus entstehende Pflanzen mit unerwünschten Merkmalen werden bei der nachfolgenden Sortenprüfung ausgesondert.

2 EINLEITUNG

2.1 ZUM AUFTRAG

Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) verfolgt die Entwicklungen und Diskussionen zu den neuen Züchtungstechniken bei Pflanzen und Tieren mit großem Interesse. In diesem Zusammenhang hat auch die EU Kommission den Mechanismus für wissenschaftliche Beratung (SAM) um eine aktuelle wissenschaftliche Erläuterung zu den neuen Techniken der Pflanzenzüchtung und Tierzucht und bestimmten Anwendungen der Lebensmittelerzeugung gebeten.

Vor diesem Hintergrund bat das BMEL[1] um einen wissenschaftlichen Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft. Der Bericht wurde durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), das Julius Kühn-Institut (JKI), das Thünen-Institut (TI) und das Max Rubner Institut (MRI) erarbeitet. Das Bundesamt für Naturschutz (BfN) und das Robert Koch-Institut (RKI) wurden beteiligt.

Der vorliegende Bericht gliedert sich in vier unabhängige Module

I. Eingrenzung des Diskussionsraums

II. Spezifische Merkmale der *Genome Editing*-Techniken

III: Nachweis von genetischen Veränderungen, Identifizierung genomeditierter Organismen und Identifizierbarkeit der Technik, mit der genetische Veränderungen erzeugt wurden

IV Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in den Bereichen Landwirtschaft, Ernährung, Human- und Veterinärmedizin

Dieser Bericht soll den offenen und transparenten Dialogprozess mit den Interessenträgern unterstützend begleiten, den das BMEL in Deutschland im Frühjahr 2017 begonnen hat.

BVL_FO_04_0022_000_V1.1

[1] Erlasse vom 29. November 2016 und 16. Januar 2017

2.2 BEGRIFFE

Die Information zur Bildung und zur Aufrechterhaltung eines Organismus ist in der DNA gespeichert, deren Gesamtheit man als Genom bezeichnet. Eine Kopie des Genoms eines Organismus liegt in jeder Zelle vor. Die DNA besteht aus Milliarden von vier Bausteinen (Nukleotiden), die in einem Strang angeordnet sind und eine spezifische Abfolge bilden (die Nukleotidsequenz). Jeweils zwei dieser Stränge binden aneinander und formen so ein Doppelstrangmolekül, das sich durch Zusammenfaltung zu einem mikroskopisch sichtbaren Chromosom organisiert, welches bei höheren Organismen im Zellkern lokalisiert ist. Weitere DNA-haltige Bereiche in der Zelle sind die Mitochondrien und, zusätzlich bei Pflanzen, die Plastiden (u.a. Chloroplasten). Neben den Chromosomen existieren in den Zellen vieler Bakterien und selten auch bei höheren Organismen auch kleinere, extrachromosomale DNA-Moleküle wie etwa Plasmide. Nur Teilbereiche einer DNA-Sequenz eines Chromosoms tragen Geninformationen, die Enzyme kodieren. Andere Bereiche haben regulatorische, teilweise keine direkten oder unbekannten Funktionen. Ihre Aktivität führt zu spezifischen Stoffwechselprozessen in der Zelle. Eine Veränderung dieser Gene hat daher auch eine Veränderung dieser Prozesse zur Folge.

Eine solche Veränderung ist seit jeher das Ziel von Pflanzenzüchtung und Tierzucht, denn Stoffwechselprozesse sind letztendlich für die Eigenschaften eines Organismus verantwortlich. Zu den herkömmlichen Züchtungsmethoden gehört auch die Nutzung von Mutationen, die spontan durch natürliche Prozesse (z. B. bei der natürlichen Rekombination oder durch UV-Strahlung) entstehen, sowie von Mutationen, die bewusst, z. B. durch ionisierende Strahlen oder erbgutverändernde Chemikalien, hervorgerufen werden (Mutagenese). Die Stelle der durch solche Verfahren induzierten Mutationen im Genom ist nicht beeinflussbar und auch die Zahl der erzeugten Mutationen ist sehr hoch. Dies macht einen langwierigen Rückkreuzungs- und Selektionsprozess nötig, um ungewollte Mutationen aus dem Genom zu entfernen. Klassische Mutagenesezüchtung hat laut der Joint FAO/IAEA Mutant Variety Datenbank mittlerweile mehr als 3000 Kulturpflanzenvarietäten hervorgebracht. Seit Anfang der 1990er Jahre ist die Gentechnik hinzugekommen. Sie ermöglicht die Übertragung von genetischem Material zwischen Organismen, zwischen denen dieser Austausch natürlicherweise nicht stattfindet. Um die Bewertung und gegebenenfalls Kontrolle möglicher Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier und für die Umwelt sicherzustellen, sind die experimentelle Freisetzung (zeitlich und räumlich begrenzt) und das Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in der Europäischen Union genehmigungspflichtig.

Der rapide wissenschaftliche Fortschritt auf dem Gebiet der Molekularbiologie seit Inkrafttreten des EU-Gentechnikrechts im Jahr 1990 hat dazu geführt, dass heute eine Reihe neuer Methoden zur Veränderung der genetischen Ausstattung von Pflanzen und Tieren zur Verfügung stehen, bei denen umstritten ist, ob die mit ihrer Hilfe veränderten Organismen unter die Regelungen des Gentechnikrechts fallen oder nicht. Hierunter sind jene Methoden von besonderem Interesse, die unter dem Begriff *Genome Editing* zusammengefasst werden. Unter *Genome Editing* werden gerichtete Änderungen der Nukleotidsequenz des Genoms von Organismen verstanden, wobei sich „gerichtet“ auf den Ort der Veränderung bezieht.

Die Nutzung ortsspezifischer Nukleasesysteme (z. B. CRISPR/Cas9, Zinkfingernukleasen, TALENs) erlaubt ein solches Einbringen genetischer Veränderungen in ein Genom, welche von Punktmutationen bis hin zur Insertion großer DNA-Segmente oder Deletionen reichen können. Ortsspezifische Nukleasesysteme (auch „*Site Directed Nucleases*, kurz SDN genannt) bestehen aus zwei Komponenten. Eine Komponente bindet an eine spezifische Nukleotidsequenz (Zielsequenz) in der doppelsträngigen DNA des Zielgenoms. Hierbei kann es sich je nach System um eine Protein- oder eine Nukleinsäurekomponente handeln. Die zweite Komponente besitzt eine Endonukleaseaktivität. Diese Nuklease erzeugt neben ihrer Zielsequenz einen DNA-Doppelstrangbruch, an dem abhängig von der angewendeten Technik unterschiedliche genetische Veränderungen eintreten können.

Bei der SDN 1-Technik wird der erzeugte Doppelstrangbruch durch einen zelleigenen DNA-Reparaturmechanismus, dem *non-homologous end joining* (NHEJ), repariert. Dabei entstehen zufällige, ein oder wenige Nukleotide umfassende Mutationen, also ein Austausch, eine Insertion oder eine Deletion einzelner oder weniger Nukleotide.

Bei der SDN 2-Technik werden zusammen mit dem ortsspezifischen Nukleasesystem auch kleine DNA-Fragmente in den Organismus eingebracht. Die eingebrachte DNA dient als Reparaturmatrize, dazu ist sie homolog zu den Flanken des von der Nuklease erzeugten Doppelstrangbruchs. An der Stelle des Doppelstrangbruchs unterscheidet sich ihre Nukleotidsequenz jedoch um ein oder wenige Nukleotide von der Zielsequenz. Bei der Reparatur des Doppelstrangbruchs durch einen zelleigenen DNA-Reparaturmechanismus unter Verwendung der eingeführten DNA, dem *homology directed repair* (HDR), wird die Sequenzänderung im Genom verankert. Dabei wird die Fehlstelle nach Vorgabe durch die Matrize durch Replikation geschlossen. So können Mutationen von einem oder wenigen Nukleotidpaaren bzw. eine kleine Insertion oder Deletion gezielt in die zelluläre Sequenz eingebracht werden.

Bei der SDN 3-Technik wird zusammen mit dem ortsspezifischen Nukleasesystem eine rekombinante DNA in die Zelle eingebracht und damit das gerichtete Kopieren eines bis zu mehrere tausend Nukleotiden langen DNA-Segmentes in die Zielsequenz ermöglicht. Das DNA-Segment ist von Abschnitten flankiert, die homolog zu der DNA um die Zielsequenz sind. Bei der Reparatur des Doppelstrangbruchs wird das DNA-Segment zielgerichtet durch homologe Rekombination in die Zielsequenz kopiert.

Bei der Verbesserung von Kulturpflanzen stößt die SDN 1-Technik an Grenzen, da mit ihr zwar an einer bestimmten Stelle im Genom ein Doppelstrangbruch erzeugt wird, das Ergebnis der nachfolgenden Reparatur durch NHEJ jedoch nicht genau vorhersagbar ist. In den meisten Fällen bewirkt die Anwendung der SDN 1-Technik durch eine Leserahmenverschiebung den knock-out des betreffenden Gens. Aus diesem Grund haben Wissenschaftler die Nuklease des CRISPR/Cas9 Systems so verändert, dass Punktmutationen ohne Erzeugung eines Doppelstrangbruchs sowohl örtlich als auch vom Ergebnis her gezielt erfolgen können (Base Editing). Dazu wird ein verändertes Cas9-Protein verwendet, welches die DNA zwar bindet, diese jedoch nicht mehr schneidet. Diese modifizierte Cas9-Nuklease ist z.B. mit einer Cytidin-Deaminase fusioniert, die Cytidin in Thymidin und Guanosin in Adenosin umwandelt (Komor *et al.*, 2016). Damit sind gezielte Umwandlungen eines bestimmten Nukleotids des Genoms in ein anderes Nukleotid möglich. Diese Methode ist prinzipiell auch für andere SDN-Techniken denkbar. Da dieser Ansatz ohne den Einsatz zusätzlicher DNA wie etwa bei der SDN 2-Technik auskommt, kann es nicht zu deren zufälligem Einbau in das pflanzliche Genom kommen.

Die Komponenten ortsspezifischer Nukleasesysteme können grundsätzlich auf unterschiedliche Weise in einen Organismus eingebracht werden. Die DNA für die beteiligten Komponenten kann entweder in das Genom des Organismus integriert werden oder auf einer vorübergehend anwesenden rekombinanten DNA (z.B. einem Plasmid) vorliegen. Wenn die Komponenten in das Genom integriert wurden, enthält der zunächst erzeugte Organismus gentechnisch veränderte DNA. Nachkommen, die als finales Produkt verwendet werden sollen, werden aber in der Regel durch nachfolgende Kreuzungs- und Selektionsschritte so generiert, dass sie zwar die genomeditierte Veränderung tragen, aber keine gentechnisch veränderte DNA mehr enthalten (Null-Segreganten). Alternativ können die Komponenten als RNA und/ oder als Protein direkt in die Zelle eingebracht werden (präassembliertes System).

Bei der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese (ODM) werden synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 20 bis 100 Nukleotiden in die Zelle eingebracht, um an einer bestimmten Sequenz ortsspezifisch Mutationen zu erzeugen. Die Technik beruht auf der sequenzspezifischen Wechselwirkung des Oligonukleotids mit seiner Zielsequenz im Genom der Zelle. Das eingesetzte Oligonukleotid ist fast vollständig homolog zu seiner Zielsequenz, es enthält

jedoch mindestens ein abweichendes Nukleotid. Dadurch kommt es zu einer Fehlpaarung zwischen Oligonukleotid und genomischer DNA. Die wird durch zelleigene Mechanismen erkannt und repariert, indem das veränderte Nukleotid an der entsprechenden Stelle eingebaut wird. Die Mutationen sind hier meistens Austausche von einzelnen oder wenigen Nukleotiden, es können aber auch kurze Deletionen oder Insertionen sein. Es werden verschiedene Arten von Oligonukleotiden eingesetzt (Laible *et al*., 2006; Simon *et al*., 2008; Storici, 2008). Dazu zählen einzelsträngige DNA, chimäre Oligonukleotide mit Anteilen von RNA und DNA, Oligonukleotide, die durch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken eine Triple-Helix mit der Zielsequenz bilden (*triplex-forming oligonucleotides*; TFO) und RNA-Oligonukleotide. Einige der Oligonukleotide werden auch mit veränderten Nukleobasen und/oder modifizierter Ribose zwecks Erhöhung der Bindung zur Zielsequenz eingesetzt, sogenannte *locked nucleic acids* (LNA). Für die Triple-Helix-Bildung eignen sich ebenso über Peptidbindungen verknüpfte Nukleobasen (sog. *peptide nucleic acids*; PNA).

2.3 LITERATUR:

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, Nature, 533, 420-424.

Laible G, Wagner S, Alderson J (2006) Oligonucleotide-mediated gene modification and its promise for animal agriculture, Gene, 366, 17-26.

Simon P, Cannata F, Concordet JP, Giovannangeli C (2008) Targeting DNA with triplex-forming oligonucleotides to modify gene sequence, Biochimie, 90, 1109-1116.

Storici F (2008) RNA-mediated DNA modifications and RNA-templated DNA repair, Current Opinion in Molecular Therapy, 10, 224-230.

3 MODUL I: EINGRENZUNG DES DISKUSSIONSRAUMS

Der Bericht ist wissenschaftlicher Natur und soll den aktuellen Stand der Technik darstellen. Die rechtliche Einordnung von Organismen, die mit Hilfe der neuen Techniken verändert wurden, ist nicht Gegenstand der Diskussion in den Modulen.

In Modul II werden die verschiedenen Methoden des *Genome Editing* dargestellt und mit den herkömmlichen Verfahren der Pflanzenzüchtung und Tierzucht sowie mit der klassischen Gentechnik (DNA-Rekombinationstechniken) verglichen.

Bei der Bewertung werden sowohl die Folgen der beabsichtigten Auswirkungen (*intended effects*) als auch der unbeabsichtigten Auswirkungen (*unintended effects*) der Techniken betrachtet. Nicht behandelt werden mögliche Risiken, die an die neu entstandenen Eigenschaften gekoppelt sind, da diese unabhängig von der eingesetzten Züchtungsmethode sind. Des Weiteren wird in Modul III die Frage der Nachweisbarkeit bzw. Identifizierbarkeit von Organismen diskutiert, die mittels *Genome Editing* verändert wurden.

Die Anwendungspotenziale des *Genome Editing* im Bereich Ernährung und Landwirtschaft werden in Modul IV vorgestellt.

Die folgenden Verfahren des *Genome Editing* werden im Rahmen dieser Module betrachtet:

- Nutzung ortsspezifischer Nukleasesysteme (*site directed nucleases*; SDN 1, SDN 2, SDN 3);
- Base Editing ohne Doppelstrangbruch;
- Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (*oligonucleotide directed mutagenesis*; ODM).

Nicht in den Modulen behandelt werden Synthetische Biologie und Gene Drive.

- Die unter dem Begriff Synthetische Biologie diskutierten Techniken bzw. Konzepte sind so unterschiedlich, dass eine für alle diese Techniken gültige Darstellung und Diskussion weder sinnvoll noch möglich ist.
- Gene Drive-Systeme stellen eine spezielle Anwendung des *Genome Editing* mittels ortsspezifischer Nukleasen dar. Die Verwendung von Gene Drive-Systemen in der Pflanzen- oder Tierzüchtung ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand unwahrscheinlich.

BVL_FO_04_0022_000_V1.1

4 MODUL II: SPEZIFISCHE MERKMALE DER GENOME EDITING-TECHNIKEN

4.1 ZUSAMMENFASSUNG MODUL II:

Unbeabsichtigte Mutationen (*Off target*-Mutationen), pleiotrope oder Positionseffekte treten bei Pflanzen und Tieren bei jeder Kreuzung und jeder induzierten Mutagenese auf. Diese müssen durch einen aufwändigen Rückkreuzungs- und Selektionsprozess in der weiteren Züchtung entfernt werden. Das *Genome Editing* führt insbesondere beim Einsatz zeitgemäßer Verfahren selten zu *Off target*-Effekten. Für diese *Off target*-Effekte gibt es zuverlässige und ausreichend sensitive Nachweisverfahren. Auch unbeabsichtigte Effekte auf angrenzende Gene bzw. pleiotrope Effekte sind nur in geringem Ausmaß zu erwarten. Die Wahrscheinlichkeit von nicht gewünschten Effekten ist bei *Genome Editing* mit der ortsgerichteten Nuklease-Technik geringer als bei der Mutagenesezüchtung (Pflanzen) und auch teilweise bei der klassischen Züchtung. Multiple gezielte Genomveränderungen sind mit *Genome Editing* besser realisier- und kontrollierbar als mit klassischen Verfahren. Dies gilt sowohl für Pflanzen und Tiere als auch für Mikroorganismen.

Das *Genome Editing* stellt daher nach jetzigem Kenntnisstand eine deutliche Verbesserung in Präzision, Effizienz und Kontrollierbarkeit gegenüber bisherigen Genmodifikations- (Mutagenese) und Gentransferverfahren dar.

4.2 EINLEITUNG

Die Information zur Bildung und zur Aufrechterhaltung eines Organismus ist in der DNA gespeichert, deren Gesamtheit man als Genom bezeichnet. Eine Kopie des Genoms eines Organismus liegt in jeder seiner Zellen vor. Die DNA besteht aus bis zu mehreren Milliarden von vier Bausteinen (Nukleotiden), die in einem Strang angeordnet sind und eine spezifische Abfolge bilden (die Nukleotidsequenz). Jeweils zwei dieser Stränge binden aneinander und formen so ein Doppelstrangmolekül, das sich durch Zusammenfaltung zu einem mikroskopisch sichtbaren Chromosom organisiert, welches bei höheren Organismen im Zellkern lokalisiert ist. Weitere DNA-haltige Bereiche in der Zelle sind die Mitochondrien und, zusätzlich bei Pflanzen, die Plastiden (u.a. Chloroplasten). Neben den Chromosomen existieren in den

Zellen vieler Bakterien und selten auch bei höheren Organismen auch kleinere, extrachromosomale DNA-Moleküle wie etwa Plasmide. Nur Teilbereiche einer DNA-Sequenz eines Chromosoms tragen Geninformationen, die Enzyme kodieren. Andere Bereiche haben regulatorische, teilweise keine direkten oder unbekannten Funktionen. Der Mensch hat etwa 42.000 Gene, 20.000 davon werden in Protein umgesetzt (kodierend), 22.000 davon sind nicht-kodierend (http://www.ensembl.org). Die Zahl der Gene bei anderen Säugern liegt in einer vergleichbaren Größenordnung. Pflanzen verfügen über 25.000 bis 50.000, Bakterien 470 bis 7.000 Gene. Ihre Aktivität führt zu spezifischen Stoffwechselprozessen in der Zelle. Eine Veränderung dieser Gene hat daher auch eine Veränderung dieser Prozesse zur Folge. Eine solche Veränderung ist seit jeher das Ziel von Züchtung, denn Stoffwechselprozesse sind letztendlich für die Eigenschaften eines Organismus verantwortlich.

Die neue Eigenschaft von *Genome Editing*-Verfahren ist nicht die Fähigkeit, die oben beschriebenen DNA-Sequenzen *per se* zu modifizieren. Das wurde schon seit Jahrzehnten z.B. in Pflanzen durch die Verfahren der klassischen Mutagenese, wie Bestrahlung oder den Einsatz von erbgutverändernden Chemikalien, geleistet. Dabei kommt es zur zufälligen Veränderung der DNA-Sequenz und damit zur Veränderung der Gene und der Eigenschaften eines Organismus. Auch durch wiederholtes Passagieren z.B. von Pflanzenzellen durch Gewebekultur mit anschließendem Anziehen von ganzen Pflanzen aus diesen Geweben entstehen zufällige, sogenannte somaklonale Mutationen. Der Ort der durch solche Verfahren induzierten Mutationen im Genom ist nicht beeinflussbar und auch die Zahl der erzeugten Mutationen ist sehr hoch. Dies macht einen langwierigen Rückkreuzungs- und Selektionsprozess nötig, um ungewollte Mutationen aus dem Genom zu entfernen. Klassische Mutagenesezüchtung hat laut der Joint FAO/IAEA Mutant Variety Datenbank mittlerweile mehr als 3000 Kulturpflanzenvarietäten hervorgebracht.

Das neue Potenzial des *Genome Editing* besteht darin, eine Mutation an genau einer gewünschten Stelle in einer DNA-Sequenz platzieren zu können. Insofern arbeitet die *Genome Editing*-Technik mit einer sehr hohen Präzision.

Im Rahmen dieses Moduls sollen die spezifischen Merkmale und die verschiedenen Methoden des *Genome Editing* dargestellt und mit den herkömmlicher Verfahren der Pflanzen- bzw. Tierzüchtung sowie mit Verfahren „klassischer Gentechnik“ (DNA-Rekombinationstechniken) verglichen werden.

Bei der Bewertung werden sowohl die Folgen unbeabsichtigter Auswirkungen (*„unintended effects“*) als auch beabsichtigter Auswirkungen (*„intended effects“*) der Techniken betrachtet. Nicht behandelt werden mögliche Risiken, die an die neu entstandenen Eigenschaften gekoppelt sind, da diese unabhängig von der eingesetzten Züchtungsmethode sind.

In diesem Modul werden die „Synthetische Biologie“ und „*Gene Drive*“-Systeme nicht behandelt:

- Die unter dem Begriff Synthetische Biologie diskutierten Techniken bzw. Konzepte sind so unterschiedlich, dass eine für alle diese Techniken gültige Darstellung und Diskussion weder sinnvoll noch möglich ist.
- *Gene Drive*-Systeme stellen eine spezielle Anwendung des *Genome Editing* mittels ortsspezifischer Nukleasen dar. Die Verwendung von *Gene Drive*-Systemen in der Pflanzen- oder Tierzüchtung ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand unwahrscheinlich.

4.3 FUNKTIONSWEISE DES *GENOME EDITING*

Die meisten Verfahren des *Genome Editing* nutzen zwei Komponenten (Ausnahmen s. u.: ODM und *„Base Editing“*): Eine „Schere“ (Nuklease), welche den DNA-Doppelstrang enzymatisch schneidet, sowie einen „Lotsen“, der diese Nuklease an eine vorher ausgewählte Stelle der Erbsubstanz führt. Dieses Erkennen des Ziels durch den Lotsen beruht auf einer passgenauen elektrochemischen Wechselwirkung des Lotsen mit seinem Ziel, ohne dass zwischen beiden eine feste chemische Verbindung geknüpft wird. Die Nuklease lagert sich an den Lotsen an oder ist sogar mit ihm verbunden und wird von ihm an die gewünschte Stelle geführt. Darum werden diese Techniken des *Genome Editing* auch *„site directed nuclease“*-Techniken (SDN) genannt. Zweck ist es zunächst, an der gewünschten Stelle einer DNA-Sequenz einen Strangbruch zu erzeugen, wobei meist der gesamte Doppelstrang betroffen ist. Solche DNA-Brüche sind für Zellen gefährlich: Sie behindern nicht nur das Ablesen der Gene, sondern sie verleihen der Erbsubstanz auch Instabilität. Daher haben Organismen im Laufe ihrer Evolution Reparatursysteme hervorgebracht, die solche Brüche möglichst schnell beseitigen.

In einem Pflanzen- oder Tiergenom werden DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) fast ausschließlich durch den zelleigenen Mechanismus des *„Non-homologous end joining“* (NHEJ)

repariert (99 % bei Pflanzen, ca. 90% bei Tieren). Bei dieser Reparatur werden die DNA-Bruchenden entweder unverändert durch ein Enzym (Ligase) wieder zusammengefügt oder die Bruchenden werden vor dem Zusammenfügen verkürzt. NHEJ umfasst zwei Spielarten: Das klassische NHEJ, welches fehlerfreie Reparaturen ermöglicht, und das alternative NHEJ, bei dem es zu Fehlern bei der Reparatur kommen kann (Bétermier *et al.,* 2014). Die Häufigkeit der Fehler ist schwer zu berechnen, da keine Daten darüber vorliegen, wie oft korrekt repariert wird. Nach bisher vorliegenden Erkenntnissen führen etwa 2/3 dieser Reparaturfehler zu einem funktionellen Ausschalten des betroffenen Gens. Folgende Fehler können auftreten:

- Insertion oder Deletion von einzelnen Basen,
- Insertion oder Deletion von Sequenzen unterschiedlicher Länge,
- Basen-Substitutionen,
- DNA-Inversionen (Herausbrechen, Verdrehen und Wiedereinfügen eines DNA-Stückes) und
- Translokationen (DNA-Segmente brechen heraus und werden an anderer Stelle wieder eingefügt).

Bei Mikroorganismen hingegen erfolgt die Reparatur eines Doppelstrangbruchs natürlicherweise über *Homology directed repair* (HDR) und nur selten über NHEJ. Dieser Mechanismus nutzt eine Vorlage (Matrize), z.B. bei Eukaryonten das Schwesterchromatid, um die Schäden wieder aufzufüllen (Reiss *et al.,* 2000). Mittels HDR wird bei Pflanzen nur ein sehr kleiner Anteil der DNA-Brüche repariert (<0,1%), bei Tieren ca. 10%. Die Entscheidung darüber, welcher der Reparaturmechanismen für die Reparatur des DSB verwendet wird, hängt von der Phase des Zellzyklus ab, in dem der DSB induziert wird, also ob sich die Zelle z.B. in einer Vermehrungsphase befindet oder nicht. NHEJ kann in jeder Phase des Zellzyklus verwendet werden, während eine Reparatur des DSB mittels HDR nur in der S- und G2-Phase des Zellzyklus geschieht, bei Pflanzen fast nur in der Meiose. Bei Mikroorganismen, die längere Zeiten in der stationären Wachstumsphase verbringen, erfolgen Reparaturen von Doppelstrangbrüchen in dieser Ruhephase durch NHEJ (Bowater und Doherty, 2009).

Die oben beschriebenen Fehler des zelleigenen Reparatursystems nutzt die SDN-Technik aus: Nachdem das Lotsensystem die Nuklease (*„site directed nuclease“*, SDN) an den gewünschten Ort im Genom geführt hat, werden in die DNA entweder Doppelstrangbrüche (DSB) oder bei Varianten der Methode Einzelstrangbrüche (sogenannte *Nicks*) erzeugt. Jetzt kommt es darauf an, wie der Bruch von der Zelle repariert wird: Überlässt man die Reparatur

der Zelle, so kann an der reparierten Stelle durch NHEJ eine der oben erwähnten Mutationen (SDN 1) entstehen. Alternativ kann man auch ein Stück DNA (Donor-DNA) als Reparaturmatrize in die Zelle einschleusen, die sich um ein oder wenige Nukleotide von der Zielsequenz unterscheidet. Die Zelle kann diese DNA dann mittels HDR als Vorlage nutzen, um die Schnittstelle zu schließen. Im Ergebnis wird die enthaltene Veränderung übernommen (SDN 2). Die Zugabe dieser Reparaturmatrize dient also zur Erzeugung von vorherbestimmten kleinen Mutationen im Genom, die üblicherweise als Einzelnukleotid-Polymorphismus (*„short/single nucleotide polymorphism“*, SNP) bezeichnet werden. Durch strukturiertes Wählen der Schnittstelle und des Designs der Vorlage können im Tierbereich Effizienzen von >50% für eine korrekte Integration erzielt werden.

Schließlich ist es möglich, als Reparaturmatrize eine rekombinante DNA in die Zelle zu geben, die neben der ursprünglichen homologen Sequenz ein größeres Stück Fremd-DNA beinhaltet. Auch dieses wird dann bei der Reparatur in den Schnitt hinein synthetisiert (SDN 3).

4.4 TECHNIKEN DES *GENOME EDITING*

4.4.1 Meganukleasen

Meganukleasen (MN) sind Proteine, die in ihrer Sequenz sowohl die Funktion zur spezifischen DNA-Bindung, als auch die Nukleasefunktion tragen. Ihre Erkennungssequenz auf der DNA-Ebene ist üblicherweise länger als 20 Nukleotide und sie schneiden nur bei korrekter Bindung an diese Erkennungssequenz. Die Spezifität ist durch die lange Erkennungssequenz sehr hoch.

4.4.2 Zinkfingernukleasen

Zinkfingernukleasen (ZFN) entstehen durch Fusion eines DNA-bindenden Proteins, dem Zinkfinger (ZF)-Protein, und einer Nuklease, i.d.R. der unspezifischen Nuklease FokI. Das ZF-Protein bewirkt die Lotsenfunktion, indem es pro Finger drei bestimmte Nukleotide der DNA erkennt und bindet. Kombiniert man also z.B. vier Zinkfinger, dann erhält man eine spezifische Bindung an eine 12 Nukleotide lange DNA-Sequenz. Die fusionierte Nuklease schneidet unspezifisch dort, wo sie an die DNA geführt wird. Sie schneidet aber üblicherweise nur als Dimer, wenn an den beiden Strängen der DNA in räumlicher Nähe eine Bindung stattfindet.

4.4.3 TALEN

Transcription Activator Like Effector Nukleasen (TALEN) bestehen wie die ZFN aus fusioniertem bindendem Protein (TALE) und einer unspezifischen Nuklease. Das TALE-Protein hat die Lotsenfunktion und erkennt pro Einheit ein spezifisches Nukleotid der DNA. Für die Spezifität sind nur die Aminosäuren 12 und 13 der insgesamt 34 Aminosäuren langen Einheit entscheidend. Die Nuklease schneidet wie bei den ZFN nur als Dimer.

4.4.4 CRISPR/Cas9

Das *„Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“* (CRISPR)-System besteht im Unterschied zu den vorhergehenden Nuklease-Systemen aus einer RNA-Komponente und einer Nuklease. Die RNA-Komponente ist eine synthetische Nukleinsäure, die aus zwei natürlichen, bakteriellen RNA Molekülen abgeleitet wurde. Diese sind ursprünglich Teil eines bakteriellen Abwehrmechanismus gegen Bakteriophagen. Die RNA-Komponente des CRISPR/Cas9-Systems sorgt für die Erkennung der Zielsequenz sowie für die Bindung der Nuklease. Sie beinhaltet also die Lotsenfunktion, indem eine i.d.R. 20 Nukleotide lange Sequenz spezifisch an komplementäre Nukleotidsequenzen der DNA bindet. Die RNA-Komponente wird daher auch *single guide* (sg) RNA genannt. Die CRISPR assoziierte Nuklease (Cas) bindet an den Komplex aus DNA und RNA und schneidet die DNA direkt vor einer definierten Sequenz mit drei Nukleotiden Länge, der sogenannten PAM-Sequenz *(Protospacer Adjacent Motif)*. Die PAM-Sequenz taucht natürlicherweise etwa alle 8 Basenpaare im Genom auf. Hierbei ist keine Dimerisierung der Nuklease erforderlich. Die Spezifität des Systems ergibt sich aus der Wahl der 20 Nukleotide langen Bindungssequenz der sgRNA.

Techniken unter 4.4.1 – 4.4.4 werden, wie oben beschrieben, auch als SDN-Techniken bezeichnet.

4.4.5 Oligonucleotide Directed Mutagenesis“

Die Methode der *„Oligonucleotide Directed Mutagenesis“* (ODM) verwendet für die Auslösung von Mutationen ein kurzes einzelsträngiges Oligonukleotid, das aus einem Gemisch von RNA und modifizierter DNA bestehen kann. Dieses Oligonukleotid ist gegen eine Sequenz des Genoms gerichtet und zu dieser fast vollständig homolog. Sie enthält jedoch mindestens eine unterschiedliche Base im Vergleich zur Zielsequenz, so dass es bei der Paarung zwischen Oligonukleotid und genomischer DNA zu einer Fehlpaarung kommt. Diese Fehlpaarung wird durch das zelleigene Reparatursystem erkannt und repariert, was in eini-

gen Fällen zum Einbau der veränderten Base an dieser Stelle und damit zu einem veränderten Basenpaar führen kann. Die hierbei auftretenden Veränderungen sind fast ausschließlich Basenaustausche.

4.4.6 „Base Editing“

Beim sogenannten *„Base Editing“* wird das Prinzip des CRISPR/Cas9 Systems genutzt, indem ein mutiertes Cas9-Enzym, das durch die Veränderung keine DNA-Schnitte mehr durchführen kann, mit dem Enzym Cytosin-Deaminase gekoppelt wird (Komor *et al.*, 2016). Das Fusionsprotein aus der sogenannten deadCas9 (dCas9) und der Cytosin-Deaminase bindet weiterhin an die *single guide* RNA (sgRNA) und wird zur Zielsequenz geführt. Dort wird jedoch die DNA nicht geschnitten. Durch die Cytosin-Deaminase wird vielmehr die Zielsequenz innerhalb eines Fensters von fünf Basen so modifiziert, dass alle dort vorhandenen Cytosin-Basen (C) letztendlich zu Thymin-Basen (T) umgebaut werden. Bei dieser Methode gibt es daher auch keine unerwünschten Insertionen oder Deletionen. Die Methode eignet sich für die Einführung von Punktmutationen, allerdings nur für Substitutionen C zu T oder indirekt auf dem komplementären DNA-Strang Guanin (G) zu Adenin (A). Befinden sich mehrere Cytosine in dem Bereich von fünf Basen, dann werden alle sequenziell zu Thymin verändert (Komor *et al.,* 2016). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich zur Genomveränderung in Mäuseembryonen angewandt, wobei die Mutationsfrequenz bei 44-57% lag (Kim *et al.* 2017).

4.5 Vergleichende Betrachtung der methodenspezifischen Merkmale und Risiken

Sowohl durch herkömmliche Mutageneseverfahren (chemische und physikalische Mutagenese durch Bestrahlung) als auch durch somaklonale Variationen bei Gewebekulturpassagen entstehen Mutationen. Möchte man daher die potenziellen Risiken der Techniken des *Genome Editing* betrachten, bietet sich ein Vergleich von SDN 1, SDN 2, ODM und „Base Editing“ mit diesen herkömmlichen Züchtungstechniken an. Hingegen ist es am sinnvollsten, die SDN 3-Technik mit der klassischen Züchtung und mit der klassischen Gentechnik zu vergleichen, da bei allen drei Verfahren neue Nukleinsäuresequenzen in das Genom eines Organismus eingeführt werden.

Des Weiteren gibt es noch *Genome Editing*-Verfahren, die zu epigenetischen Veränderungen führen. So gibt es z.B. an dCas9 gekoppelte Methylasen oder Demethylasen, die zu einer Methylierung/Demethylierung der entsprechenden Genomregion und damit zur Modifikation des Ablesens der Gene führen. Da diese Veränderungen zu keiner Sequenzveränderung im Genom führen, sind sie nicht Gegenstand dieses Moduls.

4.5.1 Unbeabsichtigte Effekte

4.5.1.1 Unbeabsichtigte Sequenzänderungen (Off target-Mutationen und nicht vorhersagbare, zufällige Sequenzänderungen)

Unter *Off target*-Mutationen bei der Anwendung von *Genome Editing*-Verfahren werden solche Mutationen verstanden, die nicht an der Zielposition im Genom entstehen. Das liegt meist daran, dass es sich bei solchen Stellen um DNA-Sequenzen handelt, die eine hohe Ähnlichkeit zur angesteuerten DNA-Sequenz aufweisen. Daher bindet der Lotse zu einem geringen Prozentsatz auch an solche ähnliche Stellen. Die Nutzung repetitiver Sequenzen als Lotse birgt eine höhere Wahrscheinlichkeit des Auftretens von *Off target*-Mutationen.

Mutationen, also auch *Off target*-Mutationen, können zielgerichtet mit Hilfe spezifischer PCR-Anwendungen (*Surveyor Nuklease Assay*, T7 Assay, *targeted deep sequencing*) oder nicht zielgerichtet durch eine vollständige Sequenzierung des Genoms („*whole genome* Sequenzierung“, WGS) detektiert werden. Die große Variabilität im Genom höherer Organismen kann es schwierig machen, einzelne *Off target*-Mutationen mit Hilfe von WGS sicher zu identifizieren.

Bei Verfahren zur Detektion von *Off target*-Mutationen durch *Genome Editing* ist anzumerken, dass nur gezielt in Sequenzen gesucht wird, die sehr ähnlich zur Zielsequenz sind. Um diese *Off target*-Orte zu bestimmen, werden bioinformatische Vorhersageprogramme genutzt. Diese eignen sich gleichermaßen für Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen.

4.5.1.2 Off targeting bei Pflanzen

Genome Editing

Bei Pflanzen wurden *Off target*-Effekte nur in Sequenzen gefunden, die wenige abweichende Basen von der Zielsequenz aufweisen und auch nur dann, wenn diese nicht in der Kernregion der Zielsequenz liegen. Bezogen auf die Genomgröße beträgt die *Off target*-Rate beim CRISPR/Cas9 Verfahren z.B. in Reis in einer Sequenz, die sich nur durch eine Base von der Zielsequenz unterscheidet, ca. $3x10^{-10}$ (Zhang *et al.*, 2014). In diesem Fall konnte ein *Off target*-Ereignis detektiert werden, das in 10% der Sequenzierungen dieser spezifischen *Off target*-Sequenz auftrat. Dieser sehr geringe Anteil wird sich mit verbesserten oder präziseren DNA-Nukleasen noch weiter reduzieren, z. B. durch Nickasen (Schiml *et al.*, 2014), HF-SpCas9 (Kleinstiver *et al.*, 2016a), eCas9 (Slaymaker *et al.*, 2016) oder auch Cpf1 (Kleinstiver *et al.*, 2016b).

Beim TALEN-Verfahren konnten in einer Studie neben der erwarteten Mutation noch drei weitere Deletionen identifiziert werden. Diese befanden sich in Bereichen, die keine Ähnlichkeiten zur Zielsequenz aufweisen. Da die Pflanzen in dieser Studie allerdings Zellkulturpassagen durchliefen, bei denen weitere Mutationen auftreten können, war die Ursache der Deletionen nicht zu ermitteln (Forner *et al.*, 2015). Bei ZFN-Verfahren konnten in Pflanzen bisher keine *Off target*-Effekte gezeigt werden. Allerdings ist die Datenlage für TALENs und ZFNs deutlich geringer als bei CRISPR/Cas9 (Zhang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012, Forner *et al.*, 2015).

In einigen Fällen wurde das gesamte Genom von Pflanzen mittels *whole genome sequencing* (WGS) sequenziert, um *Off target*-Effekte aufzuzeigen, die nicht vorhergesagt wurden. Bisher wurden in keiner dieser Studien *Off target*-Effekte detektiert, die eindeutig der verwendeten Technik zugeschrieben werden konnten (Feng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Forner *et al.*, 2015; Peterson *et al.*, 2016).

Für ODM gibt es bisher keine veröffentlichten Daten zur *Off target*-Rate, sie sollte aber auf Grund der verwendeten Technik (kein DNA-Bruch) und des DNA-Reparaturmechanismus (Fehlpaarungsreparatur) im Bereich unter 1% liegen bezogen auf die Sequenzen, an die das Oligonukleotid überhaupt binden kann.

Beim *Base Editing* unter Verwendung eines inaktiven Cas9 Proteins mit kombinierter Cytosin-Deaminase kann es zu *Off target*-Effekten im beschriebenen Fenster von fünf Nukleotiden kommen. Dieses passiert, und zwar genau dann, wenn es auch zur *Off target*-Bindung von Cas9 kommt (Komor *et al.*, 2016). Da diese Technik bei Pflanzen bisher selten zum Einsatz kam, kann über die absolute *Off target*-Rate derzeit keine Aussage getroffen werden. Daten aus *Escherichia coli* deuten allerdings darauf hin, dass zusätzliche *Off target*-Effekte möglich sind (Yang *et al.*, 2016). Die in dieser Studie untersuchte Deaminase (*Activation Induced Deaminase*, AID) zeigte genomweit eine erhöhte Rate an Cytosin-Deaminierung und dies unabhängig von den Fusionsproteinen (Zinkfinger und TALE), die für die Zielsequenzerkennung verwendet wurden (Yang *et al.*, 2016).

Natürliche Mutationen, klassische Züchtung

Die natürliche Mutationsrate beträgt bei *Arabidopsis thaliana* etwa eine Mutation pro Generation, also eine pro 150.000 Kilobasenpaaren (kbp) (Ossowski *et al.*, 2010). Bei der Kreuzungszüchtung werden durch die Kreuzung zwei haploide Elterngenome miteinander in Verbindung gebracht und in der nächsten Generation durch Rekombination miteinander vollständig vermischt. Bei der Vermischung der Elterngenome kann es zu Verlusten von ganzen Genen, Neukombinationen, Fragmentierungen und auch Translokationen kommen, die nicht nur auf die einzelnen Loci beschränkt sein müssen, sondern ganze Chromosomenabschnitte beinhalten können. Möchte man ein Gen, das für eine bestimmte wünschenswerte Eigenschaft verantwortlich ist, aus einem der beiden Kreuzungspartner in den anderen (z.B. eine Elitelinie) überführen, so überträgt man in der ersten Generation unerwünschter Weise 50% des Genoms des Kreuzungspartners. Durch wiederholte Rückkreuzung gegen die Linie, in der die neue Eigenschaft etabliert werden soll, unter Beibehaltung des Selektionsdruckes für das gewünschte Gen, wird dieser Anteil von Generation zu Generation etwa halbiert. Nach sieben erfolgten Rückkreuzungen reduziert sich dadurch der Anteil des Fremdgenoms auf etwa 0,7%.

Herkömmliche Mutagenesezüchtung

Bei den bereits bekannten Züchtungstechniken, die Genomveränderungen durch Erhöhung der Mutationsrate bewirken, also chemische und physikalische Mutagenese, sowie bei Mutationen, die durch Zellkulturpassagen auftreten (somaklonale Variation), treten sehr hohe *Off target*-Raten auf. Bei der chemischen Mutagenese wird durch die Behandlung von Saatgut mit Chemikalien (heutzutage hauptsächlich EMS = Ethylmethansulfonat oder MNU =1-methyl-1-nitrosoharnstoff) eine große Anzahl von Mutationen im Genom erzeugt. Eine Methode,

die diese chemische Mutagenese mit einem molekularbiologischen Screeningverfahren zur Lokalisierung der erhaltenen Punktmutationen kombiniert, wird als TILLING (*Targeted Induced Local Lesions In Genomes*) bezeichnet. Bei den hier üblicherweise verwendeten Konzentrationen des Mutagens (1,5 %) kommt es zu 1 vererbten Mutation pro 150 bis 300 kbp im Genom (Jander *et al.*, 2003; Till *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2008). Die physikalische Mutations-Induktion mit ionisierender Strahlung wurde bisher weniger gut quantifiziert. Es gibt hierzu die Aussage von Auerbach (1944), dass Chemikalien entdeckt wurden, die in der Mutationsinduktion so effektiv wie Gamma-Bestrahlung wirken. Daraus kann man rückschließen, dass die Anzahl von Mutationen bei der ionisierenden Strahlung in der gleichen Größenordnung wie bei der chemischen Mutagenese liegt.

Die Rate an Mutationen, die in Zellkulturpassagen auftreten (somaklonale Variation), liegt laut Miayo *et al.* (2012) für Reis bei ca. 1 Mutation pro 500 kbp, ist also immer noch vielfach höher als die natürliche Mutationsrate. Von den durch herkömmliche Mutationszüchtung ausgelösten Mutationen sind bezogen auf das Gen, welches mutiert werden soll, alle anderen Mutationen *Off target*-Ereignisse. Die Frequenz von *Off target*-Ereignissen liegt also bei allen Verfahren der Mutationszüchtung im Bereich von >99,9%. Ein Nachweis der *Off target*-Mutationen bei der induzierten Mutation oder der somaklonalen Variation ist nur über eine Resequenzierung möglich. In der Praxis wird häufig ein kleiner Teil des Genoms amplifiziert und sequenziert, die gefundenen Mutationen werden dann im Folgenden auf das gesamte Genom extrapoliert.

„Klassische Gentechnik“

Bei klassischen transgenen Pflanzen kann es zu mehrfacher Insertion des Transgens ins Genom kommen. Dieses geschieht zufällig und ungerichtet und kann am selben oder an unterschiedlichen Insertionsorten geschehen. Diese zusätzlichen Insertionen und auch Insertionen von Bruchstücken der Vektor T-DNA können als *Off target*-Ereignisse der klassischen Gentechnik aufgefasst werden. Diese lassen sich aber gut detektieren, da die Sequenz der T-DNA (oder des Transgens) bekannt ist und so ein Nachweis über Southern Blot-Analyse oder PCR durchgeführt werden kann. In seltenen Fällen kann es zu Splitterbildung kommen (Fragmentinsertionen); diese sind schwieriger nachzuweisen. Ein Nachweis ist jedoch auch hier möglich z.B. über Genom-Sequenzierungsverfahren (*Whole Genome Sequencing*, WGS) (Schouten *et al.*, 2017).

4.5.1.3 Off targeting bei Tieren

Genome Editing

Alle bisherigen Befunde deuten darauf hin, dass der Anteil an sogenannten *Off target*-Mutationen bei Nutztieren nur sehr gering ist und mit verbesserten DNA-Nukleasen noch weiter zurückgehen wird, z. B. durch Nickase (Shen et al 2014), HF-SpCas9 (Kleinstiver *et al.* 2016a), eCas (Slaymaker *et al.* 2016), Cpf1 (Kleinstiver *et al.* 2016b); ähnliches gilt für TALEN und ZFN.

Diese verbesserten CRISPR/Cas9 Systeme enthalten zum Beispiel eine inaktivierte Cas9. Als Nuklease dient hierbei eine konjungierte FokI-Endonuklease, die für einen DSB eine Dimerisierung und damit, in Analogie zu ZFN und TALENs, ein zweites CRISPR/Cas Molekül benötigt. Dies sorgt für eine deutlich längere Erkennungssequenz und somit für zusätzliche Spezifität (Tsai et al., 2014). *Off targets* sind theoretisch abhängig von der Länge der Erkennungssequenz, gleichzeitig spielen aber auch Konformitätsänderungen eine wichtige Rolle. Repetitive Sequenzen bergen eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von *Off targets*. Schaefer et al., (2017) berichteten, dass CRISPR/Cas9 behandelte Mäuse eine hohe Zahl unerwarteter off-targets im Vergleich zu einem nicht-behandelten Wurfgeschwister aufwiesen. Diese Mutationen seien zudem an *loci* entstanden, die keine Homologie zur guide-RNA aufwiesen. Die Publikation wurde wegen der unzureichenden statistischen Aussagekraft und das Fehlen von Kontrollen kritisiert. Vor allem seien die Elterngenome nicht ausreichend untersucht worden um sicherzustellen, dass die Effekte auch tatsächlich auf die Behandlung mit CRISPR/Cas9 zurückzuführen und nicht ererbt seien. Auch Iyer *et al.,* (2015) untersuchten off-target Effekte bei mit CRISPR/Cas9 behandelten Mäusen und kommen im Rahmen ihres Versuchsdesigns unter Einbeziehung entsprechender Kontrollen zu einem gegenteiligen Ergebnis. Das Auftreten von *Off target*-Effekten ist beim Tier letztlich weniger davon abhängig, welche Technik eingesetzt wird, sondern vielmehr vom Genort und dem Design der Erkennungsdomäne.

Natürliche Mutationen

Wie bei allen Säugetieren findet die Neukombination des genetischen Materials von Vater und Mutter direkt nach der Befruchtung statt. Bei Untersuchungen von Präimplantationsembryonen ist der Anteil von Embryonen mit Polyploidien, d.h. chromosomalen Aberrationen, relativ hoch (~50–60%). Allerdings scheint dies die Entwicklung nicht zu beeinträchtigen. Mutationen auf der Ebene der Basensequenz sind relativ selten und treten einmal pro 10^{11} Basen

im Replikationszyklus auf, oder umgerechnet in 1 pro ~300 Zellen. Ferner ist gut dokumentiert, dass über den sehr hohen Anteil an embryonaler Frühmortalität bei landwirtschaftlichen Nutztieren (~50% der befruchteten Eizellen degenerieren und führen nicht zu einer erfolgreichen Trächtigkeit) Embryonen mit chromosomalen Aberrationen eliminiert werden (Sreenan und Diskin, 1986, Bolet, 1986).

Mutationen im postnatalen und erwachsenen Tier sind bedingt durch die Umwelt, Sonneneinstrahlung etc.. Detaillierte Untersuchungen beim Nutztier dazu sind bisher nicht bekannt. Im Humanbereich wird die genomweite Mutationsrate mit $1{,}2 \times 10^{-8}$ bp pro Generation angegeben (Scally und Durbin, 2012). Allerdings erreichen landwirtschaftliche Nutztiere meist kein höheres Alter, um eine größere Anzahl an Genmutationen anzusammeln.

„Klassische Gentechnik“

Bei Nutztieren kommen im Wesentlichen die Mikroinjektion von rekombinanter DNA in frühe Embryonen oder zellulären Gentransfer gefolgt vom somatischen Klonen zum Einsatz. Beim somatischen Klonen wird der veränderte Zellkern entnommen und in eine entkernte Zygote überführt. Bei diesen Techniken ist nur ein Gentransfer mit zufälligem Integrationsort möglich, welcher durch PCR, Southern Blot oder WGS nachweisbar ist. Hauptnachteile der Mikroinjektion sind die niedrige Effizienz, das Auftreten von Positionseffekten (d.h. Expression des Transgens wird durch den Insertionsort wesentlich bestimmt) und das Risiko einer Insertionsmutagenese, d.h. das neue Gen integriert in einen aktiven Genort, dessen Funktion dadurch geändert wird. Beim zellulären Gentransfer können die Zellen vor dem Einsatz im somatischen Kerntransfer im Hinblick auf Integration und Funktion des neuen Gens charakterisiert und nur solche Zellen mit korrekter Integration ohne weitere Änderungen im Genom für den Kerntransfer verwendet werden.

Andere Verfahren der Transgenese sind bei Nutztieren bisher nur vereinzelt berichtet worden. Virale Vektoren (z.B. Lentiviren) spielen kaum noch eine Rolle bei der Erstellung genetisch veränderter Nutztiere. Ein gezielter Einbau von Sequenzen in das Genom von Nutztieren ist erst durch das *Genome Editing* mit ausreichender Effizienz durchführbar, da echte (d.h. Keimbahn-gängige) embryonale Stammzellen bei Nutztieren noch fehlen.

Bei der Labormaus sind Keimbahn-gängige embryonale Stammzellen (ES-Zellen) seit vielen Jahren verfügbar. Dadurch waren auch Verfahren der homologen Rekombination (HR) durchführbar. Nach anschließender Injektion der Zellen in frühe embryonale Stadien (Morulae/ Blastozysten) konnten viele Tausende Maus-Linien etabliert werden.

Zur Erstellung genetisch modifizierten Geflügels wird heute meist mit Keimzell-Vorläuferzellen (*Primordial Germ Cells*, PGC) gearbeitet, die transfiziert und dann in den sich entwickelnden Hühnerembryo eingebracht werden (z.B. durch Injektion). So entstehen in der ersten Runde meist Chimären, die dann züchterisch weiter bearbeitet werden, um am Ende das gewünschte Merkmal züchterisch zu nutzen.

4.5.1.4 Off targeting bei Mikroorganismen

Die Reparatur eines Doppelstrangbruchs erfolgt bei Mikroorganismen natürlicherweise über homologe Rekombination (HR) oder nicht-homologe Endverknüpfung *(„non-homologous end joining"* – NHEJ). Diese Mechanismen nutzt man bereits in der klassischen Gentechnik, um künstliche Veränderungen in Genomen von Mikroorganismen vorzunehmen. Mittlerweile wurden verschiedene neue *Genome Editing* Ansätze entwickelt, bei denen Doppelstrangbrüche durch weiterentwickelte Nukleasen (ZFN, Meganukleasen, TALEN, CRISPR/Cas-Nukleasen) an spezifischen Stellen induziert werden und die zelleigenen Reparaturmechanismen genutzt werden, um Deletionen/Insertionen einzuführen.

Über die Spezifität der neuartigen Nukleasen entscheidet wie schon erwähnt die Größe der benötigten Erkennungssequenz, was bei komplexeren Genomen zu u.U. mehrfachen Schnitten führen kann (Stella und Montoya, 2016). Durch die geringere Genomgröße bei Mikroorganismen (generell in etwa zwischen 3 und 6 x 10^7 Basenpaare) reduziert sich die Wahrscheinlichkeit von sogenannten *Off targets* um ein Vielfaches. Außerdem konnten bisher keine *Off target*-Mutationen bei Mikroorganismen z.B. nach CRISPR/Cas9 Anwendung (eventuell auch wegen ihrer Toxizität/Letalität) nachgewiesen werden (Bortesi *et al.* 2016). Weiterhin können bioinformatische Programme angewendet werden, um *Off target*-Sequenzen vorherzusagen (Hsu *et al.*, 2013, Doyle *et al.*, 2012) und so die Spezifität der Nukleasen stetig zu verbessern. Um ungewollte Veränderungen im Genom nach Anwendung von *Genome Editing*-Methoden zu erkennen, wurden verschiedene Nachweisverfahren entwickelt. Durch die geringe Genomgröße bei Mikroorganismen eignet sich hier besonders eine vergleichende Analyse durch Sequenzierung (Jiang *et al.* 2013). Größere und kleinere Genomveränderungen können auch gut mit den in der klassischen Gentechnik verwendeten Methoden wie PCR, Southern Blot, markergebundene bzw. phänotypische Assays nachgewiesen werden (Jiang *et al.* 2013, Cobb *et al.* 2014, Huang *et al.* 2015).

Natürliche Mutationen

Bei einzelligen Mikroorganismen folgt auf eine Genomreplikation die Zellteilung bzw. eine neue Generation. Bei mehrzelligen Eukaryoten finden dagegen mehrere Zellteilungen bzw. Replikationen pro Generation statt (z.B. *Homo sapiens*-Keimzellen 216 Zellteilungen/Generation, *Arabidopsis thaliana*-Keimzellen 40 Zellteilungen/Generation etc.) (Lynch 2010). Im Vergleich zu der geringen Wahrscheinlichkeit von *Off targets* liegt die natürliche Mutationsrate z.B. bei *Escherichia coli* ($4{,}6 \times 10^6$ Basen Genomgröße) bei $5{,}4 \times 10^{-10}$ Mutationen/Basenpaar/Replikation (Drake *et al*., 1998). Das entspricht bei *Escherichia coli* einer Mutationsrate pro Genom pro Replikation von 0,0025, so dass alle ~1000 Replikationen mindestens eine Mutation auftritt. Betrachtet man eine Übernacht-Kultur mit 10^{10} Zellen (= 10^{10} Generationen bei der letzten Verdopplung), kann man davon ausgehen, das 10^7 Mutationen aufgetreten sind und jeder nicht-letale Basenpaaraustausch in der Kultur vertreten ist. Die Mutationsrate nach Einwirkung von mutagenen Stoffen wie Chemikalien oder ionisierender Strahlung erhöht sich dann um ein Vielfaches.

Anwendung von Mutagenese im Zusammenhang mit „klassischer Gentechnik“

Auch in der klassischen Gentechnik wurden bereits *in vivo* Mutagenese Techniken angewendet. Unter Verwendung von chemischen Substanzen (MNNG, MMS, EMS, ICR-191, 2-AP, EDB), von Toxinen wie z.B. Aflatoxin B_1 und physikalischer Methoden wie z.B. UV-Bestrahlung konnten Varianten bestimmter Gene erzeugt werden. Diese wurden oft mit Insertions-Methoden (z.B. dem Einsatz von Transposons) kombiniert, wenn unbekannte Gene oder Genombereiche verändert werden sollten. Um die Effizienz dieser Methoden zu optimieren, wurden sogenannte Mutator-Stämme (z.B. *mutH, mutL, mutS*) verwendet. Mutatorstämme haben in der Regel ein defektes Reparatursystem, so dass Schäden an der DNA nach einer Mutagenese nur ungenau repariert werden. Diese wurden auch bei der Erzeugung von Mutationen in Genen, die auf Plasmiden lokalisiert sind, eingesetzt. Die Mutationsfrequenzen konnten so um das 10^2 bis 10^8 fache erhöht werden (Foster, 1991). Der Nachweis einer genetischen Veränderungen erfolgte dann z.B. über Resistenzmarker, Reversion Assays und den oben bereits genannten Methoden. Die Mutagenese mit chemischen Substanzen, Toxinen und UV-Bestrahlung ist allerdings sehr ungezielt und führt aufgrund der hohen Mutationsfrequenzen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu Mehrfachmutationen.

Genome Editing

Die Zielgenauigkeit und Effizienz kann durch die Anwendung der gezielten Mutagenese mit neuartigen *Genome Editing* Techniken deutlich verbessert werden. Insbesondere das CRISPR/Cas System ist mit Effizienzen von 65-100% sowohl bei gramnegativen als auch bei grampositiven Bakterien anwendbar. Auch wenn bei manchen Bakterien das NHEJ Reparatursystem nur eingeschränkt funktioniert, kann dieser Mangel durch andere Reparaturmechanismen ausgeglichen werden (Bortesi *et al.* 2016).

4.5.1.5 Allgemeine Schlussfolgerungen zu Off target-Effekten

Das *Genome Editing* führt insbesondere beim Einsatz zeitgemäßer Verfahren sehr selten zu *Off target*-Effekten. Für diese *Off target*-Effekte gibt es zuverlässige und ausreichend sensitive Nachweisverfahren. Das *Genome Editing* stellt daher eine deutliche Verbesserung in Präzision und Effizienz gegenüber klassischen Genmodifikations- (Mutagenese) und Gentransferverfahren dar. Die Wahrscheinlichkeit von nicht gewünschten Effekten ist bei SDN 1 unabhängig von der Technik (ZFN; TALEN; CRISPR) am geringsten, bei der Mutagenesezüchtung (Pflanzen) am größten. So liegt z.B. in Pflanzen die Mutationsrate pro Basenpaar beim *Genome Editing* mit 0 bis $3x10^{-10}$ deutlich unterhalb der Rate von $1x10^{-5}$ bis $1x10^{-6}$ bei herkömmlicher Mutagenese (Zahlen gelten für Insertionen, Deletionen und Austauschen von einer bis wenigen Basenpaaren).

4.5.2 Beeinflussung der Expression von Nicht-Ziel-Genen, pleiotrope[2] Effekte

4.5.2.1 Beeinflussung der Expression bei Pflanzen

Genome Editing

Die Wahrscheinlichkeit, dass es bei den Verfahren des *Genome Editing* zu unbeabsichtigter Beeinflussung der Expression von Genen in der Nähe des Zielortes oder zu pleiotropen Effekten kommt, ist sehr gering, da der Zielort bekannt ist, und daher eine Beeinflussung aktiv ausgeschlossen oder abgeschätzt werden kann. Zudem sind *Off target*-Mutationen sehr selten und gut vorhersagbar. Dies gilt für die Techniken ODM, SDN 1 und 2. Lediglich bei SDN 3 kann es ähnlich wie bei der klassischen Gentechnik zu pleiotropen Effekten kommen, die auf die Eigenschaft des neu eingebrachten Gens zurückzuführen sind. Sie sind im Einzelfall zu bewerten. Durch die höhere Präzision sind beim Einsatz von SDN 3 deutlich weniger Effekte zu erwarten als bei der klassischen Gentechnik. Zum Base Editing gibt es noch zu wenige Daten, um die Wahrscheinlichkeit für Deaminierungen in benachbarten Genen zu bewerten.

Natürliche Mutationen, klassische Züchtung

Aufgrund der geringen Mutationsraten ist bei natürlichen Mutationen auch die Wahrscheinlichkeit gering (aber trotzdem gegeben), dass es zu einer Beeinflussung der Expression im Bereich des Zielorts kommt, falls durch die Mutation ein steuerndes Genelement verändert wurde.

Bei der klassischen Züchtung ist eine nennenswerte Wahrscheinlichkeit der unerwünschten Beeinflussung jedoch gegeben, da der Zielort nur sehr ungenau bearbeitet wird, und es zum sogenannten *„linkage drag“* kommt: Es bleibt nämlich ein gewisser Anteil des Genoms des Kreuzungspartners trotz Rückkreuzungen mit dem anderen Elter im Genom der Nachkommen erhalten, der züchterisch unerwünschte Eigenschaften haben kann. Entsprechend ist die Wahrscheinlichkeit pleiotroper Effekte einzustufen. Die Kreuzungszüchtung ist sehr unpräzise und zudem sind *Off target*-Effekte häufig und nicht vorhersagbar.

[2] Unter ‚Pleiotropie‘ versteht man die Ausprägung mehrerer phänotypischer Merkmale, die durch ein einzelnes Gen hervorgerufen wird.

Ionisierende Strahlen oder Chemikalien (EMS)

Aufgrund der hohen Mutationsrate und Zufälligkeit ist die Wahrscheinlichkeit der Expressions-Beeinflussung anderer als der angestrebten Gene relativ hoch. Detaillierte Untersuchungen auch zur Abgrenzung von reinen *Off target*-Effekten fehlen. Studien belegen Veränderungen im gesamten Transkriptom z.B. bei Tomaten bedingt durch ionisierende Strahlung (Batista *et al.*, 2007).

„Klassische Gentechnik“

Die Beeinflussung der Expression am oder in der Nähe des Zielortes ist hier nicht zu definieren, da der Zielort unbekannt ist und es zu zufälligen Insertionen kommt. Eine Beeinflussung der Gene am Insertionsort ist möglich. Dieses ist jedoch zum einen auf die Eigenschaft des neu eingebrachten Gens zurückzuführen und zum anderen auf den jeweils zufälligen Insertionsort (Insertionseffekte). Da die T-DNA jedoch gut lokalisierbar ist, können mögliche Auswirkungen auf Gene am Insertionsort gut untersucht werden. Verwendet man die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte T-DNA Transformation, so werden lediglich das neue Gen plus die Sequenzen der T-DNA ungerichtet an einem zufälligen Ort ins Genom der Empfängerpflanze übertragen. Dabei kann es zu unerwünschten Insertionseffekten kommen, es können vorhandene Gene am Insertionsort durch die Integration ausgeschaltet oder angeschaltet werden. Diese möglichen Effekte werden bei der Risikobewertung einer gentechnisch veränderten Pflanze analysiert, bevor sie in den Verkehr gebracht wird. Es konnte bereits in Tomate gezeigt werden, dass es bei T-DNA Insertionen zu weniger Nebeneffekten kommt als bei ionisierender Strahlung (Batista *et al.*, 2007). Auch sind verschiedene Methoden entwickelt worden, die eine zielgerichtete Integration der T-DNA ermöglichen (Puchta, 2002).

4.5.2.2 Beeinflussung der Expression bei Tieren

Genome Editing

Da die Verfahren des *Genome Editing* auch bei Tieren den zielgenauen Einbau von Modifikationen in die DNA ermöglichen, ist die Wahrscheinlichkeit von Positionseffekten und pleiotropen Wirkungen beim Einsatz von *Genome Editing* Verfahren vergleichsweise gering. Bei geeigneter Vorplanung kann die Beeinflussung der Expression anderer Gene weitgehend ausgeschlossen werden.

Klassische Züchtung

Die klassische Tierzucht beruht im Wesentlichen auf quantitativen Modellen der Populationsgenetik (d.h. durchschnittliche Verbesserung des Genotyps) und berechnet additive Geneffekte, ursprünglich basierend auf den Leistungsdaten einer definierten Nachkommengruppe (z.B: Testbullen). Dabei spielen bestimmte biotechnische Verfahren, wie die künstliche Besamung (KB) und Embryotransfertechniken, eine wichtige Rolle. Mit der Sequenzierung der Genome der landwirtschaftlichen Nutztiere, wie Rind, Schwein, Schaf, Geflügel wurden die Züchtungsverfahren weiter entwickelt, und die Marker gestützte Selektion (MAS) und der Genomische Zuchtwert (GBW) eingeführt. Diese sind wesentlich genauer und sicherer in ihrer Vorhersage der Leistungen der Nachkommen. Pleiotrope Effekte sind aus klassischer Züchtung bekannt, treten dort in geringer Frequenz auf und können Teil des additiven Modells sein.

„Klassische Gentechnik“

Im Gegensatz dazu kann es bei zufälliger Integration von Sequenzen zu Positionseffekten (s. „Klassische Gentechnik“) kommen. Epistatische oder pleiotrope Effekte sind aber bei Nutztieren bisher in diesem Zusammenhang nicht beschrieben worden. Klassische Modelle der quantitativen Genetik gehen von additiven Geneffekten aus, pleiotrope Effekte können Teil dieser Modelle sein. Darüber hinaus sind bisher keine pleiotropen Effekte bei Nutztieren nach Anwendung klassischer Gentechnik beschrieben, können aber nicht generell ausgeschlossen werden.

4.5.2.3 Beeinflussung der Expression bei Mikroorganismen

Bei den klassischen gentechnischen Methoden wie auch bei den neuartigen *Genome Editing* Methoden ist der Zielort der gewünschten Veränderung bekannt, so dass bei dieser gerichteten Mutation nur eine geringe Wahrscheinlichkeit von unbeabsichtigten Effekten auf umliegende Genbereiche zu erwarten ist. Bei natürlichen (ungerichteten) Mutationen sowie bei durch ionisierende Strahlung und Chemikalien induzierten Mutationen kann ein Einfluss auf die Expression z.B. durch eine Promotor-Mutation nicht ausgeschlossen werden, die Wahrscheinlichkeit ist dabei abhängig von der Mutationsrate. Pleiotrope Effekte durch *Genome Editing* Methoden sind bei Mikroorganismen im Gegensatz zu den Pflanzen und Tieren kaum beschrieben. In den Anfängen der klassischen Gentechnik wurden gelegentlich unerwartete Auswirkungen bei Einführung von Fremd-Genen beschrieben. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Entdeckung der Produktion von Indolblau aus Indol bei *Escherichia coli*, zu der das Bakterium plötzlich nach dem Transfer von Genen für den Abbau von Naphtalen zu Salicylsäure in der Lage war (Ensley *et al.* 1983). Mittlerweile sind diese Veränderungen durch die fortschreitende Vermehrung von Genomsequenz-Daten und Programmen zur umfassenden Analyse dieser Daten (Stoffwechselwege) vorhersagbarer und treten viel seltener auf. Pleiotrope Effekte können außerdem auch jederzeit auf natürlichem Wege z.B. durch Aufnahme von Fremd-DNA (Konjugation, Transformation und Transduktion) entstehen. Bisher gibt es kaum Untersuchungen zu pleiotropen Effekten, welche möglicherweise durch die neuen *Genome Editing* Techniken entstehen können.

4.5.2.4 Allgemeine Schlussfolgerungen

Mit *Genome Editing* Techniken sind nach bisherigem Kenntnisstand nur sehr wenige unbeabsichtigte Effekte auf angrenzende Gene bzw. pleiotrope Effekte zu erwarten. Die Datenlage ist aber zurzeit noch beschränkt. Mit anderen Methoden sind diese sehr wahrscheinlich und somit kaum zu vermeiden. Unbeabsichtigte pleiotrope oder Insertions-Effekte hingegen treten bei Pflanzen und Tieren bei jeder Kreuzung und jeder induzierten Mutagenese auf. Diese werden durch Segregation im Züchtungsprozess entfernt. Mit dem *Genome Editing* sind sie bei mit geeigneter Vorplanung sehr viel seltener zu erwarten oder gar auszuschließen.

4.6 BEABSICHTIGTE EFFEKTE

4.6.1 Multiple Genomveränderungen

Gerade die Verfahren des *Genome Editing* eignen sich dazu, zielgenau multiple Veränderungen an gleichen bzw. ähnlichen Genen (Genorten, Sequenzen) durchzuführen, oder simultan oder zeitlich gestaffelt an verschiedenen Genen (Genorten, Sequenzen) vorzunehmen. Die Präzision ist mit klassischen Züchtungsverfahren nicht erreichbar.

4.6.1.1 Multiple Genomveränderungen bei Pflanzen

Genome Editing

Das gleichzeitige Verändern von mehreren Basen an einem Ort im Genom zur selben Zeit oder auch zeitlich versetzt ist mittels *Genome Editing* durch SDN 1 und SDN 2 möglich. Durch die Zugabe einer DNA-Matrize lassen sich so mehrere Basen (bis zu sieben) gleichzeitig ändern (SDN 2), hierzu sind bereits erste Studien veröffentlicht worden (Li *et al.*, 2013, 2015; Svitashev *et al.*, 2015). Die Erfolgsrate ist allerdings sehr gering: Weniger als 0,5% der erzeugten Pflanzen tragen die gewünschten Veränderungen. Es wäre theoretisch auch denkbar, dass mittels SDN 1 sukzessive mehrere gerichtete Mutationen an einem Ort ins Genom eingebracht werden. Es gibt allerdings dazu noch keine Studien. Mittels SDN 3-Technik wäre eine Mehrfachmutagenese eines Genortes durch SDN 1 oder SDN 2 ersetzbar, da es hier zu einem gezielten Einbau eines entsprechenden DNA-Fragmentes käme, das alle Einzelveränderung des SDN 1 oder SDN 2-Ansatzes enthalten kann. Mit ODM ist die Änderung von einigen Basen (bis zu 4) ebenfalls möglich. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass bei Techniken mit mehreren sukzessiven Änderungen an einem Genort die behandelten Pflanzen nach jeder Einzeländerung eine Zellkulturpassage durchlaufen müssen und es so zu einer Häufung von unerwünschten somaklonalen Mutationen kommen kann (gilt für fast alle Verfahren mit Zellkulturpassagen). Beim Base Editing können durch die Cytosin-Deaminase alle Desoxycytidine in einem Bereich von fünf Basen deaminiert werden (Komor *et al.*, 2016). Dies ermöglicht in begrenztem Umfang multiple Veränderungen an einem Genort.

Eine simultane oder gestaffelte Veränderung von mehreren Genorten ist ebenfalls mit SDN 1, 2 oder 3 möglich, indem man z.B. beim CRISPR/Cas9-System verschiedene guide RNAs - die Lotsen zu verschiedenen Genorten - gleichzeitig oder nacheinander anwendet. Die Effizienz des Verfahrens hängt dabei stark vom Design der verwendeten Erkennungsdomänen ab. Fehlpaarungen führen zu einer Reduktion der Effizienz insbesondere, wenn diese in der

Kernregion lokalisiert sind. Erste Beispiele für die SDN 1-Technik gibt es bereits beim hexaploiden Weizen (Wang *et al.,* 2014, Liang *et al.,* 2017), Sojabohne (Li *et al*, 2015) und bei einer tetraploiden Kartoffel (Andersson *et al.*, 2016). Selbst das simultane Verändern von 14 Genen wurde vor kurzem bei *Arabidopsis* gezeigt, ohne dass *Off target*-Effekte gefunden wurden (Peterson *et al.*, 2016). Mit ODM wären prinzipiell ebenfalls simultane Veränderungen möglich, wenn verschiedene Oligonukleotide gleichzeitig in die Zelle eingebracht würden.

Da das Base Editing auf den gleichen Prinzipien beruht wie die Nuklease Technik, ist es prinzipiell auch möglich, mehrere Gene simultan oder nacheinander durch Deaminierung zu verändern. Beispiele dazu liegen derzeit aber nicht vor.

Natürliche Mutation, klassische Züchtung

Bei der klassischen Züchtung ist ein Austausch mehrerer Basen nur möglich, wenn ein natürliches Allel mit mehreren Unterschieden in kreuzbaren Varianten vorhanden ist, z.B. in verwandten Wildarten. Die Wahrscheinlichkeit, dieses durch natürliche Mutation zu erreichen, ist sehr gering. Nur (hinreichend) gekoppelte Zielgene können in klassischen Züchtungsverfahren simultan vererbt und in Zuchtlinien eingebracht werden.

Ionisierende Strahlen oder Chemikalien (EMS)

Gezielte, gereihte Veränderungen mehrerer Basen mittels klassischer Mutagenese sind extrem unwahrscheinlich, da die Mutationen zufällig im Genom verteilt sind. Zudem treten entsprechend häufig *Off target*-Effekte auf.

Die Veränderung mehrerer Gene gleichzeitig ist mit ionisierenden Strahlen oder mutagenen Chemikalien möglich, aber es entstehen ebenfalls viele *Off target*-Mutationen, was etwaige Rückkreuzungen kompliziert. In der Praxis ist es daher einfacher, vorselektierte, mutierte Linien miteinander zu kreuzen. Allerdings beinhalten auch diese immer noch die *Off target*-Mutationen der einzelnen Linien, die u.U. zu einem unerwünschten Phänotyp führen können. Ein Versuch, mittels TILLING eine Mehltauresistenz (durch Modifikationen der MLO-Gene) im Weizen zu erzeugen, zeigte, dass die Mutationen nicht immer an der gewünschten Stelle

vorkommen und nicht immer zum gewünschten Ergebnis führen (Acevedo-Garcia *et al.*, 2017).

Anwendung der „klassischen Gentechnik“

Klassische Gentechnik erlaubt das gestaffelte und, begrenzt, auch das simultane Einbringen mehrerer (Fremd-)Gene in eine Zuchtlinie - etwa bei „stacked events“. Allerdings kann es dabei durch das Einbringen zusätzlicher Kopien der Gene zu unerwünschten Effekten wie z.B. Silencing kommen.

4.6.1.2 Multiple Genomveränderungen bei Tieren

Genome Editing

Der Einsatz von DNA-Nukleasen erlaubt auch bei Tieren multiple Genomveränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass mittels des CRISPR/Cas9-Systems die 62 Kopien der Porcine Endogenous Retroviren (PERVs) im Schweine-Genom simultan ausgeschaltet werden können (Yang *et al.,* 2015). Zudem kann man durch Co-Transfektion von Zellen oder Mikroinjektion von mehrerer bereits vorgefertigter GuideRNAs und (einer) Cas9 in Embryonen mehrere Gene gleichzeitig modifizieren oder ein Gen mehrfach attackieren, um größere Genbereiche (bis zu mehreren Kilobasen Länge) aus dem Genom zu entfernen. Diese Genbereiche können ganze Exone oder sogar das komplette Gen betreffen.

Klassische Tierzucht und Gentechnik

Die klassische Züchtung an Tieren erlaubt zwar multiple Änderungen der Erbanlagen, allerdings nur ungenau und in einem langwierigen Züchtungsprozess. In der Tierzucht wird von quantitativen Effekten ausgegangen, die meist mehrere Genorte betreffen. Mit klassischer Gentechnik sind gekoppelte Genomveränderungen technisch schwer umsetzbar. Es sind zwar einige Vektoren bekannt, die bisher aber nur sehr begrenzte Erfolge lieferten. Die Verwendung neuartiger Vektoren wie z.B. BACs, YACs oder Transposons erlaubt die Insertion multipler Gensequenzen.

4.6.1.3 Multiple Genomveränderungen bei Mikroorganismen

Im Zuge der Entwicklung von neuartigen *Genome Editing* Methoden können nun auch für die klassische Gentechnik nur schwer zugängliche Mikroorganismen z.B. *Actinobacteria* (Deng *et al.* 2017) modifiziert werden.

Auch multiple Genomveränderungen sind mittlerweile bei diesen Mikroorganismen einfach und mit großer Zeitersparnis möglich (Cobb *et al.* 2014). Huang *et al.* 2015 beschreiben z.B. die erfolgreiche Deletion von ganzen Antibiotikasynthese-Clustern (von 21-83 Kb) in *Streptomyces*.

Aber es gibt auch Mikroorganismen, bei denen z.B. das Wildtyp-CRISPR/Cas9 System nicht angewendet werden kann, da diese Bakterien nur über reduzierte NHEJ Mechanismen verfügen z.B. das biotechnologisch relevante Bakterium *Clostridium cellulolyticum*. Um auch diese Bakterien modifizieren zu können, wurden Einzelstrangbruch-induzierende Nickasen entwickelt, die die Durchführung von *Genome Editing* z.B. bei *C. cellulolyticum* über HR ermöglichen (Xu *et al.* 2015).

Die Anwendbarkeit von CRISPR basierten Genom Modifikationsmethoden zur gleichzeitigen Insertion oder Deletion mehrerer Gene konnte für *Escherichia coli* und *Tatumella citrea* mit hoher Effizienz gezeigt werden. Mit anderen Methoden (*sac*B, I-SceI, MAGE) konnte dies nicht erreicht werden (Jiang *et al.* 2015).

4.6.1.4 Allgemeine Schlussfolgerungen

Multiple Genomveränderungen sind mit *Genome Editing* besser realisier- und kontrollierbar als mit klassischen Verfahren. Dies gilt sowohl für Pflanzen und Tiere als auch bei Mikroorganismen.

4.6.2 Beabsichtigte pleiotrope Effekte

4.6.2.1 Beabsichtigte pleiotrope Effekte bei Pflanzen

Genome Editing

Gezielte pleiotrope Modifikationen, d.h. Steuerung von weiteren Genaktivitäten, sind mittels ODM, SDN 1 und 2 und Base Editing etwa durch Mutation von Transkriptionsfaktoren durchführbar. Mit dem SDN 3 Verfahren könnten durch *„gene targeting“* eines Transkriptionsfaktors oder anderer regulatorischer Elemente ebenfalls pleiotrope Effekte erreicht werden. Da der Zielort vorher definiert werden kann, können mögliche ungewünschte (pleiotrope) Effekte minimiert werden.

Natürliche Mutation, klassische Züchtung

Erwünschte pleiotrope Effekte sind theoretisch möglich, aber praktisch schwer steuerbar. So beruht z.B. der Heterosiseffekt auf diesem Prinzip, allerdings kennt man meist die dafür verantwortlichen Gene nicht.

Ionisierende Strahlen oder Chemikalien (EMS)

Erwünschte pleiotrope Effekte entstehen per Zufall und müssten segregiert und selektiert werden. Die Effekte müssten vorher bekannt sein, um sie zu identifizieren. Praktisch ist dies kaum realisierbar.

Anwendung der „klassischen Gentechnik“

Beabsichtigte pleiotrope Effekte sind theoretisch möglich, z.B. durch Einbringen von Transkriptionsfaktoren ähnlich wie beim *Genome Editing* oder durch ungezielte T-DNA Mutagenese und anschließende Selektion auf den gewünschten pleiotropen Effekt.

4.6.2.2 Beabsichtigte pleiotrope Effekte bei Tieren

Beabsichtigte pleiotrope Effekte sind bei Tieren kaum untersucht worden, theoretisch aber möglich. Sie sind schwer vorhersagbar, da die Detailkenntnisse zu Geninteraktionen vielfach noch unvollständig sind, was aber mit *Genome Editing* möglich werden könnte.

4.6.2.3 Beabsichtigte pleiotrope Effekte bei Mikroorganismen

Pleiotrope Effekte könnten theoretisch bei Mikroorganismen sowohl mit klassischer Gentechnik als auch mit den neuen *Genome Editing* Techniken bewusst induziert werden. Ebenso könnten diese Effekte mittels natürlicher bzw. induzierter Mutation zufällig und ungerichtet entstehen. Bisher wurden dazu allerdings keine Untersuchungen durchgeführt.

4.6.2.4 Allgemeine Schlussfolgerungen

Beabsichtigte pleiotrope Effekte sind mit klassischer Gentechnik und neuen Techniken machbar, mit anderen Techniken theoretisch auch erreichbar, aber nur per Zufall und unter hohem Aufwand. Bei Nutztieren konnten solche Effekte noch nicht nachgewiesen werden.

4.7 LITERATUR

Acevedo-Garcia J, Spencer D, Thieron H, Reinstädler A, Hammond-Kosack K, Phillips AL *et al.* (2017) Mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. Plant Biotechnol J. 2017;15(3):367-78.

Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält A-S, Samuelsson M, Hofvander P (2016) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (Solanum tuberosum) by transient CRISPR/Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Reports. 2016:1-12.

Auerbach C and Robson JM (1944) Production of mutations by allyl isothiocyanate. Nature. 154:81.

Batista R, Saibo N, Lourenço T, Oliveira MM (2008) Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(9):3640-5.

Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS (2014) Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? PLoS Genet. 10(1):e1004086.

Bolet G (1986) Timing and extent of embryonic mortality in pigs, sheep and goats: Genetic Variability. In: Embryonic mortality in farm animals (eds. Sreenan and Diskin), Martinus Nijhoff Publishers, ISBN 0-89838-772-8, 12-43.

Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassié L, Nadi R, Forni G, Boyd Lade S, Soto E, Jin X, Medina V, Villorbina G, Munoz P, Farré G, Fischer R, Twyman RM, Capell T, Christou R, Schillberg S (2016) Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. Plant Biotechnology Journal 14, pp. 2203-2216

Bowater R, Doherty AJ (2006) Making ends meet: Repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. PLoS Genet 2(2): e8.

Cobb RE, Wang Y, Zhao H (2014) High-Efficiency Multiplex *Genome Editing* of Streptomyces Species using an engineered CRISPR/Cas System. ACS Synthetic Biology 4, 723-728

Cooper JL, Till BJ, Laport RG, Darlow MC, Kleffner JM *et al.* (2008) TILLING to detect induced mutations in soybean. BMC Plant Biology 8:9.

Deng Y, Zhang X, Zhang X (2017) Recent advances in genetic modification system for Actinobacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 101(6):2217-2226

Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, VanDyk JK, Bogdanove AJ (2012) TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0 tools for TAL effector design and target prediction. Nucleic Acid Research 40: W117-22

Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D and Crow JF (1998) Rates of spontaneous mutation. Genetics 148: 1667-1686

Ensley BD, Ratzkin BJ, Osslund TD, Simon MJ, Wackett LP, Gibson DT(1983) Expression of naphthalene oxidation genes in Escherichia coli results in the biosynthesis of indigo. Science 222(4620):167-169

Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, *et al.* (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 111(12):4632-7.

Forner J, Pfeiffer A, Langenecker T, Manavella P, Lohmann JU (2015) Germline-Transmitted *Genome Editing* in Arabidopsis thaliana Using TAL-Effector-Nucleases. PLoS One. 10(3):e0121056.

Foster PL (1991) In vivo Mutagenesis. Methods Enzymol. 204:114-125

Hsu PD, Scott DA, Weinstein J A, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature Biotechnology Vol. 31: 827-32

Huang H, Zheng G, Jiang W, Hu H, Lu Y (2015) One-step High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated *Genome Editing* in Streptomyces. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 47(4):231-243

Iyer V, Zhang W, Hodgkins A, Keane Th, Huang X, Skarnes WC (2015) Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. Nature Methods 12: 479

Jander G, Baerson SR, Hudak JA, Gonzalez KA, Gruys KJ *et al.*, (2003) Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in Arabidopsis to determine frequency of herbicide resistance. Plant Physiol. 131: 139–146

Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR/Cas systems. Nature Biotechnology 31, 233-239

Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S (2015) Multigene Editing in the Escherichia coli Genome via the CRISPR/Cas9 System. Applied and Environmental Microbiology 81: 2506-2514

Kim K, Ryu SM, Kim ST, Bark G, Kim D, Lim K, Chung E, Kim S, Kim JS (2017) Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. Nature Biotechnology 35 (5):435-437

Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, *et al.* (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide *Off target* effects. Nature. 529(7587):490-5.

Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, (2016) Genome-wide specificities of CRISPR/Cas Cpf1 nucleases in human cells. Nat Biotech. 34(8):869-74.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533: doi:10.1038/nature17946

Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, *et al.* (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated *Genome Editing* in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. Nature biotechnology 31(8):688-91.

Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat Biotech. 30(5):390-2.

Li Y, Pan S, Zhang Y, Ren M, Feng M, Peng N (2015) Harnessing Type I and Type III CRISPR/Cas systems for *Genome Editing*. Nucleic Acids Res. 44(4):e34-e.

Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon B P, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015) Cas9-Guide RNA Directed *Genome Editing* in Soybean. Plant Physiology, 169: 960–970.

Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q (2017) Efficient DNA-free *Genome Editing* of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Communications. 8:14261.

Lynch M (2010) Evolution of the mutation rate. Trends Genet. 26(8):345-352

Ossowski S, Schneeberger K, Lucas-Lledó JI, Warthmann N, Clark RM, Shaw RG, *et al.* (2010) The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in Arabidopsis thaliana. Science. 327(5961):92-4.

Miyao A, Nakagome M, Ohnuma T, Yamagata H, Kanamori H (2012) Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing. Plant Cell Physiol. 53:256-64.

Peterson BA, Haak DC, Nishimura MT, Teixeira PJPL, James SR, Dangl JL, *et al.* (2016) Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis. PLoS One 11(9):e0162169.

Puchta H (2002) Gene replacement by homologous recombination in plants. Plant Mol Biol 48: 173-182.

Reiss B, Schubert I, Köpchen K, Wendeler E, Schell J, Puchta H (2000) RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by Agrobacterium. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(7):3358-63.

Scally A, Durbin R (2012) Revising the human mutation rate: implications for understanding human evolution. Nature Genetics Reviews, 13, 745-753.

Schaefer KA, Wu HW, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG Mahajan VB (2017) Unexpected mutations after CRISPR-cas9 editing *in vivo.* Nature Methods 14: 547-548.

Schiml S, Fauser F, Puchta H (2014) The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. The Plant Journal 80(6):1139-50.

Schouten HJ, van de Geest H, Papadimitriou S, Bemer M, Schaart JG, Smulders MJ, *et al.* (2017) Re-sequencing transgenic plants revealed rearrangements at T-DNA inserts, and integration of a short T-DNA fragment, but no increase of small mutations elsewhere. Plant Cell Reports 2017:1-12.

Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Lyer V, Huang X, Skarnes WC (2014) Efficient genome modification by CRISPR/Cas9 nickase with minimal *Off target* effects. Nature Methods 11, 399-402.

Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F (2015) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science 351(6268):84-8.

Sreenan JM, Diskin MG (1986) The extent and timing of embryonic mortality in cattle. In: Embryonic mortality in farm animals (eds. Sreenan and Diskin), Martinus Nijhoff Publishers, ISBN 0-89838-772-8, 1-11.

Stella S, Montoya G (2016) The *Genome Editing* revolution: A CRISPR/Cas TALE *Off target* story. Bioassays 38: S4-S13.

Svitashev S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM (2015) Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. Plant Physiol. 169(2):931-45.

Till BJ, Cooper JL, Tai TH, Colowit P, Green EA, Henikoff S, Comai L (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC Plant Biology 7:19.

Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, Goodwin MJ, Aryee MJ, Joung JK (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific *genome editing* Nature Biotechnology 32(6): 569-576.

Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, *et al.* (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nature biotechnology doi:10.1038/nbt.2969

Xu T, Li Y, Shi Z, Hemme CL, Li Y, Zhu Y, Van Nostrand JD, He Z, Zhou J (2015) Efficient *Genome Editing* in Clostridium cellulolyticum via CRISPR/Cas9 Nickase. Applied Environmental Microbiology 81: 4423-4431.

Yang L, Guell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach ., Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G (2015) Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). Science Express doi/10.1126/science.aad1191.

Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, *et al.* (2010) High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(26):12028-33.

Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, *et al.* (2014) The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. Plant Biotechnol J. 12(6):797-807.

5 MODUL III: NACHWEIS UND IDENTIFIZIERBARKEIT

Dieses Modul behandelt den Nachweis von genetischen Veränderungen, die Identifizierung genomeditierter Organismen und die Identifizierbarkeit der Technik, mit der genetische Veränderungen erzeugt wurden.

5.1 ZUSAMMENFASSUNG DES MODULS III

Mit DNA-, Protein- und Metabolit-basierten Analyseverfahren steht eine Vielzahl von Methoden zum Nachweis von genetischen Unterschieden, die gegebenenfalls durch *Genome Editing* ausgelöst wurden, zur Verfügung. DNA ist das ideale Zielmolekül für den eindeutigen Nachweis einer Veränderung des genetischen Materials, da diese Träger der Modifikation ist.

Die Identifizierung des genomeditierten Organismus und die Unterscheidung von anderen Organismen sind nur unter bestimmten Voraussetzungen und nur im Vergleich zu einer Referenz eindeutig möglich. Je geringer die Unterschiede zur Referenz werden, desto schwieriger ist die Identifizierungsmöglichkeit. Nur ergänzende Informationen über den Entwicklungsweg und die Änderungen erlauben im Einzelfall eine eindeutige Rückverfolgbarkeit.

Ob nachgewiesene genetische Veränderungen durch Techniken des *Genome Editing* oder andere Techniken erzeugt wurden, ist nicht zweifelsfrei zu klären.

5.2 EINLEITUNG

Das Genom beherbergt die im Erbgut eines Organismus kodierte genetische Information, die wesentlich dessen Eigenschaften (Phänotyp) bestimmt. Das Erbgut (die DNA) ist aus vier Grundbausteinen (Nukleotiden) aufgebaut, die in einer bestimmten Sequenz als DNA-Moleküle angeordnet sind. Die Veränderung der Nukleotidsequenz ist seit jeher ein Ziel von Züchtung, um den Organismus mit gewünschten Eigenschaften auszustatten.

Seit Jahrzehnten werden z. B. in Pflanzen durch Verfahren wie Bestrahlung oder den Einsatz von erbgutverändernden Chemikalien Veränderungen der Nukleotidsequenz (Mutationen)

induziert und dadurch neue genetische Variabilität geschaffen, die züchterisch genutzt werden kann. Dabei kommt es zu ungerichteten Veränderungen der Nukleotidsequenz. Die Orte der Mutationen im Erbgut sind zufällig und deren Anzahl kann sehr hoch sein.

Die neuen Verfahren des *Genome Editing* bieten dagegen die Möglichkeit, gerichtet Veränderungen an bestimmten Positionen der Nukleotidsequenz einzubringen. Die eingeführten Änderungen können sehr klein sein; es werden oft nur einzelne Nukleotide verändert, eingefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion). In der Regel ist die Anwendung der Technik darauf ausgerichtet, keine weiteren Änderungen zu erzeugen und keine Spuren im Genom zu hinterlassen. In diesen Fällen unterscheidet sich das Genom eines genomeditierten Organismus nur minimal von dem nicht veränderten Genom des betreffenden Ausgangsorganismus (Elter).

Im Rahmen dieses Moduls soll deshalb erörtert werden,

- ob durch *Genome Editing* eingeführte Veränderungen analytisch nachgewiesen werden können (Nachweis, Nachweisbarkeit der Veränderung),
- ob durch *Genome Editing* entwickelte Organismen eindeutig identifiziert werden können (Identifizierung des Organismus) und
- ob analytisch belegt werden kann, dass die Veränderungen durch *Genome Editing* erzeugt wurden (Identifizierbarkeit der Technik).

Dabei bedeuten im Rahmen dieses Moduls:

- Nachweisbarkeit der genetischen Veränderung - ein Unterschied auf der Ebene der Nukleotidsequenz eines Organismus kann im Vergleich zum nicht genomeditierten Organismus eindeutig gezeigt werden.
- Identifizierung des genomeditieren Organismus - aufgrund von nachgewiesenen charakteristischen Nukleotidsequenzen kann der genomeditierte Organismus von anderen Organismen unterschieden werden.
- Identifizierbarkeit der Technik - es kann eindeutig gezeigt werden, dass die Nukleotidsequenz in einem Organismus über *Genome Editing* geändert wurde.

Der Nachweis genetischer Unterschiede und die Identifizierung des genomeditierten Organismus allein geben keine Auskunft zur Ursache der Nukleotidsequenzänderung.

Betrachtet werden diese Aspekte für Organismen, die landwirtschaftlich nutzbar sind (Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen) und die mit folgenden Verfahren des *Genome Editing* erzeugt wurden:

- Nutzung ortsspezifischer Nuklease-Systeme (SDN 1, SDN 2, SDN 3);

- *Base Editing* ohne Doppelstrangbruch;
- Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (ODM).

Nicht behandelt werden Organismen, die auf Synthetische Biologie und Gene Drive zurückgehen.

Die rechtliche Einordnung von Organismen, die mit Hilfe der neuen Techniken verändert wurden, ist nicht Gegenstand dieses Moduls.

5.3 VERFAHREN DES *GENOME EDITING* IM RAHMEN DES BERICHTS

Beim *Genome Editing* kann die Nukleotidsequenz zielgerichtet über eingeführte DNA-Doppelstrangbrüche, -Einzelstrangbrüche oder eingebrachte synthetische Oligonukleotide verändert werden.

Werden Doppelstrangbrüche durch ortsspezifische Nukleasen (*site directed nuclease*, SDN) erzeugt, erfolgt die Reparatur zufällig durch zelleigene Prozesse. An der reparierten Stelle kann eine Punktmutation entstehen (SDN 1). Es kann hingegen auch ein Stück DNA als Reparaturmatrize in die Zelle eingebracht werden, das sich um ein oder wenige Nukleotide von der Zielsequenz unterscheidet. Die Zelle nutzt diese DNA dann als Vorlage, um den Schnitt zu schließen (reparieren). Im Ergebnis wird die enthaltene Veränderung übernommen, sodass an der reparierten Stelle zielgerichtet Punktmutationen entstehen (SDN 2). Ferner ist es möglich, eine DNA in die Zelle einzubringen, die neben der ursprünglichen homologen Sequenz ein größeres Stück Fremd-DNA beinhaltet. Auch dieses Stück dient dann als Vorlage bei der Reparatur am Ort des Strangbruchs (SDN 3). Im Ergebnis enthält das Genom hier eine (längere) veränderte Nukleotidsequenz.

Das Ergebnis der zelleigenen Reparatur eines Doppelstrangbruchs ist nicht vorhersehbar. Beim Base Editing wird die DNA daher ortsspezifisch durch eine modifizierte Nuklease gebunden, aber nicht geschnitten. Eine damit fusionierte Cytidin-Deaminase wandelt dann Cytidin in Thymidin und auf dem Gegenstrang entsprechend Guanosin in Adenosin um (Komor *et al*., 2016). Damit ist die gezielte Umwandlung eines bestimmten Nukleotids im Genom möglich.

Bei der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese (*oligonucleotide directed mutagenesis*, ODM) wird ein Molekül von ca. 20 bis 100 Nukleotiden in die Zelle eingebracht, welches sich in einem oder wenigen Nukleotiden von der Zielsequenz unterscheidet (Laible *et al*., 2006; Si-

mon *et al*., 2008). Diese Oligonukleotide binden aufgrund sequenzspezifischer Wechselwirkungen an ihre Zielsequenz im Genom. Das zelleigene Reparatursystem erkennt die Fehlpaarung und repariert diese durch den Einbau des abweichenden Nukleotids in die eigene DNA-Sequenz. Die eingebrachten Oligonukleotide werden anschließend von der Zelle abgebaut.

Zusammenfassend können durch *Genome Editing* folgende Veränderungen im Genom erzeugt werden:

- Nukleotid-Substitutionen,
- Insertion oder Deletion einzelner Nukleotide,
- Insertion oder Deletion von Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Länge,
- DNA-Inversionen (Abbrechen, Verdrehen und Reintegration eines DNA-Stücks).

5.4 GENERELLE VORÜBERLEGUNGEN

Bei der Betrachtung der Nachweisbarkeit und der Identifizierung des genomeditierten Organismus ist zu berücksichtigen, in welcher Weise eine genetische Veränderung in den Organismus eingebracht wurde. Wenn die Gene für die ortsspezifischen Nukleasen stabil in das Genom integriert wurden, enthält der zunächst erzeugte Organismus rekombinante DNA. Nachkommen, die als finales Produkt anzusehen sind, werden aber in der Regel durch Kreuzungs- und Selektionsschritte so generiert, dass sie zwar die genomeditierte Veränderung tragen, aber keine rekombinante DNA mehr enthalten (Null-Segreganten).

Der Nachweis der erfolgreichen Segregation, also der Abwesenheit von rekombinanter DNA, ist von dem Nachweis und der Identifizierbarkeit der durch *Genome Editing* erzeugten genetischen Veränderung klar zu trennen. Ersteres kann z. B. über eine vollständige Sequenzierung des Genoms (*whole genome sequencing*, WGS) gezeigt werden. Einige *Genome Editing*-Systeme verwenden Genkassetten mit hochkonservierten Sequenzen, z. B. den konservierten Bereiche der guide RNA (scaffold RNA), was die Etablierung von standardisierten Nachweismethoden erlaubt.

Werden rein proteinbasierte Verfahren des *Genome Editing* eingesetzt und die exprimierten Proteine direkt in die Zellen eingebracht, dann ist im genomeditierten Organismus keine rekombinante DNA zu erwarten.

Grundsätzlich sind der Nachweis eines genomeditierten Organismus und seine Identifizierung umso schwieriger, je geringer die Unterschiede zwischen ihm und dem Vergleichsorganismus (Referenz) sind. Je geringer die Unterschiede, desto wichtiger sind ergänzende Informationen über den Entwicklungsweg und die beabsichtigten Änderungen. Eine Identifizierung des Verfahrens, das zur gezielten Änderung der Nukleotidsequenz führte, ist generell (auch für Mutagenese- oder Rekombinationstechniken) nicht möglich. Daher kann nur eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Anwendung von *Genome Editing* gemacht werden.

Untersuchungsergebnisse werden wesentlich auch von der Qualität des Probenmaterials beeinflusst. Grundsätzlich sind Untersuchungen an homogenem, wenig verarbeitetem Probenmaterial einfacher durchzuführen und erlauben klarere Aussagen, als Untersuchungen an heterogenem und stark verarbeitetem Material.

5.5 Nachweis von genetischen Veränderungen, Identifizierung genomeditierter Organismen

Bei der Analytik von Proben sind zwei Szenarien zu unterscheiden: Der Nachweis der Veränderung kann auf Grundlage vorheriger Kenntnis der Modifikation und der angrenzenden Nukleotidsequenzen (z. B. auf Grundlage von Informationen des Entwicklers, aus Publikationen, Patentschriften etc.) zielgerichtet erfolgen. In diesem Fall wird im Folgenden von zielgerichtetem Nachweis gesprochen. Erfolgt der Nachweis der genetischen Veränderungen dagegen ohne die vorherige Kenntnis der Modifikation und der angrenzenden Nukleotidsequenzen, ist im Folgenden der nicht-zielgerichtete Nachweis gemeint.

In den weiteren Betrachtungen wird davon ausgegangen, dass jeweils eine geeignete Referenz vorliegt (siehe 5.5.2.1). Ohne geeignete Referenz sind der Nachweis genetischer Unterschiede und die Identifizierung des genomeditierten Organismus nicht möglich.

Basierend auf den gefundenen genetischen Unterschieden müssen bioinformatische und statistische Analysen genutzt werden, um Abschätzungen zu ermöglichen, ob diese Unterschiede mit großer Wahrscheinlichkeit technologiebedingte genetische Veränderungen sind.

5.5.1 Analyseverfahren für zielgerichteten Nachweis und die Identifizierung des genomeditierten Organismus

Derzeit kommen verschiedene Analyseverfahren für den zielgerichteten Nachweis einer Veränderung, das heißt mit vorheriger Kenntnis der Modifikation, in Frage. Im Folgenden werden ihre Eignung für den Nachweis genetischer Unterschiede und die Identifizierung eines durch *Genome Editing* entwickelten Organismus näher betrachtet.

5.5.1.1 DNA-Amplifikationsverfahren

Für DNA-Amplifikationsverfahren wird die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) genutzt. PCR-basierte Nachweismethoden sind hochspezifisch und sensitiv, setzen aber die Kenntnis der Nukleotidsequenz des nachzuweisenden DNA-Abschnitts voraus.

Werden durch *Genome Editing* nur sehr kleine Änderungen (ein oder wenige Nukleotid-Austausche, Insertionen oder Deletionen durch SDN 1, SDN 2, *Base Editing* oder ODM) eingefügt, kann eine entsprechende Sequenzänderung prinzipiell mit PCR-Verfahren, wie beispielsweise TaqMan real-time PCR oder digitaler PCR, nachgewiesen werden. Zum Beispiel können mittels der für Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphism,* SNP)-Analysen eingesetzten PCR-Methoden und ggf. Schmelz-kurvenanalysen von Amplifikaten schon sehr kleine Sequenzunterschiede von einem oder wenigen Nukleotiden im Vergleich zur nicht editierten DNA gezeigt werden (Hugget *et al*., 2015). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die zu untersuchenden Proben eventuell nur anteilig aus dem genomeditierten Produkt bestehen. Unter Verwendung eines optimierten SNP-Assays kann aber schon eine Mutante unter 100.000 Wildtypen nachgewiesen werden (Jennings *et al*., 2014).

Kenntnisse und Erfahrungen in der molekulargenetischen Analytik und der GVO-Analyse erlauben gegebenenfalls die Etablierung von Event-spezifischen PCR-Verfahren für den Nachweis und die Identifizierung von Modifikationen längerer Nukleotidsequenzen durch *Genome Editing* (wie beispielsweise durch SDN 3).

5.5.1.2 DNA-Sequenzierung

Für den zielgerichteten Nachweis bekannter Veränderungen eignen sich gängige Sequenzierungstechniken (z. B. Sanger). Wenn der Bereich, der die Veränderung enthält, bekannt ist, kann er amplifiziert und die Sequenz bestimmt werden. Dieses Verfahren ist für möglichst reine Proben besonders geeignet.

Für die Untersuchung von reinen, aber auch gemischten Proben eignet sich insbesondere die massive parallele Sequenzierung einer Zielsequenz mittels Next Generation Sequencing (NGS), das *targeted deep sequencing* (Fraiture *et al*., 2015). Ein bekannter genetischer Unterschied kann mittels *targeted deep sequencing* nachgewiesen und auch quantitativ abgeschätzt werden. Hierdurch wird der Aufwand, der beim vollständigen Sequenzieren eines Genoms (WGS) entsteht, deutlich reduziert.

Werden durch eine DNA-Sequenzierung größere Modifikationen der Nukleotidsequenz und/ oder integrierte rekombinante DNA nachgewiesen, lässt dies eine Identifizierung des Organismus zu, wenn die geänderte Nukleotidsequenz des betroffenen genomeditierten Organismus bekannt ist.

Kenntnisse und Erfahrungen in der molekulargenetischen Analytik und der GVO-Analyse erlauben gegebenenfalls die Etablierung von *targeted deep sequencing* Assays zum Nachweis und zur Identifizierung von Modifikationen längerer Nukleotidsequenzen durch *Genome Editing*.

5.5.1.3 Hybridisierungsverfahren

Hybridisierungsmethoden (Southern Blot, Microarrays etc.) sind für molekulare Charakterisierungen von untergeordneter Bedeutung, da sie oft von geringerer Sensitivität sind und eine größere Menge des genetischen Materials erfordern. Darüber hinaus ist deren Spezifität abhängig von der Länge der Modifikation. Für einzelne Nukleotidunterschiede ist die Spezifität oft nicht ausreichend. Bei größeren Modifikationen der Nukleotidsequenz sowie bei integrierter Fremd-DNA sind aber mit größerer Menge der zu untersuchenden DNA ein Nachweis und eine Identifizierung des genomeditierten Organismus sicher möglich.

5.5.1.4 Protein-basierte Verfahren

Die Anwendung Protein-basierter Methoden ist nur möglich, wenn ausreichende Mengen des intakten (nicht prozessierten) Zielproteins zur Verfügung stehen. Neben Immun-basierten Verfahren (Lateral Flow Device – LFD; Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA), in denen der Proteinnachweis über Antikörper erfolgt, kommen auch Massenspektrometrie (MS)-basierte Verfahren zum Einsatz (Lusser *et al*., 2011). Protein-basierte Analysen sind für einen Nachweis im Allgemeinen nur dann sinnvoll, wenn die genetische Modifikation zur Bildung eines neuen oder sehr deutlich veränderten Proteins oder zum Verlust eines Proteins führt. Zur Verifizierung der Befunde ist eine DNA-Analyse erforderlich.

Werden mit Protein-basierten Verfahren deutlich modifizierte oder neue Proteine nachgewiesen, ist noch keine Identifizierung erfolgt. Die Identifizierung des genomeditierten Organismus müsste mittels DNA-Analyse erfolgen. Wegen der genannten Voraussetzungen kommen Protein-basierte Nachweisverfahren für einen breiten Einsatz eher nicht in Frage.

5.5.1.5 Metabolit-basierte Verfahren

Die Gesamtheit aller Metabolite eines Organismus ist das Metabolom, deren Analyse wird als Metabolomics bezeichnet. Die aussagekräftigsten Metabolomics-Techniken sind Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Gaschromatographie–Massenspektrometrie (GC-MS), Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) und MALDI-TOF MS (Frank *et al*., 2012; Kumar *et al*., 2017). Voraussetzung für diese Analyseverfahren ist es, dass die Metabolitzusammensetzung eines Organismus durch die genetische Veränderung deutlich verändert wird.

Nur wenn die eingefügte DNA-Veränderung einen signifikanten Unterschied in der Konzentration von Metaboliten oder die Abwesenheit von Metaboliten und/ oder Anwesenheit neuer Metabolite bewirkt, kann dieser Unterschied zielgerichtet mit vereinfachten Metabolit-Analysetechniken nachgewiesen werden. Voraussetzung hierfür ist die Untersuchung einer möglichst reinen, unverarbeiteten Probe.

Im Anschluss an den Nachweis deutlich modifizierter Metabolitprofile oder neuer Metabolite gelten die gleichen Schlussfolgerungen wie bei den Protein-basierten Verfahren. Wegen der genannten Voraussetzungen kommen Metabolit-basierte Nachweisverfahren für einen breiten Einsatz eher nicht in Frage, sie wären aber gegebenenfalls als Tool für Screening-Ansätze denkbar.

5.5.2 Analyseverfahren für den nicht-zielgerichteten Nachweis der Veränderung und Identifizierung des genomeditierten Organismus

Für den nicht-zielgerichteten Nachweis, das heißt ohne vorherige Kenntnis genetischer Unterschiede, kommen im Wesentlichen *whole genome sequencing* (WGS)-Ansätze in Betracht. Metabolit-basierte Verfahren kommen in diesem Fall nur sehr bedingt in Frage.

5.5.2.1 Whole Genome Sequencing (WGS)

WGS-Ansätze, bei denen das Genom des Zielorganismus vollständig sequenziert wird, finden immer mehr Anwendung als Analysemethode, z. B auch zum GVO-Nachweis (Pauwels *et al*., 2015; Holst-Jensen *et al*., 2016). Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass vorherige Informationen über die spezifische Veränderung in dem zu untersuchenden Organismus nicht zwingend benötigt werden. Allerdings ist ein valides Referenzgenom zur jeweiligen Spezies, gegebenenfalls hinterlegt in einer Referenzdatenbank, erforderlich. Gegen diese können die mittels WGS generierten Sequenzier-Ergebnisse abgeglichen werden. Dieses Referenzgenom sollte möglichst von dem Ausgangsorganismus stammen, aus dem der zu analysierende genomeditierte Organismus entwickelt wurde, da schon zwischen unterschiedlichen Linien der Organismus-Spezies erhebliche Sequenzunterschiede zu erwarten sind. Darüber hinaus sind WGS-Ansätze umso schwieriger anwendbar, je größer das Genom ist und je mehr repetitive Bereiche es darin gibt, wie es zum Beispiel bei landwirtschaftlichen Nutztieren und vielen Kulturpflanzen der Fall ist.

Durch WGS-Ansätze können schon einzelne Nukleotidveränderungen nachgewiesen werden. Größere genetische Modifikationen und/ oder integrierte Fremd-DNA können ebenso mit WGS als solche nachgewiesen werden.

Finden sich mehrere einzelne Nukleotidänderungen in einem Genom verteilt oder an einem Genomlocus auf engstem Raum, kommt eine statistische Betrachtung zur Identifizierbarkeit des genomeditierten Organismus in Frage (siehe 5.5.3).

5.5.2.2 Metabolit-basierte Verfahren

Führt die Anwendung von *Genome Editing* zu qualitativen Veränderungen des Metabolitprofils des Organismus (ein Stoffwechselprodukt wird neu oder nicht mehr gebildet), dann ist dies über Metabolit-basierte Analyseverfahren nachweisbar, sofern eine möglichst reine, unverarbeitete Probe untersucht wird. Wichtige Voraussetzung ist, dass entsprechende Referenzdaten von der Spezies und der nicht-modifizierten Linie vorliegen.

Sehr deutlich modifizierte Metabolitprofile oder neue Metabolite lassen jedoch keinen direkten Nachweis zu, sondern geben lediglich einen Hinweis darauf, dass diese auf genetische Modifikationen und/oder integrierte Fremd-DNA zurückzuführen sein könnten. Eine Identifizierung eines bestimmten Organismus wäre nur in den Fällen möglich, dass ein Organismus einen bestimmten Metaboliten erstmalig bildet oder nicht mehr bildet, und dass diese Eigenschaft nur in diesem Organismus auftritt.

5.5.3 Bioinformatische Analysen, statistische Betrachtungen und Wahrscheinlichkeit der Identifizierung des genomeditierten Organismus

Im folgenden Abschnitt wird die Nutzung bioinformatischer und statistischer Methoden zum Nachweis der Veränderung und der Identifizierung genomeditierter Organismen betrachtet. Für die eindeutige Identifizierung ist allerdings in jedem Fall eine geeignete Referenzsequenz erforderlich.

Es werden zwei Szenarien betrachtet:

- eine zusammenhängende Nukleotidsequenz wurde verändert;
- einzelne Nukleotidänderungen wurden an verschiedenen Stellen im Genom eingefügt.

5.5.3.1 Genom-Editierung einer zusammenhängenden Nukleotidsequenz

Als zusammenhängende Nukleotidsequenz ist eine Sequenz gemeint, die gegenüber der unveränderten Referenz-DNA eingefügte Insertionen oder mehrfache Nukleotidsequenzänderungen in dichter Abfolge enthält. Eine vereinfachte Abschätzung geht für zusammenhängende Nukleotidsequenzen davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit, mit der eine beliebige Nukleotidsequenz in einem Genom vorkommt, grundsätzlich mit zunehmender Länge dieser Sequenz abnimmt (Lusser *et al*., 2011).

Diese Abschätzung vergleicht die Größe des Genoms eines Organismus und die Kombinationsmöglichkeiten zufälliger Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Länge. Das gebildete Verhältnis wird als Wahrscheinlichkeitswert für das Vorkommen dieser zufälligen Nukleotidsequenz im Genom angegeben (Tabelle 1). Es wird ersichtlich, dass bei zunehmender Genomgröße die Länge einer zufälligen Sequenz zunehmen muss, damit deren theoretisches einmaliges Auftreten gegeben ist.

Tabelle 1: Mediane Genomgrößen ausgewählter Organismen (NCBI, 2017) und Kombinationsmöglichkeiten zufälliger Nukleotidsequenzen verschiedener Längen. Die angegebene Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer Sequenz ist der Quotient aus Genomgröße/$4^{\text{Sequenzlänge}}$.

Organismus	**Haploide Genomgröße (nt)**	**Länge einer zufälligen Nukleotidsequenz**	**Kombinationsmöglichkeiten der angegebenen Sequenzlänge**	**Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer Sequenz der angegebenen Länge im Genom**
Escherichia coli	$5{,}17 \times 10^6$	11	$4{,}19 \times 10^6$	1,23
Saccharomyces cerevisiae	$1{,}21 \times 10^7$	12	$1{,}68 \times 10^7$	0,72
Neurospora crassa	$4{,}08 \times 10^7$	13	$6{,}71 \times 10^7$	0,61
Arabidopsis thaliana	$1{,}17 \times 10^8$	14	$2{,}68 \times 10^8$	0,44
Solanum tuberosum	$7{,}06 \times 10^8$	15	$1{,}07 \times 10^9$	0,66
Gallus gallus	$1{,}23 \times 10^9$	15	$1{,}07 \times 10^9$	1,15
Zea mays	$2{,}26 \times 10^9$	16	$4{,}29 \times 10^9$	0,53
Sus scrofa domesticus	$2{,}46 \times 10^9$	16	$4{,}29 \times 10^9$	0,57
Ovis aries	$2{,}62 \times 10^9$	16	$4{,}29 \times 10^9$	0,61
Bos taurus	$2{,}69 \times 10^9$	16	$4{,}29 \times 10^9$	0,63
Homo sapiens	$3{,}00 \times 10^9$	16	$4{,}29 \times 10^9$	0,70
Picea glauca	$2{,}46 \times 10^{10}$	17	$1{,}72 \times 10^{10}$	1,43

Bei dieser Betrachtung werden vereinfachende Annahmen wie die Gleichverteilung der Nukleotide und ihr statistisch unabhängiges Auftreten gemacht. Parameter wie zum Beispiel die Komplexität der veränderten Sequenzen, der Anteil von repetitiven Sequenzen sowie die Diversität des Genoms innerhalb der Spezies werden nicht berücksichtigt. Zusätzlich unterscheiden sich die Insertions-, Deletions- und Substitutionsraten sowie die Rekombinationsrate sowohl je Spezies als auch im genomischen Kontext. Für Pflanzen konnte gezeigt werden, dass sowohl zwischen den Nachkommen einer Ursprungslinie als auch zwischen verschiedenen Akzessionen/ Ökotypen einer Spezies größere Unterschiede vorkommen können (Ossowski *et al*., 2010; Zapata *et al*., 2016). Die vereinfachte Betrachtung müsste um diese Parameter korrigiert werden. Eine belastbare statistische Abschätzung, wie lang eine Sequenz mindestens sein muss, um sie als genomeditiert zu identifizieren, ist nicht verlässlich zu realisieren.

Insertionen stellen einen besonderen Fall dar, da diese neben der Größe der Veränderung auch Sequenzinformationen bereitstellen, die für weitere Analysen genutzt werden können. Wird ein natürlicherweise nicht vorkommendes Konstrukt mit Sequenzen aus Fremd-Organismen im Genom des zu untersuchenden Organismus gefunden, ist es naheliegend anzunehmen, dass es mittels gentechnischer Verfahren inseriert wurde. Für die Identifizierung dieser Fremd-DNA können zum Beispiel der BLAST Suchalgorithmus oder die K-mer basierte Analyse angewendet werden (Altschul *et al*., 1990; Nordström *et al*., 2013). Fremd-DNA kann jedoch durch Methoden wie die Optimierung der Codon Usage modifiziert sein, wodurch die Identifizierung erschwert wird.

Das Auffinden von Fremd-DNA im Genom ist jedoch kein Alleinstellungsmerkmal von gentechnischen Verfahren. Die Integration von Nukleinsäuresequenzen anderer Organismen in ein Pflanzengenom kommt auch natürlicherweise vor, wie am Beispiel der Süßkartoffel gezeigt werden konnte. Dort konnten Fremd-Gene von *Agrobacterium* nachgewiesen werden (Kyndt *et al*. 2015).

Bei vorheriger Kenntnis der Nukleotidsequenzänderung ist die beschriebene Herangehensweise vom Grundsatz her geeignet, einen spezifischen Nachweis der Veränderung zu führen, der in Kombination mit der Bestimmung des Genotyps eine Identifizierung des Organismus erlaubt. Dieser Vorgang ist allerdings nur dann erfolgreich, wenn die Referenzsequenz von ausreichend guter Qualität ist, da ansonsten größere Lücken oder gar nicht sequenzierte Bereiche vorliegen können, die eine spezifische Aussage erschweren.

Ohne vorherige Kenntnis der Sequenzänderung ist ein spezifischer Nachweis der Veränderung unter der Voraussetzung möglich, dass die Sequenz nicht im Referenzgenom vorkommt und somit einen Abschnitt von genotypisch stark abweichender (Fremd-)DNA darstellt. Für diesen Fall können allerdings weder die Technik noch der Organismus identifiziert werden.

5.5.3.2 Einzelne Nukleotidänderungen an verschiedenen Positionen im Genom

Genomeditierte Organismen können auch mehrere Änderungen einzelner Nukleotide an verschiedenen Positionen im Genom erhalten haben. Diese können mittels WGS-Analysen im Vergleich zu einer geeigneten Referenz nachgewiesen werden. Diese gezielt eingebrachten Änderungen an verschiedenen Stellen im Genom sind vor dem Hintergrund zufällig auftretender Mutationen zu bewerten. Ohne weitere Informationen und valide Referenzgenomdaten ist eine Identifizierung spezifischer Organismen auf Grundlage dieser Analyseergebnisse deshalb nicht möglich.

5.6 ANALYSEVERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERBARKEIT DER TECHNIK

Unterschiede in der Nukleotidsequenz sind bei Kenntnis der Veränderung und mit entsprechendem Referenzmaterial mit den heutigen molekularbiologischen Verfahren stets nachweisbar. Es gibt bisher keine Möglichkeit, analytisch festzustellen, auf welchem Weg eine genetische Modifikation in einem Genom entstanden ist. Verfahren wie die Bestrahlung, der Einsatz von erbgutverändernden Chemikalien, die Transformation mit *in vitro* neu kombinierter DNA oder das *Genome Editing* hinterlassen generell keine spezifischen Spuren im Genom, die Rückschlüsse auf die verwendete Technik zulassen.

Kenntnisse und Erfahrungen in der molekulargenetischen Analytik und im Umgang mit GVO können darauf hindeuten, dass Modifikationen längerer Nukleotidsequenzen durch Methoden des *Genome Editing* erzeugt wurden. Eine Identifizierung der Technik kann jedoch auch durch DNA-basierte Nachweisverfahren derzeit nicht erbracht werden. Allenfalls gibt es Anhaltspunkte, die auf den Einsatz des *Genome Editing* als Technik hinweisen können:

- Modifikationen längerer Nukleotidsequenzen;
- Anhäufung von veränderten Nukleotiden an einem Locus;
- unbeabsichtigt verbliebene rekombinante DNA oder Abschnitte davon (beispielsweise für Nuklease-Systeme kodierende Sequenzen).
- Änderung des Metaboloms

Einen eindeutigen Beleg für den Einsatz von *Genome Editing* liefern diese Hinweise allerdings nicht.

5.7 RÜCKVERFOLGBARKEIT

Liegen Informationen über den genomeditierten Organismus vor (z. B. vom Entwickler, in Publikationen, in Patentschriften oder in Zuchtbüchern), erlauben diese gegebenenfalls eine Rückverfolgbarkeit von Produkten, wie beispielsweise eine Etikettierung bei Rindfleisch, die die Rückverfolgbarkeit vom Fleisch zum Tier gewährleistet.

5.8 LITERATUR

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215(3): 403-410.

Fraiture MA, Herman P, Taverniers I, De Loose M, Deforce D, Roosens N.H (2015) Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions. BioMed Res Int. Article ID 392872. doi 10.1155/2015/392872.

Frank T, Röhlig RM, Davies HV, Barros E, Engel KH (2012) Metabolite profiling of maize kernels-genetic modification versus environmental influence. J Agric Food Chem. 60(12): 3005-3012.

Holst-Jensen A, Spilsberg B, Arulandhu AJ, Kok E, Shi J, Zel J (2016) Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. Anal Bioanal Chem. 408(17): 4595-4614.

Huggett JF, Cowen S, Foy CA (2015) Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. Clin Chem. 6(1): 79-88.

Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L (2014) Detection and Quantification of BCR-ABL1 Fusion Transcripts by Droplet Digital PCR. J Mol Diagn. 16(2): 174-179.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 533(7603): 420-424.

Kumar A, Mosa KA, Ji L, Kage U, Dhokane D, Karre S, Madalageri D, Pathania N (2017) Metabolomics assisted biotechnological interventions for developing plant-based functional foods and nutraceuticals. Crit Rev Food Sci Nutr. doi 10.1080/10408398.2017.1285752.

Kyndt T, Quispe D, Zhai H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G, Kreuze JF (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. PNAS 112(18): 5844-5849.

Laible G, Wagner S, Alderson J (2006) Oligonucleotide-mediated gene modification and its promise for animal agriculture. Gene. 366(1): 17-26.

Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2011) New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development. ISBN 978-92-79-19715-4. ISSN 1018-5593. doi 10.2791/54761.

NCBI (2017) National Center for Biotechnology Information - Genome Database. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome

Nordström KJ, Albani MC, James GV, Gutjahr C, Hartwig B, Turck F, Paszkowski U, Coupland G, Schneeberger K (2013) Mutation identification by direct comparison of whole-genome sequencing data from mutant and wild-type individuals using k-mers. Nat Biotechnol. 31(4): 325-330.

Ossowski S, Schneeberger K, Lucas-Lledó JI, Warthmann N, Clark RM, Shaw RG, Weigel D, Lynch M (2010) The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in Arabidopsis thaliana. Science 327(5961): 92-94.

Pauwels K, De Keersmaecker S, De Schrijver A, du Jardin P, Roosens N, Herman P (2015) Next-Generation sequencing as a tool for the molecular characterisation and risk assessment of genetically modified plants: added value or not? Trends Food Sci Technol. 45(2): 319-326.

Simon P, Cannata F, Concordet JP, Giovannangeli C (2008) Targeting DNA with triplex-forming oligonucleotides to modify gene sequence. Biochimie. 90(8): 1109-1116.

Zapata L, Ding J, Willing EM, Hartwig B, Bezdan D, Jiao WB, Patel V, James GV, Koornneef M, Ossowski S, Schneeberger K (2016) Chromosome-level assembly of Arabidopsis thaliana Ler reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. PNAS 113(28): 4052-4060.

6 MODUL IV: STAND DER ANWENDUNG UND ENTWICKLUNG DES *GENOME EDITING*

Dieses Modul behandelt den Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in den Bereichen Landwirtschaft, Ernährung, Human- und Veterinärmedizin.

6.1 ZUSAMMENFASSUNG DES MODULS IV:

Genome Editing-Methoden werden in der Pflanzen- und Tierzucht zur Förderung der Krankheitsresistenz, Toleranz gegen widrige Umweltbedingungen, Anpassungen an Produktionstechniken und zur Veränderung von Produkteigenschaften eingesetzt. Bei der Tierzucht stehen zudem Tierschutz und der Einsatz von Nutztieren in der Biomedizin im Fokus. Bei Mikroorganismen sollen Stoffwechselwege beeinflusst oder neu gestaltet werden *(Metabolic Engineering)* und bestehende Produktionslinien durch Veränderung von Genaktivitäten modifiziert werden. Die Technik kann die Resistenz von mikrobiellen Kulturstämmen gegen Bakteriophagenbefall erhöhen oder sogar als antimikrobielles Agens dienen. Insgesamt ist von der Technik eine Beschleunigung der Züchtung zur erwarten mit dem Ergebnis, bestehende Zuchtziele schneller und effizienter erreichen zu können.

6.2 EINLEITUNG

Die Information zur Bildung und zur Aufrechterhaltung eines Organismus ist in der DNA gespeichert, deren Gesamtheit man als Genom bezeichnet. Eine Kopie des Genoms eines Organismus liegt in jeder seiner Zellen vor. Die DNA besteht aus bis zu mehreren Milliarden von vier Bausteinen (Nukleotiden), die in einem Strang angeordnet sind und eine spezifische Abfolge bilden (die Nukleotidsequenz). Jeweils zwei dieser Stränge binden aneinander und formen so ein Doppelstrangmolekül, das sich durch Zusammenfaltung zu einem mikroskopisch sichtbaren Chromosom organisiert, welches bei höheren Organismen im Zellkern lokalisiert ist. Weitere DNA-haltige Bereiche in der Zelle sind die Mitochondrien und, zusätzlich bei Pflanzen, die Plastiden (Chloroplasten). Neben den Chromosomen existieren in den Zellen vieler Bakterien und selten auch bei höheren Organismen auch kleinere, extrachromosomale DNA-Moleküle wie etwa Plasmide. Nur Teilbereiche einer DNA-Sequenz eines Chro-

BVL_FO_04_0022_000_V1.1

mosoms tragen Geninformationen, die Enzyme kodieren. Andere Bereiche haben regulatorische oder unbekannte Funktionen. Der Mensch hat etwa 42.000 Gene, 20.000 davon werden in Protein umgesetzt (kodierend), 22.000 davon sind nicht-kodierend (http://www.ensembl.org). Die Zahl der Gene bei anderen Säugern liegt in einer vergleichbaren Größenordnung. Pflanzen verfügen über 25.000 bis 50.000, Bakterien 470 bis 7.000 Gene. Ihre Aktivität führt zu spezifischen Stoffwechselprozessen in der Zelle. Eine Veränderung dieser Gene hat daher auch eine Veränderung der Merkmale der betroffenen Organismen zur Folge. Eine solche Veränderung ist seit jeher das Ziel von Züchtung.

Die neue Eigenschaft von *Genome Editing*-Verfahren ist nicht die Fähigkeit, die oben beschriebenen DNA Sequenzen *per se* zu modifizieren. Das wurde schon seit Jahrzehnten z.B. in Pflanzen durch die Verfahren der klassischen Mutagenese, wie Bestrahlung oder den Einsatz von erbgutverändernden Chemikalien geleistet. Die Orte der durch solche Verfahren induzierten Mutationen sind jedoch gänzlich zufällig und die Zahl der erzeugten Mutationen ist sehr hoch.

Das neue Potenzial des *Genome Editing* besteht darin, eine Mutation an genau einer gewünschten Stelle in einer DNA-Sequenz platzieren zu können. Insofern arbeitet die *Genome Editing*-Technik mit einer sehr hohen Präzision.

Im Rahmen dieses Moduls sollen der Stand der Anwendung und Entwicklung des *Genome Editing* in den Bereichen

1. Pflanzenzüchtung,
2. Tierzucht,
3. Mikroorganismen, die bei der Herstellung von Lebens- bzw. Futtermitteln verwendet werden,
4. Human- und Veterinärmedizin

dargestellt werden.

6.3 STAND DER ANWENDUNG UND ENTWICKLUNG DES *GENOME EDITING* IN DER PFLANZENZÜCHTUNG

6.3.1 Etablierte Verfahren in der Pflanzenzüchtung

Konventionelle Pflanzenzüchtung nutzt Selbst- und Kreuzbestäubung, um sexuell kompatible Pflanzen kontrolliert zu vermehren. Dabei zielt der Züchter darauf, räumliche, zeitliche oder physiologische Befruchtungsbarrieren zu durchbrechen, um gewünschte Eigenschaften in einer Linie anzureichern. Zu diesem Zweck wird neben der einfachen Übertragung von Pollen auch eine Vielzahl an technischen Methoden eingesetzt. Dazu gehören chirurgische Methoden (z.B. Knospenbestäubung), Änderung der Umweltbedingungen (z.B. Bestäubung unter veränderten Temperaturen oder in besonderen Gasgemischen), Einsatz von Elektrizität, Gewebekulturtechniken (z.B. *Embryo Rescue*-Technik, Ovarienkultivierung), Chromosomenzahl-Manipulation (z.B. Schaffung von amphiploiden Pflanzen durch Gabe von Colchicin, Haploidenzucht), Translokation von Chromosomensegmenten eines Kreuzungspartners in ein Genom unter Bestrahlung oder Verfahren der Mutagenese. Bei der Mutagenese werden Pflanzenzellen oder Saatgut radioaktiv bestrahlt oder mit erbgutverändernden Chemikalien behandelt. Eine weitere Methode ist die Passagierung durch Gewebekultur, die zu Veränderungen des Genoms führen kann (somaklonale Variation). Da durch diese Behandlungen eine Vielzahl von Mutationen unkontrolliert und zufällig erzeugt wird, bedarf es eines aufwändigen Rückkreuzungs- und Selektionsprozesses, um die gewünschte Mutation zu isolieren. Klassische Mutagenesezüchtung hat laut der Joint FAO/IAEA Mutant Variety Datenbank mittlerweile mehr als 3000 Kulturpflanzenvarietäten hervorgebracht. Durch Begleitung mit molekularen Detektionsverfahren wie der Markeranalyse können Züchtungsgänge heute effizienter durchgeführt werden. Mit der Übertragung artfremder Erbsubstanz durch Methoden der Gentechnik seit etwa 1980 erfuhr diese Technikpalette eine erneute Erweiterung. Dem Züchtungsfortschritt durch Verfahren der Gentechnik stehen allerdings ein langwieriger Genehmigungsprozess sowie Akzeptanzprobleme gegenüber.

6.3.2 Anwendung von DNA Nukleasen und ODM-Technik bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen

Bei pflanzlichen Systemen werden die Verfahren zum *Genome Editing* in breiter Vielfalt eingesetzt. So kann durch zielgerichtete Mutationen ein breites Spektrum an Eigenschaften adressiert werden. Hierzu gehört neben der Erzeugung von Toleranzen gegen Herbizide auch eine Vielzahl weiterer Eigenschaften, die im Folgenden zusammenfassend vorgestellt werden.

Genome Editing wird bereits jetzt bei einer Vielzahl von Pflanzenarten angewendet: Neben Modellorganismen wie *Arabidopsis thaliana* und Tabak zählen hierzu die Hauptkulturpflanzen Mais, Soja, Reis und Kartoffel. Aber auch Zier- und Gemüsepflanzen sowie Bäume (Pappel, Eukalyptus) wurden mittlerweile adressiert (Zusammenfassung in Bortesi und Fischer, 2015). Die Chancen, die sich durch die Technik des *Genome Editing* ergeben, liegen zum einen bei der erleichterten und schnelleren Erzeugung von Merkmalen, die für den Anbau und die Produzenten interessant sind, wie zum Beispiel Krankheitsresistenzen. Zum anderen können auch Eigenschaften an Pflanzen verändert werden, die für den Konsumenten von Bedeutung sind, weil das Produkt qualitativ hochwertiger ist und zum Beispiel weniger allergenes Potential besitzt (duftender Reis, glutenfreier Weizen). Solche Eigenschaften wurden bisher kaum bearbeitet, da die Einführung dieses Mehrwertes in die Pflanzen mit klassischen (gentechnischen) Methoden relativ aufwändig ist oder ggf. unter die Gentechnikregulierung fällt. Für gentechnisch veränderte Produkte jedoch ist das Zulassungsverfahren sehr langwierig und teuer und gerade in Europa die Akzeptanz begrenzt. *Genome Editing* ermöglicht über einen kleinen genomischen Eingriff bei entsprechenden regulatorischen Rahmenbedingungen auch bei kleineren Kulturen wie Gemüse eine wirtschaftliche und gezielte züchterische Verbesserung. Erste praktische Arbeiten widmen sich auch komplexeren, adaptiven Eigenschaften wie Stresstoleranz, z.B. gegen Trockenstress (Shi *et al.,* 2017). Marktnahe Ergebnisse sind bisher nicht bekannt, aber in nicht allzu weiter zeitlicher Ferne zu erwarten. *Genome Editing* wird in der wissenschaftlichen Grundlagenforschung genutzt, um die Regulation komplexer Eigenschaften zu erforschen und damit züchterische Potentiale zu identifizieren (z.B. durch knock-out Mutationen).

6.3.3 Herbizidtoleranz

Oligonukleotid gerichtete Mutagenese wurde eingesetzt, um in Raps eine Herbizidtoleranz einzuführen (www.bvl.bund.de). Dabei führt ein einzelner Basenaustausch in einem Gen mit einer Funktion in der Synthese verzweigter Aminosäuren zur Toleranz gegen Imidazolinon basierte, herbizide Wirkstoffe. Weitere Produkte auf ODM-Basis sind in der Entwicklung. Ähnliche konventionell gezüchtete herbizidtolerante Sorten werden bereits in der Europäischen Gemeinschaft vermarktet.

6.3.4 Krankheitsresistenzen

Ein Anwendungsbereich des *Genome Editing* bei Pflanzen ist die Erzeugung von Krankheitsresistenzen. Dies geschieht meist durch die gerichtete Einführung von Mutationen (InDels) in ein Zielgen. So konnten unter anderem mittels TALENs und CRISPR/Cas9 eine Mehltauresistenz beim hexaploidem Weizen erzeugt werden, indem alle drei verantwortlichen Homoallele gleichzeitig mutiert wurden (Wang *et al.*, 2014; Gil-Humanes *et al.*, 2016). Die Resistenz gegen Mehltau ist natürlicherweise nur bei Gerste zu finden und so konnte das Prinzip „durch das Nachahmen“ der in der Gerste vorhandenen Mutation in den Weizen übertragen werden. Weitere Ansätze zur Bekämpfung von Krankheiten finden sich unter anderem beim Reis. Hier wurde mittels TALENs eine Braunfäule-Resistenz erzeugt, indem ein kleiner Teil des Promotors eines Gens entfernt wurde, welcher von den Erregern „gekapert“ wird. Diese Deletion hat zur Folge, dass die Bakterien dieses Gen nicht mehr nutzen können, die Pflanze jedoch schon (Li *et al.*, 2012). Auch bei kleinen Kulturarten konnten bereits Krankheitsresistenzen erzeugt werden. So wurde bei der Gurke durch das Ausschalten eines Transkriptionsfaktors, welcher von Viren für deren Infektionsweg „gekapert“ wird, eine breite Resistenz gegen Impomoviren und Mosaikviren erzeugt (Chandrasekaran *et al.*, 2016).

6.3.5 Geänderte Zucht- oder Produkteigenschaften

Die Änderung der Produkteigenschaften ist ein weiterer, großer Anwendungsbereich des *Genome Editing* bei vielen Pflanzen. Eine intensiv bearbeitete Kulturart ist der Reis. Hier konnten bereits mehrere Produkteigenschaften geändert werden. So wurde mittels CRISPR/Cas9 die Stärkezusammensetzung verändert, sodass der Reis einen höheren Gehalt an Amylose besitzt (Sun *et al.*, 2017). Zudem wurden, ebenfalls mittels CRISPR/Cas9, eine Vielzahl von

Ertragsfaktoren wie Kornanzahl, Ährenaufbau, Korngröße und Pflanzenform adressiert (Li *et al.*, 2016). Eine andere, besonders in Asien geschätzte Eigenschaft, ist der Geruch des Reis, etwa bei sogenanntem Duftreis. Diese Eigenschaft konnte mittels TALENs auf gewöhnlichen Reis übertragen werden (Shan *et al.*, 2015). Neben Reis wurden ebenfalls die Stärkezusammensetzung bei Mais und Kartoffel geändert (Andersson *et al.*, 2016; Waltz *et al.*, 2016a). Bei Mais wurde mittels Meganukleasen männliche Sterilität erzeugt (Djukanovic *et al.*, 2013), eine züchterisch wichtige Eigenschaft bei der Erstellung von Hybridsorten. Geänderte Produkteigenschaften wurden mittels CRISPR/Cas9 bei Champignons erzielt: Hier konnte das Verbräunen der Pilze nach der Ernte verzögert werden (Waltz *et al.*, 2016b). TALEN wurde eingesetzt, um bei Sojabohnen den Anteil an trans-Fetten zu reduzieren (Haun *et al.*, 2014). Ein hoher Konsum von trans-Fetten gilt als schädlich für Herz und Gefäße. Eine weitere Anwendung zielt auf die Reduktion gefährlicher Acrylamide in erhitzen Kartoffelprodukten ab. Hierbei wurde verhindert, dass bei der Lagerung der Knollen Zucker reduziert werden, aus denen später Acrylamide entstehen können (Clasen *et al.*, 2015). Zudem wurde bei Gerste und Mais die Phytaseaktivität geändert, um für die Verwendung zur Tierfütterung eine bessere Verwertung des sonst unverdaulichen Phytin-Phosphors zu erreichen (Shukla *et al.*, 2019, Wendt *et al.*, 2013). Derzeit in der Entwicklung, aber noch nicht ausgereift, sind auch Vorhaben, die allergenen Eigenschaften von Pflanzen zu adressieren. Dies könnte neben Gluten im Weizen auch Allergene bei der Erdnuss und dem Apfel beinhalten (van de Wiel *et al.*, 2017). Auch bei Pappeln befinden sich eine Reihe von CRISPR/Cas9-Anwendungen noch im Entwicklungsstadium, z.B. Erhöhung der Biomasse oder die Resistenz gegen den Pappelrost sowie eine Modifizierung der Ektomykorrhizierung, also der Besiedlung von Wurzel mit symbiotischen und daher nützlichen Pilzen (GMO Register 2016; Brügmann *et al.*, unpublished, Heier *et al.* unpublished).

6.4 STAND DER ANWENDUNG UND ENTWICKLUNG DES *GENOME EDITING* IN DER TIERZUCHT

6.4.1 Einführung in die landwirtschaftliche Tierzucht

Die landwirtschaftliche Tierzucht beruht auf der Selektion von besonders geeigneten Vater- und Muttertieren. Diese Selektion hat in den letzten Jahrzehnten jedoch überwiegend auf der männlichen Seite stattgefunden und ist durch den Einsatz Zuchtwert-geprüfter Vatertiere in der künstlichen Besamung (KB) stark vorangetrieben worden. Auf der weiblichen Seite konnte nur in begrenztem Maße züchterisch selektiert werden, da der Pool an weiblichen Keimzellen begrenzt ist und nicht wie beim männlichen Tier fortlaufend neu gebildet wird. Trotz neu entwickelter Techniken, wie Embryotransfer oder Ultraschall geleiteter Follikelpunktion von Oozyten (Ovum-Pickup) und deren Nutzung in der *in vitro* Produktion von Embryonen kann immer nur eine sehr begrenzte Anzahl an Nachkommen produziert werden.

Inzwischen sind die Genome wichtiger landwirtschaftlicher Nutztiere sequenziert und annotiert worden, so dass informative und weitgehend vollständige Genkarten für Rind, Pferd, Schwein, Schaf, Huhn, Hund und Biene vorliegen. Diese neuen molekulargenetischen Informationen haben zur Weiterentwicklung der Tierzucht und der Einführung des genomischen Zuchtwerts geführt, der wesentlich genauer als das bisherige Verfahren ist, das im Wesentlichen auf der Leistungsprüfung der Nachkommen beruhte. Bei der Selektion geeigneter Elterntiere spielen häufig sogenannte SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) eine große Rolle, insbesondere, wenn sie mit züchterisch wertvollen Merkmalen verbunden sind.

6.4.2 Etablierte Verfahren der genetischen Modifikation bei Nutztieren

Bereits seit den 1980er Jahren war es möglich, genetisch modifizierte (transgene) Nutztiere zu erstellen, zunächst durch Mikroinjektion von Fremd-DNA in den Vorkern von frühen Embryonen, später über den Klonvorgang durch Verwendung genetisch modifizierter Spenderzellen im Klonprozess (Niemann *et al.* 2011). Bei der Mikroinjektion konnten nur Gene hinzugefügt werden (additiver Gentransfer), während beim Klonen auch Gene mittels homologer Rekombination ausgeschaltet werden können, was jedoch wegen fehlender pluripotenter Stammzellen bei Nutztieren äußerst ineffizient ist und daher nur von wenigen Laboren weltweit durchführbar war. Arbeiten aus dieser Zeit beschränkten sich daher vornehmlich auf den additiven Gentransfer.

6.4.3 Anwendung von DNA-Nukleasen bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Mit Hilfe von DNA-Nukleasen ergeben sich neue Möglichkeiten zur Generierung genetisch veränderter Nutztiere (Petersen und Niemann, 2015). Die DNA-Nukleasen können entweder in das Zytoplasma früher Embryonen (Zygoten) injiziert werden; die Selektion auf die gewünschte Mutation findet dann im frühen Embryo bzw. bei den geborenen Jungtieren statt. Oder DNA-Nukleasen werden in somatische Spenderzellen eingebracht (Transfektion), die dann im Kerntransfer eingesetzt werden können. In diesem Fall kann die Selektion in der Regel auf zellulärer Ebene erfolgen, so dass alle Nachkommen die gewünschte genetische Mutation aufweisen. Beide Verfahren sind bei Nutztieren gut etabliert. Alle drei DNA-Nukleasen (Zink-Fingernukleasen (ZFNs), TALEN und CRISPR/Cas9) sind erfolgreich bei Nutztieren eingesetzt worden (Petersen und Niemann, 2015). Für die Produktion genetisch veränderten Geflügels werden Keimzell-Vorläuferzellen (Primordial Germ Cells (PGC)) mit spezifischen DNA-Nukleasen transfiziert und diese in Hühnerembryonen injiziert. Daraus resultieren meist chimäre Tiere, die die genetische Modifikation tragen und dann weiter selektiert werden, bis die gewünschte Eigenschaft im Genom fest verankert ist. War es in der Vergangenheit nur möglich, gezielt Gene über die Integration eines sogenannten Knockout-Vektors auszuschalten (Transgen), basiert der Knockout von endogenen Genen mittels DNA-Nukleasen auf der transienten Expression dieser Moleküle ohne Integration in das Zielgenom (kein Transgen). Modelle zur Integration des *Genome Editing*s in die Nutztierzucht sind bereits entwickelt worden und zeigen ein großes Potential für signifikante Zuchtfortschritte (Jenko *et al.* 2015).

6.4.4 Anwendungsmöglichkeiten des *Genome Editing* bei Nutztieren:

6.4.4.1 Erhöhung der Krankheitsresistenz

Ein prominentes Beispiel ist die Produktion von Schweinen mit Resistenz gegen Infektionen mit dem Porcinen Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRS) durch genetischen Knockout des CD163 Rezeptors. Die CD163-Ko Tiere waren vollständig gegen die Symptome einer PRRS Infektion geschützt (Whitworth *et al.* 2016). Ein anderes Beispiel sind Rinder, die resistent gegen eine Infektion mit Mycobacterium tuberculosis (TB) sind (Wu *et al.* 2015, Gao *et al.* 2017). In der jüngsten Publikation wurde Cas9 Nickase verwendet, um das NRAMP1-Gen (Natural resistance to infection with intracellular pathogens one) in das bovine Genom einzubringen und auf diese Weise eine Resistenz gegenüber TB-Infektionen zu erreichen (Gao *et al.* 2017). Ein weiteres Projekt zur Krankheitsresistenz betrifft die Expression des RELA-Gens zur Induktion einer Resistenz gegen ASF (Afrikanische Schweinepestvirus)

(Palgrave *et al.* 2011). Weitere genspezifische Resistenzen gegen wichtige Krankheitserreger sind denkbar. Probleme entstehen, wenn resistente Tiere den Erreger nach wie vor verbreiten, z. B. über ihre Ausscheidungen. Letzteres ist bei der geschilderten PRRS-Resistenz nicht der Fall.

6.4.4.2 Verbesserte Produktionsleistung

Das bekannteste Beispiel ist der genetische Knockout des Myostatingens (MSTN) mit Hilfe von DNA-Nukleasen. MSTN ist ein negativer Regulator des Wachstumshormons. Durch Knockout kommt es zu einer stärkeren Ausbildung der Skelettmuskulatur, was die Fleischproduktion unter bestimmten Konditionen verbessern könnte. Dies ist erfolgreich bei Rind, Schwein, Schaf und Ziege gezeigt worden (Crispo *et al.* 2014, Cyranoski, 2015, Proudfoot *et al.* 2015, Yu *et al.* 2016, Guo *et al.* 2016). Eine natürlich vorkommende Variante des MSTN Knockouts ist bei den Rinderrassen Blaue Belgier und Piemontese bekannt. Durch die starke Bemuskelung kommt es häufig zu übergroßen Kälbern bei diesen Rassen, deren lebende Geburt nur duch *Sectio Caesarea* sichergestellt werden kann. Der MSTN-KO Phänotyp ist bei diesen Fleischrinderrassen besonders ausgeprägt, da es sich um eine homozygote Mutation handelt und beide Rassen bereits viele Jahre sehr stark auf Fleischleistung selektiert wurden. Dieser markante Phänotyp ist nach den vorliegenden Informationen bei anderen Rinderrassen, Schafen und Schweinen deutlich weniger ausgeprägt (Crispo *et al.* 2014, Cyranoski, 2015, Proudfoot *et al.* 2015, Yu *et al.* 2016, Guo *et al.* 2016, Kang *et al*., 2017). Durch Induktion einer mono-allelischen Mutation im MSTN-Locus kann zudem die Bemuskelung begrenzt und dadurch negative Auswirkungen auf den Geburtsvorgang vermieden werden. Weitere Anwendungen sind denkbar, wenn z.B. bestimmte SNPs mit züchterisch relevanten Merkmalen durch Einsatz von DNA-Nukleasen induziert werden.

6.4.4.3 Beeinflussung der Milchkomposition beim Rind

Mit Hilfe von DNA-Nukleasen ist das Gen für das β-Lactoglobulin im Rind ausgeschaltet worden (Yu *et al.* 2011). Dadurch konnte Milch mit stark verändertem Proteingehalt, d.h. mehr Casein, produziert werden, die zudem frei von der allergenen Hauptkomponente (β-Lactoglobulin) der Milch war. Mit solchen Ansätzen kann Milch als wichtige tierische Proteinquelle für einen breiteren Konsumentenkreis verfügbar gemacht werden.

6.4.4.4 Produktion allergen-reduzierter oder –freier Produkte

Mit Hilfe von CRISPR/Cas9 sind im Huhn die Gene für Ovalbumin und Ovomucoid ausgeschaltet worden, um diese Hauptallergene im Hühnereiweiß zu entfernen und dadurch Eier für einen breiteren Konsumentenkreis verfügbar zu machen (Oishi *et al.* 2016). Siehe auch Lactoglobulin in der Milch (6.4.4.3).

6.4.4.5 Hornlosigkeit beim Rind

Die Hornbildung beim Rind ist genetisch bedingt und wird durch bestimmte genetische Modifikationen im Polled Locus bestimmt. In den heutigen Rinderrassen gibt es sowohl horntragende als auch genetisch hornlose Tiere. Die genetische Basis für die Hornlosigkeit ist sehr komplex; bekannt sind die sogenannte **Keltische Variante** (Celtic Mutation), die aus einer 212 Basen Insertion und 10 Basen Deletion besteht. Bei genetisch hornlosen Tieren der Rasse Holstein Friesian (HF) liegt eine 80 Kilobasen Duplikation im Polled Locus vor (Friesische Mutation). In den bedeutenden Milch- und Doppelnutzungsrassen ist die genetische Hornlosigkeit noch auf wenige Linien begrenzt. Um Inzucht zu vermeiden und gleichzeitig den Zuchtfortschritt in den anderen Merkmalen nicht zu verlieren, ist die Zucht auf Hornlosigkeit nur in langsamen Schritten sinnvoll.

Mithilfe von TALEN ist es gelungen, im Polled Locus genetisch hornlose Nachkommen aus einer horntragenden Anpaarung zu erzeugen (Carlson *et al.* 2016). Damit könnte die genetische Basis für die Hornloszucht erheblich verbreitert werden.

Die Hörner beim Rind können eine Gefahr für andere Tiere in der Herde, aber auch für die Tierbetreuer darstellen. In der guten fachlichen Praxis wird die Hornanlage des Kalbes unter Schmerzmittelgabe und Ruhigstellung mithilfe eines Brenneisens entfernt und verödet. Bei erwachsenen Tieren können die Hörner in einem tierärztlichen Eingriff entfernt werden.

Ein höherer Anteil genetisch hornloser Rinder könnte zur Verbesserung des Tierschutzes und zur Reduktion der Gefahrenmomente für den Tierhalter beitragen.

6.4.4.6 Biomedizin

Umfangreiche Erfahrungen liegen bereits in der Anwendung der DNA-Nukleasen beim Nutztier für biomedizinische Fragestellungen, überwiegend beim Schwein, vor. Dies betrifft den Knockout einer Reihe von Genen, wie α1,3-Galactosyltransferase (GGTA1-Gen), die für ein Oberflächenepitop kodiert, das in der Xenotransplantation eine große Rolle spielt (Hauschild *et al.* 2011), den Knockout für PPAR-ɣ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma)

und LDL (Low density Lipoprotein) als Großtiermodelle für kardiovaskuläre Erkrankungen (Yang *et al.* 2011, Carlson *et al.* 2012), DMD (Duchenne Muscular Disease) als Modell für genetisch bedingte Muskel Dystrophie (Carlson *et al.* 2012), APC (Adenomatous-polyposis-coli Protein) als Modell für bestimmte Formen des Darmkrebs (Tan *et al.* 2013) und der Knockout des Gens für von Willebrand Faktor (vWF) als Modell für Gerinnungsstörungen (Hai *et al.* 2014). Ferner wurden Schweine mit einem Knockout des MHC-Systems mit Hilfe von CRISPR/Cas9 produziert (Reyes *et al.* 2014). Diese Tiere sind bedeutsam für die immunologische Grundlagenforschung. Die endogenen PERV-Sequenzen (Porcine Endogenous Retrovirus), die in zahlreichen Kopien im porcinen Genom zu finden sind, konnten mit Hilfe von CRISPR/Cas9 ausgeschaltet werden (Yang *et al.* 2015). Aktive PERVs könnten ein potentielles Risiko in einer Xenotransplantationssituation darstellen.

6.4.4.7 Exogene Gensequenzen

In einem proof-of-concept Ansatz ist zudem gezeigt worden, dass mit Hilfe von DNA-Nukleasen transgene Loci ausgeschaltet werden können. Ein prominentes Beispiel bezieht sich auf die Ausschaltung des transgenen EGFP-Locus, eines Markergens, in genetisch veränderten porcinen Zellen (Watanabe *et al.* 2010).

6.4.4.8 Weitere Verwendungspotentiale

Weitere Anwendungspotentiale liegen in der Induktion von spezifischen SNP’s oder auch in der Erbfehlerkorrektur. Hierzu liegen bisher noch keine publizierten Beispiele vor.

6.5 STAND DER ANWENDUNG UND ENTWICKLUNG DES *GENOME EDITING* BEI MIKROORGANISMEN, DIE BEI DER HERSTELLUNG VON LEBENS— BZW. FUTTERMITTELN VERWENDET WERDEN

Anwendungsbeispiele und -potenziale der *Genome Editing*-Verfahren bei Mikroorganismen, die bei der Herstellung von Lebens- bzw. Futtermitteln verwendet werden, sind in den folgenden Bereichen denkbar:

6.5.1 Zielgerichtete Mutagenese

Die *Genome Editing* Systeme könnten in einer zielgerichteten Mutagenese für z.B. Änderungen in Stoffwechselwegen (*metabolic engineering*) eingesetzt werden, die zur Verbesserung der Metabolitproduktion (z.B. Vitamine oder Aromastoffe wie z.B. Diacetyl und Acetaldehyd) oder zur Optimierung der Säureproduktion führen. Solche Eigenschaften sind wichtige Funktionen für Mikroorganismen, die bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel eingesetzt werden. Erste *Genome Editing* Systeme unter Verwendung von CRISPR/Cas9 sind bereits für ‚probiotische' *L. reuteri-, L. lactis*- und *S. thermophilus*-Stämme im Forschungslabor entwickelt worden (van Pijkeren *et al.*, 2012; Oh und van Pijkeren, 2014; Selle *et al.*, 2015, Barrangou und van Pijkeren, 2016). Weiterhin könnte eine zielgerichtete Mutagenese z.B. Antibiotikaresistenzgene in Starterkulturen, die neu entwickelt werden, ausschalten. Da jedoch nach EFSA-Sicherheitsbewertung im Rahmen des QPS (*Qualified Presumption of Safety*) Antibiotikaresistenzgene in Starterkulturen, die in menschlichen Lebensmittel eingesetzt werden, abwesend sein müssen, sollte geklärt werden, inwiefern dies die Sicherheitsbewertung von Stämmen, welche durch CRISPR/Cas9 inaktivierte Resistenzgene tragen, betrifft. Neben dem CRISPR/Cas9 System werden aber auch andere Nuklease-Systeme erfolgreich in Mikroorganismen eingesetzt. Mit Hilfe von Zinkfingernukleasen konnten z.B. plasmidkodierte Beta-Laktamase-Gene in *Escherichia coli* gezielt zerstört werden (Dastjerdeh *et al.* 2016). Weiterhin konnte mit Hilfe von *Transcription Activator Like Effector Nukleasen* (TALEN) ein Darm-Kolonisierungs-Gen (*adp*) in *Bacillus nematodica* ausgeschaltet werden (Niu *et al.* 2015). Auch Meganukleasen finden z.B. in Actinomyceten Anwendung (Fernández-Martínez und Bibb 2014). Einblicke in die Rolle und Funktion sowie Regulation von Genen und Proteinen kann man sich z.B. unter Anwendung von *oligonucletide-directed mutagenesis* (ODM) verschaffen. Dieses Verfahren wird schon über Jahrzehnte erfolgreich bei Mikroorganismen

angewendet (beispielhaft: Toniti et al 2017, Xu und Zhang 2016, Sun et al 2016, Nisha and Satyanarayana 2013, Mandaci 2011, Carter *et al.* 1985, Ruvkun und Ausubel 1981).

6.5.2 Genexpressions-Modulation

Weiterhin könnten CRISPR/Cas9-Systeme für die *Modulierung der Genexpression* bei biotechnologisch wertvollen Genen in Lebensmittelfermentationen genutzt werden, z.B. um eine verbesserte Säuerung, Bacteriocinbildung, Vitaminbildung oder Enzymaktivität (z.B. Protease-, Peptidase-, Amylase- oder Lipaseaktivität) zu erhalten. Aktuell wurde eine Methode unter Einbeziehung des CRISPR/Cas9 Systems entwickelt, um die biotechnologische Isopropanol Produktion in *E.coli* zu verbessern (CREATE, Liang *et al.* 2017). Auch die Ethanolproduktion in *Saccharomyces cerevisiae* konnte unter Verwendung von TALEN gesteigert werden (Ye *et al.* 2016).

6.5.3 ‚Impfung' biotechnologisch wichtiger Stämme

Ein sehr wichtiger weiterer Anwendungsbereich wäre die ‚*Impfung'* biotechnologisch wichtiger Starterkulturen, d.h. durch das auf CRISPR/Cas9-basierende adaptive Immunsystem bestimmter Bakterien andere Stämme gegen Bakteriophagen zu schützen. Bakteriophagenbefall kann verheerende Auswirkungen auf Lebensmittel-Fermentationen mit erheblichen finanziellen Schäden zur Folge haben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das CRISPR/Cas9 System von *S. pyogenes* in mit einem *B. subtilis* enthaltenden spacer in *B. subtilis* Resistenz gegen den Bakteriophagen SPP1 zeigte (Jakutyte-Giraitiene und Gasiunas, 2016).

6.5.4 Genotypisierung von Bakterienstämmen

CRISPR/Cas9 Systeme ermöglichen aufgrund der Spacer-Abfolge in den CRISPR/Cas9-Loci eine präzise Genotypisierung von biotechnologisch wertvollen Mikroorganismen oder lebensmittelrelevanten Krankheitserregern wie z.B. *Salmonella typhimurium* Serovare (Almeida *et al.* 2017). Hiervon könnte man auch Gebrauch machen, um die Herkunft spezifischer Mikroorganismen aus ursprungsgeschützten Produkten nachzuweisen. Dieses könnte eine wichtige Rolle beim Nachweis der Lebensmittelauthentizität spielen (Barrangou and Dudley, 2016).

BVL_FO_04_0022_000_V1.1

6.5.5 CRISPR/Cas9 als antimikrobielles Agens?

Es besteht die Möglichkeit, die DNA-schneidenden bzw. –degradierenden Eigenschaften des CRISPR/Cas9 System von Bakterien zu verwenden, um die Komposition von Mikroorganismengemeinschaften zu beeinflussen und zu kontrollieren. Das ist besonders interessant im Bereich der Medizin, Biotechnologie und Umweltforschung. In diesem Zusammenhang könnte das CRISPR/Cas9 System z. B. für die sequenz-spezifische Entfernung von antibiotikaresistenten und virulenten *Staphylococcus aureus* Stämmen eingesetzt werden, ohne dass avirulente *S. aureus* betroffen werden. Bikard et al. (2014) zeigten, dass ein modifiziertes CRISPR/Cas9 System inklusive der spezifischen Ziel-Sequenzen (z.B. Antibiotika-Resistenz-Gene wie mecA) mit Hilfe eines Phagemids in Phagenköpfe verpackt und in *S. aureus* übertragen werden kann. In einer gemischten Population wurden dabei nur die *mecA*-tragenden *S. aureus* inaktiviert. Außerdem konnten auch Ziel-Gene auf resistenzvermittelnden Plasmiden zerstört werden und dadurch der Anteil an resistenzvermittelnden Plasmiden in einer gemischten *S. aureus* Population deutlich vermindert werden. Weitere Arbeiten in diese Richtung befassten sich erfolgreich mit *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* Stämmen (Gomaa et al. 2014, Jiang et al. 2013). Das CRISPR/Cas9 System könnte somit als Stamm-spezifisches antimikrobielles Agens eingesetzt werden. Bis die Anwendbarkeit zur sequenzspezifischen Manipulation komplexer Mikroorganismen-Gemeinschaften in medizinischen, biotechnologischen oder umweltbezogenen Bereichen gegeben ist, müssen allerdings noch einige Hürden (z.B. Art des Transfers in die Zielzellen, Verbleib von Fremd-DNA in den Zellen etc.) überwunden werden.

6.6 STAND DER ANWENDUNG UND ENTWICKLUNG DES *GENOME EDITING* IN DER HUMAN- UND VETERINÄRMEDIZIN

Eine Ausarbeitung dieses Kapitel liegt als Entwurf noch nicht vor. Die Bearbeitung soll Informationen des jüngsten Berichts der European Academies' Science Advisory Council, "*Genome Editing*: Scientific opportunities, public interests, and policy options in the EU" (European Academies' Science Advisory Council, 2017) berücksichtigen.

6.7 LITERATUR:

Almeida F, Medeiros MI, Rodriques DD, Allard MW, Falcao JP (2017) Molecular characterization of *Salmonella typhimurium* isolated in Brazil by CRISPR-MVLST. Journal of Microbiological Methods 133:55-61

Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält AS, Samuelsson M, Hofvander P (2016) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR/Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Reports: 1-12.

Barrangou R, Dudley EG (2016) CRISPR-Based Typing and Next-Generation Tracking Technologies. Annual Review of Food Science and Technology 7:395-411.

Barrangou R, van Pijkeren JP (2016) Exploiting CRISPR/Cas immune systems for *Genome Editing* in bacteria. Curr. Opinion Biotechnol. 37:61-68.

Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA (2014) Exploiting CRISPR/Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nature Biotechnology 32(11): 1146-1150

Bortesi L, Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant *Genome Editing* and beyond. Biotechnol Adv 33(1): 41-52.

Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D, Seabury C, Sonstegard TS, Fahrenkrug SC (2016) Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. Nature Biotechnology, 34, 479–481.

Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC (2012) Efficient TALEN mediated gene knockout in livestock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 17382-17387.

Carter P, Bedouelle H, Winter G (1985) Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. Nucleic Acid Res Jun 25; 13(12): 4431-43

Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D Leibman D, klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A, Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Mol Plant Pathol 17 (7): 1140-53

Clasen B.M, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, Tibebu R, Davison S, Ray EE and Daulhac A (2016. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. Plant biotechnology journal 14(1): 169-176.

Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, *et al.* (2015) Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. PLoS ONE 10(8): e0136690, doi:10.1371/journal.pone.0136690.

Cyranoski D (2015) Super-muscly pigs created by small genetic tweak. Nature, 523, 13-14.

Dastjerdeh MS., Kouhpayeh S, Sabzehei F, Khanahmad H, Salehi M, Mohammadi Z, Shariati L, Hejazi Z, Rabiei P, Manian M (2016) Zinc Finger Nuclease: A New Approach to Overcome Beta-Lactam Antibiotic Resistance. Jundishapur J Microbiol. 9(1): e29384

Djukanovic V, Smith J, Lowe K, Yang M, Gao H, Jones S, Nicholson MG, West A, Lape J, Bidney D (2013) Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (MS26) using a re-designed I–CreI homing endonuclease. The Plant Journal 76(5): 888-899.

European Academies' Science Advisory Council (2017) *Genome Editing*: Scientific opportunities, public interests, and policy options in the EU, http://www.easac.eu/home/reports-and-statements/detail-view/article/genome-editi.html

Fernández-Martínez LT und Bibb MJ (2014) Use of the Meganuclease I-SceI of *Saccharomyces cerevisiae* to select for gene deletions in actinomycetes. Sci Rep 4:7100.

Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu H, Chen L, Li Q, Cui C, Liu X, Zhang J, Zhang Y (2017) Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knocking cattle with reduced off-target effects. Genome Biology, 18:13, DOI 10.1186/s13059-016-1144-4.

Gil-Humanes, J., Wang Y, Liang Z, Shan Q, Ozuna CV, Sánchez-León S, Baltes NJ, Starker C, Barro F, Gao C, Voytas DF (2016) High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. Plant J. 2017 Mar;89 (6):1251-1262

GMO Register (2016) Aspen as model system. http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_report.aspx?CurNot=B/SE/16/3494

Gomaa AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL. (2014) Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. mBio 5(1):e00928-13.

Guo RH, Wan YJ, Xu D, Cui .LB, Deng MT, Zhang GM, Jia RX, Zhou WJ, Wang Z, Deng KP, Huang MR, Wang F, Zhang YL (2016) Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. Scientific reports, 6, doi:10.1038/srep29855

Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. Cell Res. 25, 372-375.

Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. Plant biotechnology journal 12(7): 934-940.

Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H (2011) Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 108, 12013-12017.

Jakutyte-Giraitiene L, Gasiunas G. (2016) Design of a CRISPR-Cas system to increase resistance of *Bacillus subtilis* to bacteriophage SPP1. J Ind Microbiol Biotechnol.Vol 43 (8):1183-8.

Jenko J, Gorjanc G, Cleveland MA, Varshney RK, Whitelaw CBA, Woolliams JA, Hickey JM (2015) Potential of promotion of alleles by *Genome Editing* to improve quantitative traits in livestock breeding programs. Genetics Selection Evolution. 47:55, DOI: 10.1186/s12711-015-0135-3.

Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR/Cas systems. Nature Biotechnology 31, 233-239

Kang JD, Kim S, Zhu HY, Jin L, Guo Q, Li XC, Zhang YC, Xing XX, Xuan MF, Zhang GL, Luo QR, Kim YS, Cui CD, Li WX, Cui ZY, Kim JS, Yin XJ (2017) Generation of cloned adult muscular pigs with myostatin gene mutation by genetic engineering. RSC-Advances 7: 1241-1249.

Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H (2016) Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. Frontiers in Plant Science 7(377).

Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat Biotech 30(5): 390-392.

Liang L, Liu R, Garst AD, Lee T, Sanchez i. Nogue V., Beckham GT, Gill RT (2017) CRISPR Enabled Trackable genome engineering for isopropanol production in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering 41 (2017)1-10

Mandaci S (2011) Site-directed mutagenesis as the cornerstone of protein engineering: from basic biotechnology to industrial enzymes. Curr Opin Biotechnol.;22(Suppl. 1):S39

Niemann H, Kues WA, Petersen B, Carnwath JW (2011) Animal Systems; Transgenesis. In: Murray Moo-Young (ed.), Elsevier, Comprehensive Biotechnology, Second Edition, Vol. 4, pp. 457 – 467.

Nisha M, Satyanarayana T (2013) Recombinant bacterial amylopullulanases- Developments and perspectives. Bioengineered 4:6, 388-400

Niu Q, Zheng H, Zhang L, Qin F, Facemire L, Zhang G, Cao F, Zhang K, Huang X, Yang J, He L, Liu C (2015) Knockout of the adp gene related with colonization in *Bacillus nematodica* B16 using customized transcription activator-like effectors nucleases. Microbial Biotechnology 8(4): 681-92

Oh, JH, van Pijkeren, JP (2014) CRISPR/Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. Nucleic Acid Res. 42:e131.

Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T (2016) Targeted mutagenesis in chicken using CRISAP/Cas9 system. Scientific Reports, 6, 23980, doi: 10.1038/srep23980.

Palgrave CJ, Gilmour L, Lowden CS, Lillico SG, Mellencamp MA, Whitelaw CB (2011) Species-specific variation in RELA underlies differences in NF-KB activity: a potential role in African swine fever pathogenesis. J. Virol. 85, 6008-6014.

Petersen B, Niemann H (2015) Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. Transgenic Res. 24, 381-396.

Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long C., Pryor JH, King TJ, Lillico SG, Mileham AJ, Mclaren DG, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC (2015) Genome edited sheep and cattle. Transgenic Res. 24, 147-153.

Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, Blosser, RJ, Smith RF, Sidner RA, Paris LL, Blankenship RL, Ray CN, Miner AC, Tector M, Tector AJ (2014) Creating class I MHC-Null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. J. Immunology 193, 5751-5757.

Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature Jan 1: 289(5793):85-8

Selle K, Klaenhammer TR, Barrangou R (2015) CRISPR based screening of genomic island excision events in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112:8076-8081.

Shan Q., Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015) Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. Plant biotechnology journal 13(6): 791-800.

Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR/Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. Plant Biotechnol J 15(2): 207-216.

Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKelver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD (2009) Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Nature 459(7245): 437-441.

Sun S, Horikawa Y, Wada M, Sugiyama J, Imai T (2016) Site-directed mutagenesis of bacterial cellulose synthase highlights sulfur-arene interaction as key to catalysis. Carbohydrate Research 434: 99-106

Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du J, Francis F, Zhao Y (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. Frontiers in Plant Science 8: 298.

Tan W, Carlson DF, Lancto CA Garbe JR, Webster DA, Hackett PB Fahrenkrug SC (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. Proc. Natl. Acad Sc ,USA 110, 16526-16531.

Toniti W, Yoshida T, Tsurumura T, Irikura D, Monma C, Kamata Y, Tsuge H (2017) Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILE-a as novel enterotoxin. Plos-One 12(2): e0171278

van de Wiel CCM, Schaart LAP, Lotz M, Smulders J.M. (2017) New traits in crops produced by *Genome Editing* techniques based on deletions. Plant Biotechnology Reports: 1-8.

Van Pijkeren JP, *et al.*, 2012: Exploring optimization parameters to increase ssDNA recombineering in *Lactococcus lactis* and *L. reuteri*. Bioengineered 3:209-217.

Waltz E (2016a) CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. Nat Biotech 34(6): 582-582.

Waltz E (2016b) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. Nature 532(7599): 293.

Wang Y., Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nature biotechnology.

Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H (2010) Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 402, 14-18.

Wendt T, Holm P, Starker C, Christian M, Voytas D, Brinch-Pedersen H, Holme I (2013) TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. Plant Molecular Biology 83(3): 279-285.

Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, Trible BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, Mclaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS (2016) Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Nature Biotechnology 34, 20–22.

Wu H, Wang Y, Zhang Y, Yang M, Lv J, Liu J, Zhang Y (2015) TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. Proc. Natl Acad Sc, USA doi:10.1073/pnas. 1530-39. 1421587112/-/DCS supplement.

www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/04_Fachmeldungen/2015/2015_06_03_Fa_CI-BUS.html

Xu J, Zhang W (2016) Strategies used for genetically modifying bacterial genome: site-directed mutagenesis, gene inactivation, and gene over-expression. Journal of Zhejiang University-Sci B (Biomed & Biotechnol) 17(2): 83-99

Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Quyang Z, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Song J, Tian J, Li F, Zhang J, Chang L, Pei D, Chen YE, Lai L (2011) Generation of PPAR gamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. Cell Res. doi: 10.1038/cr.2011.70.

Yang L, Guell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G (2015) Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). Science Express doi/10.1126/science.aad1191.

Ye W, Zhang W, Liu T, Tan G, Li H, Huang Z (2016) Improvement of Ethanol Production in Saccharomyces cerevisiae by High-Efficient Disruption of the ADH2 Gene Using a Novel Recombinant TALEN Vector. Front. Microbiol. 7:1067.

Yu BL, Lu R, Yuan YG, Zhang T, Song SZ, Qi ZQ., Shao B, Zhu MM, Mi F, Cheng Y (2016) Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. BMC Dev Biol, 16.

Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N (2011) Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. Cell Res. 21, 1638-1640.

7 DANKSAGUNG

Die Autoren danken dem RKI und BfN für kritische Anmerkungen bei der Erstellung des ersten Entwurfes sowie Vertretern nachfolgender Institutionen und Verbände sowie weiteren Personen für die Beteiligung an einer nachfolgenden öffentlichen Konsultation:

- Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit und Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz,
- Bundesverband Deutscher Pflanzenzüchter e.V.,
- Bundesverband Rind und Schwein e.V. und Förderverein Bioökonomieforschung e.V.,
- Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft e. V.,
- Dir. und Prof. i. R. Dr. H.-J.-Buhk
- Ministerium für Umwelt, Energie, Ernährung und Forsten des Landes Rheinland-Pfalz,
- Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen,
- Testbiotech e. V.,
- Umweltinstitut München e. V.,
- Wissenschaftlerkreis Grüne Gentechnik e. V.