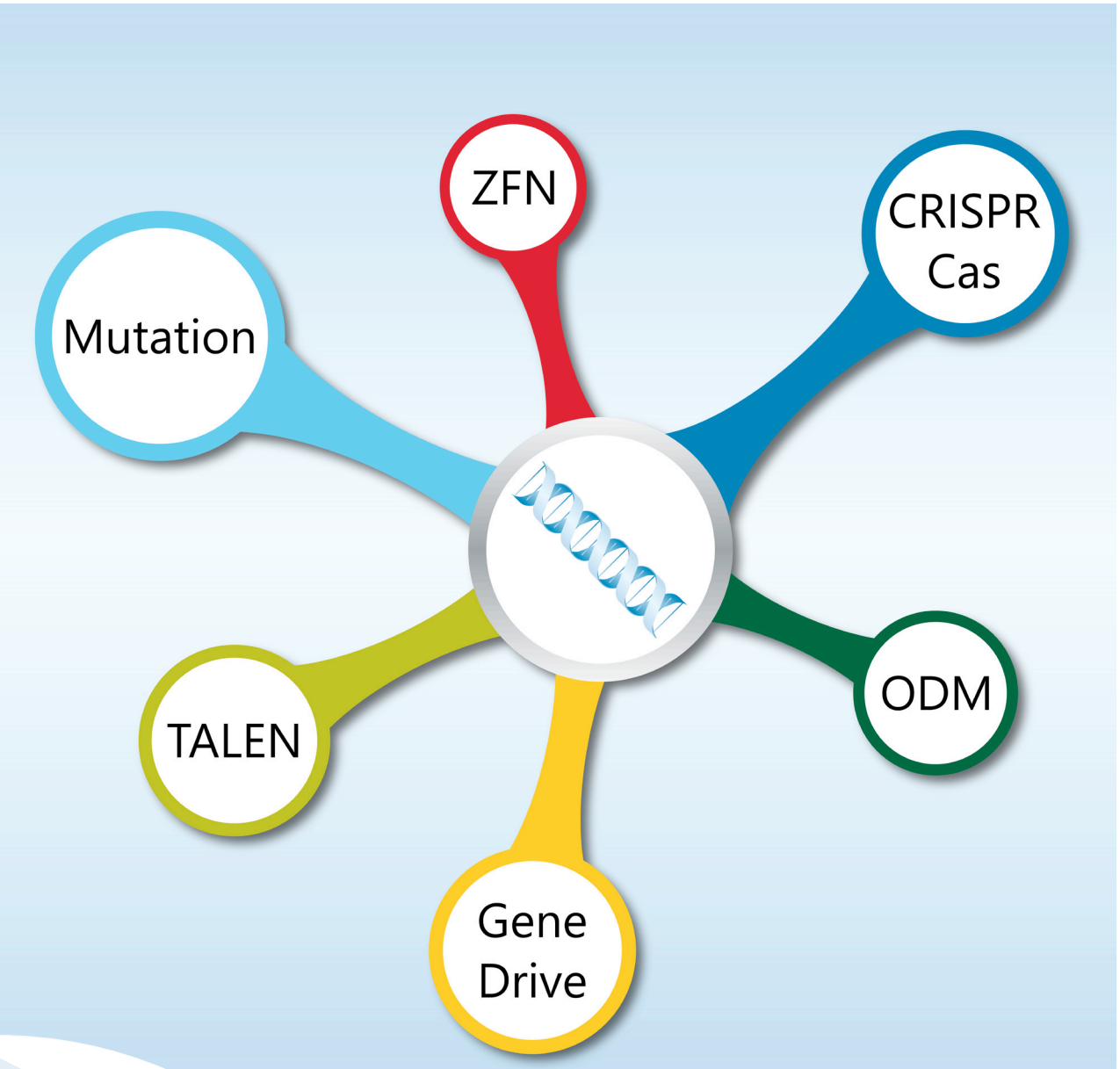
Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit



LGL

Genome Editing

Band 11 der Schriftenreihe
Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz

Die Autoren danken dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) für die Zusammenarbeit und Unterstützung.
Aus Gründen der besseren Lesbarkeit haben wir auf die gleichzeitige Verwendung geschlechtsspezifischer Schreibformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechtsformen.

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: xxxxxxxxxx@xxx.xxxxxx.xx
Internet: www.lgl.bayern.de

Druck: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dr. Patrick Gürtler
Stand: März 2019
Autoren: Dr. Patrick Gürtler, Christin-Kirsty Baillie, Dr. Ottmar Goerlich,
Dr. Sabine Estendorfer-Rinner, Dr. Armin Baiker

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Armin Baiker
Telefon: 09131 6808-5291
E-Mail: armin.baikxx@xxx.xxxxxx.xx

Dr. Patrick Gürtler
Telefon: 09131 6808-5827
E-Mail: patrick.guerxxxx@xxx.xxxxxx.xx

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
alle Rechte vorbehalten

Das vorliegende Druckprodukt wurde aus FSC-zertifizierten Materialien gefertigt.

ISSN 1866-7767 Druckausgabe
ISSN 1866-7775 Internetausgabe
ISBN 978-3-96151-052-8 Druckausgabe
ISBN 978-3-96151-053-5 Internetausgabe

Eine Behörde im Geschäftsbereich
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Diese Publikation ist urheberrechtlich geschützt, die publizistische Verwertung – auch von Teilen – der Veröffentlichung wird jedoch ausdrücklich begrüßt. Bitte nehmen Sie Kontakt mit dem Herausgeber auf, der Sie wenn möglich mit digitalen Daten der Inhalte und bei der Beschaffung der Wiedergaberechte unterstützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.

BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Telefon 089 122220 oder per E-Mail unter xxxxxx@xxxxxx.xx erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort **4**

1 Einführung **5**

2 Überblick über die Genome Editing-Techniken **7**

2.1 Oligonukleotid-gelenkte Mutagenese (ODM) 7

2.2 Ortsspezifische Nukleasen (SDN) 8

2.2.1 Meganukleasen 11

2.2.2 Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) 11

2.2.3 Transcription Activator-like Effector-Nukleasen (TALEN) 12

2.2.4 CRISPR/Cas-System 12

2.2.5 Base Editing 16

2.2.6 Transiente Änderung der Genexpression 17

3 Anwendungen des Genome Editing **18**

3.1 Anwendungen bei Mikroorganismen und Pilzen 18

3.2 Anwendungen bei Pflanzen 18

3.3 Anwendungen bei Tieren 20

3.4 Anwendungen beim Menschen 21

3.5 Gene Drive 22

3.6 Anwendungen von CRISPR/dCas9 zum Nachweis von Nukleinsäuren 24

4 Mögliche Risiken des Genome Editing **28**

4.1 Off-Target-Effekte 28

4.2 Risiken des Gene Drive 30

5 Nachweis und Identifizierung von Modifikationen **31**

5.1 Real-time PCR 31

5.2 RNase H-abhängige real-time PCR 36

5.3 Digitale PCR (dPCR) 37

5.4 T7 Assay 40

5.5 Next Generation Sequencing 42

6 Rechtliche Situation **44**

6.1 Europäische Union 44

6.2 Weltweit 45

7 Fazit **47**

8 Danksagung **48**

9 Literaturverzeichnis **49**

10 Glossar **56**

11 Anhang 1 – Genome Editing: Anwendungsbeispiele **58**

12 Anhang 2 – Genome Editing: Tiermodelle für humane Erkankungen **62**

Vorwort

Sehr geehrte Leserinnen und Leser,

bei der Tier- und Pflanzenzucht, aber auch bei der Nutzung von Mikroorganismen, stehen wir in den nächsten Jahrzehnten vor großen Herausforderungen. Neben Fragen zur Ernährung der stark ansteigenden Weltbevölkerung gelangen vor allem Themen wie Nachhaltigkeit, Verträglichkeit von Lebensmitteln, sowie die Sicherheit von Produkten immer mehr in das Bewusstsein der Verbraucher. Die klassische Züchtung leistet dabei einen wertvollen Beitrag, um diesen Herausforderungen zu begegnen.
In den letzten Jahrzehnten wurden vermehrt auch molekularbiologische Techniken genutzt, um Organismen genetisch zu verändern. Im Bereich der grünen Gentechnik wurden meist artfremde Gene in das Genom von Pflanzen und Tieren eingefügt, um diese Organismen mit neuen Eigenschaften auszustatten. Bei den klassischen molekularbiologischen Techniken erfolgt der Einbau der fremden DNA in das Genom ungerichtet und nicht vorhersagbar, was einer der Hauptkritikpunkte an diesen Techniken ist.
Seit einigen Jahren gewinnen neue molekularbiologische Techniken an Bedeutung, die eine gezielte Modifikationen des Erbguts von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen ermöglichen. Vor allem CRISPR/Cas9 hat dabei einen zentralen Platz in der öffentlichen Diskussion eingenommen. Seit dem Urteil des Europäischen Gerichtshofs im Jahr 2018 werden die mit diesen neuen Techniken hergestellten Organismen in der EU als gentechnisch veränderte Organismen eingestuft und stehen daher auch bei Überwachungsbehörden im Fokus.
Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) beschäftigt sich in einem durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) geförderten Forschungsprojekt mit diesen neuen molekularbiologischen Techniken und deren Nachweisbarkeit.
Die in diesem Rahmen entstandene Broschüre soll eine verständliche Einführung in die Funktionsweisen verschiedener Genomeditierungstechniken bieten, mögliche Nachweisstrategien aufzeigen, sowie Nutzen und Risiken der neuen Techniken gegenüberstellen.

Erlangen, März 2019

Ihr

Dr. med. Andreas Zapf

Präsident des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

1 Einführung

Seit der Entschlüsselung der Struktur der DNA als Informationsträger der genetischen Information durch Watson, Crick, Wilkins und Franklin im Jahr 1953 [1] hat sich die Forschung intensiv damit beschäftigt, diese Informationen nicht nur zu verstehen, sondern auch gezielt zu verändern. Die DNA besteht aus zwei miteinander verknüpften Nukleinsäure-Einzelsträngen, die wiederum aus einzelnen Bausteinen, den Nukleotiden (oder Basen) zusammengesetzt sind. Die Verknüpfung der Einzelstränge zu einem DNA-Doppelstrang kommt dadurch zustande, dass die vier möglichen DNA-Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) sich immer paarweise aneinanderbinden (zu sogenannten Basenpaaren, A=T bzw. G≡C). Die Abfolge (Sequenz) dieser Basen bestimmt die im Erbgut enthaltene Information.

Im Jahr 1965 beschrieb Werner Arber [2] die bakterielle Abwehr von Bakteriophagen über das Zerschneiden der Phagen-DNA durch Enzyme. Diese Enzyme, die später als Restriktionsenzyme bekannt wurden, schneiden die DNA an bestimmten Erkennungssequenzen. Dadurch bot sich erstmalig die Möglichkeit, die DNA im Reagenzglas spezifisch zu schneiden und Nukleinsäuren im Labor neu zu kombinieren. Für die Entdeckung und Erforschung der Restriktionsenzyme erhielten Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton O. Smith 1978 den Nobelpreis für Medizin [3]. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme bestehen meist aus 4-8 Basenpaaren (oft palindromisch), sind folglich sehr kurz und kommen oftmals häufig im Genom vor. Dies führt dazu, dass Restriktionsenzyme viele Schnitte im Genom verursachen. Ein einzelner Schnitt der DNA an einer vordefinierten Stelle im Genom ist damit nicht möglich.

1973 gelang erstmals die Übertragung von Nukleinsäuren in einen Organismus. Stanley Cohen und Annie Chang kombinierten virale und bakterielle DNA zu einem Plasmid (ringförmige DNA), das außerdem zwei Antibiotikaresistenzen enthielt. Diese DNA übertrugen sie in das Bakterium *Escherichia coli* [4].

Ein Meilenstein der Molekularbiologie war die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR), für die Kary Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Nun war es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (Enzym) gezielt im Labor zu vervielfältigen [5] oder neu zu kombinieren. Diese Kenntnisse waren die Grundlage für die Herstellung der ersten gentechnisch veränderten Pflanze, einer antibiotikaresistenten Tabakpflanze [6].

Um die hergestellten DNA-Fragmente in die Zelle einzubringen, wurden verschiedene Techniken angewandt. Die häufigsten angewandten Verfahren sind dabei die Elektroporation, die Genkanone (engl.: gene gun) und die Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* (mittlerweile auch als *Rhizobium radiobacter* bezeichnet). Die genannten Methoden haben jedoch gemein, dass die Integration des fremden DNA-Fragments an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle im Genom stattfindet. Außerdem ist die Effizienz dieser Techniken eher gering, so dass viele Ansätze gemacht werden müssen, bis das gewünschtes Resultat erhalten wird. Einen deutlichen Fortschritt gab es in den 1990er Jahren [7] durch die Entwicklung und Nutzung von ortsspezifischen Nukleasen wie ZFN [8]

oder TALEN [9], mit denen es nun möglich wurde, an einer vordefinierten Stelle im Genom Modifikationen vorzunehmen (Genome Editing).

Der eigentliche Durchbruch des Genome Editing, also der zielgerichteten genetischen Modifikation, kam durch die Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems im Jahr 2011 [10]. Bereits ein Jahr später konnte eine gentechnisch veränderte Version des CRISPR/Cas-Systems konstruiert und dazu genutzt werden, bakterielle DNA zielgerichtet zu zerschneiden [11]. Im Jahr darauf gelang dies auch für die DNA höherer Säugetierzellen [12].

Die steigende Bedeutung der für das Genome Editing verwendeten neuen molekularbiologischen Techniken wird auch durch die Anzahl der veröffentlichten Publikationen seit 2009 deutlich (**Abbildung 1**). Dabei nimmt vor allem CRISPR eine Schlüsselposition ein.

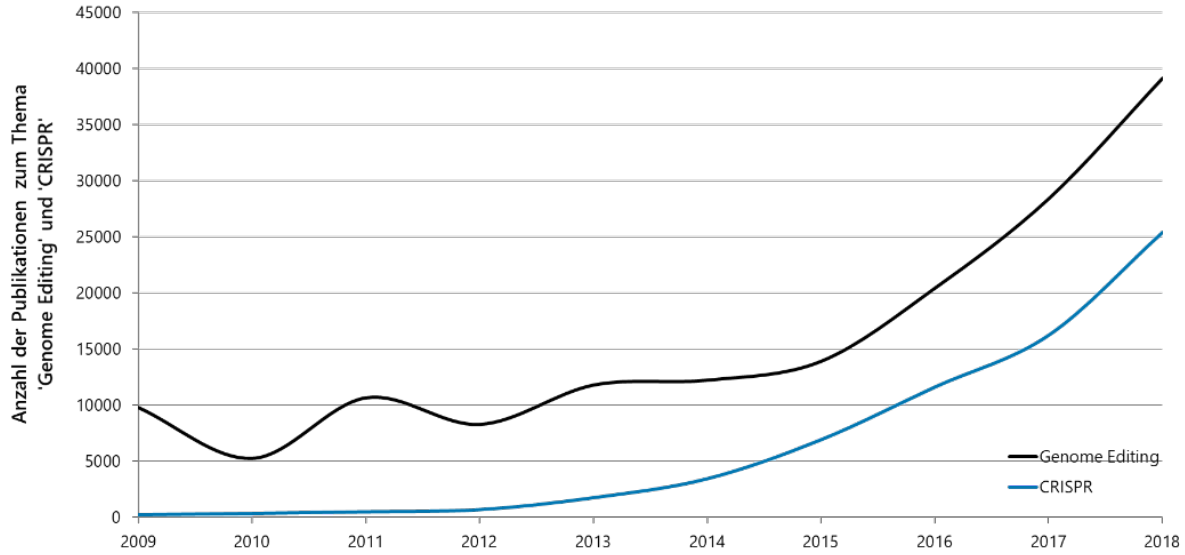


Abbildung 1: Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen mit den Stichwörtern ‚Genome Editing' (schwarze Linie) und ‚CRISPR' (blaue Linie) im Zeitraum zwischen 2009 und 2017 (Daten: https://app.dimensions.ai/discover/publication).

Durch das CRISPR/Cas-System ist es nun deutlich einfacher und praktikabler geworden, gewünschte Modifikationen im Genom von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen durchzuführen. Wie jedoch schon bei der klassischen Gentechnik werden auch Anwendungen der neuen molekularbiologischen Techniken in der Öffentlichkeit sehr kontrovers diskutiert.

In dieser Broschüre sollen daher nicht nur die neuen molekularbiologischen Techniken selbst dargestellt werden, sondern auch deren Anwendungsmöglichkeiten, mögliche Risiken und Möglichkeiten eines Nachweises (ihrer Anwendung).

2 Überblick über die Genome Editing-Techniken

Die in diesem Bericht behandelten molekularbiologischen Techniken zur spezifischen Modifikation von Nukleinsäuren werden in zwei Varianten unterteilt:

- Nutzung einer Oligonukleotid-gelenkten Mutagenese (engl.: oligonucleotide directed mutagenesis; ODM)
- Nutzung von ortsspezifischen Nukleasen (engl.: site directed nucleases; SDN)

Die Funktionsweisen der einzelnen Verfahren werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

2.1 Oligonukleotid-gelenkte Mutagenese (ODM)

Bei der Oligonukleotid-gelenkten Mutagenese (ODM; engl.: oligonucleotide directed mutagenesis) werden kurze, synthetisch hergestellte, einzelsträngige Nukleinsäure-Stücke (Oligonukleotide) mit einer Länge von ca. 20 bis 100 Nukleotiden in die zu verändernde Zelle eingebracht (**Abbildung 2**). Diese Oligonukleotide sind dabei bis auf eine oder wenige Basen komplementär zu der zu verändernden, spezifischen DNA-Sequenz im Genom der Zelle. Dort dienen sie als Matrize für das gezielte Einfügen von Mutationen, welche nur ein bis wenige DNA-Basenpaar(e) betreffen. Die zellulären Mechanismen, die zu den Mutationen führen sind nicht völlig verstanden; es wird jedoch davon ausgegangen, dass DNA-Reparaturenzyme eine wichtige Rolle spielen [13]. Mit der ODM kann man Gene gezielt ausschalten, aktivieren oder verändern. Das Einfügen von fremder DNA (z. B. Transgenen) in das Genom von Zellen ist mit Hilfe der ODM nicht möglich.

Prominentes Beispiel für eine mit Hilfe der ODM hergestellte Kulturpflanze ist der herbizidtolerante Cibus-Raps [14].

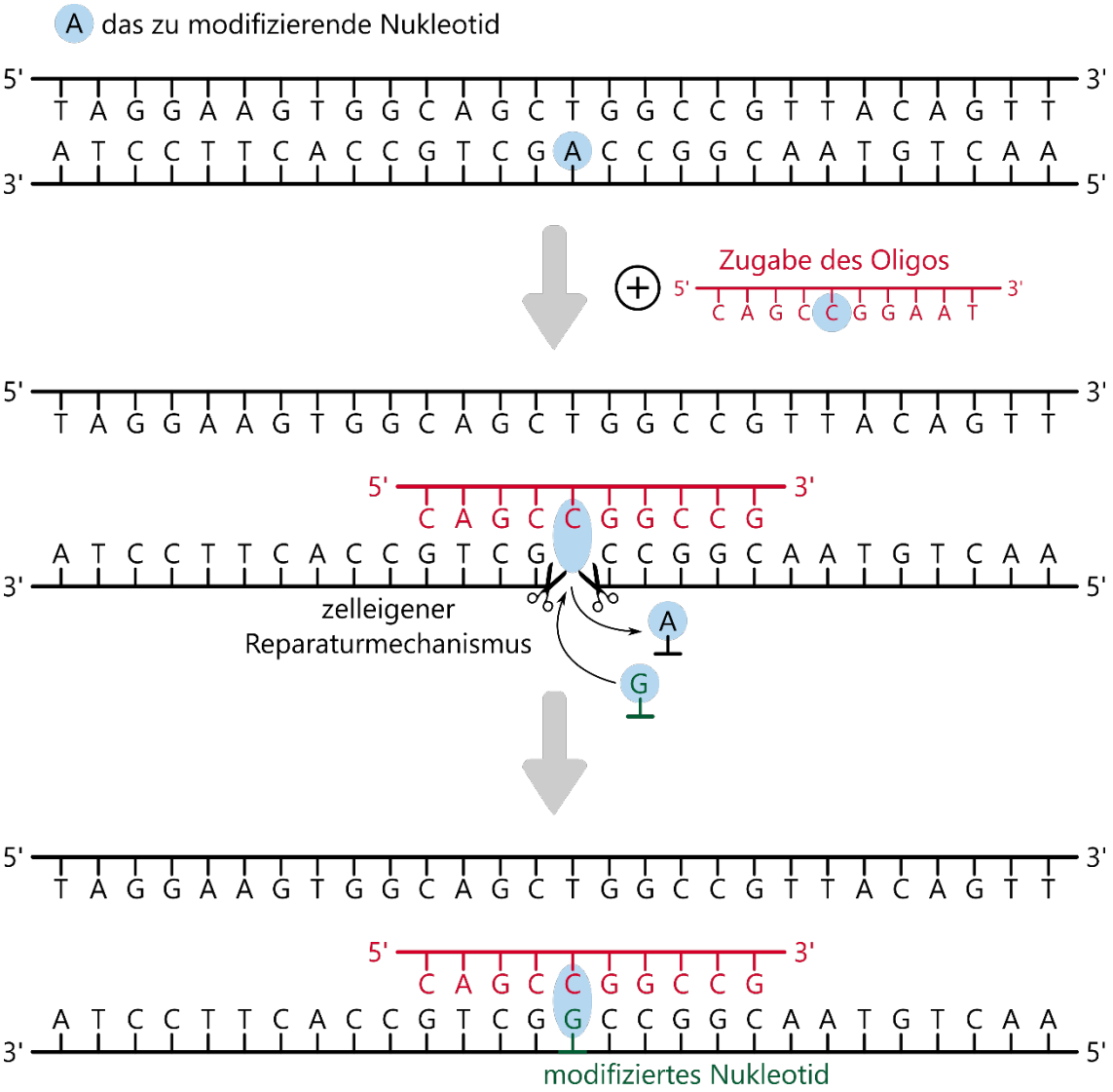


Abbildung 2: Prinzip der Oligonukleotid-gelenkten Mutagenese. Das zugegebene Oligonukleotid dient als Vorlage für den zelleigenen Reparaturmechanismus, der den gelenkten Austausch eines Nukleotids vollzieht.

2.2 Ortsspezifische Nukleasen (SDN)

Ortsspezifische Nukleasen (**SDN**; engl.: site-directed nucleases) sind Enzyme, die mit Hilfe von RNA oder Proteinen an eine bestimmte Stelle im Genom geführt werden, die verändert werden soll. Dort bewirken die Nukleasen einen Doppelstrangbruch, der für das Genome Editing genutzt werden kann. Man spricht bei SDN daher von RNA-gelenkten (engl.: RNA-directed) oder Protein-gelenkten (engl.: protein-directed) SDN.

Bevor die SDN an der vordefinierten Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch erzeugen können, müssen diese jedoch in die zu verändernde Zelle eingebracht werden. Hierfür gibt es vielfältige Verfahren.

Die SDN können als DNA in das Genom der Zelle eingefügt werden (ggf. unter Verwendung von viralen Vektoren bzw. Plasmidvektoren in tierischen Systemen). Bei Pflanzen kann die DNA auch mit Hilfe der Genkanone (engl. gene gun) oder der über Agrobakterien

vermittelten Transformation in die Zelle eingebracht werden. In der Zelle wird die DNA in mRNA und anschließend in das entsprechende Protein übersetzt und kann dann als funktionsfähige SDN zur Genomeditierung führen.

In der Regel ist die Anwesenheit des SDN-Systems (SDN und ggf. lenkende RNA) jedoch nur vorübergehend (transient) erforderlich. Wird die SDN auf (m)RNA-Ebene in die Zelle gebracht, wird sie dort in das entsprechende Enzym übersetzt und kann dann eine Genomeditierung bewirken. Dabei wird die SDN nur so lange produziert, wie auch entsprechende RNA vorhanden ist, also nur vorübergehend. Zudem ist es auch möglich, die SDN direkt auf Proteinebene in die Zelle zu bringen. Auch hier ist die SDN nur zeitlich begrenzt in der Zelle vorhanden. In beiden Fällen ist eine kodierende Fremd-DNA in der final genomeditierten Zelle nicht nachweisbar.

SDN können auf unterschiedliche Weise zu Modifikationen des Genoms führen bzw. genutzt werden. Darauf basierend wird eine Differenzierung in **SDN-1-**, **SDN-2-** und **SDN-3-Technik** vorgenommen (Abbildung 3).

Bei der **SDN-1**-Technik wird ausschließlich die SDN in die zu verändernde Zelle eingebracht, wo sie einen Doppelstrangbruch an der vorab definierten Stelle im Genom bewirkt. Dieser Doppelstrangbruch kann vom zelleigenen Reparaturmechanismus mittels non-homologous end joining (NHEJ) repariert werden, wodurch zufällige Mutationen entstehen können, die i. d. R. nur ein bis wenige Basenpaar(e) betreffen. Außerdem ist es möglich, dass ein oder wenige Basenpaar(e) eingebaut (Insertion) oder entfernt (Deletion) werden. Folglich führt die SDN-1-Technik zum Ausschalten eines Gens (knock-out) oder zu einer zufälligen Veränderung des Gens. Gezielte, vordefinierte Veränderungen bezüglich des erwünschten Merkmals und das Einfügen von fremder DNA (z. B. Transgenen) sind mit Hilfe dieser Technik nicht möglich.

Neben der SDN wird bei **SDN-2** auch ein (einzel- oder doppelsträngiges) DNA-Molekül in die zu verändernde Zelle eingebracht. Die eingebrachte DNA kann mehrere tausend Basenpaare umfassen und ist homolog (d. h. in der DNA-Sequenz übereinstimmend) zu den flankierenden Sequenzbereichen des eingeführten Doppelstrangbruchs. Sie unterscheidet sich an der Stelle des Doppelstrangbruchs lediglich durch ein bis wenige DNA-Basenpaar(e) von der endogenen (zelleigenen) DNA-Sequenz. Bei der Reparatur des Doppelstrangbruchs durch die zelleigene DNA-Reparaturmaschinerie mittels homologer Rekombination (HR) wird mit Hilfe der eingeführten homologen DNA die gewünschte (ein bis wenige DNA-Basenpaar(e) betreffende Veränderung gezielt im Genom der Zelle verankert. Dadurch lassen sich Gene gezielt ausschalten, aktivieren oder verändern. Das Einfügen von fremder DNA (z. B. Transgenen) in das Genom von Zellen ist mit Hilfe der SDN2-Technik nicht möglich. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Reparatur defekter Gene mittels eingebrachtem, homologem DNA-Molekül und homologer Rekombination (HR) im Regelfall mit geringerer Effizienz abläuft, als die Erzeugung von Insertionen / Deletionen („Indels“) als Nebenprodukt der non-homologous end joining- (NHEJ-) Reparatur.

Bei der Nutzung der **SDN-3**-Technik wird neben der SDN auch ein (doppelsträngiges) DNA-Molekül in die zu verändernde Zelle eingebracht. Dieses DNA-Molekül kann mehrere tausend Basenpaare umfassen und ist von Abschnitten flankiert, die homolog (in der DNA-Sequenz übereinstimmend) zu der DNA um die Zielsequenz des eingeführten

Doppelstrangbruchs sind. Im eingebrachten DNA-Fragment befindet sich an der Stelle des gezielten Doppelstrangbruchs ein DNA-Stück aus einem anderen Organismus, welches als Fremd-DNA (i. d. R. transgen) bezeichnet wird. Bei der Reparatur des Doppelstrangbruchs durch die zelleigene DNA-Reparaturmaschinerie mittels „homologer Rekombination“ (HR) wird die fremde DNA gezielt an dieser Stelle des Zellgenoms verankert (chromosomale Integration). Mit der SDN3-Technik werden somit gezielt fremde DNA-Bereiche (i. d. R. Transgene) in das Genom von Zellen eingefügt. Integriert diese rekombinante DNA (wie beabsichtigt) chromosomal, dann ist der resultierende Organismus Träger einer gentechnischen Veränderung, vergleichbar mit Ergebnissen einer klassischen Transgenese.

Bei der SDN-3-Technik sind jedoch die folgenden Punkte anzumerken:

- Handelt es sich bei der mit Hilfe der SDN3-Technik gezielt in das Genom des Organismus eingefügten DNA um eine DNA desselben Organismus oder einer verwandten Art, so ist ggf. der Sachverhalt der „Selbstklonierung“ (gemäß § 3 Nr. 3c Buchstabe c GenTG) erfüllt.
- Im Unterschied zur „klassischen“ Cisgenese bzw. Transgenese wird im Fall der SDN3-Technik die eingefügte DNA derselben Art bzw. die eingefügte Fremd-DNA gezielt an eine bestimmte Stelle des Genoms des Empfängerorganismus eingebaut.

Zur Erzeugung des sequenzspezifischen Doppelstrangbruchs gibt es verschiedene molekularbiologische „Tools“ die im Folgenden kurz erläutert werden.

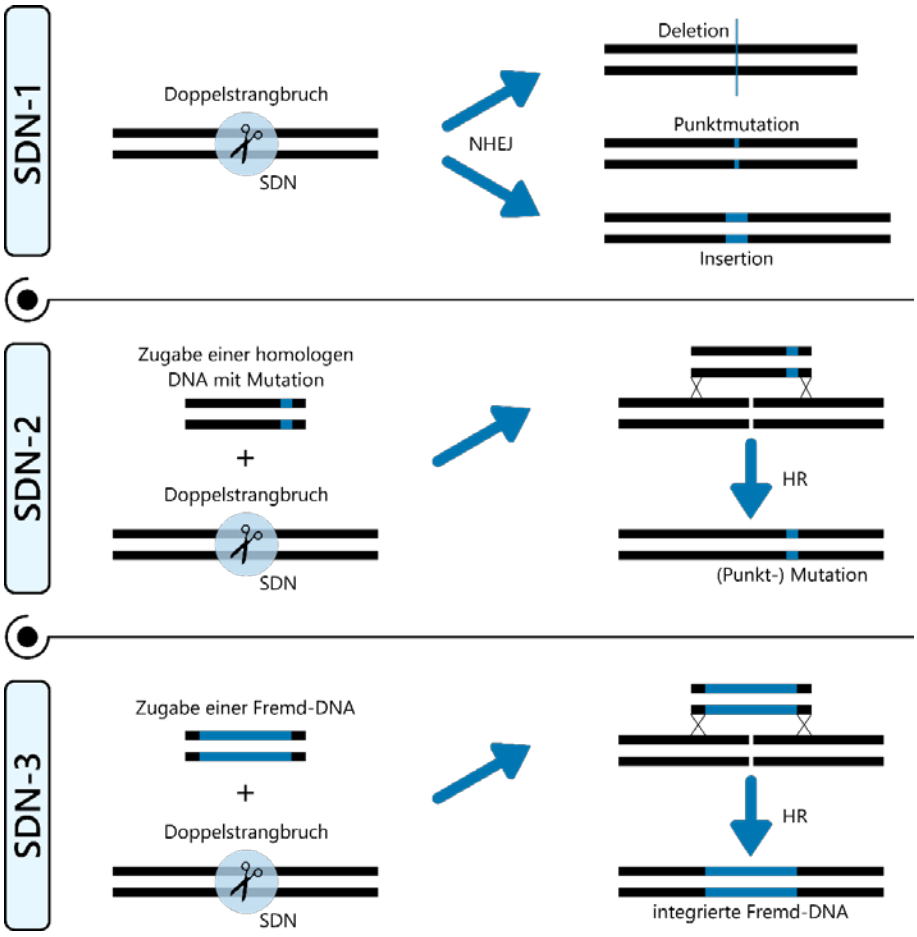


Abbildung 3: Unterteilung der SDN-Techniken in SDN-1, SDN-2 und SDN-3

2.2.1 Meganukleasen

Meganukleasen besitzen wie Restriktionsenzyme eine spezifische Erkennungssequenz, an der die DNA geschnitten wird. Im Gegensatz zu Restriktionsenzymen, die nur wenige Basenpaare erkennen, weist die Erkennungssequenz bei Meganukleasen jedoch eine Länge von 20-30 Basenpaaren auf (siehe **Abbildung 4**). Diese Länge führt dazu, dass die Erkennungssequenz statistisch für das entsprechende Genom einmalig ist. Über ein Proteindesign können Meganukleasen im Labor gezielt modifiziert werden, um ihre Erkennungssequenz anzupassen.

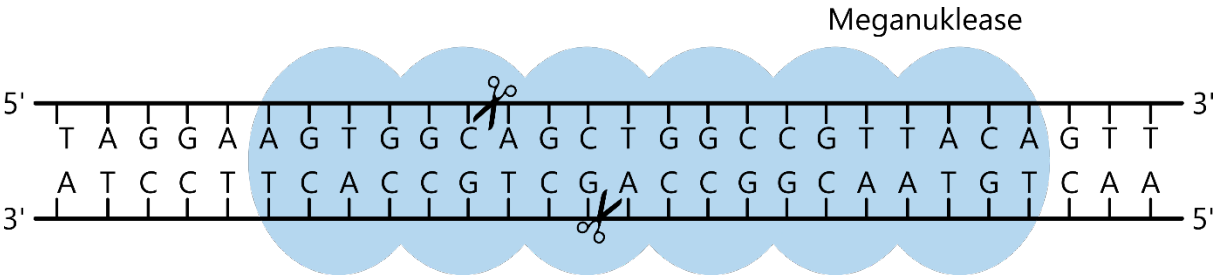


Abbildung 4: Funktionsprinzip einer Meganuklease. Das Enzym erkennt eine spezifische Sequenz zwischen 20 und 30 Basenpaaren und führt an dieser Stelle zu einem Doppelstrangbruch.

2.2.2 Zinkfinger-Nukleasen (ZFN)

Zink**f**inger-**N**ukleasen (ZFN) werden wie die unter Punkt 2.2.3 beschriebenen **T**ranscription **A**ctivator-**l**ike **E**ffector-**N**ukleasen (TALEN) zu den Protein-gelenkten SDN gezählt und waren eine der ersten Techniken des Genome Editing. ZFN sind künstlich hergestellte (rekombinante) Fusionsproteine, die aus einer DNA-Bindedomäne (Zinkfinger-Domäne) und einer DNA-Schneidedomäne (Nuklease-Domäne) bestehen (**Abbildung 5**). Die ZFN funktionieren als Heterodimer, so dass zwei ZFN vorhanden sein müssen, um einen für das Genome Editing notwendigen Doppelstrangbruch zu verursachen. Jeder Zinkfinger erkennt drei aufeinanderfolgende Nukleotide, wodurch die Nuklease-Domäne des Restriktionsenzyms (i. d. R. *Fok*I) an die entsprechende Stelle im Genom gelenkt wird. Dort erfolgt der Doppelstrangbruch durch die Aktivität der beiden Nuklease-Domänen [15, 16].

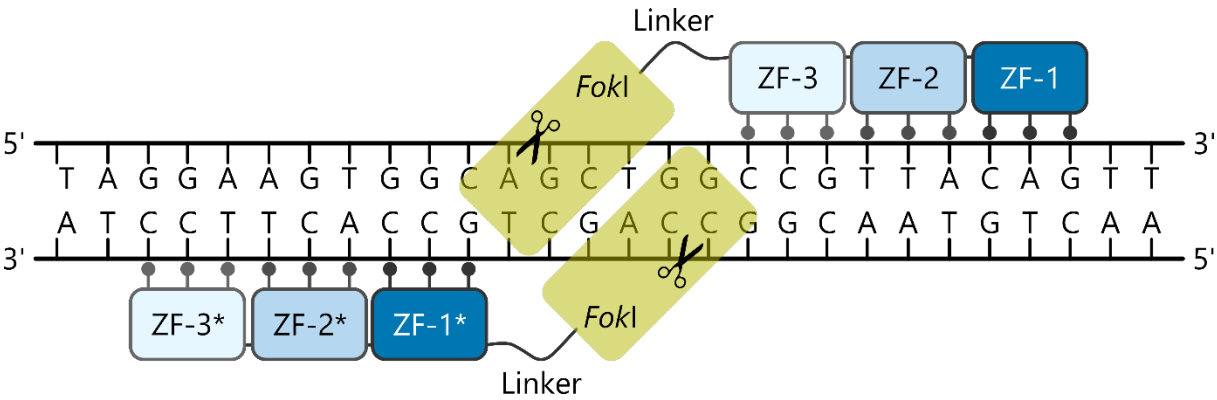


Abbildung 5: Funktionsprinzip der Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) nach Carroll, 2011 [15].

Die Tatsache, dass zwei Dimere binden müssen, damit ein Schnitt erfolgen kann, erhöht die Länge der zu erkennenden DNA-Sequenz und damit die Spezifität des Schnittes [17]. Diese Spezifität kann über die Addition weiterer Zink-Finger erhöht werden.

2.2.3 Transcription Activator-like Effector-Nukleasen (TALEN)

Den ZFN sehr ähnlich sind die TALEN, die jedoch im Vergleich wesentlich variabler sind. Sie bestehen aus einer TALE-Domäne und einer Nuklease-Domäne. Die TALE-Domäne ist aus Aminosäuren aufgebaut, wobei der überwiegende Teil des Proteins konserviert ist, und nur zwei Aminosäuren variabel sind. Über diese beiden hochvariablen Aminosäuren erfolgt die Erkennung des Nukleotids (**Abbildung 6**). Jede Einheit der TALE-Domäne erkennt ein Nukleotid. Über die Kombination der TALE-Domänen-Einheiten wird die Nuklease-Domäne an die entsprechende Stelle im Genom gelenkt, an der die Modifikation stattfinden soll. Theoretisch ist es möglich, die Nuklease über die Kombination der TALE-Domäne-Einheiten an jede Stelle im Genom zu lenken, jedoch muss die TALE Bindestelle mit einem Thymidin beginnen [18]. Die Aktivität der Nuklease-Domäne führt schließlich zum Doppelstrangbruch an der vordefinierten Stelle im Genom. Die Nuklease schneidet wie auch bei den ZFN nur als Dimer [19].

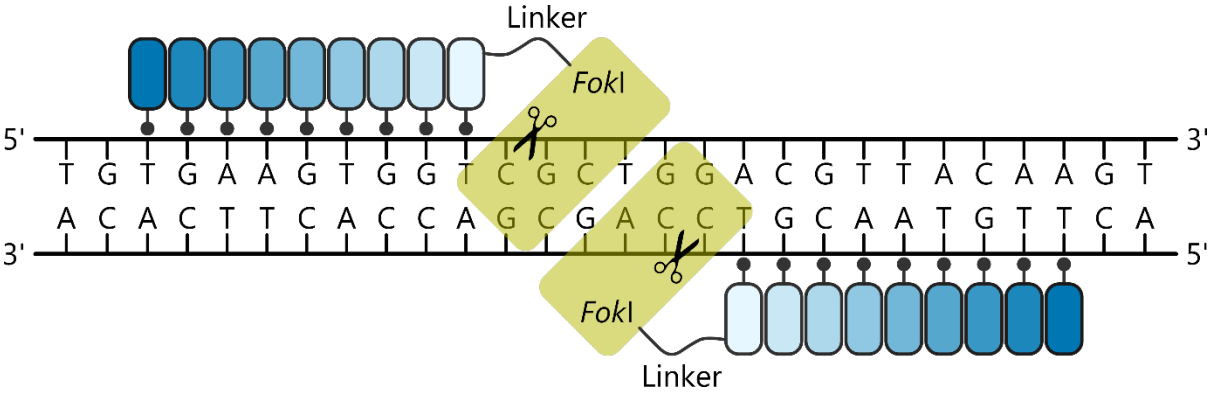


Abbildung 6: Funktionsprinzip der Transcription Activator-like Effector-Nukleasen (TALEN)

2.2.4 CRISPR/Cas-System

Bakterien und Archaeen können von einer Gruppe von Viren, den Bakteriophagen, infiziert werden. Um sich dagegen zu schützen, haben diese Mikroorganismen diverse Abwehrmechanismen entwickelt. Beim CRISPR/Cas-System werden die durch den Bakteriophagen in die Zelle injizierten genetischen Elemente mit Hilfe der bakteriellen Proteine Cas1, Cas2 und Csn2 erkannt und in kleine Fragmente zerlegt. Diese Fragmente werden als sogenannte Spacer zwischen sich wiederholende DNA-Bereiche (Repeats) ins Genom integriert (Abbildung 7). Die Repeats werden als **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats (**CRISPR**) und der Genort als CRISPR-locus bezeichnet. Es folgt die Transkription der Spacer und eines Gens, das für eine tracrRNA codiert. Diese tracrRNA ist komplementär zur Sequenz der Repeats. Nach der Transkription der Spacer erfolgt die Reifung (Maturierung). Dabei werden die Spacer auf 20 Nukleotide getrimmt und die tracrRNA gebunden. Anschließend erfolgt die Bindung eines Cas9-Enzyms, das über die 20 Nukleotide der Spacer, die jetzt als guideRNA bezeichnet werden, an eine komplementäre

DNA gelotst wird. Diese komplementäre Sequenz liegt dabei vor einem **P**rotospacer **A**djacent **M**otif (**PAM**), das beim Bakterium *Streptococcus pyogenes* aus der Nukleotidabfolge NGG besteht (N = beliebiges Nukleotid). Am komplementären DNA-Abschnitt erfolgt durch das **Cas9**-Enzym ein Doppelstrangbruch, wodurch die Fremd-DNA inaktiviert wird (**Abbildung 7**).

Neben dem Cas9-Enzym aus *Streptococcus pyogenes* gibt es noch viele andere Enzymvarianten aus verschiedenen Bakterienspezies, die jeweils unterschiedliche PAM-Sequenzen erkennen können (**siehe Tabelle 1**).

Tabelle 1: exemplarische Varianten des Cas9-Enzyms (http://www.rgenome.net/cas-designer/) mit der jeweiligen PAM-Sequenz. (degenerierte Basen: K=G/C; M=A/C; N=G/A/T/C; R=G/A; V=G/A/C; W=A/T; Y=T/C)

Enzym	Organismus	PAM-Region [5'-3']
SpCas9	*Streptococcus pyogenes*	Ngg
StCas9	*Streptococcus thermophilus*	NNAgAAW
NmCas9	*Neisseria meningitidis*	NNNNgMTT
SaCas9	*Staphylococcus aureus*	NNgRRT
CjCas9	*Campylobacter jejuni*	NNNVRYAC
CjCas9	*Campylobacter jejuni*	NNNNRYAC
AsCpf1	*Acidaminococcus sp.*	TTTN
AsCpf1	*Acidaminococcus sp.*	TTTV
SpCas9	*Streptococcus pasteurianus*	NNgTgA
FnCpf1	*Francisella sp.*	TTN
SaCas9	*Staphylococcus aureus*	NNNRRT
FnCpf1	*Francisella sp.*	KYTV
VRER SpCas9	*Streptococcus pyogenes*	NgCg
YQR SpCas9	*Streptococcus pyogenes*	NgA
XCas9 3.7 (TLIKDIV SpCas9)	*Streptococcus pyogenes*	NgT

2012 wurde basierend auf dem CRISPR/Cas9-System aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* ein effizientes Werkzeug für das Genome Editing entwickelt. Für diese Anwendung wurde das natürlich vorkommende CRISPR/Cas9-System stark vereinfacht und so gestaltet, dass es einfach und effektiv an neue Ziele angepasst werden kann [20]. Mit dem optimierten System ist es nun möglich, einen Doppelstrangbruch an einer vorher definierten Stelle im Genom zu erzeugen (**Abbildung 8**).

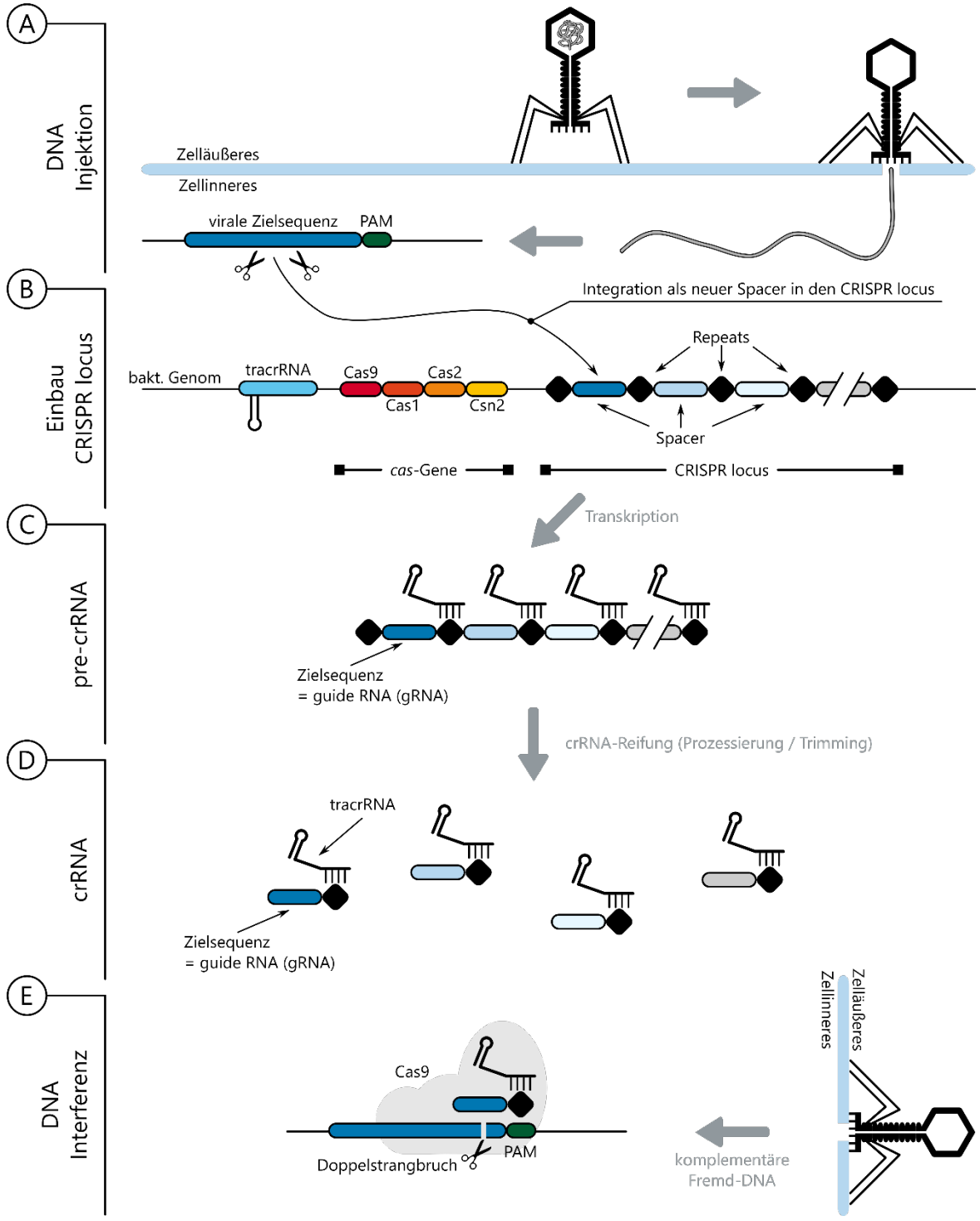


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des bakteriellen CRISPR-Cas9-Systems. Nach der Injektion der Fremd-DNA erfolgt die Fragmentierung dieser DNA mit Hilfe der Proteine Cas1, Cas2 und Csn2. Ein Fragment des viralen Genoms wird als neuer Spacer zwischen zwei Repeats am CRISPR-locus des bakteriellen Genoms eingefügt. Die Spacer und der tracrRNA-Genabschnitt (engl.: trans-activating crRNA) werden transkribiert und modifiziert. Dabei bindet die tracrRNA an die Repeat-Region und der Spacer wird auf 20 Nukleotide getrimmt und dient als guideRNA. Dieser Komplex aus guideRNA und tracrRNA verbindet sich mit dem Cas9-Enzym. Dieses wird über die guideRNA an eine komplementäre DNA-Sequenz geführt, die vor einer PAM-Region liegt (PAM = protospacer adjacent motif). Die Fremd-DNA wird daraufhin durch die Cas9 geschnitten und damit inaktiviert (Abbildung basiert auf Jiang and Doudna, 2017 [21]).

Das beim Genome Editing verwendete CRISPR/Cas9-System besteht aus einem Riboproteinkomplex. Dieser setzt sich aus einer synthetischen **sgRNA** (engl.: single guide RNA) und dem Cas9-Enzym zusammen. Die sgRNA ist fest mit der **tracrRNA** verbunden (sgRNA:tracrRNA-Komplex). Zudem enthält die sgRNA einen Sequenzabschnitt, der komplementär zu dem Bereich der Ziel-DNA ist, der geschnitten werden soll. Dadurch wird das gebundene Cas9-Enzym an die vorher definierte Stelle im Genom gelenkt. Dort schneidet das Enzym die beiden DNA-Stränge sofern die kurze **PAM**-Erkennungssequenz im Genom des Zielorganismus vorhanden ist. Der Doppelstrangbruch führt zur Aktivierung des zelleigenen Reparaturmechanismus, der genutzt wird, um die Modifikation des Genoms vorzunehmen. Die Reparatur kann über **NHEJ** (engl.: non-homologous end-joining) oder **HDR** (engl.: homology directed repair) erfolgen (**Abbildung 8**).

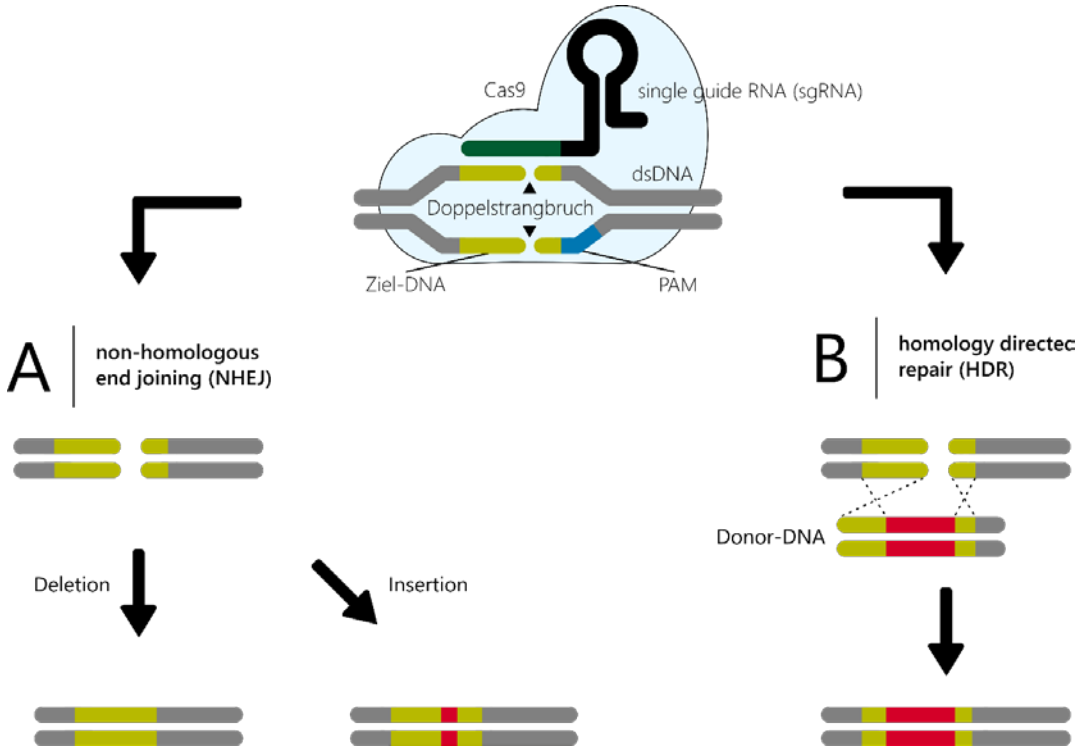


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise des CRISPR-Cas9-Systems zur Genomeditierung. Das Cas9-Enzym wird über die single guide RNA (sgRNA) an die entsprechende Stelle der Ziel-DNA gelenkt, an der es einen Doppelstrangbruch erzeugt. Dieser wird durch den zelleigenen Reparaturmechanismus repariert. Dies kann über zwei Wege erfolgen: A) beim non-homologous end joining wird der Doppelstrangbruch ohne eine Vorlage wieder repariert, wodurch es zu Insertionen und Deletionen kommen kann. Diese umfassen i. d. R. einzelne bis wenige Basen. B) Beim homology directed repair-Mechanismus wird eine Donor-DNA hinzugefügt, die als Vorlage für die Reparatur des Doppelstrangbruchs dient. Dabei wird eine Fremd-DNA von DNA-Abschnitten flankiert, die jeweils homolog zu den flankierenden Bereichen des Doppelstrangbruchs sind. Der Reparaturmechanismus der Zelle baut nun die Fremd-DNA an der entsprechenden Stelle des Doppelstrangbruchs ein. Dadurch lassen sich an der Position des Doppelstrangbruchs fremde DNA-Abschnitte einfügen, die einzelne Basen bis mehrere tausend Basen umfassen können.

Neben Doppelstrangbruch-erzeugenden Nukleasen werden auch **Nickasen** verwendet, die lediglich Einzelstrangbrüche hervorrufen. Dies führt zu Reparaturen über homologe Rekombination oder kann für die Aktivierung bzw. Unterdrückung von Genexpression verwendet werden [22]. Pärchen von Nickasen werden eingesetzt um eine präzisere Genomeditierung durchzuführen, da hier zwei Zielsequenzen genutzt werden. Dies kann auch dazu führen, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Off-Target-Effekten reduziert wird.

2.2.5 Base Editing

Das Base Editing ist eine besondere Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems, um gezielt einzelne Basen ohne Erzeugung eines Doppelstrangbruchs zu verändern. Der Vorteil des Base Editing-Ansatzes ist, dass er ohne potentiell destabilisierende Schnitte im Erbgut der zu verändernden Zelle auskommt und das Resultat daher noch besser vorhersagbar ist.

Hierfür wird das Enzym ‚**Cytidindesaminase**' an ein inaktiviertes Cas9-Enzym (dCas9) gekoppelt. Dieses inaktivierte Cas9-Enzym ist weiterhin in der Lage an die Ziel-DNA zu binden, kann diese aber nicht mehr schneiden (**Abbildung 9A-B**).

Die an das inaktivierte Cas9-Enzym gekoppelte Cytidindesaminase verursacht an der Zielsequenz den chemischen Umbau einer Cytidin- (C-) in eine Uracil- (U-) Base (**Abbildung 9C**). Aus dem zueinander passenden C-G (G = Guanin) Basenpaar wird somit ein nicht zueinander passendes U-G Basenpaar. Eine weitere an das inaktivierte Cas9-Enzym angehängte Enzymdomäne, der sogenannte ‚Uracil Glycosylase Inhibitor', verhindert dabei, dass die Basenveränderung (C ⇨ U) durch das zelleigene Reparatursystem wieder korrigiert wird. Bei der nächsten Zellteilung wird dann gegenüber den Uracil (U) ein Adenosin (A) eingebaut. Das nicht in die DNA gehörige Uracil wird durch ein Thymin (T) ersetzt, so dass schließlich ein T-A Basenpaar entsteht (**Abbildung 9D**). Auf diese Weise erhält man Zellen, bei denen das ursprüngliche C-G Basenpaar gegen ein T-A Basenpaar ausgetauscht (editiert) ist.

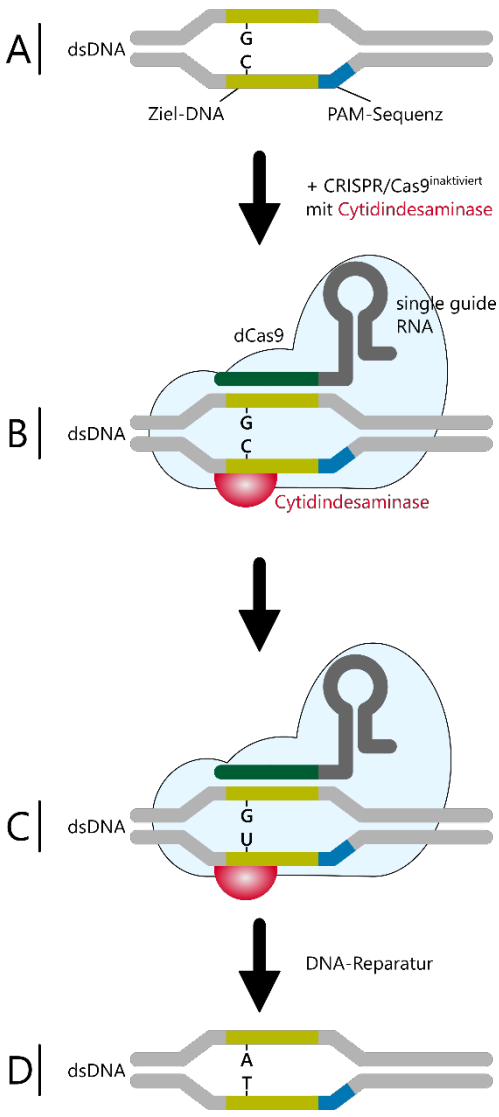


Abbildung 9: Prinzip des Basenaustausches unter Verwendung des Base Editing. Über ein inaktiviertes Cas9-Enzym mit gekoppelter Cytidindesaminase erfolgt ein Basenaustausch von Cytidin (C) zu Uracil (U). Über den zelleigenen Reparaturmechanismus wird das nicht zum U passende G durch ein Adenin (A) ersetzt. Zudem wird auch das U durch ein Thymin (T) ersetzt, so dass ein Basenaustausch C-G in A-T ohne Doppelstrangbruch erreicht wird (Abbildung basiert auf ERS Genomics Limited; www.ersgenomics.com)

Mittlerweile ist auch der umgekehrte Schritt möglich, also ein T-A Basenpaar in ein C-G Basenpaar zu ändern. Das hierfür benötigte Enzym ist jedoch in der Natur nicht vorhanden, so dass für diese Veränderung ein synthetisches Enzym zur Anwendung kommt (CRISPR based adenosine base editing (ABE) fusion protein) [23]. Dieses wird ebenfalls an ein inaktives Cas9-Enzym gekoppelt und katalysiert den Umbau eines Adenosins in ein Inosin (I). Dieses Inosin wird dann im nächsten Schritt in ein Guanin umgebaut.

Neben der Modifikation auf DNA-Ebene sind auch Modifikationen der RNA über ein Base-Editing möglich. Dabei erfolgt die Kopplung eines adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)-Proteins an ein deaktiviertes dCas13-Enzym. Auch hier wird ein Adenosin durch ein Inosin ersetzt, das beim Spleißen und bei der Translation der mRNA wie ein Guanin agiert [23].

2.2.6 Transiente Änderung der Genexpression

Über das CRISPR/Cas9-System lassen sich nicht nur Modifikationen der DNA durchführen, sondern auch die Transkription, also das Ablesen der genetischen Information zur Produktion von Proteinen, vorübergehend (transient) beeinflussen. Dabei werden Regulatoren der Genexpression an ein inaktiviertes Cas9-Enzym (dCas9) gekoppelt (**Abbildung 10**). Aktivatoren erlauben dabei ein verstärktes Ablesen der genetischen Information, Repressoren unterdrücken das Ablesen derselben [24-26]. Bei der Nutzung von Repressoren wird auch von CRISPR interference (CRISPRi) gesprochen, bei der Nutzung von Aktivatoren von CRISPR activation (CRISPRa). Welches Gen dabei betroffen ist, lässt sich durch die Sequenzspezifität des CRISPR/Cas9-Systems vorab definieren. Da die Nukleaseaktivität des Cas9-Enzyms in diesem Fall inaktiviert ist, findet auch keine stabile Modifikation der DNA statt. Mittlerweile ist es auch möglich, die Regulatoren direkt an die guide RNA zu koppeln, so dass ein Cas9-Enzym für die Anwendung nicht mehr zwingend erforderlich ist.

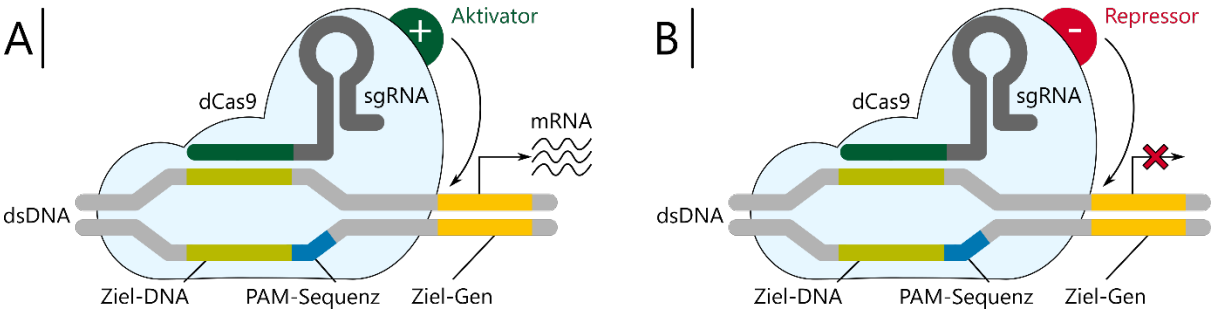


Abbildung 10: Die Fusion eines Nuklease-inaktiven CRISPR-Cas9-Systems mit Transkriptionsregulatoren ermöglicht eine sequenzspezifische Interaktion mit der chromosomalen DNA. Aktivatoren (A) verstärken das Ablesen eines Genabschnitts und führen dadurch zu einer verstärkten transienten Proteinproduktion, während Repressoren (B) das Ablesen eines Genabschnitts verhindern.

3 Anwendungen des Genome Editing

Anwendungen des Genome Editing sind bereits in vielen Publikationen beschrieben, vor allem die Nutzung von ZFN und TALEN. Seit der Verfügbarkeit des CRISPR/Cas9-Systems steigt die Anzahl der Publikationen jährlich an. Hier finden sich momentan noch zu einem großen Anteil Arbeiten, die eine generelle Anwendbarkeit dieser Technologie demonstrieren. Oftmals werden Gene für fluoreszierende Proteine eingefügt oder ein Albinismus erzeugt, mit dem der Erfolg des Genome Editing phänotypisch schnell erfasst werden kann. Das generelle Anwendungsspektrum für die neuen molekularbiologischen Techniken ist jedoch sehr vielfältig und soll hier anhand einiger Beispiele dargestellt werden.

3.1 Anwendungen bei Mikroorganismen und Pilzen

Das Genome Editing hat mittlerweile bei der genetischen Veränderung z. B. biotechnologisch relevanter Bakteriengattungen wie *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* oder *Corynebacterium* Einzug gehalten [27, 28].

Die weit verbreitete Nutzung von Antibiotika in der Medizin führt zu einer weltweiten Zunahme von Infektionen mit z. T. multiresistenten Erregern, gegen die keine wirksamen Antibiotika mehr zur Verfügung stehen. Um dieser ‚Antibiotikakrise' zu begegnen, gibt es Ansatzpunkte, die den Einsatz des Genome Editing (z. B. in Kombination mit einer Phagentherapie) beinhalten. So konnte gezeigt werden, dass es durch die Anwendung der SDN-Technik möglich ist, Antibiotikaresistenzgene in resistenten Bakterien zu inaktivieren [29-31]. Liegt das Resistenzgen auf dem Bakterienchromosom, kann das Bakterium dadurch abgetötet werden. Ist das Resistenzgen auf einem Plasmid lokalisiert, kann das Bakterium resensibilisiert, d. h. für das Antibiotikum wieder zugänglich gemacht werden. Die neuen Techniken werden bei Bakterien auch genutzt, um mögliche Alternativen zu den derzeit genutzten Nukleasen (z. B. Cas9) zu finden oder zu entwickeln [32].

Auch bei den biotechnologisch relevanten Pilzgattungen *Penicillium*, *Streptomyces*, *Saccharomyces* und *Aspergillus* sind Anwendungen beschrieben, wobei derzeit vor allem die veränderte Produktion medizinisch genutzter Sekundärmetabolite im Fokus steht [33, 34].

3.2 Anwendungen bei Pflanzen

Die Entwicklung genomeditierter Nutzpflanzen ist Gegenstand intensiver Forschung bei Unternehmen im Bereich der Pflanzenzüchtung und an Universitäten. Im Fokus stehen vor allem die Modifikation von Produkt- und agronomischen Eigenschaften. Die Herbizidtoleranz ist dabei das am häufigsten angestrebte Züchtungsziel und wurde mit ODM [13, 14, 35], ZFN [36-38] oder CRISPR/Cas9 [39] bei verschiedenen Pflanzen erreicht. Das hierzulande bekannteste Beispiel einer genomeditierten Nutzpflanze ist derzeit der mit Hilfe der ODM-Technik hergestellte herbizidtolerante Raps der Firma Cibus [40].

Auch die Resistenz gegenüber Schädlingen und Krankheiten ist ein wichtiges Züchtungsziel, für das die Genomeditierung genutzt wird. Mittels TALEN konnte so eine Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* im Reis erreicht werden [41]. Eine Resistenz in der Zitrone gegen *Xanthomonas citri* wurde mit der CRISPR/Cas9-Technologie erzielt [42]. Die Firma Calyxt

entwickelte mit Hilfe der SDN1 (TALEN)-Technik eine gegen Mehltau resistente Weizenlinie [43].

Ein wichtiger Aspekt bei der Züchtung von Nutzpflanzen ist auch die Ertragssteigerung. Über Genomeditierung wurde eine schlagfeste Saat in Raps erzeugt, die bei der Ernte zu weniger Verlusten führt [44]. Über CRISPR/Cas9 konnten in Reis verschiedene ertragassoziierte Gene modifiziert werden. Dadurch konnte die Anzahl der Körner, die Dichte der Rispen und die Korngröße erhöht werden [45].

Mit Hilfe der ZFN-Technik wurde eine Mais-Linie mit modifiziertem Phytinsäure-Stoffwechselweg entwickelt, wodurch die Phosphatbelastung der Böden reduziert werden soll [36]. Auch in der Gerste wurde dieses Züchtungsziel verfolgt, hier jedoch mittels TALEN [46].

Anpassungen an veränderte klimatische Bedingungen oder an teilweise schwierige regionale Klima- und Bodenbedingungen werden in den nächsten Jahren und Jahrzehnten verstärkt an Bedeutung gewinnen. Bei Reis und Baumwolle kann zum Beispiel durch den Austausch eines einzigen Nukleotids eine bessere Stickstoffverwertung [47] oder ein steileres Wurzelwachstum erzeugt werden, was die Wasser- und Nährstoffaufnahme und dadurch auch das Pflanzenwachstum verbessert [48]. Die Versalzung der Böden stellt in vielen Ländern der Welt eine große Herausforderung dar, der man mittels neuer molekularbiologischer Techniken begegnen möchte [49]. Ansatzpunkte hierfür wurden bereits 2016 veröffentlicht [50].

Eine weitere wichtige Rolle in der Pflanzenzüchtung spielen die Veränderungen der nutritiven, haptischen, optischen oder industriell nutzbaren Eigenschaften. In einem Champignon wurde ein knock-out des Enzyms Polyphenoloxidase durchgeführt, was dazu führt, dass der Champignon nicht braun wird [51]. Die Firma Cellectis Plant Sciences arbeitet an zwei mit Hilfe der SDN1 (TALEN)-Technik hergestellten Soja-Linien mit verändertem Fettsäuremuster, bei denen der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren reduziert ist [52]. Die Fruchtreifung von Tomaten konnte mittels CRISPR/Cas9-Technik (SDN-1) verlangsamt werden [53], was die Lagerungsmöglichkeiten verbessert.

Zwischen 2011 und 2016 wurden bereits über 30 genomeditierte Pflanzen in den USA als nicht regulierungsbedürftig eingestuft. Die meisten davon wurden mittels ZFN oder TALEN modifiziert [51]. 2018 wurde erstmals in den USA eine kommerziell angebaute, genomeditierte Pflanze geerntet, eine von der Firma Calyxt modifizierte Sojabohne. Diese wurde an zwei Positionen im Genom modifiziert, um die Produktion von gesättigten Fettsäuren zu reduzieren[1]. In den USA wird diese Pflanze nicht als gentechnisch verändert eingestuft.

Bisher dominieren Pflanzen, die mit Hilfe der SDN1-Technik verändert wurden, da diese Methode die am einfachsten anzuwendende Variante ist und es noch technische Probleme mit der SDN2-Technik (siehe oben) gibt. Im Gegensatz zu den bisherigen gentechnologischen und konventionellen Verfahren, lassen sich Erkenntnisse bei der Verwendung der neuen Techniken an einer Pflanzenspezies meist recht einfach auf andere

[1] https://www.transgen.de/aktuell/2724.usa-genom-editierte-sojabohnen-ohne-gentechnik.html

Spezies übertragen. Dies kann zu schnelleren Ergebnissen im Bereich der Pflanzenforschung führen.

Nach unserem Kenntnisstand findet in der EU derzeit keine kommerzielle Nutzung genomeditierter Nutzpflanzen statt.

3.3 Anwendungen bei Tieren

Auch im Bereich der Züchtung von Nutztieren wird intensiv am Einsatz neuer Genomeditierungsverfahren geforscht. Ziel ist es, Einblicke in die generelle Funktionsweise einzelner Gene zu gewinnen und Tiermodelle für die Forschung und Verbesserungen im Bereich Tiergesundheit/Tierwohl zu entwickeln. Forscher in den USA haben zum Beispiel mit Hilfe der SDN1-Technik (TALEN) Rinder entwickelt, die keine Hörner ausbilden [54, 55]. Damit lässt sich die Verletzungsgefahr unter den Tieren und für den Landwirt verringern. Stress und Schmerzen, die für die Tiere mit der Enthornung verbunden sind, können vermieden werden. Männliche Ferkel werden oftmals kastriert, um zu verhindern, dass das Fleisch später streng riecht oder unangenehm schmeckt („Ebergeruch“). Durch ein knock-out der hierfür verantwortlichen Gene kann dies auch ohne Kastration erreicht werden [56].

Genome Editing-Verfahren zur frühzeitigen Geschlechterbestimmung in Hühnereiern soll das Töten von geschlüpften männlichen Küken verhindern ([57]; **Abbildung 11**). Diese Geschlechtserkennung könnte z. B. über die Produktion des Green Fluorescent Proteins in männlichen Embryonen (in Eiern) erreicht werden.

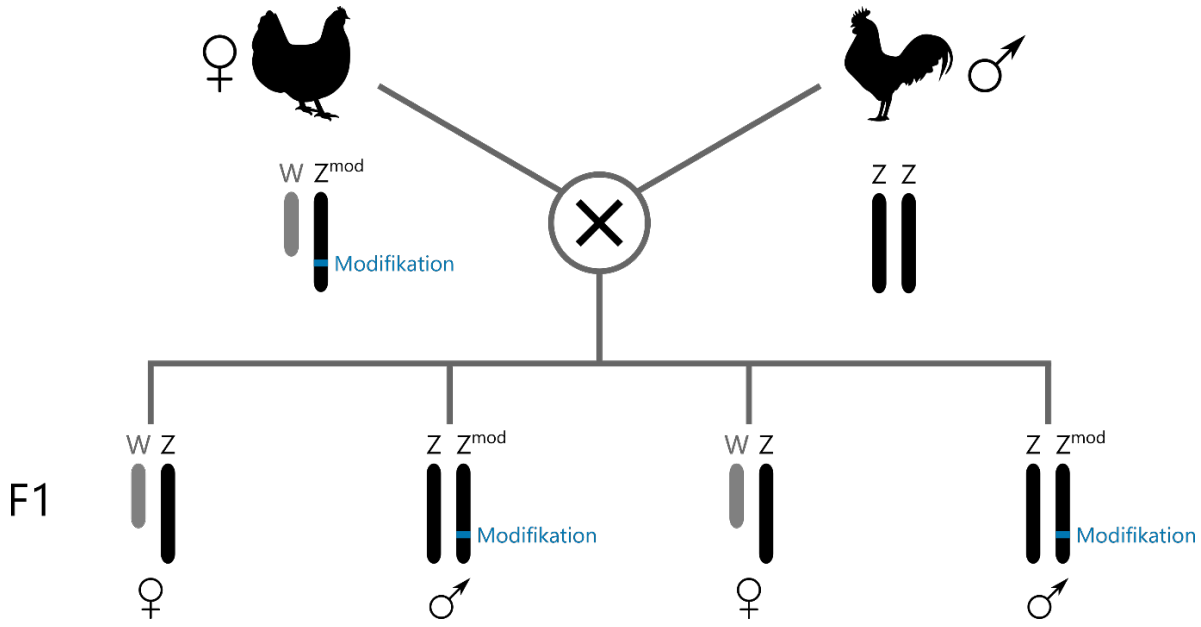


Abbildung 11: Selektion von Weibchen in der Hühnerzucht mittels Genome Editing. Im Chromosom Z der weiblichen Tiere wird mittels Genome Editing ein Genabschnitt zur Produktion eines fluoreszierenden Proteins eingefügt, die damit im klassischen Sinn gentechnisch verändert wurden. Bei der Kreuzung erhalten nur männliche Nachkommen das modifizierte Z-Chromosom und können dadurch bereits im embryonalen Stadium selektiert werden. Dadurch kann eine Tötung nach dem Schlüpfen verhindert werden. Männliche Nachkommen tragen die genetische Modifikation, weibliche Nachkommen nicht, sind also selbst nicht mehr gentechnisch verändert. Die genetische Modifikation (z. B. die Expression des Green Fluorescent Proteins (GFP)) kann im Hühnerembryo im Ei visualisiert werden.

Die Anwendung der SDN-1 Technik (CRISPR/Cas9) führte bei Schweinen und Schafen zu einer erhöhten Muskelfleischbildung [58, 59] und konnte bei Ziegen erfolgreich eingesetzt werden, um eine Unempfänglichkeit gegenüber der Prionenerkrankung zu vermitteln [60]. Mittels CRISPR/Cas9 wurde bei Schweinen eine Unempfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit dem PRRS-Virus (engl.: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus) erzeugt [61, 62]. Das ebenfalls in Schweinen vorkommende PER-Virus (engl.: Porcine Endogeneous Retrovirus) konnte durch den Einsatz von CRISPR/Cas9 [63] inaktiviert werden. Dieses Virus spielt auch im Rahmen der (Xeno-) Organtransplantation eine Rolle, da hier eine Übertragung auf den Menschen möglich ist. Die Züchtung von tierischen Organspendern (z. B. Schweinen) ist ein wichtiger Aspekt im Bereich der medizinischen Forschung, um den Mangel an verfügbaren Spenderorganen auszugleichen. Ziel der Züchtung ist u. a. die Verminderung des Risikos von Abstoßungsreaktionen bei der Xenotransplantation.

Nach unserem Kenntnisstand findet derzeit keine kommerzielle Nutzung genomeditierter Nutztiere in der EU statt.

3.4 Anwendungen beim Menschen

Ein wichtiger Anwendungsbereich für das Genome Editing beim Menschen ist die Grundlagenforschung. Ziele sind dabei die Erforschung von Genfunktionen, die Reparatur von defekten Genen, sowie die Herstellung von Tier- und Zellkultur-Modellen für die Erforschung von Krankheiten [64]. Hieraus ergeben sich Ansatzpunkte für die Gentherapie (mono-) genetischer Erkrankungen. So konnte das CRISPR/Cas9-System genutzt werden, um die korrekte Expression der *dystrophin*-Gene *in vitro* wiederherzustellen. Mutationen führen zur Duchenne Muskeldystrophie. Durch Insertionen und Deletionen mittels Genome Editing konnte der Leserahmen für das Gen korrigiert werden. Nach Transplantation der genomeditierten Zellen in Mäuse konnte dort das humane Dystrophin detektiert werden [65].

Durch Genome Editing (TALEN; CRISPR/Cas9) wurden auch Fortschritte beim Verständnis der Entstehung von Diabetes gemacht [66]. Vor allem bei Typ 1 Diabetes setzen die Wissenschaftler große Hoffnung in die CRISPR-Technologie [67]. Etwas weiter ist man bei der Erforschung von Therapiemöglichkeiten für die cystische Fibrose. In Stammzellen ist es gelungen die Funktionalität des cystic fibrosis transmembrane conductor receptor (CFTR) durch CRISPR/Cas9-basierte Modifikation eines Allels wiederherzustellen [68]. Genomeditierte Stammzellen konnten zu Epithelzellen differenziert werden, die eine normale Expression des CFTR aufwiesen [69].

Auch in der Gentherapie humaner Infektionskrankheiten gibt es durch die Anwendung der neuen molekularbiologischen Genomeditierungstechniken Fortschritte. Vor allem die Bekämpfung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und diverser Tumorerkrankungen spielen dabei eine wichtige Rolle [70]. So konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe von ZFN möglich ist, den zellulären Co-Rezeptor für HIV (i. e. CCR5; **Abbildung 12**) zu zerstören, was eine Resistenz der Zelle gegenüber der HIV-Infektion zur Folge hatte [71]. Mittels CRISPR/Cas9 konnte ein weiterer Co-Rezepter für HIV, CXCR4, in humanen $CD4^+$-Zellen zerstört werden, was im Fall von HIV-1 zu einer Resistenz der Zellen gegenüber einer Infektion führte [72].

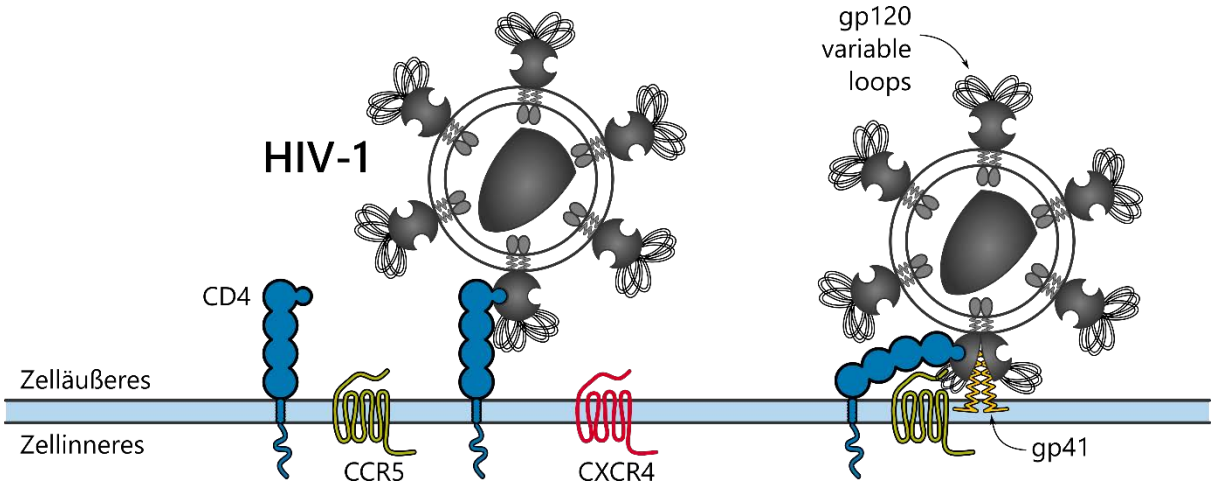


Abbildung 12: Anheftung von HIV an eine CD4+ T-Helferzelle: über das virale gp120 Protein bindet das Virus an einen CD4-Rezeptor. Anschließend erfolgt mit den variablen Loops des gp120 eine Bindung an den CCR5- oder CXCR4-Rezeptor. Dadurch gelangt das Virus zur Zellmembran und dringt über gp41 ein.

Modifikationen der *tat*- und *rev*-Gene des HIV in infizierten T-Zellen konnten zudem die Replikation des Virus verhindern [73]. Andere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass es mit Hilfe von ZFN und CRISPR/Cas9 möglich ist, das HIV-Provirus vollständig aus den infizierten Zellen „herauszuschneiden“, was eine „Heilung“ derselben zur Folge hatte [74, 75].

Im Bereich der Gentherapie von Tumorerkrankungen wird vor allem die CRISPR-Technologie genutzt, um schnell und effizient geeignete Mausmodelle herzustellen [76, 77]. Gentherapieansätze zielen meist darauf ab, Tumor-induzierende Gene (Onkogene) abzuschalten [78], Tumor-unterdrückende Gene (Tumorsupressorgene) anzuschalten [79] oder modifizierte tumorspezifische T-Zellen [80, 81] zu entwickeln.

Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Gentherapie im Allgemeinen bzw. Genomeditierungsansätze im Bereich der Gentherapie im Speziellen noch keine Standardtherapien humaner Erkrankungen darstellen und sich vielmehr im Stadium (prä-) klinischer Forschung befinden.

3.5 Gene Drive

Gene Drive (= Gen-Antrieb) ist eine spezielle Anwendung der SDN-Technik, um die Verbreitung von modifizierten Genabschnitten innerhalb einer Population zu beschleunigen. Die klassischen Mendel’schen Regeln werden hier zum Teil aufgehoben. Normalerweise erhalten Nachkommen je einen Chromosomensatz von einem Elternteil. Jedes Gen liegt damit in zwei Ausführungen vor (= Allele), wobei sich vorteilhafte Allele evolutionär weitervererben. Mit Hilfe des Gene Drive wird die gewünschte Modifikation stets an die nächste Generation weitergegeben.

Dies gelingt dadurch, dass neben der eigentlichen Modifikation (z. B. eine bestimmte Resistenz) auch die Sequenz für das SDN-System selbst in das Genom der Zielzelle integriert wird. Die Zelle produziert nun selber das SDN-System, wodurch auf dem zweiten Chromosom ein Doppelstrangbruch erzeugt wird. Die Modifikation vom ersten Chromosom

wird über den zelleigenen Reparaturmechanismus mittels homologer Rekombination auch in das zweite Chromosom eingebaut. Dadurch sind beide Allele des Gens gleich (enthalten die Modifikation und die Nukleinsäureinformation für das SDN-System) und werden an die Nachkommen weitergegeben. In den Nachkommen kommt es wieder zum Doppelstrangbruch und die Modifikation wird auch hier in das zweite Chromosom eingebaut. Dies setzt sich fort, so dass sich auf diese Weise eine Modifikation entgegen der Mendel'schen Regeln in einer Population rasant ausbreiten kann (**Abbildung 13**). Bei polyploiden Organismen, also Organismen mit mehr als zwei Chromosomensätzen, erfolgt der Einbau des Gene Drive-Systems in alle Chromosomen, d. h. an allen Allelen.

Die für den Gene Drive genutzte DNA enthält durch die Integration der Sequenz für das SDN-Systems immer fremde DNA und ist somit transgen. Derartige Gene Drive-Organismen werden daher weltweit als gentechnisch verändert eingestuft. Ihre Nutzung bedarf somit einer vorherigen Genehmigung. Die gewünschte Modifikation selbst kann sehr klein sein (Punktmutation, kleine Deletion, kleine Insertion) oder mehrere tausend Basenpaare umfassen.

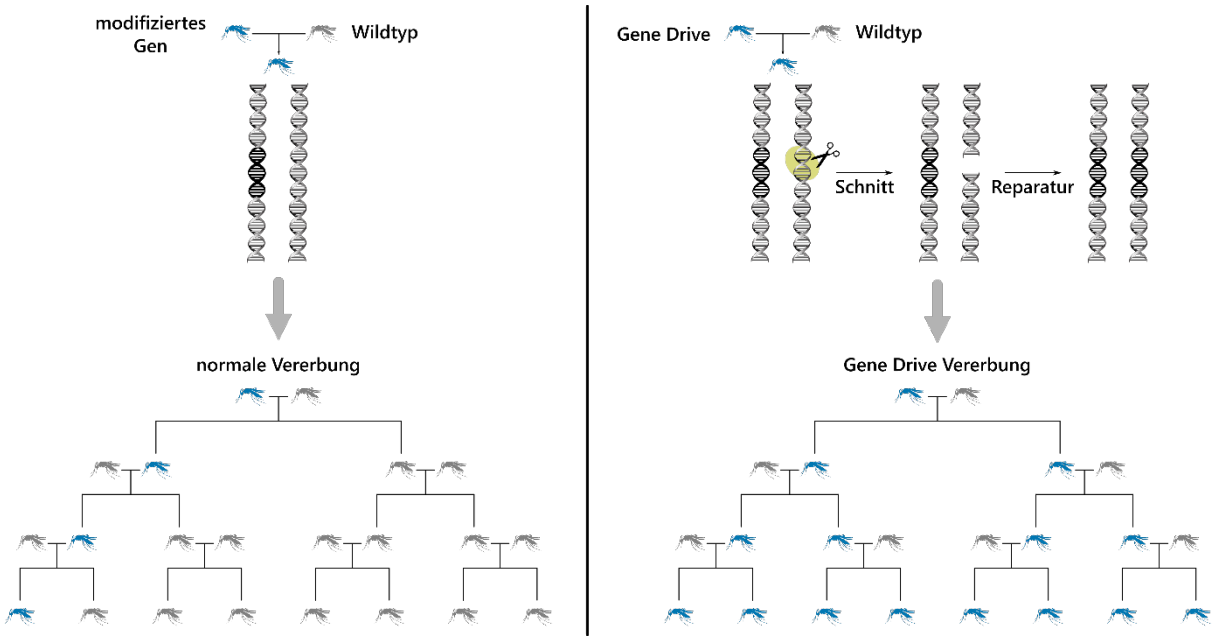


Abbildung 13: Verbreitung einer neuen Eigenschaft durch Verwendung des Gene Drive-Systems. Bei der normalen Vererbung einer Modifikation erfolgt die Weitergabe neuer Eigenschaften auf Basis der Mendel'schen Regeln (linke Abbildung). Beim Gene Drive (rechte Abbildung) werden Individuen durch das Schneiden und die anschließende Reparatur aus einem heterozygoten in einen homozygoten Zustand versetzt, da die Modifikation des ersten Chromosoms als Matrize für die Reparatur verwendet wird. Dadurch wird die neue Eigenschaft stets auch an die nachkommende Generation weitergegeben. Diese wird nun ebenfalls in einen homozygoten Zustand versetzt. Dies setzt sich weiter fort, so dass sich die neue Eigenschaft, losgelöst von den Mendel'schen Regeln, rasant in der Population ausbreitet (basiert auf [82]). Derartige Gene Drive-Organismen werden weltweit als gentechnisch veränderte Organismen eingestuft. Ihre Nutzung bedarf somit einer vorherigen Genehmigung.

Durch die Entwicklung des CRISPR/Cas9-Systems hat auch die Forschung bezüglich möglicher Gene Drive-Anwendungen in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Voraussetzung für die Anwendung des Gene Drive-Systems ist eine sexuelle Vermehrung

des zu modifizierenden Organismus. Bei einigen Pflanzen, Tieren und Bakterien, sowie generell bei Viren ist dies jedoch nicht gegeben. Die derzeitige Hauptanwendung des Gene Drive ist die Bekämpfung von krankheitsübertragenden Insekten, vor allem Mücken. Im besonderen Fokus stehen dabei die Überträger von Dengue (z. B. *Aedes Aegypti*, *Aedes albopictus*) und Malaria (z. B. *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*) [83-85]. Die Bekämpfung erfolgt dabei meist über zwei Herangehensweisen: die Reduktion der entsprechenden Mückenpopulation oder Resistenz/Immunität gegenüber den entsprechenden Erregern durch das Ersetzen von Populationen. Derzeit befinden sich aber alle Anwendungen noch im Forschungsstadium.

Bei *Anopheles*-Mücken wurde ein 17 kb großes DNA-Fragment übertragen, das neben der Sequenz für das Gene Drive-System auch Effektor-Gene enthält, die gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* gerichtet sind und durch die Blutaufnahme des Insekts aktiviert werden [86]. Die generelle Kontrolle der Mückenpopulation kann über die Modifikation von Fertilitätsgenen erreicht werden, die eine Sterilität hervorruft [87]. Daneben gibt es auch Verfahren, bei denen Gene für ein Toxin und ein Antidot übertragen werden. Wird das Gen für das Toxin ins X-Chromosom und das Gen für das Antidot ins Y-Chromosom integriert, produzieren weibliche Tiere das Toxin, jedoch nicht das Antidot. Die meisten männlichen Tiere hingegen produzieren das Toxin und können die Wirkung des Toxins über die Produktion des Antidots regulieren [88]. Dadurch lässt sich die Population der Weibchen reduzieren. Über eine Re-Invasion von nicht veränderten Mücken kann die Population aber wiederhergestellt werden.

2018 wurde Gene Drive erstmals bei Labormäusen eingesetzt. Das CRISPR-System wurde dabei genutzt die Fellfarbe zu verändern [89, 90]. Diese Eigenschaft wird durch den Gene Drive auch an die nächsten Generationen weitergegeben.

Bei Pflanzen finden sich Anwendungen zur Bekämpfung von Schädlingen und zur Unkrautbekämpfung. So könnte durch Gene Drive die Ausbildung von Toleranzen gegenüber Herbiziden reduziert oder ganz verhindert werden, indem die dafür verantwortlichen Gene ausgeschaltet werden. Diese Toleranzen gegenüber Herbiziden basieren oftmals auf dem Vorhandensein mehrerer Kopien dieser Toleranzgene (z. B. *epsps* – führt zur Toleranz gegenüber dem Herbizid Round-Up). Auch die Populationskontrolle ist ein Ansatz der zur Bekämpfung von Unkräutern genutzt werden könnte. Allerdings befinden sich Gene Drive-Anwendungen bei Pflanzen noch in einem sehr frühen Forschungsstadium, so dass mit einer Kommerzialisierung in naher Zukunft nicht zu rechnen ist [83, 91, 92].

3.6 Anwendungen von CRISPR/dCas9 zum Nachweis von Nukleinsäuren

Die CRISPR-Technologie kann nicht nur genutzt werden, um Nukleinsäuren zu modifizieren, sondern auch zu detektieren. Eine Patentschrift[2] aus dem Jahr 2016 beschreibt ein selektives DNA-Anreicherungsverfahren mittels CRISPR. Hierfür wird ein modifiziertes Cas9-Enzym verwendet, das die DNA nicht mehr schneiden kann (dCas9). An dieses dCas9-Enzym ist z. B. ein Biotin gebunden. Wird der CRISPR/dCas9-Komplex über die

[2] Bang, Duhee; Lee, Ji Won; Lim, Hyeon Seob. *Method for target dna enrichment using crispr system*. U.S. Patent Application Nr. 15/053,859, 2016.

entsprechende guide RNA an die vordefinierte Stelle der vorab fragmentierten DNA gelenkt, bindet der Komplex an das DNA-Fragment. Das an dCas9 gebundene Biotin kann nun genutzt werden, um mit Streptavidin verknüpfte magnetische Partikel an die dCas9 zu koppeln. Dieser Komplex aus DNA, CRISRP/dCas9 und magnetischem Partikel kann dann über einen Magneten isoliert und der DNA-Abschnitt anschließend sequenziert werden (**Abbildung 14**).

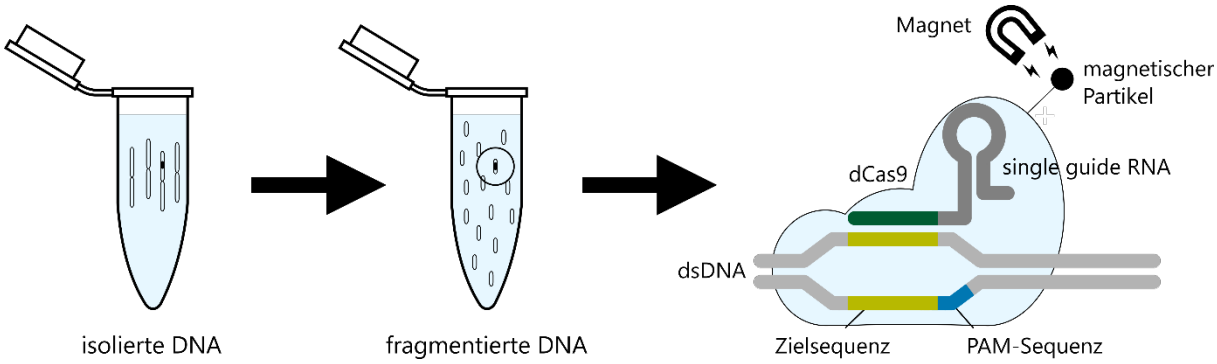


Abbildung 14: spezifische Detektion von Nukleinsäuren mittels CRISPR/dCas9 unter Verwendung magnetischer Partikel

Eine weitere Möglichkeit stellt das CASFISH (Cas-mediated fluorescence *in situ* hybridization; [93]) dar, eine Bezeichnung in Anlehnung an die FISH-Technologie (FISH = fluorescence *in situ* hybridization). Auch bei CASFISH wird ein modifiziertes dCas9-Enzym genutzt, das die DNA nicht mehr schneidet und in diesem Fall mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Über die Fluoreszenz kann dann die entsprechende DNA-Sequenz indirekt detektiert werden. Zudem ist durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe auch die parallele Detektion verschiedener DNA-Abschnitte möglich (Multiplex-Nachweis).

2017 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe des Broad Institute of MIT and Harvard [94] eine Anwendung der CRISPR-Technologie zur Detektion von Nukleinsäuren, die unter dem Namen SHERLOCK (**S**pecific **H**igh Sensitivity **E**nzymatic **R**eporter Un**LOCK**ing; siehe **Abbildung 15**) bekannt wurde. Anstelle des Cas9 wird hierfür ein Cas13a-Enzym genutzt. Der zu detektierende DNA-Abschnitt wird über eine Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) isothermal vervielfältigt. Dabei wird eine T7-RNA-Polymerase eingesetzt, die die doppelsträngige DNA in einzelsträngige RNA umschreibt. Zu dieser umgeschriebenen RNA wird nun der Komplex aus Cas13a und einer sgRNA gegeben. Die sgRNA lenkt das Cas13a-Enzym an die gewünschte Erkennungssequenz. Dadurch wird das Cas13-Enzym aktiviert und schneidet die RNA. Durch die Aktivierung des Cas13-Enzyms erwirbt dieses Enzym auch eine unspezifische RNAse-Aktivität. Deshalb wird nicht nur die gewünschte RNA geschnitten, sondern auch alle in der Nähe befindlichen RNA-Moleküle, unabhängig davon, ob diese die Erkennungssequenz aufweisen oder nicht. Daher gibt man nun zu der RNA und dem Cas13a-sgRNA-Komplex weitere einzelsträngige Reporter-RNA-Moleküle, die am 5‘-Ende mit einem Reporterfarbstoff und am 3‘-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert sind. Wie bei Hydrolysesonden in der qPCR (siehe 5.1) wird der Reporter energetisch

angeregt und gibt bei intaktem Reporter-RNA-Molekül (aufgrund der räumlichen Nähe) die Energie an den Quencherfarbstoff weiter (FRET), der diese Energie in Form von Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge oder als Wärme abgibt. Wurde die Cas13a aktiviert, schneidet das Enzym nun auch die in der Nähe befindlichen Reporter-RNA-Moleküle, wodurch der Reporter-Farbstoff seine räumliche Nähe zum Quencher verliert. Wird der Reporter energetisch angeregt, kann er seine Energie nicht mehr an den Quencher weitergeben und gibt diese stattdessen in Form von Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge ab, die dann gemessen werden kann. Also nur wenn die Cas13a die vordefinierte Erkennungssequenz in der RNA erkennt, wird sie aktiviert und schneidet einzelsträngige RNA und damit auch die Reporter-RNA, wodurch ein Fluoreszenzsignal abgegeben wird, das gemessen werden kann [95, 96].

Diese Technik wurde in der Forschung u. a. dafür genutzt, um pathogene Bakterien zu differenzieren, sowie zur Detektion von zellfreier Tumor-DNA. Außerdem wurde mit dieser Technik Zika- bzw. Denguevirus RNA detektiert [94]. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe lässt sich diese Methode analog zur qPCR als Multiplex-Methode einsetzen, um verschiedene Ziel-Moleküle simultan nachzuweisen. Zudem ist diese Methode durch die isothermale Amplifikation auch portabel einsetzbar und ermöglicht eine einfache und schnelle Detektion in Form von Teststreifen [96].

Den gleichen Mechanismus nutzt auch das DETECTR-System (**D**NA **E**ndonuclease-**T**arg**e**ted **C**RISPR **T**rans **R**eporter; [97]), wobei hier ein Cas12a-Enzym genutzt wird. Dieses erkennt und schneidet allerdings nicht RNA, sondern einzelsträngige DNA (ssDNA).

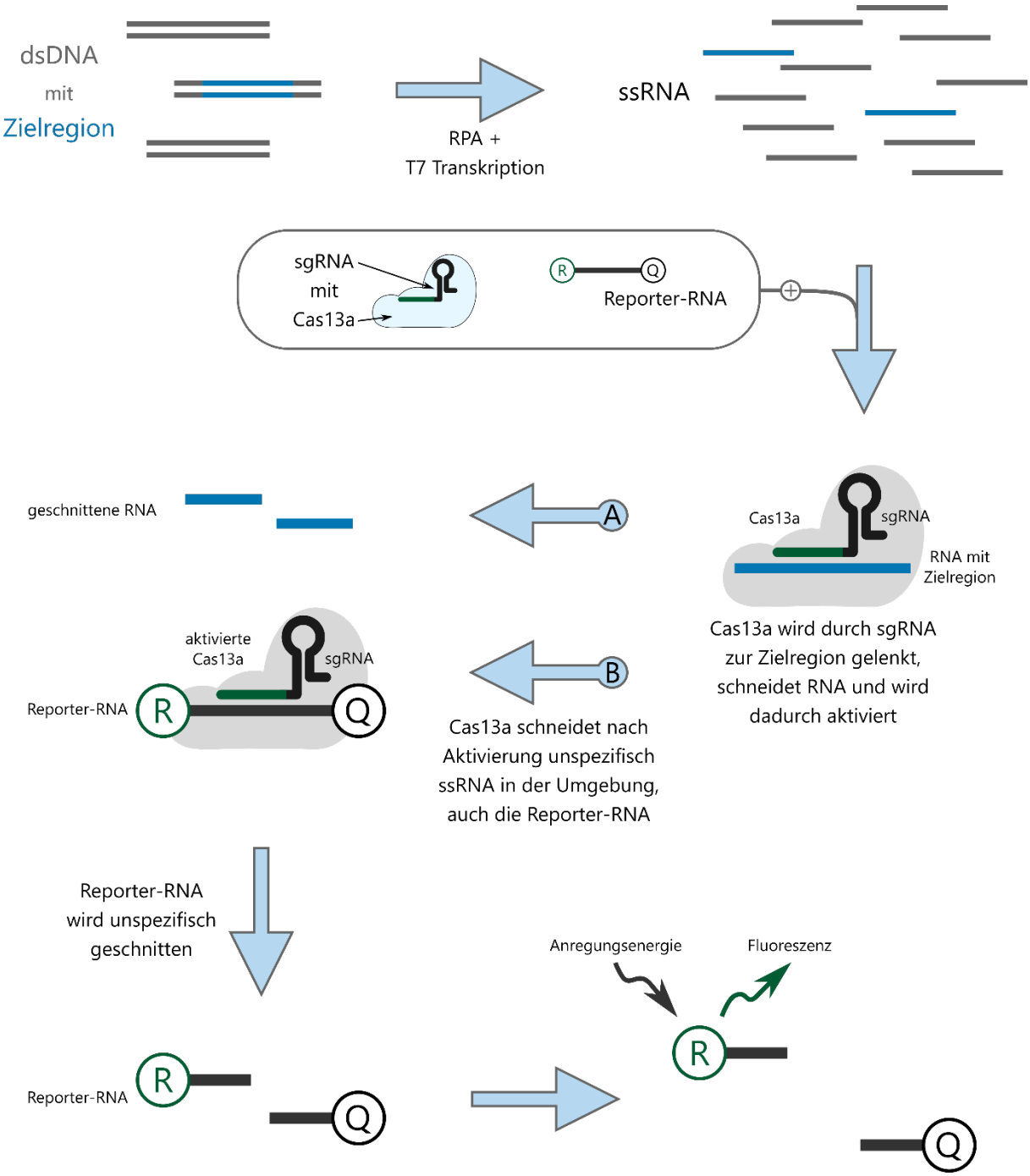


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Nukleinsäurenachweises mittels SHERLOCK: die DNA wird über eine Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) isothermal vervielfältigt und mittels T7-RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben (ssRNA = einzelsträngige RNA). Über die sgRNA wird das Cas13a-Enzym an die entsprechende Erkennungssequenz gelenkt, die RNA geschnitten (A) und das Enzym dadurch aktiviert. Nach der Aktivierung kann das Cas13a auch unspezifisch weitere ssRNA-Moleküle in der Umgebung schneiden. Werden zusätzlich einzelsträngige RNA-Reportermoleküle hinzugegeben, die mit einem Reporter (R) und einem Quencher (Q) markiert sind, so werden diese unspezifisch von Cas13a geschnitten (B). Dadurch verliert der Reporter die räumliche Nähe zum Quencher und bei Anregung des Reporterfarbstoffs kann dieser ungehindert fluoreszieren. Dieses Signal kann dann gemessen werden.

4 Mögliche Risiken des Genome Editing

Seit dem EuGH-Urteil im Jahr 2018 (siehe **6.1**) unterliegen alle mittels Genome Editing erzeugten Organismen in der EU der Gentechnik-Freisetzungsrichtlinie. Ihre Risikobewertung erfolgt auf EU-Ebene im Rahmen von Einzelfallprüfungen unter Zugrundelegung einer prozess- und produktbezogenen Betrachtung und Bewertung. Die Einhaltung des Vorsorgeprinzips soll dabei ein hohes Maß an Sicherheit gewährleisten[3]. Welche Auswirkungen die mit neuen Techniken veränderten Pflanzen auf die Umwelt (z. B. auf Nicht-Zielorganismen oder ganze Ökosysteme) haben, kann über entsprechende Untersuchungen im Labor/Gewächshaus oder in Freilandversuchen ermittelt werden. Dabei müssen auch Aspekte wie das Auskreuzen oder Verbreiten von veränderten Genen auf andere Lebewesen, sowie Resistenzbildungen, oder Verlust an Biodiversität als wichtige Punkte in die Risikobewertung mitaufgenommen werden. Bei über Gene Drive erzeugten Organismen wird diese Bewertung allgemein als sehr wichtig angesehen. Ob eine aufwändige und kostenintensive Sicherheitsbewertung auch für Genome Editing-Organismen notwendig ist, die auch auf natürliche Weise entstehen könnten, wird derzeit kontrovers diskutiert. Außerhalb Europas sind derartige Organismen oftmals nicht reguliert.

Jede angewandte Technik birgt auch gewisse Risiken. Das trifft für die konventionelle Pflanzenzüchtung genauso zu wie für das Genome Editing. Bei der Bewertung von potentiellen Risiken, ist es daher wichtig zu beachten, welche Techniken miteinander verglichen werden. Bei SDN-3 werden Fremd-DNA-Fragmente integriert, wodurch Produkte entstehen, die mit Produkten der klassischen Gentechnik vergleichbar sind. Bei SDN-1 und SDN-2 hingegen werden keine Fremd-DNA-Fragmente in das Genom integriert. Daher bietet es sich an, diese Verfahren mit klassischen Mutageneseverfahren wie der Bestrahlung oder Nutzung mutagener Substanzen oder der klassischen Züchtung zu vergleichen.

4.1 Off-Target-Effekte

Der mit am häufigsten genannte Risikofaktor ist das Auftreten von potentiellen Off-Target-Effekten beim Genome Editing. Off-Target-Effekte sind DNA-Modifikationen, die an einer nicht beabsichtigten Stelle im Genom auftreten. Dies kann passieren, wenn im Genom weitere Regionen existieren, die der Zielregion für die gewünschte Mutagenese sehr ähnlich sind. Allerdings gibt es neben der Zielregion weitere Einflussfaktoren für das Auftreten von Off-Target-Effekten, wie das Vorhandensein von DNA-Methylierungen, Modifikationen von Histonen und die Zugänglichkeit des Chromatins [98, 99]. Neben den Reaktionsbedingungen (z. B. Salzkonzentration, Temperatur und Dauer des Experiments) haben auch die Art und Konzentration der entsprechenden Nuklease einen Einfluss bezüglich des Auftretens von Off-Target-Effekte [100, 101]. Bei CRISPR/Cas9-Anwendungen ist zudem nicht nur die Ähnlichkeit der sgRNA-Sequenz mit der zu modifizierenden Zielregion, sondern auch das Vorhandensein der entsprechenden PAM-Sequenz eine Voraussetzung für das Schneiden der DNA durch die Nuklease [102]. Dies reduziert die Möglichkeiten für Off-Target-Effekte.

[3] Deutscher Bundestag, Drucksache 18/10301 vom 10.11.2016

Bei der Bewertung von Off-Target-Effekten ist auch die Art der Anwendung bei der Bewertung zu berücksichtigen. Besonders kritisch werden Off-Target-Effekte im Bereich der (humanen) Gentherapie betrachtet. Hier besteht das Risiko, dass durch das Einfügen unbeabsichtigter Genomveränderungen (z. B. Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen) in das Genom der behandelten Zellen unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können [103]. Bei klassischen Mutageneseverfahren ist die Zahl unbekannter Veränderungen oftmals um ein Vielfaches höher als bei Genome Editing-Verfahren. In der Pflanzenzüchtung können unerwünschte Mutanten im Selektionsprozess aussortiert werden.

Für die Vorhersage von Off-Target-Effekten gibt es mittlerweile einige molekularbiologische [104, 105] und bioinformatische Ansätze [106-108]. Gerade bei der Nutzung bioinformatischer Tools bleibt allerdings die Frage, in wie weit diese die tatsächlichen Ereignisse korrekt vorhersagen können. Die oben genannten Einflussfaktoren machen Vorhersagen *in silico* deutlich schwieriger, auch wenn mit der fortschreitenden Nutzung und Weiterentwicklung der aktuellen Genome Editing-Methoden diese in ihrer Spezifität stetig optimiert werden [109]. Parallel hierzu werden auch die bioinformatischen Werkzeuge (Tools) immer besser in der Vorhersage möglicher Off-Target-Effekte und führen durch ‚deep learning'-Ansätze auch zu Optimierungen beim Design spezifischer sgRNAs [110]. Vermehrt werden auch Web-Tools zum Design von CRISPR-Experimenten und zur Auswertung von NGS-Analysen nach der CRISPR-Anwendung veröffentlicht [111]. Dies könnte dazu beitragen, Off-Target-Effekte weiter zu reduzieren und das Design von CRISPR-Experimenten zu erleichtern.

2014 haben Zhang *et al.* [112] im Rahmen von CRISPR/Cas9-Experimenten in Reis auch Off-Target-Analysen durchgeführt. Verschiedene sgRNA-Zielsequenzen wurden darauf untersucht, ob weitere Bindungsmöglichkeiten (und damit mögliche Modifikationsstellen) im Reisgenom vorhanden sind. Lediglich bei einer der verwendeten sgRNAs konnten in 7 von 72 sequenzierten Pflanzen tatsächlich auch Off-Target-Mutationen detektiert werden. Peterson *et al.* [113] identifizierten bei CRISPR/Cas9-Experimenten in *Arabidopsis thaliana* 178 mögliche Off-Target-Stellen, konnten jedoch keine Insertionen oder Deletion (InDels) an diesen Genorten detektieren. Vor allem ein gutes sgRNA-Design sorgt bei der Verwendung von CRISPR/Cas9 dafür, dass keine oder nur geringe Off-Target-Effekte auftreten.

Wenn man Modifikationen mittels Genome Editing betrachtet, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass auch natürlicherweise Mutationen auftreten, z. B. durch UV-Strahlung oder Fehler bei der DNA-Replikation. (siehe **Tabelle 2**)

Tabelle 2: natürliche Mutationsraten verschiedener Organismen

Organismus	Bezeichnung	Mutationsrate (Mutationen pro Nukleotid pro Generation)	neue Mutationen (pro Generation)	Literatur
Homo sapiens	Mensch	ca. 1×10^{-8} bis 3×10^{-8}	ca. 30-90	[114, 115]
Arabidopsis thaliana	Ackerschmalwand	ca. 2×10^{-9} bis 7×10^{-9}	ca. 0,3-1	[116, 117]
Escherichia coli		ca. $2{,}2\times10^{-10}$ bis $8{,}9\times10^{-11}$	ca. 0,0004-0,001	[118, 119]
Mus musculus	Maus	ca. $3{,}75\times10^{-9}$ bis 7×10^{-9}	ca. 13-24	[115, 120]
Zea mays	Mais	ca. $2{,}9\times10^{-8}$ bis $3{,}3\times10^{-8}$	ca. 60-70	[121]

Die natürliche Mutationsrate wird bei der Mutagenesezüchtung durch Nutzung chemischer Substanzen (EMS = Ethylmethansulfonat; MNU = Methylnitrosoharnstoff; Diepoxybutan) oder Strahlung (γ-Strahlen; schneller Neutronenbeschuss) künstlich erhöht und wurde bereits bei diversen Pflanzenspezies angewandt [122]. Beim sogenannten **TILLING** (**T**argeted **I**nduced **L**ocal **L**esions In Genoms) wird vor allem die chemische Mutagenese mit molekularbiologischen DNA-Screening-Methoden kombiniert, um die gewünschten Mutationen auf genetischer Ebene zu detektieren. Durch Rückkreuzung wird dann versucht, alle unerwünschten Mutationen wieder zu entfernen, bei gleichzeitigem Erhalt der gewünschten Mutation. Es bleiben jedoch stets auch unerwünschte Mutationen im Anschluss an die Rückkreuzung zurück. Produkte aus klassischen Mutageneseverfahren sind vom Gentechnikrecht ausgenommen.

4.2 Risiken des Gene Drive

Die Nutzung des Gene Drives unterscheidet sich von der generellen Nutzung der Genome Editing-Techniken. Ziel des Gene Drives ist nicht nur die Veränderung eines bestimmten Merkmals eines Organismus, sondern auch die beschleunigte Verbreitung dieser Veränderung innerhalb einer Population. Ziele können das Einfügen bzw. Entfernen von bestimmten Eigenschaften, aber auch die Entfernung einer ganzen Population sein. Die Definition und Bewertung von möglichen Risiken durch die Nutzung des Gene Drives ist durch direkte und indirekte Einflüsse auf das Ökosystem deutlich komplexer.

So besteht die Möglichkeit, dass sich die genetische Modifikation auch auf Wildpopulationen überträgt und dort verbreitet. Mitunter soll dies ja gerade Ziel der Anwendung eines Gene Drive sein. Durch die beschleunigte Verbreitung innerhalb einer Population besteht beim Gene Drive eine besondere Brisanz.

Wie effektiv der Gene Drive abläuft und wie stark die möglichen Auswirkungen ausfallen, hängt dabei von vielen Faktoren ab. Einer dieser wichtigen Faktoren ist die evolutionäre Fitness des Organismus, die bereits durch kleine genetische Änderungen beeinflusst werden kann. Evolutionäre Fitness ist die Anzahl der Nachkommen, die ein Individuum zur nächsten Generation beiträgt [123]. Sie ermöglicht die Vorhersage der Verbreitung des Gene Drive innerhalb einer Population. Vor allem die Art und der Ort der genetischen Modifikation, sowie die genetische Ausstattung des Organismus bestimmen die Intensität des Einflusses auf die Fitness, auch bedingt durch Interaktionen (epistatische Effekte) zwischen der Mutation und anderen Genorten im Organismus [124]. Eine reduzierte Fitness oder gar die Entfernung einer ganzen Population hat potentiell auch Konsequenzen für viele andere Spezies. So sind z. B. Mücken als Beutetiere ein wichtiger Bestandteil des Beute-Räuber-Modells und die Vernichtung einer Mückenpopulation könnte einer anderen Spezies die Nahrungsgrundlage entziehen. Auch könnte dies dazu führen, dass die freiwerdende ökologische Nische durch andere Spezies besetzt wird, was wiederum Einfluss auf das Ökosystem hat.

Ebenfalls ungeklärt sind die folgenden Fragen:

- Welche Effekte haben Gene Drive-Organismen, wenn sie durch Tiere oder den Menschen als Nahrung aufgenommen werden?
- Können Off-Target-Effekte zu unerwünschten Phänotypen führen?
- Welche pleiotropen Effekte[4] können auftreten?
- Wie kann ein Gene Drive gesteuert oder sogar wieder rückgängig gemacht werden?

Um diese Fragen hinreichend beantworten zu können, ist noch viel Forschungsarbeit zu leisten [125]. Hierbei ist vor allem ein Aspekt von besonderer Bedeutung: die Wissenschaft muss dafür Sorge tragen, dass die Forschungsarbeiten sicher durchgeführt werden, um negative Auswirkungen auf Mensch, Tier und Umwelt zu vermeiden. So wurde vorgeschlagen, dass Forschung an Gene Drive publik gemacht und sowohl das Konzept als auch die angedachte Anwendung vor dem Start der Forschungsarbeit veröffentlicht werden sollten [126].

5 Nachweis und Identifizierung von Modifikationen

Beim Nachweis bzw. der Identifizierung von genomeditierten Organismen sind die folgenden Fragen von besonderer Bedeutung:

- Wie lassen sich Genome Editing-Modifikationen nachweisen?
- Kann ein Organismus, der mit Genome Editing modifiziert wurde, eindeutig identifiziert werden?
- Kann eine Genome Editing-Modifikation von einer natürlichen Mutation oder einer Modifikation mittels klassischer Mutagenese unterschieden werden?

Grundsätzlich lassen sich DNA-basierte und Protein-basierte Nachweismethoden unterscheiden. Bei Analysen auf DNA-Ebene spielt es eine wichtige Rolle, ob Sequenzinformationen bezüglich der vorgenommenen Modifikation und entsprechende Referenzsequenzen der Spezies vorliegen.

5.1 Real-time PCR

Die real-time PCR (qPCR; [127]) ist der derzeitige Goldstandard zur Detektion von gentechnisch veränderten Organismen (GVO). Dabei wird ein vorher definierter DNA-Abschnitt enzymatisch vervielfältigt. Welcher Abschnitt vervielfältigt wird, wird durch die Zugabe von kurzen Oligonukleotiden (Primer) bestimmt, die als Startstelle für die Verlängerung des komplementären DNA-Strangs durch das Enzym DNA-Polymerase dienen. Die eigentliche Detektion der Vervielfältigung kann auf verschiedene Weisen erfolgen, wobei sich zwei Verfahren in der Analytik durchgesetzt haben: der Einsatz von interkalierenden Farbstoffen (**Abbildung 16A**) und die Verwendung von Hydrolyse-Sonden (**Abbildung 16B**).

[4] pleiotroper Effekt: ein Gen beeinflusst zwei oder mehrere voneinander unabhängige Merkmale

Interkalierende Farbstoffe lagern sich in doppelsträngige DNA (dsDNA) ein. Werden sie dann energetisch (z. B. durch einen Laser) angeregt, nehmen sie diese Energie auf und geben sie in Form von Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge ab. Je mehr DNA anfangs vorhanden ist, desto schneller nimmt die DNA-Menge in der qPCR zu und desto mehr Farbstoff kann sich in die dsDNA einlagern. Dies führt zu einer Zunahme der Fluoreszenzstärke. Die DNA-Menge und die Fluoreszenzstärke sind demnach proportional zueinander.

Eine Hydrolyse-Sonde ist ein Oligonukleotid, das zusätzlich zu den Primern bei der PCR hinzugefügt wird. Diese Sonde bindet auf einem der beiden DNA-Stränge zwischen den Primern und ist mit zwei Farbstoffen markiert, einem Reporter und einem Quencher. Der Reporter nimmt Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge auf und würde diese in Form von Fluoreszenz einer anderen Wellenlänge wieder abgeben. Durch die räumliche Nähe des Quenchers wird die vom Reporter abgegebene Energie vom Quencher aufgenommen. Der Quencher gibt die Energie dann in Form von Fluoreszenz (einer anderen Wellenlänge als der Reporter) oder in Form von Wärme (dark quencher) ab. Das Fluoreszenzsignal des Reporters wird somit vom Quencher unterdrückt oder ausgelöscht (engl. to quench = löschen). Wird der DNA-Strang während der qPCR ausgehend vom Primer durch die DNA-Polymerase verlängert, wird die Sonde durch die Polymerase abgelöst (= strand displacement) und abgebaut. Dadurch verliert der Reporter die räumliche Nähe zum Quencher, so dass kein Energietransfer (FRET) mehr stattfinden kann.

Dies führt dazu, dass der Reporter die aufgenommene Energie als Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge abgibt, die nun gemessen werden kann. Je mehr DNA vervielfältigt wird, desto mehr Sonden werden im Laufe der PCR zerstört, was zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals führt. Zudem bietet die Verwendung von Hydrolyse-Sonden den Vorteil, dass nur dann eine Sonde abgebaut wird (und dadurch das Fluoreszenzsignal steigt), wenn der vorher durch die Primer definierte DNA-Abschnitt vervielfältigt wird.

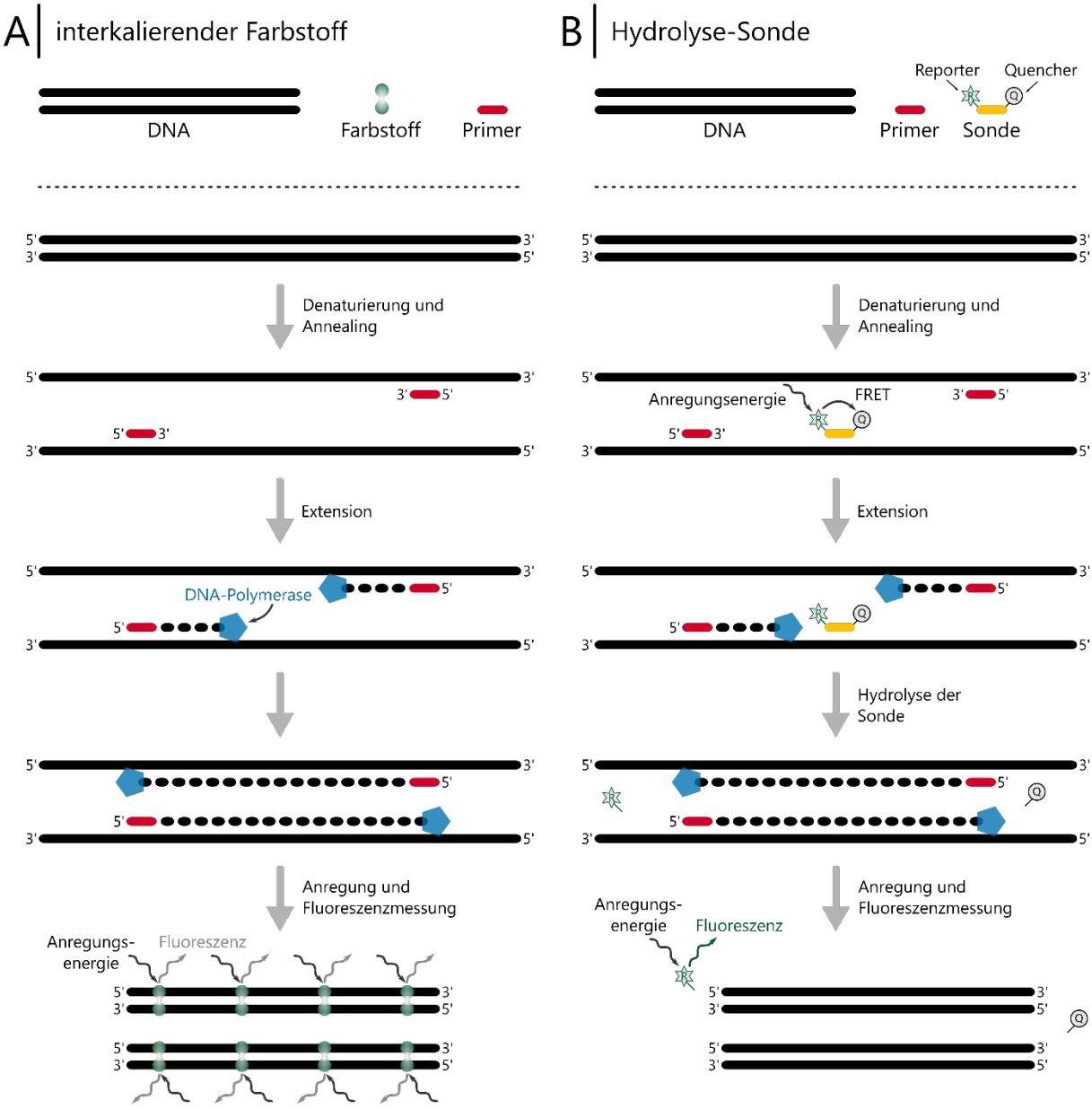


Abbildung 16: Zwei Varianten der quantitativen real-time PCR (qPCR). A) qPCR unter Verwendung eines interkalierenden Farbstoffs. Interkalierende Farbstoffe (z. B. SYBR Green) lagern sich in doppelsträngige DNA (dsDNA) ein und geben nach Anregung Energie in Form von Fluoreszenz ab. Je mehr dsDNA vorhanden ist, desto höher wird das gemessene Fluoreszenzsignal. B) qPCR unter Verwendung einer Hydrolyse-Sonde. Die Hydrolyse-Sonde bindet zwischen den spezifischen Primern und ist mit einem Reporter-Farbstoff (R) und einem Quencher-Farbstoff (Q) markiert. Bei Anregung des Reporter-Farbstoffs erfolgt aufgrund der räumlichen Nähe ein Energietransfer auf den Quencher, der die Energie meist in Wärme abgibt. Während der PCR verlängert die DNA-Polymerase den zweiten DNA-Strang ausgehend vom Primer und baut dabei die Hydrolyse-Sonde ab (5‘-3‘-Exonukleasefunktionalität). Dadurch verlieren Reporter und Quencher ihre räumliche Nähe, so dass der Reporter bei Anregung die Energie in Form von Fluoreszenz abgibt. Diese kann gemessen werden und ist proportional zur Menge an vervielfältigter DNA.

Bei der ‚klassischen‘ Gentechnik wird eine fremde DNA an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle des Genoms integriert. Die stabile Integration wird als Event bezeichnet. Da die Integrationsstelle für jedes Event spezifisch ist, dient sie als Ansatzpunkt für eine

eindeutige Detektion und Identifikation des Events mittels qPCR. Dabei wird ein vom Wirtsgenom in den inserierten DNA-Bereich reichender Abschnitt vervielfältigt (= Event-spezifischer Nachweis; **Abbildung 17**), der die Integrationsstelle beinhaltet.

Abbildung 17: Event-spezifischer Nachweis zur Identifizierung eines gentechnisch veränderten Organismus. Die komplementären Sequenzen der PCR-Primer liegen im Pflanzengenom und in der inserierten DNA, wodurch ein PCR-Produkt erzeugt wird, das vom Wirtsgenom in das inserierte DNA-Fragment reicht. Dieser Übergangsbereich ist spezifisch für ein jedes Event.

Bei genomeditierten Organismen sind jedoch nur bei bestimmten Anwendungen der SDN-3-Technik fremde DNA-Fragmente im Wirtsgenom vorhanden, die dann mittels qPCR detektiert werden können. Meist werden Einzelbasenaustausche, Deletionen oder Insertionen einzelner Basen vorgenommen. In diesen Fällen ist eine Detektion mittels qPCR wesentlich schwieriger, da die Spezifität der qPCR für die Detektion von Punktmutationen oftmals nicht ausreicht. Daher finden hier spezielle qPCR-Techniken Anwendung. Eine Möglichkeit stellt das High Resolution Melting (HRM) dar, welches im Anschluss nach einer qPCR durchgeführt wird. In der qPCR vervielfältigte DNA-Fragmente haben aufgrund ihrer Länge und ihres GC-Gehalts eine bestimmte Schmelztemperatur. Wird in der qPCR ein interkalierender Farbstoff verwendet, kann im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dabei wird die Temperatur ausgehend von etwa 60 °C (hier liegen die vervielfältigten DNA-Fragmente als Doppelstrang vor) kontinuierlich und sehr langsam auf 99 °C erhöht und ebenfalls kontinuierlich das Fluoreszenzsignal gemessen. Nähert sich die Temperatur der Schmelztemperatur des DNA-Fragments an, beginnen sich die Doppelstränge zu trennen, wodurch sich der interkalierende Farbstoff von der DNA löst. Dadurch kommt es zu einem Abfall der Fluoreszenz (siehe **Abbildung 18**). Erfolgte durch die Genomeditierung ein Austausch von einem A bzw. T in ein G bzw. C oder hat eine Insertion/Deletion stattgefunden, ändert sich auch die Schmelztemperatur des gebildeten DNA-Fragments minimal. Dieser Unterschied kann durch HRM detektiert werden [128]. Durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung kann die Genomeditierung final bestätigt werden.

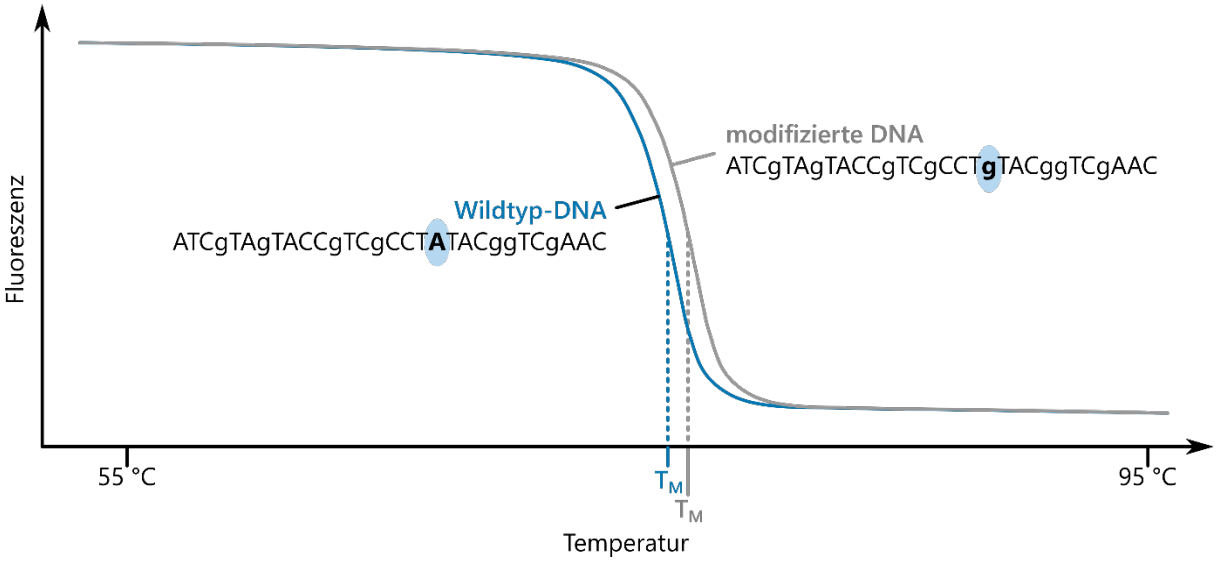


Abbildung 18: High Resolution Melting (HRM) zur Detektion einer Mutation. Ein Austausch von Basen, Insertionen oder Deletionen führen oft zu Veränderungen der spezifischen Schmelztemperatur. Diese Änderungen können über ein HRM detektiert werden. Die Art der Veränderung lässt sich so aber nicht direkt identifizieren.

Eine weitere qPCR-basierte Möglichkeit ist die Verwendung von Locked Nucleic Acids (LNAs). LNAs sind analog zu konventionellen Nukleotiden, besitzen jedoch eine 2‘-O, 4’-C Methylenbrücke. Dies erhöht die thermische Stabilität der Basenpaarung, so dass die Schmelztemperatur kurzer Primer bzw. Sonden erhöht werden kann. Wird in der qPCR eine Sonde eingesetzt, die an der Position der Genomeditierung eine LNA-Base trägt, kommt es beim Vorhandensein der Genomeditierung zu einer stabilen Bindung der Sonde und damit zu einem Fluoreszenzsignal im Laufe der PCR. Fehlt diese Genomeditierung, führt der Unterschied in dieser einen Base zu einer deutlichen Erniedrigung der Schmelztemperatur [129] und zu einem Ausfall bzw. einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals.

Diese qPCR-basierten Methoden haben einen Aspekt gemeinsam: im Anschluss an die qPCR muss eine Sequenzierung durchgeführt werden, um eine explizite Aussage über die vorgenommene Genomeditierung treffen zu können. Welche Methode zur Erzeugung der Veränderung genutzt wurde, kann auf diesem Wege allerdings nicht festgestellt werden.

In den meisten Fällen werden weder die guide RNA, noch die kodierende DNA für das Cas9-System im finalen Produkt vorhanden sein. In Fällen wo dies jedoch der Fall ist, könnte die qPCR auch genutzt werden, um diese Fremd-DNA nachzuweisen, die natürlicherweise nicht vorhanden ist. Eine Einsatzmöglichkeit wäre z. B. die Detektion von modifizierten Organismen, deren neue Eigenschaften mittels Gene Drive an die Nachkommen weitergegeben werden sollen. Bei diesen Organismen ist die DNA, die für die guide RNA und das Cas9-Enzym kodiert, ins Genom integriert.

5.2 RNase H-abhängige real-time PCR

Die RNase H-abhängige qPCR ermöglicht die Detektion von Einzelbasenaustauschen. Bei dieser Methode werden zwei spezifische Forward Primer verwendet die jeweils drei Kriterien aufweisen (siehe Abbildung 19A):

- Am 3‘-Ende sind die Primer geblockt, was verhindert, dass die Primer durch die Polymerase verlängert werden. Dies verhindert unspezifische PCR-Produkte.
- Vor der Blockierung am 3‘-Ende ist eine RNA-Base eingebaut.
- Die beiden Forward Primer weisen an der Position der Einzelbasenmodifikation jeweils unterschiedliche Basen auf (z. B. Forward Primer 1 ein T, Forward Primer 2 ein C).
- Am 5‘-Ende ist ein Abschnitt vorhanden, der als Bindestelle für die Hydrolyse-Sonde und für den universalen Forward Primer dient.

Zudem werden ein Reverse Primer, der ebenfalls am 3‘-Ende geblockt ist und eine RNA-Base besitzt, und ein universaler Forward Primer verwendet. Abhängig davon, welche Base in der Ziel-DNA vorhanden ist, binden in der PCR der Reverse Primer und einer der beiden Forward Primer (**Abbildung 19A**). Die im Reaktionsansatz befindliche RNase H erkennt den RNA-DNA-Mismatch an der Position der RNA-Base im Primer und schneidet den Forward und Reverse Primer an dieser Position, wodurch auch die Blockierung am 3‘-Ende entfernt wird. Nun kann die DNA-Polymerase ausgehend vom 3‘-Ende der beiden Primer den zweiten Strang vervollständigen (**Abbildung 19B**). Dadurch wird auch die Bindestelle für den universalen Forward Primer und die Hydrolyse-Sonde an die DNA-Stränge angehängt. An diese Bindestelle binden nun der universale Forward Primer und die Hydrolyse-Sonde (**Abbildung 19C**). Ausgehend von diesem Primer und dem Reverse Primer wird wieder jeweils der komplementäre Strang vervollständigt. Stößt die DNA-Polymerase nun an die Hydrolyse-Sonde, wird diese durch die 5‘-3‘-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase vom Strang abgelöst und abgebaut. Reporter- und Quencher-Farbstoff verlieren ihre räumliche Nähe und der Reporter kann bei Anregung die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge abgeben (**Abbildung 19D**). Diese abgegebene Fluoreszenz kann dann gemessen werden. Das generelle Funktionsprinzip der Hydrolyse-Sonde ist auch unter 5.1 beschrieben. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur zwei Hydrolyse-Sonden benötigt werden (eine für die Bindestelle von Forward Primer 1 und eine für die Bindestelle von Forward Primer 2). Diese sind für alle Assays identisch. Lediglich der spezifische Teil (der die Einzelbasenmodifikation beinhaltet) der beiden spezifischen Forward Primer muss an den jeweiligen Assay angepasst werden. Dies spart Kosten, da die Hydrolyse-Sonden meist die teuersten Komponenten neben dem PCR Master Mix sind.

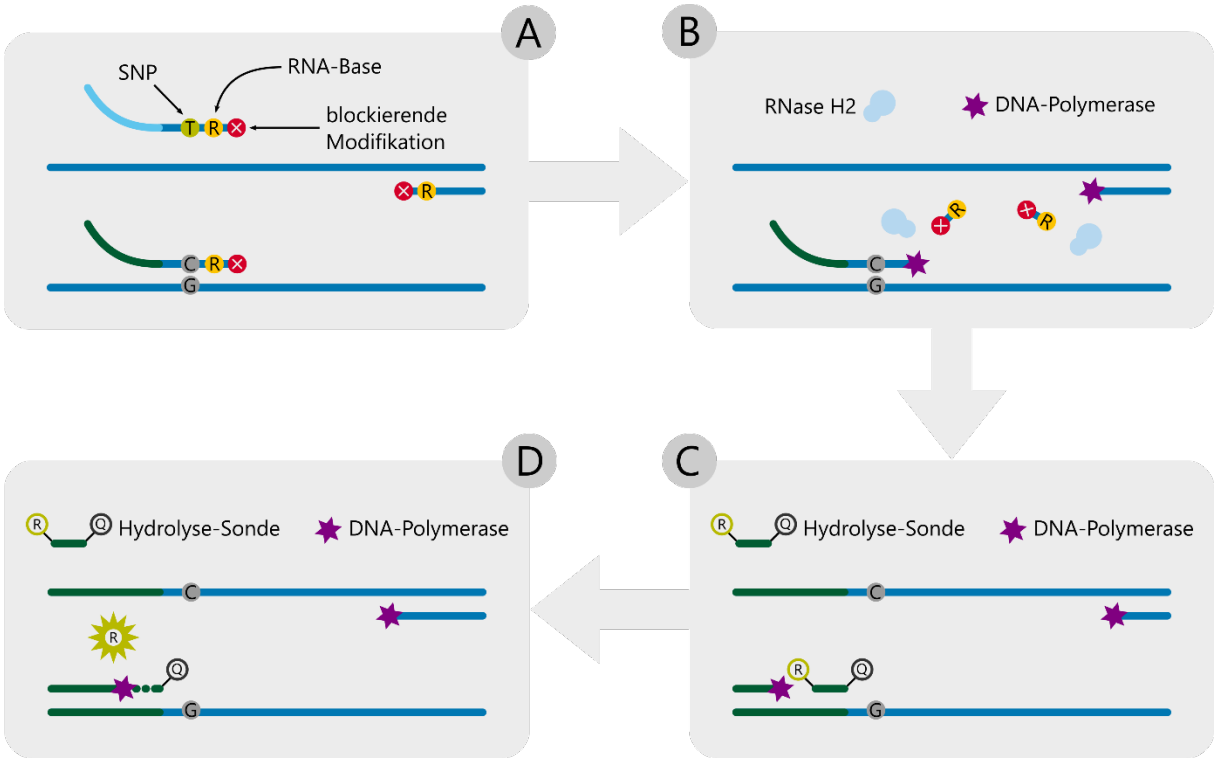


Abbildung 19: Schematische Darstellung einer RNase H2-abhängigen real-time PCR: A) abhängig von der in der Ziel-DNA vorhandenen Base (hier G oder A; Einzelbasenmodifikation = SNP) bindet einer der beiden spezifischen Forward Primer. Außerdem bindet ein Reverse Primer an die DNA. Die Primer sind am 3'-Ende blockiert und besitzen eine einzelne RNA-Base. Die beiden Forward Primer weisen am 5'-Ende zudem eine Bindestelle für den universellen Forward Primer und die Hydrolyse-Sonde. B) Das Enzym RNase H2 erkennt den RNA-DNA-Mismatch zwischen gebundenem Primer und Ziel-DNA und schneidet an dieser Position den Primer, wodurch auch die Blockierung entfernt wird. Die Polymerase vervollständigt jeweils den komplementären Strang, wodurch auch die Bindestelle des Forward Primers im PCR-Produkt vorhanden ist. C) An diese Bindestelle binden der universelle Forward Primer und die Hydrolyse-Sonde. D) Wird ausgehend vom universellen Primer der zweite Strang vervollständigt, wird die sich im Weg befindliche Hydrolyse-Sonde abgebaut und Reporter- und Quencher-Farbstoff räumlich voneinander getrennt. Der Reporter kann nun die Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge abgeben, die als Fluoreszenzsignal gemessen werden kann.

5.3 Digitale PCR (dPCR)

Eine sehr vielversprechende Methode zur Detektion von einzelnen Modifikationen ist die digitale PCR (dPCR). Die dPCR basiert auf dem Prinzip der qPCR und kann (abhängig vom genutzten Gerät) mit interkalierenden Farbstoffen oder Hydrolysesonden durchgeführt werden. Der hergestellte Reaktionsmix, bestehend aus der DNA-Probe und den PCR-Komponenten wird bei der dPCR auf sehr viele kleine Kompartimente aufgeteilt. Hier gibt es derzeit zwei Verfahren. Bei der digital chamber PCR (dcPCR) wird ein Chip mit festen Kompartimenten verwendet, auf die der Reaktionsmix aufgeteilt wird. Bei der digitalen droplet PCR (ddPCR) werden über Wasser-Öl-Emulsionen Tröpfchen erzeugt, in die der Reaktionsmix verteilt wird. Anschließend wird eine konventionelle Endpunkt-PCR durchgeführt, die in jedem Kompartiment separat abläuft. Anschließend wird die Fluoreszenz in jedem einzelnen Kompartiment gemessen. Befindet sich das gesuchte DNA-Fragment in einem Kompartiment, wird es in der PCR vervielfältigt und das Kompartiment leuchtet. Ist das gesuchte DNA-Fragment in einem Kompartiment nicht vorhanden, läuft auch keine PCR

ab und das Kompartiment leuchtet nicht. Durch diese 0-1-Antwort erhielt die Methode die Bezeichnung „digitale PCR“ (**Abbildung 20**). Über das Verhältnis von positiven zu negativen Kompartimenten kann – unter Berücksichtigung des Reaktionsvolumens des Kompartiments und der Verdünnung der Probe – auf die anfängliche DNA-Kopienzahl der Probe zurückgerechnet werden. Da in Kompartimenten auch mehr als eine Ausgangskopie der Ziel-DNA vorhanden sein kann, muss dies berücksichtigt werden. Dies erfolgt über die Nutzung der Poisson-Korrektur.

Werden zwei Hydrolysesonden in der dPCR verwendet, wobei eine die Mutation detektiert, die zweite den Wildtyp (unmodifiziert), so ist auf diesem Wege eine Detektion selbst kleiner Nukleotidunterschiede in der DNA möglich [130]. Allerdings ist auch hier eine vorherige Kenntnis über die eingebrachte DNA-Modifikation notwendig. Im Gegensatz zur qPCR werden die DNA-Moleküle auf unterschiedliche Kompartimente verteilt, in denen die PCR getrennt abläuft. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation in einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA detektiert werden kann. Daher könnte die dPCR im Hinblick auf die Detektion von einzelnen oder wenigen Basenaustauschen besser geeignet sein, als die klassische qPCR.

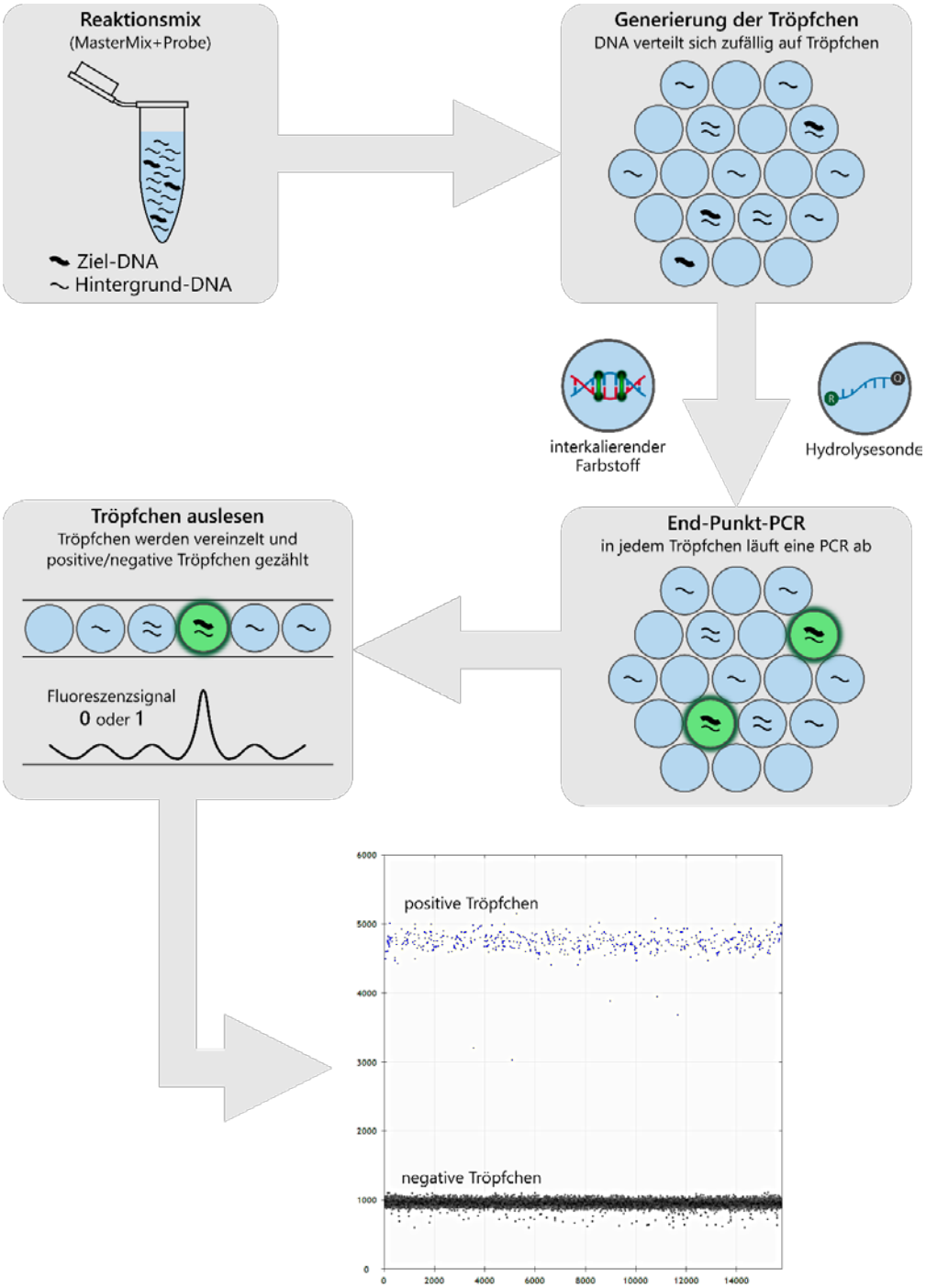


Abbildung 20: Schematischer Ablauf einer ddPCR-Analyse. Der Reaktionsmix mit der Probe wird auf bis zu 20.000 Tröpfchen einer Wasser-Öl-Emulsion aufgeteilt. Die DNA verteilt sich dabei zufällig auf die Tröpfchen. Diese Tröpfchen durchlaufen eine Endpunkt-PCR, werden nach der PCR vereinzelt und die Anzahl und Fluoreszenz jedes Tröpfchens gemessen. Durch die Verwendung von interkalierenden Farbstoffen bzw. Hydrolysesonden leuchten Tröpfchen, in denen das gesuchte DNA-Fragment vervielfältigt wurde. Über das Verhältnis von positiven Tröpfchen zur Gesamtzahl der Tröpfchen kann unter Verwendung der Poisson-Korrektur auf die anfängliche DNA-Konzentration zurückgerechnet werden.

5.4 T7 Assay

Eine Möglichkeit zur Detektion von Einzelbasenmodifikationen ist die Verwendung einer T7 Endonuklease I in Kombination mit der Kapillarelektrophorese (bzw. Gelelektrophorese). Hierbei ist es jedoch wichtig zu wissen, in welchem Genabschnitt sich die Modifikation befindet. Dieser Genabschnitt wird mittels PCR vorab vervielfältigt, wobei einige PCR-Produkte auch die unmodifizierte Base enthalten. Anschließend werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen getrennt und durch langsames Abkühlen wieder miteinander verbunden. Dabei entstehen auch Heteroduplex-DNAs. Diese enthalten auf einem DNA-Strang die Modifikation, auf dem anderen Strang die nicht-modifizierte Base. Dieser Unterschied wird von der T7 Endonuklease I erkannt und die DNA an dieser Stelle geschnitten. Es entstehen folglich zwei Fragmente. Ist nur die Wildtyp-DNA vorhanden, erfolgt kein Schnitt und es bleibt bei einem spezifischen DNA-Fragment. Die Anzahl der Fragmente und deren Größe kann dann mittels Gelelektrophorese, besser jedoch über Kapillarelektrophorese bestimmt werden (siehe **Abbildung 21**). Die Methode, die zur Modifikation der DNA genutzt wurde, kann auch hier nicht bestimmt werden. Ist keine Information zur Modifikation vorhanden, ist diese Methode ungeeignet, um Genome Editing-Anwendungen zu detektieren. Auch ist die Sensitivität dieser Methode deutlich schlechter als bei real-time PCR-basierten Methoden.

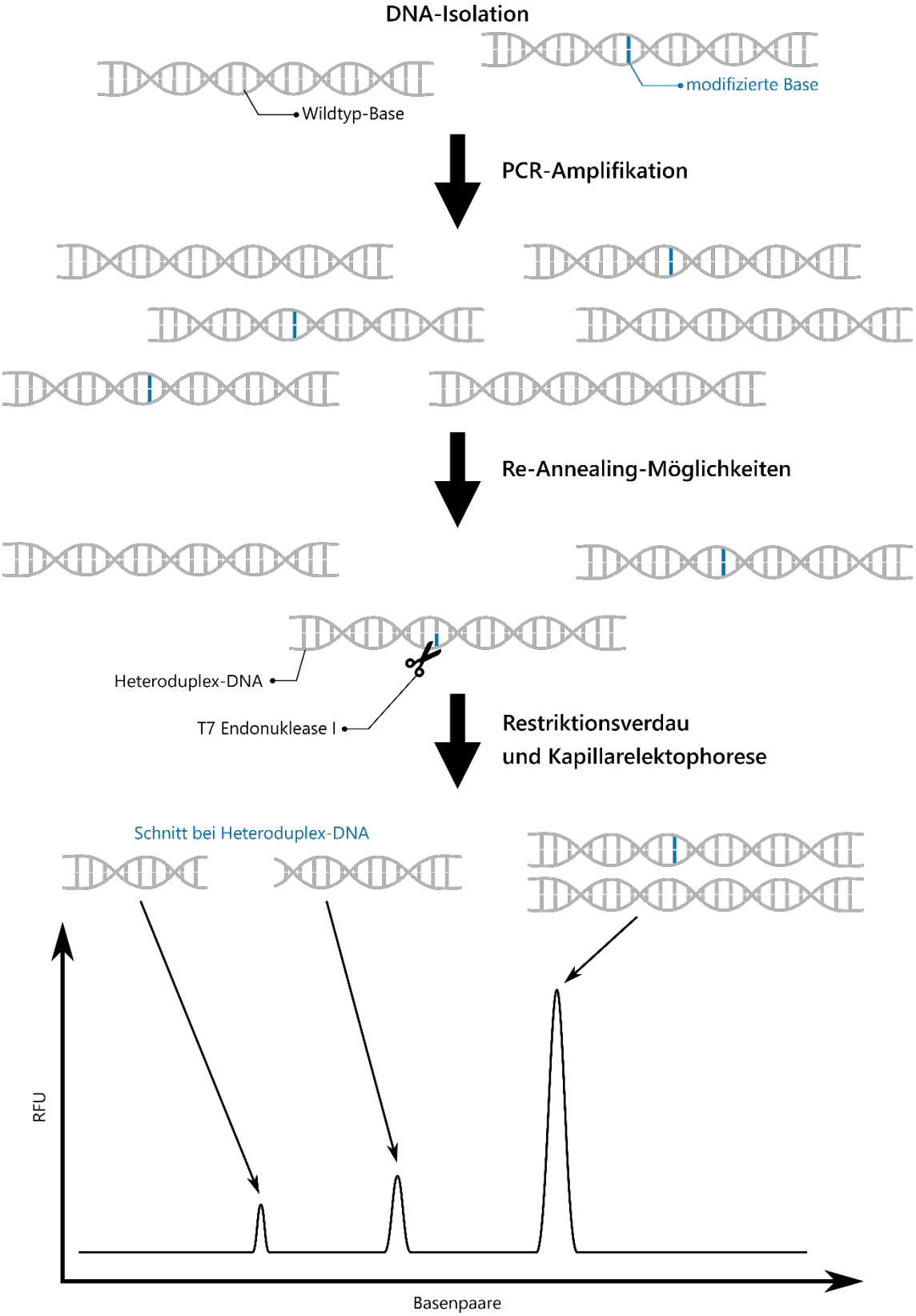


Abbildung 21: Detektion einer bekannten Genomeditierung mittels Restriktionsverdau und Kapillarelektrophorese. Die Heteroduplex-DNA wird unter Verwendung einer T7-Endonuklease I verdaut und die Produkte kapillarelektrophoretisch aufgetrennt (RFU = relative fluorescence unit).

5.5 Next Generation Sequencing

Die derzeit am häufigsten diskutierte Methode zur Detektion von eingebrachten genetischen Modifikationen ist das Next Generation Sequencing (NGS). NGS stellt eine massiv parallele Sequenzierung von DNA dar und ermöglicht dadurch die Detektion von sehr kleinen Veränderungen im Genom. Die DNA (genomische DNA oder PCR-Amplikons) wird über Ultraschall oder Enzyme in kleine Fragmente zerlegt. An diese Fragmente binden sogenannte Adapter, die eine Bindung der Fragmente an eine Glasplatte ermöglichen und Bindestellen für die Sequenzierprimer aufweisen. Außerdem enthalten diese Adapter eine kurze DNA-Sequenz, den Index, die bei jeder Probe unterschiedlich ist. Dadurch können mehrere Proben parallel sequenziert werden, was die Kosten und den Aufwand deutlich senkt. Jedes dieser Fragmente wird an der Glasplatte gebunden, vervielfältigt und sequenziert. Anschließend werden über bioinformatische Verfahren die einzelnen Sequenzen wieder zu einer längeren Sequenz zusammengesetzt. Hier unterscheidet man zwei Herangehensweisen: die Resequenzierung und die De-Novo-Sequenzierung (**Abbildung 22**). Bei der Resequenzierung werden die sequenzierten Fragmente mit einer Referenzsequenz verglichen und auf Basis der Übereinstimmungen zu einer größeren Sequenz zusammengesetzt. Bei der De-Novo-Sequenzierung fehlt diese Referenzsequenz, so dass die einzelnen Fragmente aufgrund ihrer überlappenden Bereiche zu längeren Sequenzen (Contigs) zusammengesetzt werden.

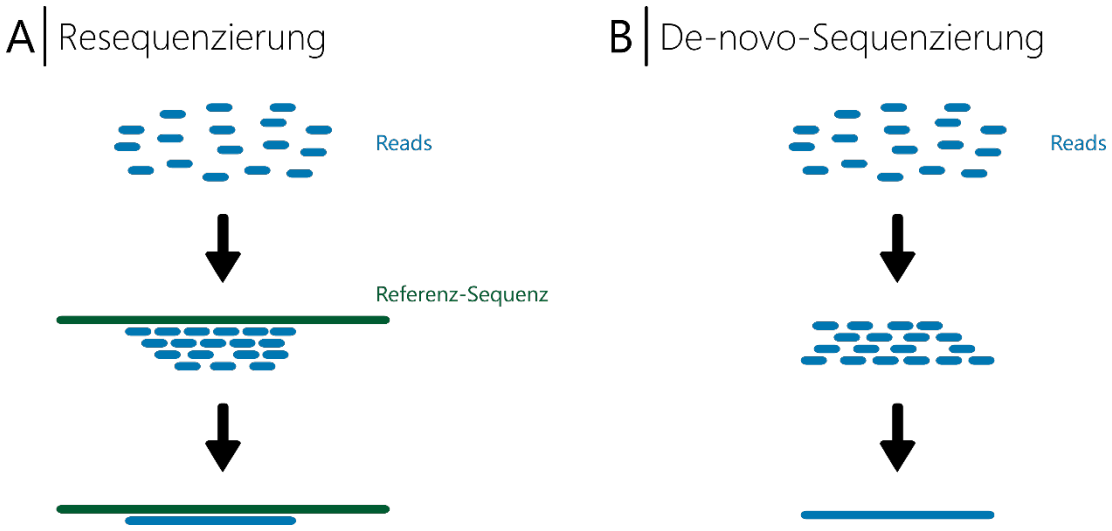


Abbildung 22: Zwei Herangehensweisen bei der Auswertung von Next Generation Sequencing-Daten: A) bei der Resequenzierung werden die Reads anhand einer Referenzsequenz zu einer längeren Sequenz zusammengesetzt. B) Bei der De-Novo-Sequenzierung werden die Reads anhand ihrer Überlappungen zu größeren Sequenzen zusammengesetzt.

Um das bioinformatische Problem zu umgehen wird an neuen Sequenziertechniken geforscht. Ein bereits etabliertes System ist das Nanopore-Sequencing. Hierbei wird die DNA nicht mehr in kleine Fragmente zerstückelt, sondern komplett durch eine Nanopore (sehr kleine definierte Öffnung eingebettet in einer Biomembran) gelenkt. Bei der Durchwanderung der Poren führen die verschiedenen Nukleotide zu unterschiedlichen Änderungen der

Porengröße. Dies wiederum führt zu einer Veränderung des Stromflusses, der an der Biomembran gemessen werden kann (**Abbildung 23**). Dadurch lassen sich Änderungen der Porengröße den einzelnen Nukleotiden zuordnen und somit die Sequenz der DNA, die durch die Pore wandert, in Echtzeit bestimmen.

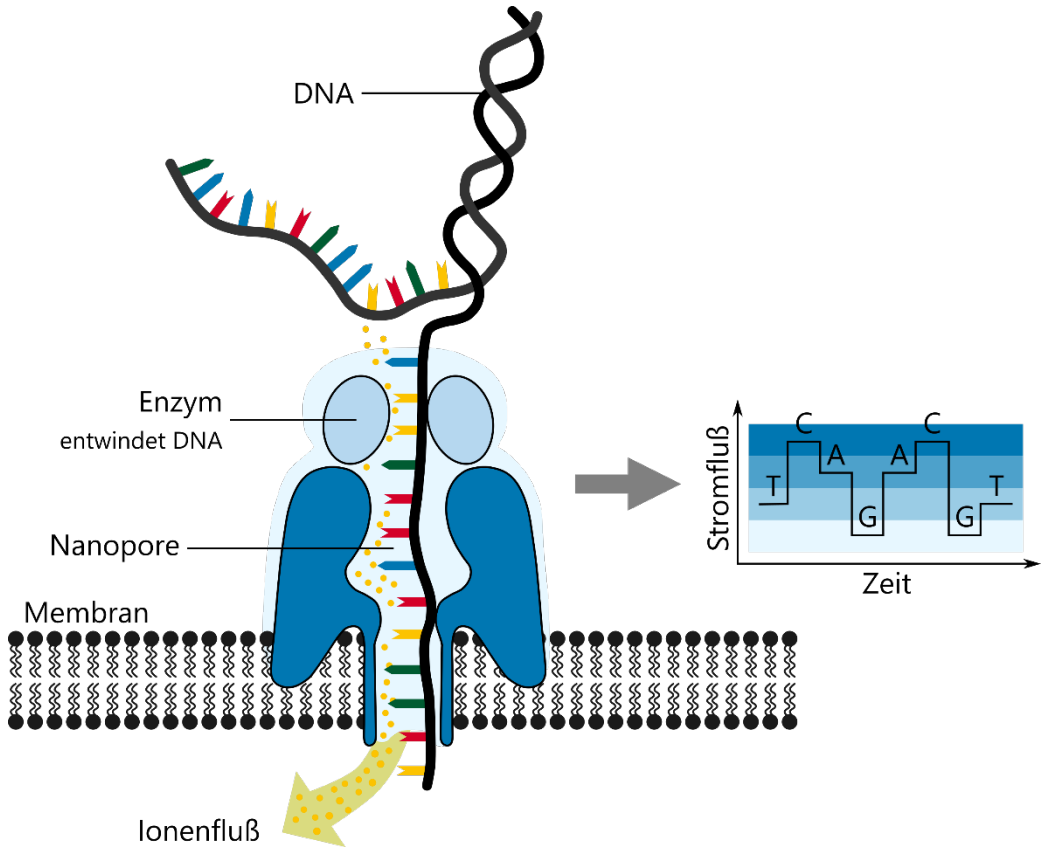


Abbildung 23: Nanopore-Sequencing nach dem Prinzip der Firma Oxford Nanopore Technologies: die einzelsträngige DNA wird durch eine Pore geleitet. Abhängig von den durchlaufenden Nukleotiden ändert sich der Stromfluß. Dadurch lässt sich in Echtzeit verfolgen, welche Nukleotide der Reihe nach durch die Pore wandern. Die Reihenfolge der Nukleotide ergibt die DNA-Sequenz des DNA-Einzelstrangs.

Dieses Verfahren führt zu langen DNA-Sequenzen, die nun nicht mehr in aufwendigen bioinformatischen Tools aus kleinen Fragmenten zusammengesetzt werden müssen. Noch ist die Technik etwas fehleranfälliger als das bisherige NGS-Verfahren, doch neue Entwicklungen senken diese Fehlerrate deutlich, so dass das Nanopore-Sequencing eine deutliche Alternative oder zumindest eine gute Ergänzung zum bisherigen NGS-Sequencing darstellt.

Der Einsatz von NGS-Methoden als Nachweis von Genome Editing gestaltet sich jedoch sehr schwierig, da zwar die gesamte Sequenz des zu analysierenden Organismus durch die NGS-Analyse bestimmt wird, die Aussage ob es sich um eine Punktmutation an bestimmten Stellen im Genom handelt, aber nur im Vergleich zu Referenzgenomen erfolgen kann. Solche Referenzgenome sind zurzeit kaum bis gar nicht vorhanden. Zudem müssten sie für jede Spezies und Pflanzensorte einzeln bestimmt werden.

6 Rechtliche Situation

6.1 Europäische Union

Am 25.07.2018 fällte der Europäische Gerichtshof (EuGH) in der Rechtssache C-528/16 ein Grundsatzurteil. Dabei wurde festgestellt, dass alle mittels Mutagenese erhaltenen Organismen als GVO im Sinne der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG [131] gelten. Die in der Freisetzungsrichtlinie Anhang 1B (Artikel 3 Abs. 1) aufgeführten Ausnahmen beziehen sich dabei nur auf klassische Mutagenese-Verfahren, die schon lange als ‚sicher' eingestuft und genutzt werden (z. B. Mutagenese mittels Bestrahlung oder mutagener Substanzen). Einige der durch diese Verfahren hergestellten Organismen sind in einer Datenbank[5] der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) und der Atomenergiebehörde (IAEA) aufgeführt (siehe **Tabelle 3**). Diese Datenbank ist freiwillig, so dass vermutlich nur ein Bruchteil der Organismen, die mittels radioaktiver Strahlung oder mutagener Substanzen hergestellt wurden, hier auch tatsächlich aufgeführt sind.

Tabelle 3: Anzahl der Einträge exemplarischer Pflanzenspezies in der Datenbank der FAO/IAEA[1], die mittels radioaktiver Strahlen oder mutagener Substanzen modifiziert wurden und damit vom EU-Gentechnikrecht ausgenommen sind (Mais (*Zea mays*); Sojabohne (*Glycine max*), Raps (*Brassica napus*), Reis (*Oryza sativa*), Baumwolle (*Gossypium sp.*)) – Stand 30.07.2018.

Spezies	*Zea mays*	*Glycine max*	*Brassica napus*	*Oryza sativa*	*Gossypium sp.*
Anzahl der Einträge	96	173	21	822	48

Demnach fallen alle Anwendungen der neuen Techniken unter den Anwendungsbereich der Richtlinie 2001/18/EG. Die damit hergestellten Organismen sind daher als GVO einzustufen (**Abbildung 24**). Alle Voraussetzungen, die in der Freisetzungsrichtlinie für GVO aufgeführt sind, gelten gleichermaßen. Im Rahmen des Zulassungsprozesses in der EU ist der Hersteller entsprechend verpflichtet, geeignetes Referenzmaterial und spezifische Nachweisverfahren für die Überwachung zur Verfügung zu stellen. In wie weit dies tatsächlich möglich bzw. praktikabel ist, wird sich in den nächsten Jahren zeigen. Das EuGH-Urteil findet gleichermaßen bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen Anwendung, die mittels neuer Techniken hergestellt wurden und freigesetzt bzw. in Verkehr gebracht werden sollen.

Die Einstufung von Organismen erfolgt in der EU weiterhin auf prozessbezogener Basis. In wissenschaftlichen Kreisen besteht jedoch größtenteils die Auffassung, dass das Produkt bzw. der Phänotyp stärker im Fokus einer Bewertung stehen sollte [132, 133].

[5] https://mvd.iaea.org/

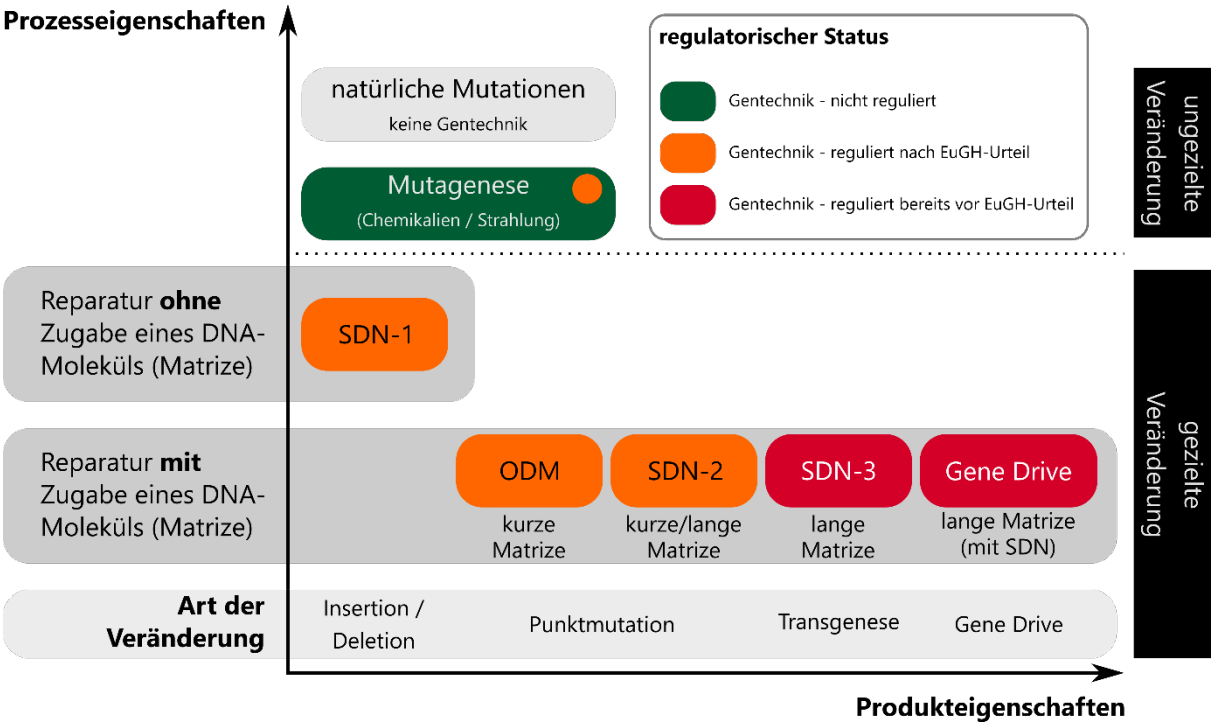


Abbildung 24: Regulatorischer Status der neuen Genomeditierungstechniken SDN-1, SDN-2, SDN-3 sowie des Gene Drive nach dem EuGH-Urteil. Natürliche Mutationen, sowie die „klassische“ Mutagenese mit Chemikalien oder Strahlung, lösen ungezielte Veränderungen (z. B. Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen) im Genom der Zelle aus. Die Anwendung dieser Techniken stellt nach dem EuGH-Urteil Gentechnik dar. Die resultierenden GVO werden aber i. d. R. nicht reguliert bzw. ist deren Regulierung den einzelnen Mitgliedsstaaten freigestellt. Die Anwendung der SDN-3-Technik sowie des (rekombinanten) Gene Drives führt zu Organismen, die Träger einer gentechnischen Veränderung sind und somit GVO darstellen. Es handelt sich somit um Gentechnik, die bereits vor dem EuGH-Urteil reguliert war. Beide Techniken führen dabei zum gezielten Einfügen von fremder DNA, die mehrere tausend Basenpaare umfassen kann. Mit Hilfe der ODM-, SDN-1- und SDN-2-Techniken können gezielte Veränderungen im Genom der Zelle durchgeführt werden. Im Falle der Anwendung der SDN-1-Technik können dabei insbesondere Insertionen und Deletionen („Indels“) hervorgerufen werden und im Falle der ODM- und SDN-2-Technik gezielte Punktmutationen. Im Falle der SDN-1-Technik wird dabei kein DNA-Molekül als Matrize zugegeben, im Falle der ODM- und SDN-2-Techniken erfolgt die Zugabe einer entsprechenden DNA-Reparaturvorlage. Der Status der ODM-, SDN-1- und SDN-2-Technik war vor dem EuGH-Urteil nicht eindeutig geklärt. Seit dem EuGH-Urteil werden diese Techniken als Gentechnik eingestuft und als solche reguliert.

6.2 Weltweit

In den **USA** erfolgt die Einstufung von genomeditierten Organismen je nach Art des Organismus und dessen Anwendungsbereichs durch die USDA-APHIS (US Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service), die FDA (US Food and Drug Administration) und die EPA (US Environmental Protection Agency). Sofern modifizierte Organismen keine Pflanzenschädlinge sind, nicht mittels DNAs oder Vektoren von Pflanzenschädlingen erzeugt wurden und auch über konventionelle Züchtung hätten hergestellt werden können, sind diese für die USDA-APHIS von der Regulierung ausgenommen. Um den Regulierungsprozess von als Lebens- oder Futtermittel genutzten genomeditierten Organismen zu verbessern, hat sich die FDA über einen Aufruf an die Öffentlichkeit gewandt, die nun Kommentare und Informationen einreichen kann. Produziert eine modifizierte Pflanze ein Pestizid (z. B. Insektizide wie das Bt-Toxin), erfolgt eine

Regulierung durch die EPA. Allerdings sind nicht die modifizierten Pflanzen, sondern die chemischen und biologischen Eigenschaften des Pestizids Grundlage des Regulierungsprozesses.

In **Kanada** erfolgt die Regulierung sehr stark produktbezogen und wird von Fall zu Fall durch die Canadian Food Inspection Agency (CFIA) entschieden [132]. Dabei spielt die Methode zur Produktion des modifizierten Organismus keine Rolle. Entscheidend ist ausschließlich die Neuartigkeit des Produkts, die dann gegebenenfalls eine Regulierung und Risikobewertung nach sich zieht. Als neuartig gelten dabei Organismen, deren neue Eigenschaft bisher in keiner kultivierten Population in Kanada vorhanden ist. Ebenfalls als neuartig gilt der Organismus sofern das Niveau des Merkmals signifikant außerhalb des Bereichs des Merkmals in anderen kultivierten Populationen in Kanada liegt. Hat das neue Merkmal potentiell eine negative Auswirkung auf die Umweltsicherheit, erfolgt auf jeden Fall eine Risikobewertung und Regulierung.

Auch in **Argentinien** erfolgt die Bewertung einzelfall- und produktbezogen. Argentinien ist auch das erste Land, das gesetzliche Rahmenbedingungen für die neuen molekularbiologischen Methoden gesetzt hat. Als gentechnisch verändert wird hier ein Organismus angesehen, wenn eine stabile Integration eines Gens (oder mehrerer Gene) oder einer DNA-Sequenz in das Pflanzengenom stattgefunden hat. Sofern dies nicht der Fall ist, hängt die Bewertung davon ab, ob für die Erzeugung des genomeditieren Organismus ein Transgen vorübergehend eingebracht wurde. Verbleibt dieses Transgen im Organismus, wird dieser als gentechnisch verändert eingestuft. Wurde kein Transgen verwendet oder ist das Transgen im Endprodukt nicht mehr vorhanden, gilt dieser Organismus nicht als gentechnisch verändert.

Eine ähnliche Herangehensweise findet sich in **Brasilien**, wo hauptsächlich drei Institutionen beteiligt sind, CNTBio (National Biosafety Technical Commission), ANVISA (Brazilian National Health Surveillance Authority) und CONEP (Brazil's National Committee for Ethics in Research). CNTBio ist eine multidisziplinäre Institution, die technische Unterstützung für die Regierung bietet und die nationale Gesetzgebung aktualisiert, Biosicherheitsrichtlinien umsetzt und sicherheitsrelevante Normen festsetzt. Auch Forschungsvorhaben werden von der CNTBio genehmigt. ANVISA ist bei der Zulassung, Überprüfung und Regulierung von Produkten beteiligt, die mögliche Gesundheitsrisiken aufweisen, die sich aufgrund des Genome Editing ergeben. CONEP entwickelt Leitlinien im Bereich der Gesundheitsforschung und ist für die Evaluierung, Genehmigung und Bewertung von Forschungsvorhaben im Humanbereich zuständig. Hierbei stehen dann vor allem ethische Aspekte im Vordergrund. Auch in Brasilien wird eine produktbezogene Einzelfallüberprüfung durchgeführt.

Das „Office of the Gene Technology Regulator" (OGTR) hat in **Australien** einen Entwurf zur Überarbeitung bestehender GVO-Regularien erstellt. Darin sind einige Bewertungen aufgeführt, die prozessbezogen sind: Demnach gilt ein Organismus als gentechnisch verändert, wenn die ODM-Technik zur Modifikation genutzt wurde. Ebenfalls als gentechnisch verändert gilt ein Organismus, wenn bei der Herstellung ein Nukleinsäure-Template für die „homology-directed repair" von durch SDN erzeugte Einzel- oder Doppelstrangbrüche verwendet wird (SDN-2 und SDN-3). Wird kein Nukleinsäure-Template verwendet, gilt der Organismus nicht als gentechnisch verändert (SDN-1). Auch unter den

folgenden Voraussetzungen wird ein Organismus nicht als gentechnisch verändert eingestuft:

- es wurde eine RNA eingeführt, die nicht in ein Polypeptid übersetzt wird
- es wurde eine RNA eingeführt, die nicht zu einer Änderung der Genomsequenz des Organismus führt
- es wurde eine RNA eingeführt, die nicht zu einem infektiösen Agens führt

Nach öffentlicher Diskussion dieses Entwurfs wird das Dokument noch modifiziert und könnte dann dem Gesetzgebungsverfahren zugeführt werden.

In **Japan** wurde in einem Komitee des „Ministry of Environment“ (MOE) über die Bewertung von Genome Editing diskutiert. Dabei sind sich die Mitglieder einig, dass SDN-1-Anwendungen nicht reguliert werden sollten. Jedoch müsse sichergestellt sein, dass die daraus entstehenden Produkte sicher sind. Außerdem wurde vorgeschlagen ein Managementsystem zu erstellen, in dem der Regierung die Art und die Anwendung aller genomeditierter Organismen, die nicht unter die GVO-Regulierung fallen, übermittelt werden. Jedoch sollen Mikroorganismen in geschlossenen Anlagen hiervon ausgenommen werden. Diese Maßnahme soll das Vertrauen der Bevölkerung in die neuen Techniken stärken.

7 Fazit

Die neuen molekularbiologischen Techniken, die unter dem Überbegriff Genome Editing zusammengefasst werden können, ermöglichen die zielgerichtete Modifikation des Erbguts. Vor allem die Oligonukleotid-gelenkte Mutagenese (ODM) und sequenzspezifische Nukleasen (SDN) stehen dabei im Fokus. Neben Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) und Transcription Activator-like Effector-Nukleasen (TALEN) hat sich bei den SDN vor allem das CRISPR/Cas9-System durchgesetzt. Im Vergleich zu ZFN und TALEN sind CRISPR/Cas9-Systeme wesentlich einfacher, schneller und kostengünstiger anzuwenden und in ihrer Anwendung flexibler. Dies hat dazu geführt, dass sich das CRISPR/Cas9-System und Varianten desselben in den letzten Jahren in Forschung und Entwicklung durchgesetzt haben.

Veränderungen im Genom, die durch das Genome Editing vorgenommen werden können, sind vielfältig. Möglich ist sowohl der Austausch einzelner Basen, als auch die Insertion und Deletion von kleinen und größeren DNA-Abschnitten.

Durch das Urteil des EuGHs vom 25.07.2018 stehen die Forschung/Entwicklung und vor allem auch die Überwachung vor großen Herausforderungen. Alle Organismen, die durch Genome Editing modifiziert wurden, fallen demnach in der EU in den Wirkungsbereich der Gentechnik-Freisetzungsrichtlinie und dürfen damit nicht ohne Zulassung in Verkehr gebracht werden. Folglich ist nicht nur der Nachweis der Modifikation an sich, sondern auch der Nachweis der verwendeten Methode erforderlich, da beispielsweise Punktmutationen auch natürlich oder über klassische Mutageneseverfahren entstehen können, die von der Freisetzungsrichtlinie ausgenommen sind.

Der Nachweis einer Modifikation ist bei vorheriger Kenntnis dieser Modifikation durch verschiedene molekularbiologische Verfahren prinzipiell möglich. Es kann aber nicht immer nachgewiesen werden, durch welches Verfahren diese Modifikation erzeugt wurde.

Ist die Modifikation nicht bekannt, ist ein Nachweis schwierig bis unmöglich. Als mögliche Nachweisverfahren für Punktmutationen könnten verschiedene Varianten der qPCR, die digitale PCR, der T7 Assay oder NGS Verwendung finden. Allerdings gibt es derzeit weder konkret verfügbare Nachweismethoden, noch Referenzmaterial für die entsprechenden Nachweise, obwohl weltweit bereits die ersten genomeditierten Produkte auf dem Markt sind und sich viele Produkte in der Pipeline befinden. Momentan fehlen wichtige Informationen. Dies betrifft vor allem die für die Entwicklung von Nachweismethoden notwendigen Sequenzinformationen. Hinzu kommt, dass die Nachweisgrenzen der möglichen Nachweismethoden, welche für Einzelbasenmodifikationen angewendet werden könnten, möglicherweise höher liegen als der geforderte Kennzeichnungsschwellenwert für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel in der EU von 0,9 %. Bei der unterschiedlichen Rechtslage in Bezug auf das Genome Editing weltweit stellt sich die Frage, ob genomeditierte Organismen in Dokumenten aus Ländern aufgeführt werden, in denen diese Methoden nicht regulierungspflichtig sind.

Die Anwendungen des Genome Editing sind äußerst vielfältig und finden sich sowohl bei Mikroorganismen, in der Pflanzen- oder Tierzüchtung, als auch an menschlichen Zellen im Bereich der Grundlagenforschung. Im Besonderen wird hier vor allem die CRISPR/Cas9-Technik vermehrt genutzt. Genome Editing-Verfahren besitzen zweifelsohne ein hohes Potential, jedoch sind mit ihr je nach Anwendung auch mögliche Risiken verbunden. Hier sind die sogenannten „Off-Target-Effekte“ zu berücksichtigen. Besondere Risiken gehen von Gene Drive-Organismen aus, da sich hier Veränderungen im Erbgut möglicherweise schnell in einer ganzen Population ausbreiten können.

Die Techniken der Genomeditierung selbst unterliegen einer fortwährenden Weiterentwicklung, so dass zu erwarten ist, dass deren Präzision in den nächsten Jahren weiter steigen wird und damit potentielle Risiken weiter reduziert werden.

8 Danksagung

Dieser Bericht entstand im Rahmen eines vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz geförderten Projekts (VH-ID: TGC01GCU-72143). Für die Unterstützung möchten wir uns sehr herzlich bedanken.

9 Literaturverzeichnis

1. **J. D. Watson and F. H. C. Crick** (1953) - *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 171: 737.
2. **W. Arber** (1965) - *Host-Controlled Modification of Bacteriophage*. Annual review of microbiology, 19; 1: 365.
3. **Nobelprize.org** - *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978*. 1978. 13.11.2017]; Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/.
4. **S. N. Cohen, *et al.*** (1973) - *Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70; 11: 3240.
5. **R. Saiki, *et al.*** (1988) - *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 239; 4839: 487.
6. **R. T. Fraley, *et al.*** (1983) - *Expression of bacterial genes in plant cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 80; 15: 4803.
7. **Y.-G. Kim, *et al.*** (1996) - *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93; 3: 1156.
8. **M. Bibikova, *et al.*** (2001) - *Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases*. Molecular and cellular biology, 21; 1: 289.
9. **P. Römer, *et al.*** (2007) - *Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene*. Science, 318; 5850: 645.
10. **E. Deltcheva, *et al.*** (2011) - *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 471; 7340: 602.
11. **M. Jinek, *et al.*** (2012) - *A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science: 1225829.
12. **L. Cong, *et al.*** (2013) - *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 339; 6121: 819.
13. **N. J. Sauer, *et al.*** (2016) - *Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing*. Plant Biotechnology Journal, 14; 2: 496.
14. **A. E. Ricroch and M.-C. Hénard-Damave** (2016) - *Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges*. Critical reviews in biotechnology, 36; 4: 675.
15. **D. Carroll** (2011) - *Genome engineering with zinc-finger nucleases*. Genetics, 188; 4: 773.
16. **M. H. Porteus and D. Carroll** (2005) - *Gene targeting using zinc finger nucleases*. Nature biotechnology, 23; 8.
17. **J. Smith, *et al.*** (2000) - *Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains*. Nucleic acids research, 28; 17: 3361.
18. **J. Boch and U. Bonas** (2010) - *Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function*. Annual review of phytopathology, 48.
19. **T. Gaj, *et al.*** (2013) - *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends in Biotechnology, 31; 7: 397.
20. **Z. Liang, *et al.*** (2014) - *Targeted Mutagenesis in Zea mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System*. Journal of Genetics and Genomics, 41; 2: 63.
21. **F. Jiang and J. A. Doudna** (2017) - *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. Annual review of biophysics, 46.
22. **D. Bikard, *et al.*** (2013) - *Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system*. Nucleic acids research, 41; 15: 7429.
23. **J. N. Bjerke, *et al.*** (2018) - *Recent Advances in CRISPR Base Editing: From A to RNA*. Journal; Issue.
24. **Luke A. Gilbert, *et al.*** (2014) - *Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation*. Cell, 159; 3: 647.
25. **P. Perez-Pinera, *et al.*** (2013) - *RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors*. Nature Methods, 10: 973.
26. **Lei S. Qi, *et al.*** (2013) - *Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression*. Cell, 152; 5: 1173.
27. **W. Jiang, *et al.*** (2013) - *RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems*. Nat Biotech, 31; 3: 233.
28. **J.-H. Oh and J.-P. van Pijkeren** (2014) - *CRISPR–Cas9-assisted recombineering in Lactobacillus reuteri*. Nucleic acids research, 42; 17: e131.

29. **M. S. Dastjerdeh, *et al.*** (2016) - *Zinc finger nuclease: a new approach to overcome beta-lactam antibiotic resistance*. Jundishapur journal of microbiology, 9; 1.
30. **R. J. Citorik, *et al.*** (2014) - *Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases*. Nature biotechnology, 32; 11: 1141.
31. **D. Bikard, *et al.*** (2014) - *Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials*. Nature biotechnology, 32; 11: 1146.
32. **F. A. Ran, *et al.*** (2015) - *In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9*. Nature, 520: 186.
33. **A. S. El-Sayed, *et al.*** (2017) - *Genome editing approaches: manipulating of lovastatin and taxol synthesis of filamentous fungi by CRISPR/Cas9 system*. Applied microbiology and biotechnology.
34. **H. Huang, *et al.*** (2015) - *One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in Streptomyces*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 47; 4: 231.
35. **A. Okuzaki and K. Toriyama** (2004) - *Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice*. Plant Cell Reports, 22; 7: 509.
36. **V. K. Shukla, *et al.*** (2009) - *Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases*. Nature, 459: 437.
37. **J. A. Townsend, *et al.*** (2009) - *High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases*. Nature, 459; 7245: 442.
38. **Y. Ran, *et al.*** - *Zinc-Finger Nuclease (ZFN)-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (Triticum aestivum) using a DNA repair template*. Plant Biotechnology Journal, 0; ja.
39. **Y. Sun, *et al.*** (2016) - *Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase*. Molecular plant, 9; 4: 628.
40. **G. F. W. Gocal, *et al.*** (2015) - *Oligo-Mediated Targeted Gene Editing*. Journal; Issue: 73.
41. **T. Li, *et al.*** (2012) - *High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice*. Nature biotechnology, 30; 5: 390.
42. **A. Peng, *et al.*** (2017) - *Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus*. Plant Biotechnology Journal, 15; 12: 1509.
43. **Y. Wang, *et al.*** (2014) - *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew*. Nature biotechnology, 32; 9: 947.
44. **J. Braatz, *et al.*** (2017) - *CRISPR-Cas9 induced mutations in polyploid oilseed rape*. Plant physiology: pp. 00426.2017.
45. **M. Li, *et al.*** (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.
46. **T. Wendt, *et al.*** (2013) - *TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants*. Plant Molecular Biology, 83; 3: 279.
47. **Y. Lu and J.-K. Zhu** (2017) - *Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system*. Molecular plant, 10; 3: 523.
48. **Y. Wang, *et al.*** (2017) - *Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton*. Science China Life Sciences, 60; 5: 524.
49. **R. C. Nongpiur, *et al.*** (2016) - *Genomics Approaches For Improving Salinity Stress Tolerance in Crop Plants*. Current Genomics, 17; 4: 343.
50. **R. Chantre Nongpiur, *et al.*** (2016) - *Genomics approaches for improving salinity stress tolerance in crop plants*. Current genomics, 17; 4: 343.
51. **E. Waltz** (2016) - *Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation*. Nature, 532; 7599: 293.
52. **W. Haun, *et al.*** (2014) - *Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family*. Plant biotechnology journal, 12; 7: 934.
53. **Y. Ito, *et al.*** (2015) - *CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 467; 1: 76.
54. **D. F. Carlson, *et al.*** (2016) - *Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines*. Nature Biotechnology, 34: 479.
55. **W. Tan, *et al.*** (2013) - *Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110; 41: 16526.
56. **T. Sonstegard, *et al.*** (2016) - *Precision Animal Breeding as a Sustainable, non-GMO Solution for Improving Animal Production and Welfare*.
57. **T. Doran, *et al.*** - *Genome editing in poultry-opportunities and impacts*.
58. **J.-D. Kang, *et al.*** (2017) - *Generation of cloned adult muscular pigs with myostatin gene mutation by genetic engineering*. RSC Advances, 7; 21: 12541.

59. **M. Crispo, *et al.*** (2015) - *Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes*. PLOS ONE, 10; 8: e0136690.
60. **W. Ni, *et al.*** (2014) - *Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system*. PloS one, 9; 9: e106718.
61. **K. M. Whitworth, *et al.*** (2015) - *Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Nature Biotechnology, 34: 20.
62. **C. Burkard, *et al.*** (2018) - *Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to PRRSV-1 infection*. Journal of virology: JVI. 00415.
63. **D. Niu, *et al.*** (2017) - *Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9*. Science (New York, N.Y.), 357; 6357: 1303.
64. **K. Musunuru** (2013) - *Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models*. Disease Models & Mechanisms, 6; 4: 896.
65. **D. G. Ousterout, *et al.*** (2015) - *Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy*. Nature communications, 6: 6244.
66. **Z. Zhu, *et al.*** (2016) - *Genome Editing of Lineage Determinants in Human Pluripotent Stem Cells Reveals Mechanisms of Pancreatic Development and Diabetes*. Cell Stem Cell, 18; 6: 755.
67. **D. Gerace, *et al.*** (2017) - *CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: a path to clinical success?* Stem cell research & therapy, 8; 1: 62.
68. **G. Schwank, *et al.*** (2013) - *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*. Cell stem cell, 13; 6: 653.
69. **A. L. Firth, *et al.*** (2015) - *Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs*. Cell reports, 12; 9: 1385.
70. **G. Wang, *et al.*** (2018) - *CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1*. Virus research, 244: 321.
71. **E. E. Perez, *et al.*** (2008) - *Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases*. Nature biotechnology, 26; 7: 808.
72. **P. Hou, *et al.*** (2015) - *Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection*. Scientific reports, 5: 15577.
73. **Y. Ophinni, *et al.*** (2018) - *CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures*. Scientific reports, 8; 1: 7784.
74. **R. Kaminski, *et al.*** (2016) - *Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing*. Scientific Reports, 6: 22555.
75. **X. Qu, *et al.*** (2013) - *Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells*. Nucleic acids research, 41; 16: 7771.
76. **H. Mou, *et al.*** (2015) - *Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9*. Genome medicine, 7; 1: 53.
77. **Randall J. Platt, *et al.*** (2014) - *CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling*. Cell, 159; 2: 440.
78. **W. Xue, *et al.*** (2014) - *CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver*. Nature, 514; 7522: 380.
79. **B. Garcia-Bloj, *et al.*** (2016) - *Waking up dormant tumor suppressor genes with zinc fingers, TALEs and the CRISPR/dCas9 system*. Oncotarget, 7; 37: 60535.
80. **H. Torikai, *et al.*** (2012) - *A foundation for" universal" T-cell based immunotherapy: T-cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR*. Blood.
81. **T. L. Roth, *et al.*** (2018) - *Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting*. Nature.
82. **K. M. Esvelt, *et al.*** (2014) - *Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations*. Elife, 3: e03401.
83. **E. National Academies of Sciences and Medicine** (2016) - *Gene Drives on the Horizon: Advancing Science, Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values*. Washington, DC: The National Academies Press. 230.
84. **M. Legros, *et al.*** (2013) - *Modeling the Dynamics of a Non-Limited and a Self-Limited Gene Drive System in Structured Aedes aegypti Populations*. PLoS ONE, 8; 12: e83354.
85. **G. K. Christophides** (2005) - *Transgenic mosquitoes and malaria transmission*. Cellular Microbiology, 7; 3: 325.
86. **V. M. Gantz, *et al.*** (2015) - *Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112; 49: E6736.

87. **A. Hammond, *et al.*** (2016) - *A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector Anopheles gambiae*. Nat Biotech, 34; 1: 78.
88. **J. M. Marshall and B. A. Hay** (2014) - *Medusa: A Novel Gene Drive System for Confined Suppression of Insect Populations*. PLoS ONE, 9; 7: e102694.
89. **J. Cohen** (2018) - *A 'gene drive' makes its debut in mammals*. Science, 361; 6398: 118.
90. **B. R. Conklin** (2019) - *On the road to a gene drive in mammals*. Journal; Issue.
91. **M. J. Scott, *et al.*** (2017) - *Agricultural production: assessment of the potential use of Cas9-mediated gene drive systems for agricultural pest control*. Journal of Responsible Innovation: 1.
92. **T. A. Gaines, *et al.*** (2010) - *Gene amplification confers glyphosate resistance in Amaranthus palmeri*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107; 3: 1029.
93. **W. Deng, *et al.*** (2015) - *CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112; 38: 11870.
94. **J. S. Gootenberg, *et al.*** (2017) - *Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2*. Science.
95. **A. M. Caliendo and R. L. Hodinka** (2017) - *A CRISPR Way to Diagnose Infectious Diseases*. New England Journal of Medicine, 377; 17: 1685.
96. **J. S. Gootenberg, *et al.*** (2018) - *Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6*. Science (New York, N.Y.), 360; 6387: 439.
97. **J. S. Chen, *et al.*** (2018) - *CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity*. Science, 360; 6387: 436.
98. **A. Hendel, *et al.*** (2015) - *Quantifying on-and off-target genome editing*. Trends in biotechnology, 33; 2: 132.
99. **C. Kuscu, *et al.*** (2014) - *Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease*. Nature Biotechnology, 32: 677.
100. **V. Pattanayak, *et al.*** (2011) - *Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection*. Nature Methods, 8: 765.
101. **P. D. Hsu, *et al.*** (2013) - *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases*. Nature Biotechnology, 31: 827.
102. **S. W. Cho, *et al.*** (2014) - *Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases*. Genome research, 24; 1: 132.
103. **C. E. Nelson, *et al.*** (2019) - *Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy*. Nature medicine: 1.
104. **S. Q. Tsai, *et al.*** (2014) - *GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases*. Nature Biotechnology, 33: 187.
105. **S. Q. Tsai, *et al.*** (2017) - *CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets*. Nat Methods, 14; 6: 607.
106. **J. Listgarten, *et al.*** (2018) - *Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs*. Nature biomedical engineering, 2; 1: 38.
107. **F. Heigwer, *et al.*** (2014) - *E-CRISP: fast CRISPR target site identification*. Nature Methods, 11: 122.
108. **F. Alkan, *et al.*** (2018) - *CRISPR-Cas9 off-targeting assessment with nucleic acid duplex energy parameters*. Genome Biology, 19; 1: 177.
109. **S. Q. Tsai and J. K. Joung** (2016) - *Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR–Cas9 nucleases*. Nature Reviews Genetics, 17: 300.
110. **G. Chuai, *et al.*** (2018) - *DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning*. Genome Biology, 19; 1: 80.
111. **G.-H. Hwang, *et al.*** (2018) - *Web-based design and analysis tools for CRISPR base editing*. BMC bioinformatics, 19; 1: 542.
112. **H. Zhang, *et al.*** (2014) - *The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation*. Plant Biotechnology Journal, 12; 6: 797.
113. **B. A. Peterson, *et al.*** (2016) - *Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis*. PLOS ONE, 11; 9: e0162169.
114. **Y. Xue, *et al.*** (2009) - *Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree*. Current Biology, 19; 17: 1453.
115. **B. Milholland, *et al.*** (2017) - *Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice*. Nature communications, 8: 15183.
116. **S. Ossowski, *et al.*** (2010) - *The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in Arabidopsis thaliana*. science, 327; 5961: 92.

117. **M. Exposito-Alonso, *et al.*** (2018) - *The rate and potential relevance of new mutations in a colonizing plant lineage*. PLoS genetics, 14; 2: e1007155.
118. **H. Lee, *et al.*** (2012) - *Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109; 41: E2774.
119. **S. Wielgoss, *et al.*** (2011) - *Mutation rate inferred from synonymous substitutions in a long-term evolution experiment with Escherichia coli*. G3: Genes, Genomes, Genetics, 1; 3: 183.
120. **A. B. Adewoye, *et al.*** (2015) - *The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline*. Nature communications, 6: 6684.
121. **R. M. Clark, *et al.*** (2005) - *Estimating a nucleotide substitution rate for maize from polymorphism at a major domestication locus*. Molecular biology and evolution, 22; 11: 2304.
122. **P. Sikora, *et al.*** (2011) - *Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding*. International journal of plant genomics, 2011.
123. **National Academies of Sciences - Engineering - Medicine** (2016) - *Gene drives on the horizon: advancing science, navigating uncertainty, and aligning research with public values*. Washington, DC: The National Academies Press.
124. **J. A. G. De Visser and J. Krug** (2014) - *Empirical fitness landscapes and the predictability of evolution*. Nature Reviews Genetics, 15; 7: 480.
125. **A. L. Caplan, *et al.*** (2015) - *No time to waste—the ethical challenges created by CRISPR: CRISPR/Cas, being an efficient, simple, and cheap technology to edit the genome of any organism, raises many ethical and regulatory issues beyond the use to manipulate human germ line cells*. EMBO reports, 16; 11: 1421.
126. **K. A. Oye, *et al.*** (2014) - *Regulating gene drives*. Science, 345; 6197: 626.
127. **S. A. Bustin, *et al.*** (2009) - *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clinical Chemistry, 55; 4: 611.
128. **M. Liew, *et al.*** (2004) - *Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons*. Clinical Chemistry, 50; 7: 1156.
129. **Y. You, *et al.*** (2006) - *Design of LNA probes that improve mismatch discrimination*. Nucleic acids research, 34; 8: e60.
130. **Y. Miyaoka, *et al.*** (2014) - *Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection*. Nature Methods, 11: 291.
131. **European Commission** (2001) - *Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC*. Official Journal of the European Union, L 106/1.
132. **J. D. Wolt, *et al.*** (2016) - *The Regulatory Status of Genome-edited Crops*. Plant Biotechnology Journal, 14; 2: 510.
133. **F. Hartung and J. Schiemann** (2014) - *Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU*. The Plant Journal, 78; 5: 742.
134. **BVL, *et al.*** (2018) - *Bericht zum Sachstand der Regulierung, Deregulierung und Nicht-Regulierung von neuen molekularbiologischen Züchtungstechniken in ausgewählten Drittländern sowie zu Pflanzen, Nutztieren und Heimtieren, die derzeit mit Hilfe der klassischen Gentechnik sowie der neuen molekularbiologischen Züchtungstechniken für die Bereiche Ernährung, Landwirtschaft, Gartenbau sowie Arzneimittelherstellung und -forschung weltweit entwickelt werden*. 07.06.2018. https://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/02_Verbraucher/09_Monitoring_Molekulare_Techniken/gentechnik_molekulare_techniken_node.html
135. **S. Bryan, *et al.*** (2010) - *Oligonucleotide recombination in Gram-negative bacteria*. Molecular Microbiology, 75; 1: 138.
136. **United States Department of Agriculture (USDA)** - *Am I Regulated? - Regulated Article Letters of Inquiry*. 2018. [cited 2018 09.08.2018]; Available from: https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated/Regulated_Article_Letters_of_Inquiry.
137. **P. Wang, *et al.*** (2018) - *High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (Gossypium hirsutum) using CRISPR/Cas9 system*. Plant Biotechnology Journal, 16; 1: 137.
138. **S. Wen, *et al.*** (2018) - *TALEN-mediated targeted mutagenesis of fatty acid desaturase 2 (FAD2) in peanut (Arachis hypogaea L.) promotes the accumulation of oleic acid*. Plant Molecular Biology, 97; 1: 177.
139. **N. J. Sauer, *et al.*** (2016) - *Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants*. Plant Physiology, 170; 4: 1917.
140. **J.-C. Breitler, *et al.*** (2018) - *CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of Coffea canephora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).

141. **B. M. Clasen, *et al.*** (2016) - *Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout*. Plant Biotechnology Journal, 14; 1: 169.
142. **T. Zhu, *et al.*** (1999) - *Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96; 15: 8768.
143. **K. Xie and Y. Yang** (2013) - *RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System*. Molecular Plant, 6; 6: 1975.
144. **Y. Sun, *et al.*** (2017) - *Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes*. Frontiers in Plant Science, 8.
145. **L. Huang, *et al.*** (2018) - *Developing superior alleles of yield genes in rice by artificial mutagenesis using the CRISPR/Cas9 system*. The Crop Journal.
146. **C. Klap, *et al.*** (2017) - *Tomato facultative parthenocarpy results from Sl AGAMOUS-LIKE 6 loss of function*. Plant biotechnology journal, 15; 5: 634.
147. **J. H. Jung and F. Altpeter** (2016) - *TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol*. Plant Molecular Biology, 92; 1: 131.
148. **T. S. Park, *et al.*** (2014) - *Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111; 35: 12716.
149. **Y. Gao, *et al.*** (2017) - *Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects*. Genome Biology, 18; 1: 13.
150. **R. Bevacqua, *et al.*** (2016) - *Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system*. Theriogenology, 86; 8: 1886.
151. **A. Alessio, *et al.*** (2018) - *203 Genome Modifications by Sleeping Beauty Transposition and CRISPR/Cas9 to Improve Cow Milk Composition for Human Consumption*. Reproduction, Fertility and Development, 30; 1: 242.
152. **S. Yu, *et al.*** (2011) - *Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle*. Cell Research, 21: 1638.
153. **S. Moghaddassi, *et al.*** (2014) - *TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin*. PloS one, 9; 2: e89631.
154. **C. Proudfoot, *et al.*** (2015) - *Genome edited sheep and cattle*. Transgenic research, 24; 1: 147.
155. **L. Xu, *et al.*** (2013) - *Targeted myostatin gene editing in multiple mammalian species directed by a single pair of TALE nucleases*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2.
156. **X. Liu, *et al.*** (2013) - *Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows*. Nature communications, 4: 2565.
157. **R. Hu, *et al.*** (2017) - *RAPID COMMUNICATION: Generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system*. Journal of animal science, 95; 5: 2019.
158. **W. R. Li, *et al.*** (2017) - *CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep*. The FEBS journal, 284; 17: 2764.
159. **X. Wang, *et al.*** (2016) - *Disruption of FGF5 in cashmere goats using CRISPR/Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers*. PloS one, 11; 10: e0164640.
160. **X. Wang, *et al.*** (2016) - *Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep*. Scientific Reports, 6: 32271.
161. **H. HAN, *et al.*** (2014) - *One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system*.
162. **C. Zhang, *et al.*** (2014) - *Targeted disruption of the sheep MSTN gene by engineered zinc-finger nucleases*. Molecular Biology Reports, 41; 1: 209.
163. **F. Tanihara, *et al.*** (2016) - *Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs*. Science advances, 2; 9: e1600803.
164. **K. Wang, *et al.*** (2015) - *Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System*. Scientific Reports, 5: 16623.
165. **K. D. Wells, *et al.*** (2017) - *Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Journal of virology, 91; 2: e01521.
166. **M. Li, *et al.*** (2018) - *Site-Specific Fat-1 Knock-In Enables Significant Decrease of n-6PUFAs/n-3PUFAs Ratio in Pigs*. G3: Genes, Genomes, Genetics: g3. 200114.2018.
167. **Q. Zheng, *et al.*** (2017) - *Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity*. Proceedings of the National Academy of Sciences: 201707853.

168. **J. Peng, *et al.*** (2015) - *Production of Human Albumin in Pigs Through CRISPR/Cas9-Mediated Knockin of Human cDNA into Swine Albumin Locus in the Zygotes*. Scientific Reports, 5: 16705.
169. **Y. Bi, *et al.*** (2016) - *Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP*. Scientific Reports, 6: 31729.
170. **Y. Yang, *et al.*** (2016) - *Genetically humanized pigs exclusively expressing human insulin are generated through custom endonuclease-mediated seamless engineering*. Journal of Molecular Cell Biology, 8; 2: 174.
171. **S. Rao, *et al.*** (2016) - *Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets*. Molecular Reproduction and Development, 83; 1: 61.
172. **X. Wang, *et al.*** (2018) - *CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass*. Animal genetics, 49; 1: 43.
173. **R. Guo, *et al.*** (2016) - *Generation and evaluation of myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system*. Scientific reports, 6.
174. **Y. Niu, *et al.*** (2018) - *Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9*. Reproduction, Fertility and Development, 30; 2: 307.
175. **B. Yu, *et al.*** (2016) - *Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats*. BMC developmental biology, 16; 1: 26.
176. **K. Xiong, *et al.*** (2013) - *Targeted editing of goat genome with modular-assembly zinc finger nucleases based on activity prediction by computational molecular modeling*. Molecular biology reports, 40; 7: 4251.
177. **K. Khalil, *et al.*** (2017) - *Generation of Myostatin Gene-Edited Channel Catfish (Ictalurus punctatus) via Zygote Injection of CRISPR/Cas9 System*. Scientific Reports, 7; 1: 7301.
178. **Z. Qin, *et al.*** (2016) - *Editing of the Luteinizing Hormone Gene to Sterilize Channel Catfish, Ictalurus punctatus, Using a Modified Zinc Finger Nuclease Technology with Electroporation*. Marine Biotechnology, 18; 2: 255.
179. **R. B. Edvardsen, *et al.*** (2014) - *Targeted Mutagenesis in Atlantic Salmon (Salmo salar L.) Using the CRISPR/Cas9 System Induces Complete Knockout Individuals in the F0 Generation*. PLOS ONE, 9; 9: e108622.
180. **A. Wargelius, *et al.*** (2016) - *Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon*. Scientific Reports, 6: 21284.
181. **Z. Zhong, *et al.*** (2016) - *Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp*. Scientific Reports, 6: 22953.
182. **A. Aryan, *et al.*** (2013) - *TALEN-Based Gene Disruption in the Dengue Vector Aedes aegypti*. PLOS ONE, 8; 3: e60082.
183. **A. B. Hall, *et al.*** (2015) - *A male-determining factor in the mosquito Aedes aegypti*. Science, 348; 6240: 1268.
184. **Y. Dong, *et al.*** (2018) - *CRISPR/Cas9 -mediated gene knockout of Anopheles gambiae FREP1 suppresses malaria parasite infection*. PLoS pathogens, 14; 3: e1006898.
185. **A. L. Smidler, *et al.*** (2013) - *Targeted Mutagenesis in the Malaria Mosquito Using TALE Nucleases*. PLOS ONE, 8; 8: e74511.
186. **Y. Wang, *et al.*** (2013) - *The CRISPR/Cas System mediates efficient genome engineering in Bombyx mori*. Cell Research, 23: 1414.
187. **J. Xu, *et al.*** (2014) - *Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated female-specific sterility in the silkworm, Bombyx mori*. Insect Molecular Biology, 23; 6: 800.
188. **J. Xu, *et al.*** (2018) - *Mass spider silk production through targeted gene replacement in Bombyx mori*. Proceedings of the National Academy of Sciences.
189. **Q. Yan, *et al.*** (2014) - *Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system*. Cell Regeneration, 3; 1: 12.
190. **T. Sui, *et al.*** (2016) - *CRISPR/Cas9-mediated mutation of PHEX in rabbit recapitulates human X-linked hypophosphatemia (XLH)*. Human molecular genetics, 25; 13: 2661.
191. **J. Song, *et al.*** (2016) - *RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency*. Nature communications, 7: 10548.
192. **H. Wu, *et al.*** (2018) - *Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes genome editing capability in mammalian systems*. Cellular and Molecular Life Sciences.
193. **L. Li, *et al.*** (2017) - *Fumarylacetoacetate hydrolase knockout rabbit model for hereditary tyrosinemia type 1*. Journal of Biological Chemistry: jbc. M116. 764787.
194. **X. Zhou, *et al.*** (2015) - *Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer*. Cellular and Molecular Life Sciences, 72; 6: 1175.

195. **B. Cho, *et al.*** (2018) - *Generation of insulin-deficient piglets by disrupting INS gene using CRISPR/Cas9 system*. Transgenic Research, 27; 3: 289.
196. **A. Hinrichs, *et al.*** (2018) - *Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver*. Molecular Metabolism, 11: 113.
197. **T. Hai, *et al.*** (2014) - *One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system*. Cell research, 24; 3: 372.
198. **C. Quadalti, *et al.*** (2018) - *SURF1 knockout cloned pigs: Early onset of a severe lethal phenotype*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1864; 6: 2131.
199. **D. F. Carlson, *et al.*** (2012) - *Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109; 43: 17382.
200. **Y. Chen, *et al.*** (2015) - *Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9*. Human molecular genetics, 24; 13: 3764.
201. **U. Midic, *et al.*** (2017) - *Quantitative assessment of timing, efficiency, specificity and genetic mosaicism of CRISPR/Cas9-mediated gene editing of hemoglobin beta gene in rhesus monkey embryos*. Human Molecular Genetics, 26; 14: 2678.
202. **H. Liu, *et al.*** (2014) - *TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys*. Cell stem cell, 14; 3: 323.
203. **H. Wan, *et al.*** (2015) - *One-step generation of p53 gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system*. Cell research, 25; 2: 258.
204. **Y. Kang, *et al.*** (2015) - *CRISPR/Cas9-mediated Dax1 knockout in the monkey recapitulates human AHC-HH*. Human Molecular Genetics, 24; 25: 7255.
205. **Q. Ke, *et al.*** (2016) - *TALEN-based generation of a cynomolgus monkey disease model for human microcephaly*. Cell research, 26; 9: 1048.

10 Glossar

DNA-Methylierung

Die Basen Adenin und Cytosin können durch Übertragung von Methylgruppen (-CH_3) zu N^6-Methyladenin, 5-Methylcytosin und N^4-Methylcytosin verändert werden. DNA-Methylierungen haben verschiedene Funktionen: Schutz vor Fremd-DNA, Einfluss auf die Genexpression, Fehlerkorrektur bei der DNA-Replikation und Unterscheidung von mütterlichen und väterlichen Allelen.

Genome Editing

Unter dem Begriff Genome Editing sind neue molekularbiologische Verfahren zusammengefasst, welche zur zielgenauen Veränderung des Erbguts von Organismen eingesetzt werden.

Heteroduplex DNA

Eine Heteroduplex-DNA ist eine doppelsträngige DNA aus zwei DNA-Einzelsträngen unterschiedlicher Herkunft. Dabei kann es einzelne Bereiche geben, die nicht zueinander passen. Hier bilden sich Schleifenstrukturen aus.

Homologe Rekombination

Homologe Rekombination (HR) ist ein Mechanismus zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Ist ein DNA-Doppelstrang mit homologen, d. h. ähnlichen DNA-

Bereichen, vorhanden, wird dieser DNA-Doppelstrang als Vorlage für die Reparatur verwendet. Die beiden DNA-Moleküle nähern sich an und es kommt im Bereich der ähnlichen DNA-Abschnitte zu Crossing Over, also einem Austausch zwischen den beiden DNA-Molekülen.

INDEL

Insertion oder Deletion

IN SILICO

Vorgänge, die am Computer simuliert werden.

NICKASE

Nickasen sind Enzyme, die Einzelstrangbrüche (Nicks) in doppelsträngiger DNA hervorrufen können.

NON-HOMOLOGOUS END JOINING (NHEJ)

NHEJ ist ein Reparaturmechanismus für Schäden an der doppelsträngigen DNA. Dabei werden die beiden DNA-Fragmente bei einem Doppelstrangbruch ohne entsprechende Vorlage wieder zusammengefügt. Bei diesem Vorgang kann es zu Fehlern bei der Reparatur kommen, wodurch Deletionen, Insertionen oder Mutationen entstehen können.

PLEIOTROPE EFFEKTE

Von einem pleiotropen Effekt spricht man, wenn ein Gen mehrere, voneinander unabhängige Merkmale beeinflusst.

SELBSTKLONIERUNG

Bei der Selbstklonierung wird einer Zelle oder einem Organismus genetisches Material entnommen und wieder in Zellen der gleichen oder eng verwandter Arten eingefügt. Zwischen der Entnahme und dem Einfügen können Modifikationen des genetischen Materials vorgenommen werden.

TRANSKRIPTION

Übersetzen der Information der DNA in einen Bauplan (mRNA) für ein Protein bzw. mehrere Proteine.

XENOTRANSPLANTATION

Xenotransplantation ist die Transplantation von Organen oder Gewebeteilen in einen Organismus einer anderen Art (z. B. vom Schwein in den Menschen).

11 Anhang 1 – Genome Editing: Anwendungsbeispiele

Tabelle 4: exemplarische Anwendungen des Genome Editing bei Pflanzen, Säugetieren, Fischen und Insekten (Teile dieser Tabelle stammen aus einem Bericht des Bundeamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), des Julius-Kühn-Instituts (JKI) und des Friedrich-Löffler-Instituts (FLI) im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL); [134]); F&E = Forschung & Entwicklung.

Organismus	Spezies	Modifikation	Technik	Literatur
Bakterien	*E. coli* *P. syringae* *S. flexneri* *S. typhimurium*	Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker Status: F&E	ODM	[135]
Pflanzen	Alfalfa	verringerter Ligningehalt Hersteller: Calyxt Inc. (USA) Status: Phase 1 (von 3; Stand 20.02.2019)	TALEN	[136]
	Baumwolle	*GhCLA1* knock-out; Albino Phänotyp Status: F&E	CRISPR/Cas9	[137]
	Baumwolle	*GhARG* knock-out; laterales Wurzelwachstum Status: F&E	CRISPR/Cas9	[48]
	Erdnuss	*AhFAD2*-Mutation; Ölsäuregehalt Status: F&E	TALEN	[138]
	Flachs	*epsps*-Mutation; Herbizidtoleranz Hersteller: Cibus (USA) Status: Vermarktung geplant für 2019	ODM; CRISPR/Cas9	[139]
	Gerste	Mutation im *HvPAPhy_a*-Promotor; Phytinsäuregehalt Status: F&E	TALEN	[46]
	Kaffee	*CcPDS* knock-out; Albino Phänotyp Status: F&E	CRISPR/Cas9	[140]
	Kartoffel	reduzierte Schwarzfleckigkeit Hersteller: Simplot Plant Science (USA) Status: unbekannt / möglicherweise Marktreife	TALEN	[136]
	Kartoffel	*vInv*-Mutation; verbesserte Lagerungseigenschaften und geringerer Acrylamidgehalt Hersteller: Calyxt Inc. (USA) Status: unbekannt / möglicherweise Marktreife	TALEN	[141]
	Kartoffel	nicht-bräunende Kartoffel Hersteller: Calyxt Inc. (USA) Status: Phase 1 (von 3; Stand 09.08.2018)	TALEN	[136]
	Mais	veränderte Stärkezusammensetzung Hersteller: DuPont Pioneer. (USA) Status: Vermarktung geplant für 2020	CRISPR/Cas9	[136]
	Mais	*ahas*-Mutation; Herbizidtoleranz Status: F&E	ODM	[142]
	Mais	*IPK1* knock-out; modifizierter Phytinsäuregehalt Hersteller: Dow AgroScience (USA) Status: unbekannt / möglicherweise Marktreife	ZFN	[36, 136]
	Raps	*alc* knock-out; Reduktion des Ernteverlusts durch schlagfeste Saat Status: F&E	CRISPR/Cas9	[44]
	Raps	*BnAHAS1C*-Mutation; Herbizidtoleranz Hersteller: Cibus (USA) Status: verfügbar (SU Canola)	ODM	[14]

Organismus	Spezies	Modifikation	Technik	Literatur
	Reis	*OsMPK5*-Mutation; Pilz- und Bakterienresistenz Status: F&E	CRISPR/Cas9	[143]
	Reis	*sbeII*-Mutation; Amylosegehalt Status: F&E	CRISPR/Cas9	[144]
	Reis	*als*-Mutation; Herbizidtoleranz Status: F&E	CRISPR/Cas9	[39]
	Reis	*Gn1a* und *DEP1* knock-out; Ertragssteigerung *OsPDS* knock-out; Albino Phänotyp Status: F&E	CRISPR/Cas9	[145]
	Reis	*als*-Mutation; Herbizidtoleranz Status: F&E	ODM	[35]
	Reis	Mutation im *Os11N3*-Promotor; Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* Hersteller: Iowa State University (USA) Status: unbekannt / möglicherweise Marktreife	TALEN	[41]
	Soja	FAD2-1A- und FAD2-1B-Mutation; Fettsäuremuster Hersteller: Calyxt Inc. (USA) Status: Phase 3 (von 3)	TALEN	[52, 136]
	Soja	*Drb2a* und *Drb2b* knock-out Trockenheits- und Salztoleranz Hersteller: USDA-ARS (USA) Status: unbekannt / möglicherweise Marktreife	CRISPR/Cas9	[136]
	Tabak	*als*-Mutation; Herbizidtoleranz Status: F&E	ZFN	[37]
	Tomate	*rin* knock-out; verlangsamte Fruchtreifung Status: F&E	CRISPR/Cas9	[53]
	Tomate	*SlAGL6* knock-out; kernlose Früchte Status: F&E	CRISPR/Cas9	[146]
	Weizen	*TaMLO*-Mutation; Mehltauresistenz Status: F&E	TALEN	[43]
	Weizen	ballaststoffreicher Weizen Hersteller: Calyxt Inc. (USA) Status: Phase 1 (von 3; Stand 20.02.2019)	TALEN	[136]
	Weizen	*ahas*-Mutation; Herbizidtoleranz Status: F&E	ZFN	[38]
	Zitrone	*CsLOB1* promoter-Mutation; Resistenz gegen *Xanthomonas citri* Status: F&E	CRISPR/Cas9	[42]
	Zuckerrohr	*COMT* knock-out; Lignin-Reduktion Status: F&E	TALEN	[147]
Pilze	Champignons	nicht-bräunende Champignons Hersteller: Pennsylvania State University (USA) Status: unbekannt / möglicherweise Marktreife	CRISPR/Cas9	[51]
Säugetiere	Huhn	embryonale Geschlechtserkennung	SDN-3	[57]
	Huhn	*Ovalbumin*-Gen knock-out	TALEN	[148]
	Rind	*NRAMP1* knock-in Tuberkulose-Resistenz	CRISPR/Cas9-nickase	[149]
	Rind	*PRNP* knock-out / knock-in BSE-Resistenz	CRISPR/Cas9	[150]
	Rind	*β-lactoglubulin* knock-out	CRISPR/Cas9	[151, 152]

Organismus	Spezies	Modifikation	Technik	Literatur
	Rind	Hornlosigkeit	TALEN	[54]
	Rind	*humanes Serum Albumin*-Gen knock-in	TALEN	[153]
	Rind	*myostatin* knock-out	TALEN	[154, 155]
	Rind	*lysostaphin* Insertion Mastitisprävention	ZFN	[156]
	Schaf	*FGF5* knock-out Wollwachstum	CRISPR/Cas9	[157-159]
	Schaf	*myostatin* knock-out	CRISPR/Cas9	[59, 160, 161]
	Schaf	*myostatin* knock-out	ZFN	[162]
	Schwein	*myostatin* knock-out	CRISPR/Cas9	[163, 164]
	Schwein	Unempfänglichkeit gegenüber einer PRRS-Virus-Infektion	CRISPR/Cas9	[61]
	Schwein	Resistenz gegenüber PRRS-Virus-1-Infektion	CRISPR/Cas9	[165]
	Schwein	Resistenz gegenüber PRRS-Virus-Infektion	CRISPR/Cas9	[62]
	Schwein	*fat-1* knock-in Fettsäurezusammensetzung	CRISPR/Cas9	[166]
	Schwein	*mUCP1* knock-in Fettreduktion	CRISPR/Cas9	[167]
	Schwein	Inaktivierung des PER-Virus	CRISPR/Cas9	[63]
	Schwein	*humanes Serum Albumin*-Gen knock-in	CRISPR/Cas9	[168]
	Schwein	*myostatin* knock-out	CRISPR/Cas9 Cre/LoxP	[169]
	Schwein	*Insulin*-Gen Punktmutation (3 Basen) Humanisiertes Schweine-Insulin	CRISPR/Cas9 TALEN	[170]
	Schwein	*myostatin* knock-out	TALEN	[58, 171]
	Ziege	*myostatin* knock-out	CRISPR/Cas9	[60, 172, 173]
	Ziege	*GDF9* Punktmutation – Erhöhung der Nachkommenzahl	CRISPR/Cas9	[174]
	Ziege	Unempfänglichkeit gegenüber Prionenerkrankung	CRISPR/Cas9	[60]
	Ziege	*myostatin* knock-out	TALEN	[175]
	Ziege	*β-lactoglobulin* Allergenreduktion	ZFN	[176]
Fische	getüpfelter Gabelwels	*myostatin* knock-out	CRISPR/Cas9	[177]
	getüpfelter Gabelwels	*Luteinisierungshormon (LH)*-Gen knock-out; Sterilität	ZFN	[178]
	Atlantik-Lachs	*tyr* und *slc45a2* knock-out Albino Phänotyp	CRISPR/Cas9	[179]
	Atlantik-Lachs	*dnd* und *slc45a2* knock-out Sterilität und Albino Phänotyp	CRISPR/Cas9	[180]
	Karpfen	*myostatin* knock-out	CRISPR/Cas9	[181]
Insekten	*Aedes aegypti*	*kmo* knock-out; Augenfarbe	TALEN	[182]
	Aedes aegypti	*nix* knock-out; Geschlechtsbestimmung	CRISPR/Cas9	[183]

Organismus	Spezies	Modifikation	Technik	Literatur
	Anopheles stephensi	Integration von anti-*Plasmodium falciparum* Effectorgenen	CRISPR/Cas9	[86]
	Anopheles gambiae	*AGAP007280; weibliche Sterilität; Gene Drive*	CRISPR/Cas9	[87]
	Anopheles gambiae	*FREP1* knock-out; reduzierte Infektionsraten mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium berghei*	CRISPR/Cas9	[184]
	Anopheles gambiae	*TEP1* knockout; Überempfindlichkeit gegenüber *Plasmodium berghei*	TALEN	[185]
	Bombyx mori	*BmBLOS2* knock-out; ‚oily skin' Phänotyp	CRISPR/Cas9	[186]
	Bombyx mori	*BmDSX* knock-out; weibliche Sterilität	TALEN	[187]
	Bombyx mori	*FibH*-Substitution durch Konstrukt *MaSp1-FibH*	TALEN	[188]

12 Anhang 2 – Genome Editing: Tiermodelle für humane Erkankungen

Tabelle 5: Beispiele für genomeditierte Tiermodelle zur Erforschung und Behandlung von humanen Erkrankungen (Teile dieser Tabelle stammen aus einem Bericht des Bundeamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), des Julius-Kühn-Instituts (JKI) und des Friedrich-Löffler-Instituts (FLI) im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL); [134]).

Spezies	Gen / Modifikation	Krankheit	Technik	Literatur
Kaninchen	*IL2RG* und *RAG1* knock-out	Immundefizienz	CRISPR/Cas9	[189]
	PHEX knock-out	Phosphatdiabetes	CRISPR/Cas9	[190]
	humanes APOAII knock-in	Hypercholesterinämie	CRISPR/Cas9 TALEN	[191]
	WRN knock-out	Werner-Syndrom	CRISPR/Cpf1	[192]
	fumarylacetoacetat hydroxylase knock-out	Tyrosinämie Typ I	TALEN	[193]
Schwein	*PARK2* und *PINK1* knock-out	Parkinson	CRISPR/Cas9	[194]
	INS knock-out	Diabetes	CRISPR/Cas9	[195]
	GRH knock-out	Laron-Syndrom	CRISPR/Cas9	[196]
	vWF knock-out	Von-Willebrand-Syndrom	CRISPR/Cas9	[197]
	SURF1 knock-out	Leigh-Syndrom	CRISPR/Cas9 TALEN	[198]
	DAZL und APC knock-out	Azoospermie Darmkrebs	TALEN	[55]
	LDL-Rezeptor knock-out	Hypercholesterinämie	TALEN	[199]
Rhesus-Affe	*DMD* knock-out	Duchenne Muskeldystrophie	CRISPR/Cas9	[200]
	β-hämoglobin knock-out	Sichelzellanämie β-Thalassämie	CRISPR/Cas9	[201]
	MECP2 knock-out	Rett-Syndrom	TALEN	[202]
Javaneraffe	*p53* knock-out	Krebs	CRISPR/Cas9	[203]
	MECP2 knock-out	Rett-Syndrom	TALEN	[202]
	Dax1 knock-out	Kongenitale Nebennieren-Hypoplasie und Hypogonadotroper Hypogonadismus	CRISPR/Cas9	[204]
	MCPH1 Mutation	Mikrozephalie	TALEN	[205]

Schriftenreihe Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz

Bisher sind in dieser Schriftenreihe folgende Bände erschienen:

Band 1:	Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005 (2006)
Band 2:	2. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007 (2008)
Band 3:	3. Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ Fortbildungsveranstaltung in Oberschleißheim am 02. Dezember 2009 (2010)
Band 4:	Überwachung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut in Bayern (April 2019 – 3. Auflage, inhaltlich veränderter Nachdruck der 2. Auflage vom Juli 2011)
Band 5:	Nachweis von nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Organismen (GVO); Weltweite Ermittlung, Importanalyse und Entwicklung von Nachweis-Methoden (2011)
Band 6:	4. Fachtagung in Oberschleißheim am 30. November 2011 (2012)
Band 7:	Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen (2013)
Band 8:	5. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 26. November 2013 (2014)
Band 9:	6. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 17. November 2015 (2016)
Band 10:	7. Fachtagung Gentechnik „Synthetische Biologie“ in Oberschleißheim am 8. November 2017 (2018)

sowie der vorliegende Band:

Band 11:	Genome Editing (2019)

Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de