

LGL

8. Fachtagung Gentechnik

„Neue molekularbiologische Techniken
und deren Herausforderungen
für die Analytik“

Oberschleißheim, 23. Oktober 2019

Band 12 der Schriftenreihe
Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz

Wir danken dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) für die Unterstützung bei der Durchführung der Fachtagung Gentechnik am LGL.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit haben wir auf die gleichzeitige Verwendung geschlechtsspezifischer Schreibformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

Herausgeber: 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

Druck: Osterchrist druck und medien GmbH, Nürnberg
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
S. 5/6/8/10/14: © Angelina Schindele, Patrick Schindele, Holger Puchta;
Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe; S. 17-38: © Eckhard Wolf;
Genzentrum der Universität München (LMU); S. 51-58: © Christopher
Weidner; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
(BVL); S. 60-62/65/69/70: © Georg Oberhofer, Ernst A. Wimmer; Califor-
nia Institute of Technology, Pasadena, USA; Georg-August-Universität
Göttingen; S. 73/77/79/84: © Sören Lukas Hellmann, Robin Kobus,
Bertil Schmidt, Sven Bikar, René Köppel und Thomas Hankeln;
Johannes Gutenberg-Universität Mainz; StarSEQ GmbH; Kantonales
Labor Zürich, Schweiz

Stand: Juli 2020
Autoren: Dr. Patrick Gürtler, Dr. Ottmar Goerlich und Dr. Armin Baiker

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Armin Baiker
Telefon: 09131 6808-5291; E-Mail: armin.baiker@lgl.bayern.de

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
alle Rechte vorbehalten

Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

ISSN 1866-7767 Druckausgabe ISBN 978-3-96151-076-4 Druckausgabe
ISSN 1866-7775 Internetausgabe ISBN 978-3-96151-077-1 Internetausgabe

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 direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

8. Fachtagung Gentechnik
„Neue molekularbiologische Techniken
(Genomeditierung, CRISPR/Cas & Co)
und deren Herausforderungen für die Analytik“
in Oberschleißheim, am 23. Oktober 2019

Vorwort

Sehr geehrte Damen und Herren,

neue molekularbiologischen Techniken wie CRISPR/Cas haben die anwendungsorientierte Grundlagenforschung nachhaltig verändert. Sie bieten Chancen, bergen Risiken und stellen dadurch auch die amtliche Überwachung vor große Herausforderungen.

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) hat diese Thematik aufgegriffen und am 23.10.2019 am Standort Oberschleißheim die 8. Fachtagung Gentechnik mit dem Schwerpunkt „Neue molekularbiologische Techniken (Genomeditierung, CRISPR/Cas & Co) und deren Herausforderungen für die Analytik“ ausgerichtet. Die Aktualität und das große öffentliche Interesse an diesem Thema zeigte sich insbesondere daran, dass die Veranstaltung bis auf den letzten Platz ausgebucht war und mit mehr als 150 Teilnehmerinnen und Teilnehmern ein neuer Besucherrekord erzielt wurde.

Zahlreiche renommierte Dozenten aus Universitäten, Behörden und Forschungseinrichtungen referierten zu verschiedenen Aspekten der neuen molekularbiologischen Techniken (NMT) und der Genomeditierung.

Im ersten Themenblock wurde den Teilnehmerinnen und Teilnehmern der Veranstaltung ein verständlicher Überblick über die Funktionsweise der NMT und über Anwendungsmöglichkeiten der Genomeditierung vermittelt. Herr Prof. Dr. Holger Puchta vom Karlsruher Institut für Technologie (KIT) vermittelte in seinem Vortrag anschaulich, wie CRISPR/Cas zu einer Revolution in der Pflanzenzüchtung beigetragen hat. Direkt im Anschluss referierte Herr Prof. Dr. Eckhard Wolf vom Genzentrum der Universität München (LMU) über aktuelle Anwendungsmöglichkeiten der Genomeditierung bei Tieren. Zum Abschluss des ersten Themenblocks referierte Herr Prof. Dr. Ernst Wimmer über Mechanismen und Anwendungen des „Gene Drive“. Da er nicht persönlich anwesend sein konnte, wurde sein interessanter Vortrag live übers Internet zugeschaltet.

Im zweiten Themenblock standen insbesondere die rechtlichen Aspekte der Anwendung der neuen molekularbiologischen Techniken und deren Herausforderungen für die Analytik im Fokus der Beiträge.



So erläuterte Herr Prof. Dr. Hans-Georg Dederer von der Universität Passau das EuGH-Urteil vom 25.07.2018 und führte die Folgen dieses Urteils für die Rechtslage nach dem Gentechnikrecht aus. Den Abschluss des zweiten Themenblocks bildete ein Vortrag von Herrn Dr. Christopher Weidner vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), in dem die Herausforderungen der neuen molekularbiologischen Techniken für die Analytik ausgeführt wurden.

Im dritten Block wurden Themen aus dem Bereich der Analytik und aktueller Forschungsprojekte vorgestellt. So berichtete Herr Prof. Dr. Thomas Hankeln von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in einem kurzweiligen Vortrag über die Anwendung des „Next Generation Sequencing“ (NGS) für die Authentizitäts-Überprüfung von Lebensmitteln. Im Anschluss daran stellte Frau Dr. Christin-Kirsty Baillie (LGL, Oberschleißheim) Strategien zum Nachweis von Punktmutationen am Beispiel des Cibus-Raps vor. Mit einem Vortrag von Herrn Dr. Wolfram Volkwein (LGL, Oberschleißheim) über den aktuellen Entwicklungsstand der synthetischen Biologie wurde die rundum gelungene Veranstaltung beendet.

Einen besonderen Dank möchten wir dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) aussprechen, für die Förderung verschiedener Forschungsprojekte zum Thema neue molekularbiologische Techniken, sowie für die finanzielle Unterstützung der 8. Fachtagung Gentechnik.

Ich wünsche Ihnen eine interessante Lektüre und hoffe, dass diese Ihnen wertvolle Hinweise für Ihre Arbeit geben kann.

Erlangen, am 1. Oktober 2020

Ihr



Walter Jonas

Leiter des Bayerischen Landesamtes für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Inhaltsverzeichnis

1	CRISPR/Cas und die Revolution in der Pflanzenzüchtung	7
1.1	Klassische Züchtung und Gentechnik.....	7
1.2	Genome Editing (Enzymatische DSB Induktion und synthetische Nukleasen).....	9
1.3	Gerichtete Mutagenese mittels CRISPR/Cas	11
1.4	Meilensteine der CRISPR/Cas-vermittelten Pflanzenzüchtung	13
1.5	Literatur	17
2	Genomeditierung bei Tieren	19
3	Das EuGH-Urteil vom 25.7.2018 und dessen Folgen für die Rechtslage nach dem Gentechnikrecht	41
3.1	Urteil des EuGH vom 25.7.2018	41
3.2	Folgen für die Rechtslage nach dem Gentechnikrecht	46
3.3	Erstreckung auf das „geschlossene System“	51
4	Neue Molekularbiologische Techniken: Herausforderungen für die Analytik – Aktivitäten des NRL GVO	53
4.1	Zusammenfassung.....	53
4.2	Referenzen.....	61
5	Gene Drives und Schädlingsbekämpfung	62
5.1	Selbstsüchtige Gene verursachen natürliche Gene Drives	62
5.2	Nutzung von Gene Drives für die Schädlingsbekämpfung	65
5.3	Kontrollierbarkeit von Gene Drives	69
5.4	Literatur	73
6	All-Food-Seq: Next Generation Sequencing-basiertes Screeningverfahren zur quantifizierbaren Speziesidentifikation in prozessierten Lebensmitteln	74
6.1	DNA-basierte Speziesidentifikation: ein unverzichtbares Werkzeug der Lebensmittelüberwachung	74
6.2	All-Food-Sequencing: Gesamt-genomisches NGS-basiertes Lebensmittel-Screening	77
6.3	AFS liefert exaktere Resultate als qPCR	80
6.4	AFS identifiziert „exotische“ Komponenten in der Praxis.....	82
6.5	Bakterien- und Phagen-Detektion ohne Mehraufwand	83
6.6	Limitation durch Referenzgenome	83

6.7	Schnellere Analysen durch algorithmische Weiterentwicklung.....	84
6.8	Kosten der AFS.....	87
6.9	Zusammenfassung und Ausblick	87
6.10	Danksagung	88
6.11	Quellen.....	88
7	Mit neuen molekularbiologischen Techniken genetisch veränderte Organismen: Regulatorischer Status und Entwicklung von Nachweismethoden.....	92
7.1	Zusammenfassung.....	92
7.2	Literatur	101
8	Entwicklungsstand der Synthetischen Biologie und Strategien für die analytische Überwachung	102
8.1	Einleitung	102
8.2	Forschungsgebiete der Synthetischen Biologie.....	102
8.3	Regulierung der Synthetischen Biologie in Deutschland	106
8.4	Strategien zur Analytischen Überwachung	106
8.5	Literatur	109

1 CRISPR/Cas und die Revolution in der Pflanzenzüchtung

Angelina Schindele, Patrick Schindele und Holger Puchta

Botanisches Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe

1.1 Klassische Züchtung und Gentechnik

Die natürliche Variabilität vieler Pflanzenarten beruht auf der Veränderung des genetischen Codes durch Mutationen und Selektionsstress durch die Umwelt. Diese natürlichen Mutationen entstehen durch exogene so wie endogene Faktoren, wie UV-Strahlung oder Sauerstoffradikale aus zelleigenen Stoffwechselwegen, welche die DNA angreifen und auf verschiedene Arten schädigen können (Pacher und Puchta 2017). Während DNA Einzelstrangbrüche für den Organismus einfach zu reparieren sind, da hierbei der unbeschädigte Strang als Matrice fungieren kann, ist die Reparatur eines DNA Doppelstrangbruchs (DSB) aufwändiger und komplexer für die Zelle. Ein DSB kann entweder über den fehlerfreien Reparaturweg der Homologen Rekombination (HR) oder über den fehleranfälligen Weg der nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) behoben werden (**Abb. 1**).

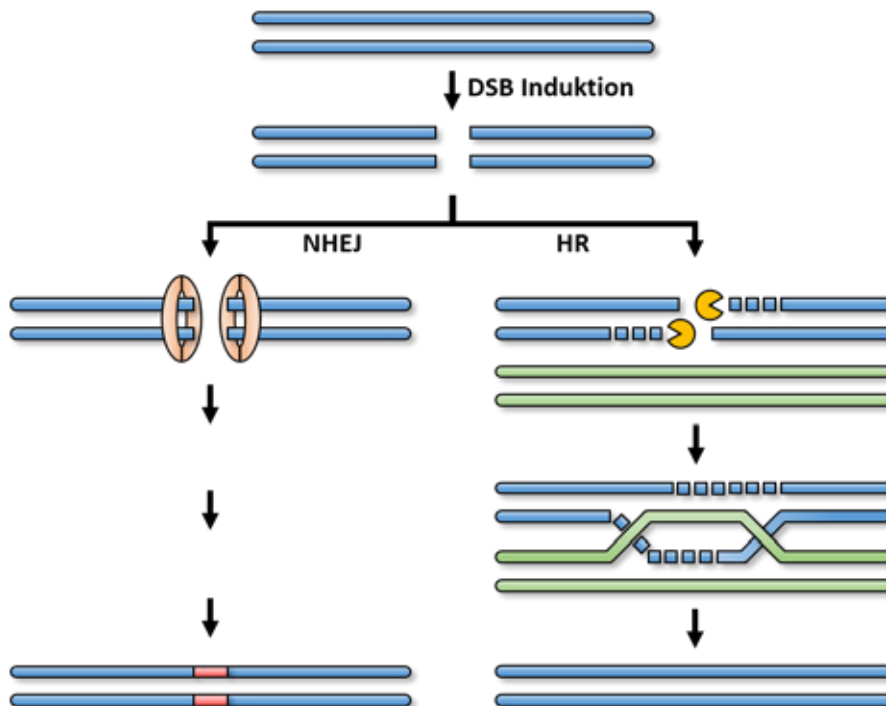


Abbildung 1: DNA Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur: DNA DSB können über zwei unterschiedliche Mechanismen repariert werden. Beim klassischen NHEJ werden die entstandenen Bruchenden ohne Berücksichtigung von Homologien wieder zusammengefügt. Aufgrund gewisser Prozessierung kann es dabei zu Sequenz-Veränderungen kommen. Bei der HR werden homologe Sequenzen für die Reparatur verwendet, sodass der DSB in der Regel ohne Sequenz-Veränderungen repariert wird. In Pflanzen stellt das NHEJ den Hauptweg der DSB Reparatur dar.

In Pflanzen stellt dabei NHEJ den Hauptmechanismus zur Reparatur eines DSB dar, sodass genetische Variationen, wie Deletionen, Insertionen oder Substitutionen in einer Vielzahl auftauchen können. Pflanzen, die durch diese Mutationen agronomisch vorteilhafte Eigenschaften entwickelten, wie beispielsweise große Früchte, verringerte Pflanzengröße oder Ertragssteigerung, wurden weiter kultiviert (Pacher und Puchta 2017). Neben gezielter Selektion dieser Pflanzen wurden auch Pflanzen mit verschiedenen vorteilhaften Merkmalen gekreuzt, um neue Sorten zu generieren, die noch besser an biotische und abiotische Umweltfaktoren angepasst sind und agronomisch wertvolle Eigenschaften liefern. Die Kreuzungszüchtung stellt die weitverbreitetste Zuchtform dar, mit dem Vorteil auch wertvolle Merkmale verwandter Arten einkreuzen zu können (**Abb. 2A**). Zum einen muss jedoch eine Vielzahl an gekreuzten Pflanzen produziert werden, um die seltenen Ereignisse zu generieren, zum anderen ist es sehr zeitaufwendig die entsprechende Pflanze auch zu identifizieren. Weiterhin können auch nachteilige Merkmale der Eltern an die Nachkommen weitergegeben werden oder es können durch Rekombination der elterlichen Allele neue nachteilige Merkmale entstehen. Da sich aber nicht alle negativen Merkmale phänotypisch ausdrücken, können diese in die nächste Generation gelangen und sich in der Pflanze etablieren. Dies geschah beispielsweise bei der Domestikation der Tomatenpflanze, wobei die Selektion nach gleichmäßig gefärbten Tomatenfrüchten ebenso den Verlust von Geschmacksstoffen zur Folge hatte.

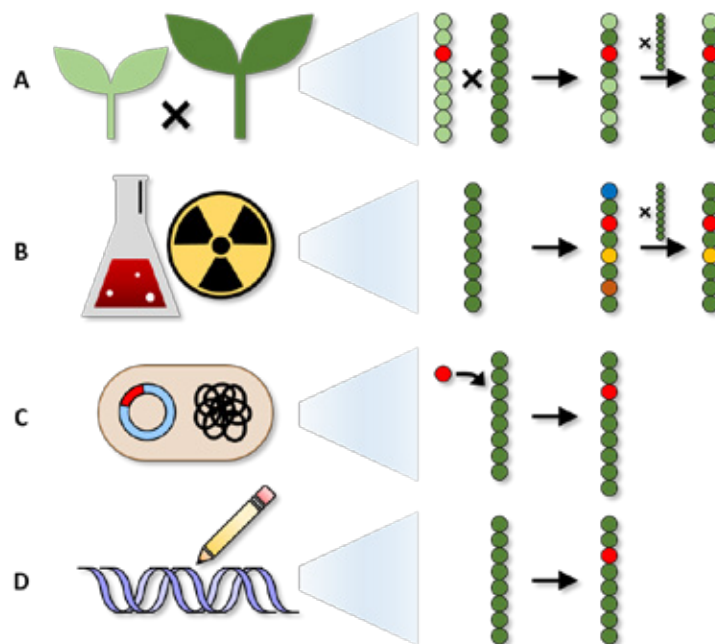


Abbildung 2: Methoden der Pflanzenzüchtung: In der Kreuzungszüchtung werden artverwandte Pflanzen miteinander gekreuzt, um positive Merkmale der einen Pflanze auf die andere zu übertragen (A). In der Mutagenesezüchtung werden mittels chemischen oder physikalischen Mutagenen Mutationen im Pflanzengenom induziert, um positive Merkmale zu etablieren (B). Bei beiden Züchtungsmethoden werden zusätzliche, meist ungewünschte Merkmale übertragen bzw. induziert, die über langwierige Rückkreuzungsverfahren entfernt werden müssen. Bei der klassischen Gentechnik werden artfremde Gene als Transgen ins Pflanzengenom übertragen (C). Beim Genome Editing werden endogene Sequenzen sequenz-spezifisch editiert, ohne artfremde DNA zu übertragen.

Ab Anfang der 1920er Jahre wurde die Mutagenesezüchtung entwickelt, bei welcher genetische Veränderungen durch chemische Mutagene oder ionisierende Strahlung bewirkt werden (Pacher und Puchta 2017) (**Abb. 2B**). Diese Behandlungen induzieren tausende Mutationen simultan, sodass im Anschluss die Pflanzen identifiziert werden müssen, die auf diese Weise vorteilhafte phänotypische Merkmale ausgeprägt haben. Weltweit existieren über 3000 Nutzpflanzensorten die mittels ionisierender Strahlung erzeugt wurden. Darunter zählen viele Hartweizensorten, wie Buchweizen, aber auch viele Hülsenfrüchte, Gemüsesorten und Obstsorten, wie die Grapefruit-Sorten Star Ruby und Ruby Red. Da bei der klassischen Mutagenesezüchtung die Mutationen jedoch ungezielt und ungerichtet eingefügt werden, kommt es vor, dass auch Gene zum Nachteil verändert werden. Diese müssen durch aufwändiges Rückkreuzen und Screening wieder entfernt werden. Wie bei der Kreuzungszüchtung können somit auch hier Mutationen entstehen, die nicht phänotypisch erkannt werden können, und somit in die nächsten Generationen vererbt werden. Die veränderten Pflanzen gelten nicht als „gentechnisch manipulierte“ Organismen.

Im Vergleich zur klassischen Mutagenese, beschreibt die klassische Gentechnik das Einbringen von artfremden Genen in einen Organismus (**Abb. 2C**). Dabei werden die gewünschten Gene zusammen mit ihren regulatorischen Elementen in rekombinanter DNA zusammengeführt und in das Zielgenom eingebracht. Dies geschieht unter anderem durch die Methode der Agrobakterium-vermittelten Transformation. *Agrobacterium tumefaciens* ist ein pflanzenpathogenes Bodenbakterium, welches mittels seiner extrachromosomalen T-DNA Tumore in Pflanzen induziert. Die tumorinduzierenden Gene können im Labor durch die jeweils gewünschten Gene ausgetauscht werden und somit ins pflanzliche Zielgenom eingeführt werden. Da die generierten Pflanzen artfremde DNA enthalten, werden sie als GVO (gentechnisch veränderte Organismen) eingestuft. Der Anbau dieser Pflanzen ist nur in einigen Ländern, wie beispielsweise Süd- und Nordamerika erlaubt. In den EU-Mitgliedsstaaten beschränkt sich der Anbau von GVOs vor allem auf Spanien.

1.2 Genome Editing (Enzymatische DSB Induktion und synthetische Nukleasen)

Im Gegensatz zur klassischen Mutagenesezüchtung kann mittels des *Genome Editing* (GE) Ansatzes das Genom zielgerichtet und präzise verändert werden, um neue vorteilhafte Merkmale zu erzeugen (**Abb. 2D**). Dabei liegt dieser Methode dasselbe Prinzip, nämlich die DSB Induktion und zelleigene Reparatur via HR oder NHEJ zugrunde. HR kann für die Integration von Mutationen ausgenutzt werden, wenn dem Reparaturapparat ein Homologieaufweisendes DNA Fragment bereitgestellt wird, das neue Sequenzinformation enthält. So können spezifische Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in das Genom eingeführt werden. DSB Reparatur über NHEJ in dem offenen Leserahmen eines Gens, kann zu des-

sen Verschiebung führen, was zumeist in einem verfrühten Stopcodon resultiert und damit in der Expression eines nicht-funktionellen Proteins. Voraussetzung für diese gezielten Ansätze ist die sequenzspezifische DSB Induktion, die durch den Einsatz sequenzspezifischer Nukleasen erreicht wird.

Die ersten Ansätze basierten auf der Verwendung von natürlich vorkommenden Nukleasen, den sogenannten Meganukleasen, wie I-SceI aus Hefe (Perrin et al. 1993; Puchta et al. 1993) (**Abb. 3**). Diese umfassen eine Erkennungssequenz zwischen 18 und 40 Nukleotiden, was sie hoch spezifisch macht, gleichzeitig aber die Anzahl an möglichen Zielsequenzen begrenzt. Um die Auswahl der Schnittstellen zu erhöhen, wurden die Meganukleasen auf verschiedene Weisen modifiziert. So wurde beispielsweise die Aminosäuresequenz der Nukleasen verändert, um neue Zielsequenzen erkennen zu können (Argast et al. 1998). Da allerdings die DNA-Bindedomäne und die katalytisch aktive Domäne des Enzyms überlappen, führt eine Veränderung der DNA-Bindedomäne auch zur Veränderung der katalytischen Aktivität und somit zur Beeinträchtigung der Schnitteffizienz (Thompson et al. 1992).

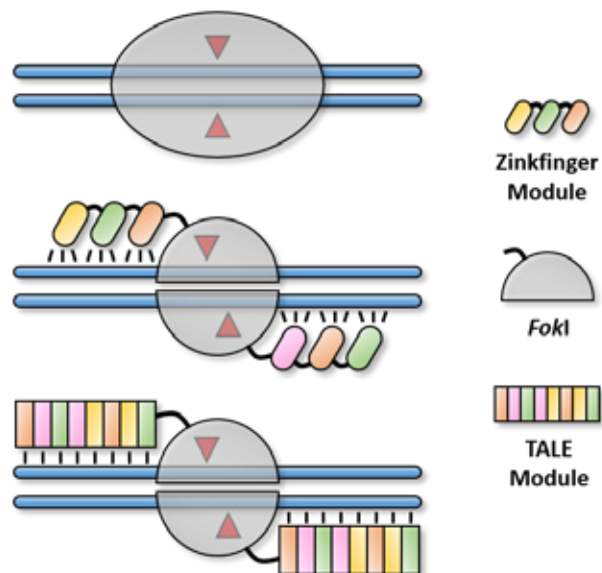


Abbildung 3: Synthetische Nukleasen: Meganukleasen (Oben) sind natürlich-vorkommende Nukleasen, die einen DSB in einer festgelegten Erkennungssequenz induzieren, aufgrund dessen aber nur sehr bedingt an andere Zielstellen angepasst werden können. ZFN (Mitte) und TALENs (Unten) bestehen aus dem Restriktionsenzym Fok1, das an eine bestimmte DNA-Bindedomäne fusioniert ist. ZFN verwenden Zinkfinger als DNA-Bindedomäne, wobei ein Zinkfinger Modul 3 Basen der DNA erkennt. TALENs verwenden TALEs als DNA-Bindedomäne, wobei ein TALE Modul eine Base der DNA erkennt.

Besser eignen sich künstlich hergestellte Nukleasen, die Zinkfingernukleasen (ZFNs) und die TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*), um DSB in die DNA einzufügen (**Abb. 3**). In beiden Systemen beruht die katalytische Aktivität auf dem TypII-S-

Restriktionsenzym FokI, welches als Dimer die DNA schneidet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zielspezifität von FokI beeinflusst werden kann, wenn die Endonukleasedomäne des Enzyms an andere DNA-Bindedomänen gekoppelt wird (Li et al. 1992). Bei den ZFN ist eine bestimmte Abfolge mehrerer Zinkfinger-Domänen an FokI gekoppelt. Ein Zinkfinger besteht aus etwa 30 Aminosäuren, die über ihre Seitenketten mit drei bis vier Nukleotiden der DNA interagieren. ZFN bestehen demnach aus zwei Monomeren, die jeweils aus einem Set von mindestens drei Zinkfingern, gekoppelt an eine Nukleasedomäne, aufgebaut sind (Kim et al. 1996). Dieses System erwies sich jedoch als störanfällig, da einzelne Zinkfingerdomänen miteinander interagieren können und gleichzeitig interaktionsfreie Varianten in einer verringerten Schnitteffizienz resultieren (Isalan et al. 1997).

Die DNA-Bindeeffektoren, die bei den TALENs zum Einsatz kommen, stammen ursprünglich aus pflanzenpathogenen Bakterien und fungieren hierbei als Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren. TALENs besitzen eine DNA-Bindedomäne bestehend aus bis zu 30 Tandemwiederholungen dieser Effektoren, die aus jeweils circa 34 Aminosäuren aufgebaut sind (Boch et al. 2009). Die Sequenz der einzelnen Module ist dabei hoch konserviert mit Ausnahme der Aminosäuren 12 und 13, die die Nukleotidspezifität vermitteln und deren Anpassung dementsprechend die Zielsequenz vorgibt (Herbers et al. 1992). Durch ihren modularen Aufbau kann theoretisch jede Zielsequenz anvisiert werden. Da die TAL-Effektoren ebenso wie die Zinkfinger an FokI fusioniert sind, muss es somit auch zur Dimerisierung zweier Nukleasedomänen der TALENs kommen, damit ein DSB induziert werden kann. Durch speziell angepasste Klonierungsprotokolle wurde der Zeitaufwand zur Assemblierung von TALENs minimiert, sodass der limitierende Faktor lediglich die Transformation in den jeweiligen Zielorganismus darstellt (Cermak et al. 2011).

1.3 Gerichtete Mutagenese mittels CRISPR/Cas

Die Verwendung des CRISPR/Cas-Systems als molekulare Schere revolutionierte die Molekularbiologie (Cathomen und Puchta 2018). Dieses System stammt ursprünglich aus Prokaryoten und dient als adaptives Immunsystem gegen invasive Fremd-DNA. Das am besten charakterisierte und meistverwendete System ist das CRISPR/Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*. Eindringende Fremd-DNA wird zunächst in den CRISPR-Lokus des Wirtsgenoms als sogenannter Spacer integriert.

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) beschreibt dabei die charakteristischen Sequenzwiederholungen, welche durch die integrierten *Spacer* (nicht-repetitive Sequenzen) getrennt sind. Kommt es zur erneuten Infektion durch invasive DNA, wird der CRISPR-Lokus transkribiert und prozessiert, sodass kleine RNA Fragmente, die crRNAs, entstehen. Diese bestehen aus dem variablen 20 nt langen *Spacer* und einem konstanten Teil. Der konstante Teil ermöglicht die Bindung an eine weitere RNA, die tracrRNA, welche die Interaktion zur RNA-gesteuerten Cas9-Endonuklease vermittelt. Dieser 3-Komponenten Komplex bindet mittels des *Spacer* sequenz-spezifisch an die invasive DNA und induziert einen DSB (Schindele et al. 2018).

Damit dieser Komplex nicht den integrierten *Spacer* im CRISPR-Lokus schneidet, ist ein kurzes Motiv, das *protospacer-adjacent motif* (PAM) stromabwärts der Zielsequenz für die DSB Induktion essentiell. Für den Laborbedarf wurde die tracrRNA und die crRNA zu einer single-guide RNA (sgRNA oder gRNA) fusioniert und dadurch ein 2-Komponenten System etabliert (Jinek et al. 2012) (**Abb. 4**). Abhängig vom PAM kann durch die Wahl der passenden Zielsequenz fast jede Stelle im Genom adressiert werden. Der DSB wird drei Nukleotide stromaufwärts des PAM, in Form eines glatten Bruchs, induziert.

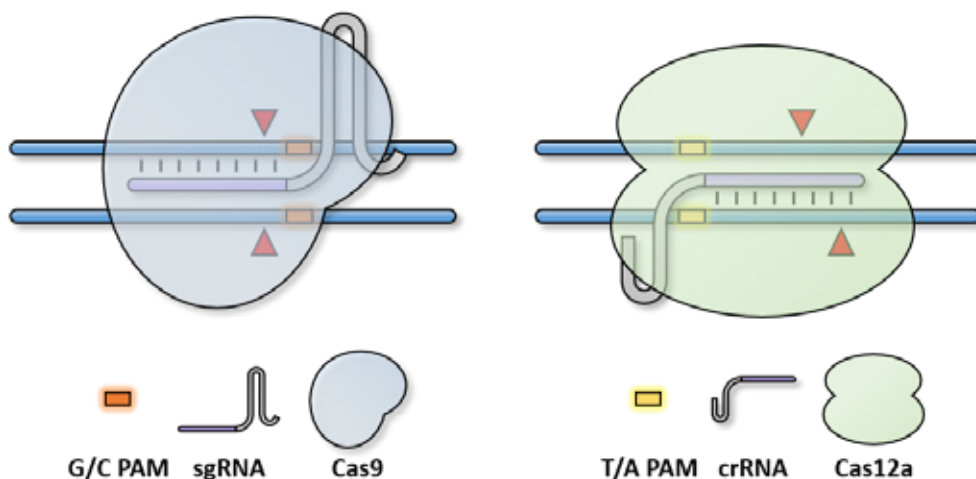


Abbildung 4: Das CRISPR/Cas-System: Das CRISPR/Cas9-System (Links) war das erste CRISPR-System, das charakterisiert und für den Laborgebrauch adaptiert wurde. Das adaptierte System besteht aus der Cas9 Nuklease und einer sgRNA, die die Zielspezifität des Systems gewährleistet. Ausschließlich ein kurzes, GC-reiches PAM benachbart der Zielsequenz ist notwendig, dass ein DNA DSB induziert werden kann. Das CRISPR/Cas12a-System (Rechts) ermöglicht ebenfalls die Induktion eines DNA DSB, mit dem Unterschied, dass ein TA-reiches PAM benachbart der Zielsequenz vorliegen muss.

Neben dem Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* gibt es auch weitere Cas9 Orthologe, die sich vor allem in der Arbeit mit Pflanzen bewährt haben (Li et al. 2013). So konnte gezeigt werden, dass das Cas9 aus *Staphylococcus aureus* im Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* wesentlich effizienter schneidet (Steinert et al. 2015).

Aber auch andere CRISPR/Cas-Systeme, wie das Cas12a-System haben Vorteile gegenüber den ursprünglich charakterisierten Systemen (Zetsche et al. 2015). So stellt das Cas12a-System ursprünglich ein 2-Komponenten System dar, das mit nur einer crRNA funktioniert und weist zudem andere Anforderungen an das PAM auf als das Cas9-System. Während Cas9 für G/C-reiche Sequenzen vorteilhaft ist, können mit dem Cas12a-System auch A/T-reiche Bereiche adressiert werden. Dies hat den Vorteil, dass Introns oder Promotor-Regionen, die durch ihre A/T-reiche Sequenz dem Cas9 System nicht zugänglich waren, nun anvisiert werden können. Ein wichtiger Unterschied besteht weiterhin in der Induktion des DSB, dieser wird nämlich distal des PAMs induziert und resultiert dabei in Bruchenden mit Einzelstrangüberhängen (Schindele et al. 2018) (**Abb. 4**). Das weite Spektrum an verschiedenen CRISPR/Cas-Systemen für unterschiedlichste Anforderungen, als auch die günstige und zeitsparende Generierung der Konstrukte machen es zu einem anwendungsfreundlichen Werkzeug.

Mutationen, die durch das CRISPR/Cas-System induziert wurden, lassen sich molekular nicht von natürlich vorkommenden Mutationen unterscheiden. Zudem ist durch entsprechende Selektion der editierten Pflanzen im Nachhinein kein Transgen mehr nachweisbar. Es ist somit nahezu ausgeschlossen, eine mittels GE editierte Pflanze, die nicht als solche deklariert ist, zu erkennen. Dies ist nur bei der klassischen Gentechnik möglich, bei der artfremde DNA im Genom verbleibt und schließlich nachgewiesen werden kann. Aufbauend auf diesen Tatsachen, wurden genom-editierte Kulturpflanzen in einigen Ländern, wie den USA, Kanada, Argentinien und Israel nicht als GVO eingestuft, sondern den Pflanzen der klassischen Züchtung gleichgestellt. Im Gegensatz dazu stuft die EU grundsätzlich alle gentechnisch modifizierten Pflanzen als GVO ein. Neue Methoden, wie das hochspezifische CRISPR/Cas-System fallen demnach unter die GVO Verordnung.

Absurderweise werden Pflanzen, die mit etablierten - extrem unspezifischen - Methoden, wie Mutagenesezüchtung, erzeugt wurden und sich als sicher erwiesen haben, von dieser Klassifizierung ausgenommen.

1.4 Meilensteine der CRISPR/Cas-vermittelten Pflanzenzüchtung

Obwohl in der EU die CRISPR/Cas-basierte Pflanzenzüchtung kaum möglich ist, konnten weltweit schon erstaunliche Forschungsergebnisse erzielt werden, die durch klassische Verfahren kaum hätten erreicht werden können. Dabei fokussiert sich die Forschung vor allem auf die Ertragssteigerung und Verbesserung der Produktqualität, sowie die bessere Anpassung an biotische und abiotische Faktoren.

In Reis konnte beispielsweise durch die simultane Mutagenese dreier verschiedener, ertrags-beeinflussender Gene, editierte Pflanzen mit gesteigerten Ertragsseigenschaften hergestellt werden. Die Dreifachmutante wies eine höhere Ertragsausbeute auf, inklusive verlängerter Rispen, gesteigerter Körneranzahl pro Ripse, sowie einer Zunahme an Kornlänge, -breite und -gewicht (Zhou et al. 2019). Mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems können insbesondere auch agronomische Anforderungen in Bezug auf polyploide Nutzpflanzen adressiert werden. So produziert die hexaploide Pflanze *Camelina sativais* bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wobei jedoch die vermehrte Produktion von einfach ungesättigten Fettsäuren gewünscht ist. Um dem nachzukommen, wurden drei Gene, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind, mit dem CRISPR/Cas-System simultan adressiert. Heraus kamen verschiedene Kombinationen an Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten, die stark in ihren Fettsäureprofilen variieren, von etwa 10 % einfach gesättigten Fettsäuren vergleichbar zum Wildtyp bis hin zu 62 % einfach gesättigter Fettsäuren in Dreifachmutanten (Morineau et al. 2017).

Der komplette Knock-Out von bestimmten Genen kann in manchen Fällen zu pleiotropen Effekten führen. In diesem Sinne ist ein weiterer Durchbruch in der Pflanzenzüchtung das Editieren von cis-regulatorischen Elementen (CREs), welche Einfluss auf die Transkription nehmen. Mit diesem Ansatz kann man eine Dosis-spezifische Expression bestimmter Gene erreichen. Dies ermöglicht das Feintuning bestimmter Gene hin zu ihrem optimalen Expressionslevel. Beispielsweise ist die geringe Expression der MADS-box Gene in Tomate für eine starke Verzweigung der Triebe verantwortlich, was gleichzeitig aber zu einer geringen Fertilität und somit kaum Früchten führt. Die starke Expression dieser Gene resultiert hingegen in sehr geringer bis hin zu keiner Verzweigung, dafür aber zu gesteigerter Fertilität und im Vergleich größerer Anzahl an Früchten. Werden die MADS-box Gene durch das Editieren der CREs mit mäßiger Stärke exprimiert, erreicht man eine moderate Verzweigung, die schließlich in der höchsten Produktivität und somit einer Ertragssteigerung resultiert (Soyk et al. 2017).

Das CRISPR/Cas-System wurde ebenfalls zum Vorbeugen von Ernteaufällen und damit der indirekten Ertragssteigerung eingesetzt. So wurde beispielsweise in Mais der natürliche Promotor des ARGOS8-Gens durch einen anderen in Mais vorkommenden Promotor ausgetauscht. Die veränderte Expression führte zu einer besseren Adaption der Pflanzen gegenüber Trockenstress und gleichzeitiger Ertragssteigerung unter Wassermangel (Shi et al. 2017).

Der überwiegende Teil von Ernteaufwänden ist jedoch dem Befall durch Pathogene und Schädlinge zuzuschreiben. Hierbei besonders hervorzuheben ist durch Mehltau-befallener Weizen, da Weizen nach Mais das zweithäufigste Getreide weltweit ist und einen zentralen Faktor in der Lebensmittelindustrie darstellt. Als Virulenzfaktor dient dem Mehltau das pflanzeneigene Protein MLO2, welches dem Pilz ermöglicht in die pflanzlichen Zellen einzudringen. In Tomate konnte durch die simple Mutation dieses Gens eine Mehltau-resistente Pflanzenlinie hergestellt werden (Nekrasov et al. 2017). Weizen, als hexaploider Organismus, besitzt jedoch drei Homologe des MLO2 Gens, sodass durch konventionelle Züchtung bisher keine Mehltau-resistente Pflanze erzeugt werden konnte. Erst mittels sequenzspezifischer Nukleasen wie dem CRISPR/Cas-System konnten alle drei Homologe simultan editiert werden, sodass erstmals Mehltau-resistenter Weizen erzeugt werden konnte (Wang et al. 2014).

Neben Polyploidie stellt auch die vegetative Fortpflanzung eine Hürde hinsichtlich der Einbringung neuer Merkmale dar. Ein wichtiges Beispiel ist in diesem Sinne die Kulturbanane „Cavendish“, welche durch den Schlauchpilz Tropical Race 4 (TR4) stark bedroht ist. Zwar weisen Wildbananen ein TR4-Resistenzgen auf, dieses kann jedoch nicht in die Kulturbanane eingekreuzt werden, da sich diese vegetativ durch Ableger vermehrt und keine Samen bildet. Erste Versuche das Resistenzgen der Wildbanane mittels klassischer Gentechnik in die Kulturbanane einzubringen, wurden bereits in Feldversuchen erfolgreich getestet (Dale et al. 2017). Da diese Pflanzen aber ein artfremdes Gen exprimieren, soll die Kulturpflanze direkt mittels CRISPR/Cas editiert werden, um sie ohne stabile Integration eines Transgens resistent gegenüber dem Pilzerreger zu machen.

Das erfolgreiche Editieren von Pflanzen mittels CRISPR/Cas um negative Merkmale zu eliminieren, zeigte sich auch in der Generierung von Gluten-freiem Weizen. Weizenkörner beinhalten Gluten-Proteine, welche für die Viscoelastizität der Weizenprodukte sorgen, aber gleichzeitig auch eine Unverträglichkeit in mehr als 7 % der westlichen Weltbevölkerung auslöst. Der Locus, der für die Gluten-Gene kodiert ist hoch komplex und besteht aus mehr als 100 Genen und Pseudogenen auf drei Chromosomen. Dies machte es unmöglich durch klassische Züchtungsansätze Gluten-freie Weizen Varianten zu erzeugen. Mittels CRISPR/Cas konnten Forscher jedoch die Menge an Gluten-Proteinen in Weizen drastisch reduzieren, sogar ohne die vorteilhafte Viscoelastizität zur Verarbeitung von Weizenprodukten zu verlieren (Sánchez-León et al. 2017).

Die Anwendung der CRISPR/Cas-Systeme ermöglicht nicht nur das Editieren von Genen und deren regulatorischen Elemente und dadurch die Beeinflussung der Genexpression, sondern auch Chromosomen umzustrukturieren (Schindele et al. 2019) (**Abb. 5**).

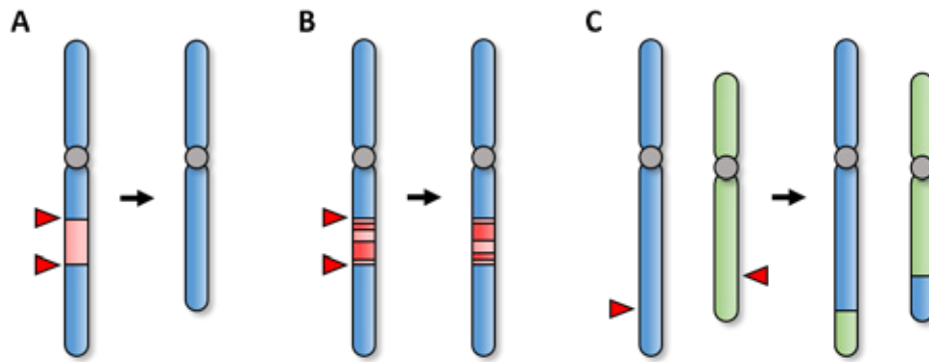


Abbildung 5: Chromosomale Umstrukturierungen: Die simultane Induktion mehrerer DSB kann in chromosomalen Umstrukturierungen resultieren. Werden zwei DSB auf einem Chromosom induziert, können Deletionen (A) oder Inversionen (B) des dazwischenliegenden Bereichs stattfinden. Die Induktion zweier DSB auf unterschiedlichen Chromosomen kann wiederum zur Translokation (C) von chromosomalen Fragmenten führen.

Beispielsweise können zwei DSB auf demselben Chromosom entweder eine Deletion oder eine Inversion des dazwischenliegenden Bereichs induzieren. Dies ermöglicht es agronomisch negative Merkmale zu eliminieren, mehrere positive Eigenschaften genetisch zu verknüpfen oder auch zu trennen. Letztere sind darauf zurückzuführen, dass die Wahrscheinlichkeit für Rekombination zwischen zwei Genen mit Abnahme deren Distanz zueinander sinkt. Diese Ansätze der gezielten chromosomalen Umstrukturierung rücken gerade in Bezug auf die klassische Züchtung in den Fokus, denn große Teile der genetischen Information sind durch ihre Struktur für konventionelle Züchtungsansätze gar nicht zugänglich. Um solche Bereiche dem Austausch von genetischen Material wieder zugänglich zu machen, kann das CRISPR/Cas-System gezielt eingesetzt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass kleinere Inversionen bis zu 18 Kb in Pflanzen induziert und stabil in die nächste Generation vererbt werden können (Schmidt et al. 2019). Folglich sollte auch die Induktion größerer Inversionen erreichbar sein. Beispielsweise kann dies angewendet werden, um im Laufe der Entwicklung entstandene invertierte Bereiche von Pflanzengenomen wieder zu revertieren. In *Arabidopsis thaliana* besitzt eine Untergruppe eine 1.2 Mb große Inversion auf einem Chromosom. In dem invertierten Bereich findet durch selbiges bedingt kein Austausch von genetischem Material mehr statt. Beeindruckenderweise war es möglich, die Reversion dieses sehr großen Fragmentes zu induzieren und letztendlich nachzuweisen, dass dadurch wieder Rekombination und somit Austausch der genetischen Information stattfinden kann (Schmidt & Puchta, unpubliziert).

1.5 Literatur

- Argast, G. M.; Stephens, K. M.; Emond, M. J.; Monnat, R. J.** (1998): *I-PpoI and I-CreI homing site sequence degeneracy determined by random mutagenesis and sequential in vitro enrichment*. *Journal of molecular biology* 280 (3), 345–353
- Boch, Jens; Scholze, Heidi; Schornack, Sebastian; Landgraf, Angelika; Hahn, Simone; Kay, Sabine et al.** (2009): *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors*. *Science* (New York, N.Y.) 326 (5959), 1509–1512
- Cathomen, Anton; Puchta, Holger (Hg.)** (2018): *CRISPR/Cas9 - Einschneidende Revolution in der Gentechnik*. Berlin: Springer.
- Cermak, Tomas; Doyle, Erin L.; Christian, Michelle; Wang, Li; Zhang, Yong; Schmidt, Clarice et al.** (2011): *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting*. *Nucleic acids research* 39 (12), e82
- Dale, James; James, Anthony; Paul, Jean-Yves; Khanna, Harjeet; Smith, Mark; Peraza-Echeverria, Santy et al.** (2017): *Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4*. *Nature communications* 8 (1), 1496
- Herbers, Karin; Conrads-Strauch, Jutta; Bonas, Ulla** (1992): *Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein*. *Nature* (London) 356 (6365), 172–174
- Isalan, M.; Choo, Y.; Klug, A.** (1997): *Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (11), 5617–5621
- Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle** (2012): *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science* (New York, N.Y.) 337 (6096), 816–821
- Kim, Y. G.; Cha, J.; Chandrasegaran, S.** (1996): *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (3), 1156–1160
- Li, Jian-Feng; Norville, Julie E.; Aach, John; McCormack, Matthew; Zhang, Dandan; Bush, Jennifer et al.** (2013): *Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9*. *Nature biotechnology* 31 (8), 688–691
- Li, L.; Wu, L. P.; Chandrasegaran, S.** (1992): *Functional domains in Fok I restriction endonuclease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10), 4275–4279
- Morineau, Céline; Bellec, Yannick; Tellier, Frédérique; Gissot, Lionel; Kelemen, Zsolt; Nogué, Fabien; Faure, Jean-Denis** (2017): *Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid Camelina sativa*. *Plant biotechnology journal* 15 (6), 729–739
- Nekrasov, Vladimir; Wang, Congmao; Win, Joe; Lanz, Christa; Weigel, Detlef; Kamoun, Sophie** (2017): *Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion*. *Scientific reports* 7 (1), 482
- Pacher, Michael; Puchta, Holger** (2017): *From classical mutagenesis to nuclease-based breeding - directing natural DNA repair for a natural end-product*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 90 (4), 819–833

- Perrin, A.; Buckle, M.; Dujon, B.** (1993): *Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions*. The EMBO journal 12 (7), 2939–2947
- Puchta, H.; Dujon, B.; Hohn, B.** (1993): *Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease*. Nucleic acids research 21 (22), 5034–5040
- Sánchez-León, Susana; Gil-Humanes, Javier; Ozuna, Carmen V.; Giménez, María J.; Sousa, Carolina; Voytas, Daniel F.; Barro, Francisco** (2017): *Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9*. Plant biotechnology journal 16 (4), 902–910
- Schindele, Angelina; Dorn, Annika; Puchta, Holger** (2019): *CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane*. Current opinion in biotechnology 61, 7–14
- Schindele, Patrick; Wolter, Felix; Puchta, Holger** (2018): *Das CRISPR/Cas-System*. Biol. Unserer Zeit 48 (2), 100–105
- Schmidt, Carla; Pacher, Michael; Puchta, Holger** (2019): *Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system*. The Plant journal: for cell and molecular biology 98 (4), 577–589
- Shi, Jinrui; Gao, Huirong; Wang, Hongyu; Lafitte, H. Renee; Archibald, Rayeann L.; Yang, Meizhu et al.** (2017): *ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions*. Plant biotechnology journal 15 (2), 207–216
- Soyk, Sebastian; Lemmon, Zachary H.; Oved, Matan; Fisher, Josef; Liberatore, Katie L.; Park, Soon Ju et al.** (2017): *Bypassing Negative Epistasis on Yield in Tomato Imposed by a Domestication Gene*. Cell 169 (6), 1142-1155.e12
- Steinert, Jeannette; Schiml, Simon; Fauser, Friedrich; Puchta, Holger** (2015): *Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from Streptococcus thermophilus and Staphylococcus aureus*. The Plant journal: for cell and molecular biology 84 (6), 1295–1305
- Thompson, A. J.; Yuan, X.; Kudlicki, W.; Herrin, D. L.** (1992): *Cleavage and recognition pattern of a double-strand-specific endonuclease (I-creI) encoded by the chloroplast 23S rRNA intron of Chlamydomonas reinhardtii*. Gene 119 (2), 247–251
- Wang, Yanpeng; Cheng, Xi; Shan, Qiwei; Zhang, Yi; Liu, Jinxing; Gao, Caixia; Qiu, Jin-Long** (2014): *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew*. Nature biotechnology 32 (9), 947–951
- Zetsche, Bernd; Gootenberg, Jonathan S.; Abudayyeh, Omar O.; Slaymaker, Ian M.; Makarova, Kira S.; Essletzbichler, Patrick et al.** (2015): *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system*. Cell 163 (3), 759–771
- Zhou, Jianping; Xin, Xuhui; He, Yao; Chen, Hongqiao; Li, Qian; Tang, Xu et al.** (2019): *Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties*. Plant cell reports 38 (4), 475–485

2 Genomeditierung bei Tieren

Eckhard Wolf

Genzentrum der Universität München (LMU), München

Gen(om)e editing in animals



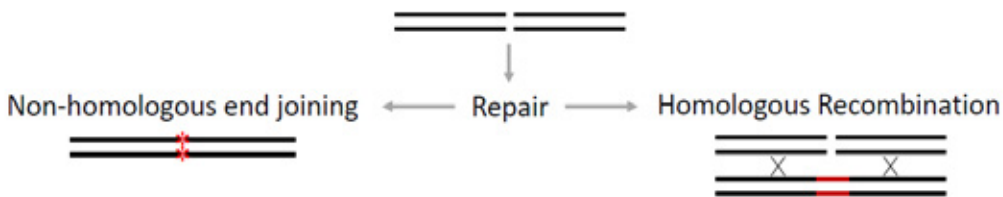
Eckhard Wolf

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
 und Laboratorium für funktionale Genomanalyse (LAFUGA)
 Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

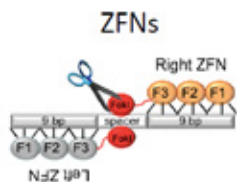


Gene Editing through site-directed nucleases

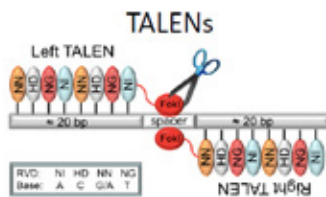
Principle: Introduction of a DNA double strand break at a targeted site



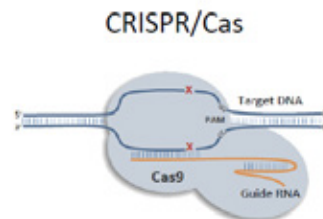
Tools:



Zinc Finger Nucleases

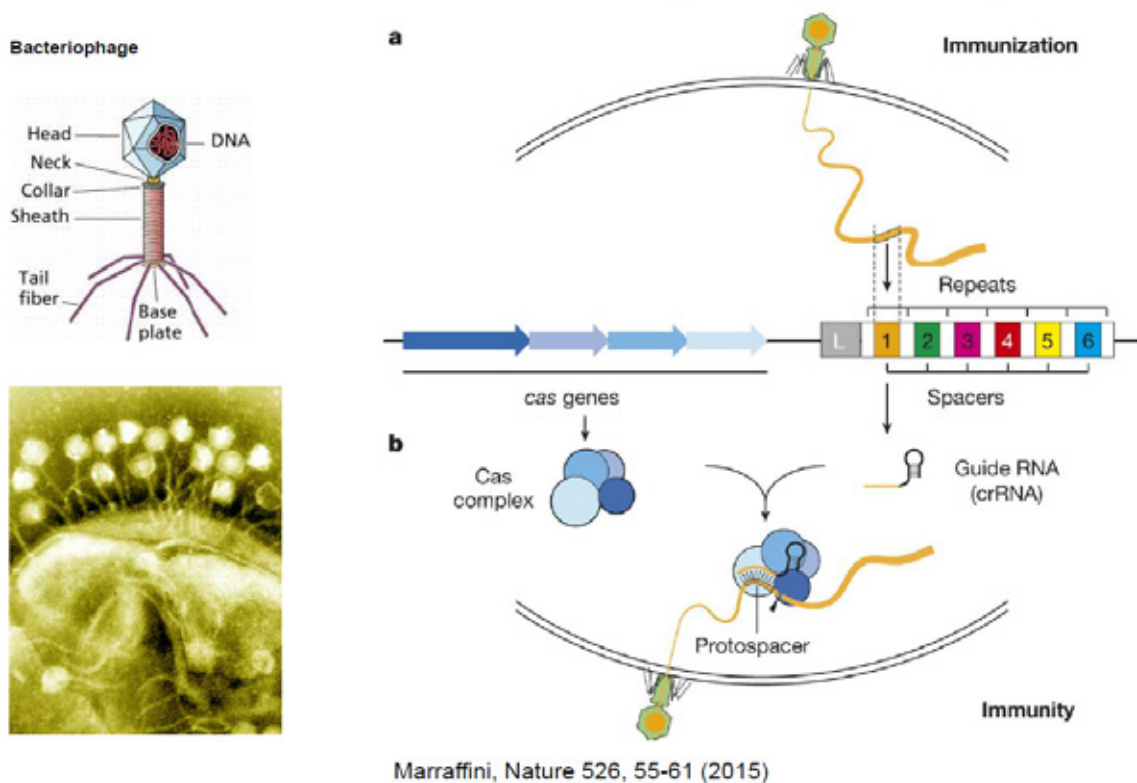


Transcription Activator-Like Effector Nucleases

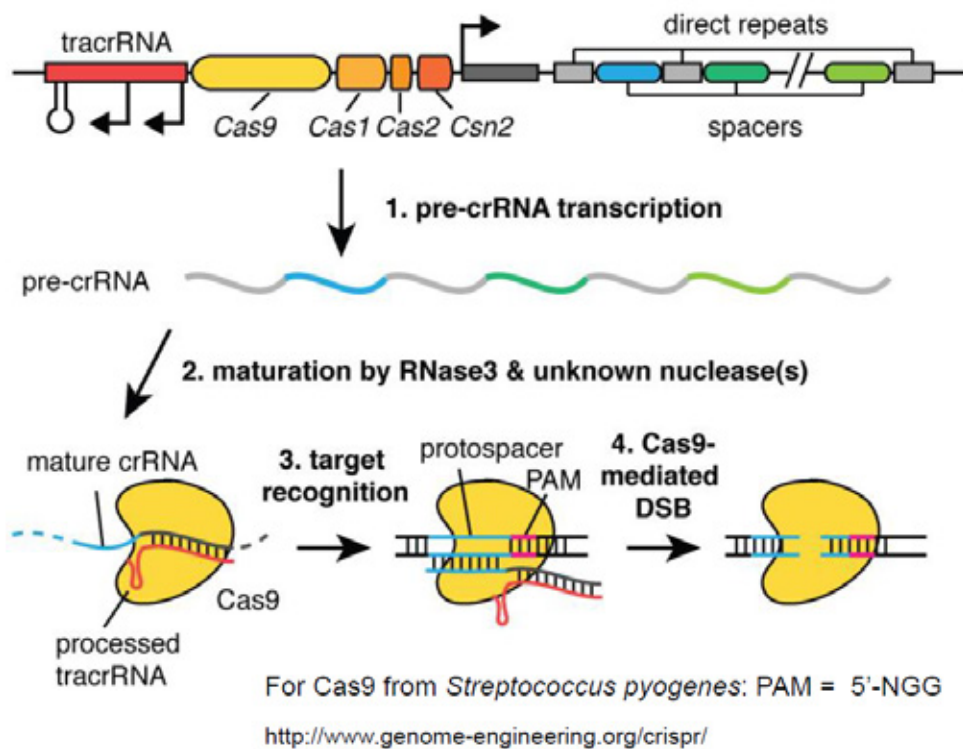


Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/
CRISPR associated

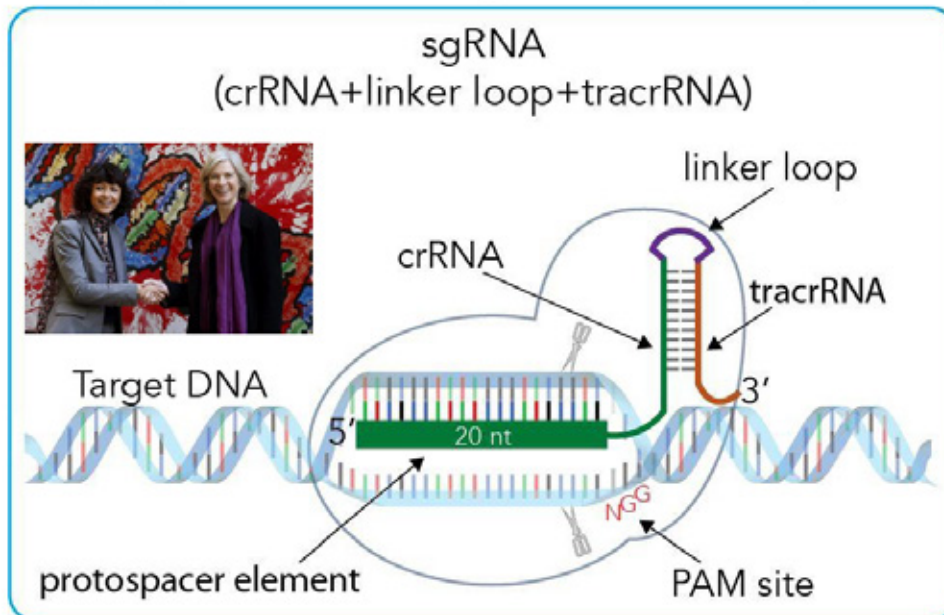
CRISPR/Cas – a bacterial adaptive defence system



Streptococcus pyogenes CRISPR locus 1



A single guide RNA can provide locus specificity

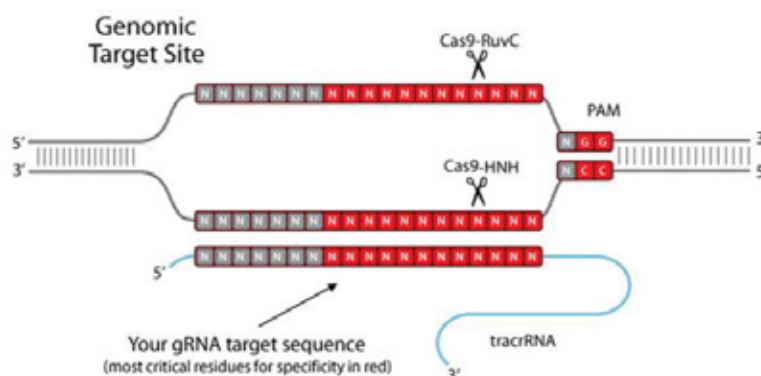


Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science* 337 (6096): 816–21.

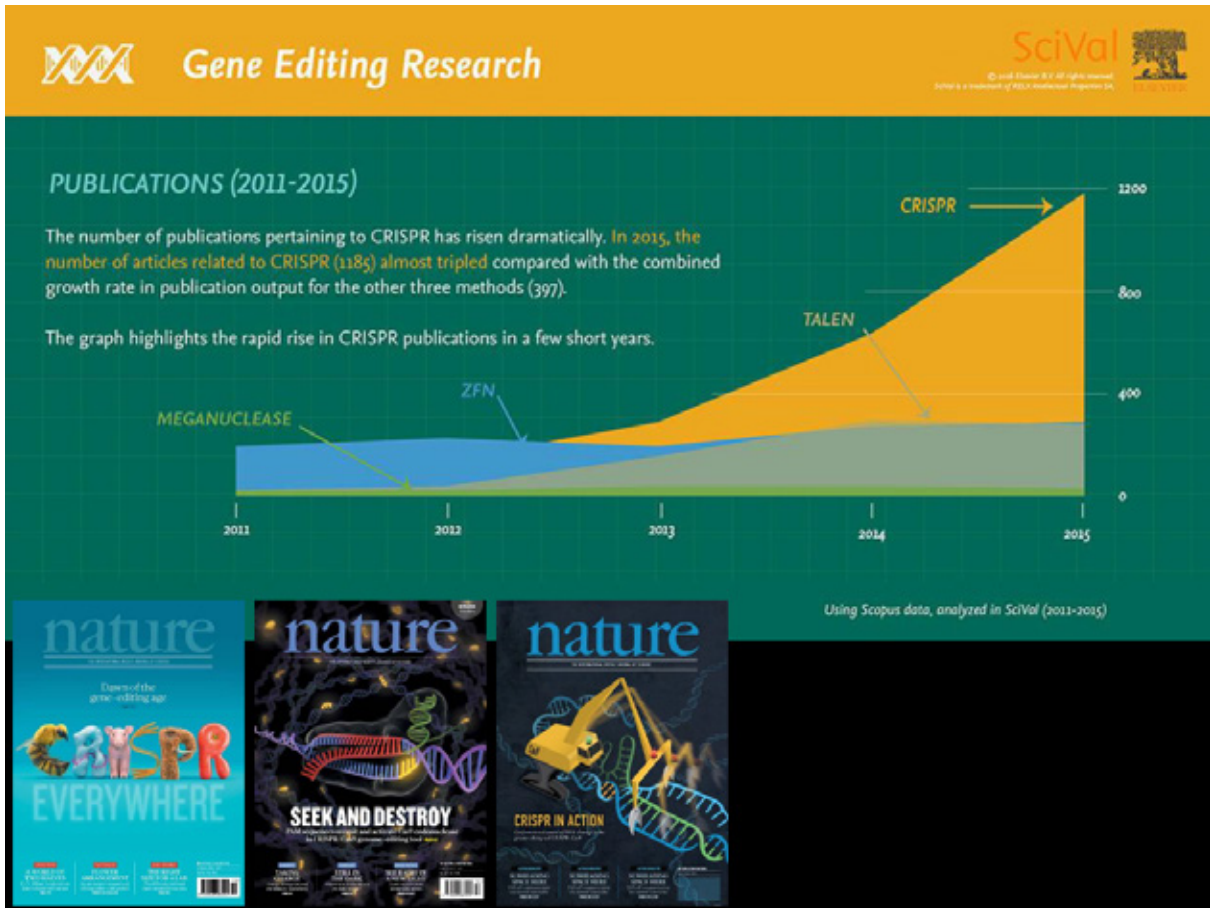
www.idtdna.com

RNA-guided nucleases for gene editing

- Simple system, requires only a Cas nuclease and a gRNA against the target sequence
- No complex protein engineering is required → fast, cost-effective
- High cutting activity in a broad range of species and cell types, multiple loci can be targeted at once



<http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/biology/crispr-cas9-genome-editing.html>



Cas9 target selection tools

<http://tools.genome-engineering.org>



<http://zifit.partners.org>



<http://www.e-crisp.org>

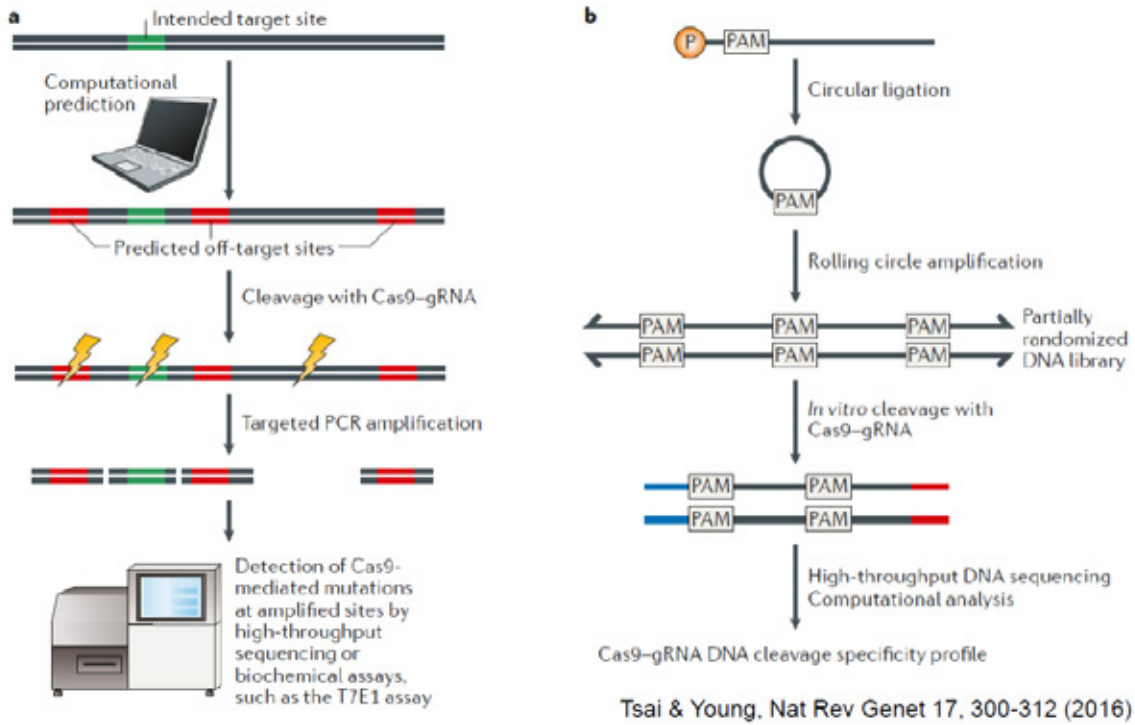
E-CRISP

Design of CRISPR constructs



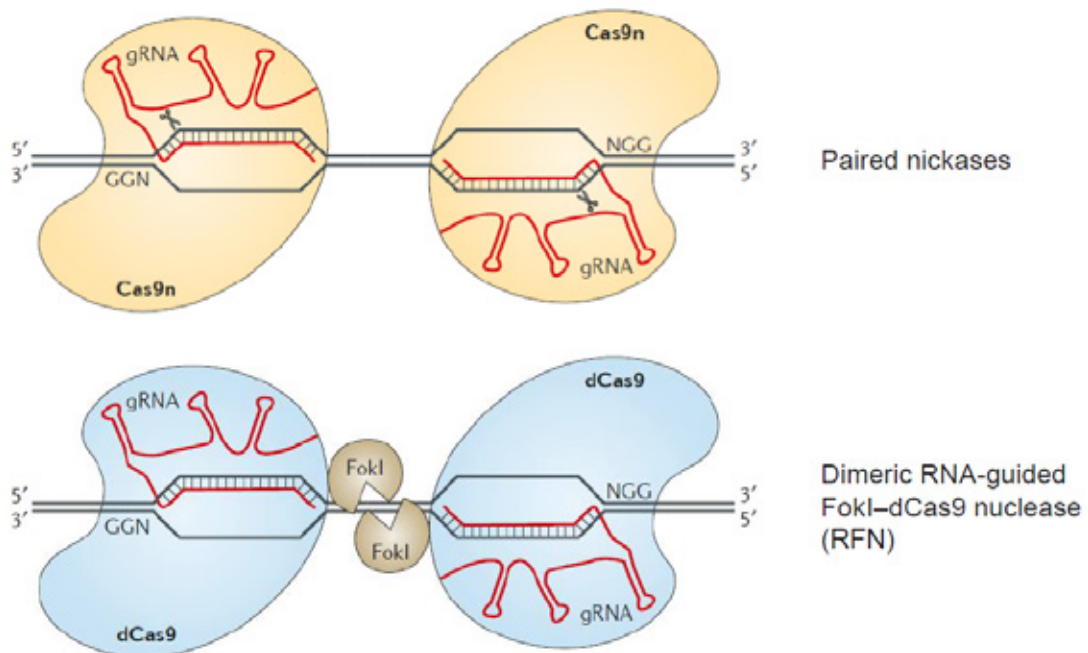
Avoiding off-target effects

a) Analysis of all potential off-target sites



Avoiding off-target effects

b) Cas9 cleaving only one DNA strand (nickase)

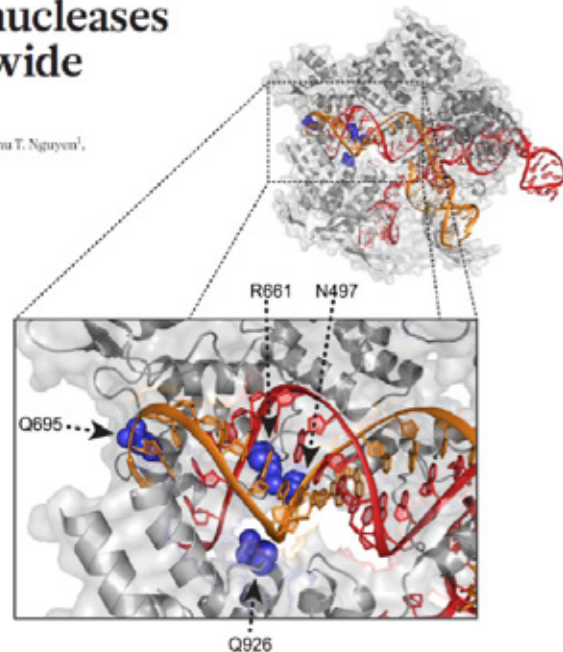
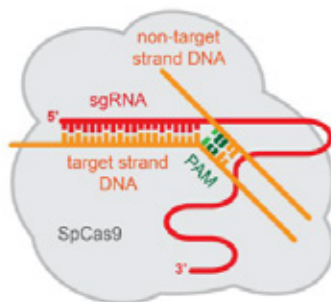


Tsai & Young, Nat Rev Genet 17, 300-312 (2016)

Avoiding off-target effects c) Use of high-fidelity Cas9

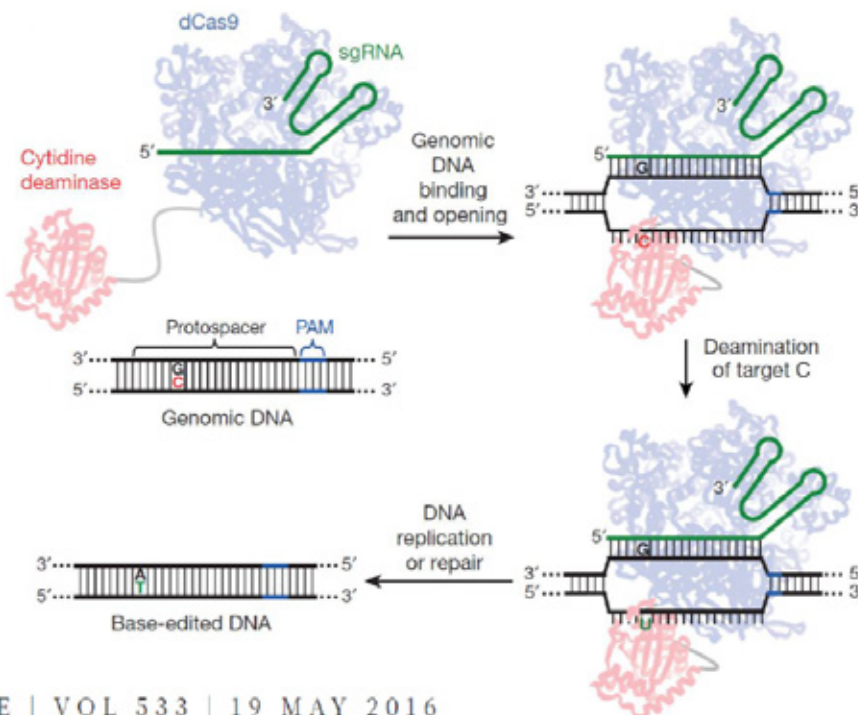
High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects

Benjamin P. Kleinstiver^{1,2*}, Vikram Pattanayak^{1,2*}, Michelle S. Prew¹, Shengdar Q. Tsai^{1,2}, Nhu T. Nguyen¹, Zongli Zheng¹ & J. Keith Joung^{1,2}



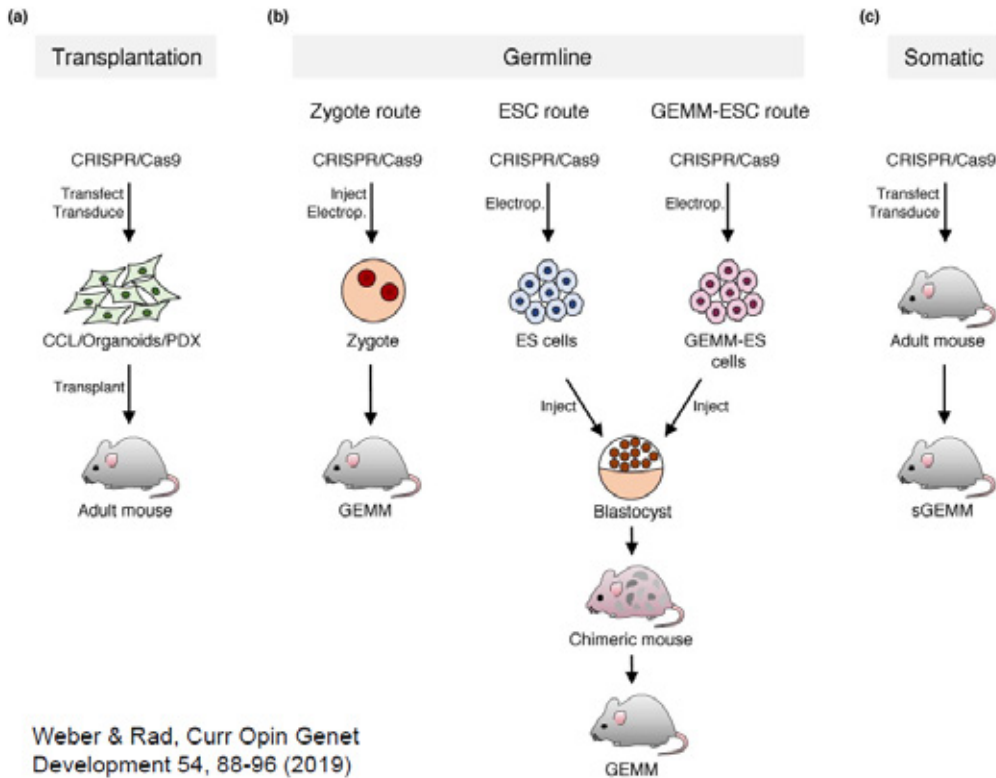
NATURE | VOL 529 | 28 JANUARY 2016

Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage

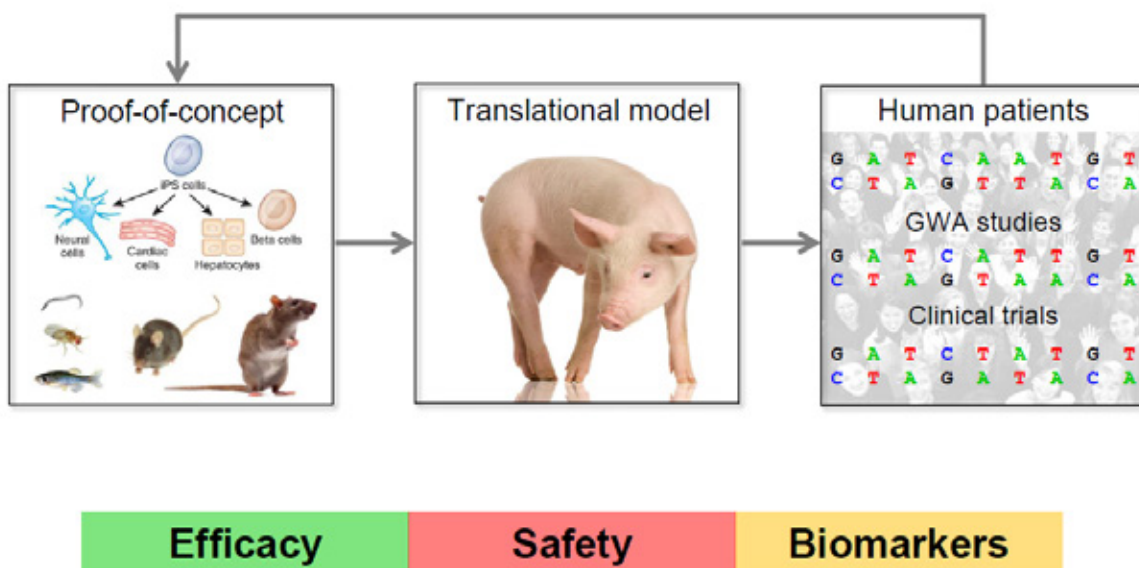


NATURE | VOL 533 | 19 MAY 2016

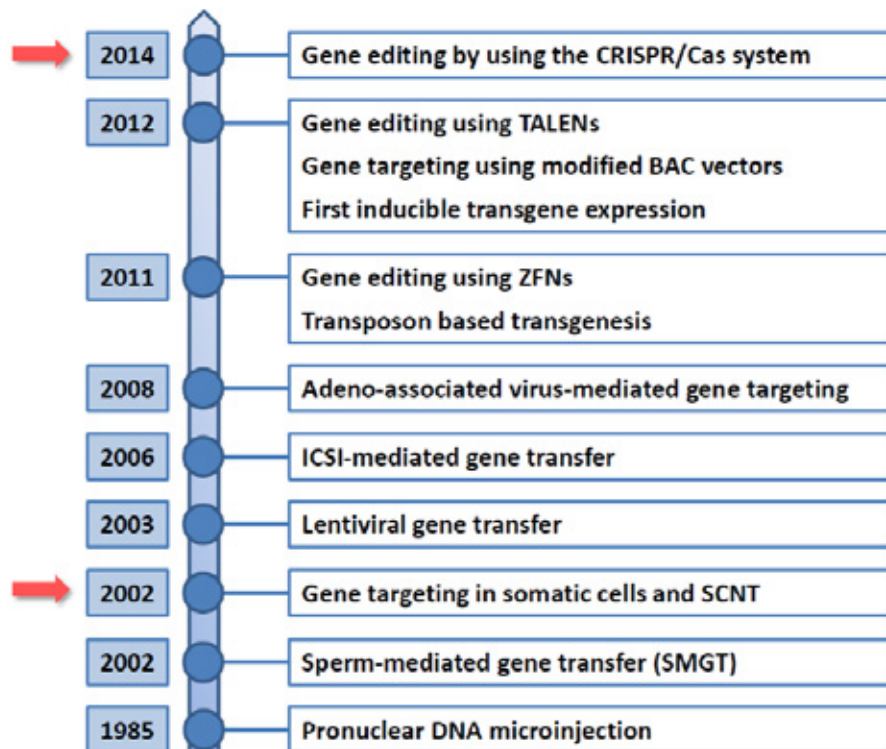
Engineering CRISPR mouse models of cancer



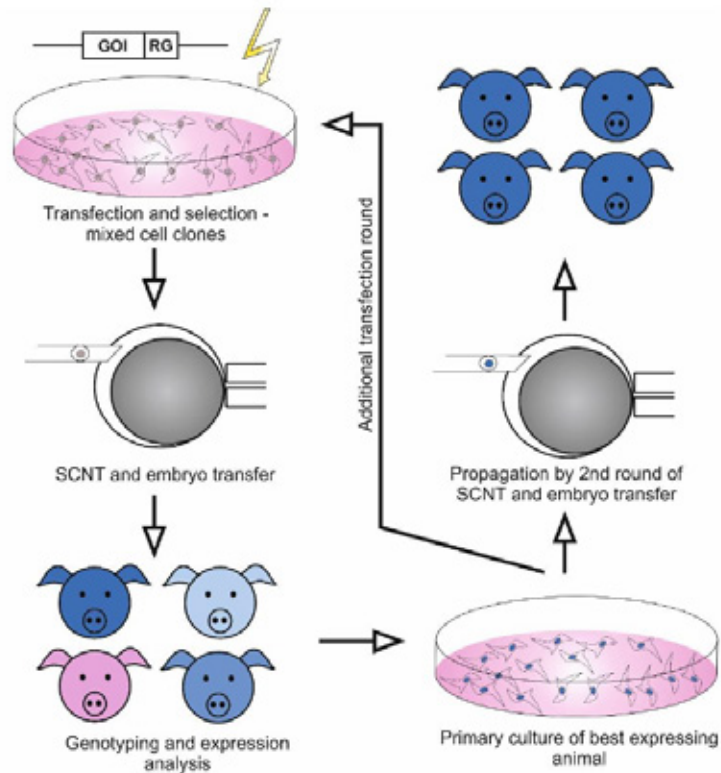
Non-rodent mammalian models may bridge the gap between proof-of-concept studies and clinical trials



Genetic engineering toolbox for pigs



Genetic engineering of pigs



Kurome et al.,
Meth Mol Biol 1222,
37-59 (2015)

Genetically engineered pigs for medical research

Diabetes research

Renner et al., Diabetes 2010
 Renner et al., Diabetes 2012
 Renner et al., Diabetes 2013
 Streckel et al., J Transl Med 2015
 Renner et al., J Pathol 2016
 Hinkel et al., J Am Coll Cardiol 2016
 Kemter et al., Diabetologia 2017
 Kleinworth et al., Diabetologia 2017
 Blutke et al., Mol Metab 2017
 Kleinert et al., Nat Rev Endocrinol 2018
 Clauß et al., Nat Rev Cardiol 2019

Monogenic diseases

Cystic fibrosis

Klymiuk et al., J Mol Med 2012

Duchenne muscular dystrophy

Klymiuk et al., Hum Mol Genet 2013

Matsunari et al., PNAS 2018

Regensburger et al., Nat Med (accepted)

Laron syndrome

Hinrichs et al., Mol Metab 2018

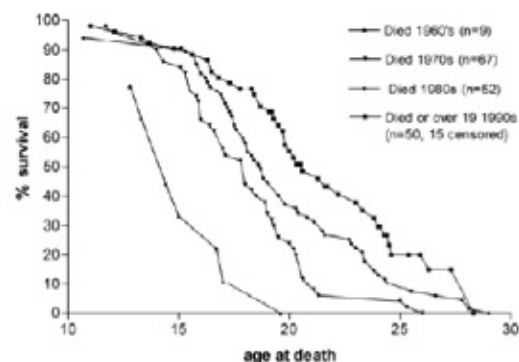
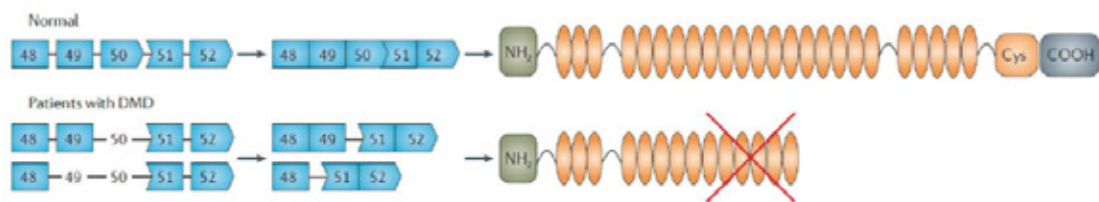
Xenotransplantation

Klymiuk et al., Diabetes 2012
 Bongoni et al., Transplantation 2013
 Bongoni et al., Xenotransplantation 2014
 Mohiuddin et al., Am J Transplant 2014
 Wunsch et al., Transplantation 2014
 Abicht et al., Xenotransplantation 2015
 Bongoni et al., Transplantation 2015
 Bähr et al., PLoS One 2016
 Bongoni et al., Transplantation 2016
 Cooper et al., Transplantation 2016
 Cowan et al., Xenotransplantation 2016
 Fischer et al., Sci Rep 2016
 Mohiuddin et al., Nat Commun 2016
 Bongoni et al., Sci Rep 2017
 Cohrs et al., Endocrinology 2017
 Wolf-van Bürck et al., Sci Rep 2017
 Längin et al., Nature 2018

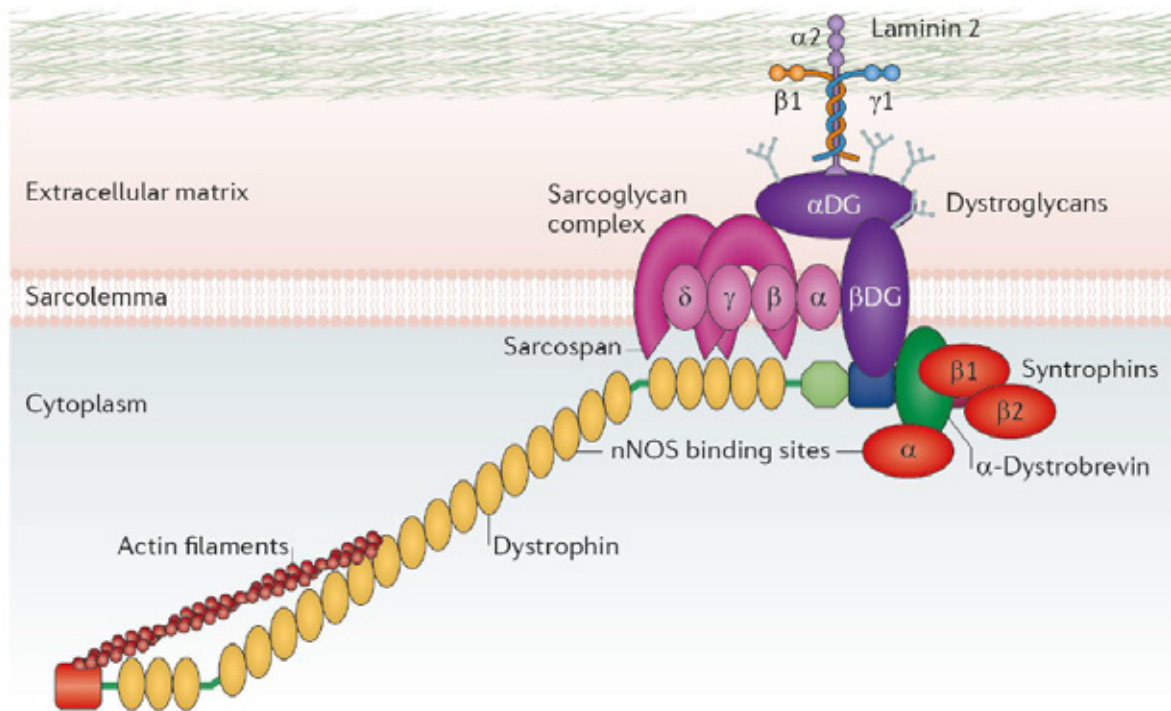


Duchenne muscular dystrophy (DMD)

- Severe X-linked disease that affects 1 in 3,500 males
- Loss-of-function mutations in the *DMD* gene (2.4 Mb, 79 exons); 60% deletions in exons 45-55

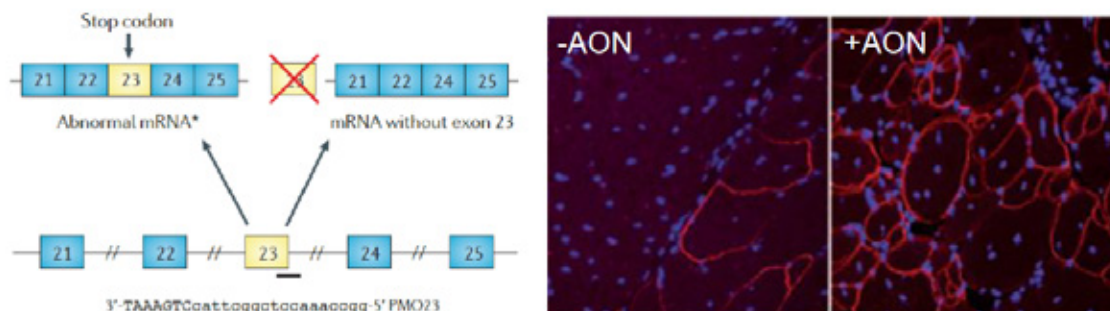
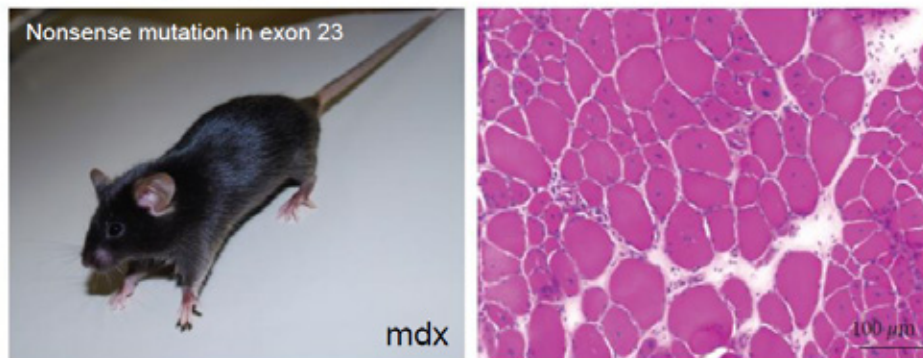


Dystrophin-associated protein complex



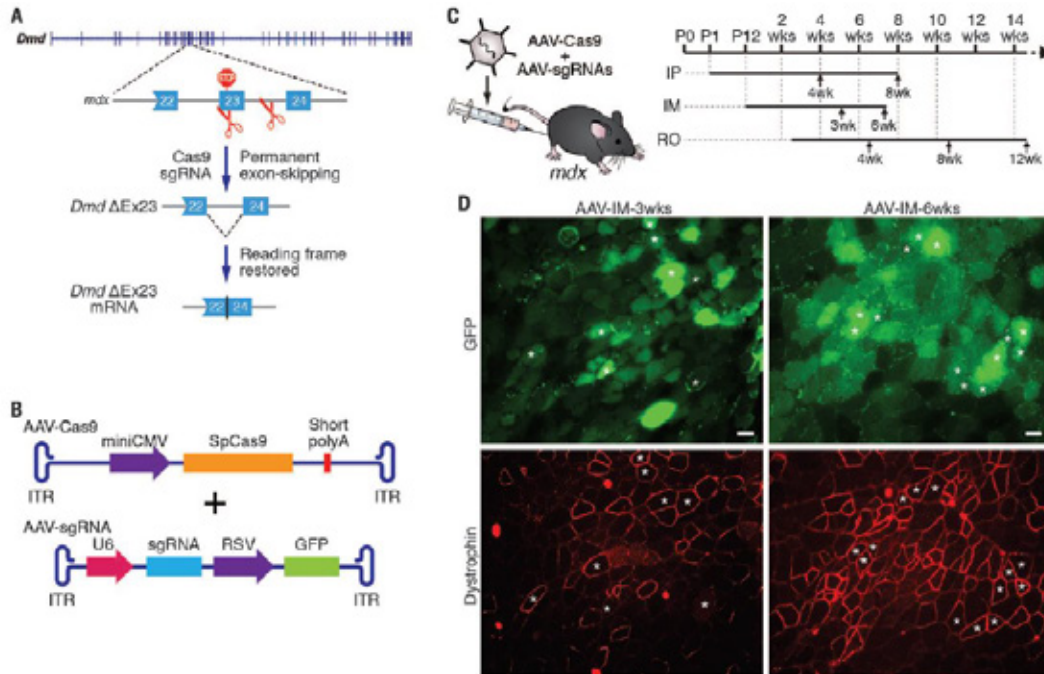
Fairclough et al., Nature Reviews Genetics | AOP, published online 23 April 2013; doi:10.1038/nrg3460

Exon skipping in the *mdx* mouse model of DMD



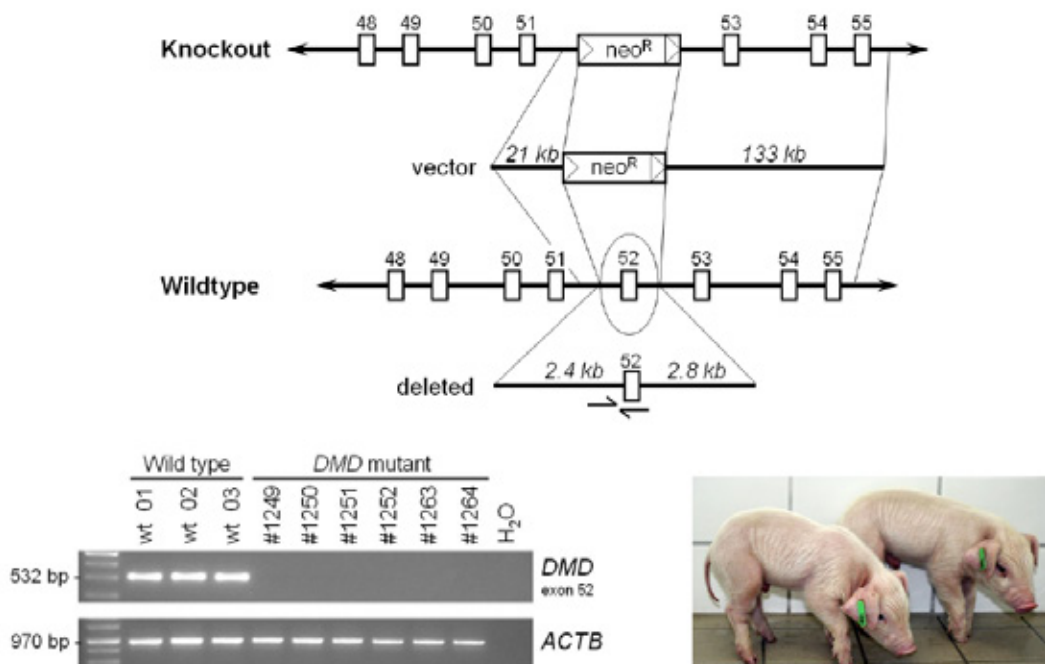
Muntoni & Wood, Nat Rev Drug Discov 10, 621-637 (2011)

Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in the *mdx* mouse



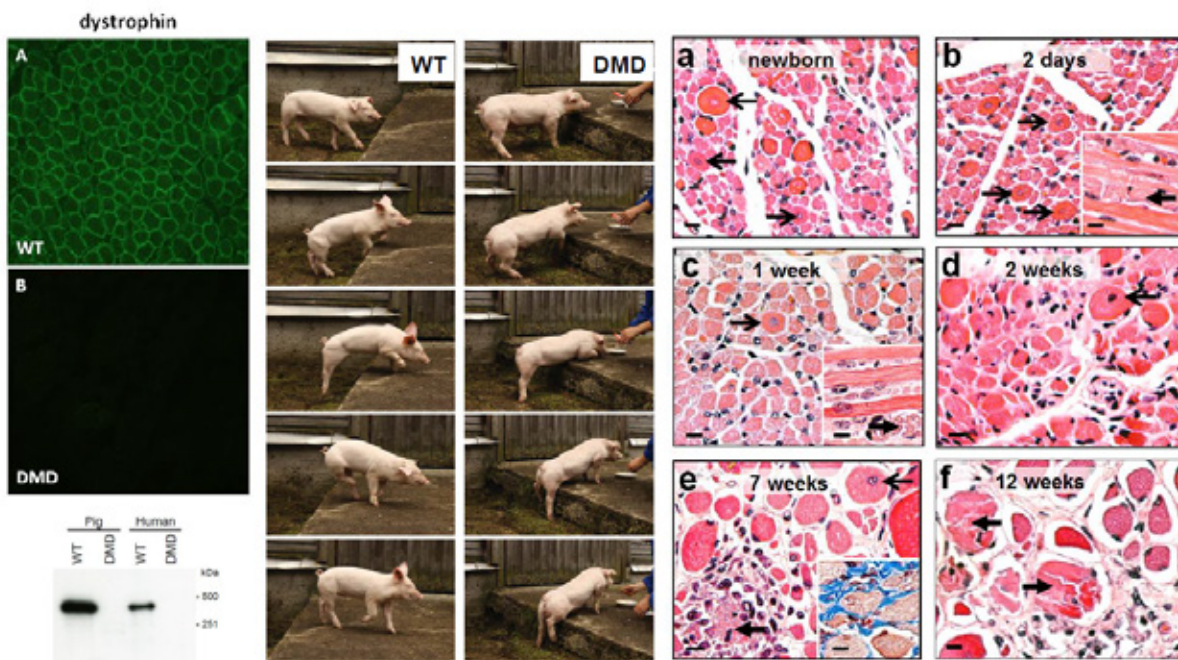
Long et al., SCIENCE • 22 JANUARY 2016 • VOL 351 ISSUE 6271

Targeted deletion of *DMD* exon 52 in the pig



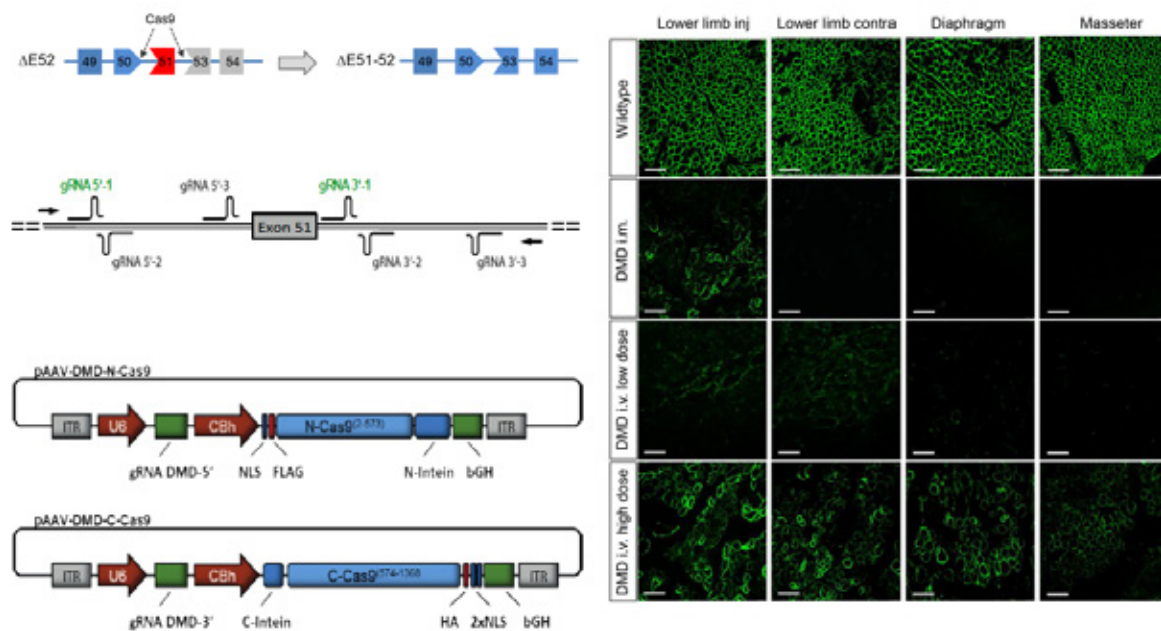
Klymiuk et al., Hum Mol Genet 22, 4368-4382 (2013)

Tailored pig model for Duchenne muscular dystrophy



Klymiuk et al., Hum Mol Genet 22, 4368-4382 (2013)

Restoration of dystrophin expression after somatic gene editing using CRISPR/Cas9



Moretti et al., Nat Med 2020 Feb;26(2):207-214



TRR 127 "Xenotransplantation"



Biology of xenogeneic cell, tissue and organ transplantation

Project Area A: Immunity/Tolerance

A1 (Schwitzer, de Figueiredo):
Negative costimulation, downregulation of SLA, functional testing of novel transgenes

A2 (Hinkel, Kupatt):
Viral transduction of endothelia with protective genes, prevention of cardiac hypertrophy and fibrosis

A3 (Chavakis):
Modulating the graft-host interface in xenograft dysfunction using antiinflammatory proteins

A4 (Jaeckel):
Induction of long-lasting xenograft tolerance by using xeno-specific regulatory T cells (Tregs)

A5 (Waskow, Ludwig, Klymiuk):
Mechanisms of xenograft rejection in a novel mouse model with all subsets of human lymphoid and myeloid cells

Z1 (Marckmann, Sautermeister, Hoppe):
Ethical, legal, societal issues

Z2 (Denner, Tönjes):
Microbiological safety

Project Area B: Novel transgenic strategies

B1 (Niemann, Kues, Lucas-Hahn):
Multi-transgenic pigs as universal donors for pig-to-primate xenotransplantation

B2 (Schnieke, Flisikowska, Knolle):
Modular combination of xenoprotective genetic modifications and inducible expression systems (*smart grafts*)

B3 (Klymiuk, Kemter, Wunsch, Wolf):
Genetically engineered donor pigs with improved pancreatic islets

Z3 (Niemann, Lucas-Hahn, Schnieke, Wolf):
Core facility for multi-GM pigs

Z4 (Kaup, Schönmann):
Core facility for non-human primates

Project Area C: Preclinical and clinical XT

C1 (Speier, Gavalas, Kemter):
Suitability of porcine islets and novel cell sources for diabetes transplantation therapy

C3 (Selssler):
Transplantation of multi-transgenic porcine islets expressing immunomodulatory molecules

C4 (Ludwig, Peakman, Bornstein):
Macroencapsulation of porcine islets – path to the clinic

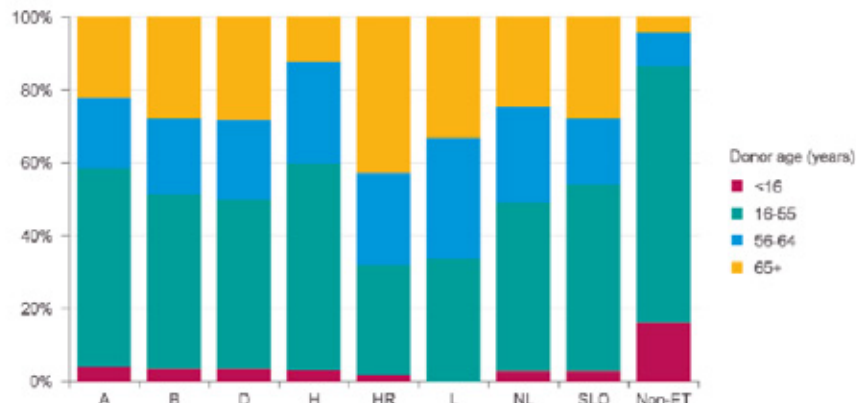
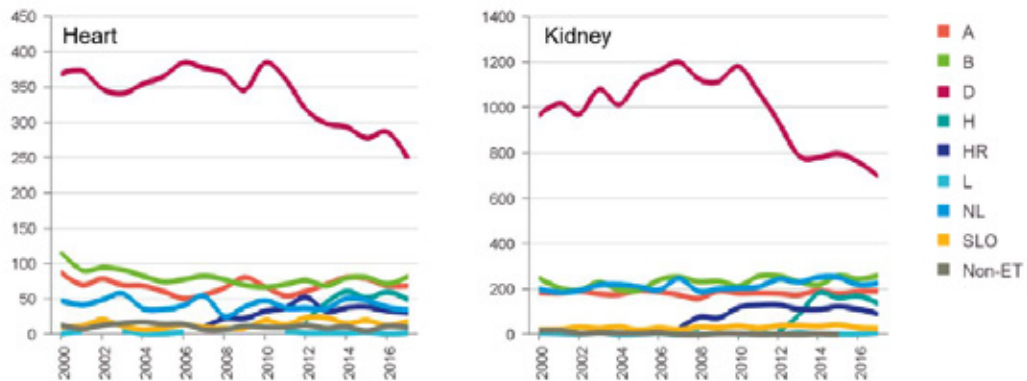
C6 (Tiede, Werwitzke, Ramackers):
Modulation of complement activation and coagulation in xenotransplantation

C7 (Hilffiker, Haverich):
Preclinical assessment of antigen-reduced decellularized porcine heart valves

C8 (Abicht, Brenner, Guethoff, Reichart):
Strategies in preclinical cardiac xenotransplantation

from bench to bedside

Decreasing organ donations and increasing donor age



Eurotransplant | Annual Report 2017

Waiting list	A	B	D	H	HR	NL	SLO	Total
Kidney	453	648	3054	441	242	1301	66	6205
Heart	93	96	440	82	50	67	33	861
Lung	167	149	422			114		852
Liver	227	408	1367	88	193	230	35	2548
Pancreas	26	29	181	16	12	37	1	302
Intestine		5	8			1		14
Total	966	1335	5472	627	497	1750	135	10782
Patients	920	1264	5151	614	474	1712	131	10266

Patient registrations for multiple organs are counted for each organ type, includes new and repeat registrations

Mortality	A	B	D	H	HR	NL	SLO	Total
Kidney	61	60	661	84	19	186		1071
Heart	6	19	153	18	5	16	7	224
Lung	11	10	98			38		157
Liver	31	51	365	27	28	27	5	534
Pancreas	3	3	35	1	2	4		48
Intestine			3					3
Patients	106	134	1251	125	51	264	12	1943

Eurotransplant | Annual Report 2017

Xenotransplantation – down and up



2016

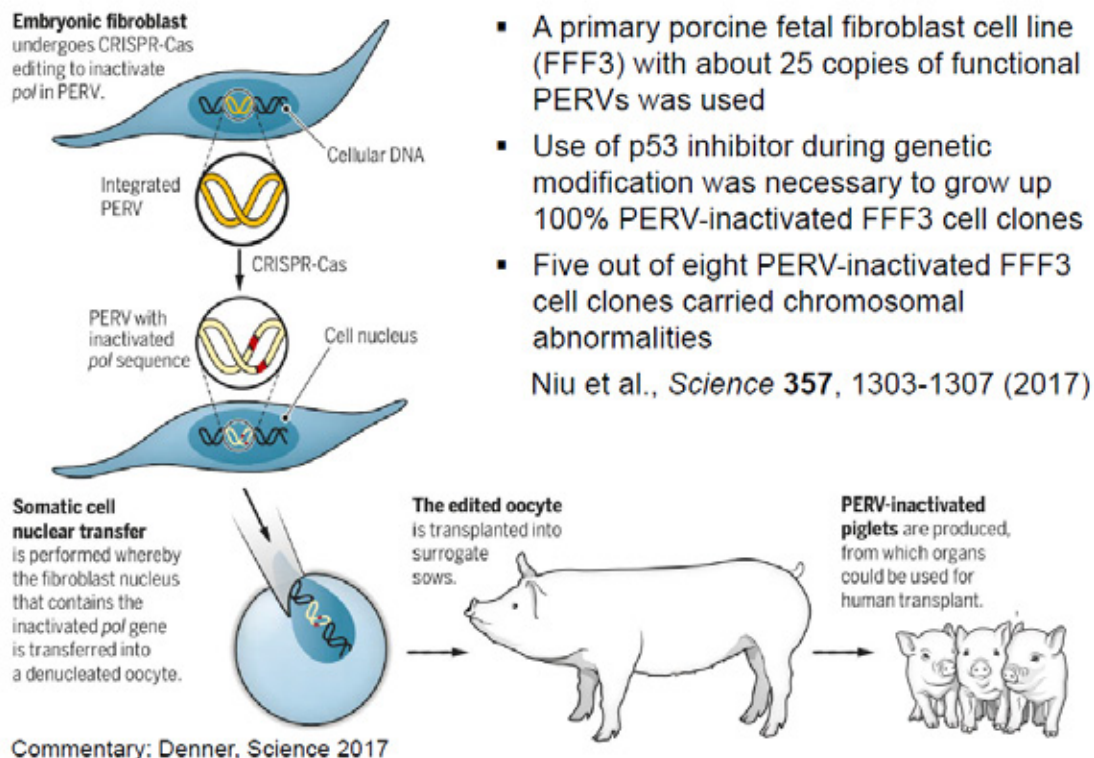
nature EDITORIAL biotechnology

In the 1990s, concerns about potential transfer of porcine retroviruses to xenotransplant recipients shut down commercial programs, even though **transmission had not (and still has not) been demonstrated *in vivo***. Given the continuing shortage of human organs for transplant, **return of commercial funding to xenotransplantation is encouraging**.

Government funders should take note. Yes, stem cell-derived therapies offer great long-term promise for degenerative diseases. But **xenotransplants represent an additional intriguing option - one with potentially shorter horizons to the clinic.**

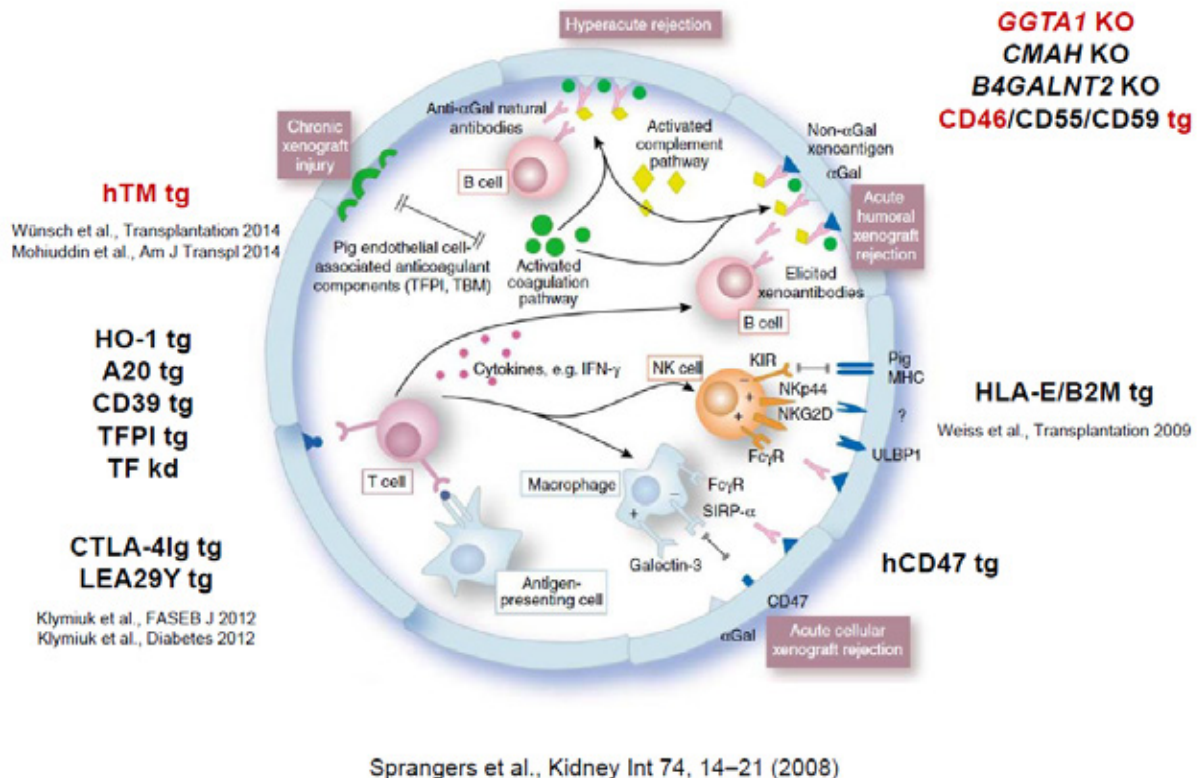
NATURE BIOTECHNOLOGY
VOLUME 34 NUMBER 1 JANUARY 2016

Pigs with inactivated PERV integrants

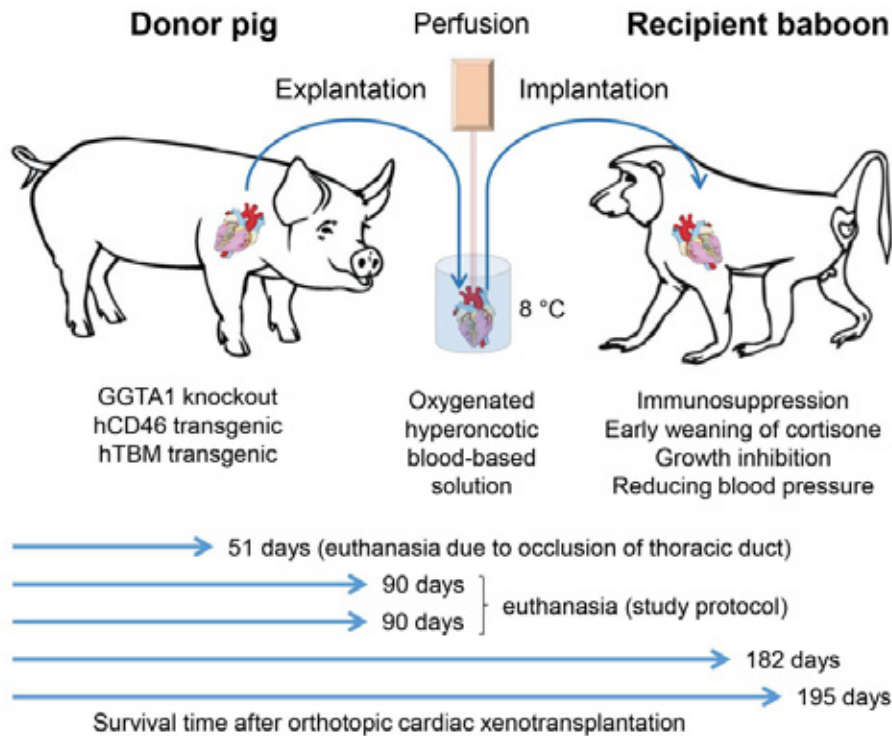


- A primary porcine fetal fibroblast cell line (FFF3) with about 25 copies of functional PERVs was used
 - Use of p53 inhibitor during genetic modification was necessary to grow up 100% PERV-inactivated FFF3 cell clones
 - Five out of eight PERV-inactivated FFF3 cell clones carried chromosomal abnormalities
- Niu et al., *Science* 357, 1303-1307 (2017)

Mechanisms of organ xenograft rejection

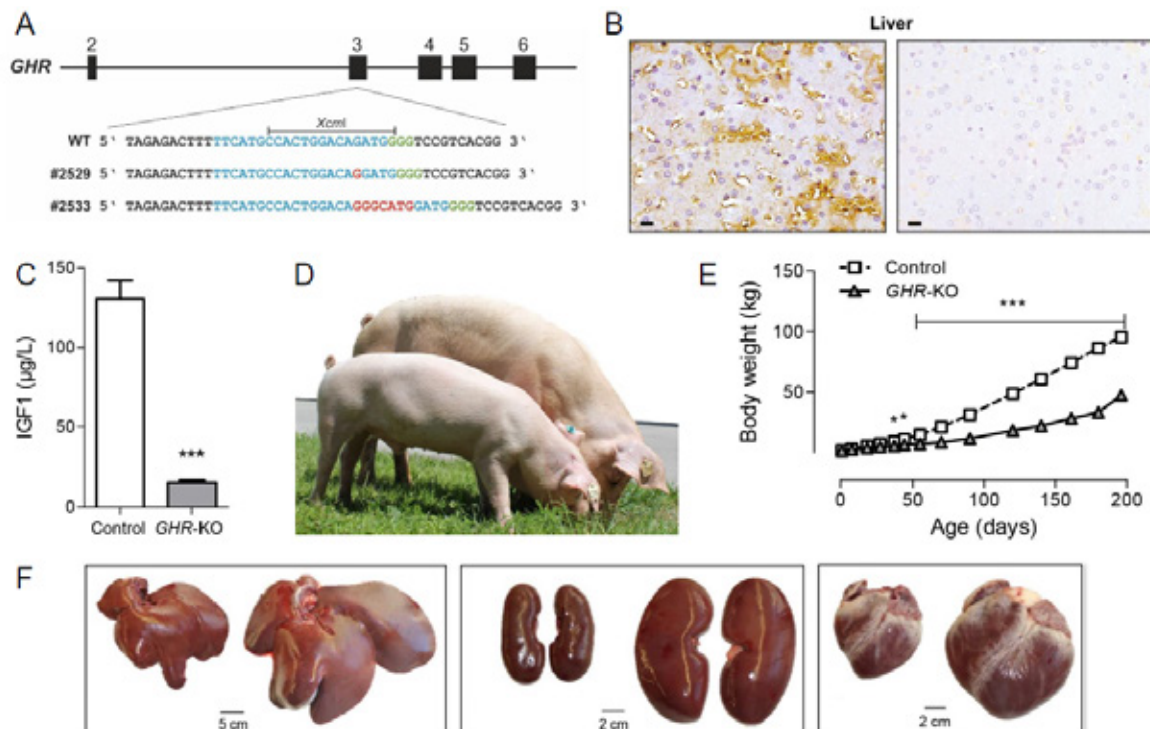


Breakthrough in orthotopic cardiac xenotransplantation



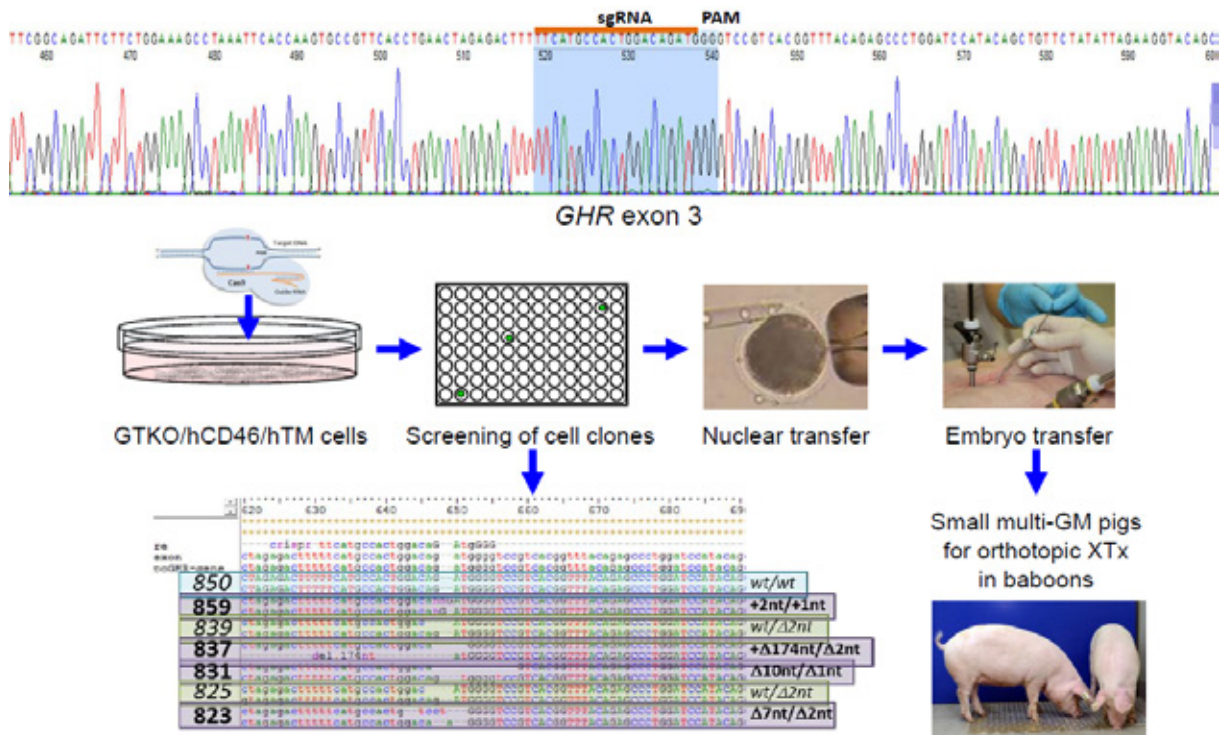
Längin et al., Nature 564, 430-433 (2018)

Small pigs by growth hormone receptor deficiency

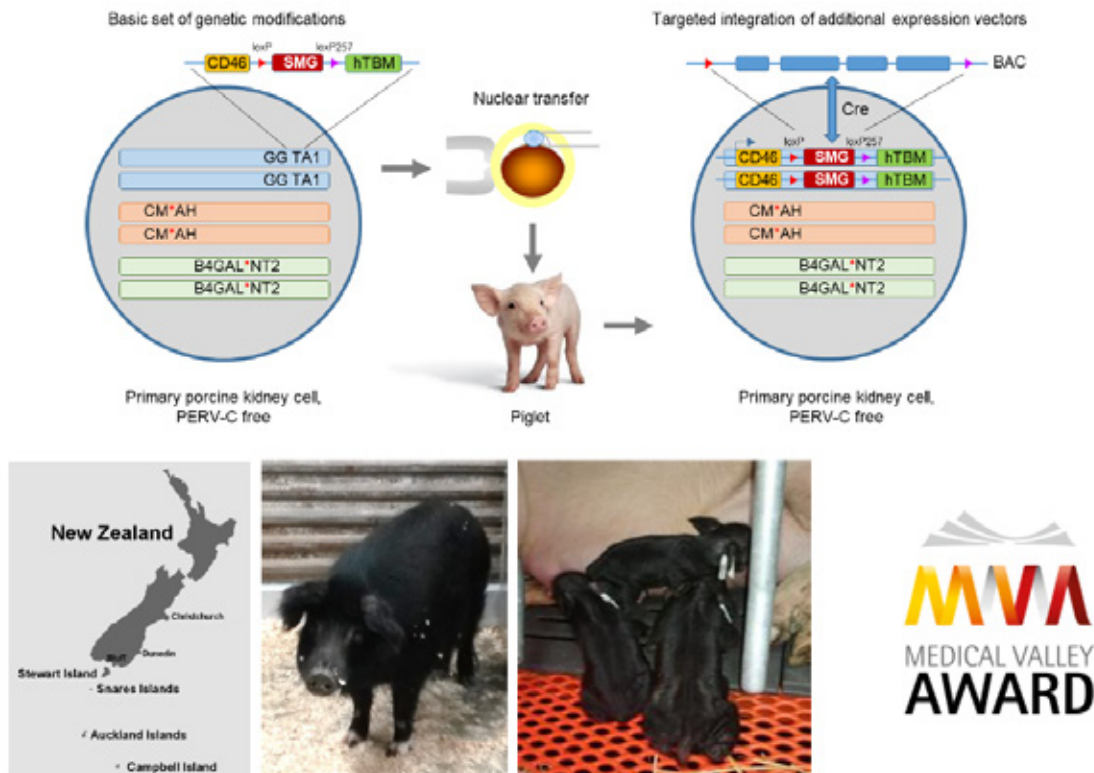


Hinrichs et al., Mol Metab 11, 113-128 (2018)

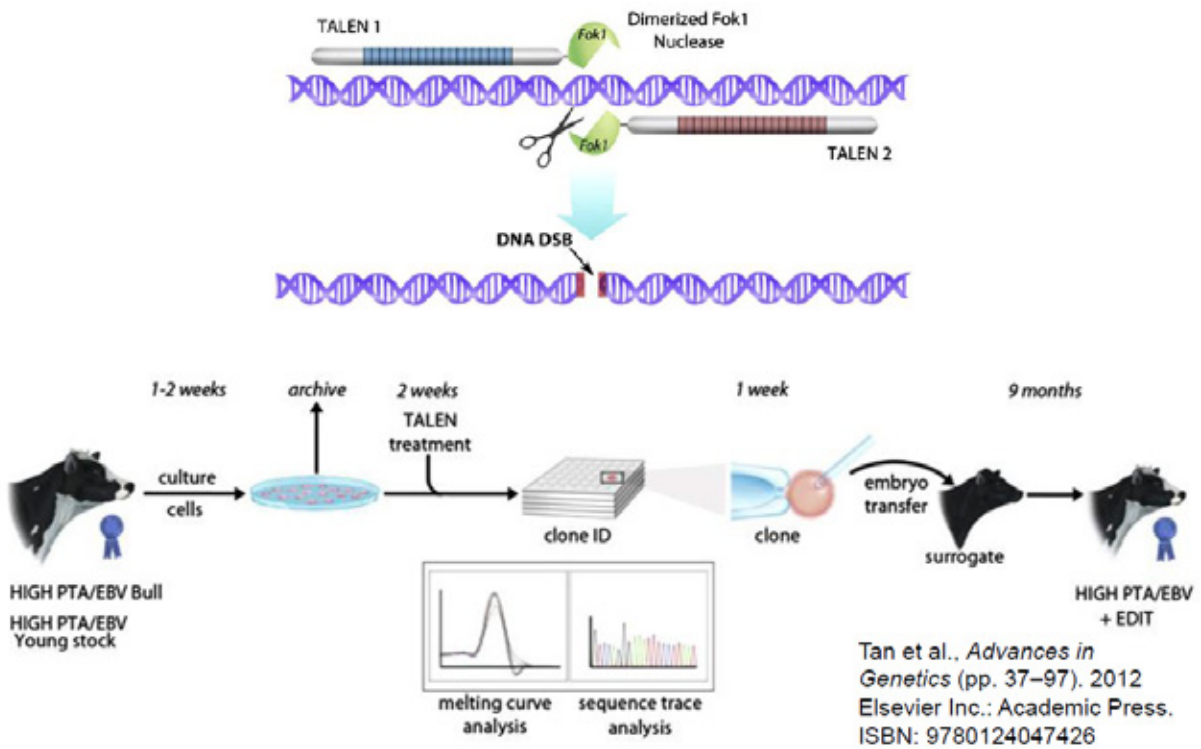
GHR-deficient GTKO/hCD46/hTBM pigs



Concept for a new xeno-organ donor pig



Precision editing of livestock genomes



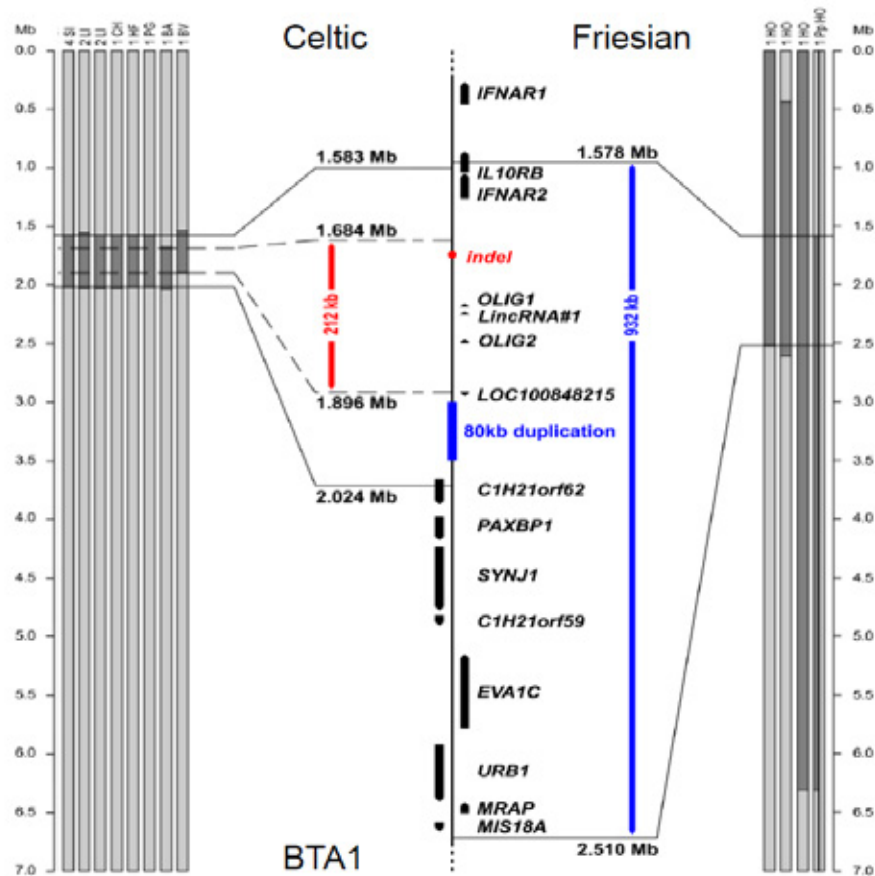
Genetic basis of polled cattle



Medugorac et al.,
PLoS ONE 7(6):
e39477 (2012)

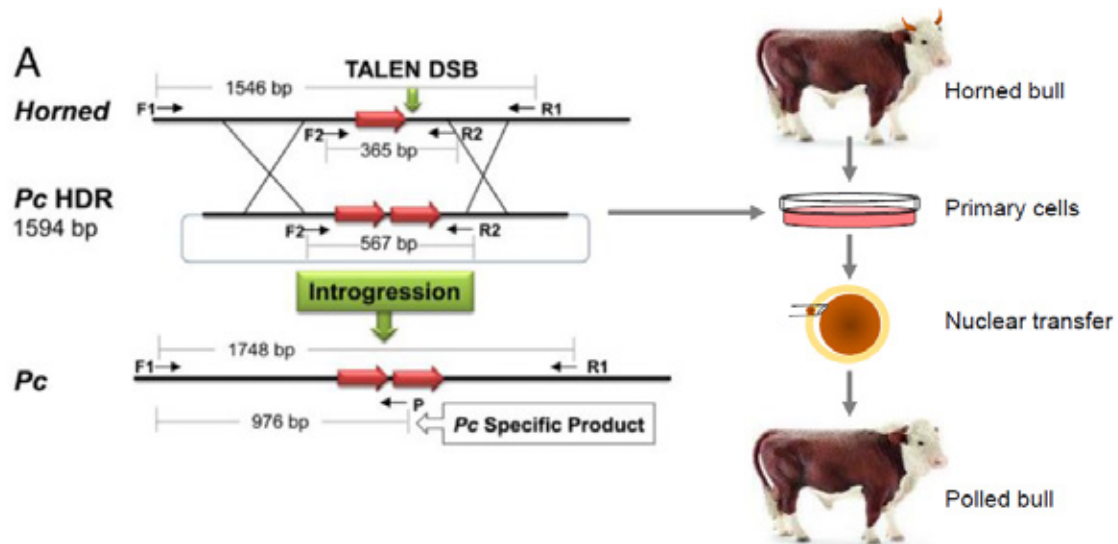
Rothammer et al.,
Genet Select Evol
46:44 (2014)

Wiedemar et al.,
PLoS ONE 9(3):
e93435 (2014)



Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases

Wenfang Tan^{a,b,1}, Daniel F. Carlson^{c,1}, Cheryl A. Lancto^c, John R. Garbe^d, Dennis A. Webster^c, Perry B. Hackett^{b,c,e}, and Scott C. Fahrenkrug^{a,b,c,2}



Tan et al., Proc Natl Acad Sci USA 110, 16526-31 (2013)

First gene edited polled cattle

Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines

Daniel F Carlson¹, Cheryl A Lancto¹, Bin Zang², Eui-Soo Kim¹, Mark Walton¹, David Oldeschulte³, Christopher Seabury³, Tad S Sonstegard¹ & Scott C Fahrenkrug¹



Spotigy and Buri

NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 34 NUMBER 5 MAY 2016

On the Horns of the GMO Dilemma

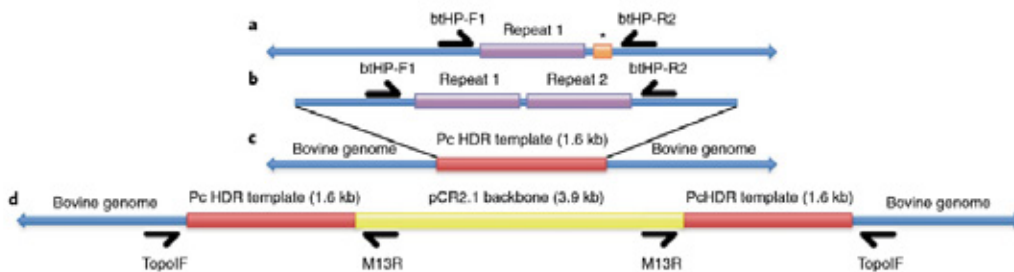
Can genome-editing revive the idea of genetically modified livestock?

The use of the technology remains experimental and far from the food chain. But some large breeding companies are starting to invest. "There may be an opportunity for a different public acceptance dialogue and different regulations," says Jonathan Lightner, R&D chief of the U.K. company Genus, which is the world's largest breeder of pigs and cattle and has paid for some of Recombinetics' laboratory research. "This isn't a glowing fish. It's a cow that doesn't have to have its horns cut off."

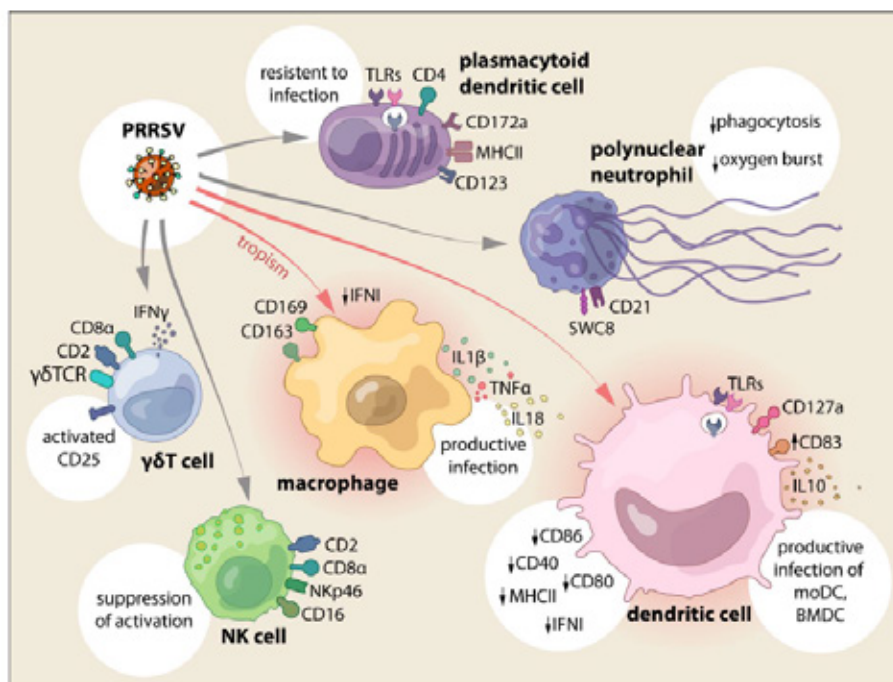
Genomic and phenotypic analyses of six offspring of a genome-edited hornless bull

Amy E. Young¹, Tamer A. Mansour^{2,3}, Bret R. McNabb³, Joseph R. Owen¹, Josephine F. Trott¹, C. Titus Brown³ and Alison L. Van Eenennaam^{1*}

Genome editing followed by reproductive cloning was previously used to produce two hornless dairy bulls. We crossed one genome-edited dairy bull, homozygous for the dominant P_C Celtic *POLLED* allele, with horned cows (*pp*) and obtained six heterozygous (P_Cp) polled calves. The calves had no horns and were otherwise healthy and phenotypically unremarkable. We conducted whole-genome sequencing of all animals using an Illumina HiSeq4000 to achieve $\sim 20\times$ coverage. Bioinformatics analyses revealed the bull was a compound heterozygote, carrying one naturally occurring P_C Celtic *POLLED* allele and an allele containing an additional introgression of the homology-directed repair donor plasmid along with the P_C Celtic allele. These alleles segregated in the offspring of this bull, and inheritance of either allele produced polled calves. No other unintended genomic alterations were observed. These data can be used to inform conversations in the scientific community, with regulatory authorities and with the public around 'intentional genomic alterations' and future regulatory actions regarding genome-edited animals.

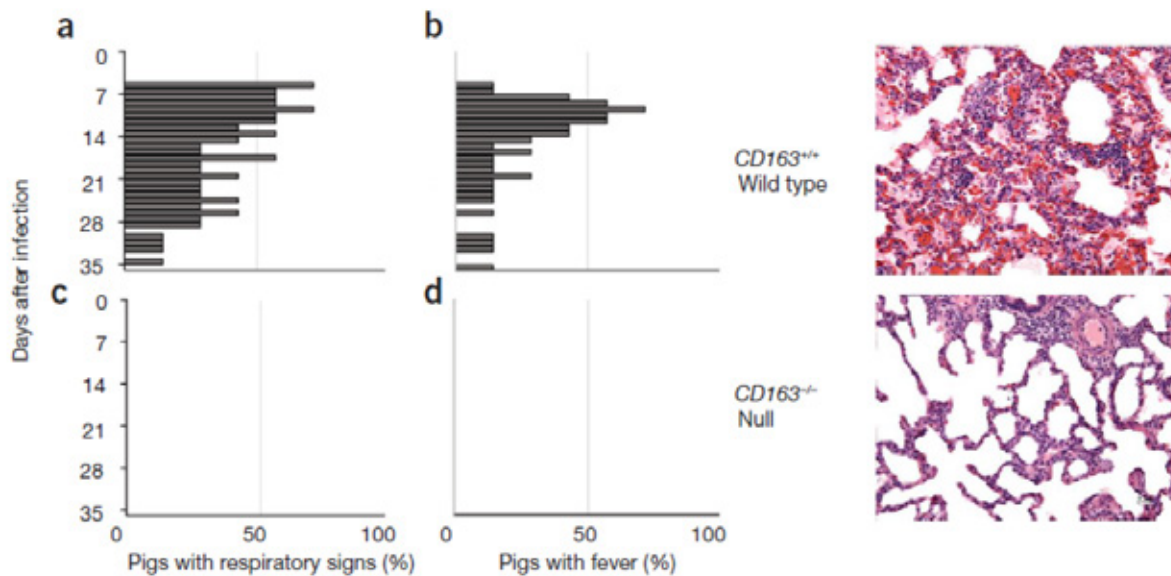


CD163 is essential for infection of macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome virus



Crisci et al., Vet Sci 2019, 6, 26; doi:10.3390/vetsci6010026

Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus



Witworth et al. Nat Biotechnol 34, 20-22 (2016)



VIRUS-CELL INTERACTIONS

Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection

Christine Burkard,² Tanja Opiressnig,^{2,3} Alan J. Mileham,⁵ Tomasz Stadejek,⁴ Tahar Ait-Ali,² Simon G. Lillico,² C. Bruce A. Whitelaw,² Alan L. Archibald²

August 2018 Volume 92 Issue 16 e00415-18

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Front. Immunol., 08 August 2019 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01846>

Highly Efficient Generation of Pigs Harboring a Partial Deletion of the CD163 SRCR5 Domain, Which Are Fully Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 2 Infection

Chunhe Guo¹, Min Wang¹, Zhenbang Zhu¹, Sheng He¹, Hongbo Liu¹, Xiaofeng Liu¹, Xuan Shi¹, Tao Tang¹, Piao Yu¹, Jianhua Zeng¹, Linfang Yang¹, Yongchang Cao¹, Yaosheng Chen¹, Xiaohong Liu¹ and Zuyong He¹*

¹State Key Laboratory of Biocontrol, Guangzhou Higher Education Mega Center, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China

²Guangdong YIHAO Food Co., Ltd., Guangzhou, China

The screenshot shows the website of the Bayerische Forschungsstiftung. The header includes the logo and navigation links like 'Startseite', 'Kontakt', and 'english excerpt'. A search bar is also present. The main navigation bar has tabs for 'DIE STIFTUNG', 'FÖRDERPROJEKTE', 'ANTRAGSTELLUNG', 'INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT', 'SERVICE', and 'DOWNLOADS'. On the left, there is a vertical menu with categories like 'LIFE SCIENCES', 'INFORMATIONEN- UND KOMMUNIKATIONSTECHNOLOGIEN', etc. The central content area features a project listing for 2018: 'FORTiGe Forschungsverbund – Tiergesundheit durch Genomik'. The text describes genomic approaches using CRISPR-Cas9 for animal health. Below the text are logos for 'ASR', 'BAYERN GENETIK', 'EGZH', 'BVN', and 'LOHMANN TIERZUCHT'. On the right, there is a 'Projektfinder' search box and a 'Forschungsverbünde' section.

Gen(om)e Editing in livestock – prospects and problems

- Functional validation of DNA polymorphisms in *in vitro* and *in vivo* models
- Precise recapitulation of human disease mechanisms or drug targets in large animal models
- Multimodified organ donor pigs for xenotransplantation
- Resolving linkage of antagonistic alleles
- Targeted exchange of alleles (*precision editing*)
- Acceptance for biomedicine, not for animal breeding

Where genome editing is needed

The journal endorses the principle of transparency in the production of genome-edited crops and livestock as a precondition for the registration of a breed or cultivar, with no further need for regulation or distinction of these goods from the products of traditional breeding.

NATURE GENETICS | VOLUME 48 | NUMBER 2 | FEBRUARY 2016

3 Das EuGH-Urteil vom 25.7.2018 und dessen Folgen für die Rechtslage nach dem Gentechnikrecht

Hans-Georg Dederer

Universität Passau

3.1 Urteil des EuGH vom 25.7.2018

3.1.1 Vorlagefragen des französischen Conseil d'État

Das Urteil des EuGH vom 25. Juli 2018 in der Rechtssache C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*,¹ geht auf eine Vorlage des französischen Conseil d'État gemäß Art. 267 Abs. 1 Buchst. b, Abs. 3 AEUV² zurück,³ also des französischen Staatsrats, der hier in seiner Funktion als oberster Verwaltungsgerichtshof Frankreichs handelte.⁴ Von den mehreren Vorlagefragen⁵ zur Auslegung der EU-Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG⁶ (nachfolgend: Richtlinie 2001/18/EG) ist im vorliegenden Zusammenhang allein die erste Frage bedeutsam, die wiederum im Wesentlichen zwei Fragen in sich vereinte.⁷ Kurz zusammengefasst lauteten diese beiden Fragen:

1. Sind Mutagenese-Organismen „genetisch veränderte Organismen (GVO)“ im Rechtssinne der Richtlinie 2001/18/EG?
2. Welche Reichweite hat die sog. „Mutagenese-Ausnahme“?

3.1.2 Maßgebliche Regulationsstruktur der Richtlinie 2001/18/EG

a) GVO-Definition als „Eingangsportal“

Verständlich werden diese beiden Fragen vor dem Hintergrund der insoweit maßgeblichen Regulationsstruktur der Richtlinie 2001/18/EG. Für die Eröffnung ihres Anwendungsbereichs ist zunächst entscheidend, ob ein Organismus die Legaldefinition des GVO in Art. 2 Nr. 2 der Richtlinie 2001/18/EG erfüllt. Diese Definition lautet auszugsweise wie folgt:

¹ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583

² Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union (ABl. EU C 306, 17.12.2007, S. 1)

³ Conseil d'État, 3e et 8e ch., 3 oct. 2016, n°388649, *Confédération Paysanne*, ECLI:FR:CECHR:2016:388649.20161003

⁴ siehe <https://www.conseil-etat.fr/le-conseil-d-etat/missions/juger-l-administration>

⁵ siehe EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 25

⁶ Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates (ABl. EU L 106, 17.4.2001, S. 1)

⁷ Siehe die Umformulierung der Frage durch den EuGH: EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 26

„genetisch veränderter Organismus (GVO)“: ein Organismus ..., dessen genetisches Material so verändert worden ist, wie es auf natürliche Weise ... nicht möglich ist“ (Art. 2 Nr. 2 der Richtlinie 2001/18/EG).

Diese Definition bildet gleichsam das „Eingangportal“ zur Richtlinie. Ein Organismus, welcher der Definition entspricht, geht gleichsam durch dieses „Portal“ und befindet sich damit (zunächst) im Anwendungsbereich der Richtlinie.

b) Bereichsausnahme als „Hintertür“

Allerdings sieht die Richtlinie in ihrem Art. 3 Abs. 1 daneben noch eine „Hintertür“ vor, nämlich eine Ausnahme vom Anwendungsbereich, kurz: eine sog. „Bereichsausnahme“. Organismen, welche den Kriterien der Bereichsausnahme genügen, werden durch diese „Hintertür“ wieder aus dem Anwendungsbereich der Richtlinie entlassen. D.h. es handelt sich eigentlich um GVO im Rechtssinne der Richtlinie, aber um solche GVO, die nach dem Willen des Gesetzgebers keiner Risikoregulierung bedürfen. Die hier relevante Bereichsausnahme in der speziellen Gestalt der schon erwähnten Mutagenese-Ausnahme lautet auszugsweise wie folgt:

„Diese Richtlinie gilt nicht für Organismen, bei denen eine genetische Veränderung durch den Einsatz der in Anhang I B aufgeführten Verfahren herbeigeführt wurde.“ (Art. 3 Abs. 1 der Richtlinie 2001/18/EG);

*„Verfahren/Methoden der genetischen Veränderung, aus denen Organismen hervorgehen, die von der Richtlinie auszuschließen sind ...:
1. Mutagenese, ...“ (Anhang I B Nr. 1 der Richtlinie 2001/18/EG).*

3.1.3 Antworten des EuGH

a) Zur GVO-Definition

Vor diesem Hintergrund war die Antwort des EuGH auf die erste Frage, ob Mutagenese-Organismen GVO im Rechtssinne der Richtlinie 2001/18/EG sind, eher nahe- als fernliegend. Kurz gefasst beantwortete der EuGH nämlich diese Frage dahin, dass Mutagenese-Organismen GVO bilden.⁸ In der Tat kann über die „Hintertür“ der Bereichsausnahme aus dem Anwendungsbereich der Richtlinie nur entweichen, was vorher im Anwendungsbereich der Richtlinie war, also durch das „Eingangportal“ in Gestalt der GVO-Definition in den Anwendungsbereich der Richtlinie gelangt sein musste.

⁸ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 27-38.

Werden Mutagenese-Organismen über die Mutagenese-Ausnahme aber aus dem Anwendungsbereich der Richtlinie entlassen, dann müssen sie vorher im Anwendungsbereich der Richtlinie gewesen sein, also den Kriterien der GVO-Definition entsprochen haben.⁹

b) Zur Mutagenese-Ausnahme

Umso bedeutender wurde die Antwort des EuGH auf die zweite Frage nach der Reichweite der Mutagenese-Ausnahme. Würden darüber sämtliche Mutagenese-Organismen aus dem Anwendungsbereich der Richtlinie entweichen können – oder nur solche, die mit Techniken der tradierten, chemisch (mittels mutagener Agenzien) oder physikalisch (mittels ionisierender Bestrahlung) induzierten, aber ungezielten Mutagenese¹⁰ erzeugt werden? Aus den Entscheidungsgründen ergibt sich eindeutig, dass jedenfalls solche GVO nicht aus dem Anwendungsbereich der Richtlinie 2001/18/EG entlassen werden dürfen, welche aus neuartigen Verfahren der Mutagenese hervorgehen, „die seit dem Erlass der Richtlinie [am 12.03.2001] entstanden sind oder sich hauptsächlich entwickelt haben“.¹¹ Wie sich aus den Entscheidungsgründen weiter ableiten lässt,¹² meinte der EuGH damit „Verfahren/Methoden der gezielten Mutagenese, bei denen neue gentechnische Verfahren wie die Mutagenese mit Hilfe von Oligonukleotiden oder die Mutagenese mit Hilfe zielgerichteter Nukleasen zur Anwendung [kommen]“.¹³ Die ODM- und die SDN-Verfahren sind aber gerade diejenigen neuartigen Züchtungsverfahren, die unter dem Begriff „Genomeditierung“ zusammengefasst werden.¹⁴

Im Ergebnis bedeutet dies, dass alle genomeditierten Organismen GVO sind und als solche uneingeschränkt von der Richtlinie 2001/18/EG erfasst werden.

3.1.4 Begründungsgang des EuGH

Zentrale Begründungselemente des EuGH waren zum einen der 17. Erwägungsgrund der Richtlinie 2001/18/EG, zum anderen der 8. Erwägungsgrund in Verbindung mit Art. 1 und Art. 4 Abs. 1 der Richtlinie 2001/18/EG.

a) Motiv des Gesetzgebers: Ausnahme nur bei Erlass der Richtlinie bereits als sicher geltender Verfahren

⁹ Dass man das juristisch differenzierter sehen kann, hat mit durchaus überzeugenden Erwägungen der Generalanwalt in seinen Schlussanträgen gezeigt. Siehe Schlussanträge des Generalanwalts Michal Bobek vom 18. Januar 2018, Rechtssache C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, Rn. 66.

¹⁰ Siehe hierzu auch Conseil d'État, 3e et 8e ch., 3 oct. 2016, n°388649, *Confédération Paysanne*, ECLI:FR:CECHR:2016:388649.20161003, Rn. 23.

¹¹ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 51.

¹² siehe EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 51, 47, 23.

¹³ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 23.

¹⁴ siehe etwa Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, *Genome Editing*, S. 7-17.

Der 17. Erwägungsgrund der Richtlinie lautet:

„Diese Richtlinie sollte nicht für Organismen gelten, die mit Techniken zur genetischen Veränderung gewonnen werden, die herkömmlich bei einer Reihe von Anwendungen angewandt wurden und seit langem als sicher gelten.“

Der EuGH¹⁵ hat diesen Erwägungsgrund als gesetzgeberisches Motiv für die Bereichsausnahme des Art. 3 Abs. 1 der Richtlinie 2001/18/EG, insbesondere in Gestalt der Mutagenese-Ausnahme (Anhang I B Nr. 1 der Richtlinie 2001/18/EG), aufgefasst.¹⁶ Durch die „Hintertür“ entweichen konnten damit nur diejenigen GVO, die mit solchen Techniken der Mutagenese gewonnen werden, „die herkömmlich bei einer Reihe von Anwendungen angewandt wurden und seit langem als sicher gelten“. Aus der Sicht des EuGH ließ sich dies für die neuartigen Techniken der Genomeditierung nicht sagen. Hierzu stütze sich der Gerichtshof entscheidend auf die Feststellungen des französischen Conseil d'État und übernahm dessen Auffassung,¹⁷ wonach die von den ODM- und SDN-Techniken ausgehenden Risiken „noch nicht mit Sicherheit bestimmt werden“ könnten und vor allem „vergleichbar mit den bei der Erzeugung und Verbreitung von GVO durch Transgenese auftretenden Risiken“ seien.¹⁸ Als risikoe erhöhend (und insoweit wiederum im Anschluss an die Feststellungen des Conseil d'État)¹⁹ fasste der EuGH dabei auf, „dass die Entwicklung dieser neuen Verfahren/Methoden die Erzeugung genetisch veränderter Sorten in einem ungleich größeren Tempo und Ausmaß als bei der Anwendung herkömmlicher Methoden der Zufallsmutagenese ermöglicht“.²⁰

b) Zweck der Richtlinie: Vorsorge gegen potentielle Umwelt- und Gesundheitsrisiken

Vor diesem Hintergrund brachte der EuGH noch den Schutzzweck der Richtlinie 2001/18/EG und das in der Richtlinie speziell positiviert Vorsorgeprinzip ins Spiel. Art. 1 der Richtlinie beschreibt deren Schutzzweck wie folgt:

„Entsprechend dem Vorsorgeprinzip ist das Ziel dieser Richtlinie ... der Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt ...“

¹⁵ Anders als der Generalanwalt. Siehe Schlussanträge des Generalanwalts Michal Bobek vom 18. Januar 2018, Rechtssache C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, Rn. 92-95.

¹⁶ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 44-48.

¹⁷ Conseil d'État, 3e et 8e ch., 3 oct. 2016, n°388649, *Confédération Paysanne*, ECLI:FR:CECHR:2016:388649.20161003, Rn. 28.

¹⁸ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 47-48.

¹⁹ Conseil d'État, 3e et 8e ch., 3 oct. 2016, n°388649, *Confédération Paysanne*, ECLI:FR:CECHR:2016:388649.20161003, Rn. 28.

²⁰ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 48.

Ergänzend normiert Art. 4 Abs. 1 Satz 1 der Richtlinie:

„Die Mitgliedstaaten tragen im Einklang mit dem Vorsorgeprinzip dafür Sorge, dass alle geeigneten Maßnahmen getroffen werden, damit die absichtliche Freisetzung oder das Inverkehrbringen von GVO keine schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt hat.“

Der 8. Erwägungsgrund der Richtlinie 2001/18/EG hält schließlich fest, dass das Vorsorgeprinzip für den Gemeinschaftsgesetzgeber beim Erlass der Richtlinie bedeutsam war und deshalb auch für die Umsetzung und damit Auslegung leitend sein muss:

„Der Grundsatz der Vorsorge wurde bei der Ausarbeitung dieser Richtlinie berücksichtigt und muss bei ihrer Umsetzung berücksichtigt werden.“

Die auf den Schutzzweck und das Vorsorgeprinzip gestützte Argumentation des EuGH²¹ ist zwar nicht abwegig, aber überaus oberflächlich und weit von den eigenen, äußerst strengen Maßstäben entfernt, an welchen der Gerichtshof sonst z.B. eine Berufung der Mitgliedstaaten auf das Vorsorgeprinzip misst.²² Nur bei einer äußerst summarischen, den wissenschaftlichen Erkenntnisstand ausblendenden Betrachtungsweise konnte man zum Schluss kommen: Wenn die mit der Genomeditierung verbundenen Risiken denjenigen, welche bei der Transgenese, also der „klassischen“ Gentechnik, für welche die Richtlinie 2001/18/EG ursprünglich im Wesentlichen konzipiert war, nicht nur entsprechen, sondern diese Risiken sogar übertreffen und sich dazu noch nicht einmal „mit Sicherheit bestimm[en]“ lassen, dann kann es im Lichte des Schutzzwecks der Richtlinie in Verbindung mit dem Vorsorgeprinzips nicht sein, dass genomeditierte Organismen aus dem Anwendungsbereich der Richtlinie herausfallen.

²¹ EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 49-53.

²² Hierzu *Dederer*, Genomeditierung ist Gentechnik, EurUP 2019, S. 236 (242); gleichfalls kritisch *Beck*, All About That Risk?, EurUP 2019, S. 246 (252); *Faltus*, Mutagene(se) des Gentechnikrechts, ZUR 2018, S. 524 (530); *Seitz*, Modifiziert oder nicht? EuZW 2018, S. 757 (762-763); dem EuGH dagegen zustimmend *Spranger*, Neue Techniken und Europäisches Gentechnikrecht, NJW 2018, S. 2929 (2929-2930); eher eine vermittelnde Position einnehmend *Andersen/Schreiber*, „Genome Editing“ vor dem EuGH und seine Folgen, NuR 2020, S. 99 (106). Vgl. auch Schlussanträge des Generalanwalts *Michal Bobek* vom 18. Januar 2018, Rechtssache C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, Rn. 102-104.

3.2 Folgen für die Rechtslage nach dem Gentechnikrecht

3.2.1 Erstreckung auf „Freisetzung“ und „Inverkehrbringen“

Verständlich werden die – weitreichenden – Folgen des EuGH-Urteils nur vor dem Hintergrund der Regelungskonzeption des europäischen Gentechnikrechts. Jenes beruht gemäß dem 24. Erwägungsgrund der Richtlinie 2001/18/EG auf dem Stufenprinzip, wonach

„die Einschließung der GVO ... nach und nach stufenweise gelockert und ihre Freisetzung in der gleichen Weise ausgeweitet [wird], jedoch nur dann, wenn die Bewertung der vorherigen Stufen in bezug auf den Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt ergibt, dass die nächste Stufe eingeleitet werden kann.“

Danach sind drei Stufen zu unterscheiden: das „geschlossene System“, die „Freisetzung“ und das „Inverkehrbringen“. Nach dieser Typisierung werden GVO zunächst (1. Stufe) im geschlossenen System (z.B. Labor, Wachstumskammer, Gewächshaus) hergestellt, entwickelt und geprüft, danach (2. Stufe) im Freiland im Wege der Freisetzung in die Umwelt getestet (z.B. zunächst im kleinen Maßstab mit höheren Sicherheitsvorkehrungen, dann im großen Maßstab mit geringeren Sicherheitsvorkehrungen), um anschließend (3. Stufe) in Verkehr gebracht, also als Produkte vermarktet zu werden.

Die Richtlinie 2001/18/EG gilt nur für die 2. und 3. Stufe, also für die „Freisetzung“ (Teil B der Richtlinie 2001/18/EG) und für das „Inverkehrbringen“ (Teil C der Richtlinie 2001/18/EG), insoweit aber nur solcher Produkte, deren Inverkehrbringen nicht einem speziellen gentechnikrechtlichen Regelwerk unterfällt (vgl. Art. 12 der Richtlinie 2001/18/EG). Solche speziellen Vorschriften hat der Unionsgesetzgeber für Saat- und Pflanzgut,²³ Lebens- und Futtermittel,²⁴ Pflanzenschutzmittel²⁵ sowie Arzneimittel²⁶ erlassen. Einen eigenen Rechtsrahmen hat der Unionsgesetzgeber für das geschlossene System vorgesehen.²⁷

²³ Richtlinie 2002/53/EG des Rates vom 13. Juni 2002 über einen gemeinsamen Sortenkatalog für landwirtschaftliche Pflanzenarten (ABl. EU L 193, 20.08.2002, S. 1); Richtlinie 2002/55/EG des Rates vom 13. Juni 2002 über den Verkehr mit Gemüsesaatgut (ABl. EU L 193, 20.7.2002, S. 33); Richtlinie 1999/105/EG des Rates vom 22. Dezember 1999 über den Verkehr mit forstlichem Vermehrungsgut (ABl. EU L 11, 15.1.2000, S. 17); Richtlinie 2008/90/EG des Rates vom 29. September 2008 über das Inverkehrbringen von Vermehrungsmaterial und Pflanzen von Obstarten zur Fruchterzeugung (ABl. EU L 267, 8.10.2008, S. 8); Richtlinie 68/193/EWG des Rates vom 9. April 1968 über den Verkehr mit vegetativem Vermehrungsgut von Reben (ABl. EU L 93, 17.4.1968, S. 15).

²⁴ Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel (ABl. EU L 268, 18.10.2003, S. 1).

²⁵ Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates (ABl. EU L 309, 24.11.2009, S. 1).

²⁶ Verordnung (EG) Nr. 726/2004/ des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 zur Festlegung von Gemeinschaftsverfahren für die Genehmigung und Überwachung von Human- und Tierarzneimitteln und zur Errichtung einer Europäischen Arzneimittel-Agentur (ABl. EU L 136, 30.4.2004, S. 1).

²⁷ Richtlinie 2009/41/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen (ABl. EU L 125, 21.5.2009, S. 75).

Das Urteil des EuGH gilt zunächst nur für die Richtlinie 2001/18/EG. Damit unterliegen genomeditierte Organismen deren Regelungen über GVO-Freilandversuche sowie über das Inverkehrbringen von GVO-Produkten unter Einschluss des GVO-Anbaus.

Unmittelbare Bedeutung hat das Urteil des EuGH aber auch für diejenigen Spezialvorschriften, welche das Inverkehrbringen der oben genannten Produkte, also von Saat- und Pflanzgut, Lebens- und Futtermitteln, Pflanzenschutzmitteln sowie Arzneimitteln betreffen. Denn deren Anwendungsbereiche bestimmen sich anhand der GVO-Definition und der Bereichsausnahme der Richtlinie 2001/18/EG.²⁸ Mithin erstrecken sich diese speziellen Regelwerke im Gefolge des EuGH-Urteils nunmehr auch auf genomeditierte Organismen.²⁹ Gleiches gilt schließlich für die horizontalen, also nicht auf bestimmte Produktkategorien begrenzten Regeln über die Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von GVO³⁰ sowie über die grenzüberschreitende Verbringung von GVO.³¹

3.2.2 Vollzugsprobleme

a) Fehlende Identifizierungs-, Nachweis- und Überwachungsverfahren

Freilich ergeben sich aus der Anwendung der vorgenannten Regelungen auf genomeditierte Organismen spezifische Vollzugsprobleme. So stellt sich das Problem, dass in Anträgen auf Genehmigung von Freisetzungen oder des Inverkehrbringens von Produkten Informationen über Identifizierungs-, Nachweis- und Überwachungsverfahren beizubringen sind.³² Zwar dürften sich mittels Genomeditierung erzeugte Mutationen nachweisen, aber nicht in dem Sinne identifizieren lassen, dass ihre Entstehung auf die Anwendung von Techniken der Genomeditierung zurückzuführen ist. Vielmehr verhält es sich nach dem Stand von Wissenschaft und Technik so, dass jedenfalls mittels ODM oder SDN-1- oder SDN-2-Techniken erzeugte Mutationen von natürlichen Mutationen oder im Wege klassischer, d.h. chemisch oder physikalisch induzierter Mutagenese hervorgerufene Mutationen nicht zu unterscheiden sind.³³

²⁸ Vgl. Art. 4 Abs. 4 Richtlinie 2002/53/EG; Art. 4 Abs. 2 Richtlinie 2002/55/EG; Art. 5 Abs. 1 Richtlinie 1999/105/EG; Art. 3 Abs. 2; Art. 5ba Abs. 1 Richtlinie 68/193/EWG; Art. 2 Nr. 5 Verordnung (EG) Nr. 1829/2003; Art. 3 Nr. 16 Verordnung (EG) Nr. 1107/2009; Art. 6 Abs. 2 UAbs. 1, Art. 31 Abs. 2 UAbs. 1 Verordnung (EG) Nr. 726/2004.

²⁹ Ebenso mit Blick auf Art. 4 Abs. 4 Richtlinie 2002/53/EG bereits der EuGH, Rs. C-528/16, *Confédération paysanne u.a.*, ECLI:EU:C:2018:583, Rn. 55-68.

³⁰ Vgl. Art. 3 Nr. 1 Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG (ABl. EU L 268, 18.10.2003, S. 24).

³¹ Vgl. Art. 3 Nr. 2 Verordnung (EG) Nr. 1946/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Juli 2003 über grenzüberschreitende Verbringungen genetisch veränderter Organismen (ABl. EU L 287, 05.11.2003, S. 1).

³² Vgl. etwa Anhang IIIA II. A. 6.-7., II. C. 2. f) - g), V. A. 1., 3, Anhang IIIB I. B. 5., II. B. 5., Anhang IV A. 7. der Richtlinie 2001/18/EG.

³³ Vgl. etwa Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit, Zur Identifizierbarkeit von Genomeditierungen in Pflanzen. Kommentar zu Y. Bertheau, 2019 [http://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/01_Aktuelles/Kommentar%20zu%20Bertheau%20\(2019\)/Kommentar%20zu%20Bertheau_basepage.html?nn=8568694](http://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/01_Aktuelles/Kommentar%20zu%20Bertheau%20(2019)/Kommentar%20zu%20Bertheau_basepage.html?nn=8568694).

b) Risiko von Feldzerstörungen

Darüber hinaus müssen Feldversuche mit genomeditierten Organismen ebenso wie der kommerzielle Anbau genomeditierter Pflanzen in das Standortregister eingetragen werden, welches die Grundstücke, auf welchen der Versuch bzw. der Anbau stattfindet, exakt bezeichnet (§ 16a Abs. 1, Abs. 2 Satz 1 Nr. 3, Abs. 3 Satz 2 Nr. 4, Abs. 4 Satz 1 Nr. 3 GenTG³⁴). Damit besteht die bereits aus der Freisetzung „klassischer“ GVO bekannte Gefahr vollständiger Feldzerstörungen.³⁵

c) Politisiertes Genehmigungsverfahren

Ferner unterliegt das Inverkehrbringen einem Genehmigungsverfahren, das sich in der Vergangenheit als höchst politisiert und damit langwierig, in der Folge als übermäßig zeit- und kostenintensiv und vom Ausgang letztlich unvorhersehbar erwiesen hat.³⁶

d) Koexistenz- und Opt-out-Problematik

Im Fall des Anbaus genomeditierter Nutzpflanzen greift außerdem das in Art. 26a der Richtlinie 2001/18/EG ermöglichte, auf nationaler Ebene im deutschen Gentechnikgesetz konkretisierte Koexistenzregime. Danach trifft den Landwirt, der genomeditierte Nutzpflanzen anbaut, die Pflicht zur Vorsorge gegen Einträge der spezifisch auf Genomeditierung beruhenden genetischen Veränderungen seiner Pflanzen in Nachbarkulturen (vgl. § 16b GenTG). Kommt es zu einer solchen Kontamination, kann die verschuldensunabhängige Nachbarschaftshaftung greifen (vgl. § 36a GenTG i.V. mit § 906 Abs. 2 Satz 2 BGB). Freilich stellt sich auch hier wieder eine spezifisch mit der Genomeditierung zusammenhängende Beweisproblematik. Denn selbst wenn in benachbarten Beständen eine genetische Veränderung nachweisbar wäre, welche derjenigen in den genomeditierten Nutzpflanzen entspricht, ließe sich argumentieren, dass jene Mutationen in den Nachbarbeständen auf natürlichem Wege (zum Beispiel durch die UV-Strahlung der Sonne oder schlicht im Zuge von Zellteilungen) zustande gekommen seien. Hier stellen sich dann Fragen nach der Beweislast(-verteilung), dem Beweismaß und der Zulassung des indirekten Beweises.

Ferner ist zu bedenken, dass ein Mitgliedstaat von der Möglichkeit des sog. Opt-outs Gebrauch macht,³⁷ also den Anbau genomeditierter Nutzpflanzen auf seinem Staatsgebiet oder in Teilen desselben beschränkt oder verbietet (vgl. Art. 26b und Art. 26c der Richtlinie 2001/18/EG).

³⁴ Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz – GenTG) vom 20.6.1990.

³⁵ Siehe Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina/Deutsche Forschungsgemeinschaft/Union der deutschen Akademien der Wissenschaften, Wege zu einer wissenschaftlich begründeten, differenzierten Regulierung genomeditierter Pflanzen in der EU, 2019, S. 4-5, 19.

³⁶ Vgl. *Dederer*, Genetic Technology and Food Security, in: Schmidt-Kessel (Hrsg.), German national Reports on the 19th International Congress of Comparative Law, 2014, S. 303 (332-338).

³⁷ Was für Deutschland mangels gesetzlicher Regelung nicht möglich ist.

e) Verbrauchertäuschung durch „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung?

Umstritten ist die Frage, inwiefern die „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung weiterhin für Produkte verwendet werden kann, wenn im Verlauf ihrer Herstellung Mutagenese-Organismen verwendet wurden, die nach dem Urteil des EuGH sämtlich als GVO zu gelten haben. Insofern ist nochmals daran zu erinnern, dass auch die mittels „klassischer“, d.h. chemisch oder physikalisch induzierter Mutagenese erzeugten Organismen GVO im Rechtssinne des Gentechnikrechts sind. Zwar lässt die deutsche Kennzeichnungsregelung in § 3a EG-GenTGDurchfG³⁸ die „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung weiterhin zu. Indes wird argumentiert, dass das höherrangige Unionsrecht für die allgemeine Lebensmittelkennzeichnung eine Anwendung der nationalen Regelung über die „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung nicht zulasse.³⁹ Denn in dieser Kennzeichnung liege eine unionsrechtliche verbotene Verbrauchertäuschung. Wegen des Anwendungsvorrangs des Unionsrechts könne darüber auch nicht die Figur der „gesetzlich autorisierten Verbrauchertäuschung“ hinweghelfen (um die es sich der Sache nach bei der „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung schon immer gehandelt hat), weil das nationale, eine solche Verbrauchertäuschung zulassende Gesetzesrecht eben nicht anwendbar sei. Allerdings ist für den Tatbestand der Verbrauchertäuschung auf den „durchschnittlich informierten, aufmerksamen und verständigen Durchschnittsverbraucher“ abzustellen.⁴⁰ Vor dem Hintergrund dieses unionsrechtlichen Verbraucherleitbildes dürfte sich (mit einer gewissen Vorsicht) argumentieren lassen, dass ein solcher „Durchschnittsverbraucher“ mit „Gentechnik“ bzw. „GVO“ bislang schon nur solche Verfahren bzw. Organismen verbunden hat und (wohl) weiterhin verbindet, die auch reguliert werden, weil sie (anscheinend) für Menschen und Umwelt dem Grunde nach potentiell riskant sind. Nicht regulierte Organismen, und seien es nur von der Regulierung ausgenommene GVO, dürften sich dagegen aus Verbrauchersicht als gleichsam „unverdächtig“ darstellen, weshalb ihre Verwendung – aus Sicht des Verbrauchers – einer „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung wohl nicht entgegensteht. Denn das Label „Ohne Gentechnik“ dürfte aus Verbrauchersicht wohl für „traditionell, konventionell, sicher“, kurz: für „vertraut“, d.h. für nicht mit einer Risikoregulierung unterliegender Gentechnik in Berührung gekommen, stehen.

³⁸ Gesetz zur Durchführung der Verordnungen der Europäischen Gemeinschaft oder der Europäischen Union auf dem Gebiet der Gentechnik und über die Kennzeichnung ohne Anwendung gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel (EGGentechnik-Durchführungsgesetz – EGGenTDurchfG) vom 22.4.2004.

³⁹ *Kahrmann/Leggewie*, Gentechnikrechtliches Grundsatzurteil des EuGH und die Folgefragen für das deutsche Recht, NuR 2018, S. 761 (765).

⁴⁰ Hierzu *Schmitt*, Das unionsrechtliche Verbraucherleitbild, 2018, S. 55-56.

f) Schwächung des Forschungsstandorts

Zu denken ist auch an wissenschaftspolitische Folgen, zu welchen die Schwächung des Forschungsstandortes EU gehört.⁴¹ Tatsächlich haben europäische Unternehmen bereits ihre Forschungseinrichtungen im Nachgang zum EuGH-Urteil zum Teil vollständig in die USA verlegt. Darüber hinaus kann die fehlende Aussicht auf eine kommerzielle Anwendung genomeditierter Nutzpflanzen oder Tiere auch nachteilige Rückwirkungen auf die universitäre Forschung haben. Denn warum sollte sich ein Doktorand oder Postdoc auf jahrelange, spezialisierte Forschung auf dem Gebiet der Genomeditierung einlassen, wenn sich damit keine beruflichen Perspektiven, vor allem außerhalb der Universität, z.B. in Unternehmen der Saatgut- bzw. Züchtungsindustrie verbinden lassen. Auch dürfte es unzumutbar sein, Doktoranden oder Postdocs Forschungsarbeiten durchführen zu lassen, die mit Freilandversuchen verbunden sind, deren Zerstörung zu erwarten ist.

g) Welthandelsrechtliches Prozessrisiko

Zum anderen sind erhebliche Beeinträchtigungen des Welthandels nicht auszuschließen.⁴² Momentan entwickelt sich die Regulierungspraxis zwischen der Union einerseits und Drittstaaten (wie in Süd- und Mittelamerika in Argentinien, Brasilien, Chile, Ecuador, Honduras, Kolumbien, Paraguay, in Nordamerika in den USA und Kanada, im asiatisch-pazifischen Raum in Japan und Australien) diametral auseinander. Genomeditierte Organismen werden in vielen der genannten Drittstaaten nicht reguliert, durchlaufen also insbesondere kein behördliches Genehmigungsverfahren. Demgegenüber stoßen sie beim Zugang zum europäischen Binnenmarkt auf die Hürde der Genehmigungspflicht für das Inverkehrbringen von GVO-Produkten. Es ist durchaus naheliegend, dass jene Drittstaaten in diesem Marktzugangshindernis ein welthandelsrechtlich unzulässiges Handelshemmnis sehen. Darüber hinaus stellt sich erneut das Nachweis- und Identifikationsproblem. Selbst wenn sich in einer Schiffsladung anhand von repräsentativen Stichproben eine Mutation nachweisen ließe, bliebe unklar, ob jene natürlich entstanden ist, auf herkömmlichen Züchtungsmethoden beruht oder mittels Genomeditierung erzeugt worden ist.

⁴¹ Zum Folgenden Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina/Deutsche Forschungsgemeinschaft/Union der deutschen Akademien der Wissenschaften, Wege zu einer wissenschaftlich begründeten, differenzierten Regulierung genomeditierter Pflanzen in der EU, 2019, S. 5-6, 19-21, 31.

⁴² Zum Folgenden Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina/Deutsche Forschungsgemeinschaft/Union der deutschen Akademien der Wissenschaften, Wege zu einer wissenschaftlich begründeten, differenzierten Regulierung genomeditierter Pflanzen in der EU, 2019, S. 27-29.

3.3 Erstreckung auf das „geschlossene System“

Ein besonderes Problem bildet die Übertragbarkeit des EuGH-Urteils auf die Regeln über das geschlossene System. Wie bereits kurz dargestellt, unterliegt das geschlossene System einer eigenen, eigenständigen Regulierung in Gestalt der Richtlinie 2009/41/EG.

Deren Eigenständigkeit zeigt sich darin, dass sie nicht für alle GVO, sondern nur für eine Teilmenge daraus, nämlich die genetisch veränderten Mikroorganismen (GVM) gilt. Ferner definiert sie ihren Anwendungsbereich in der Folge autonom anhand einer eigenen GVM-Definition und einer eigenen Bereichsausnahme.

Gleichwohl gibt es überzeugende Gründe dafür, letztlich auch die Richtlinie 2009/41/EG und damit die nationalen, diese Richtlinie umsetzenden Vorschriften über das geschlossene System auf genomeditierte (Mikro-)Organismen zu erstrecken.⁴³

Hierfür spricht zum einen der annähernd identische Wortlaut der Definitionen und Bereichsausnahmen. So lautet die GVM-Definition der Richtlinie 2009/41/EG:

„genetisch veränderter Mikroorganismus‘ (GVM) ... Mikroorganismus, dessen genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie es unter natürlichen Bedingungen ... nicht vorkommt“ (Art. 2 lit. b RL 2009/41/EG).

Die Bereichsausnahme wiederum ist wie folgt formuliert:

„[D]iese Richtlinie [gilt] nicht für ... die Fälle, in denen eine genetische Veränderung durch den Einsatz der in Anhang II Teil A aufgeführten Verfahren/Techniken herbeigeführt wird“ (Art. 3 Abs. 1 Buchst. a RL 2009/41/EG);

„Techniken oder Methoden der genetischen Veränderung zur Herstellung von Mikroorganismen, die von der Richtlinie auszuschließen sind ...:

1. Mutagenese, ...“ (Anhang II Teil A Nr. 1 und 4 RL 2009/41/EG).

Zum anderen lassen sich die Entscheidungsgründe, welche den EuGH bei seiner Auslegung der GVO-Definition und der Mutagenese-Ausnahme der Richtlinie 2001/18/EG geleitet haben, auf die Richtlinie 2009/41/EG und die dort normierte GVM-Definition samt Bereichsausnahme im Prinzip übertragen. So sind von einem methodischen Standpunkt aus Ausnahmeregelungen, mithin auch die Regelungen beider Richtlinien über die Mutagenese-Ausnahmen, eng auszulegen.

⁴³ Im Ergebnis ebenso und von der Argumentation her ähnlich bereits *Kahrmann/Leggewie*, Gentechnikrechtliches Grundsatzurteil des EuGH und die Folgefragen für das deutsche Recht, NuR 2018, S. 761 (764); *Spranger*, Memorandum zur Frage der Übertragbarkeit der Ausführungen des Europäischen Gerichtshofes in der Rs. C-528/16 auf den Regulierungsbereich der Systemrichtlinie 2009/41/EG, 2019 (abrufbar unter https://www.bfn.de/fileadmin/BfN/recht/Dokumente/System_Memorandum_final.pdf).

Ferner sind die Schutzzwecke der beiden Richtlinien identisch (vgl. Art. 1 der Richtlinien 2001/18/EG und 2009/41/EG). Darüber hinaus ist die Richtlinie 2009/41/EG nicht anders als die Richtlinie 2001/18/EG im Lichte des Vorsorgeprinzips zu interpretieren. Das hat seinen Grund bereits darin, dass die Richtlinie 2009/41/EG auf einer umweltpolitischen Kompetenzgrundlage beruht (Art. 192 Abs. 1 AEUV) und deshalb das für die Umweltpolitik der Union bereits auf der höheren, vertraglichen Ebene positiviert Vorsorgeprinzip (Art. 191 Abs. 1 UAbs. 1 Satz 2 AEUV) beim Erlass der Richtlinie und in der Folge auch bei ihrer Auslegung zu beachten ist. Schließlich spricht vor dem Hintergrund des oben skizzierten Stufenprinzips der Kohärenzgedanke dafür, dass genomeditierte (Mikro-)Organismen unter die Regeln über das geschlossene System fallen. Denn es würde dem Stufenprinzip widersprechen, wenn genomeditierter (Mikro-)Organismen erstmals auf der 2. Stufe der Freisetzung reguliert würden, ohne zuvor den Regeln über das geschlossene System, der 1. Stufe, unterworfen gewesen zu sein.

4 Neue Molekularbiologische Techniken: Herausforderungen für die Analytik – Aktivitäten des NRL GVO

Christopher Weidner

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin

4.1 Zusammenfassung

Mit der Entwicklung von neuen molekularbiologischen Techniken (NMT) wie beispielsweise CRISPR/Cas, TALEN und Zinkfingernukleasen stehen zur Züchtung von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen Methoden bereit, die eine gewünschte Veränderung des Genoms enorm beschleunigen. Gleichzeitig können mit diesen Methoden genetische Veränderungen erzeugt werden, die sich nur um eine einzige Base von der ursprünglichen Genomsequenz unterscheiden. Mit seinem Urteil vom 25.07.2018 hat der Europäische Gerichtshof (EuGH) festgestellt [1], dass Organismen, die mittels NMT erzeugt wurden, gentechnisch veränderte Organismen (GVO) sind und somit unter die Regularien der GVO-Richtlinie (2001/18/EG) fallen [2]. Daraus ergeben sich insbesondere für die mit der amtlichen Kontrolle von GVO in Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut zuständigen Laboratorien Herausforderungen für die Analytik. Das Nationale Referenzlabor (NRL) für GVO am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) unterstützt die amtlichen Kontrolllaboratorien durch seine Tätigkeiten hinsichtlich der Methodenentwicklung und -harmonisierung bei der Bewältigung der analytischen Herausforderungen.

In der Verordnung (EU) Nr. 2017/625 [3] sind die Aufgaben der EU-Referenzlaboratorien, der nationalen Referenzlaboratorien und der amtlichen Kontrolllaboratorien festgelegt (**Abbildung 1**).



Abbildung 1: Zusammenarbeit zwischen Referenzlaboren und amtlichen Kontrolllaboren in der GVO-Analytik

Die EU-Referenzlaboratorien werden von der EU-Kommission, die nationalen Referenzlaboratorien vom jeweiligen Mitgliedsstaat benannt. Ein zentrales Ziel aller Referenzlaboratorien ist die Harmonisierung und Verbesserung von Analysemethoden. Im Bereich der GVO-Analytik stellt die Validierung von Methoden während des Zulassungsprozesses von GVO eine wichtige Aufgabe des EU-Referenzlaboratoriums dar. Die Untersuchung von Proben im Rahmen der Überwachung gehört aufgrund der föderalen Struktur der Lebensmittelüberwachung in Deutschland zu den Aufgaben der zuständigen Behörden der Bundesländer.

Die Nationalen Referenzlaboratorien stellen eine Schaltstelle zwischen den EU-Referenzlaboratorien und den Laboratorien der amtlichen Kontrolle in Deutschland dar. Die NRL koordinieren die Tätigkeiten der amtlichen Kontrolllaboratorien mit dem Ziel, Analysemethoden und deren Verwendung zu standardisieren um Leistungsfähigkeit und Bewertungsstrategien zu harmonisieren und eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse in Deutschland sicherzustellen (**Abbildung 2**). Dazu unterstützen die NRL die amtlichen Kontrolllaboratorien bei der Qualitätssicherung, indem sie beispielsweise Referenzmaterialien, Standardsubstanzen und gegebenenfalls Beschreibungen selbst entwickelter Methoden zur Verfügung stellen. Ebenso wird durch jährliche Fachtagungen und regelmäßige Workshops und Hospitationen die Weitergabe von Informationen und Expertise gewährleistet.

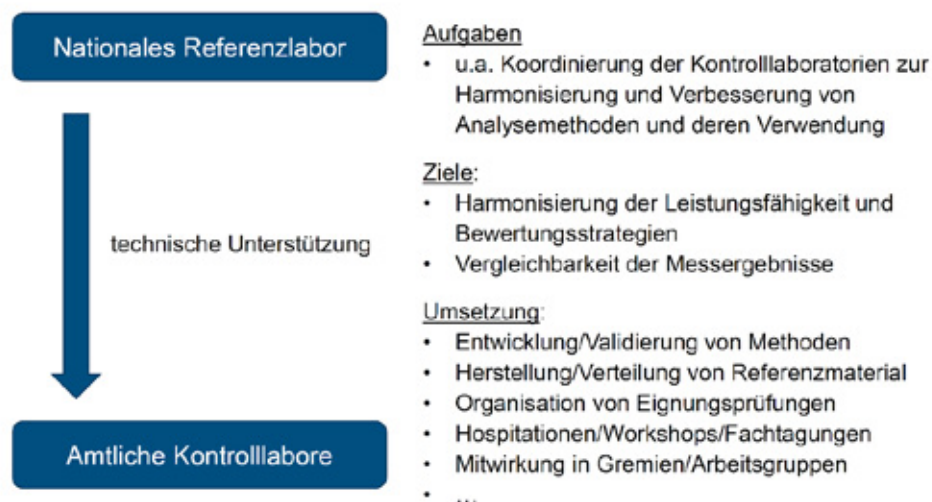


Abbildung 2: Aufgaben eines nationalen Referenzlabors.

Eine große Bedeutung in der Arbeit der NRL hat die regelmäßige Durchführung von Laborvergleichstests (Eignungsprüfungen). Bei solchen Laborvergleichsstudien wird identisches Probenmaterial an die für die entsprechenden Stoffgruppen zuständigen Überwachungslabore versandt und von diesen mit ihren Routinemethoden untersucht.

In der Auswertung der Ergebnisse kann geprüft werden, ob das zu untersuchende Stoffspektrum vollständig abgedeckt und richtig identifiziert wurde. Außerdem gibt die Auswertung Aufschluss darüber, ob bei den Ergebnissen der Teilnehmer signifikante Unterschiede hinsichtlich der jeweils bestimmten Konzentration der untersuchten Stoffe bestehen. Die Labore werden über Ihre Resultate umfassend informiert und können z. B. durch Optimierung der Untersuchungsmethode auf ein auffälliges Ergebnis reagieren. Darüber hinaus wird durch die Mitwirkung in nationalen und internationalen Gremien zu einer harmonisierten Arbeitsweise sowie zu einer Etablierung von akzeptierten Standards und Normen beigetragen. Mit ihren vielfältigen Aufgaben tragen die NRL zum Erhalt eines hohen Niveaus der amtlichen Kontrolle bei. Sowohl molekularbiologisch als auch regulatorisch unterscheiden sich mittels NMT erzeugte GVO von den klassischen GVO (**Abbildung 3**). Während durch das EuGH-Urteil vom 25.07.2018 [1] nicht nur klassische, sondern auch NMT-GVO innerhalb der Europäischen Union der Zulassungspflicht unterliegen, ist die Regulierung von NMT-GVO außerhalb der EU derzeit relativ uneinheitlich bzw. teilweise noch ungeklärt.

	klassische GVO	mit NMT erzeugte GVO
Regulierung EU	zulassungspflichtig	zulassungspflichtig
Regulierung global	weitestgehend einheitlich	uneinheitlich
Umfang der genet. Veränderung	stark	gering
Art der genet. Veränderung	Einführung artfremder Gene (transgen)	Einzelbasenaustausche, Insertionen/Deletion
Methoden der genet. Veränderung	Infektion mit <i>gv-A. tumefaciens</i> , biolistische Transformation mit artfremder DNA	CRISPR/Cas, ODM, ZFN, TALEN
Präzision der genet. Veränderung	nicht zielgerichtet	zielgerichtet
Aufwand der genet. Veränderung	z.T. groß	geringer

Abbildung 3: Vergleich von klassischen und mittels NMT erzeugten GVO.

Molekulargenetisch betrachtet unterscheiden sich NMT-GVO häufig relativ stark von klassischen GVO. Während klassische GVO i. d. R. größere Genkassetten aus Bestandteilen artfremder Genome oder neukombinierte DNA-Abschnitte enthalten, ist der Umfang der genetischen Veränderung bei NMT-GVO oftmals nur gering und weist beispielsweise lediglich Einzelbasenaustausche oder kleine Insertionen/Deletionen auf.

Dabei unterscheidet sich die Präzision zwischen den zugrundeliegenden molekularbiologischen Herstellungsverfahren ganz beträchtlich voneinander: Während bei klassischen GVO durch beispielsweise Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* oder biolistischer Transformation eine hinsichtlich der Lokalisation nicht-zielgerichtete Veränderung im Zielgenom erzeugt wird, erfolgt die genetische Veränderung durch Anwendung von NMT zielgerichtet an definierter DNA-Sequenz. Insbesondere durch die hohe Präzision von NMT-Verfahren ist der methodische Aufwand der gewünschten genetischen Veränderung vergleichsweise gering. Allen analytischen Methoden gemein ist, dass sie spezielle Anforderungen erfüllen müssen. So müssen die Methoden für den Nachweis von GVO ausreichend sensitiv (bis 0,1 % m/m) und spezifisch sein (**Abbildung 4**). Die Methoden müssen robust sein, d.h. sie müssen bei kleineren Veränderungen der Reaktionsbedingungen ähnliche Ergebnisse liefern. Ferner müssen sie sich auf ein (i.d.R. zertifiziertes) Referenzmaterial beziehen. Schließlich müssen die Methoden im Routine-Betrieb praktisch anwendbar sein (z. B. in Bezug auf technischen Aufwand und Kosten).

Methoden zum Nachweis von GVO

- müssen sensitiv sein (LOQ bis 0,1 % m/m)
 - müssen spezifisch sein für diesen GVO
 - müssen robust sein (bei kleineren Veränderungen der Reaktionsbedingungen ähnliche Ergebnisse liefern)
 - müssen praktisch anwendbar sein (in den Kontrolllaboratorien)
 - müssen sich auf ein (zertifiziertes) Referenzmaterial beziehen
- bei zugelassenen GVO müssen die Methoden durch den Hersteller entwickelt und vom EURL u.a. durch Ringversuche mit den NRL validiert werden
- bei nicht-zugelassenen GVO werden die Methoden durch diverse Labore/Arbeitsgruppen eigeninitiativ entwickelt und validiert



Abbildung 4: Analytische Leistungskriterien für Methoden zum Nachweis von GVO.

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens für GVO und daraus hergestellten Produkten sind Nachweis- und Identifizierungsverfahren sowie geeignetes Referenzmaterial zur gerichtsfesten Rückverfolgbarkeit und Marktkontrolle vom Antragsteller verfügbar zu machen. Die eingereichte Methode wird vom EURL validiert und die Eignung des Referenzmaterials vom EURL überprüft. Bei der Validierung der Methode im Ringversuch wird das EURL durch die NRL und zusätzlich benannte amtliche Laboratorien (gemäß VO 120/2014/KOM) [4] unterstützt.

Im Fall von nicht-zugelassenen GVO werden oftmals qualitative Methoden zum Nachweis des GVO oder spezifischer GVO-Elemente durch diverse Labore und Arbeitsgruppen eigeninitiativ entwickelt und zumeist im Rahmen von Gremientätigkeiten im Ringversuch validiert.

Die im Rahmen der Tätigkeiten der Arbeitsgruppen nach §28b GenTG und §64 LFGB in Ringversuchen validierten Methoden werden in der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ veröffentlicht und stehen damit für eine sichere und einheitliche Anwendung analytischer Verfahren zur Verfügung.

Die genannten Kriterien und Zuständigkeiten gelten nicht nur im Fall von klassischen GVO, sondern auch im Fall von mittels NMT hergestellten GVO. Das bedeutet, dass ein mittels NMT hergestellter GVO oder Produkte daraus in der EU nur zugelassen werden kann, wenn der Antragsteller eine geeignete Methode sowie entsprechendes Referenzmaterial zur Verfügung stellt. Damit sind durch die Anwendung von NMT sowohl für den Hersteller bei der Zulassung als auch für die amtliche Überwachung besondere Herausforderungen verbunden. Eine analytische Herausforderung ist der qualitative oder quantitative Nachweis von sehr kleinen genetischen Veränderungen. So wurde durch NMT im Extremfall nur eine einzige Base genetisch verändert, sodass Genotypisierungsverfahren notwendig sind, wie sie unter anderem in der molekularmedizinischen Diagnostik zum Nachweis von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) bzw. SNVs (Single Nucleotide Variants) verwendet werden. Zur grundsätzlichen Bewältigung dieser analytischen Herausforderung existieren mehrere Technologien (**Abbildung 5**). So können beispielsweise Real-Time PCR-Verfahren oder digitale PCR (dPCR)-Verfahren mit speziellen Reagenzien (z. B. blockierte Sonden und RNase H, Sonden mit Minor Groove Binder (MGB) oder Locked Nucleic Acids (LNA)) zum Einsatz kommen. Eine sich rasant entwickelnde, aussichtsreiche Technologie stellt das Next Generation Se-quencing (NGS) dar. Damit ist es möglich, Genome ungerichtet auf nicht bekannte Sequenz-veränderungen zu untersuchen und einzelne Basenunterschiede zu erkennen. Derzeitige Limitierungen des NGS sind unter anderem ein vergleichsweise hoher technischer Aufwand, die teilweise unzureichende Verfügbarkeit von Referenzsequenzen und die noch geringe Standardisierung der NGS-Verfahren.

Der Nachweis kleiner genetischer Veränderungen erfordert spezielle analytische Verfahren und Strategien.

- **Real-Time PCR-Verfahren mit speziellen Reagenzien, z.B.**
 - **Blockierte Sonden**
 - **Sonden mit MGB (Minor Groove Binder)**
 - **Sonden mit LNA (Locked Nucleic Acids)**
 - **RNase H (rhPCR)**
- **Digitale PCR-Verfahren mit speziellen Reagenzien**
 - **s.o.**
- **Next Generation Sequencing (NGS)**
 - **Long-Read vs. Short-Read-Sequencing**
 - **Whole-Genome- vs. Targeted Sequencing**

Abbildung 5: Mögliche Lösungsansätze für die Bewältigung analytischer Herausforderungen im Fall von mittels NMT hergestellten GVO.

Im Bereich der Analyse von Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut existieren derzeit kaum öffentlich bekannte Fallbeispiele, in denen Methoden für eine sensitive Analytik für SNVs entwickelt und im Ringversuch getestet wurden. Als Proof of Principle hat das NRL GVO am BVL im Rahmen einer Arbeitsgruppe unter dem Dach des BIPM (Bureau International des Poids et Mesures, Internationales Büro für Maße und Gewichte) an einer metrologischen Pilotstudie teilgenommen. Ziel der Studie war die Entwicklung einer digitale-PCR-Methode zur metrologisch rückführbaren Quantifizierung eines SNVs im humanen Genom als Modell für mittels NMT erzeugte GVO in Lebens- und Futtermitteln (**Abbildung 6**). Als Zielsequenz diente hierbei eine bekannte Mutation (V600E durch Thymin zu Adenin-Austausch) im Exon 5 der BRAF Kinase. Dazu wurde am NRL GVO für die digital droplet PCR (ddPCR) eine Duplex-Methode entwickelt, bei der zwei genotypische Hydrolyse-Sonden (Wildtyp vs. Mutation) zusammen mit einem Forward- und einem Reverse-Primer in einem Ansatz vorliegen. Die Sonden unterschieden sich hierbei je nach Zielsequenz nur um ein Nukleotid sowie in ihrem spezifischen Fluorophor am 5'-Ende (VIC vs. FAM). Am 3'-Ende der Sonde wurden zur Erhöhung der Spezifität ein MGB-Molekül sowie zur Verringerung der Hintergrund-Fluoreszenz ein nicht-fluoreszierender Quencher angebracht. Das Amplikon hatte dabei eine Gesamtgröße von 85 bp. Als Geräte-Plattform wurde das QX200-System der Firma Bio-Rad gewählt.

Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung eines Einzelbasenaustauschs (SNV) im metrologischen Ringversuch

- **Metrologisch rückführbare Messungen weniger Kopien einer Mutation in Wildtyp-Hintergrund-DNA**
→ **Modell für mit NMT erzeugten GVO in Lebens- und Futtermitteln**
- **Zielspezies: Mensch**
- **Zielregion: BRAF Exon 5 – Sequenz**
- **Mutation: SNV (T→A) V600E**
- **Nachweistechnologie: digitale PCR**

Abbildung 6: Aktivitäten des NRL GVO am BVL zur Entwicklung einer Methode für die Quantifizierung eines Einzelbasenaustauschs (SNV).

Durch die Arbeiten am NRL GVO und beim BIPM konnte gezeigt werden, dass eine metrologisch rückführbare Bestimmung eines SNV im Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA auf wenige Kopienzahlen möglich ist. Der Einzelbasenaustausch ließ sich im Spurenbereich präzise und richtig quantifizieren. Ein bemerkenswerter Aspekt war hierbei die Robustheit der digitale-PCR-Technologie: Die von den Laboren unabhängig entwickelten dPCR-Methoden zeigten im Ringversuch am gleichen Probenmaterial sehr ähnliche quantitative Messergebnisse.

Obwohl die Detektion eines bekannten SNV unter erhöhtem technischem Aufwand prinzipiell möglich ist, scheitert die Identifikation der zugrundeliegenden Ursache derzeit an der Pluralität in Frage kommender Mechanismen (**Abbildung 7** und **Abbildung 8**). So kann der SNV nicht nur durch die Anwendung von NMT, sondern auch durch klassische Mutagenese-Verfahren (z. B. chemische Substanzen oder ionisierende Bestrahlung) entstanden sein.

Ist es möglich, NMT-GVO spezifisch zu identifizieren???



Abbildung 7: Herausforderungen für die Analytik bei der Kausalität von genomischen Einzelbasenaustauschen (SNV). Von der Detektion eines SNV kann nicht zweifelsfrei auf die Ursache geschlossen werden, da sowohl die Anwendung von NMT als auch klassische Mutagenese-Verfahren sowie natürlich vorkommende Mutationen zu kleinen Veränderungen im Genom führen können.

Methoden zum Nachweis von mit NMT erzeugten GVO:

- 😊 😞 müssen sensitiv sein (bis 0,1 % m/m)
→ prinzipiell möglich, aber anspruchsvoll
- 😊 😞 müssen robust sein
→ prinzipiell möglich (für NGS derzeit unklar)
- 😊 😞 müssen praktisch umsetzbar sein
→ für PCR möglich, für NGS derzeit noch nicht
- 😞 müssen sich auf ein (zertifiziertes) Referenzmaterial beziehen
→ problematisch für nicht-zugelassene GVO, Sequenzinformation häufig nicht vorhanden
- 😱 müssen spezifisch sein für diesen GVO
→ keine Unterscheidung möglich zu Organismen, die mittels klassischer Mutagenese oder durch natürliche Mutation entstanden sind

Abbildung 8: Zusammenfassung der Erfüllung analytischer Leistungskriterien für mittels NMT erzeugte GVO.

Ebenso können natürlich vorkommende Mutationen oder Varianzen zwischen oder innerhalb der Sorten kleinen Veränderungen im Genom erklären. Erschwerend kommt hinzu, dass bei nicht-zugelassenen GVO Sequenzinformationen und Referenzmaterialien häufig nicht zugänglich sind (**Abbildung 9**). In diesen Fällen kann nicht zweifelsfrei auf die Ursache der Veränderung geschlossen werden. Zu diesem Schluss kommt auch das Europäische Netzwerk von GVO Laboratorien (ENGL, European Network of GMO Laboratories) in seinem Bericht [5].

	klassische GVO	mit NMT erzeugte GVO
Analytischer Aufwand	derzeit Routine	groß
Referenzmaterial	i.d.R. vorhanden	derzeit nicht vorhanden
Identifizierbarkeit/Rückführbarkeit	ja	nein

Abbildung 9: Analytische Herausforderung bei klassischen gegenüber mittels NMT erzeugten GVO.

Das NRL GVO am BVL unterstützt die amtlichen Kontrolllaboratorien bei der Bewältigung der analytischen Herausforderungen durch zusätzliche Aktivitäten. So arbeitet das NRL GVO aktiv in der ENGL-Arbeitsgruppe zur Definition von Akzeptanzkriterien für Methoden zum Nachweis von mittels NMT erzeugten Lebens- und Futtermitteln mit. Ferner unterstützt das NRL GVO die Entwicklung von Nachweisstrategien für mittels NMT erzeugtem Raps im Rahmen der §28b GenTG Arbeitsgruppe „Methodensammlung“, deren Geschäftsstelle am BVL angesiedelt ist. Darüber hinaus stellt das NRL GVO Referenzmaterialien und Informationen zur Verfügung. Darüber hinaus etabliert das NRL GVO am BVL im Rahmen eines Projektes das NGS. Dafür werden geeignete Gerätesysteme für short-read und long-read-Sequencing sowie eine adäquate IT-Infrastruktur installiert und personelle Ressourcen zur Verfügung gestellt. Ziele des NGS-Projekts sind Standardisierung und Harmonisierung der NGS-Analytik von Probenvorbereitung über Sequenzierung bis hin zur Datenanalyse und - Interpretation und die Evaluation der NGS-Technologie für die Identifikation & Charakterisierung von nicht-zugelassenen GVO.

4.2 Referenzen

- [1] Urteil des EuGH in der Rechtssache (Aktenzeichen) C-528/16 vom 25. Juli 2018
- [2] GVO-Richtlinie: Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates
- [3] Kontrollverordnung: Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel, zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 999/2001, (EG) Nr. 396/2005, (EG) Nr. 1069/2009, (EG) Nr. 1107/2009, (EU) Nr. 1151/2012, (EU) Nr. 652/2014, (EU) 2016/429 und (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 1/2005 und (EG) Nr. 1099/2009 des Rates sowie der Richtlinien 98/58/EG, 1999/74/EG, 2007/43/EG, 2008/119/EG und 2008/120/EG des Rates und zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EEG, 96/23/EG, 96/93/EG und 97/78/EG des Rates und des Beschlusses 92/438/EWG des Rates (Verordnung über amtliche Kontrollen)
- [4] Durchführungsverordnung (EU) Nr. 120/2014 Der Kommission vom 7. Februar 2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1981/2006 mit Durchführungsbestimmungen zu Artikel 32 der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über das gemeinschaftliche Referenzlaboratorium für gentechnisch veränderte Organismen
- [5] European Network of GMO Laboratories (ENGL), Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques, 26 March 2019 (JRC116289)

5 Gene Drives und Schädlingsbekämpfung

Georg Oberhofer¹ und Ernst A. Wimmer²

¹ Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, USA

² Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Eine modifizierte und gekürzte Version dieses Artikels ist in
Spektrum der Wissenschaften 2.20 erschienen

5.1 Selbstsüchtige Gene verursachen natürliche Gene Drives

Gene Drive, im Deutschen oft mit „Genantrieb“ oder „Genturbo“ bezeichnet, ist keine neuartige Erfindung von Molekulargenetikern oder Bioingenieuren, sondern ein natürlich vorkommendes Phänomen selbstsüchtiger Gene, welche die mendelschen Vererbungsregeln aushebeln wollen, um an möglichst viele Nachkommen weitergegeben zu werden (Burt und Trivers, 2006). Normalerweise liegt ein bestimmtes Gen in einem Organismus in zwei Kopien, den Allelen, vor. Ein Allel kommt von der Mutter, das andere vom Vater. Bei der sexuellen Fortpflanzung werden die zwei Allele, welche auf den zueinander homologen Chromosomen liegen, verteilt, so dass ein bestimmtes Allel nur auf die Hälfte der Nachkommen vererbt wird (**Abbildung 1A**). Ohne Selektionsdruck verändert sich die Häufigkeit eines Alleles in einer Population daher normalerweise nicht. Zeigt ein Allel jedoch ‚Drive‘, kommt es zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses, wobei im Extremfall alle Nachkommen das „Drive-Allel“ erhalten (**Abbildung 1B**). Das Drive-Allel wird somit in die Population eingetrieben: Gene Drive entspricht daher eigentlich einem „Geneintrieb“.

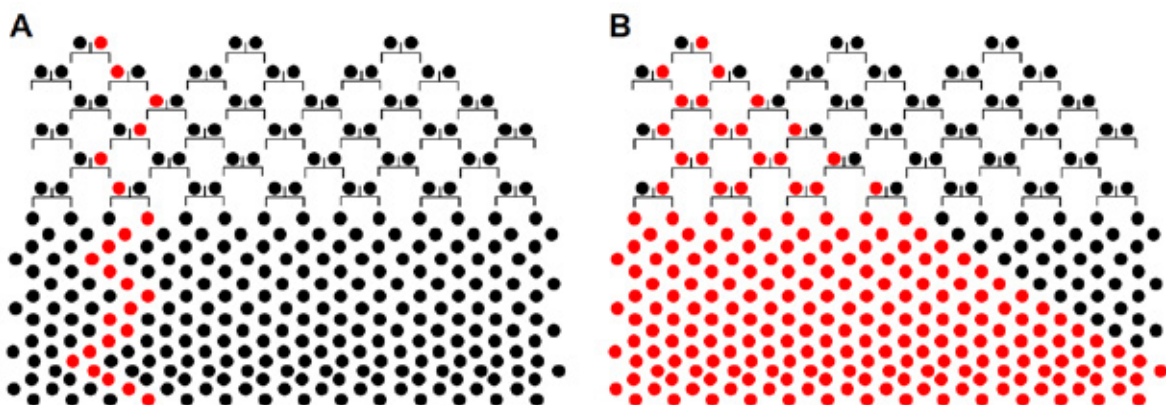


Abbildung 1: Mendelsche Vererbung (A) versus Gene Drive (B)

Wie schafft es nun so ein selbstsüchtiges Gen, die Spielregeln der Vererbung auszutricksen? In einer weit verbreiteten Strategie interferiert das Drive-Allel mit der Vererbung seines

Schwesterallels und sabotiert daher dessen Weitergabe an die nächste Generation (Interferenz; **Abbildung 2A**). Man kann sich das so vorstellen, dass das Drive-Allel z.B. ein mütterliches Zellgift (Toxin) produziert, das an alle Nachkommen weitergegeben wird. Zudem vermittelt das Drive-Allel aber auch ein zygotisches Gegenmittel (Antidot), so dass alle Embryonen gerettet werden, welche das Drive-Allel erhalten, wogegen die Embryonen, die das Drive-Allel nicht erhalten, sterben. Im Ergebnis besitzen alle überlebenden Nachkommen das Drive-Allel. Ein entsprechendes System ist im Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* bekannt und wurde nach der Frauengestalt der griechischen Mythologie, die ihre eigenen Kinder getötet hat (**Abbildung 2B**), *MEDEA* (Maternaler Effekt Dominanter Embryonaler Arretierung) genannt. In dem Käfer sind sogar mehrere verschiedene *MEDEA* Genorte bekannt, die mit der Ausnahme des Subkontinents Indien weltweit verbreitet sind. In Indien gibt es ein genetisches Element (*H*, Hybrid-Inkompatibilitätsfaktor), das aus *MEDEA* Selbstmordgene macht, die sich daher dort nicht ausbreiten können. Dies zeigt, dass die Natur auch immer wieder Wege findet selbstsüchtige Gene in Schach zu halten.

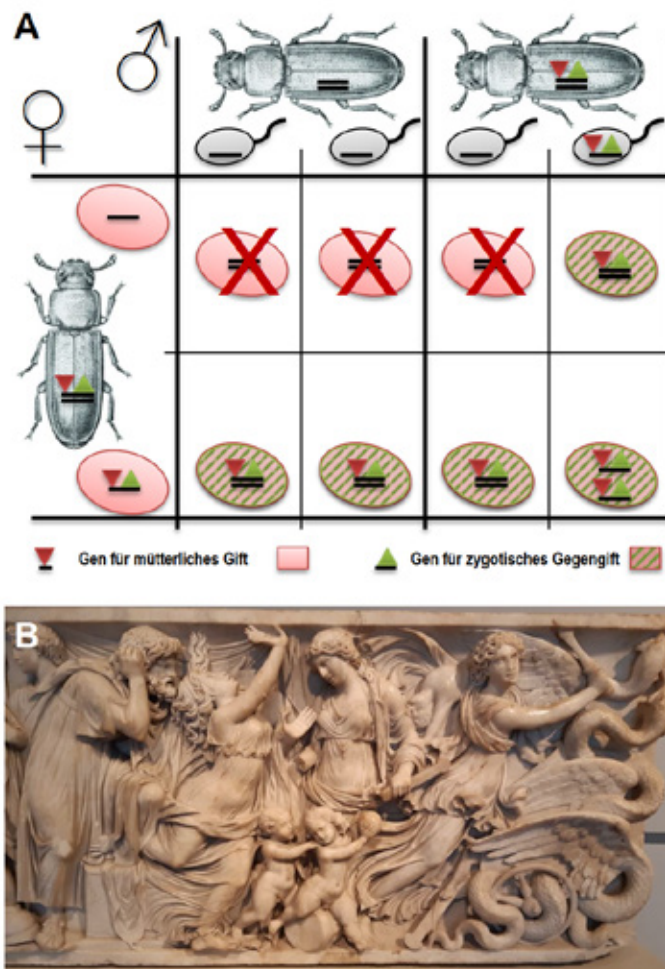


Abbildung 2: Interferenz: Sabotage durch MEDEA (Maternaler Effekt Dominanter Embryonaler Arretierung) nach Wimmer 2013 (A). Medea-Sarkophag (Rom, Italien, 140-150 n. Chr.), Altes Museum, Berlin (B).

Neben der Sabotage (Interferenz) gibt es in der Natur weit verbreitet auch die Strategie der Überreplikation zur vermehrten Verbreitung eines selbstsüchtigen Gens. Normalerweise wird bei der Zellteilung jedes Chromosom, und damit jedes darauf liegende Gen, genau einmal kopiert. Bestimmte genetische Elemente haben es im Laufe der Evolution aber geschafft, zusätzliche Kopien von sich selbst zu erzeugen, ohne dabei auf die reguläre Kopiermaschinerie der Zelle angewiesen zu sein. Ein Beispiel für solche Elemente sind springende Gene, sogenannte Transposons. Für die Entdeckung von Transposons im Mais in den 40er und 50er Jahren bekam Barbara McClintock 1983 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Ein Transposon kann sich selbst gezielt aus dem Chromosom ausschneiden und an einer anderen Stelle wieder einfügen (cut and paste) oder aber sich kopieren und anderswo wieder einfügen (copy and paste). Letzterer Mechanismus führt zu einer Überreplikation des Transposons, und damit zu einer vermehrten Vererbung (**Abbildung 3A**). Ein gut untersuchtes Transposon ist das P-Element in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Dieses Transposon sprang vermutlich vor circa hundert Jahren durch horizontalen Gentransfer in diese Fliegenart. Innerhalb weniger Jahrzehnte hat es sich dann über alle natürlich vorkommenden Fliegenpopulationen dieser Art weltweit ausgebreitet. Die einzigen *D. melanogaster* Stämme, die heute kein P-Element besitzen sind jene, die von Wissenschaftlern vor 1960 gesammelt und seither isoliert im Labor gehalten werden. Das Rumspringen des Transposons führt zu Mutationen in der Fliege, die wichtige Gene zerstören können. Deshalb evolvieren Repressoren in den betroffenen Fliegen, die das Transposon unter Kontrolle halten. Auch unser eigenes Genom besteht fast zur Hälfte aus Transposons oder deren Überresten, was sie zusammengefasst wohl zur erfolgreichsten Klasse von selbstsüchtigen Genen macht.

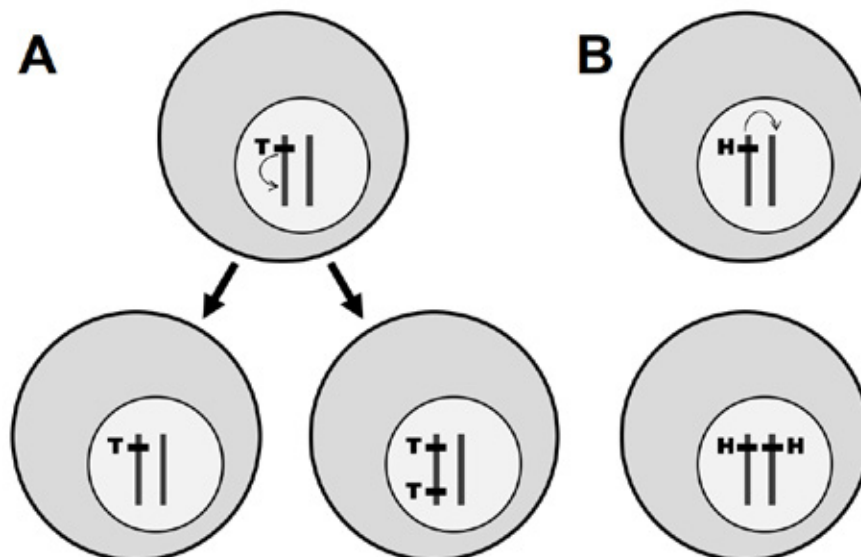


Abbildung 3: Überreplikation: Transposons (A), Homing Endonukleasen (B), nach Burt und Trivers 2006.

Andere selbstsüchtige Gene, die auch einen Mechanismus der Überreplikation zeigen, sind sogenannte Homing-Elemente, die für eine Endonuklease kodieren, welche die DNS an einer bestimmten Stelle aufschneiden kann. Solche Homing Endonukleasen agieren wie eine Genschere, die eine genaue Zielsequenz auf dem homologen Chromosom erkennt und dort schneidet. Ein zelleigener Reparaturmechanismus, die Homologie dirigierte Reparatur (homology directed repair, HDR) kann das Homing-Element als Vorlage verwenden, um den DNS-Strangbruch zu reparieren, wobei das Homing-Element dann auch in das homologe Chromosom eingebaut wird. Bei der Reparatur durch HDR nutzt die Zelle, dass die Erbinformation in zwei homologen Chromosomensätzen vorliegt, und verwendet das intakte homologe Chromosom als Vorlage, um den Doppelstrangbruch zu reparieren. Im Falle eines HEG-Elements wird dieses dann in das andere Chromosom hineinkopiert und vervielfältigt sich somit. Das HEG-Element liegt dabei genau an der Stelle im Chromosom wo der Doppelstrangbruch im homologen Chromosom erzeugt wird. Das Homing-Element liegt nun homozygot in zwei Kopien vor, oder anders ausgedrückt: das Schwesterallel wurde durch das Homing-Element-Allel ersetzt (**Abbildung 3B**). Als Ergebnis erhalten dann alle Nachkommen das selbstsüchtige *Homing-Endonuklease-Gen (HEG)*, welches damit ‚Drive‘ zeigt und in die Population eingetrieben wird.

5.2 Nutzung von Gene Drives für die Schädlingsbekämpfung

Bereits in den 80er und 90ern wurden Konzepte entwickelt, wie man selbstsüchtige Gene, wie z.B. Transposons, für die Anwendung in der Schädlingsbekämpfung nutzen könnte, ohne dass diese jedoch erfolgreich umgesetzt werden konnten. 2003 hat der englische Evolutionsgenetiker Austin Burt ein Design vorgeschlagen (Burt, 2003), wie man die in Hefen gefundenen *HEG*-basierten Gene Drives nachbauen und nutzen könnte. Dabei lassen sich Gene Drive Strategien in zwei prinzipiell unterschiedliche Kategorien einteilen. Beim Modifizierungs-Drive (modification drive) soll eine bestimmte Zielpopulation verändert werden (**Abbildung 4A**). Ein oft diskutiertes Beispiel sind Moskitos die Malaria oder andere Krankheiten wie z.B. Zika, Gelbfieber oder Dengue übertragen. Wissenschaftler haben artifizielle Gene entwickelt, welche Moskitos entweder immun gegen diese Krankheitserreger machen oder die Übertragung der Erreger blockieren. Das Problem ist nun: Wie kann man die Moskitos in freier Wildbahn mit denen, die für die Krankheitsübertragung refraktär sind, ersetzen? Für diesen Zweck kommen Gene Drives ins Spiel. Man koppelt einfach das artifizielle Gen an einen Gene Drive Mechanismus, welcher dann dafür sorgt, dass die Refraktärität in die Wildtypmoskitopopulation eingetrieben wird. Im Kontrast dazu, soll beim Unterdrückungs-Drive (suppression drive) die Zielpopulation reduziert bzw. eliminiert werden (**Abbildung 4B**).

Dabei koppelt man an den Gene Drive ein artifizielles Gen, welches die Fitness der Population stark beeinträchtigt oder man mutiert mit dem Drive-Element gezielt ein Gen, das für einen entscheidenden biologischen Prozess benötigt wird. Zum Beispiel könnte man ein Drive-Element in die Population einschleusen, welches dafür sorgt, dass spezifisch Weibchen sterben, steril werden oder sich in Männchen umwandeln. Unter normalen Umständen würde sich so ein Gen nie ausbreiten können. Der Gene Drive sorgt nun aber dafür, dass das trotzdem passiert, was zur Folge haben kann, dass die Zielpopulation stark reduziert wird oder gar ganz verschwindet. Ein potentieller Anwendungsbereich für diese Art von Gene Drive wäre vor allem in der Bekämpfung von invasiven Schädlingen. Ein großer Vorteil dieser Bekämpfungsstrategie liegt in der Beschränkung auf die Zielspezies, da sich Gene Drives über sexuelle Fortpflanzung ausbreiten.

Lange Zeit war es jedoch schwierig geeignete molekulare Werkzeuge zu finden, welche an einer vorgegebenen, bestimmten Stelle im Genom schneiden können, um den Überreplikationsprozess einzuleiten. Das änderte sich tiefgreifend mit der Entdeckung der programmierbaren CRISPR/Cas Genschere, die natürlicherweise in Bakterien erworbene Immunität vermittelt und mittlerweile für die Genomeditierung verschiedenster höherer Organismen eingesetzt werden kann. Damit hatte man auf einmal ein Werkzeug zur Verfügung, welches an beliebigen Stellen im Genom schneiden kann. Es dauerte dann auch nicht lange bis in einer Konzeptstudie im Jahr 2014 dargelegt wurde, wie sich damit künstliche Homing-Elemente bauen lassen, die Drive-Eigenschaften aufweisen, um natürliche Populationen zu verändern (Esvelt et al., 2014).

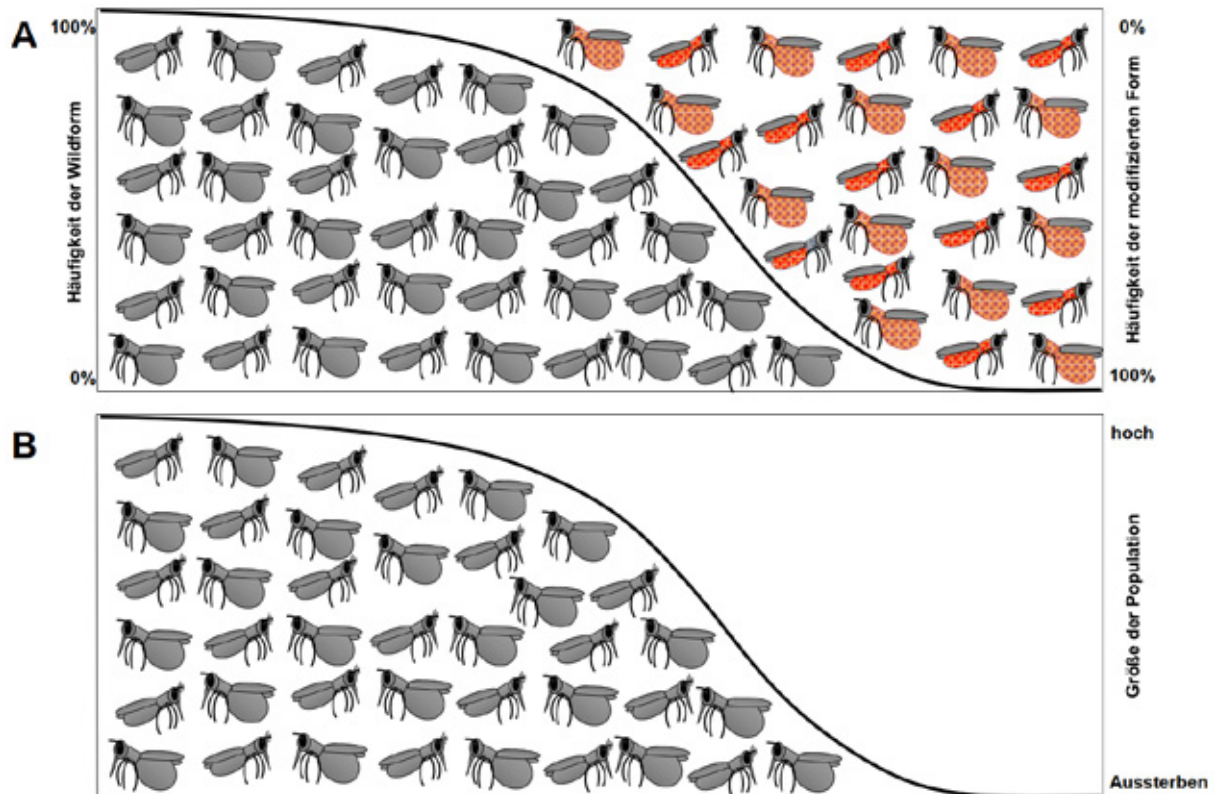


Abbildung 4: Gene Drive Strategien: Modifizierung (A), Unterdrückung (B).

Die anfängliche Euphorie legte sich aber bald wieder, als mehrere Wissenschaftler in einer Reihe von Folgepublikationen zeigten, dass das System nicht so effizient funktionierte wie anfänglich gemutmaßt. Eines der Hauptprobleme war, dass das CRISPR basierte *HEG*-system sehr schnell zu Resistenzen führte. Um diesen Vorgang etwas genauer zu erläutern, muss man einen Blick auf die Funktionsweise von CRISPR/Cas werfen. Das System besteht aus einer Endonuklease (meist Cas9, mittlerweile gibt es aber eine Vielzahl an Alternativen), welche eine sogenannte Leit-RNS (guide RNA) binden kann. Diese Leit-RNS hat einen programmierbaren variablen Teil von 20 Nucleotidbasen. Der aktive Komplex aus Leit-RNS und Cas9 scannt nun das Genom und sucht nach Stellen die komplementär zu den 20 Basen sind. Wird diese Sequenz im Genom gefunden, schneidet Cas9 den DNS-Doppelstrang an dieser Position. Sobald eine Zelle bemerkt, dass es einen DNS-Doppelstrangbruch gibt, gehen alle Alarmglocken an und DNS-Reparatursysteme werden aktiviert. Im Laufe der Evolution wurden Zellen mit einer Vielzahl an Reparaturmechanismen gegen solche Vorfälle ausgestattet. Für einen erfolgreichen Gene Drive ist aber nur die bereits erwähnte Homologie dirigierte Reparatur (HDR) entscheidend. Während in Hefen, in denen *HEGs* weit verbreitet sind, die HDR den überwiegenden Reparaturmechanismus darstellt, ist dieser in vielzelligen Tieren aber nur begrenzt in den Keimbahnzellen aktiv, also in den Zellen aus denen Spermien und Eizellen werden.

In den somatischen Körperzellen und auch in der Zygote, der ersten Zelle, die bei der Befruchtung der Eizelle mit einem Spermium entsteht, ist HDR jedoch selten und die Reparatur wird in der Regel durch nicht homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ) durchgeführt. Bei der Reparatur durch NHEJ wird jedoch der Doppelstrangbruch einfach wieder zusammengestüekelt. Dabei kommt es häufig zu Fehlern, Insertionen oder Deletionen (INDELs), sprich Mutationen, welche die DNS-Sequenz genau an der Schnittstelle verändern. Die entstandenen Mutationen führen dazu, dass die Cas9 mit der Leit-RNS die Zielsequenz nicht mehr erkennen kann. Falls die Funktion des Gens trotz Mutation erhalten bleibt, ist eine Resistenz gegen den *HEG*-Drive entstanden. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass das Entstehen solcher Resistenzen sehr schnell geschehen kann und die Ausbreitung eines *HEG*-Drives verhindert (Hammond et al. 2017; Champer et al. 2017; KarimiNejadRanjbar et al. 2018). Das grundsätzliche Problem bei der Nutzung von Homing-Endonukleasen liegt daher darin, dass genau an der Zielsequenz die Mutationsrate erhöht wird. Ein *HEG* basierter Gene Drive vermittelt daher inhärent auch eine Resistenzentwicklung gegen sich selbst.

Mehrere Arbeiten haben sich damit befasst, wie man diese Resistenzen vermeiden kann. Dabei haben sich zwei Strategien als erfolgreich herausgestellt. Zum einen kann man anstelle von einer einzigen Leit-RNS einfach mehrere verwenden. Die Idee ist, dass es mit zunehmender Anzahl an Leit-RNSes immer unwahrscheinlicher wird, dass alle Zielsequenzen gleichzeitig mutieren (Oberhofer et al. 2018; Champer et al. 2018). Eine andere Strategie ist es eine Zielsequenz zu verwenden, welche hochkonserviert ist und somit eine geringe Toleranz gegenüber Mutationen hat. So eine konservierte Sequenz kann jetzt nicht so einfach mutieren und gleichzeitig die Genfunktion erhalten. In Moskitos konnten Wissenschaftler so eine hochkonservierte Sequenz identifizieren. Der entwickelte *HEG* basierte Unterdrückungs-Drive, welcher die konservierte Sequenz als Ziel hatte, konnte mehrere Käfigpopulationen von Moskitos zu 100% unterdrücken, ohne dass es zur Resistenzentwicklung kam (Kyrou et al. 2018). Diese Strategie kann allerdings nur bei einem Unterdrückungs-Drive angewendet werden. Bei einem Modifizierungs-Drive will man eine neutrale Sequenz als Ziel haben, welche die Fitness der Population nicht beeinträchtigt. Neutrale Sequenzen unterliegen aber keinem Selektionsdruck und können daher frei mutieren. Die beiden Eigenschaften von DNS-Sequenzen ‚neutral‘ und ‚hochkonserviert‘ schließen sich somit gegenseitig aus. Im Hinblick auf die Strategie des Modifizierungs-Drives können wir aber nochmal von der Überreplikations- zur Sabotagestrategie zurückgehen. Auch wenn das MEDEA-System des Reismehlkäfers bisher molekulargenetisch nicht verstanden ist, gelang es 2007 erstmals einen solchen Gene Drive in der Taufliede artifiziell zu generieren (Chen et al. 2007). Vor kurzem gelang es nun eine MEDEA-Version mit CRISPR/Cas9 nachzubauen. Dabei wird nicht auf ‚Homing‘ gesetzt, sondern auf gezielte Mutagenese, was die Problematik der erhöhten Resistenzentwicklung umgeht (Oberhofer et al. 2019).

Das Prinzip ist denkbar einfach: die CRISPR/Cas Genschere fungiert als ‚Gift‘, indem es ein essentielles Gen, welches für das Überleben des Organismus notwendig ist, schneidet, und dieses mittels NHEJ funktionsuntüchtig mutiert. Das ‚Gegengift‘ (Antidot) besteht aus einer Version des essentiellen Zielgens, welches aber resistent gegen das Binden der Cas9-Genschere ist. Werden das Gen für die Genschere und das Gegengift-Gen an einem Genort gekoppelt entsteht ein Drive-Element. Liegt dieses Drive-Element in einer einzelnen Kopie in einer Mutter vor, wird die aktive Genschere an alle Nachkommen über die Eizellen weitergegeben. Im Embryo wird dann das essentielle Gen kontinuierlich mutiert und damit inaktiviert. Nur die Nachkommen, welche auch das chromosomal vererbte Gegengift-Gen erhalten, können überleben. Alle anderen sterben, da sie keine funktionale Kopie des essentiellen Gens mehr besitzen. Damit besitzen alle überlebenden Nachkommen das Drive-Element und es kommt zum Drive. An das Drive-Element könnte nun zusätzlich auch ein Refraktäritäts-gen gekoppelt werden, das verhindert, dass Krankheitserreger übertragen werden können, und so in einem Modifizierungs-Drive in die Population eingetrieben werden kann.

5.3 Kontrollierbarkeit von Gene Drives

Es gibt nun eine Reihe von Bedenken bei der Anwendung von Gene Drives. Die bisher beschriebenen Gene Drive-Varianten, könnten sich im Prinzip global ausbreiten, auch wenn nur eine sehr kleine Anzahl von Drive-Element Trägern freigesetzt wird. Dies bedeutet, dass selbst ein durchaus zu befürwortender Einsatz eines Unterdrückungs-Drives gegen invasive Arten das grundsätzliche Problem beinhaltet, dass sich der Drive möglicherweise auch in die Heimatregion der Art verbreitet und diese dort ungewollt dezimiert. Auch wenn es biologisch gesehen absolut unwahrscheinlich ist, dass ein Gene Drive eine Art weltweit ausrotten kann, ist dies zumindest rein theoretisch möglich. Insekten, die einen Gene Drive verbreiten, werden sich auch nicht an politische Grenzen halten, was die schwierige Frage aufwirft, wer entscheiden soll, ob und wo ein Gene Drive freigesetzt werden kann.

Könnte man die Bedenken der unkontrollierbaren Ausbreitung ausräumen? Die bisher vorgestellten Gene Drive-Strategien haben den Charme, dass sie kostengünstig sind, da nur eine geringe Anzahl von Individuen freigesetzt werden muss, was auch in Entwicklungs- und Schwellenländer durchführbar wäre. Solche Gene Drive-Systeme werden mit ‚Low-Threshold‘ bezeichnet, da der Schwellenwert für die freizusetzenden Individuen gering ist, um den Gene Drive zu starten. Dies bedeutet jedoch auch, dass bereits eine Verschleppung von wenigen Individuen ausreicht, um den Gene Drive ungewollt zu verbreiten. Im Gegensatz dazu wird derzeit an der Entwicklung von sogenannten ‚High-Threshold‘ Gene Drives gearbeitet. High-Threshold bedeutet, dass die Drive-Element Träger eine Mehrheit der Population ausmachen müssen (über 50%), ansonsten funktioniert der ‚Drive‘ nicht. Ein solches High-Threshold System könnte man in einer bestimmten Region begrenzt freisetzen.

Auch wenn einige der Drive-Element Träger durch natürliche Migrationsbewegungen sich in Nachbarregionen ausbreiten, werden diese aber nicht die notwendigen 50% der Gesamtpopulation erreichen, und somit mit der Zeit wieder verschwinden.

Wie könnte nun so ein High-Threshold Gene Drive aussehen. Eine Möglichkeit wäre die Erzeugung eines Doppel-MEDEA-Systems, bei dem eine Gen-Koppelung ein Toxin A und ein Antidot B darstellt und eine zweite Gen-Koppelung Toxin A und Antidot B (**Abbildung 5A**). Nachkommen können nur dann überleben, wenn sie beide Gen-Koppelungen ererbt haben, da sie nur dann beide notwendigen Gegengifte produzieren können. Eine Population, in der beide Gen-Koppelungen homozygot, also auf beiden homologen Chromosomen, vorkommen, hat keine Probleme, da alle Nachkommen beide Genkoppelungen erhalten. Eine Population die keine der Genkoppelungen trägt, hat auch keine Probleme. Wenn sich jedoch Individuen verpaaren, welche die Genkoppelungen heterozygot, also jeweils nur auf einem der homologen Chromosomen, tragen, wird ein großer Teil der Nachkommen sterben. Heterozygote Träger haben daher weniger überlebende Nachkommen, was man in der Genetik als Unterdominanz-Effekt bezeichnet. Diese Unterdominanz führt nun dazu, dass sich die MEDEA-Elemente, wenn sie ausreichend häufig (über 50%) vertreten sind, in der Population ausbreiten und ‚Drive‘ zeigen. Wenn aber zu wenig MEDEA-Elemente in der Population zugegen sind, werden diese verschwinden (**Abbildung 5B**). Dieser Effekt würde damit zu einer lokalen Begrenzung des Gene Drives beitragen auf die Region, in der die MEDEA-Elemente tragenden Individuen in großer Menge freigesetzt werden. Dies wäre ein großer Vorteil, der aber den Nachteil hoher Kosten für wiederholte Massenfreesetzungen mit sich bringt.

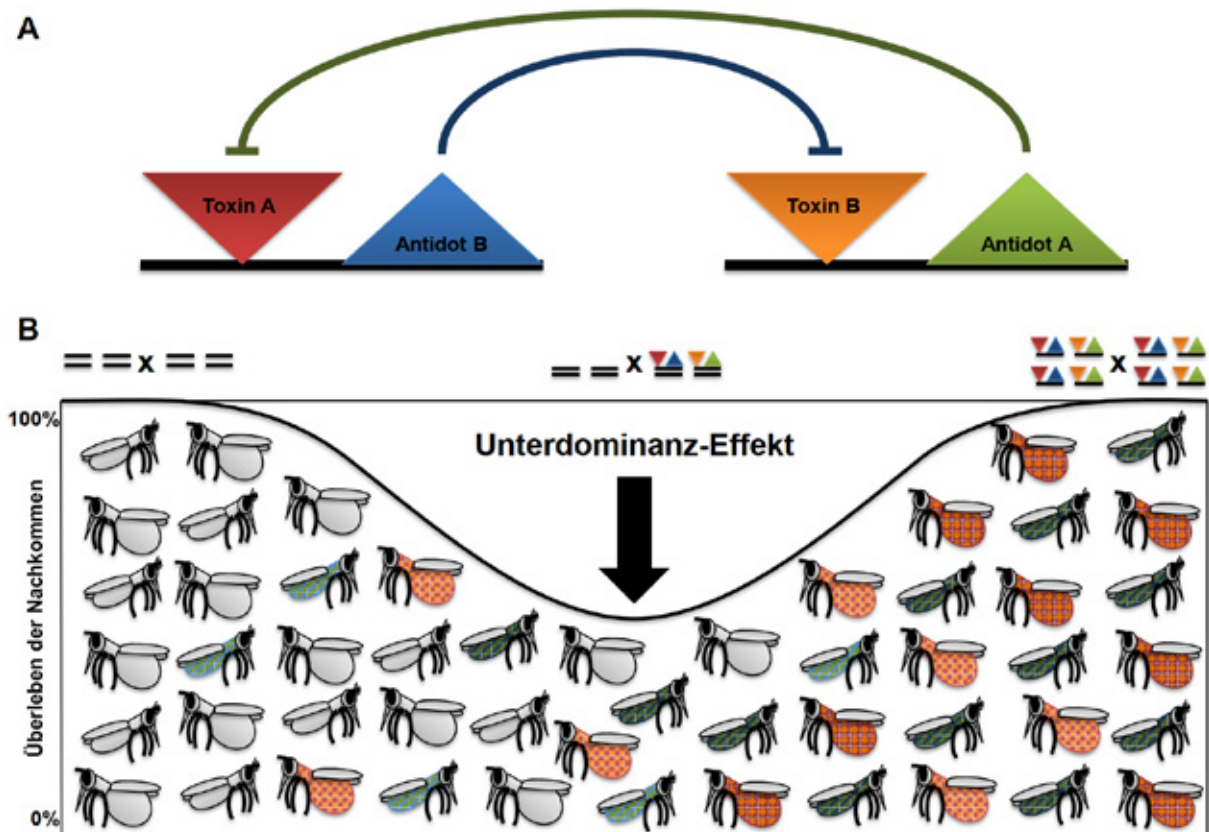


Abbildung 5: Unterdominanz basierend auf Doppel-MEDEA zur lokalen Begrenzung eines Gene Drives. Nach Wimmer 2013.

Eine weitere Möglichkeit der Begrenzung liegt in der zeitlichen Aktivität eines Gene Drives (Noble et al., 2019). Dieser Ansatz beruht darauf, dass mehrere Homing-Elemente selbst nicht eigenständig aktiv sind, sondern aufeinander angewiesen sind (geteilter Drive, ‚Split Drive‘). Ein Element A braucht für seine Überreplikation die Aktivität des Elements B, was seinerseits für seine Überreplikation die Aktivität des Elements C braucht, das selbst nicht überrepliziert wird. Das Prinzip funktioniert wie eine mehrstufige Rakete, bei der C zunächst die zweite Stufe B und Kapsel A antreibt. C geht dann verloren und nun treibt aber B weiterhin noch A an, bis auch B verloren geht (**Abbildung 6**). A wurde damit in die Höhe gebracht, hat aber selbst keinen Treibstoff und fällt daher auch wieder ab. Mit diesem System kann das Element A für eine bestimmte Zeit in eine Population in großen Mengen eingeschleust werden, kann sich dann aber nicht weiter ausbreiten und wird nicht langfristig stabil in der Population bleiben, wenn es für die Art keinen Selektionsvorteil mit sich bringt.

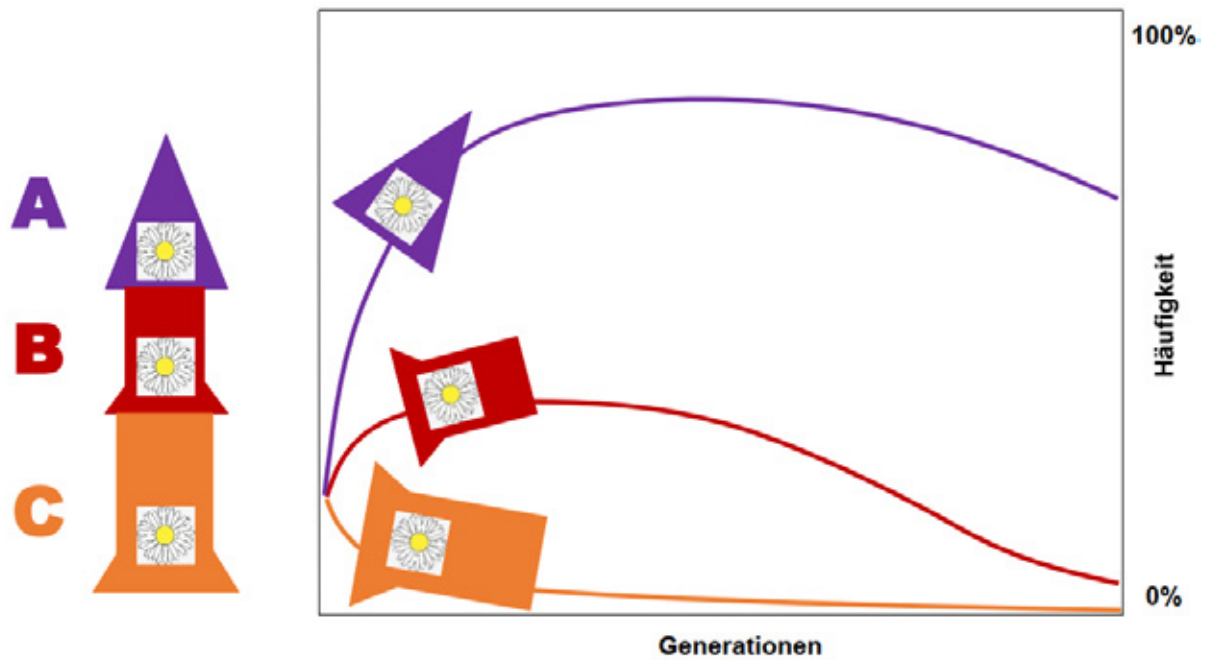


Abbildung 6: Raketentufen-Prinzip (Daisy Chain Drives) zur zeitlichen Begrenzung eines Gene Drives (nach <http://www.sculptingevolution.org/daisydrives>; Nobel et al., 2019)

Gene Drive basierte Schädlingsbekämpfung wird in der Zukunft eine hervorragende Möglichkeit bieten, Art-spezifisch und daher ökologisch sinnvoll, umweltschonend und nachhaltig handeln zu können. Bevor jedoch erste Anwendungen im Freiland durchgeführt werden sollten, müssen unseres Erachtens Möglichkeiten der Begrenzung des Gene Drives geschaffen und erprobt werden. Wenn dies gelingt, wird uns dieser Ansatz neuartige Möglichkeiten bieten, spezifisch gegen Agrarschädlinge und Krankheitsüberträger vorzugehen bzw. im Hinblick auf den Naturschutz invasive Arten zu bekämpfen.

5.4 Literatur

- Burt, A.** (2003) *Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations*. Proc. R. Soc. Lond. B 270: 921– 928.
- Burt, A. & Trivers, R.L.** (2006) *Genes in Conflict*. Belknap Press of Harvard University Press, Boston, MA.
- Champer, J., Reeves, R., Oh, S.Y., Liu, C., Liu, J., Clark, A.G. & Messer, P.W.** (2017) *Novel CRISPR/Cas9 gene drive constructs reveal insights into mechanisms of resistance allele formation and drive efficiency in genetically diverse populations*. PLoS Genet. 13: e1006796.
- Champer, J., Liu, J., Oh, S.Y., Reeves, R., Luthra, A., Oakes, N., Clark, A.G. & Messer, P.W.** (2018) *Reducing resistance allele formation in CRISPR gene drive*. Proc Natl Acad Sci 115: 5522–5527.
- Chen, C.H., Huang, H., Ward, C.M., Su, J.T., Schaeffer, L.V., Guo, M. & Hay B.A.** (2007) *A Synthetic Maternal-Effect Selfish Genetic Element Drives Population Replacement in Drosophila*. Science 316, 597–600.
- Esvelt, K.M., Smidler, A.L., Catteruccia, F.* & George M Church, G.M.** (2014) *Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations*. eLife 3: e03401.
- Hammond, A.M., Kyrou, K., Bruttini, M., North, A., Galizi, R., Karlsson, X., Kranjc, N., Carpi, F.N., D’Aurizio, R., Crisanti, A. & Nolan, T.** (2017) *The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito*. PLoS Genet 13: e1007039.
- KaramiNejadRanjbar, M., Eckermann, K.N., Ahmed, H.M.M., Sánchez C., Dippel, S., H.M., Marshall, J.M. & Wimmer, E.A.** (2018) *Consequences of resistance evolution in a Cas9-based sex conversion suppression gene drive for insect pest management*. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, 6189–6194.
- Kyrou, K., Hammond, A.M., Galizi, R., Kranjc, N., Burt, A., Beaghton, A.K., Nolan, T. & Crisanti, A.** (2018) *A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged Anopheles gambiae mosquitoes*. Nat Biotechnol. 36, 1062–1066.
- Noble, C., Min, J., Olejarz, J., Buchthal, J., Chavez, A., Smidler, A.L., DeBenedictis, E.A., Church, G.M., Nowak, M.A. & Esvelt, K.M.** (2019) *Daisy-chain gene drives for the alteration of local populations*. Proc Natl Acad Sci 116: 8275–8282.
- Oberhofer, G., Ivy, T. & Hay, B.A.** (2018) *Behavior of homing endonuclease gene drives targeting genes required for viability or female fertility with multiplexed guide RNAs*. Proc Natl Acad Sci 2018 115, E9343–E9352.
- Oberhofer, G., Ivy, T. & Hay, B.A.** (2019) *Cleave and Rescue, a novel selfish genetic element and general strategy for gene drive*. Proc Natl Acad Sci 116, 6250–6259.
- Wimmer, E.A.** (2013) *Insect Biotechnology: Controllable Replacement of Disease Vectors*. Current Biology 23, R453–R456.

6 All-Food-Seq: Next Generation Sequencing-basiertes Screeningverfahren zur quantifizierbaren Speziesidentifikation in prozessierten Lebensmitteln

Sören Lukas Hellmann¹, Robin Kobus², Bertil Schmidt², Sven Bikar³, René Köppel⁴ und Thomas Hankeln¹

¹ *Institut für molekulare und organismische Evolutionsbiologie, AG Molekulare Genetik & Genomanalyse, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*

² *Institut für Informatik, AG Hochleistungsrechnen, Johannes Gutenberg-Universität Mainz*

³ *StarSEQ GmbH, Mainz*

⁴ *Kantonales Labor Zürich, Gesundheitsdirektion Kanton Zürich, Schweiz*

6.1 DNA-basierte Speziesidentifikation: ein unverzichtbares Werkzeug der Lebensmittelüberwachung

Regelmäßig berichten die Nachrichten von Lebensmittelskandalen: falsch deklarierte Rezepturen oder Austausch teurer durch günstigere Zutaten werden mit Regelmäßigkeit aufgedeckt [1–5]. Neben einer Täuschung des Verbrauchers kann dies erhebliche gesundheitliche Auswirkungen haben, wenn der Verbraucher Nahrungsmittelunverträglichkeiten oder Allergien hat oder es zur Aufnahme gesundheitsschädlicher Substanzen kommt. Auch ethische Aspekte der Ernährung (z. B. halal, kosher, vegan) gilt es zu beachten. In Deutschland erkranken jährlich über 200.000 Menschen an durch Lebensmittel übertragenen Mikroorganismen [6], die z.B. durch einen Mangel an Hygienemaßnahmen bei der Verarbeitung in die Produkte gelangen können [7]. Lebensmittelhändler selbst sowie Behörden der Lebensmittelüberwachung müssen die Möglichkeit haben, die Identität und Qualität der gelieferten Waren zu überprüfen. Im Sinne des Verbraucherschutzes und zur Verhinderung von unlauterem Wettbewerb ist es daher erforderlich, standardisierte Methoden für die eindeutige Identifizierung biologischer Arten zur Verfügung zu haben. Für prozessierte Lebensmittel haben sich dafür DNA-basierte Nachweisverfahren als vorteilhaft erwiesen, da die Struktur von Proteinen je nach Grad der Verarbeitung oft zerstört wird und ein Nachweis auf Proteinebene sich somit schwierig gestalten kann. Des Weiteren zeichnen sich DNA-basierte Methoden wie die am häufigsten eingesetzte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch ihre hohe Sensitivität, Spezifität und Quantifizierbarkeit (quantitative PCR, qPCR) aus [8–17]. Diese PCR-Verfahren beruhen zum Nachweis einer Spezies in der Regel auf der Amplifikation von allgemein hoch-konservierten Genabschnitten, die charakteristische artspezifische Basensubstitutionen aufweisen. Die Zielsequenzen für die PCR stammen oftmals aus mitochondrialer (*cytB*, *cox1*, *16S rDNA*) oder plastidärer DNA (*rbcl*, *matK*), da diese Organellen-DNAs in hoher Kopienzahl vorhanden und selbst nach starker Prozessierung im Gewebe effizient nachweisbar sind.

Typischerweise werden die PCR-Amplikons für den Artennachweis mit der klassischen Sanger-Technik sequenziert. Die dann sichtbaren charakteristischen Sequenzaustausche werden als artspezifischer „DNA-Barcode“ bezeichnet [18–20]. Für viele hunderttausende tierische, pflanzliche und Pilz-Spezies sind solche DNA-Barcodes bereits in entsprechenden Sequenzdatenbanken gesammelt worden, so dass die aus einem Lebensmittel erhaltenen Barcode-Sequenzen einfach durch Datenbankabgleich identifiziert werden kann [21]. Eine Abwandlung der beschriebenen Methodik kommt zum Tragen, wenn nicht homogenes biologisches Material aus einer Spezies, sondern komplexe Lebensmittelgemische bestehend aus mehreren Arten analysiert werden sollen. Beim sogenannten „Meta-Barcoding“ erfasst ein Primerpaar beispielweise das *cytB*-Gen von Tieren. Die resultierenden Amplifikate stellen dann ein Gemisch der unterschiedlichen Tierarten in der Probe dar. Sie werden hoch-parallel durch Next-Generation-Sequencing entschlüsselt. Die im Gemisch vorhandenen unterschiedlichen artspezifischen Sequenzen können danach durch einen Datenbankabgleich identifiziert werden (**Abbildung 1**).

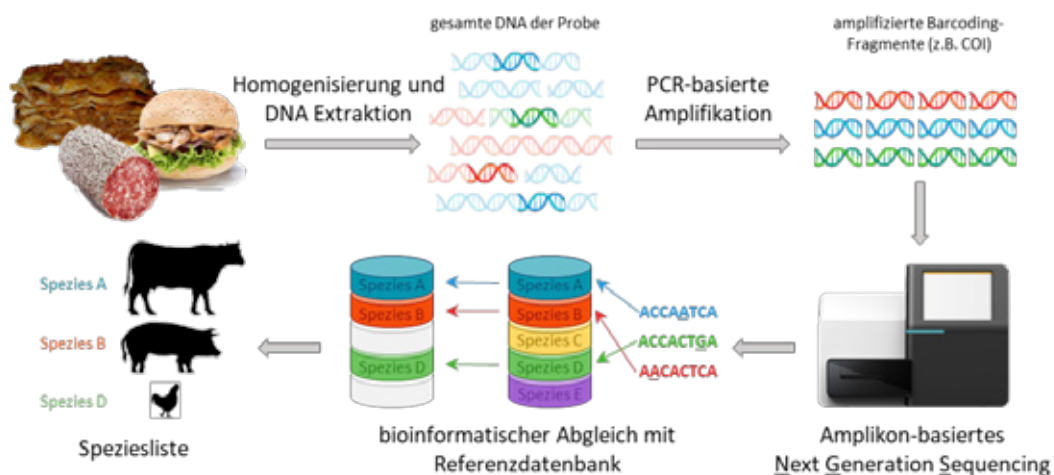


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer „Meta-Barcoding“-Analyse: Die zu analysierende Probe wird homogenisiert und eine Gesamt-DNA-Extraktion durchgeführt. Mittels PCR werden Genabschnitte mit spezies-spezifischen Sequenzaustauschen (z.B. aus dem Gen der mitochondrialen COI) amplifiziert, sog. DNA-Barcoding Fragmente. Für eine umfassende Analyse multipler Spezies sind parallele PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Primersystemen notwendig. Die DNA-Barcoding Fragmente werden anschließend hoch-parallel durch NGS-Methoden sequenziert. In einer bioinformatischen Analyse werden die sequenzierten Fragmente mit bestehenden Referenzdatenbanken abgeglichen und somit das Artenspektrum der metagenomischen Probe abgeleitet.

Qualitativ kann man die Artzusammensetzung des Lebensmittels auf diese Weise hochspezifisch ermitteln. Für die gleichzeitige Erfassung z.B. von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen sind aber parallele Ansätze mit jeweils anderen PCR-Primersystemen erforderlich. Prinzipiell ist also das Next-Generation Sequencing (NGS)-basierte Meta-Barcoding durch den Einsatz dieser Primersysteme auf ein Spektrum an identifizierbaren Arten beschränkt.

Die Barcode-typischen Markergene aus Organellen-DNA schwanken zudem in der Kopienzahl je nach Gewebe und auch zwischen den Arten sehr stark. Eine Quantifizierung von Art-Anteilen durch einfaches Auszählen der Meta-Barcode-Sequenzen gilt daher durch Schwankungen in der Anzahl der zur Verfügung stehenden PCR-Matrizen, durch die variable Bindungsspezifität der Primer und durch Assay-abhängige Amplifikationsbias als eher problematisch [22–29].

Eine Alternative zum PCR/Barcode-basierten Speziesnachweis stellt die Sequenzierung der Gesamtheit aller genomischer DNA eines Lebensmittels dar („whole-genome shotgun metagenomics“). Die artspezifischen Unterschiede der erhaltenen Sequenzabschnitte sollten dabei eine Bestimmung der Artzusammensetzung erlauben. In der Tat bestehen die Genome von Eukaryoten überwiegend aus nicht-funktionellen Bereichen, die weitgehend ohne selektiven Druck während der Evolution speziesspezifische Mutationen anhäufen und so für eine Artbestimmung bestens geeignet sind. Der Genomanteil zwischenartlich konservierter Gen-Exons ist dagegen niedrig (z.B. 1.2 % bei Säugetieren [30]). Lebensmittelrelevante Spezies wie Schwein, Huhn u.a. zeigen zudem innerhalb einer Art nur wenige Polymorphismen von etwa 0,5 – 5 pro 1.000 Nukleotiden [31–34]. Diese geringen Werte sollten eine Differenzierung der Spezies durch gesamt-genomische Sequenzierung nicht negativ beeinflussen; sie könnten hingegen für eine Bestimmung von Populationen und geografischer Herkunft des Materials ausgewertet werden.

Eine weitere Überlegung ist, dass der DNA-Anteil jeder Spezies in einem komplexen Lebensmittel in etwa proportional zum Gewichtsanteil der entsprechenden Spezies in der Probe sein sollte. Dies würde zusätzlich zur Artidentifikation eine Quantifizierung von Speziesanteilen in Nahrungsmittelgemischen ermöglichen, indem man die Anteile der Arten in dem Sequenzdatensatz durch Auszählen der sogenannten „Sequenz-Reads“ bestimmt. Zudem kann ein solcher Ansatz der metagenomischen Gesamtsequenzierung von Lebensmittel-DNA alle in der Probe vorhandenen Spezies, egal ob eukaryotisch, prokaryotisch oder gar viral, in einem einzigen Experiment bestimmen. Daher entfällt die Notwendigkeit von multiplen Assays, um Bestandteile aller Domänen des Lebens identifizieren zu können. Eine zusätzliche DNA-Amplifikation über Primer entfällt ebenso, wie das hieraus resultierende Bias. Da die erhaltenen genomischen DNA-Sequenzen quasi ohne vorherige Erwartungen betrachtet werden, können auch unerwartete „exotische“ Speziesanteile detektiert werden, insbesondere auch solche, die ein mögliches Gesundheitsrisiko für den Konsumenten darstellen.

6.2 All-Food-Sequencing: Gesamt-genomisches NGS-basiertes Lebensmittel-Screening

Das All-Food-Sequencing (AFS) ist ein DNA-basiertes Screeningverfahren zur gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Artendiagnose in komplexen Lebensmitteln, die aus Anteilen mehrerer Spezies bestehen [35]. Die Methode umfasst die ungezielte Sequenzierung der gesamten Genom-DNA eines Lebensmittels mittels NGS. Daher wird im Gegensatz zu anderen Methoden wie PCR oder Meta-Barcoding keine Amplifikation bestimmter genomischer Regionen und somit auch keine a priori-Informationen in Form von z.B. Amplifikationsprimern benötigt. Eine zu prüfende Lebensmittelprobe wird homogenisiert und die gesamte DNA extrahiert. Die gewonnene DNA wird längenfragmentiert und eine Illumina-Sequenzierbibliothek erstellt; die Sequenzierung erfolgt auf z.B. auf einem Illumina HiSeq-, NextSeq- oder MiSeq-Gerät. Bereits ca. 200k erhaltene Sequenz-Reads einer Leselänge von je 50 bp sind ausreichend, um die Hauptkomponenten des Lebensmittels mit einem Anteil von mindestens 1 % zuverlässig zu quantifizieren [36]. Besser werden für eine Analyse mit der AFS jedoch etwa 1 Mio. Reads erstellt, um auch Bestandteile in geringeren Anteilen zuverlässig detektieren zu können. Die bioinformatische Arbeit, bei der die Reads identifiziert und gezählt werden, läuft folgendermaßen ab (**Abbildung 2**): zunächst werden die Reads hochspezifisch an eine Palette zur Verfügung stehender Referenz-Genomsequenzen kartiert und somit einer Art zugeordnet sowie dabei auch ausgezählt („quantitatives Mapping“). Reads, die bei diesem Schritt der Auswahl an Referenzgenomen nicht zugeordnet werden können („Unmapped Reads“), werden optional durch massive Datenbank-Suchen mit dem Alignment-Algorithmus BLAST identifiziert („qualitative Metagenomik“).

Beim Kartieren der Reads an Referenzgenome greift AFS auf den etablierten Mapping-Algorithmus BWA zurück [37]: Im quantitativen Mapping werden die Reads einer Lebensmittelprobe iterativ in drei Durchgängen mit abnehmender Stringenz an eine Auswahl von Referenzgenomen kartiert. Zunächst werden nur vollständig sequenzidentische Reads ausgewertet. Resultierende Treffer werden in drei Kategorien eingeteilt: 1) Unique Reads, die spezifisch an ein Referenzgenom kartieren, 2) Multimapped Reads, die mit gleicher Güte an mehrere Referenzgenome kartieren und 3) Unmapped Reads, die keinem Referenzgenom zugeordnet werden konnten (**Abbildung 2**). Die Unique Reads werden direkt der entsprechenden Spezies zugeordnet. Multimapped Reads entstehen durch zwischen mehreren Spezies konservierte Genomregionen und ihre Herkunft ist nicht eindeutig bestimmbar. Daher werden diese Reads anteilig im Verhältnis entsprechend der bei den Unique Reads beobachteten Distribution auf die beteiligten Spezies verteilt. Zuletzt werden die Unmapped Reads als Eingabe für zwei weitere Mapping-Durchgänge genutzt, wobei jeweils die geforderte Sequenzidentität zwischen Read und Referenzgenom um 1 % gesenkt wird.

Am Ende der drei Durchgänge wird anhand aller pro Spezies erzielten Treffer die finale Distribution der identifizierten Spezies berechnet. Die verbleibenden Unmapped Reads können in der qualitativen Metagenomik durch optionale massive BLAST-Analysen zugeordnet werden [38, 39]. Hierbei werden alle Unmapped Reads per lokalem BLAST mit der NCBI non-redundant nucleotide collection (nr/nt) abgeglichen. Somit können Spezies identifiziert werden, die nicht bei der initialen Auswahl der Referenzgenome berücksichtigt wurden.

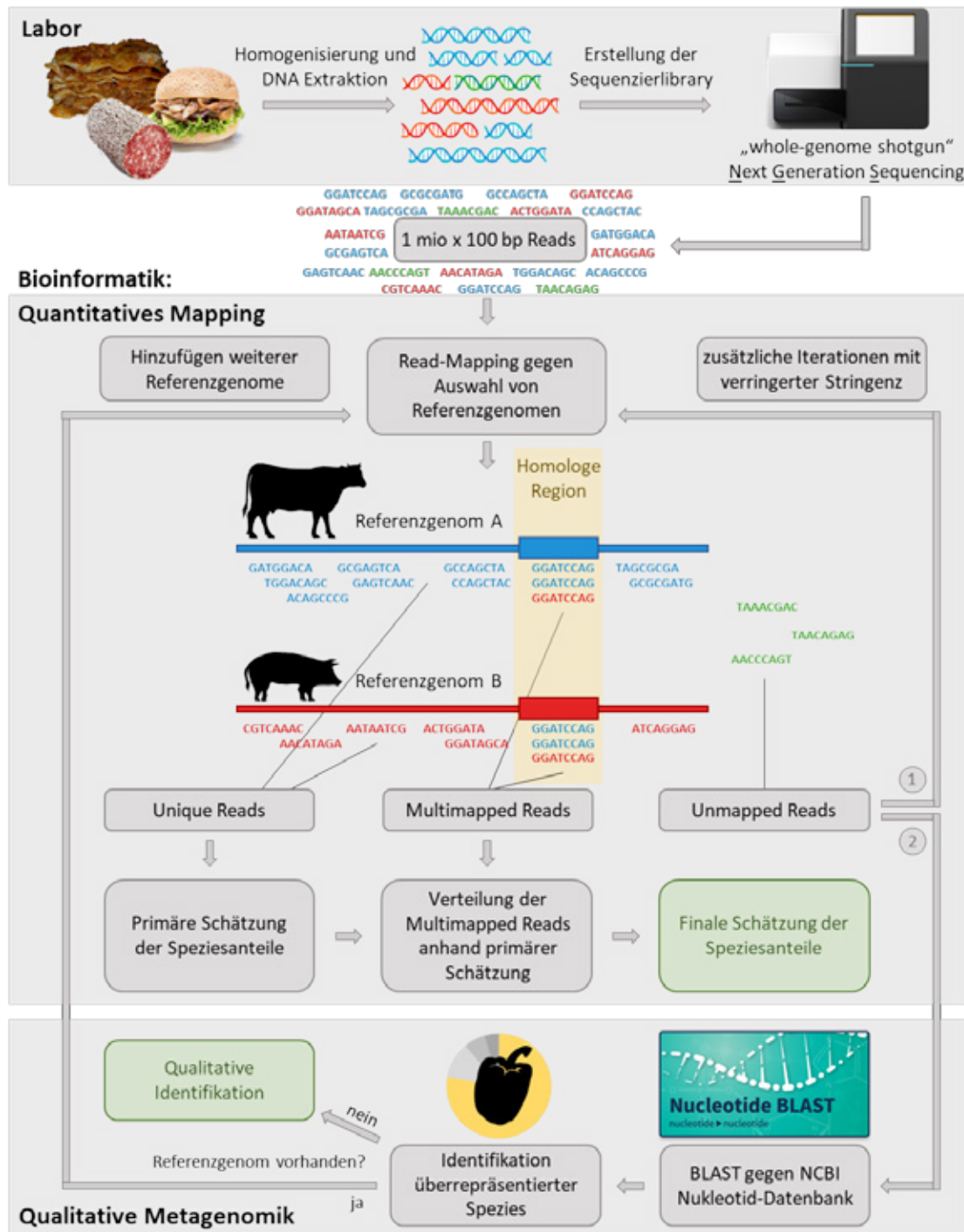


Abbildung 2: Workflow der AFS. Mit gängigen molekularbiologischen Methoden wird die gesamte DNA einer Lebensmittelprobe extrahiert, eine NGS library erstellt und auf einem Illumina-Gerät sequenziert. Im quantitativen Mapping werden in drei Iterationen die sequenzierten Reads an ausgewählte Referenzgenome kartiert und in Klassen unterteilt: Unique Reads treffen spezifisch an nur einem Referenzgenom, Multimapped Reads treffen aufgrund konservierter Sequenzen an mehreren Referenzgenomen. Multimapped Reads werden anhand des Verhältnisses von Unique Reads auf Spezies aufgeteilt. Unmapped Reads können keinem Referenzgenom zugeordnet werden und zeigen in der Regel zusätzliche in der Probe enthaltene Spezies oder mikrobiologische Belastungen an. In der qualitativen Metagenomik wird die Speziesherkunft jedes ungemappten Reads durch BLAST-Analysen ermittelt. Sofern ein Referenzgenom für neu entdeckte Spezies vorhanden ist, kann das quantitative Mapping um entsprechende Spezies erweitert werden.

Wenn für eine dabei neu identifizierte Spezies ein Referenzgenom existiert, so kann der initiale quantitative Mappingschritt unter Einbeziehung dieser neu identifizierten Komponente wiederholt werden. Bei Fehlen eines passenden Referenzgenoms kann mit den Unmapped Reads zumindest eine qualitative Aussage über die Anwesenheit der Spezies im Lebensmittel getroffen werden. Durch diese qualitative Metagenomik sind selbst in Spuren vorhandene Zutaten wie Gewürze, Verunreinigungen oder Allergene in der Probe detektierbar. Auch eine Bestimmung des mikrobiologischen Artenspektrums ist auf diese Weise möglich.

6.3 AFS liefert exaktere Resultate als qPCR

Die Performanz der AFS-Methode wurde anhand von Wurstproben mit exakt bekannten Zusammensetzungen getestet, sogenannten Kalibrator-Würsten. Diese Proben wurden von einer professionellen Metzgerei zu Versuchszwecken nach drei Rezepturen erstellt: AllMeat (Rind, Schwein, Schaf, Pferd in variablen Anteilen), Lyoner (Rind, Schwein und in geringem Umfang Huhn, Truthahn) sowie Geflügel-Lyoner (Huhn, Truthahn und in geringerem Umfang Rind, Schwein) [9, 10]. Viele Lebensmittel enthalten auch pflanzliche Komponenten, die bei Personen zu allergischen Reaktionen führen können. Daher wurden insgesamt 11 Pflanzen mit Allergiepotezial in unterschiedlichen Mengen in die Wurstrezepturen eingearbeitet.

Die so konzipierten Proben wurden per AFS analysiert und die Ergebnisse mit denen konventioneller Methoden wie qPCR und droplet digital PCR (ddPCR) verglichen (**Abbildung 3**): In 9 von 13 Fällen lieferte AFS die besten Resultate, bei 3 Proben war eine ddPCR leicht besser und nur in einem Fall lieferte eine ddPCR eindeutig bessere Ergebnisse als AFS [40]. Für keine der betrachteten Proben konnte eine qPCR das beste Ergebnis liefern. Selbst Zutaten mit einem Anteil von 0,5 – 1 % konnten zuverlässig durch AFS detektiert werden. Noch keine quantitative Analytik war zum Zeitpunkt der Datenauswertung für die potenziell allergenen Pflanzenspezies möglich, da für diese nur ein einziges Referenzgenom existierte. Daher konnten diese Bestandteile nur durch qualitative Metagenomik untersucht werden. Alle Pflanzenspezies konnten dabei identifiziert werden [35]. Eine quantitative Aussage ist bei dieser BLAST-Analyse aufgrund der ungleichmäßigen Repräsentation von Spezies in der Datenbank nicht möglich. Zwar wurde eine Pflanzenart sogar mit nur einem Read identifiziert, vor allem bei Allergenen gehen wir jedoch davon aus, dass eine qualitative Aussage als Alarmsignal ausreichend ist.

Zur Einschätzung der Gefahr von möglichen falsch-positiven Resultaten bei der AFS-Analyse wurden zusätzlich zu den in den Würsten real enthaltenen Spezies-Komponenten zusätzlich nah-verwandte Spezies getestet.

Eine enge phylogenetische Beziehung von Arten bedingt eine höhere Sequenzähnlichkeit aufgrund konservierter DNA-Sequenzen, die wiederum zu uneindeutigen Read-Zuordnungen und somit zu qualitativ und quantitativ falschen Aussagen führen könnten. Es konnte gezeigt werden, dass phylogenetische Distanzen von ca. 10 Mio. Jahren (z.B. Schaf-Ziege oder Rind-Wasserbüffel) nur zu geringen Falsch-Zuordnungen bei der AFS führen und diese lebensmittelrelevanten Speziespaare somit sicher unterschieden werden können [40]. Durch in silico-Simulationen haben wir gezeigt, dass eine Erhöhung der Read-Leselänge bei der Sequenzierung auf 150 bp falsch-positive Treffer erwartungsgemäß verringert, da längere Reads häufiger diagnostische Unterschiede zwischen den Spezies enthalten. Durch diese technische Modifikation kann die falsch-positive Detektionsrate mit nur geringen Mehrkosten deutlich gesenkt werden.

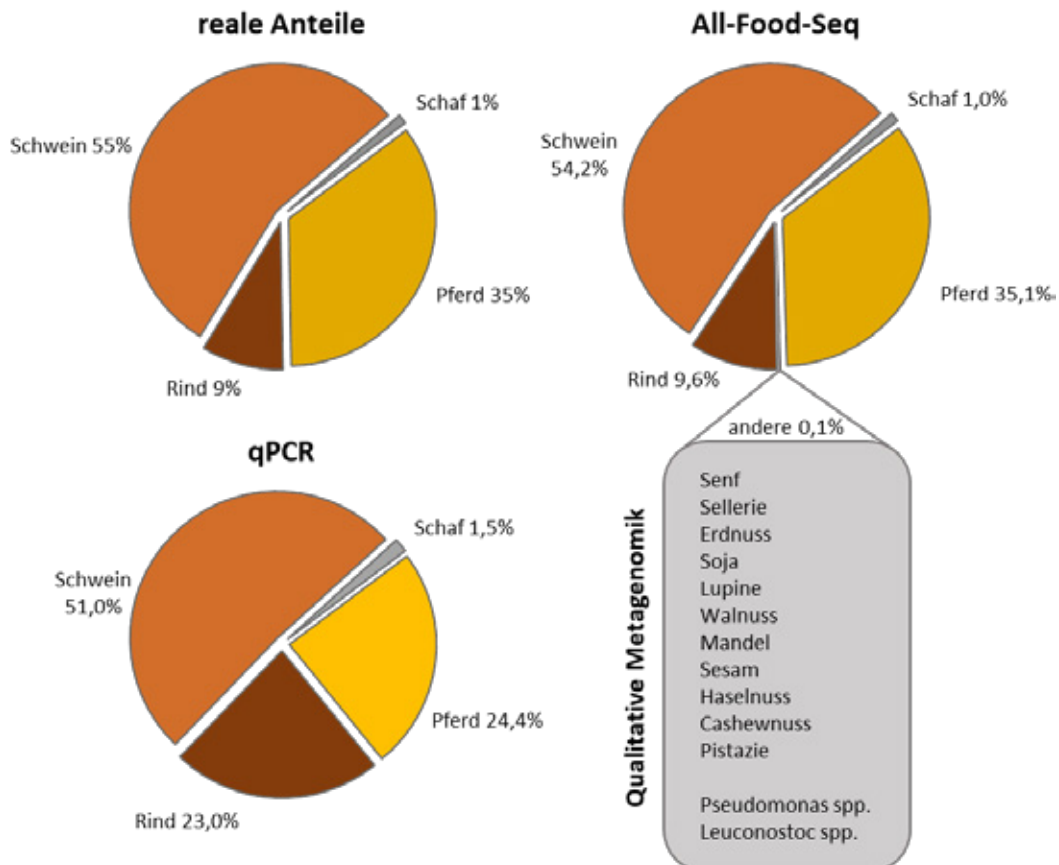


Abbildung 3: Vergleich der All-Food-Seq und qualitativer PCR am Beispiel des AllMeat-Kalibrators B. Die Ergebnisse der qualitativen PCR stammen aus [8].

6.4 AFS identifiziert „exotische“ Komponenten in der Praxis

Das Potential der AFS zur Detektion unerwarteter Komponenten sollte in der Praxis getestet werden, indem reale Lebensmittelproben sequenziert wurden. Diese umfassten fünf Döner Kebab von Imbissen aus dem Rhein-Main-Gebiet. Laut dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) dürfen unter dem Namen Döner Kebab verkaufte Gerichte ausschließlich Fleisch von Lamm/Schaf oder Kalb/Rind enthalten; Hähnchen- oder Putenhaltige Gerichte müssen hingegen einen entsprechenden Namen gemäß der enthaltenen Geflügelart tragen [41]. Mehrere Studien berichten jedoch von Fehldeklarationen von Döner Kebab-Snacks, wobei häufig nicht deklariertes Geflügel oder in seltenen Fällen auch Schweinefleisch enthalten waren [42–44]. Bei der Untersuchung mit der AFS lag daher der Fokus auf der Identifikation der Fleischkomponenten, weshalb nur diese extrahiert und analysiert wurden. In drei von fünf Proben konnte Fleisch vom Truthahn mit je einem Anteil von über 70 % nachgewiesen werden, obgleich keine der Proben als Geflügeldöner verkauft wurde [40]. In drei Proben konnten geringe Mengen an nicht deklariertes Soja nachgewiesen werden, die womöglich aus einer Gewürzmischung der Marinade des Fleisches stammen könnte und für Konsumenten besonders im Hinblick auf Allergien von großer Relevanz ist. In einer Probe wurden außerdem nennenswerte Mengen an Mais gefunden, dessen Ursprung wir in der Salatbeilage des Döner Kebab vermuten.

Des Weiteren wurde eine Paella mit Huhn analysiert. Bei diesem Gericht handelt es sich um ein rezeptorisch komplexes Gericht mit vielen Zutaten in zum Teil geringen Mengenanteilen. Zur Vereinfachung dieser komplizierten Aufgabe wurden bei der Analyse mit der AFS nur die „Nicht-Reis“-Komponenten untersucht. Die meisten der Komponenten wie Huhn, Alaska Seelachs, Miesmuscheln, Tomaten und Paprika konnten zuverlässig detektiert werden [unveröffentlichte Ergebnisse]. Diese Probe zeigt aber auch eine Schwäche der AFS auf: für die im Gericht enthaltenen Erbsen sowie Zwiebeln existieren bis dato keine Referenzgenome, die jedoch eine zwingende Voraussetzung für die quantitative Analyse sind. Durch die daher notwendigerweise fehlerhafte Quantifizierung wurde der Anteil der real vorhandenen Spezies (mit Referenzgenom) überschätzt, sodass eine exakte mengenmäßige Aussage in diesem Fall nicht möglich war. Durch den zweiten Analyseschritt der AFS, die Metagenomik per BLAST-Analyse, war es indessen möglich, diese Spezies zumindest qualitativ zu identifizieren. Auf diese Weise konnte im Gericht entgegen der deklarierten Rezeptur Hefe detektiert werden (ein Befund, den der Hersteller auf Nachfrage bestätigte). Außerdem wurden geringe Mengen an *Nepetoideae* identifiziert. Dieser Pflanzen-Unterfamilie gehören diverse Gewürzpflanzen wie Basilikum, Oregano, Rosmarin, Thymian an. Auch geringe Spuren von Fadenwürmern wurden identifiziert. Da Seelachs häufig von diesen Parasiten befallen ist, erscheint dieser Weg in das Lebensmittel am naheliegendsten.

Im tiefgefrorenen Produkt stellen diese zwar keine Gesundheitsgefahr für den Menschen dar, sie sind jedoch Indiz für eine verspätete Entfernung des Bauchlappens bei der Bearbeitung des Fisches [45, 46]. Interessanterweise konnte die AFS die im Rezept angegebenen Shrimps nicht bestätigen, dafür wurde unerwartet Tintenfisch identifiziert. Wir vermuten, dass es sich hierbei um eine mögliche Änderung der Rezeptur oder eine Kontamination in der Produktionslinie handelt; diese Beobachtung hat der Hersteller jedoch nicht kommentiert. Diese Beispiele demonstrieren, dass die AFS als Screening-Methode sinnvoll einsetzbar ist. Ergänzt durch etablierte Methoden wie die gezielte PCR-Detektion hat die AFS ein großes Potential zur routinemäßigen Analyse von komplex zusammengesetzten Lebensmitteln.

6.5 Bakterien- und Phagen-Detektion ohne Mehraufwand

Die AFS basiert wie beschrieben auf einer Sequenzierung der gesamten DNA einer Probe. Dies bietet zeitgleich das Potential, das mikrobielle Spektrum ohne finanziellen Mehraufwand bedingt durch eine separate Typisierung testen zu können. Diese Stärke der AFS zeigte sich eindrucksvoll an den Geflügel-Lyoner-Proben: In diesen wurden die Bakterien *Brochothrix spp.*, *Pseudomonas spp.* und *Psychrobacter spp.* identifiziert [47]. Vertreter aller drei Gattungen sind dafür bekannt Lebensmittel zu verderben [48, 49]. Des Weiteren wurde in diesen Lyonerwürsten *Brochothrix* phage BL3 nachgewiesen [47]. Dieser Bakteriophage wird in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, um die Haltbarkeit von verpacktem Fleisch zu verlängern [50, 51]. Somit zeigt AFS eindrucksvoll, dass selbst die Detektion von Viren und auch bioprozessierten Lebensmitteln möglich sind.

6.6 Limitation durch Referenzgenome

Bedingung für die Funktionsweise der AFS ist das Vorhandensein von Referenzgenomen für möglichst viele zu testende Spezies. In der Vergangenheit waren solche Genomsequenzen nur kostenintensiv und sehr aufwändig herzustellen. So hat etwa das human genome project vor zwanzig Jahren mehrere Tausend Wissenschaftler über einen Zeitraum von über 10 Jahren beschäftigt und fast 3 Mrd. US-Dollar gekostet [52, 53]. Die Kosten einer Sequenzierung sind jedoch erheblich gesunken (z.B. auf ca. 1.500 € pro Humangenom), und verbesserte Computertechnologie sowie Algorithmik haben den zur Assemblierung benötigten Rechenaufwand deutlich reduziert. Heute ist daher die Erstellung eines Referenzgenoms einer Spezies auch für kleine Labore erschwinglich und der Arbeitsaufwand von einem Doktoranden in wenigen Wochen zu bewerkstelligen.

Als weiter kostensparende Alternative haben wir getestet, ob die AFS auch mit sehr schwach redundant sequenzierten und daher äußerst kostengünstig erstellten Genomsequenzen funktioniert.

Solche Genome, die typischerweise mit einer Redundanz von nur 5-10x produziert werden, erreichen selbstverständlich bei weitem nicht die hohe Qualität von gründlich erarbeiteten Referenzgenomen wie dem des Menschen. Die Basensequenz ist jedoch in der Regel nahezu vollständig vorhanden ($> 90\%$), liegt aber eben stark fragmentiert vor. Dennoch eignen sich diese günstig erstellten Genomsequenzen offenbar hervorragend für analytische Zwecke wie die AFS [unveröffentlichte Ergebnisse]. Zusätzlich planen große Genom-Konsortien die Sequenzierung von vielen Tausend Genomen [54, 55]. Daher ist davon auszugehen, dass in einigen Jahren Referenzgenome für die wichtigsten aller eukaryotischen Spezies vorhanden sein werden. Vermutlich werden damit alle lebensmittelrelevanten Spezies schon früher abgedeckt sein, sodass diese Limitierung der AFS voraussichtlich bald entfällt.

6.7 Schnellere Analysen durch algorithmische Weiterentwicklung

Während einer AFS-Analyse müssen bei der Kartierung der Reads alle Referenzgenome in den Arbeitsspeicher des Rechners geladen werden. Die Menge an benötigten Computerressourcen nimmt schon heute zum Teil problematische Dimensionen an und wird künftig mit mehr verfügbaren Referenzgenomen weiter steigen. Zum Teil werden diese Herausforderungen sicher durch Fortschritte in der Computertechnik kompensiert werden. Dennoch wird parallel eine Reduktion der Rechenlast erforderlich. Wir entwickeln daher die Software AFS-MetaCache, die durch geschickte Reduktion der zu durchsuchenden Genomgröße den Rechenaufwand stark reduziert [47, 56]. Die Vorgehensweise führt MinHash als algorithmisches Prinzip in DNA-Analyseverfahren ein: diese informatische data mining-Technik berechnet den Jaccard-Koeffizienten zweier Elemente und bestimmt deren Schnittmenge, sodass zügig Übereinstimmungen detektiert werden können. Die Methode stammt ursprünglich aus der Webentwicklung und wird u.a. von Internet-Suchmaschinen verwendet, um sich ähnelnde Websites zu filtern.

AFS-MetaCache unterteilt sich in zwei Arbeitsschritte: 1) einmalige Erstellung der Datenbank mit den Referenzgenomen und 2) Analyse einer Probe durch Abgleich der Reads mit der erstellten Datenbank. Bei der Konstruktion der Datenbank wird jedes zur Verfügung stehende Referenzgenom in Windows der Länge l unterteilt, die einer genomischen Region entsprechen (**Abbildung 4**). Innerhalb eines jeden Windows werden alle k Nukleotide langen Sequenzen, sog. k -mers, extrahiert und in eine Liste geschrieben. Auf jedes Element dieser Liste wird nun eine Hashfunktion angewandt, die jedem k -mer basierend auf seiner Sequenz einen eindeutigen Zahlenwert zuteilt. Nun folgt der Vorteil, der zur enormen Reduktion an Hardware-Ressourcen führt.

Anstatt wie rechenintensive Mapping-Algorithmen die gesamte verfügbare Information als Referenz zu nutzen, reduziert AFS-MetaCache die Sequenz der Referenzgenome nach einem reproduzierbaren Prinzip: aus der Liste an Hash-Werten jedes Windows werden nicht alle, sondern nur die s kleinsten k -mere für die folgende Analyse in die Datenbank geschrieben. Dadurch reduziert sich die Größe jedes zu durchsuchenden Referenzgenoms, während jedoch alle genomischen Regionen abgebildet bleiben.

Beim zweiten Schritt, der Klassifikation der sequenzierten Reads aus der Lebensmittelprobe, wird nun sehr ähnlich vorgegangen: Jeder sequenzierte Read wird in seine k -mere zerlegt und diese in einer Liste gespeichert, jeweils eine Hashfunktion angewandt und zuletzt nur die s kleinsten k -mere betrachtet (Abbildung 4). Anstatt die ganze Sequenz eines Reads zu vergleichen, müssen somit nur s k -mere ausgewertet werden, um die genomische Region des Reads und damit seine Herkunft und Spezies-Zuordnung zu identifizieren. Diese Reduktion des Suchaufwands hat eine über 400-fache Steigerung der Geschwindigkeit bei gleichbleibender Sensitivität und Spezifität zur Folge, sodass die bioinformatische Auswertung einer Probe mit 10 Mio. Reads auf deutlich unter 1 Minute reduziert werden kann [47, 56].

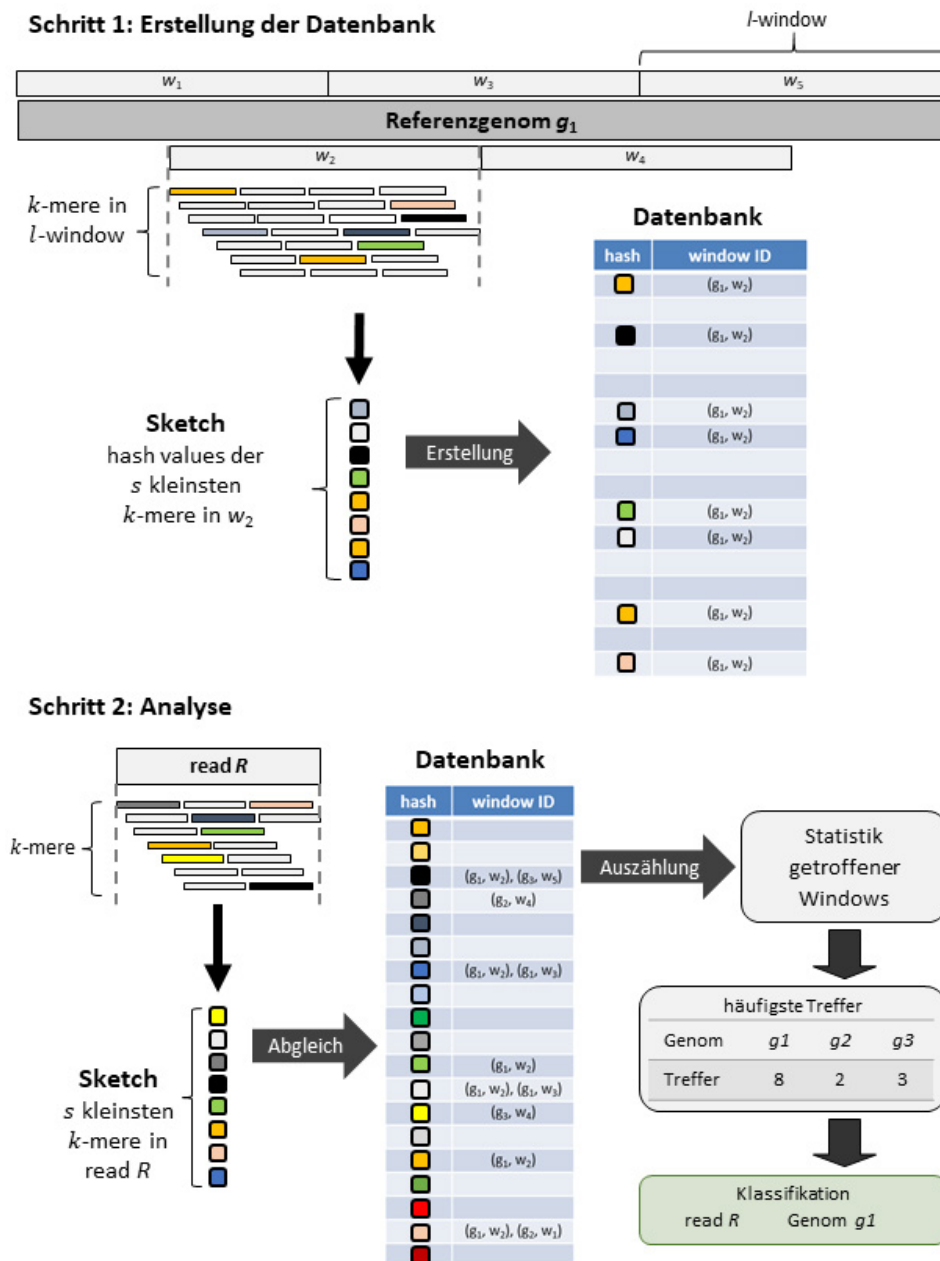


Abbildung 4: Konzeptioneller Ablauf von AFS-MetaCache. Die Methode läuft in zwei Schritten ab: Zunächst wird einmalig eine Datenbank aus allen zur Verfügung stehenden Referenzgenomen erstellt. Dabei wird jedes Genom in windows unterteilt. Anschließend wird für alle in einem window enthaltenen k-mere ein Hash-Wert berechnet. Nur die k-mere mit den s kleinsten Hash-Werten werden in die Datenbank übertragen. Der zweite AFS-MetaCache Schritt ist die Analyse: Jeder zu analysierende Read wird in seine k-mere zerlegt und deren Hash-Werte berechnet. Die s kleinsten Hash-Werte jeden Reads werden mit der Datenbank abgeglichen. Basierend auf den getroffenen k-meren in der Datenbank wird ermittelt, an welches window und Genom der jeweilige Read kartiert werden kann.

6.8 Kosten der AFS

Die Materialkosten einer AFS-Analyse reflektieren größtenteils die Reagenzien zur Erstellung der Illumina NGS-Library. Die Reagenzien für die Sequenzierung selbst von etwa 1 Mio. Reads sind hingegen sehr günstig. Kommerzielle Anbieter offerieren beispielsweise die Analyse von 40 Proben (parallel) mit je 2x 1 Mio. Reads („paired-end“-Sequenzierung) und 75 bp Leselänge für ca. 120€ pro Probe [57].

6.9 Zusammenfassung und Ausblick

Die All-Food-Seq (AFS) ist eine Screening-Methode zur Analyse von Lebensmittelkomponenten basierend auf Next-Generation Sequencing der Gesamt-DNA. Verglichen mit etablierten Methoden wie der qPCR oder ddPCR liefert die AFS eine vergleichbare oder sogar bessere Quantifizierungsaussage. Bedingung für eine Analyse mit der AFS ist das Vorhandensein von Referenzgenomen der zu untersuchenden Spezies. Durch kontinuierlich sinkende Kosten für Genomdaten ist mit deren Verfügbarkeit für die meisten Lebensmittelrelevanten Spezies in wenigen Jahren zu rechnen. Der Preis pro Analyse wird vermutlich ebenfalls weiter sinken.

Prinzipbedingt ermöglicht AFS das Screening eines Lebensmittels ohne a priori-Annahmen, z.B. durch den Einsatz von PCR-Systemen. Außerdem stellt die Methode einen All-in-One Ansatz dar, da neben tierischen und pflanzlichen Komponenten auch die mikrobielle Belastung festgestellt werden kann. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um Parasiten, Pilze, Bakterien und gar Viren handelt: Vertreter aller Domänen des Lebens können in nur einem Experiment parallel detektiert werden. Aktuell lassen sich Mikroorganismen zwar identifizieren, aber nur bedingt quantifizieren. Wir arbeiten daher daran, den Zusammenhang zwischen identifizierten bakteriellen Reads und koloniebildenden Einheiten herzustellen. Hierdurch wird es potenziell möglich, per AFS eine Aussage z.B. über die Anzahl von Fäulnisbakterien und somit den Frischegrad des Lebensmittels zu treffen. Allergene können in der AFS derzeit häufig nur qualitativ identifiziert werden; für viele relevante Pflanzenspezies fehlen aktuell noch die Referenzgenome.

Fortschritte in der Sequenziertechnologie werden sich vermutlich sehr positiv auf die AFS in der Praxis auswirken: aktuell testen wir die Eignung des Nanoporen-Sequenzierprinzips für die AFS. Diese ultraportable Sequenziertechnologie ermöglicht Analysen am Ort der Probenahme, also z.B. auf dem Markt oder direkt beim Produzenten, und damit in Echtzeit. Es entfällt die Notwendigkeit des Probenverkehrs in ein Labor, was vor allem bei der Kontrolle von schnell verderblichen Lebensmitteln von Vorteil ist. Besonders die Kombination mit schnelleren Analyse-Algorithmen wie AFS-MetaCache ist dabei erfolgsversprechend. Somit kann die aktuell gängige Praxis der Beanstandung einer Probe im Nachhinein aufgrund der großen Zeitersparnis bei der Analyse schon bald der Vergangenheit angehören.

6.10 Danksagung

TH und SLH danken dem Bundesamt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE, Förderkennzeichen 2816503814), dem Center for Computational Sciences der JGU Mainz (CSM) und dem Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz Rheinland-Pfalz für finanzielle Unterstützung.

6.11 Quellen

1. **Wong EHK, Hanner RH** (2008) *DNA barcoding detects market substitution in North American seafood*. *Food Res Int* 41:828–837
2. **Luber F., Demmel A., Hosken A., et al.** (2012) *Apricot DNA as an indicator for persipan: Detection and quantitation in marzipan using ligation-dependent probe amplification*. *J Agric Food Chem* 60:5853–5858
3. **Iwobi A., Sebah D., Kraemer I., et al.** (2015) *A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat*. *Food Chem* 169:305–313
4. **Cohen NJ, Deeds JR, Wong ES, et al.** (2009) *Public health response to puffer fish (Tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product*. *J Food Prot* 72:810–817
5. **Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Rahimi E** (2014) *Molecular assay to fraud identification of meat products*. *J Food Sci Technol* 51:148–152
6. **Bundesinstitut für Risikobewertung: Problematik der Lebensmittelinfektion**. https://www.bfr.bund.de/de/problematik_der_lebensmittelinfektion-11100.html. Accessed 24 Feb 2020
7. **Verwaltungsgericht Kassel** (2019) *Betriebsschließung Firma Wilke*. <https://verwaltungsgerichtsbarkeit.hessen.de/pressemitteilungen/betriebsschließung-firma-wilke-0>. Accessed 24 Feb 2020
8. **Köppel R., Ruf J., Zimmerli F., Breitenmoser A.** (2008) *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey*. *Eur Food Res Technol* 227:1199–1203
9. **Eugster A., Ruf J., Rentsch J., Köppel R.** (2009) *Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial*. *Eur Food Res Technol* 230:55–61
10. **Köppel R., Ruf J., Rentsch J.** (2011) *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep*. *Eur Food Res Technol* 232:151–155
11. **Ulca P., Balta H., Çağın İ., Senyuva HZ** (2013) *Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods*. *Meat Sci* 94:280–284
12. **Floren C., Wiedemann I., Brenig B., et al.** (2015) *Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR)*. *Food Chem* 173:1054–1058
13. **Liu S., Xu K., Wu Z., et al.** (2016) *Identification of five highly priced tuna species by quantitative real-time polymerase chain reaction*. *Mitochondrial DNA* 27:3270–3279
14. **Song K.-Y., Hwang HJ, Kim JH** (2017) *Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications*. *Food Chem* 229:341–346
15. **Spielmann G, Gerdes L, Miller A, et al.** (2018) *Molecular biological species identification of animal samples from Asian buffets*. *J für Verbraucherschutz und Leb* 13:271–278

16. **Spielmann G., Diedrich J., Haszprunar G., et al.** (2019) *Comparison of three DNA marker regions for identification of food relevant crustaceans of the order Decapoda*. *Eur Food Res Technol* 245:987–995
17. **Köppel R., Ganeshan A., Weber S., et al.** (2019) *Duplex digital PCR for the determination of meat proportions of sausages containing meat from chicken, turkey, horse, cow, pig and sheep*. *Eur Food Res Technol* 245:853–862
18. **Roslin T., Majaneva S.** (2016) *The use of DNA barcodes in food web construction—terrestrial and aquatic ecologists unite!* *Genome* 59:603–628
19. **Staats M., Arulandhu AJ, Gravendeel B., et al.** (2016) *Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification*. *Anal. Bioanal. Chem.* 408:4615–4630
20. **Böhme K., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J., Ortea I.** (2019) *Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics*. *J Agric Food Chem* 67:3854–3864
21. **Ratnasingham S., Hebert PDN** (2007) *BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding*. *Mol Ecol Notes* 7:355–364
22. **Tillmar AO, Dell’Amico B., Welander J., Holmlund G.** (2013) *A universal method for species identification of mammals utilizing next generation sequencing for the analysis of DNA mixtures*. *PLoS One* 8:e83761
23. **Zhou X., Li Y., Liu S., et al.** (2013) *Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification*. *Gigascience*
24. **Newmaster SG, Grguric M., Shanmughanandhan D., et al.** (2013) *DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products*. *BMC Med* 11:1–13
25. **Deagle BE, Thomas AC, Shaffer AK, et al.** (2013) *Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: Which counts count?* *Mol Ecol Resour* 13:620–633
26. **Markoulatos P., Sifakas N., Moncany M.** (2002) *Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach*. *J Clin Lab Anal* 16:47–51
27. **Berry D., Mahfoudh K. Ben, Wagner M., Loy A.** (2011) *Barcoded Primers Used in Multiplex Amplicon Pyrosequencing Bias Amplification*. *Appl Environ Microbiol* 77:7846–7849
28. **Tedersoo L., Anslan S., Bahram M., et al.** (2015) *Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi*. *MycKeys* 10:1–43.
29. **Sze MA, Schloss PD** (2019) *The Impact of DNA Polymerase and Number of Rounds of Amplification in PCR on 16S rRNA Gene Sequence Data*. *mSphere* 4:e00163-19.
30. **Dunham I., Kundaje A., Aldred SF, et al.** (2012) *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. *Nature* 489:57–74
31. **Kerstens HHD, Crooijmans RPMA, Veenendaal A, et al.** (2009) *Large scale single nucleotide polymorphism discovery in unsequenced genomes using second generation high throughput sequencing technology: Applied to Turkey*. *BMC Genomics* 10:479
32. **Kijas JW, Townley D., Dalrymple BP, et al.** (2009) *A Genome Wide Survey of SNP Variation Reveals the Genetic Structure of Sheep Breeds*. *PLoS One* 4:e4668

33. **Wade CM, Giulotto E., Sigurdsson S., et al.** (2009) *Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse*. *Science* (80-) 326:865–867
34. **Wiedmann RT, Smith TPL, Nonneman DJ** (2008) *SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing*. *BMC Genet* 9:81
35. **Ripp F., Krombholz C., Liu Y., et al.** (2014) *All-Food-Seq (AFS): a quantifiable screen for species in biological samples by deep DNA sequencing*. *BMC Genomics* 15:639
36. **Liu Y., Ripp F., Koepfel R., et al.** (2017) *AFS: identification and quantification of species composition by metagenomic sequencing*. *Bioinformatics* 33:btw822
37. **Li H., Durbin R.** (2009) *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. *Bioinformatics* 25:1754–1760
38. **Altschul SF, Gish W., Miller W., et al.** (1990) *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol* 215:403–410
39. **Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., et al.** (2009) *BLAST+: Architecture and applications*. *BMC Bioinformatics* 10
40. **Hellmann SL, Ripp F., Bikar SE, et al.** (2020) *Identification and quantification of meat product ingredients by whole-genome metagenomics (All-Food-Seq)*. *Eur Food Res Technol* 246:193–200
41. **Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit** (2020) *Kenntlichmachung von „Döner Kebab“ und „ähnlichen“ Erzeugnissen bei loser Abgabe*. https://www.lgl.bayern.de/downloads/lebensmittel/doc/merkblatt_doener_kebab.pdf. Accessed 24 Feb 2020
42. **Norddeutscher Rundfunk** (2016) *Häufig Fleischbrät und Zusatzstoffe im Döner*. <https://www.ndr.de/ratgeber/verbraucher/Haeufig-Fleischbraet-und-Zusatzstoffe-im-Doener,doener164.html>. Accessed 24 Feb 2020
43. **LACROS** (2009) *The composition and labelling of doner kebabs*. Lacors, Local Authorities Coord Regul Serv
44. **Liuzzo G., Rossi R., Giacometti F., et al.** (2016) *Mislabelling of döner kebab sold in Italy*. *Ital J Food Saf* 5
45. **Europäisches Parlament** (2004) *Verordnung (EG) Nr. 853/2004*. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:DE:PDF>. Accessed 24 Feb 2020
46. **Deutsche See: Nematoden**. <https://www.deutschesee.de/wissen/fisch-ernaehrung/nematoden/>. Accessed 24 Feb 2020
47. **Kobus R., Abuín JM, Müller A., et al.** (2020) *A big data approach to metagenomics for All-Food-Sequencing*. *BMC Bioinformatics* 21:102
48. **Borch E., Kant-Muermans ML, Blixt Y.** (1996) *Bacterial spoilage of meat and cured meat products*. *Int J Food Microbiol* 33:103–120
49. **Gennari M., Parini M., Volpon D., Serio M.** (1992) *Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformation of Psychrobacter and Acinetobacter from fresh and spoiled meat, milk and cheese*. *Int J Food Microbiol* 15:61–75
50. **Greer GG, Dilts BD** (2002) *Control of Brochothrix thermosphacta spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages*. *J Food Prot* 65:861–863

51. **Moye ZD, Woolston J., Sulakvelidze A** (2018) *Bacteriophage applications for food production and processing*. *Viruses* 10
52. **National Human Genome Research Institute** (2001) *The Human Genome Project*. <https://www.genome.gov/human-genome-project>. Accessed 24 Feb 2020
53. **Lander ES, Linton LM, Birren B, et al.** (2001) *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature* 409:860–921
54. **G10K Consortium**: *Vertebrate Genomes Project*. <https://vertebrategenomesproject.org/>. Accessed 24 Feb 2020
55. **G10K Consortium**: *Earth BioGenome Project*. <https://genome10k.soe.ucsc.edu/earth-bio-genome/>. Accessed 24 Feb 2020
56. **Müller A., Hundt C., Hildebrandt A., et al.** (2017) *MetaCache: Context-aware classification of metagenomic reads using minhashing*. *Bioinformatics* 33:3740–3748
57. **StarSEQ**: *NGS Sequenzierung*. <https://www.starseq.com/>. Accessed 24 Feb 2020

7 Mit neuen molekularbiologischen Techniken genetisch veränderte Organismen: Regulatorischer Status und Entwicklung von Nachweismethoden

Christin-Kirsty Baillie, Patrick Guertler, Ulrich Busch, Ottmar Goerlich und Armin Baiker

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Landesinstitut Lebensmittel, Lebensmittelhygiene und Kosmetische Mittel (LH), Oberschleißheim

7.1 Zusammenfassung

Neue molekularbiologische Techniken (NMT) - oder oft auch synonym Gene Editing genannt - bezeichnen Verfahren, welche eine gezielte Veränderung der DNA an einer vordefinierten Stelle im Genom von Organismen ermöglichen (Podevin *et al.*, 2013). Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) führt derzeit ein Forschungsprojekt zu den NMT, ihren Anwendungsmöglichkeiten, zu potentiellen Risiken der NMT, zur rechtlichen Situation, sowie zur Entwicklung von Nachweisstrategien für genomeditierte Organismen (geGVO) durch. Die NMT unterscheiden sich von der klassischen Gentechnik dahingehend, dass bei der älteren Variante der Gen-Veränderung meist Fremd-DNA in einen Organismus über eine ungerichtete Transformation eingebracht wird. Gängige Transformationsmethoden in der grünen Biotechnologie sind z. B. die Partikel-Kanone oder eine *Agrobacterium tumefaciens* (neuere Bezeichnung: *Rhizobium radiobacter*) vermittelte Übertragung von DNA (Somssich, 2019). Der Integrationsort der neu eingebrachten DNA im Zielorganismus kann bei diesen klassischen Methoden nicht vorherbestimmt werden. Die präzise Veränderung durch NMT wird hingegen durch den Einsatz von Nukleasen ermöglicht, welche über Proteine oder RNA an eine bestimmte Stelle im Genom gelenkt werden, die man als *site directed nucleases* (SDN, deutsch: ortsspezifische Nukleasen) bezeichnet. Die Mutation der genomischen DNA erfolgt bei NMT nach der Erkennung der gewünschten DNA-Sequenz durch die SDN und den gezielten Schnitt des DNA-Doppelstrang, welcher anschließend durch zelleigene Mechanismen repariert wird. Auch in der Natur entstehen Doppelstrangbrüche, z. B. durch die Einwirkung von UV-Strahlung oder mutagener Substanzen, weshalb sich Reparaturmechanismen zum Schutz des Organismus vor Mutationen entwickelt haben. Bei diesen Reparaturmechanismen, dargestellt in **Abbildung 1**, handelt es sich um das *non-homologous end joining* (NHEJ, deutsch: nicht homologes Verbinden der Enden), und bei Vorhandensein einer DNA-Vorlage um die homologe Rekombination (HR). Im Zuge der NHEJ DNA-Reparatur können auf unterschiedliche Weise Mutationen auftreten, indem einzelne Basen entfernt (Deletion), hinzugefügt (Insertion) oder ausgetauscht werden (Basenaustausch) (siehe **Abbildung 1A**) (Hsu *et al.*, 2014).

Der HR Reparaturmechanismus funktioniert durch das Vorhandensein einer überlappenden DNA-Sequenz zu flankierenden Bereichen der SDN-Schnittstelle. Diese DNA dient als Vorlage für die Reparatur des Doppelstrangbruchs (Sonoda *et al.*, 2006).

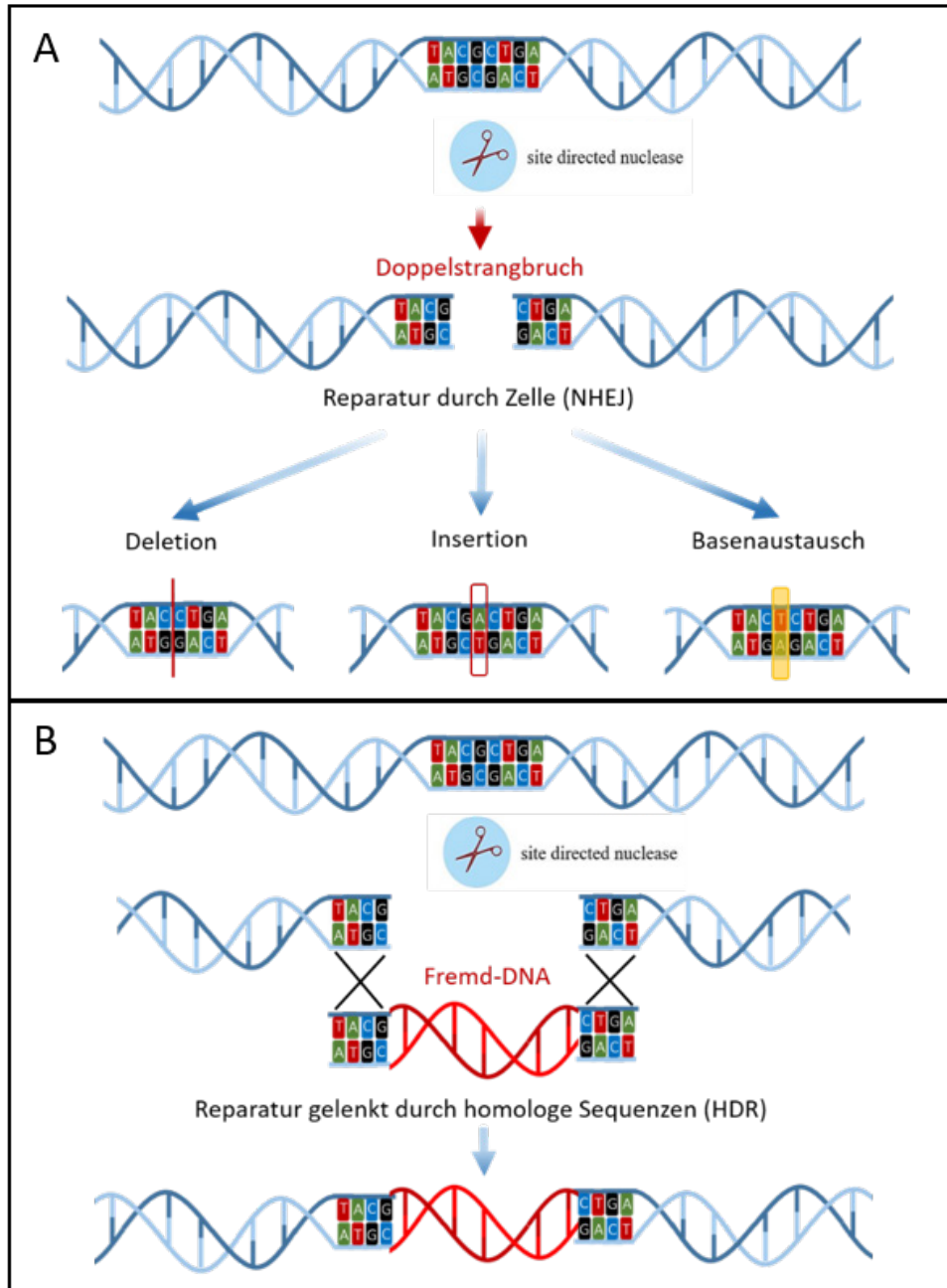


Abbildung 1: Reparaturmechanismen eines DNA-Doppelstrangbruchs nach Schnitt mittels SDN. (A) Bei dem Reparaturmechanismus des non homologues end-joining (NHEJ) werden gebrochene DNA Stränge ohne Vorlage (Matrize) von der Zelle repariert. Dabei können Mutationen von einer bis wenigen Base entstehen, wie die Deletion, Insertion oder der Basenaustausch im Vergleich zur nicht geschädigten DNA. **(B)** Der Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR) funktioniert bei Vorhandensein einer DNA-Sequenz als Vorlage (Matrize) mit flankierenden Bereichen zur der SDN-Schnittstelle, welche für die Reparatur verwendet wird. Die DNA Vorlage kann dadurch so aufgebaut sein, dass flankierte Fremd-DNA in den Organismus eingebracht werden kann.

Im Zuge von NMT/Gene Editing kann über den präzisen Schnitt der SDN und der bekannten Sequenzinformation eine DNA als Vorlage generiert werden, welche Fremd-DNA flankiert zu den überlappenden Bereichen in den Organismus einbaut (siehe **Abbildung 1B**). Basierend auf der Art der verwendeten SDN und den resultierenden genomischen DNA Veränderungen im Organismus werden verschiedene NMT wie folgt eingeteilt (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms, 2012):

Als **SDN-1-Technik** wird die Verwendung von zielgerichteten Nukleasen ohne die Zugabe von Fremd-DNA eingestuft. Dadurch wird der resultierende DNA-Doppelstrangbruch durch NHEJ repariert und es kann an einer definierten Stelle im Genom zu kleinen Mutationen wie z. B. Deletionen kommen. Die genaue Art der Veränderung kann dabei jedoch nicht beeinflusst werden, da sie zufällig bei der Reparatur auftritt. SDN-1 wird häufig genutzt, um Gene auszuschalten (*knock-out*), da solche unkontrollierten Veränderungen der DNA zu einer Verschiebung des DNA-Leserasters führen können.

Bei der **SDN-2-Technik** wird zusätzlich zu der ortsspezifischen Nuklease ein DNA-Fragment (Matrize) verwendet, das bis auf eine kleine Mutation (eine bis wenige Basen) identisch zu der Stelle im Pflanzengenom ist, an welcher der Doppelstrangbruch erzeugt wird. Der zelleigene Reparaturmechanismus HR nutzt nun dieses zugegebene DNA-Fragment als Vorlage und baut somit auch die vorgegebene Mutation an der gewünschten Stelle ins Pflanzengenom ein.

Die **SDN-3-Technik** unterscheidet sich von der SDN-2-Technik nur durch die Größe des eingebrachten DNA-Moleküls, welches als Vorlage zur Reparatur dient. Es können so auch mehrere tausend Basenpaare aus anderen Organismen eingebracht werden. Dadurch ist der resultierende gentechnisch veränderte Organismus nach SDN-3 Anwendung vergleichbar mit einem GVO der klassischen grünen Gentechnik, jedoch ist bei SDN-3 der Integrationsort der Fremd-DNA im Genom vordefiniert.

Neben der Verwendung von SDN gibt es auch Methoden, die ohne DNA-Doppelstrangbruch zu genetischen Veränderungen führen. Eine dieser Methoden ist die sogenannte *oligo-directed mutagenesis* Technik (ODM, deutsch: oligo-gelenkte Mutagenese). Dabei werden kurze, synthetisch hergestellte (meist einzelsträngige) DNA-Fragmente mit 20-200 Nukleotiden in einen Organismus eingebracht. Diese unterscheiden sich bis auf eine oder wenige Basen nicht vom jeweiligen Pflanzengenom. Das synthetische DNA-Fragment dient ebenfalls als Vorlage für den Einbau der gewünschten Modifikation, wobei die zellulären Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Gocal, 2015). Der sogenannte CIBUS-Raps ist ein prominentes Beispiel für eine mittels ODM genetisch veränderte Kulturpflanze (Ricroch und Hénard-Damave, 2016).

Die rechtlichen Regelungen von biologischen Techniken mit dem Ziel der Erbgutveränderung werden in der EU in der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG geregelt, die in den Mitgliedsstaaten in nationale Gesetze, wie in Deutschland dem Gentechnikgesetz (GenTG), umgesetzt ist.

Die Verwendung als Lebens- und Futtermittel und Vorgaben zur Kennzeichnung werden in der EU durch die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 geregelt. Besonders die Definition eines gentechnisch veränderten Organismus (GVO) und die Mutagenese-Verfahren, welche von der Regulierung innerhalb der EU ausgenommen sind, werden in der Freisetzungsrichtlinie von 2001 festgelegt. Seit der Entdeckung der NMT und der zunehmenden Anwendung dieser Verfahren besonders in der Forschung war unklar, wie die gezielten Modifikationen von genomischer DNA durch SDN rechtlich einzuschätzen sind. Am 25. Juli 2018 fälltte der Europäische Gerichtshof (EuGH) ein für Wissenschaftler überraschendes Urteil zu den NMT (Fallnummer C-528/16 und Pressemitteilung Nr. 111/18). Dieses Urteil legt fest, dass alle mittels Mutagenese erzeugten Organismen als GVO im Sinne der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG einzustufen sind. Ausgenommen sind dabei nur solche Mutagenese-Verfahren, die schon lange als ‚sicher‘ eingestuft sind und schon lange genutzt werden (z. B. Mutagenese mittels Bestrahlung oder mutagener Substanzen; siehe **Abbildung 2**). Dies beinhaltet in der Auslegung des EuGHs also nicht NMT, da diese erst seit 2012 verbreitet Anwendung finden und weitergehend nicht auf der Liste der ausgenommen Verfahren innerhalb der Freisetzungsrichtlinie aufgeführt werden.

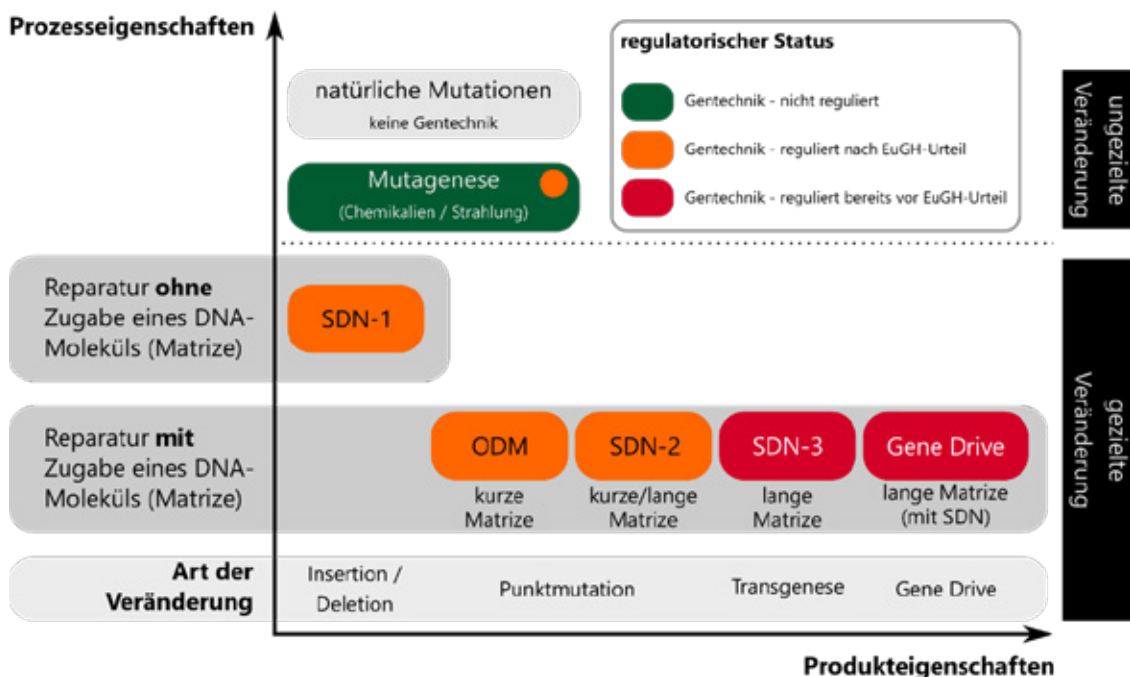


Abbildung 2: Regulatorischer Status der NMT Techniken SDN-1, SDN-2 und SDN-3 innerhalb der EU. In grün mit orangenem Punkt ist die Mutagenese angegeben, da diese nach der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG zwar GVO hervorbringt, diese jedoch von der Regulierung ausgenommen sind. In orange sind die SDN-1, SDN-2 und ODM Technik hinterlegt, da diese seit dem EuGH Urteil von 2018 klar als zu regulierende Verfahren eingestuft wurden. Die SDN-3 Technik und der Gene Drive in rot, waren schon vor dem EuGH Urteil klar als zu regulierende Verfahren eingestuft.

Aus Sicht der amtlichen Überwachung von gentechnisch veränderten Organismen und Produkten ergeben sich basierend auf dem EuGH Urteil große Herausforderungen. Durch die Entscheidung, dass auch SDN-1 und SDN-2 Techniken zu GVO führen, welche in der EU reguliert sind, müssen die so erzeugten genomeditierten gentechnisch veränderten Organismen (geGVO) in der EU ein Zulassungsverfahren für den Anbau und das Inverkehrbringen als Lebens- und Futtermittel durchlaufen. Im Zuge eines solchen Zulassungsverfahrens müssen vom Hersteller Informationen über den geGVO geliefert werden, die ausreichen, um vom geGVO ausgehende Risiken für Mensch und Umwelt abschätzen zu können. Zusätzlich müssen spezifische Nachweismethoden sowie geeignete Referenzmaterialien vom Hersteller bereitgestellt werden, um den geGVO in Saatgut, sowie Lebens- und Futtermitteln analysieren zu können. Nicht zugelassene GVO dürfen nicht auf den europäischen Markt gelangen (Null-Toleranz). Produkte, welche zugelassene GVO enthalten, müssen entsprechend den geltenden Kennzeichnungsregelungen gekennzeichnet werden. Eine Kennzeichnung ist nicht notwendig, wenn zugelassene GVO im Produkt zufällig oder technisch nicht vermeidbar mit einem Anteil von unter 0,9 % (GVO-Anteil) enthalten sind. In der Regel erfolgt der Nachweis von GVO mittels real-time PCR (qPCR) basierten Methoden und einer Nachweiskaskade über Screening-PCRs, welche häufig verwendete genetische Elemente nachweisen, und eventspezifische PCRs, welche eine genaue Identifizierung der GVO Linie ermöglichen (siehe **Abbildung 3**). Bei Produkten der klassischen grünen Gentechnik ist der geforderte eventspezifische Nachweis und somit eine genaue Identifikation des GVO im Rahmen der amtlichen Überwachung möglich. Dies ist der Fall durch die unterschiedlichen nicht steuerbaren Integrationsorte von Fremd-DNA bei klassischen Transformationsmethoden, selbst bei Verwendung der gleichen Elemente, wie dem häufig genutzten 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (cauliflower mosaic virus). Somit können Überwachungsbehörden durch ein qPCR basiertes Screening zuerst auf häufig verwendete Elemente untersuchen und dann bei eventuell positiven Befunden den genauen GVO durch eventspezifische qPCR Assays identifizieren.

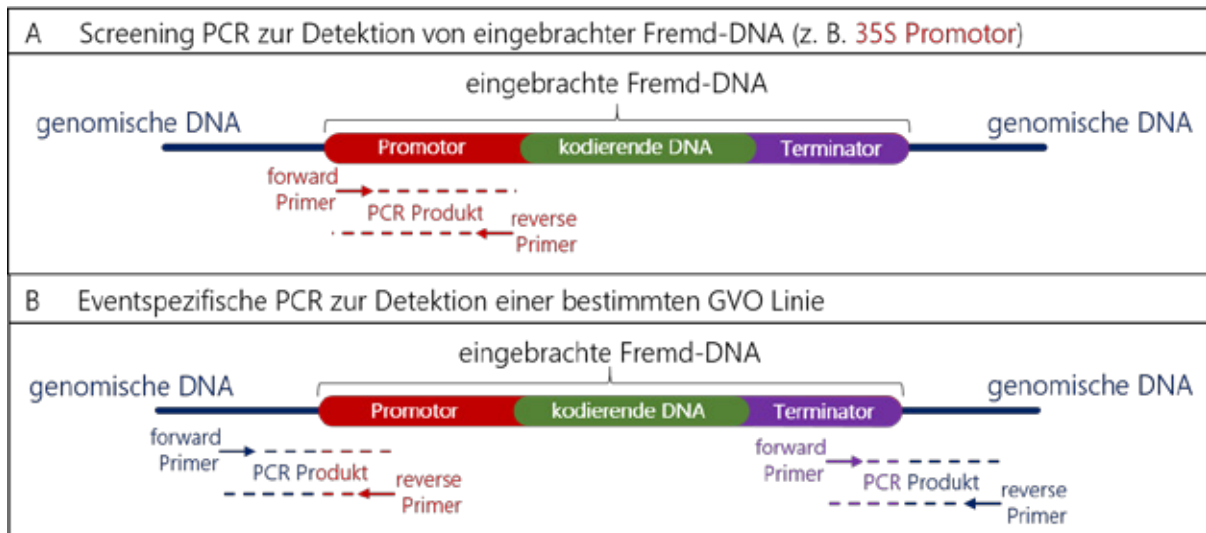


Abbildung 3: PCR basierte Nachweisstrategien für GVO. (A) Detektion von häufig verwendete genetische Elemente mittels PCR als erstes Screening auf GVO. Die verwendeten Primer binden nur innerhalb der eingebrachten Fremd-DNA in einem bestimmten Element (z. B. Promotoren oder Terminatoren). **(B)** Proben die mittels Screening PCR positiv getestet wurden, werden weiter mittels eventspezifischer PCR untersucht, welche die Zuordnung zu einzelnen Transformationsevents ermöglichen. Dabei binden die verwendeten Primer jeweils einmal in der genomischen DNA und einmal in der eingebrachten Fremd-DNA, so dass das PCR-Produkt den Integrationsort einschließt.

Dieses bestehende Überprüfungssystem wird jedoch mit durch NMT erzeugte geGVO nicht mehr möglich sein, da besonders bei SDN-1 und SDN-2 Techniken teilweise nur einzelne Punktmutationen entstehen. Diese Punktmutationen können nicht von natürlich entstandenen Mutationen oder Mutationen basierend auf von der Regulierung ausgenommenen Mutageneseverfahren unterschieden werden (Grohmann *et al.*, 2019). Der molekularbiologische Nachweis einer Punktmutation ist technisch aufwendiger als gängige qPCR Methoden in der Routineanalytik und nur möglich bei vorherbekannten Sequenzinformationen zur Mutationsstelle. Bei der Verwendung von Next Generation Sequencing (NGS) muss zusätzlich ein Referenzgenom des untersuchten Organismus, welches den unveränderten Zustand abbildet, zugänglich sein.

Als Beispiel einer mittels NMT gezüchteten Pflanze kann der Raps (*Brassica napus*) mit Event 5715 der Firma CIBUS herangezogen werden, in den USA wird dieser auch unter dem Namen SU-Canola geführt. Diese Rapssorte enthält durch die Verwendung der ODM Technik eine Punktmutation auf zwei Genen, welche zu einer Herbizidtoleranz gegen Imidazolinone und Sulfonylhurea führt. Durch die Komplexität des Rapsgenoms verfügt die Pflanze über mehrere Isoformen des betroffenen Gens *aceto-hydroxy acid synthase* (*ahas*, deutsch Acetolactat Synthase) (Rutledge *et al.*, 1991). Für die Analytik relevant sind die Gene *ahas-1*, *ahas-2* und *ahas-3*, wobei die Gene *ahas-1* und *ahas-3* die betroffenen Ziele der Punktmutation durch die Firma Cibus sind.

Das Gen *ahas-2* weist von der DNA-Sequenz weniger Homologien auf als die beiden Zielgene und wird zeitlich begrenzt und gewebsspezifisch nur im Rapsamen abgelesen (Ouellet *et al.*, 1992). Das AHAS-Enzym katalysiert den ersten Schritt der Aminosäuresynthese von Leucin und Valin und ist für das Überleben der Pflanze somit elementar. Eine Inhibierung des Enzyms durch Herbizide führt deshalb zum Absterben der Pflanze. Durch die eingeführte Punktmutation können die Herbizide jedoch nicht am Enzym binden, somit findet keine Hemmung statt und die Pflanze ist herbizidtolerant, weshalb die Herbizide gegen Unkräuter im Anbau verwendet werden können, ohne das Wachstum des mutierten Rapses zu beeinträchtigen (Tan *et al.*, 2005).

Da im Falle des CIBUS-Raps durch die Sequenzinformationen aus dem US Patentdaten (Schopke *et al.*, 2009) die veränderte DNA-Base der zwei betroffenen Gene bekannt ist, wird im Zuge des Forschungsprojektes am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, in Kooperation mit anderen Landesämtern, an einer Nachweismethode für den CIBUS-Raps gearbeitet. Dies soll einen ersten Einblick geben, mit welchen Kosten und apparativem und eventuell personellem Mehraufwand bei der routinemäßigen Überwachung von geGVO gerechnet werden muss. Weitergehend soll auch geklärt werden, ob ein Nachweis für eine Punktmutation eine vergleichbare Sensitivität wie ein konventioneller Nachweis für klassische GVO aufweisen kann.

Um Punktmutationen nachweisen zu können, kommen mehrere Verfahren in Frage: z. B. die Amplifikation des DNA Abschnitts mittels PCR mit anschließender Verwendung einer T7 Endonuklease I in Kombination mit Kapillarelektrophorese (T7-Endonuklease Assay), Next Generation Sequencing (NGS) oder rh-AMP PCR. Die rh-AMP PCR wurde durch die Firma IDT entwickelt, patentiert und wird für die Genotypisierung von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) z. B. in der Krebsdiagnostik angewandt (Dobosy *et al.*, 2011 und Beltz *et al.*, 2018). In **Abbildung 4** ist das Funktionsprinzip dieser Methode schematisch dargestellt, welche ein zweites Enzym - die RNase H2 - zusätzlich zur Polymerase und Primern mit speziellen Aufbau im Rahmen einer qPCR verwendet.

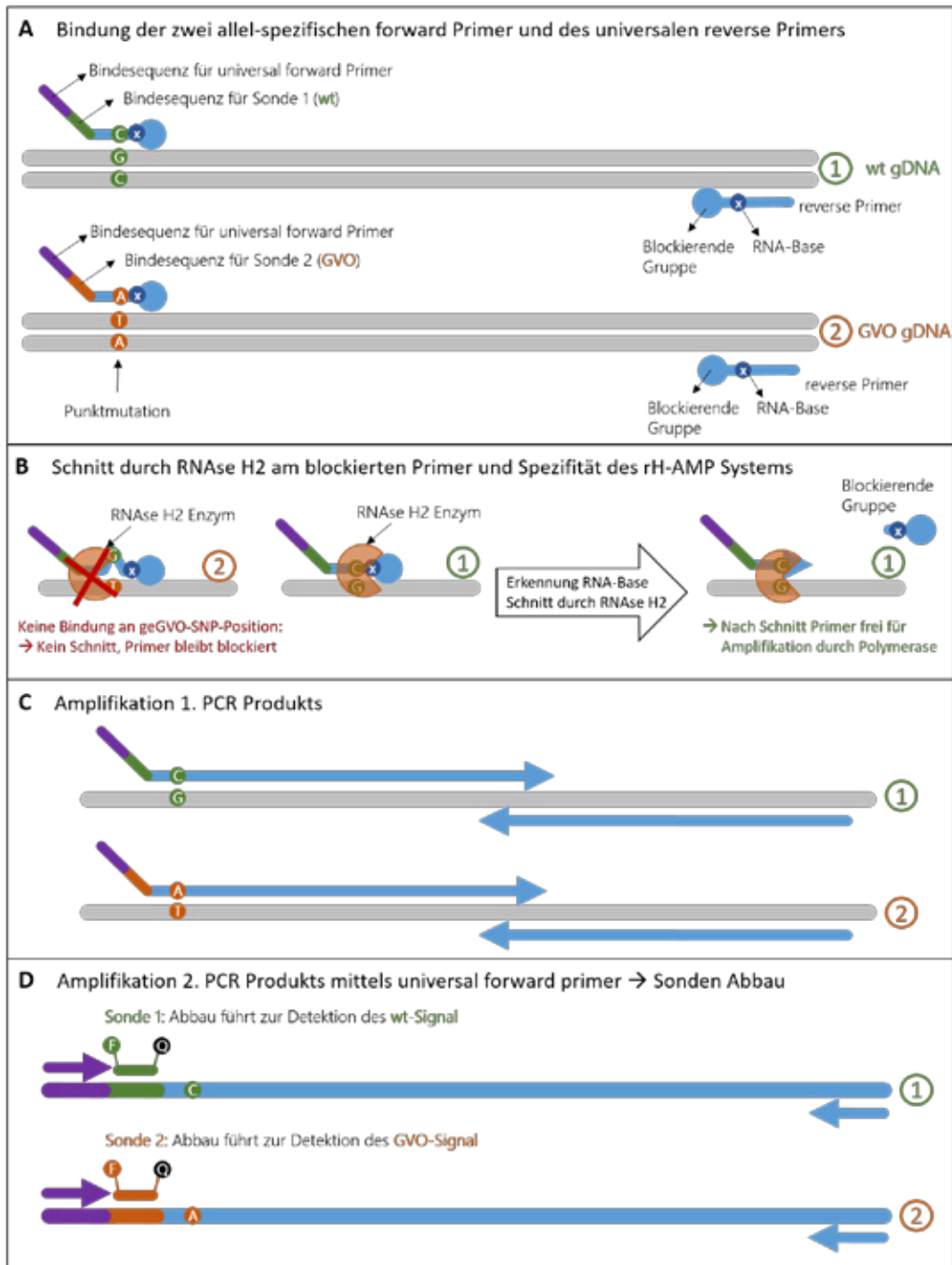


Abbildung 4: Funktionsprinzip der rh-AMP PCR zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms (SNP). (A) Verwendung eines universalen reversen Primers, die forward-Primer sind allel-spezifisch und decken die SNP-Position ab (Wildtyp (wt) = grün oder GVO = orange). Alle Primer sind zu Beginn blockiert, so dass keine Amplifikation durch eine Polymerase stattfinden kann. (B) Die Spezifität des Systems ergibt sich durch die RNase H2, welche zusätzlich in den PCR-Mix enthalten ist. Die RNase H2 schneidet an der eingebauten RNA-Base im Primer, wenn alle Nukleotide zu 100% passen. Nach dem Schnitt kann der Primer von der Polymerase zum Amplifizieren verwendet werden. Bei einem Mismatch zwischen wt-forward Primer und GVO-DNA Template bleibt der Primer blockiert. (C) Im ersten Amplifikationsschritt werden durch die beiden Forward-Primer die überhängenden Sondensequenzen und eine Bindesequenz für einen universalen forward-Primer ins PCR-Produkt eingebaut. (D) Im zweiten Amplifikationsschritt erfolgt die PCR durch die beiden universal-Primer, die beiden Sonden des Systems binden und werden durch die 3'-5'-Exonuklease Aktivität der Polymerase abgebaut, was als fluoreszierendes Signal detektierbar ist, durch die räumliche Trennung des Fluorochroms (F) und des Quenchers (Q).

Die RNase H2, ursprünglich isoliert aus der hyperthermophilen Archae *Pyrococcus abyssi*, ist eine Endo-Ribonuklease, die Fehlpaarungen zwischen RNA-DNA Heteroduplexsträngen erkennt und die RNA-Base zielgenau herausschneidet. Durch den Schnitt wird ein freies 3'-OH Ende am DNA-Strang hinterlassen, welches direkt von der Polymerase für weitere Amplifikation genutzt werden kann. Das Enzym ist hoch spezifisch und schneidet weder einzelsträngige RNA noch einzelsträngige oder doppelsträngige DNA. Durch den Ursprung aus einem hyperthermophilen Organismus ist der optimale Reaktionstemperaturbereich der RNase H2 mit 60-80°C kompatibel mit der Annealing- und Elongations-Phase von DNA-Polymerasen während einer Standard-PCR. Der Aufbau der Primer ist der Schlüssel für den Nachweis von SNPs mittels der rh-AMP Methode. Die Primer werden so designt, dass direkt hinter der SNP-Position eine RNA-Base eingebaut wird, gefolgt von einer chemischen Gruppe, welche die Amplifikation blockiert. Dadurch werden ungeschnittene Primer nicht von der Polymerase verlängert. Die RNase H2 ist besonders sensibel für Basen-Fehlpaarungen vor der RNA-Base, welche herausgeschnitten wird, so dass nur, wenn sich der Primer zu 100% passend an die Zielsequenz anlagert, der Schnitt erfolgt. Zusätzlich wird den allelspezifischen Primern eine DNA-Sequenz angehängt, welche als Bindestelle für eine Sonde fungiert und auch eine Bindesequenz für einen universellen forward-Primer enthält. Im ersten Schritt der rh-AMP-PCR binden die jeweiligen allelspezifischen forward Primer und der reverse universal Primer (siehe **Abbildung 4A**) und es werden nach dem Erkennen der eingebauten RNA-Base und dem spezifischen Schnitt durch die RNase H2, zwei spezifische PCR-Produkte gebildet, eines für die wt-SNP-Base und eines für die GVO-SNP-Base. Im zweiten Schritt lagern sich durch die angehängten DNA-Sequenzen aus dem allelspezifischen-Primern die universellen forward-Primer und die entsprechenden Sonden-Sequenzen am PCR-Produkt an und es erfolgt ein Abbau der entsprechenden Sonden. Durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase werden die Fluorochrome von den Quenchern in der Sonde getrennt, was zur Detektion von wt- und GVO-Fluoreszenz-Signalen führt. Durch diese Methode wird das Problem gelöst, dass normale Primer in qPCR Nachweisen bei nur einer Punktmutation nicht ausreichend spezifisch binden können. Dies führt bei Standard qPCRs dazu, dass ohne geblockte Primer und RNase H2 Verwendung beide DNA-Stellen (wt und geGVO) gleichzeitig amplifiziert werden und somit keine Unterscheidung möglich ist. Im Zuge der rh-AMP PCR werden die nachweisenden Sonden jedoch über die angehängten Sequenzen der allelspezifischen Primer eingebracht, weshalb sie sich stark voneinander unterscheiden und einen Nachweis ermöglichen.

7.2 Literatur

- Beltz, K., Tsang, D., Wang, J., Rose, S., Bao, Y., Wang, Y., ... and Gunderson, K.** (2018): *A High-Performing and Cost-Effective SNP Genotyping Method Using rhPCR and Universal Reporters*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 9 (09), 497
- Dobosy, J. R., Rose, S. D., Beltz, K. R., Rupp, S. M., Powers, K. M., Behlke, M. A., & Walder, J. A.** (2011): *RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers*. *BMC biotechnology* 11 (1), 80
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)** (2012). *Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function*. *EFSA Journal* 10 (10), 2943
- Gocal, G.** (2015): *Non-transgenic trait development in crop plants using oligo-directed mutagenesis: Cibus' Rapid Trait Development System*. NABC Report 26
- Grohmann, L., Keilwagen, J., Duensing, N., Dagand, E., Hartung, F., Wilhelm, R., ... and Sprink, T.** (2019): *Detection and identification of genome editing in plants: challenges and opportunities*. *Frontiers in Plant Science* 10
- Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F.** (2014): *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. *Cell* 157 (6), 1262-1278
- Ouellet, T., Rutledge, R. G., and Miki, B. L.** (1992): *Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of Brassica napus have divergent patterns of expression*. *The Plant Journal* 2 (3), 321-330
- Podevin, N., Davies, H. V., Hartung, F., Nogué, F., and Casacuberta, J. M.** (2013): *Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding*. *Trends Biotechnol.* 31, 375–383
- Ricroch, A. E., and Hénard-Damave, M. C.** (2016): *Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges*. *Critical reviews in biotechnology* 36 (4), 675-690
- Rutledge, R. G., Ouellet, T., Hattori, J., and Miki, B. L.** (1991): *Molecular characterization and genetic origin of the Brassica napus acetohydroxyacid synthase multigene family*. *Molecular and General Genetics* 229 (1), 31-40
- Schopke, C., Gocal, G. F., Walker, K., and Beetham, P. R.** (2009): U.S. Patent Application No. 12/245,610
- Somssich, M.** (2019): *A short history of plant transformation* (No. e27556v2). PeerJ Preprints
- Sonoda, E., Hochegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., and Takeda, S.** (2006): *Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair*. *DNA repair* 5 (9-10), 1021-1029
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., and Shaner, D. L.** (2005): *Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future*. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 61 (3), 246-257

8 Entwicklungsstand der Synthetischen Biologie und Strategien für die analytische Überwachung

Wolfram Volkwein, Ulrich Busch und Armin Baiker

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Landesinstitut Lebensmittel, Lebensmittelhygiene und Kosmetische Mittel (LH), Oberschleißheim

8.1 Einleitung

Bei der Synthetischen Biologie (kurz: SynBio) handelt es sich um einen interdisziplinären Forschungszweig in dem verschiedenste Bereiche der Biowissenschaften, Chemie, Physik, Informationstechnik und Ingenieurwissenschaften miteinander kombiniert werden. Somit findet in der SynBio ein Brückenschlag zwischen den unterschiedlichen Lebens- und Technikwissenschaften statt, der zu einer Technologisierung der Biologie führt. Durch diese Technologisierung der einzelnen Bereiche soll das gemeinsame Ziel erreicht werden bereits bestehende biologische Systeme zu verändern, sie mit neuen Komponenten zu kombinieren oder gar von Grund auf neu zu erschaffen. Auf diese Weise soll die SynBio wesentlich zum Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung beitragen und zu neuen biotechnologischen Anwendungen in der Industrie führen.

8.2 Forschungsgebiete der Synthetischen Biologie

Ungefähr seit der Jahrtausendwende findet der Begriff „Synthetische Biologie“ in der wissenschaftlichen Literatur immer öfter Verwendung und es wurden in den letzten Jahren zahlreiche Stellungnahmen hierzu veröffentlicht. Unter anderem vom Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag (TAB) [1], der Convention on Biological Diversity (CBD) [2], der EU-Kommission [3-5] und der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) [6, 7]. In diesen Stellungnahmen wurde versucht, eine allgemeingültige Definition der SynBio zu finden, was jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gelang. Die EU Kommission stellt hierzu in ihrer Stellungnahme aus dem Jahr 2014 [3] fest, dass eine genaue Abgrenzung zwischen Gentechnik und Synthetischer Biologie auf Basis von quantifizierbaren und tatsächlich messbaren Werten, sowie die Definition von Inklusions- und Exklusionskriterien, nicht möglich ist. Um der Synthetischen Biologie trotz der fehlenden, allgemein gültigen Definition einen Rahmen zu geben, wird diese oftmals über die Zuordnung und Einteilung ihrer Forschungsbereiche definiert. In **Abbildung 1** werden im folgenden drei Einteilungsmöglichkeiten der Forschungsfelder der Synthetischen Biologie vorgestellt.

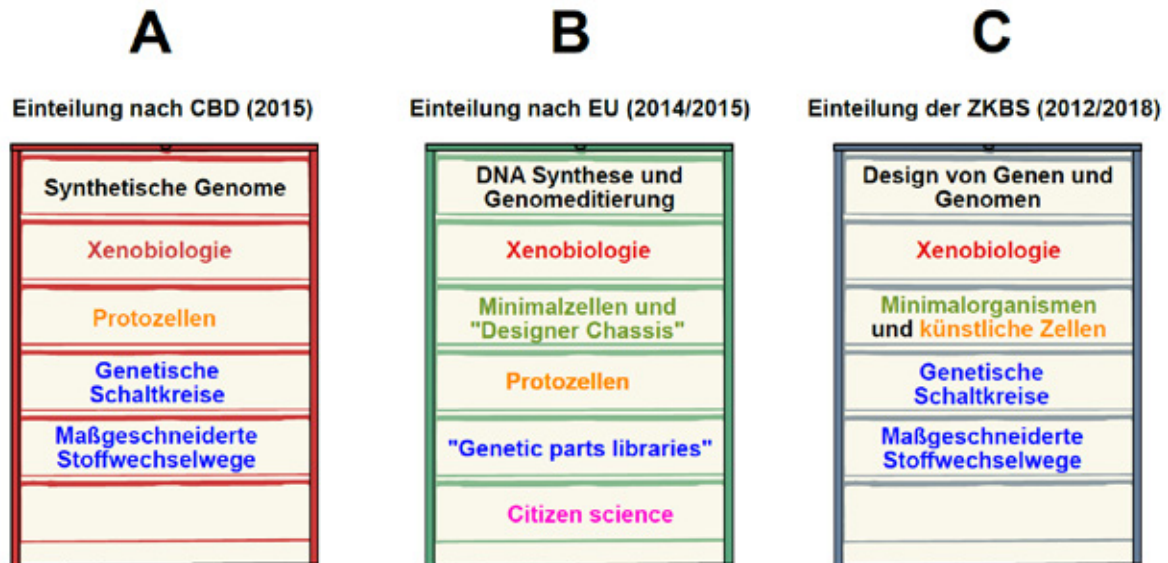


Abbildung 1: Einteilung der Forschungsfelder der Synthetischen Biologie gemäß verschiedener Stellungnahmen: (A) Forschungsfelder welche laut der Convention on Biological Diversity (CBD) der Synthetischen Biologie zuzuordnen sind [2]. (B) Forschungsfelder welche laut der EU Kommission der Synthetischen Biologie zuzuordnen sind [3-5]. Hervorzuheben ist hier das die EU Kommission den Bereich „Citizen Science“ als Trend in der Synthetischen Biologie definiert. (C) Forschungsfelder welche laut der ZKBS der Synthetischen Biologie zuzuordnen sind [6, 7].

Im Folgenden werden die Forschungsgebiete der Synthetischen Biologie anhand der Einteilung der ZKBS [6, 7] kurz vorgestellt:

8.2.1 Design und Synthese von Genen und Genomen

Die Gensynthese ist eine Schlüsseltechnologie der Synthetischen Biologie. Die Fortschritte in dieser Technologie haben die Erzeugung gezielter Mutationen stark vereinfacht. Auch bilden sie die Grundlage für die de novo Konstruktion (chemische Synthese) kompletter Genome. Beispiele hierfür sind die Synthese des Poliovirus [8] oder des bakteriellen Genoms von *Mycoplasma mycoides* [9, 10]. Zwischenzeitlich ist auch die Synthese eines kompletten eukaryotischen Hefechromosoms [11] sowie die Konstruktion eines synthetischen *Escherichia coli* Genoms [12] gelungen.

8.2.2 Design von maßgeschneiderten Stoffwechselwegen

Unter dem Design maßgeschneiderter Stoffwechselwege versteht man die Anwendung genetischer Elemente und Schaltkreise zur Entwicklung maßgeschneiderter Stoffwechselwege innerhalb von Modell- oder Produktionsorganismen (siehe hierzu auch MacDonald & Daens [13]). Ein prominentes Beispiel hierfür ist die semisynthetische Herstellung des Antimalaria Medikaments Artemisinin. Bei Artemisinin handelt sich um das weltweit meist genutzte Standardmedikament gegen Malaria.

Bevor Artemisinin mit Hilfe der SynBio produziert werden konnte, musste es in zeit- und kostenintensiven Verfahren aus dem „Einjährigen Beifuß“ extrahiert [14] oder chemisch synthetisiert werden [15, 16]. Die Synthetische Biologie ermöglicht nun eine effizientere Möglichkeit das Medikament herzustellen und somit den Preis und die Verfügbarkeit des Medikaments zu stabilisieren [17]. Hierfür wurde ein maßgeschneiderter Stoffwechselweg zunächst in *E. coli* [18] und später auch in Hefen eingeführt [19, 20], der im Biosyntheseweg ein Ensemble aus einem Dutzend Genen aus Beifußpflanzen, Bakterien und Hefen vereint. Die Mikroorganismen produzieren so eine Vorstufe von Artemisinin, die Artemisinsäure, welche anschließend chemisch in Artemisinin umgewandelt werden kann.

8.2.3 Xenobiologie

In der Xenobiologie werden biologische Systeme konstruiert, die „unnatürliche“ Bausteine beinhalten. Zu diesen Bausteinen zählen zum Beispiel unnatürliche Aminosäuren. Die Verwendung dieser unnatürlichen Aminosäuren erlaubt Proteine mit neuen Eigenschaften zu versehen. So können z.B. Proteine positionsspezifisch mit posttranslationalen Modifikationen, photoreaktiven Gruppen oder spektroskopischen Sonden ausgestattet werden [21]. Neben unnatürlichen Aminosäuren werden in der Xenobiologie auch Xeno-Nukleinsäuren (XNA) verwendet [22]. Diese XNAs werden häufig genutzt, um funktionale Nukleinsäuren wie z.B. Aptamere [23] oder Nukleinsäure basierte Enzyme [22, 24] herzustellen. Ein weiteres Anwendungsgebiet der unnatürlichen Aminosäuren und der Xeno-Nukleinsäuren ist darüber hinaus deren Nutzung als Biocontainment System. Hierbei werden Organismen erzeugt, die nur in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäuren bzw. der Xeno-Nukleinsäuren lebensfähig und somit von diesen abhängig sind [25, 26]. Durch die Anwendung dieser Technik eröffnen sich unter anderem auch die Möglichkeit ein verbessertes Biocontainment und somit eine erhöhte Sicherheit im Bereich der SynBio zu erreichen.

8.2.4 Erzeugung von Minimalorganismen und Schaffung künstlicher Zellen

Grundlegend an dem Konzept der Minimalzellen ist die Reduktion des Genoms auf ein Minimalgenom, also der Gesamtheit an Genen die für den Grundstoffwechsel eines Organismus minimal benötigt werden und somit essentiell für diesen sind. Um dieses Ziel zu erreichen wird der sogenannten „top-down“ Ansatz verfolgt, bei dem bereits existierende Genome auf essenzielle Lebensfunktionen reduziert werden [27]. Alternativ hierzu können Genome auch chemisch synthetisiert werden. Bei der Synthese werden jedoch Gene ausgespart die als nicht lebensnotwendig für den Organismus angesehen werden. Anschließend wird das Genom in einen bereits bestehenden Organismus „transplantiert“, wobei die Transplantation so gesteuert wird das das synthetische Genom das bereits bestehende Genom verdrängt. [9, 10].

Der genau entgegengesetzte Ansatz wird bei der Entwicklung von Protozellen verfolgt. Protozellen sind „am Reißbrett“ entworfene Zellen, welche de novo aus nicht-lebendem Material hergestellt werden und möglichst viele Eigenschaften lebender Zellen aufweisen sollen. Das langfristige Ziel dieses „bottom up“ Ansatzes ist es, einen sich selbst-replizierenden künstlichen Organismus zu schaffen. Dieser könnte dann, genauso wie die Minimalzellen, als „Designer-Chassis“ genutzt werden um verschiedenste Stoffwechselwege unterzubringen, welche wiederum nützliche Substanzen wie z.B. Medikamente und Biokraftstoffe produzieren könnten. Des Weiteren würde ein stark vereinfachtes Zellmodell erste Einblicke in grundlegende Fragenstellungen geben, wie z.B. aus unbelebter Materie Leben entstehen kann [28]. Derzeit ist es allerdings noch nicht möglich, sich-selbst replizierende künstliche Zellen / Protozellen zu generieren.

8.2.5 Konzeption genetischer Schaltkreise

Ähnlich wie in der Informatik sollen z.B. in lebenden Systemen (in vivo) oder im Reagenzglas (in vitro) genetische Schaltkreise geschaffen werden, deren Bauteile auf vorhersagbare Weise miteinander interagieren und auf definierte Inputs definierte Outputs liefern. Dabei werden Komponenten wie Regulatoren, Aktivatoren oder Repressoren aus verschiedensten Organismen frei miteinander kombiniert. Beispiele hierfür ist unter anderem die Entwicklungen eines synthetischen Kreislaufes der 20 % effektiver CO₂ fixiert als der Calvin Zyklus von Pflanzen [29], die Entwicklung eines Biomedizinischen Tattoos mit dessen Hilfe Hyperkalzämie assoziierte Krebsarten detektiert werden können [30] oder in vitro Sensoren welche die Detektion von Schwermetallen in Wasser ermöglichen [31].

8.2.6 Trend in der Synthetischen Biologie: Citizen science

Des Weiteren wird der Bereich „Citizen science“ oder Do-It-Yourself-Biologie (DIY-Biologie) in den Stellungnahmen der EU als Trend in der Synthetischen Biologie definiert [4, 5]. DIY-Biologen sind Personen, die biologische Experimente außerhalb etablierter Bereiche als „Hobby“ durchführen. Sie haben dabei in der Regel nur eine geringe oder gar keine naturwissenschaftliche Ausbildung. Mittlerweile sind auch sogenannte DIY-Kits im Internet bestellbar. Mit Hilfe dieser Kits wäre es möglich, gentechnische Experimente auch Zuhause durchzuführen. Laut Gentechnikgesetz (§ 8 Abs. 1 Satz 1) dürfen gentechnischen Arbeiten in Deutschland jedoch nur innerhalb einer gentechnischen Anlage durchgeführt werden.

8.3 Regulierung der Synthetischen Biologie in Deutschland

Bislang gibt es weder in Deutschland noch in Europa eine spezifische gesetzliche Regelung für die Synthetische Biologie. Eine Regulierung findet in Deutschland derzeit vor allem über das Gentechnik-Gesetz (GenTG) statt. Um von diesem erfasst zu werden, muss ein durch Synthetische Biologie hergestellter Organismus unter die Definition eines gentechnisch veränderten Organismus (GVO) fallen. Ein GVO wird im GenTG als „Organismus, mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt“ definiert. In Deutschland können alle Organismen, die derzeit mithilfe der Synthetischen Biologie erzeugt werden, durch das GenTG bewertet und eingestuft werden [7]. Sollten in Zukunft jedoch Protozellen entwickelt werden, die selbstständig replizieren, so wären diese nicht vom GenTG abgedeckt und bedürften eventuell einer anderen Regulierung [7]. Aufgrund der dynamischen und vielfältigen Entwicklung der SynBio hat die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS) den Auftrag erhalten, ein wissenschaftliches Monitoring auf nationaler und internationaler Ebene durchzuführen und die aktuellen Entwicklungen der SynBio kritisch zu begleiten. Die aktuellen Ergebnisse dieser Monitorings sind für jedermann einsehbar und online abrufbar auf der Internetseite der ZKBS (www.zkbs-online.de) veröffentlicht.

8.4 Strategien zur Analytischen Überwachung

Um die Entwicklungen in der SynBio auch analytisch zu begleiten, wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) entsprechende Nachweisstrategien entwickelt und Referenzmaterialien von SynBio-Organismen beschafft. Einige der entwickelten Nachweisstrategien sind im Folgenden kurz dargestellt:

8.4.1 Nachweis von Protozellen

Ein erster notwendiger Schritt bei der Generierung von Protozellen ist die *in vitro* Rekonstruktion der Zellteilung. Um in Zukunft eine solche zu ermöglichen, sollen unter anderem die in *E. coli* beteiligten Zellteilungsproteine MinC, MinD, MinE und FtsZ Verwendung finden [28, 32, 33].

Proben dieser Proteine konnten vom LGL beschafft und erfolgreich mittels MALDI-TOF nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden auch die Plasmide, welche die Gene für die Zellteilungsproteine tragen untersucht und deren Nukleinsäuresequenz bestätigt. Somit können am LGL potentielle, für die Zellteilung einer Protozelle notwendigen Bestandteile sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene nachgewiesen werden.

8.4.2 Nachweis von Minimalorganismen

Die Herstellung von Minimalorganismen ist durch zwei Hauptinteressen gekennzeichnet:

- Zum einen soll die Reduzierung des Genoms Aufschlüsse über den minimal erforderlichen Satz an Genen liefern, welche ein lebensfähiger Organismus benötigt.
- Zum anderen wird eine Reduktion des Genoms genutzt, um die Eigenschaften von industriell genutzten Organismen zu verbessern. Dadurch können z.B. bei der industriellen Produktion störende Proteasen und Nukleasen entfernt [34], oder die Produktion gewünschter Zielproteine gesteigert werden [35].

Aus beiden oben genannten Bereichen wurden Referenzmaterialien beschafft und am LGL untersucht. Zum einen handelte es sich um genomische DNA des vom J. Craig Venter Institut entwickelten Stamm JCV-syn3.0 [10] welcher auf dem Genom des Bakteriums *Mycoplasma mycoides* basiert [9]. Zum anderen um den auf *Vibrio natriegens* basierenden Proteinproduktionsstamm Vmax™ [36]. Beide Bakterienstämme konnten mit den am LGL entwickelten Methoden eindeutig identifiziert werden. In beiden Fällen wurden für die jeweiligen Organismen spezifische Bereiche mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert, was eine eindeutige Zuordnung ermöglichte.

8.4.3 Nachweis Xenobiologie

Im Bereich der Xenobiologie findet das Amber Suppression System [37] zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren breite Anwendung. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich unnatürliche Aminosäuren ortsspezifisch in Proteine einzubauen und somit die daraus resultierenden Proteine mit neuen Funktionen auszustatten [21, 38]. Hierfür wird meist ein hierfür speziell entwickelter *E. coli* Stamm (*E. coli* C321.ΔA.exp [39]) verwendet der dahingehend optimiert wurde, dass der Einbau der synthetischen Aminosäure möglichst effizient erfolgt. Hierzu wurden in diesem Stamm, unter anderem, alle im Genom enthaltenen 321 Amber-Stopcodons durch alternative Stopcodons ersetzt. Der entsprechende *E. coli* Stamm wurde als Referenzmaterial beschafft und am LGL untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser mit den am LGL entwickelten Methoden eindeutig identifiziert werden kann.

8.4.4 Untersuchung von DIY Biologie Kits

Zwei verschiedene DIY-Biologie Kits wurden als Referenzmaterial beschafft und am LGL untersucht:

Citizen Science DIY- Kit: DIY CRISPR GENOME ENGINEERING (The Odin)

Hierbei handelt es sich um ein DIY-Gentechnik-Kit der US-Firma "The Odin". Der "DIY Bacterial Gene Engineering CRISPR Kit" ermöglicht (laut Herstellerangaben) die Durchführung eines einfachen CRISPR/Cas9-Experiments zur Einführung einer Streptomycin-Resistenz in das Genom von *E. coli*.

Im Zuge der Analysen wurde die Identität der im Kit enthaltenen Nucleinsäuren und Bakterien überprüft. Bei den im Kit enthaltenen Empfängerbakterien handelte es sich nicht um *E. coli* HME63, sondern um fakultativ pathogene Bakterien der Risikogruppe 2. Das LGL informierte darüber die Öffentlichkeit sowie die zuständigen Behörden auf Bundes- und EU-Ebene. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass das Genomeditierungsexperiment auch mit dem vorgesehenen *E. coli* Stamm HME63 nicht zu dem Ergebnis führt, das im Kit beschrieben ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beschriebenen Experimenten mit den pathogenen Mikroorganismen um gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 handelt, die nach Gentechnikrecht in einer gentechnischen S2-Anlage durchgeführt werden müssen.

An dieser Stelle sollte Erwähnung finden, dass der eingetragene Verein „Science Bridge“ ein ebenfalls auf CRISPR/Cas9 basiertes Genomeditierungsexperiment entwickelt hat und dieses interessierten Schülerlaboratorien zur Verfügung stellt:

<https://sciencebridge.net/ANGEBOTE/EXPERIMENTE/AUS-BLAU-MACH-WEISS-DIE-GENSCHERE-CRISPR-CAS-IN-AKTION/>

Citizen Science DIY- Kit: Canvas Kit™ - Create Living Paintings™ (Amino Labs)

Hierbei handelte es sich um ein Kit der kanadischen Firma "Amino Labs". Dieses Kit soll es ermöglichen, ein einfaches Gentechnik Experiment durchzuführen. Dabei sollen Plasmide, welche für Farbproteine codieren, in einen *E. coli* K12 Sicherheitsstamm eingebracht werden. Werden diese Bakterien im Anschluss auf einem Nährboden ausgestrichen, bilden sich farbige Kolonien, wodurch sich quasi „malen“ lässt (siehe **Abbildung 2**).

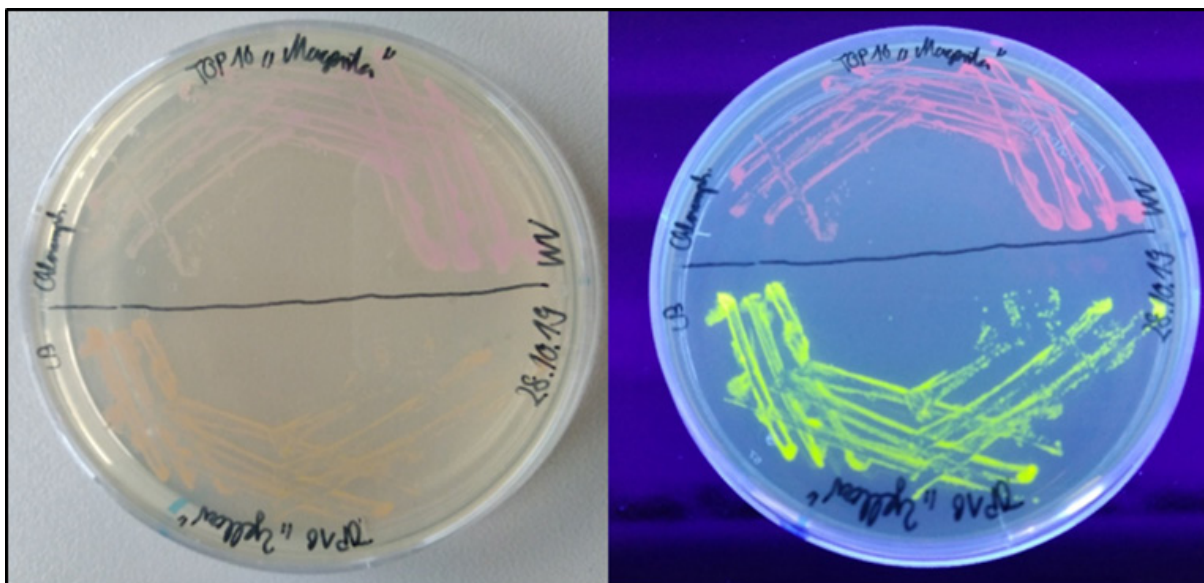


Abbildung 2: Bakterienmalkasten der Firma „Amino Labs“: Bild links: Auf Nährboden ausgestrichene Bakterien, welche mit Plasmiden transformiert wurden, die wiederum für verschiedene Farbproteine codieren. Bild rechts: Platte aus dem linken Bild unter UV Licht

Die Analyse der einzelnen Kit-Komponenten (Plasmide und Bakterienkultur) am LGL ergab, dass die Herstellerangaben korrekt waren, und dass das vom Hersteller angegebene Experiment mit dem Kit durchgeführt werden kann. Bemerkenswert war, dass der Kit erst ausgeliefert wurde, nachdem das LGL nachgewiesen hatte, über die entsprechenden Genehmigungen mit gentechnischen Arbeiten zu verfügen. Außerdem wird in der beigefügten Kit-Anleitung darauf hingewiesen, dass ggf. spezifische nationale Regulierungen hinsichtlich der Durchführung des Kits existieren und dass hier unter Umständen eine Rücksprache mit den lokalen Behörden erforderlich sei.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die ZKBS ein Fokusthema zur „Do-it-yourself-Biologie - Gentechnik für jedermann?“ auf ihrer Internet Seite veröffentlicht hat. Auf dieser werden unter nachfolgenden Link unter anderem auf die gesetzlichen Rahmenbedingungen in Deutschland bezüglich dieses Themas eingegangen:

http://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/03_Fokusthemen/DIY-Biologie/DIY-Biologie_node.html;jsessionid=5A8DF5895C1868ADA4BF5E7E84DE8B47.2_cid332

8.5 Literatur

1. **Arnold Sauter, Steffen Albrecht, Davy van Doren, Harald König, Thomas Reiß, Rüdiger Trojok, Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag (TAB)** (2015): *Synthetische Biologie – die nächste Stufe der Bio- und Gentechnologie*. Arbeitsbericht Nr. 164
2. **Secretariat of the Convention on Biological Diversity** (2015): *Synthetic biology*. Montreal, Technical Series No. 82, 118 pages
3. **European Commission: Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)** (2014): *Opinion on Synthetic Biology I Definition*. ISBN 978-92-79-30136-0
4. **European Commission: Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)** (2015): *Opinion on Synthetic Biology II Risk assessment methodologies and safety aspects*. ISBN 978-92-79-43916-2
5. **European Commission: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)** (2015): *Final Opinion on Synthetic Biology III: Risks to the environment and biodiversity related to synthetic biology and research priorities in the field of synthetic biology*. ISBN 978-92-79-54973-1
6. **ZKBS** (2012): *Monitoring der Synthetischen Biologie in Deutschland, 1. Zwischenbericht der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS)*. Az.: 46012
7. **ZKBS** (2018): *Synthetic Biology, 2nd Interim report of the German Central Committee on Biological Safety (ZKBS)*. Az.: 46012
8. **Cello, J., A.V. Paul and E. Wimmer, Chemical synthesis of poliovirus cDNA** (2002): *Generation of infectious virus in the absence of natural template*. Science 297 (5583), p. 1016-1018

9. **Gibson, D.G., J.I. Glass, C. Lartigue, V.N. Noskov, R.Y. Chuang, M.A. Algire, G.A. Benders, M.G. Montague, L. Ma, M.M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E.A. Denisova, L. Young, Z.Q. Qi, T.H. Segall-Shapiro, C.H. Calvey, P.P. Parmar, C.A. Hutchison, 3rd, H.O. Smith and J.C. Venter** (2010): *Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome*. *Science* 329 (5987), p. 52-56
10. **Hutchison, C.A., 3rd, R.Y. Chuang, V.N. Noskov, N. Assad-Garcia, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, J. Gill, K. Kannan, B.J. Karas, L. Ma, J.F. Pelletier, Z.Q. Qi, R.A. Richter, E.A. Strychalski, L. Sun, Y. Suzuki, B. Tsvetanova, K.S. Wise, H.O. Smith, J.I. Glass, C. Merryman, D.G. Gibson and J.C. Venter** (2016): *Design and synthesis of a minimal bacterial genome*. (2016), *Science* 351 (6280), p. aad6253
11. **Annaluru, N., H. Muller, L.A. Mitchell, S. Ramalingam, G. Stracquadanio, S.M. Richardson, J.S. Dymond, Z. Kuang, L.Z. Scheifele, E.M. Cooper, Y. Cai, K. Zeller, N. Agmon, J.S. Han, M. Hadjithomas, J. Tullman, K. Caravelli, K. Cirelli, Z. Guo, V. London, A. Yeluru, S. Murugan, K. Kandavelou, N. Agier, G. Fischer, K. Yang, J.A. Martin, M. Bilgel, P. Bohutski, K.M. Boulier, B.J. Capaldo, J. Chang, K. Charoen, W.J. Choi, P. Deng, J.E. DiCarlo, J. Doong, J. Dunn, J.I. Feinberg, C. Fernandez, C.E. Floria, D. Gladowski, P. Hadidi, I. Ishizuka, J. Jabbari, C.Y.L. Lau, P.A. Lee, S. Li, D. Lin, M.E. Linder, J. Ling, J. Liu, J. Liu, M. London, H. Ma, J. Mao, J.E. McDade, A. McMillan, A.M. Moore, W.C. Oh, Y. Ouyang, R. Patel, M. Paul, L.C. Paulsen, J. Qiu, A. Rhee, M.G. Rubashkin, I.Y. Soh, N.E. Sotuyo, V. Srinivas, A. Suarez, A. Wong, R. Wong, W.R. Xie, Y. Xu, A.T. Yu, R. Koszul, J.S. Bader, J.D. Boeke and S. Chandrasegaran** (2014): *Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome*. *Science* 344 (6179), p. 55-58
12. **Fredens, J., K. Wang, D. de la Torre, L.F.H. Funke, W.E. Robertson, Y. Christova, T. Chia, W.H. Schmied, D.L. Dunkelmann, V. Beránek, C. Uttamapinant, A.G. Llamazares, T.S. Elliott and J.W. Chin** (2019): *Total synthesis of Escherichia coli with a recoded genome*. *Nature* 569 (7757), p. 514-518
13. **MacDonald, I.C. and T.L. Deans** (2016): *Tools and applications in synthetic biology*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105 (Pt A), p. 20-34
14. **Haynes, R.K.** (2006): *From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements*. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(5), p. 509-537
15. **Wang, Z., Yang L., Yang X. and Zhang X.** (2014): *Advances in the chemical synthesis of artemisinin*. *Synthetic Communications* 44(14), p. 1987-2003
16. **Schmid, G. and W. Hofheinz** (1983): *Total synthesis of qinghaosu*. *J. Am. Chem. Soc.* 105(3), p. 624-625
17. **Hale, V., J.D. Keasling, N. Renninger and T.T. Diagana** (2007): *Microbially derived artemisinin: a biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6 Suppl), p. 198-202
18. **Martin, V.J., D.J. Pitera, S.T. Withers, J.D. Newman and J.D. Keasling** (2003): *Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids*. *Nat. Biotechnol.* 21(7), p. 796-802

19. **Ro, D.K., E.M. Paradise, M. Ouellet, K.J. Fisher, K.L. Newman, J.M. Ndungu, K.A. Ho, R.A. Eachus, T.S. Ham, J. Kirby, M.C. Chang, S.T. Withers, Y. Shiba, R. Sarpong and J.D. Keasling** (2006): *Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast*. *Nature* 440(7086), p. 940-943
20. **Paddon, C.J., P.J. Westfall, D.J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M.D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D.R. Polichuk, K.H. Teoh, D.W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Dengrove, D. Diola, G. Dorin, K.W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S.P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, H. Jiang, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L.F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievens, P.S. Covelto, J.D. Keasling, K.K. Reiling, N.S. Renninger and J.D. Newman** (2013): *High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*. *Nature* 496(7446), p. 528-532
21. **Dumas, A., L. Lercher, C.D. Spicer and B.G. Davis** (2015): *Designing logical codon reassignment - Expanding the chemistry in biology*. *Chem. Sci.* 6 (1), p. 50-69
22. **Taylor, A.I., G. Houlihan and P. Holliger** (2019): *Beyond DNA and RNA: The expanding toolbox of synthetic genetics*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11 (6)
23. **Pinheiro, V.B., A.I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J.C. Chaput, J. Wengel, S.Y. Peak-Chew, S.H. McLaughlin, P. Herdewijn and P. Holliger** (2012): *Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution*. *Science* 336 (6079), p. 341-344
24. **Taylor, A.I. and P. Holliger** (2015): *Directed evolution of artificial enzymes (XNAzymes) from diverse repertoires of synthetic genetic polymers*. *Nat. Protoc.* 10 (10), p. 1625-1642
25. **Rovner, A.J., A.D. Haimovich, S.R. Katz, Z. Li, M.W. Grome, B.M. Gassaway, M. Amiram, J.R. Patel, R.R. Gallagher, J. Rinehart and F.J. Isaacs** (2015): *Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids*. *Nature*. 518 (7537), p. 89-93
26. **Herdewijn, P. and P. Marliere** (2009): *Toward safe genetically modified organisms through the chemical diversification of nucleic acids*. *Chem. Biodivers.* 6 (6), p. 791-808
27. **Glass, J.I., C. Merryman, K.S. Wise, C.A. Hutchison, 3rd and H.O. Smith** (2017): *Minimal cells-real and imagined*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9 (12)
28. **Kretschmer, S., K.A. Ganzinger, H.G. Franquelim and P. Schwillle** (2019): *Synthetic cell division via membrane-transforming molecular assemblies*. *BMC Biol.* 17 (1), p. 43
29. **Schwander, T., L. Schada von Borzyskowski, S. Burgener, N.S. Cortina and T.J. Erb** (2016): *A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide in vitro*. *Science*. 354 (6314), p. 900-904
30. **Tastanova, A., M. Folcher, M. Muller, G. Camenisch, A. Ponti, T. Horn, M.S. Tikhomirova and M. Fussenegger** (2018): *Synthetic biology-based cellular biomedical tattoo for detection of hypercalcemia associated with cancer*. *Sci. Transl. Med.* 10 (437)
31. **Alam, K.K., J.K. Jung, M.S. Verosloff, P.R. Clauer, J.W. Lee, D.A. Capdevila, P.A. Pastén, D.P. Giedroc, J.J. Collins and J.B. Lucks** (2019): *Rapid, low-cost detection of water contaminants using regulated in vitro transcription*. *bioRxiv*, p. 619296
32. **Kretschmer, S. and P. Schwillle** (2014): *Toward spatially regulated division of protocells: Insights into the E. coli Min system from in vitro studies*. *Life (Basel)* 4(4), p. 915-928

33. **Kretschmer, S. and P. Schwille** (2016): *Pattern formation on membranes and its role in bacterial cell division*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 38, p. 52-59
34. **Casali, N.** (2003): *Escherichia coli host strains*. *Methods Mol. Biol.* 235, p. 27-48
35. **Morimoto, T., R. Kadoya, K. Endo, M. Tohata, K. Sawada, S. Liu, T. Ozawa, T. Kodama, H. Kakeshita, Y. Kageyama, K. Manabe, S. Kanaya, K. Ara, K. Ozaki and N. Ogasawara** (2008): *Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in Bacillus subtilis*. *DNA Res.* 15 (2), p. 73-81
36. **Weinstock, M.T., E.D. Heseck, C.M. Wilson and D.G. Gibson** (2016): *Vibrio natriegens as a fast-growing host for molecular biology*. *Nat. Methods.* 13 (10), p. 849-851
37. **Wang, L., A. Brock, B. Herberich and P.G. Schultz** (2001): *Expanding the genetic code of Escherichia coli*. *Science.* 292 (5516), p. 498-500
38. **Wang, L.** (2017): *Engineering the genetic code in cells and animals: Biological considerations and impacts*. *Acc. Chem. Res.* 50 (11), p. 2767-2775
39. **Lajoie, M.J., A.J. Rovner, D.B. Goodman, H.R. Aerni, A.D. Haimovich, G. Kuznetsov, J.A. Mercer, H.H. Wang, P.A. Carr, J.A. Mosberg, N. Rohland, P.G. Schultz, J.M. Jacobson, J. Rinehart, G.M. Church and F.J. Isaacs** (2013): *Genomically recoded organisms expand biological functions*. *Science* 342 (6156), p. 357-360

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 2010 – 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)
- Band 11: Genome Editing (2019)

sowie der vorliegende Band:

- Band 12: 8. Fachtagung Gentechnik „Neue molekularbiologische Techniken (Genomeditierung, CRISPR/Cas & Co) und deren Herausforderungen für die Analytik“ in Oberschleißheim, am 23. Oktober 2019 (2020)

**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