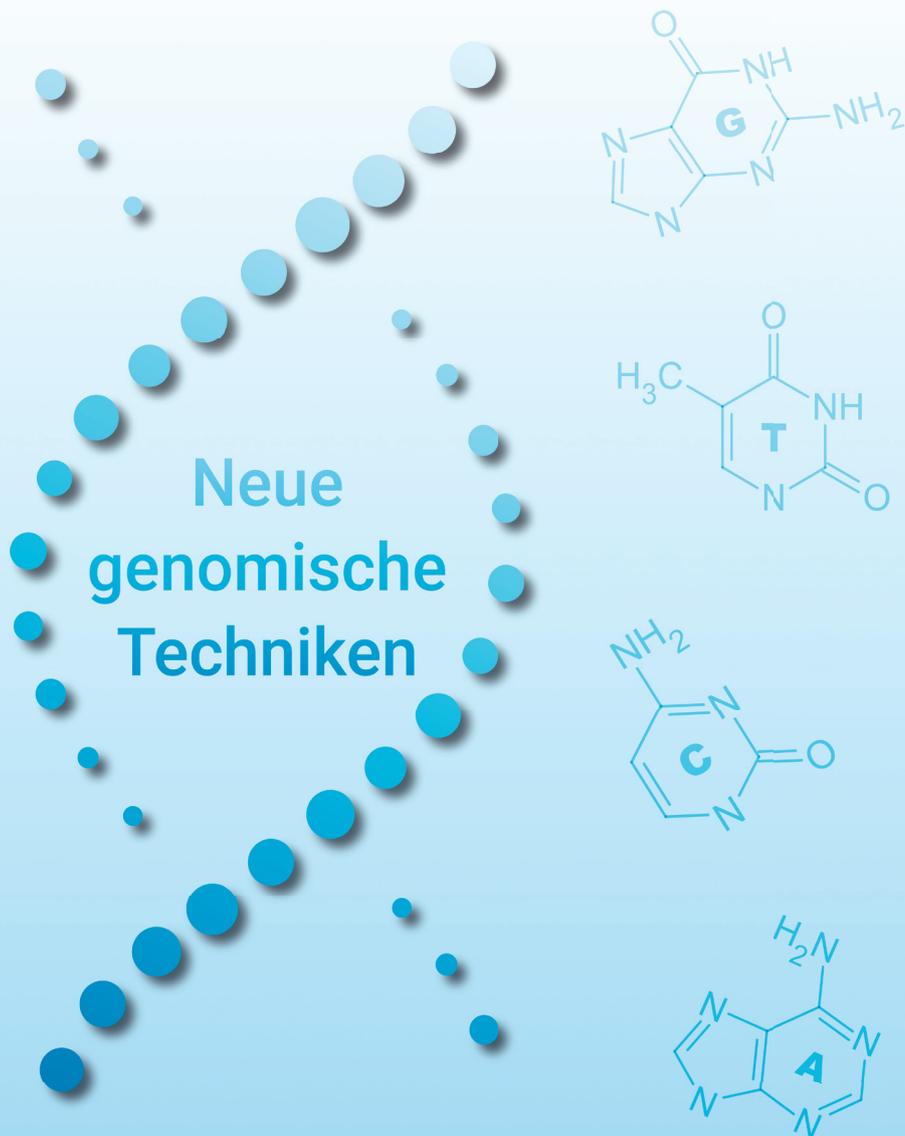




# 9. Fachtagung Gentechnik



LGL

„Neue genomische Techniken –  
Rechtliche Bewertungen,  
Anwendungen und  
Herausforderungen“

9. Fachtagung Gentechnik  
am 14. und 15. September 2022  
in Oberschleißheim

Band 13 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.

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](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)  
Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)

Onlineausgabe: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg  
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit  
S. 4: © Simon Geiger

Stand: August 2023  
Autoren: Dr. Patrick Gürtler 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](mailto:armin.baiker@lgl.bayern.de)

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit  
alle Rechte vorbehalten



Eine Behörde im Geschäftsbereich  
Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz



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



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Telefon 089 122220 oder per E-Mail unter [direkt@bayern.de](mailto: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.

**„Neue genomische Techniken –  
Rechtliche Bewertungen, Anwendungen  
und Herausforderungen“**

**9. Fachtagung Gentechnik  
am 14. und 15. September 2022 in Oberschleißheim**

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	4
1 Novellierung der GenTSV .....	6
2 Genom-Editierung für mehr Lebensmittelsicherheit.....	15
3 Synthetische Biologie: Aktuelle Entwicklungen auf dem Weg zu einer Schlüsseltechnologie.....	26
4 Neue Entwicklungen für die transgen-freie Gen-Editierung in Pflanzen.....	33
5 Genomeditierter Raps - Bewertung der Real-Time PCR Methode von Chhalliyil <i>et al.</i> (2020).....	37
6 Machbarkeitsstudie zu Nachweis- und Identifizierungsverfahren für genomeditierte Pflanzen und pflanzliche Produkte.....	42
7 Nachweis gentechnisch veränderter Papaya – Erfahrungen aus der amtlichen Überwachung.....	52
8 Aktivitäten der § 28b GenTG Arbeitsgruppe zum Nachweis von genomeditierten Pflanzen .....	60
9 Anwendung von CRISPR/Cas in der GVO-Analytik .....	70

## Vorwort

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Welt verändert sich rasant und wir stehen in den nächsten Jahrzehnten vor großen Herausforderungen durch den Klimawandel, die wachsende Weltbevölkerung, aber auch durch ein verändertes Bewusstsein der Menschen in Bezug auf Nachhaltigkeit, Verträglichkeit, Verfügbarkeit und Sicherheit von Lebensmitteln.

Bei der Bewältigung dieser Herausforderungen spielt die klassische Züchtung von Pflanzen und Tieren eine wichtige und zentrale Rolle. Einen Beitrag können aber auch neue molekularbiologische Züchtungstechniken leisten, die in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen haben und häufig unter dem Begriff „Genome Editing“ zusammengefasst werden. Diese Techniken ermöglichen die gezielte Veränderung des Erbguts von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen, wodurch Eigenschaften gezielt verändert werden können. Insbesondere das CRISPR/Cas9-System hat in der öffentlichen Diskussion eine zentrale Rolle eingenommen.

Die rechtliche Einordnung dieser Techniken und der damit erzeugten Organismen war jedoch lange Zeit unklar. Im Jahr 2018 hat der Europäische Gerichtshof in einem richtungsweisenden, aber aus wissenschaftlicher Sicht auch überraschenden Urteil festgestellt, dass alle mit den neuen Techniken erzeugten Organismen in der EU als gentechnisch veränderte Organismen im Sinne der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG einzustufen sind. Damit rücken diese Verfahren und die damit hergestellten Produkte in den Fokus der Überwachung, was neue Herausforderungen mit sich bringt.

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) hat sich dieser Thematik bereits frühzeitig angenommen und führt Forschungsvorhaben durch, die dankenswerterweise vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) gefördert werden. Im Rahmen dieser Forschungsprojekte werden nicht nur Informationen zum weltweiten Stand des Genome Editing zusammengetragen, sondern auch mögliche Risiken identifiziert und Nachweismethoden entwickelt.

Darüber hinaus wollen wir als LGL zu einer offenen, wissenschaftlichen und technologieoffenen Diskussion dieses durchaus kontroversen Themas beitragen. Dies haben wir mit einer Übersichtsbroschüre zum Thema „Genome Editing“ begonnen, die 2019 erschienen ist. Mit diesem Symposium wollen wir diesen Weg fortsetzen.



Es ist uns gelungen, namhafte Expertinnen und Experten auf diesem Gebiet als Referentinnen und Referenten für diese Fachtagung zu gewinnen. Die Vorträge zeigen die verschiedenen Facetten, Möglichkeiten und Fragestellungen dieser neuen Techniken auf. Insbesondere die rechtliche Situation, Entwicklungen im Bereich der analytischen Methoden, aber auch Anwendungen im Bereich der Pflanzenforschung und der Krankheitsbekämpfung stehen im Mittelpunkt dieser Fachtagung. Ich wünsche Ihnen allen eine interessante Fachtagung und wertvolle Diskussionen.

Ihr



**Prof. Dr. Christian Weidner**

Präsident des Bayerischen Landesamtes für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

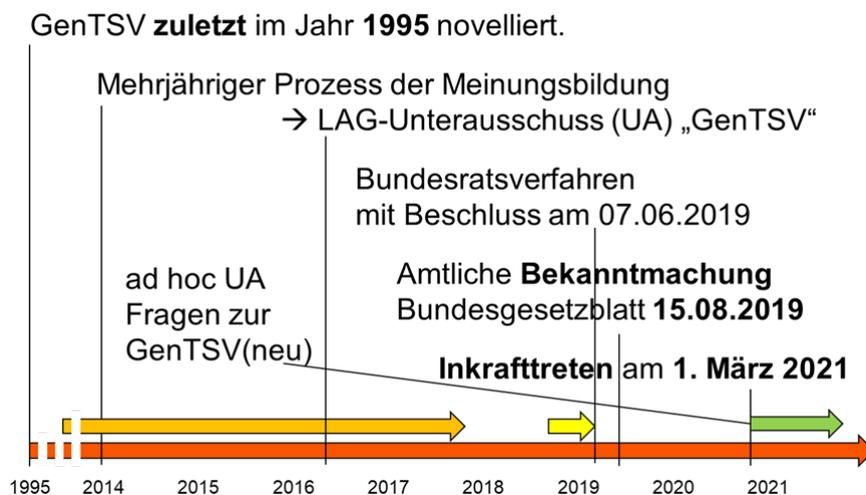
# 1 Novellierung der GenTSV

**Boris Schneider**

*Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz, StMUV*

## 1.1 Novellierungsprozess der GenTSV

Die letzte Fassung der GenTSV trat im Jahr 1995 in Kraft (siehe **Abbildung 1-1**). Bereits wenige Jahre nach der Jahrtausendwende wurden erste Arbeitskreise eingerichtet, die sich mit den Bestimmungen der GenTSV auseinandersetzten und erste Empfehlungen für eine Anpassung aussprachen. Der Prozess der Meinungsbildung zog sich in der Folge über mehrere Jahre hin. Im April 2016 legte die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS) auf Bitte des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) eine erste Zusammenstellung von Änderungsvorschlägen für eine Novelle der GenTSV vor. Im Mai 2016 beschloss die Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG), dass die GenTSV an den Stand von Wissenschaft und Technik angepasst werden soll, wobei auch Folgeänderungen aufgrund der Novelle der Biostoffverordnung (BioStoffV) vom Juli 2013 vorgenommen werden sollten.



**Abbildung 1-1:** Novellierungsprozess der GenTSV

Das BMEL erarbeitete auf Basis der Änderungsvorschläge von ZKBS und Ländern eine Synopse, die Basis für die Arbeit des im November 2016 eingesetzten Unterausschusses „GenTSV“ der LAG wurde. Dem Unterausschuss gehörten Vertreter aus zehn Ländern sowie des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), des Robert Koch-Instituts, des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales und des BMEL an. Im Oktober 2017 legte der Unterausschuss seinen Abschlussbericht vor, der wiederum Grundlage für den Novellierungs-Entwurf wurde, zu welchem BMEL im Juni 2018 die Länder- und Verbändeanhörung begann.

Wie mehrheitlich im LAG-Unterausschuss vereinbart, sah dieser Entwurf z. B. in § 28 Abs. 3 noch folgende Formulierung zur Aktualisierung der Sachkunde vor: *Liegen Anhaltspunkte dafür vor, dass ein Projektleiter nicht mehr über die bei der Fortbildung vermittelten Kenntnisse verfügt, kann die zuständige Behörde die erneute Teilnahme des Projektleiters an einer anerkannten Fortbildungsveranstaltung [...] anordnen.* Die letztlich in der novellierten GenTSV [GenTSV (neu)] enthaltene Regelung kam hier erst im Bundesratsverfahren zustande, welches am 27.03.2019 mit der Drucksache 137/19 startete und mit Beschluss vom 7.6.2019 endete (gelber Pfeil in **Abbildung 1-1**). Hauptschwerpunkt der Diskussionen im Bundesrat und später zwischen Regierung und Bundesrat bildeten neu aufgenommene Regelungen zum Gene Drive.

Letztlich wurde die GenTSV (neu) in ihrer aktuell gültigen Fassung am 15.08.2019 im Bundesgesetzblatt amtlich bekannt gemacht und trat am 01.03.2021 in Kraft.

Mit LAG-Beschluss vom März 2021 wurde ein Ad-hoc-Unterausschuss zu Fragen der Anwendung der GenTSV (neu) eingerichtet der im März 2022 Antwortentwürfe zu zuvor zum Verordnungstext gesammelten Fragen vorlegte (grüner Pfeil in **Abbildung 1-1**). Es wurde beschlossen, diese den Ländern als Empfehlungen zur Vollzugshilfe im internen Teil der LAG-Homepage zur Verfügung zu stellen.

## 1.2 Überblick – Was ist neu?

Die GenTSV (neu) weist mit 33 statt vormals 22 nun 11 Paragraphen mehr auf, da bisher gemeinsam behandelte Sachverhalte entflochten und zwei Anhänge (II und VI) in den Verordnungstext integriert wurden.

Inhaltlich wurden

- **Definitionen** überarbeitet und ergänzt,
- die Sicherheitseinstufung von gentechnischen Arbeiten im Labor- und Produktionsbereich vereinheitlicht,
- **Gene Drive Systeme** – nach hiesiger Kenntnis erstmals innerhalb der Europäischen Union – explizit rechtlich berücksichtigt,
- **Angleichungen im Bereich der Arbeitssicherheit** an die 2013 novellierte BioStoffV durchgeführt,
- Neuerungen bei der Abwasser- und Abfallbehandlung vorgenommen,
- Neuregelungen zu Sachkundeanforderungen ergänzt, die nun im Turnus von fünf Jahren einen **Aktualisierungskurs** vorsehen,
- erstmals spezifische Ordnungswidrigkeitstatbestände auch für den Projektleiter eingeführt und
- zuletzt die technischen und organisatorischen Anforderungen in den **Anhängen umstrukturiert und überarbeitet.**

Es kann somit zusammengefasst werden, dass es sich um eine substantielle Novellierung handelt. In Tabelle 1-1 sind Abschnitte und Paragraphen der GenTSV (neu) und der alten GenTSV zur Übersicht gegenübergestellt.

**Tabelle 1-1: Gegenüberstellung der neuen und alten GenTSV**

<b>GenTSV (neu)</b>	<b>GenTSV (alt)</b>
<u>Abschnitt 1</u>	<u>Erster Abschnitt</u>
Allgemeine Vorschriften (§§ 1-3)	Allgemeine Vorschriften (§§ 1-3)
§ 1 Anwendungsbereich	§ 1 Anwendungsbereich
§ 2 Sicherheitsstufen und -maßnahmen	§ 2 Sicherheitsstufen und -maßnahmen
§ 3 Begriffsbestimmungen	§ 3 Begriffsbestimmungen
<u>Abschnitt 2</u>	<u>Zweiter Abschnitt</u>
Grundlagen und Durchführung der Sicherheitseinstufung (§§ 4-12)	Grundlagen und Durchführung der Sicherheitseinstufung (§§ 4-7)
§ 4 Grundlagen der Risikobewertung und der Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten	§ 4 Grundlagen der Risikobewertung und der Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten
§ 5 Risikobewertung von Organismen	§ 5 Risikobewertung von Organismen
§ 6 Veröffentlichung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen	(§ 5 Abs. 6)
§ 7 Biologische Sicherheitsmaßnahmen	§ 6 Biologische Sicherheitsmaßnahmen
§ 8 Empfängerorganismen und Vektoren als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme	Anhang II (§ 5 Abs. 5, § 6, § 7 Abs. 5)
§ 9 Grundsatz der Sicherheitseinstufung	(§ 6 Abs. 4 und 5)
§ 10 Sicherheitseinstufung von gentechnischen Arbeiten mit Mikroorganismen	§ 7 Sicherheitseinstufung
§ 11 Sicherheitseinstufung von gentechnischen Arbeiten mit Tieren und Pflanzen	(§ 7 Abs. 2 und 3)
§ 12 Gentechnische Arbeiten zur Herstellung von hochwirksamen Toxinen	(§ 7 Abs. 4)
<u>Abschnitt 3</u>	<u>Dritter Abschnitt</u>
Sicherheitsmaßnahmen (§§ 13-26)	Sicherheitsmaßnahmen (§§ 8-13)
§ 13 Allgemeine Schutzpflicht, Arbeitsschutz	§ 8 Allgemeine Schutzpflicht, Arbeitsschutz
§ 14 Sicherheitsmaßnahmen für Labor- und für Produktionsbereiche	§ 9 Technische und organisatorische Sicherheitsmaßnahmen für Labor- und Produktionsbereiche
§ 15 Sicherheitsmaßnahmen f. Gewächshäuser	§ 10 Haltung von Pflanzen in Gewächshäusern
§ 16 Sicherheitsmaßnahmen für Tierräume	§ 11 Haltung von Versuchstieren in Tierhaltungsräumen
§ 17 Allgemeine Arbeitssicherheitsmaßnahmen	§ 12 Arbeitssicherheitsmaßnahmen

<b>GenTSV (neu)</b>	<b>GenTSV (alt)</b>
§ 18 Arbeitssicherheit bei Prüfung, Wartung und Veränderung von Anlagen, Apparaturen und Einrichtungen	(§ 12 Abs. 5)
§ 19 Anpassung von Maßnahmen der Arbeitssicherheit u. Überwachung des Arbeitsbereiches	(§ 12 Abs. 6 und 7)
§ 20 Arbeitsmedizinische Präventionsmaßnahmen	Anhang VI
§ 21 Unterrichtung der Beschäftigten	§ 12a Unterrichtung der Beschäftigten
§ 22 Allgemeine Anforderungen an die Abwasser- und Abfallbehandlung	§ 13 Anforderungen an die Abwasser- und Abfallbehandlung
§ 23 Abwasser- und Abfallbehandlung bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufen 1 und 2	(§ 13 Abs. 3)
§ 24 Entsorgung von Abwässern und Abfällen ohne Vorbehandlung bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufen 1 und 2	(§ 13 Abs. 2)
§ 25 Inaktivierung von gentechnisch veränderten Organismen vor der Abwasser- oder Abfallentsorgung	(§ 13 Abs. 4)
§ 26 Abwasser- und Abfallbehandlung bei gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufen 3 und 4	(§ 13 Abs. 5 und 6)
<b><u>Abschnitt 4</u></b>	<b><u>Vierter Abschnitt</u></b>
Projektleiter (§§ 27, 28)	Projektleiter (§§ 14, 15)
§ 27 Verantwortlichkeiten des Projektleiters	§ 14 Verantwortlichkeiten des Projektleiters
§ 28 Sachkunde des Projektleiters	§ 15 Sachkunde des Projektleiters
<b><u>Abschnitt 5</u></b>	<b><u>Fünfter Abschnitt</u></b>
Beauftragter für die biologische Sicherheit (§§ 29-32)	Beauftragter für die biologische Sicherheit (§§ 16-19)
§ 29 Bestellung eines Beauftragten für die Biologische Sicherheit	§ 16 Bestellung eines Beauftragten
§ 30 Sachkunde des Beauftragten für die Biologische Sicherheit	§ 17 Sachkunde des Beauftragten
§ 31 Aufgaben des Beauftragten für die Biologische Sicherheit	§ 18 Aufgaben des Beauftragten
§ 32 Pflichten des Betreibers gegenüber dem Beauftragten für die Biologische Sicherheit	§ 19 Pflichten des Beauftragten
<b><u>Abschnitt 6</u></b>	<b><u>Sechster Abschnitt</u></b>
Ordnungswidrigkeiten (§ 33)	Bußgeldvorschriften (§ 20)
§ 33 Ordnungswidrigkeiten	§ 20 Ordnungswidrigkeiten
	<b><u>Siebter Abschnitt</u></b>
	Schlussvorschriften (§ 21)

GenTSV (neu)	GenTSV (alt)
	(Inkrafttreten) (§ 22)
<u>Anlagen</u>	<u>Anhänge</u>
Anlage 1 Allgemeine Kriterien für die Risikobewertung	Anhang I Risikogruppen der Spender- und Empfängerorganismen/ Allgemeine Kriterien für die Sicherheitsbewertung
	Anhang II Biologische Sicherheitsmaßnahmen
Anlage 2 Sicherheitsmaßnahmen für Labor- und Produktionsbereiche	Anhang III Sicherheitsmaßnahmen für Labor- und Produktionsbereiche
Anlage 3 Sicherheitsmaßnahmen für Gewächshäuser	Anhang IV Sicherheitsmaßnahmen für Gewächshäuser
Anlage 4 Sicherheitsmaßnahmen für Tierräume	Anhang V Sicherheitsmaßnahmen für Tierräume
	Anhang VI Arbeitsmedizinische Präventionsmaßnahmen

### 1.3 (Neue) Regelungen der GenTSV

Im Folgenden werden nur die aus meiner Sicht wichtigsten Neuerungen der GenTSV (neu) kurz vorgestellt. Es existieren darüber hinaus noch weitere, von mir als weniger interessant eingestufte Änderungen, wie beispielsweise redaktionelle Anpassungen an die neue Nummerierung. Es werden daher nicht alle einzelnen Paragraphen behandelt.

#### 1.3.1 Abschnitt 1 – Allgemeine Vorschriften

In § 3 (Begriffsbestimmungen) wurden Definitionen überarbeitet und ergänzt:

- Nr. 5 Grenzen, ab wann ein Toxin hochwirksam ist, wurden angehoben und präzisiert.
- Nr. 6 Inaktivierung wird auf alle gefährlichen Wirkungen von Organismen ausgedehnt.
- Nr. 7 Neueinführung der Definition des Begriffs „**Desinfektion**“: *Reduktion der Anzahl vermehrungsfähiger oder infektiöser Organismen in dem Maße, dass von ihnen keine schädlichen Auswirkungen und insbesondere keine Infektionsgefahren ausgehen.*
- Nr. 8 Erweiterte Definitionen der Begriffe „Sterilisation; Sterilisierung“: **Sterilisation** ist das Abtöten aller vermehrungsfähigen oder infektiösen Organismen einschließlich ihrer Dauerformen und Zerstörung ihrer gefährlichen Wirkungen; **Sterilisierung** sind Eingriffe, um Tieren die Fortpflanzungsfähigkeit zu nehmen.
- Nr. 10 Erweiterung der Definition des Begriffs „**Produktionsbereich**“ als ein Bereich zur ausnahmsweisen Erzeugung von GVO.

- Nr. 11 Neueinführung der Definition des Begriffs „**Tierräume**“: *Gebäude oder abgetrennte Bereiche innerhalb eines Gebäudes mit Tierhaltungsräumen und dazugehörigen Funktions- und Betriebsräumen.*  
Damit wird nun eine Abgrenzung zwischen der gesamten Anlage und den speziellen Tierhaltungsräumen möglich.

### 1.3.2 Abschnitt 2 – Grundlagen und Durchführung der Sicherheitseinstufung

In § 7 werden die biologischen Sicherheitsmaßnahmen, präziser als bisher beschrieben und unabhängig von der Sicherheitsstufe aufgeführt. Das BVL veröffentlicht durch die ZKBS anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahmen auf der ZKBS-Internetseite (§ 7 Abs. 6).

Das Regelungssystem wird als eigener § 9 (Grundsatz der Sicherheitseinstufung) neu festgeschrieben. Es erfolgt eine Differenzierung nach gentechnischen Arbeiten mit Mikroorganismen (§ 10) bzw. Tieren und Pflanzen (§ 11). Dabei werden in den §§ 10 Abs. 5 und 11 Abs. 6 GenTSV (neu) erstmalig **Gene Drive Arbeiten** im deutschen Gentechnikrecht berücksichtigt: *Gentechnische Arbeiten [...], die darauf gerichtet sind, genetische Elemente herzustellen, welche die eigene Ausbreitung in Populationen sich sexuell vermehrender Organismen vorantreiben, sind grundsätzlich der Sicherheitsstufe 3 zuzuordnen. Im Rahmen des Genehmigungsverfahrens kann die Behörde die Arbeiten auf der Grundlage der Risikobewertung einer anderen Sicherheitsstufe zuordnen. Die zuständige Behörde hat von der ZKBS eine Stellungnahme mit Empfehlungen zu den erforderlichen spezifischen Sicherheitsmaßnahmen für solche Arbeiten einzuholen.*

Arbeiten mit Gene Drive Organismen sind damit grundsätzlich der Sicherheitsstufe 3 zuzuordnen und unterliegen somit einem Genehmigungsverfahren, d. h. es darf nicht mit den Arbeiten begonnen werden, bevor die ZKBS eine Stellungnahme mit Empfehlungen zu den erforderlichen spezifischen Sicherheitsmaßnahmen für solche Arbeiten abgegeben und die zuständige Behörde entschieden hat. Dabei ist eine Einstufung in eine andere Sicherheitsstufe möglich und steht im Ermessen der zuständigen Behörde. Es liegen Empfehlungen des LAG-ad hoc Unterausschuss „Fragen zur GenTSV (neu)“ vor, wie verfahrenstechnisch im Falle einer solchen „Umstufung“ vorzugehen ist.

Weiter wurde ein neuer § 12 „Gentechnische Arbeiten zur Herstellung von hochwirksamen Toxinen“ eingeführt. Ähnlich den Gene Drive Arbeiten ist die Produktion hochwirksamer Toxine der Sicherheitsstufe 3 zugeordnet, was eine ZKBS-Beteiligung sicherstellt. Diese gibt Empfehlungen zu den Sicherheitsmaßnahmen, wobei auch biologische Sicherheitsmaßnahmen einbezogen werden können.

### 1.3.3 Abschnitt 3 – Sicherheitsmaßnahmen

Die Arbeitssicherheitsmaßnahmen sind jetzt in den vier Paragraphen 17-20 geregelt.

In § 17 „Allgemeine Arbeitssicherheitsmaßnahmen“ wird in Abs. 2 Nr. 3 anlehnend an die BiostoffV geregelt, dass die **Betriebsanweisung** mindestens alle 2 Jahre zu überprüfen und, falls erforderlich, zu aktualisieren ist. Laut Abs. 3 hat der Betreiber einen **Hygieneplan** zu erstellen, was damit neu bereits ab der Sicherheitsstufe 1 erforderlich wird. Abs. 4 gestattet eine **elektronische Belehrung** mit Erfolgskontrolle für die Sicherheitsstufe 1.

Die Unterweisungspflichten können dabei vom Projektleiter auf geeignete Mitarbeiter übertragen werden. Zur Frage, wer geeignete Mitarbeiter sind, hat der LAG-ad hoc Unterausschuss „Fragen zur GenTSV (neu)“ Empfehlungen ausgesprochen. Die Entscheidung, ob die Person geeignet ist, obliegt in Bayern dem Projektleiter und ist abhängig von den durchgeführten Arbeiten. Geeignete Mitarbeiter sollten eine abgeschlossene Ausbildung mit naturwissenschaftlichem Hintergrund und mindestens drei Jahre Erfahrung in gentechnischem Arbeiten haben. Die Teilnahme an einer Fortbildungsveranstaltung sollte nicht notwendig sein, um eine Unterweisung durchführen zu können.

Der neue Paragraph 18 für die **Prüfung, Wartung** und Veränderung von Anlagen, Apparaturen und Einrichtungen enthält Regelungen zur Arbeitssicherheit des damit betrauten Personals.

§ 20 Arbeitsmedizinische Präventionsmaßnahmen verweist auf die BioStoffV und die Verordnung zur arbeitsmedizinischen Vorsorge. Entsprechende Belange waren bisher in Anhang VI geregelt.

Neu bei den Anforderungen an die **Abwasser- und Abfallbehandlung** ist, dass die Anwendung von chemischen Inaktivierungsverfahren nur erlaubt ist, wenn ein physikalisches Verfahren aufgrund der Beschaffenheit des Abfalls/Abwassers nicht möglich ist (§ 23 Abs. 2 Nr. 2). Neue Anforderungen an das Autoklavieren von GVO in besonderen Matrices wie Tierkadavern wurden aufgenommen: *Beim Autoklavieren von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in besonderen Matrices, wie in Tierkadavern, muss sichergestellt sein, dass die [...] Temperaturen und Einwirkzeiten in allen Schichten erreicht werden* (§§ 25 Abs. 1, 26 Abs. 1). Nach Empfehlung des LAG-ad hoc Unterausschusses „Fragen zur GenTSV (neu)“ werden unter dem Begriff „besondere Matrices“ nicht nur Tierkadaver, sondern auch Materialien, in denen eine Satttdampfverteilung nur zeitverzögert, ungleichmäßig oder schwer realisierbar ist, verstanden; beispielsweise Filter aus MSW/RLT, englumige Schläuche, Erde aus Gewächshäusern, Einstreu etc.

#### 1.3.4 Abschnitte 4/5 – Projektleiter/Beauftragter für die biologische Sicherheit

Zur **Sachkunde des Projektleiters** ist in § 28 das erforderliche Hochschulstudium derart definiert, dass es einen Bachelor-Abschluss nicht einschließt (Abs. 2 Nr. 1). In Bayern wird nach Empfehlung des LAG-ad hoc Unterausschusses „Fragen zur GenTSV (neu)“ ein Bachelor für Arbeiten im Produktionsbereich oder bei Freisetzen von Pflanzen als ausreichend erachtet. Für die Projektleitertätigkeit in S3- und S4-Anlagen ist neu zusätzlich eine mindestens zweijährige Tätigkeit im Rahmen der Sicherheitsstufen 2, 3 oder 4 nachzuweisen (Abs. 2 Nr. 2). Weiter wurden Regelungen für bei Dritten tätige Projektleiter aufgenommen (Abs. 6).

Zur **Aktualisierung der Sachkunde** ist in § 28 Abs. 3 neu festgelegt: *Die bei der [Erst-] Fortbildung [...] vermittelten Kenntnisse müssen mindestens alle fünf Jahre durch die erneute Teilnahme an einer anerkannten Fortbildungsveranstaltung aktualisiert werden.*

Nach LAG-Beschluss vom 06./07.11.2019, der nur eine Empfehlung darstellt, gilt die Regelung in § 28 Abs. 3 GenTSV (neu) nicht rückwirkend.

Der Zeitraum von fünf Jahren, nach dem die durch die Fortbildung erworbenen Kenntnisse spätestens aktualisiert werden müssen, beginnt am Tag des Inkrafttretens der Verordnung und somit am 01.03.2021 zu laufen, d. h. eine Aktualisierung der Fortbildung muss spätestens bis zum 28.02.2026 erfolgt sein. Bayern folgt dieser Empfehlung.

Zu Art und Inhalt der neuen Aktualisierungs-Fortbildungen hat eine ad hoc-Arbeitsgruppe der LAG die Lehrinhalte für Fortbildungsveranstaltungen gemäß § 28 Abs. 3 GenTSV (neu) erarbeitet.<sup>1</sup>

#### **Wichtige Punkte:**

- der Unterrichtszeitbedarf beträgt insgesamt mindestens 8 Lehrstunden à 45 Minuten,
- die Teilnehmerzahl sollte möglichst kleiner als fünfzig Personen sein,
- Fernkurse sind möglich (die Teilnahme ist dabei geeignet nachzuweisen),
- es soll ausreichend Zeit für freie Diskussionen eingeräumt werden.

Die Anforderungen an die erforderliche Sachkunde und an deren Nachweis richten sich beim Beauftragten für die biologische Sicherheit nach den für den Projektleiter geltenden Vorschriften (§ 30), so dass auch hier der Besuch von Aktualisierungskursen erforderlich wird.

#### **1.3.5 Abschnitt 6 – Ordnungswidrigkeiten**

In § 33 Nr. 8 wurden erstmals spezifische **Ordnungswidrigkeitstatbestände auch für den Projektleiter** festgelegt: *Ordnungswidrig [...] handelt, wer vorsätzlich oder fahrlässig [...] einen Beschäftigten nicht, nicht richtig, nicht vollständig, nicht in der vorgeschriebenen Weise oder nicht rechtzeitig unterweist.*

#### **1.3.6 Anlagen zur GenTSV (neu)**

Eine generelle Neuerung in den Anlagen 2, 3 und 4 stellt die komplette Aufführung aller Sicherheitsmaßnahmen für jede einzelne Sicherheitsstufe in den Anlagen dar:

- Anlage 2 A (für den Laborbereich),
- Anlage 2 B (für den Produktionsbereich),
- Anlage 3 (für Gewächshäuser) und
- Anlage 4 (für Tierräume).

In Labor- und Produktionsanlagen (Anlage 2) sollen die Arbeiten in abgegrenzten und ausreichend großen Räumen durchgeführt werden, der Begriff des Bereichs wurde gestrichen. Für S3 wurde die Formulierung „in abgegrenzten (abgeschirmten) und ausreichend großen Räumen“ gewählt. Auch bei den **Eigenschaften von Arbeitsflächen und angrenzenden Flächen** finden sich keine Unterschiede zwischen Produktions- und Laborbereichen.

---

<sup>1</sup> [https://www.lag-gentechnik.de/documents/lehrinhalte-fortbildungsveranstaltungen\\_1677160275.pdf](https://www.lag-gentechnik.de/documents/lehrinhalte-fortbildungsveranstaltungen_1677160275.pdf)

Bei S1 ist nun auch das Mobiliar eingeschlossen und sollte leicht zu reinigen sein. Zudem müssen Oberflächen nun beständig gegenüber Desinfektionsmitteln sein, da neu ja auch für S1 ein Hygieneplan mit Angaben entsprechender Desinfektionsmittel erforderlich ist. Ab S2 müssen die Arbeitsflächen, angrenzende Wandflächen, der Fußboden sowie der Wand-Boden-Anschluss flüssigkeitsdicht sein.

Bei **Händereinigung und Desinfektion** finden sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen Produktions- und Laborbereichen. In S1 wird neben dem Waschbecken jetzt zusätzlich ein Handwaschmittel-, ein Desinfektionsmittel- und ein Einmalhandtuchspender empfohlen („soll vorhanden sein“). In Gewächshäusern/Tierräumen (Anlagen 3 und 4) soll eine leicht erreichbare Waschgelegenheit zur Reinigung der Hände mit einem Handdesinfektionsmittelspender und erforderlichenfalls einem Einmalhandtuchspender sowie einem Desinfektionsmittelspender vorhanden sein.

Neu ist für **Labortüren und -fenster** die Forderung der Verschlussheit von Laborfenstern im S1-Bereich sowie das Aufschlagen der Türen in Fluchrichtung (bisher „nach außen“). Auch in Gewächshäusern/Tierräumen sollen Türen in Fluchrichtung aufschlagen.

## 2 Genom-Editierung für mehr Lebensmittelsicherheit

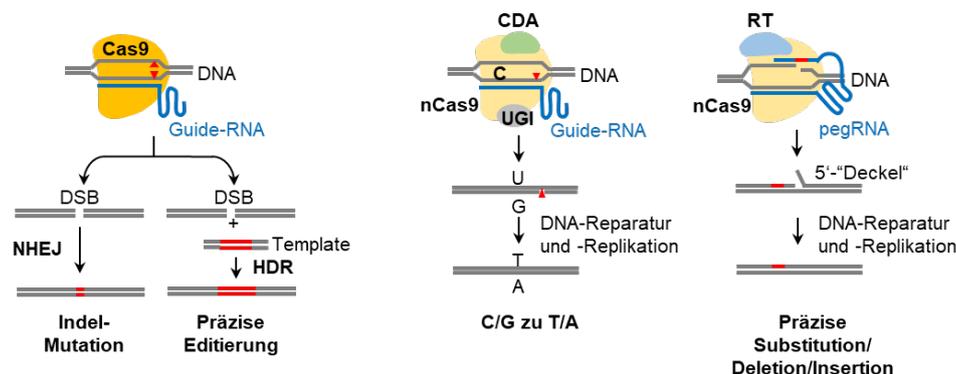
Stephan Clemens

Lehrstuhl Pflanzenphysiologie und Fakultät für Lebenswissenschaften: Lebensmittel, Ernährung und Gesundheit, Universität Bayreuth

### 2.1 Einleitung

Das CRISPR-Cas-System erlaubt, die in der Natur typischen Formen der Mutation, also Insertionen oder Deletionen von DNA-Basen ebenso wie Punktmutationen, programmierbar, d. h. gezielt an bestimmten, durch die DNA-Sequenz bestimmten Stellen im Genom einzuführen. Eine durch CRISPR-Cas erzeugte Mutation ist nicht von einer zufällig aufgetretenen Mutation zu unterscheiden.

Die auf CRISPR-Cas basierenden Techniken der Genomeditierung werden mit großer Geschwindigkeit ausgebaut und verfeinert (**Abbildung 2-1**). Neben die gezielte Erzeugung eines Doppelstrangbruchs durch die Cas-Nuklease mit anschließender Reparatur durch zelleigene Systeme sind inzwischen weitere Techniken wie das *Base editing* und das *Prime editing* getreten (Gao, 2021). Präzision und die Zahl der Optionen für die Editierung wachsen damit.



**Abbildung 2-1: Methoden der Genom-Editierung mittels CRISPR-Cas.** Links: Programmiert durch die Sequenz der Guide-RNA und die RNA-DNA-Basenpaarung setzt die Nuklease Cas9 spezifisch an einer Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch (DSB). Dieser wird durch eines von zwei zellulären DNA-Reparatursystemen repariert. Das „Non-Homologous End Joining“ (NHEJ) lässt meist eine kurze Insertion oder Deletion zurück (Indel) (alle Veränderungen der DNA sind rot hervorgehoben), während die „Homology-directed Repair“ (HDR) in Gegenwart einer von außen eingebrachten Vorlage (Template) zur gezielten Editierung, d.h. der Einführung von einem oder mehreren Basenaustauschen, genutzt werden kann. Mitte: Ein mutiertes Cas9-Protein (nCas9; „Nickase“) wird beim „Base Editing“ eingesetzt. Das nCas9 schneidet nur einen DNA-Strang. Eine fusionierte Cytidin-Deaminase (CDA) oder eine Adenin-Deaminase (nicht gezeigt) wandeln dann, unterstützt durch den Uracil-DNA-Glycosylase Inhibitor (UGI), Cytosin/Guanin in Thymin/Adenin um bzw. Adenin/Thymin in Guanin/Cytosin. Ergebnis ist ein gezielter Basenaustausch. Rechts: Das „Prime Editing“ basiert auf der Fusion von nCas9 mit einer Reversen Transkriptase. Die „prime editing guide RNA“ (pegRNA) ist eine modifizierte Guide-RNA, die zusätzlich eine Primer-Bindungsstelle und ein Template für die Reverse Transkriptase trägt. Mittels Reverser Transkription wird das Template in DNA umgeschrieben. Der entstehende 5'-"Deckel" wird dann dank der DNA-Reparatur Teil des Genoms. Durch Prime Editing können präzise Editierungen, Insertionen und Deletionen erzeugt werden. (nach Clemens, 2021)

Der Fokus dieses Beitrags liegt auf den Potentialen der Genomeditierung im Sinne einer weiteren Verbesserung der Lebensmittelsicherheit. Die Diskussion wird dabei auf pflanzliche Lebensmittel beschränkt, da diese den weitaus größten Teil der Lebensmittel bzw. Lebensmittelgrundstoffe ausmachen. Zudem bilden Nutzpflanzen bereits seit der Entdeckung des CRISPR-Cas-Systems einen Schwerpunkt der Forschung, da die Potentiale für die züchterische Weiterentwicklung von Pflanzen sehr schnell erkannt wurden (Doudna und Charpentier, 2014). Die vorgestellten Beispiele basieren zumeist noch auf der einfachsten Variante der Genomeditierung, d.h. der Inaktivierung eines Gens durch Insertionen oder Deletionen.

## 2.2 Die Entwicklung der Genom-Editierung von Nutzpflanzen

Schon jetzt (Stand September 2022) sind über 500 Anwendungen der Genom-Editierung bei insgesamt über 60 verschiedenen Nutzpflanzen in der Datenbank von EUSAGE (European Sustainable Agriculture Through Genome Editing) erfasst (Dima *et al.*, 2022; <https://www.eusage.eu/genome-search>). Ähnlich zählte eine vom *Joint Research Council* der EU im Jahre 2021 veröffentlichte Markterkundung zu Anwendungen neuer genomischer Techniken über 400 verschiedene genomeditierte Pflanzen<sup>1</sup>. Die meisten der erfassten Projekte befanden sich noch in der frühen Forschungs- und Entwicklungsphase und nur wenige in der Kommerzialisierung. Ca. 60 % der potentiellen Anwendungen werden von akademischen Institutionen entwickelt.

Eine Analyse der Herkunftsländer zeigt, dass die überwiegende Zahl der in der EUSAGE-Datenbank gelisteten Projekte in China und den USA angesiedelt ist. Die gesamte EU kommt nur auf ca. ein Viertel der Zahlen für China und ein Drittel der in den USA entwickelten Anwendungen (Dima *et al.*, 2022). Die bearbeiteten Eigenschaften („Traits“) können in verschiedene Kategorien wie z. B. „Wachstum, Ertrag“ oder „Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren“ eingeteilt werden (**Tabelle 2-1**). Relevant für die Lebensmittelsicherheit sind vor allem Veränderungen der Inhaltsstoffe, erfasst in der Kategorie „Verbesserte Nahrungsmittel-/Futtermittelqualität“. Erwähnt werden soll an dieser Stelle jedoch, dass auch die Kategorie „Biotische Interaktionen“ in unmittelbarem Zusammenhang mit der Lebensmittelsicherheit steht. Die bereits mehrfach eindrucksvoll gelungene Steigerung der Krankheitsresistenz etwa von Weizen oder Reis mittels Genom-Editierung (Oliva *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022) kann zu einer Verringerung der Belastung mit Pestizidrückständen führen. Möglicherweise noch bedeutsamer ist die Unterdrückung von pilzlichen Primär- oder Sekundärinfektionen und damit die zu erwartende deutlich verringerte Wahrscheinlichkeit, dass gesundheitsschädliche Mykotoxine gebildet werden.

---

<sup>1</sup> <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC123830>

**Tabelle 2-1:** Einteilung von Anwendungen der Genomeditierung in Nutzpflanzen nach Kategorien und mit Beispielen für die jeweils veränderten Eigenschaften. Die Prozentangabe bezeichnet den Anteil an den in der EUSAGE-Datenbank erfassten > 500 Projekten (Stand September 2022) (nach Dima *et al.*, 2022).

Kategorie	Eigenschaften	%
Verbesserte Nahrungsmittel-/Futtermittelqualität	Veränderte Zusammensetzung zur Verbesserung des Nährwertes (in Bezug auf Vitamine, toxische Verbindungen, Stärke, Öl, Proteine, Ballaststoffe, Allergene etc.)	25
Wachstum, Ertrag	Höhere Photosynthese-Effizienz, Verbesserung von Fruchtgröße und – Gewicht, Erhöhung der Zahl der Blüten, Samen, Früchte; verbesserte Pflanzenarchitektur (z.B. Größe oder Form der Pflanze, Entwicklungsmuster, Form der Früchte)	22
Biotische Interaktionen	Resistenz gegen durch Pathogene wie Viren, Bakterien, und Pilze oder durch Nematoden ausgelöste Pflanzenkrankheiten	18
Industrielle Verwertung	Werkzeuge für die Züchtung, Biokraftstoffe, Stickstoff-Effizienz	14
Herbizidtoleranz	Toleranz gegenüber verschiedenen Herbiziden	8
Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren	Verbesserte Toleranz gegenüber Trockenstress, Hitze, Kälte, Überflutung, erhöhter Salzkonzentrationen, UV-Strahlung etc.	5
Aroma und Geschmack	Verbessertes Aroma, verbesserter Geschmack	5
Lagerfähigkeit	Längere Haltbarkeit, veränderte Anforderung an Lagerbedingungen, weniger Verbräunung	3

## 2.3 Mögliche Anwendungen der Genom-Editierung für mehr Lebensmittelsicherheit

Mögliche Steigerungen der Lebensmittelsicherheit durch insbesondere CRISPR-Cas- Anwendungen sollen beispielhaft für vier Herausforderungen diskutiert werden, der Eliminierung von Allergenen, der Verringerung der Konzentrationen pflanzlicher Sekundärstoffe, der Verringerung der Konzentrationen anderer potentiell problematischer Metabolite sowie der weitgehenden Verhinderung der Akkumulation von Fremdstoffen wie potentiell hochtoxischen, nicht-essentiellen Metallen bzw. Metalloiden in pflanzlichen Organen.

### 2.3.1 Allergene

Pflanzliche Nahrungsmittel enthalten zahlreiche allergene Stoffe, die in einer größer werdenden Zahl von Menschen entsprechende Reaktionen auslösen. Die meisten der bekannten Allergene sind Proteine und gehören überwiegend zu vier verschiedenen Klassen (Radauer and Breiteneder, 2007). Die Prolamin-Superfamilie stellt die prominenteste Gruppe dar. Sie enthält u.a. die in den meisten Getreidesamen dominanten Speicherproteine. In der funktionell sehr diversen Cupin-Superfamilie finden sich u.a. im Samen lokalisierte Speicherproteine der Klassen 7S und 11S. Profilin sind kleine cytosolische Proteine, die vor allem mit Elementen des Cytoskeletts interagieren. Die Bet v 1-Superfamilie schließlich verdankt ihren Namen dem wichtigsten Birkenpollen-Allergen. Dieses und viele verwandte Proteine in Pflanzen werden vor allem unter Stressbedingungen verstärkt gebildet.

In einer Pilotstudie an *Brassica juncea* (Brauner Senf, auch Indischer oder Orientalischer Senf genannt) konnte die Arbeitsgruppe von Jens Boch an der Leibniz-Universität Hannover zeigen, dass eines der Hauptallergene, das zu den 2S-Albuminen und damit den Prolaminen zählende Bra j I, durch einen CRISPR-Cas-Ansatz eliminiert werden kann (Assou *et al.*, 2022). Hierfür wurden, geleitet durch entsprechende Guide-RNAs, entweder kleine Insertionen/Deletionen von einigen Basen oder größere Deletionen von mehreren Hundert Basen in alle Varianten des kodierenden Gens im allotetraploiden Genom von *B. juncea* eingefügt. Die resultierenden Pflanzen enthielten in ihren Samen entweder deutlich verringerte Mengen oder kein nachweisbares Bra J I mehr. Damit konnte die prinzipielle Machbarkeit der Strategie gezeigt werden. Dies war vorher mit ähnlicher Zielrichtung auch schon beim Weizen gelungen. Mittels CRISPR-Cas konnten Linien mit deutlich geringeren Gluten-Gehalten entwickelt werden (Sánchez-León *et al.*, 2018). Konventionelle Züchtung oder Mutagenese wären dazu kaum in der Lage, da das Genom des hexaploiden Brotweizens ca. 100  $\alpha$ -Gliadin-Gene enthält, die für die wesentlichen Gluten-Proteine kodieren. Angesichts der Prävalenz von Gluten-Unverträglichkeit und insbesondere Zöliakie besitzt dieser Ansatz großes Potential für eine Verbesserung der Gesundheitsvorsorge.

Noch zielgerichteter als die Eliminierung einzelner Proteine ist die Veränderung der allergenen Epitope durch gezielte Basenaustausche. So würden mögliche Qualitätseinbußen durch den Verlust ganzer Proteine im Samen vermieden werden können. Für zahlreiche Allergene ist bekannt, welche Teile der dreidimensionalen Struktur das Immunsystem aktivieren. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren mit Hilfe des *Base Editing* oder des *Prime Editing* könnten hypoallergene Varianten generiert werden.

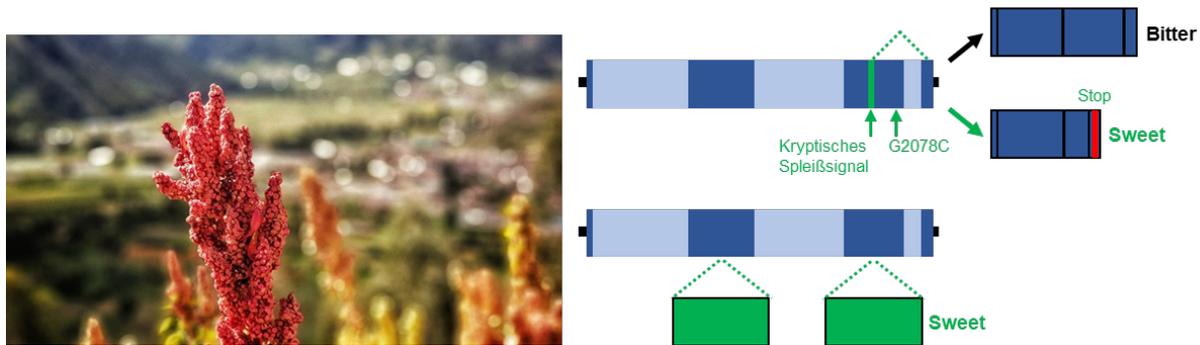
### 2.3.2 Potentiell toxische pflanzliche Sekundärstoffe

Pflanzen verteidigen sich gegen Fraßfeinde und Pathogene durch die Synthese einer großen Vielfalt unterschiedlicher Sekundärstoffe (im Englischen inzwischen häufig „specialized metabolites“ genannt). Es ist ein Kennzeichen unserer Nutzpflanzen, dass sie, verglichen mit ihren Wildverwandten, in der Regel deutlich geringere Konzentrationen toxischer Sekundärstoffe enthalten. Im Zuge des mit der Neolithischen Revolution vor mehr als 10.000 Jahren begonnenen Domestikationsprozesses sind unwillkürlich genetisch veränderte Individuen selektiert worden, die zumindest in den essbaren Organen z. B. weniger Bitterstoffe enthalten. In der Tat ist eine solche metabolische Veränderung insgesamt der häufigste Domestikationsprozess laut einer quantitativen Auswertung für über 200 auf der Welt verbreitete Nutzpflanzenarten (Meyer *et al.*, 2012). Ein Schlüsselereignis der Domestikation von Mandeln z. B. war der weitgehende Verlust der Synthese des hochtoxischen cyanogenen Diglucosids Amygdalin, bei dessen Abbau nach Gewebsverwundung Blausäure freigesetzt wird (Sánchez-Pérez *et al.*, 2019). Im Laufe der Domestikation ist eine nicht-synonyme Mutation zufällig aufgetreten und selektiert worden, welche die Funktion eines bHLH-Transkriptionsfaktors stört. Dieser aktiviert in wilden Mandeln die Transkription von für Amygdalin-Biosyntheseenzyme kodierenden Genen.

Der Verlust der Fähigkeit zur Synthese von auch für den Menschen toxischen Sekundärstoffen ist jedoch nicht absolut. Häufig findet die Biosynthese in einigen Organen der Pflanze weiterhin statt oder nur bestimmte Genotypen (Kultivare) zeigen den erwünschten Verlust der Toxine.

Ein sehr bekanntes Beispiel für das erste Szenario ist die Kartoffel (*Solanum tuberosum*), deren grüne Gewebe u. a. das giftige Steroidalkaloid  $\alpha$ -Solanin enthalten. Die Lagerung von Kartoffeln und auch die Nutzung von Wildverwandten für Kreuzungen würde durch eine Verringerung des  $\alpha$ -Solanin-Gehaltes erleichtert (Sawai *et al.*, 2014). Nach Identifizierung einer an der  $\alpha$ -Solanin-Synthese beteiligten Sterol-Reduktase wurde das entsprechende Gen inaktiviert. Die resultierenden Pflanzen enthielten bis zu ca. 90 % weniger  $\alpha$ -Solanin. Die Inaktivierung des Gens war noch durch RNAi-Interferenz erfolgt, da die Arbeiten schon zu lange zurückliegen. Mittels CRISPR-Cas könnte eine noch effizientere Inaktivierung erreicht werden.

Im Sinne einer größeren Diversität unserer (pflanzenbasierten) Ernährung und einer Steigerung der Nachhaltigkeit ist der verstärkte Anbau von sogenannten „vernachlässigten Nutzpflanzen“ („orphan crops“) wünschenswert. Oftmals zeigen diese Arten lokale Anpassungen an ihre ursprünglichen Verbreitungsgebiete und könnten deshalb mit weniger Ressourceneinsatz kultiviert werden. Allerdings sind wichtige erwünschte Eigenschaften oft nicht hinreichend ausgeprägt. Zu diesen zählt oftmals auch die Reduzierung des Gehalts toxischer Sekundärstoffe – wie oben angemerkt ein zentrales Resultat der Domestikation. Eine der „vernachlässigten Nutzpflanzen“, die züchterisch noch wenig erschlossen sind, ist Quinoa (*Chenopodium quinoa*). An dieser Art lässt sich das Potential von Genom-Editierung für die schnellere züchterische Weiterentwicklung illustrieren. Die Nachfrage ist in den letzten Jahren rasch gestiegen, da Quinoa als glutenfreies Pseudogetreide mit einem günstigen Inhaltsstoffspektrum eine Alternative zu Weizenprodukten darstellt. Quinoa kann zudem auf eher marginalen Böden angebaut werden und so einen wichtigen Beitrag sowohl zu gesunder Ernährung als auch zur Ernährungssicherheit leisten. Die Art ist jedoch tetraploid und es gibt bisher wenig Züchtungsprogramme. Eine wichtige Eigenschaft vieler Sorten betrifft die Akkumulation von potentiell toxischen Saponinen in der Samenschale. Genotypen mit der sogenannten „sweet quinoa“-Eigenschaft synthetisieren nur sehr wenig Saponine und können – im Gegensatz zu den Samen von „bitter quinoa“-Genotypen - ohne Auswaschen dieser Inhaltstoffe verzehrt werden. Das „sweet quinoa“-Merkmal ist deshalb ein wichtiges Züchtungsziel und soll in möglichst viele Sorten mit anderen günstigen Eigenschaften eingeführt werden. Durch die Sequenzierung des Quinoa-Genoms und die Re-Sequenzierung zahlreicher Sorten ist aufgeklärt worden, welche genetische Veränderung für „sweet quinoa“ verantwortlich ist (Jarvis *et al.*, 2017). Die Veränderung einer DNA-Base der kodierenden Sequenz oder die Exon-Insertion eines Transposons haben ein Gen inaktiviert, dessen Produkt, ein bHLH-Transkriptionsfaktor, die Saponin-Biosynthese im Samen aktiviert (**Abbildung 2-2**). Die Übertragung des gewünschten Merkmals könnte prinzipiell rasch über gezielte Inaktivierung des Genes mittels CRISPR-Cas passieren. Voraussetzung wären effektive Transformationsprotokolle. Herkömmliche Alternativen wären langwierige Züchtung durch Kreuzung und mehrmalige Rückkreuzung oder zufällige Mutagenisierung in der Hoffnung, dass eine der Tausenden von Mutationen das richtige Gen trifft und all die anderen Mutationen keine schädlichen Auswirkungen haben.



**Abbildung 2-2: Durch Genom-Editierung können Nutzpflanzen wie Quinoa (*Chenopodium quinoa*) (links) schneller züchterisch entwickelt werden.** Eine der erwünschten Eigenschaften ist der Verlust der Bildung von Saponinen, für den Menschen schädlichen Bitterstoffen, in der Samenschale ("sweet quinoa"-Eigenschaft). Die Sequenzierung des Genoms von *C. quinoa* sowie die Re-Sequenzierung zahlreicher Kultivare (Jarvis *et al.*, 2017) hat zwei verantwortliche Mutationsereignisse offenbart, die in unterschiedlichen Genotypen auftreten. Beide betreffen das *TSARL1*-Gen. Dieses kodiert für einen bHLH-Transkriptionsfaktor, der die Saponin-Synthese in der Samenschale aktiviert. Die eine Mutation führt zu einer durch ein vorzeitiges Stopcodon nicht-funktionalen Spleißvariante (rechts, oben), die andere besteht aus Transposon-Insertionen in Exons des Gens (rechts, unten). Mittels CRISPR-Cas wäre es nun möglich, das *TSARL1*-Gen zu inaktivieren und damit die "sweet quinoa"-Eigenschaft ohne die sehr zeitraubende Einkreuzung (*C. quinoa* ist tetraploid) in andere interessante Sorten zu übertragen (nach Clemens, 2021; Bildquelle: alpaventas über [www.pixabay.com](http://www.pixabay.com)).

### 2.3.3 Andere die Lebensmittelsicherheit beeinträchtigende pflanzliche Metabolite

In den vergangenen 10-15 Jahren haben sich die EFSA und andere für die Lebensmittelsicherheit verantwortliche Institutionen zunehmend mit Acrylamid beschäftigt, das beim Erhitzen auf Temperaturen über 120 °C in zahlreichen Grundnahrungsmitteln wie Kartoffel- und Getreideprodukten entsteht (Chain (CONTAM), 2015). Erstmals in Lebensmitteln nachgewiesen wurde Acrylamid, das als Gruppe 2A-Kanzerogen, d.h. wahrscheinlich krebserregend eingestuft ist, im Jahre 2002. Seit 2017 existieren innerhalb der EU mit der Verordnung 2017/2158 der Kommission Richtwerte für verschiedene Lebensmittel und eine Verpflichtung zu Minimierungsmaßnahmen (EUR-Lex - 32017R2158 - EN - EUR-Lex<sup>2</sup>)

Acrylamid entsteht in einer Maillard-Reaktion von Zuckern und freien Aminosäuren während des Backens oder Frittierens kohlenhydratreicher Nahrungsmittel. Insbesondere die Aminosäure Asparagin trägt wesentlich zur Bildung von Acrylamid bei. Aus diesem Grund wird eine Verringerung der Asparagin-Konzentrationen in den relevanten pflanzlichen Organen angestrebt, um die Bildung von Acrylamid bei der Herstellung der jeweiligen Produkte wie Brot, Gebäck oder Cerealien zu minimieren. Für den Brotweizen *Triticum aestivum*, dem bei dieser Produktpalette offensichtlich besondere Bedeutung zukommt, wurde vor kurzem berichtet, dass durch die CRISPR-Cas-vermittelte Inaktivierung eines Gens eine Reduktion der Asparagin-Gehalte des Korns erreicht werden konnte (Raffan *et al.*, 2021). Ein Schlüsselenzym der Asparagin-Synthese ist die Asparagin-Synthetase, kodiert vom *TaASN2*-Gen.

<sup>2</sup> <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>

Durch Transformation von Embryos mit anschließender Regeneration sowie der Verwendung von vier verschiedenen Guide-RNAs konnten Weizenpflanzen generiert werden, die in allen sechs Allelen des *TaASN2*-Gens Deletionen und/oder Insertionen aufwiesen und damit inaktiv waren. Samen dieser Pflanzen enthielten im besten Falle bis zu 90 % weniger Asparagin im Korn.

Der editierte Weizen konnte inzwischen in umfangreichen Feldversuchen getestet werden. Dies war erstmals in Europa möglich, da das Vereinigte Königreich seit dem „Brexit“ nicht mehr an die EU-Regulierung gebunden ist und für genomeditierte Pflanzen ein eigenes Regelwerk erlassen konnte. Erste Ergebnisse der Feldversuche sind im Februar 2023 veröffentlicht worden<sup>3</sup> (Raffan *et al.*, 2023). Die Körner des genomeditierten Weizens enthielten bis zu 50 % weniger Asparagin. Nach Verarbeitung des Mehls wurde in den erhaltenen Produkten bis zu 45 % weniger Acrylamid nachgewiesen. Bemerkenswert ist zudem, dass die Ernteerträge denen der Ausgangssorte entsprachen. Dies galt nicht für Linien, bei denen einzelne *TaASN2*-Allele durch herkömmliche Zufallsmutagenese inaktiviert worden waren und die deshalb noch zahlreiche weitere Mutationen tragen, von denen einige offensichtlich nachteilig für den Ertrag sind.

#### 2.3.4 Toxische, nichtessentielle Elemente

Cadmium (Cd) und Arsen (As) zählen zu den problematischsten Umweltgiften. Die Weltgesundheitsorganisation WHO listet sie unter den „10 Chemicals of Major Public Health Concern“, neben z.B. Asbest oder Dioxinen<sup>4</sup>. Chronische Belastung mit Cd und As ist schon seit Jahrzehnten als gesundheitsbedrohlich bekannt. Beide Elemente sind Gruppe I-Kanzernogene. Cd akkumuliert zudem in den Nieren und kann diese schädigen.

Der wichtigste Weg der Cd-Exposition für den nicht rauchenden Teil der Bevölkerung ist der Konsum pflanzlicher Nahrungsmittel (beim Rauchen wird das in Tabakblättern gespeicherte Cd inhaliert; dies trägt bei Rauchern etwa 50 % zur insgesamt höheren Cd-Belastung bei) (Clemens *et al.*, 2013). Arsen wird vor allem über das Trinkwasser und durch den Verzehr von Reis aufgenommen. Dem Reis kommt für die As-Exposition deshalb eine besondere Bedeutung zu, weil er meist auf überfluteten Feldern angezogen wird. Unter den dann herrschenden reduzierenden Bedingungen liegt As weitgehend als Arsenit vor, welches besonders verfügbar und giftiger als das oxidierte Arsenat ist. Neueste Studien haben zudem gezeigt, dass auch organische Thioarsenate wie das hochtoxische Dimethylmonothioarsenat (DMMTA) in Reisböden entstehen (Wang *et al.*, 2020), von Reispflanzen aufgenommen werden können (Kerl *et al.*, 2019) und bis in das Korn gelangen (Dai *et al.*, 2022; Planer-Friedrich *et al.*, 2022).

In den letzten Jahren haben die von der EFSA vorgenommenen Einschätzungen der verfügbaren Evidenz bzgl. der Exposition und möglicher Gesundheitsgefährdungen zur Absenkung der EU-Grenzwerte für Cd und As in Lebensmitteln geführt. Verordnung 2021/1323 der Kommission setzt die Grenzwerte für Cd in verschiedenen Lebensmitteln jetzt je nach Produkt auf 20 bis 200 µg/kg Frischgewicht.

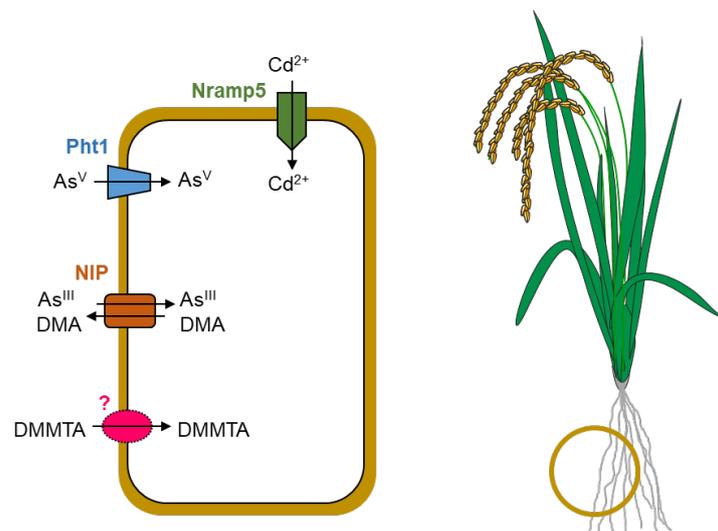
---

<sup>3</sup> siehe auch: <https://www.rothamsted.ac.uk/news/results-are-gene-edited-wheat-field-trial-delivers>

<sup>4</sup> <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern>

Dies soll die wöchentliche Cd-Aufnahme für Menschen in der EU bei unter 2,5 µg/kg Körpergewicht halten. Für anorganisches As in Reisprodukten wurden mit der EU-Verordnung 2015/1006 erstmals im Jahre 2015 Grenzwerte eingeführt, die am 3. März 2023 durch EU-Verordnung 2023/465 weiter abgesenkt wurden.

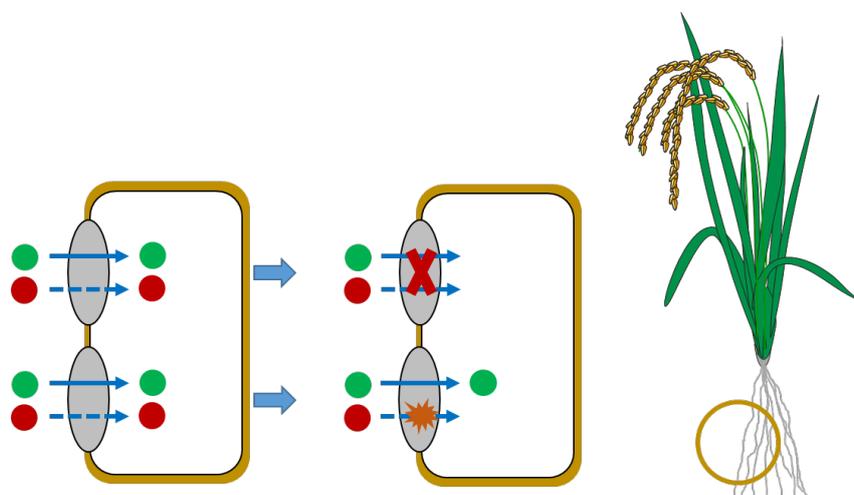
Elemente wie Cd und As haben keine bekannte biologische Funktion. Sie gelangen dennoch in pflanzliche und andere Zellen, weil Transporter-Proteine nicht perfekt selektiv für ihre natürlichen Substrate sind, in diesem Falle essentielle Mineralstoffe (**Abbildung 2-3**). Cd<sup>2+</sup>-Ionen werden über Mn<sup>2+</sup>-Transporter wie Nramp5 oder Fe<sup>2+</sup>-Transporter wie IRT1 in pflanzliche Zellen aufgenommen. Wichtige Aufnahmewege für anorganisches Arsen und das organische Dimethylarsenat (DMA) sind Phosphattransporter bzw. Silikattransporter (Clemens und Ma, 2016).



**Abbildung 2-3: Die Aufnahme von toxischen Elementen in Pflanzenzellen.** Elemente wie Cd und As sind nicht-essentiell, d.h. sie besitzen keine physiologische Funktion. Aufnahme in Zellen geschieht über Transporter für essentielle oder förderliche Elemente. Cd<sup>2+</sup>-Ionen werden in Reiswurzeln vor allem über den Mn<sup>2+</sup>-Transporter Nramp5 aufgenommen. Arsenat (As<sup>V</sup>) gelangt über Transporter (wie Pht1) für das chemisch ähnliche Phosphat in Zellen, Arsenit (As<sup>III</sup>) über Aquaglyceroporine der NIP-Familie, die in Reis unter anderem Silikat transportieren. Auch Dimethylarsenat (DMA) wird so transportiert. Der Aufnahmeweg für das hochtoxische Dimethylmonothioarsenat (DMMTA) ist unbekannt (nach Clemens, 2019).

Diese Erkenntnisse der Grundlagenforschung könnten jetzt genutzt werden, um die Aufnahme nicht-essentieller, potentiell hochtoxischer Elemente über gezielte Editierung von Transporter-Genen deutlich zu reduzieren (**Abbildung 2-4**). Die prinzipielle Machbarkeit dieses Ansatzes ist für Reispflanzen und Cd bereits gezeigt worden. Reis-Genotypen mit einer Defektmutation im Gen für OsNramp5, einen Mn<sup>2+</sup>-Transporter, zeigen unter realistischen Feldbedingungen eine mehr als 95 %ige Reduktion der Cd-Gehalte im Korn, während die Mn-Gehalte ausreichend hoch sind, da für dieses essentielle Mikroelement mehrere Aufnahmewege existieren (Ishikawa *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse wurden mit einer durch harte Kohlenstoff-Strahlung mutagenisierten Pflanze erreicht und ließen sich mittels CRISPR-Cas jetzt auf weitere Reiskultivare und andere Nutzpflanzenarten übertragen.

Ähnliches für As zu erreichen ist ebenfalls prinzipiell möglich, jedoch komplexer, da unterschiedliche Arsen-Formen existieren und verschiedene Transportwege relevant sind (**Abbildung 2-3**).



**Abbildung 2-4: Die Reduzierung der Aufnahme von toxischen Elementen durch die Editierung von Transporter-Genen.** Viele Transporter nehmen sowohl ein essentielles oder förderliches Element auf (grüner Punkt) wie auch ein nicht-essentielles, toxisches Element (roter Punkt). Die Aufnahme toxischer Elemente wie Cd oder As kann prinzipiell durch die Inaktivierung eines entsprechenden Transporter-Gens reduziert werden (oben) oder durch eine die Substratspezifität des Transporters modifizierende Editierung (unten). Letztere Strategie ist herausfordernder, da die Proteinstruktur verstanden sein muss und eine gezielte Editierung erforderlich ist (verändert nach Clemens, 2019)

## 2.4 Zusammenfassung und Thesen

Auf CRISPR-Cas basierende Techniken besitzen großes Potential die Lebensmittelsicherheit weiter zu verbessern. Dies ist schon jetzt, wenige Jahre nach Entwicklung der Technik, vielfältig dokumentiert, ohne das die technischen Möglichkeiten auch nur annähernd ausgeschöpft worden wären. Bisher handelt es sich praktisch ausschließlich um die Inaktivierung von Genen.

Das ALARA-Prinzip (**As Low As Reasonably Achievable**) gebietet, dass die durch Genom-Editierung erreichbare Reduktion schädlicher Inhaltsstoffe in die Praxis umgesetzt wird. Gesundheitsgefahren z.B. durch die chronische Cd- und As-Aufnahme mit der Nahrung sind ausreichend belegt und es ist möglich, die Konzentrationen dieser Stoffe in Lebensmitteln mittels CRISPR-Cas drastisch zu reduzieren.

Die vorgestellten genetischen Veränderungen gehören zur SDN1- oder SDN2-Kategorie, d. h. es entstehen Mutationen, die nur ein bis wenige Basenpaare(e) betreffen bzw. es werden kurze Sequenzabschnitte gezielt editiert. Der dauerhafte Einbau fremder DNA in das Genom erfolgt nicht und die Mutationen könnten so ununterscheidbar auch in der Natur auftreten.

Genetische Veränderungen dieser Art werden in vielen Ländern der Welt schon jetzt oder voraussichtlich in naher Zukunft nicht mehr als transgene Pflanzen reguliert (Buchholzer und Frommer, 2023). Damit können Innovationen für mehr Lebensmittelsicherheit bald schon Realität werden.

## 2.5 Literatur

- ASSOU, J., ZHANG, D., ROTH, K. D. R., STEINKE, S., HUST, M., REINARD, T., WINKELMANN, T., AND BOCH, J. (2022)** - *Removing the major allergen Bra j 1 from brown mustard (Brassica juncea) by CRISPR/Cas9*. *The Plant Journal* 109:649–663.
- BUCHHOLZER, M., AND FROMMER, W. B. (2022)** - *An increasing number of countries regulate genome editing in crops*. *New Phytologist* 237:12-15.
- CHAIN (CONTAM), E. P. ON C. IN THE F. (2015)** - *Scientific Opinion on acrylamide in food*. *EFSA Journal* 13:4104.
- CLEMENS, S. (2019)** - *Safer food through plant science: reducing toxic element accumulation in crops*. *J. Exp. Bot.* 70:5537–5557.
- CLEMENS, S. (2021)** - *Mehr Nachhaltigkeit durch Genomeditierung: Genetische Variation gezielt erzeugen und nutzen*. *Biologie in unserer Zeit* 51:337–345.
- CLEMENS, S., AND MA, J. F. (2016)** - *Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods*. *Annu Rev Plant Biol* 67:489–512.
- CLEMENS, S., AARTS, M. G. M., THOMINE, S., AND VERBRUGGEN, N. (2013)** - *Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning*. *Trends Plant Sci.* 18:92–99.
- DAI, J., TANG, Z., GAO, A.-X., PLANER-FRIEDRICH, B., KOPITKE, P. M., ZHAO, F.-J., AND WANG, P. (2022)** - *Widespread Occurrence of the Highly Toxic Dimethylated Monothioarsenate (DMMTA) in Rice Globally*. *Environ. Sci. Technol.* 56:3575–3586.
- DIMA, O., HEYVAERT, Y., AND INZÉ, D. (2022)** - *Interactive database of genome editing applications in crops and future policy making in the European Union*. *Trends in Plant Science* 27:746–748.
- DOUDNA, J. A., AND CHARPENTIER, E. (2014)** - *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science* 346:1258096.
- GAO, C. (2021)** - *Genome engineering for crop improvement and future agriculture*. *Cell* 184:1621–1635.
- ISHIKAWA, S., ISHIMARU, Y., IGURA, M., KURAMATA, M., ABE, T., SENOURA, T., HASE, Y., ARAO, T., NISHIZAWA, N. K., AND NAKANISHI, H. (2012)** - *Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice*. *PNAS* 109:19166–71.
- JARVIS, D. E., HO, Y. S., LIGHTFOOT, D. J., SCHMÖCKEL, S. M., LI, B., BORM, T. J., ... & TESTER, M. (2017)** - *The genome of *Chenopodium quinoa**. *Nature*, 542(7641), 307-312.
- KERL, C. F., SCHINDELE, R. A., BRÜGGENWIRTH, L., COLINA BLANCO, A. E., RAFFERTY, C., CLEMENS, S., AND PLANER-FRIEDRICH, B. (2019)** - *Methylated Thioarsenates and Monothioarsenate Differ in Uptake, Transformation, and Contribution to Total Arsenic Translocation in Rice Plants*. *Environ. Sci. Technol.* 53:5787–5796.
- LI, S., LIN, D., ZHANG, Y., DENG, M., CHEN, Y., LV, B., ... & GAO, C. (2022)** - *Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties*. *Nature*, 602(7897), 455-460.
- MEYER, R. S., DUVAL, A. E., AND JENSEN, H. R. (2012)** - *Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops*. *New Phytologist* 196:29–48.
- OLIVA, R., JI, C., ATIENZA-GRANDE, G., HUGUET-TAPIA, J. C., PEREZ-QUINTERO, A., LI, T., ... & YANG, B. (2019)** - *Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing*. *Nature biotechnology*, 37(11), 1344-1350.

- PLANER-FRIEDRICH, B., KERL, C. F., COLINA BLANCO, A. E., AND CLEMENS, S.** (2022) - *Dimethylated Thioarsenates: A Potentially Dangerous Blind Spot in Current Worldwide Regulatory Limits for Arsenic in Rice*. *J Agric Food Chem* 70:9610–9618.
- RADAUER, C., AND BREITENEDER, H.** (2007) - *Evolutionary biology of plant food allergens*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120:518–525.
- RAFFAN, S., SPARKS, C., HUTTLY, A., HYDE, L., MARTIGNAGO, D., MEAD, A., ... & HALFORD, N. G.** (2021) - *Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene TaASN2*. *Plant biotechnology journal*, 19(8), 1602-1613.
- RAFFAN, S., ODDY, J., MEAD, A., BARKER, G., CURTIS, T. Y., USHER, S. L., ... & HALFORD, N. G.** (2023) - *Field assessment of genome edited, low asparagine wheat: Europe's first CRISPR wheat field trial*. *Plant Biotechnology Journal*.
- SÁNCHEZ-LEÓN, S., GIL-HUMANES, J., OZUNA, C. V., GIMÉNEZ, M. J., SOUSA, C., VOYTAS, D. F., AND BARRO, F.** (2018) - *Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9*. *Plant Biotechnology Journal* 16:902–910.
- SÁNCHEZ-PÉREZ, R., PAVAN, S., MAZZEO, R., MOLDOVAN, C., CIGLIANO, R. A., CUETO, J. D., RICCIARDI, F., LOTTI, C., RICCIARDI, L., DIGENTA, F., ET AL.** (2019) - *Mutation of a bHLH transcription factor allowed almond domestication*. *Science* 364:1095–1098.
- SAWAI, S., OHYAMA, K., YASUMOTO, S., SEKI, H., SAKUMA, T., YAMAMOTO, T., ... & UMEMOTO, N.** (2014) - *Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato*. *The Plant Cell*, 26(9), 3763-3774.
- WANG, J., KERL, C. F., HU, P., MARTIN, M., MU, T., BRÜGGENWIRTH, L., ... & PLANER-FRIEDRICH, B.** (2020) - *Thiolated arsenic species observed in rice paddy pore waters*. *Nature Geoscience*, 13(4), 282-287.

## 3 Synthetische Biologie: Aktuelle Entwicklungen auf dem Weg zu einer Schlüsseltechnologie

**Tobias Erb**

*Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie und Zentrum für synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO), Marburg*

### 3.1 Zusammenfassung

Unter dem Sammelbegriff „synthetische Biologie“ werden verschiedene Ansätze zusammengefasst, die zum Ziel haben neuartige biologische Systeme zu erzeugen. Dabei werden Bottom-up und Top-Down Ansätze unterschieden. Molekularbiologische, technologische und (bio)informatische Neuerungen lassen das Ziel, Organismen für verschiedenste Anwendungen maßgeschneidert zu erzeugen, näher rücken. Biofoundries, welche die automatisierte Assemblierung von DNA-Fragmenten und das automatisierte Handhabung von genetisch modifizierten Organismen ermöglichen, spielen eine wichtige Rolle in der Transformation der synthetischen Biologie zu einer Schlüsseltechnologie für biotechnologische und medizinische Anwendung.

### 3.2 Einführung

Unter „synthetischer Biologie“ fasst man Ansätze zusammen, die sich mit der gezielten Erzeugung biologischer Systeme mit neuen Eigenschaften beschäftigen [1]. Bei der synthetischen Biologie handelt es sich nach Ansicht von Forschungsförderungsorganisationen, wie der DFG, nicht um ein inhaltlich definiertes neues Forschungsfeld, sondern um eine konzeptionell neue Herangehensweise in der Biologie, die sich von den klassisch analytisch-deskriptiven Ansätzen, wie sie bisher verwendet wurden, unterscheidet [2,3].

Mit ihrem dezidierten synthetisch-konstruktiven Ansatz folgt die Biologie damit einer Entwicklung, die anderen wissenschaftlichen Disziplinen bereits durchlaufen haben; beispielsweise die Erweiterung der Chemie (d. h. die Lehre vom Aufbau, den Eigenschaften und der Umwandlung chemischer Stoffe) um die Synthesechemie (d. h. das gezielte Erzeugen neuartiger Moleküle mit neuen Eigenschaften), oder die Ingenieurwissenschaften, die die grundlegenden Erkenntnisse aus der Physik in neue (technologische) Anwendungen überführen.

Obwohl die synthetische Biologie aktuell immer noch einen starken Grundlagenforschungs-Charakter hat, ergeben sich bereits jetzt erste Anwendungsmöglichkeiten. Vor allem im angloamerikanischen Raum wird die synthetische Biologie als Motor einer modernen Bio-ökonomie/Biotechnologie verstanden und durch strategische Forschungspolitik und -förderung aktiv entwickelt [2]. Das wirtschaftliche Potenzial der synthetischen Biologie wird von Marktforschungsinstituten aktuell mit ca. 10 Milliarden Euro und bis 2030 zwischen 40 und 100 Milliarden Euro beziffert [4].

### 3.3 Aktuelle Forschungsfragen: Synthetische Biologie in Grundlage und Anwendung

In Bezug auf ihre Forschungsfragen beschäftigt sich die synthetische Biologie sowohl mit fundamentalen Erkenntnisgewinn, wie auch mit anwendungsorientierten Fragestellungen. In der Grundlagenforschung werden unter anderem Fragen zur Entstehung von Leben (z. B. Realisierung von Proto- und künstlichen Zellen [5]), der grundlegenden Organisation biologischer Systeme und Prozesse (z. B. in vitro-Transkription/Translationssysteme [6], zellfreier Metabolismus [7]), sowie zur Erweiterung des natürlichen Lösungsraums (z. B. das Design neuer Proteine und Enzyme [8], Verwendung nicht-natürlicher Aminosäuren und Nukleotiden [9]) behandelt. Auf der Anwendungsseite werden unter anderem neue Technologien zum Einsatz in der Biotechnologie & Medizin erforscht, die Zugang zu neuen biobasierten Molekülen (z. B. Synthese von Spinnenseide und Lösungsmitteln [10]) und nachhaltigen Produktionsverfahren (Gewinnung von Abfallströmen bzw. CO<sub>2</sub> als Rohstoff für eine zirkuläre Bioökonomie [7]), neuen Möglichkeiten in Therapie und Diagnostik (maßgeschneiderte (Bio)moleküle, in vitro und in vivo point-of-care Ansätze bzw. Screens [11]), günstige und sensitive Biosensoren (z. B. Kontrolle von Wasserqualität), neue Ansätze zu Nahrungssicherheit und Landwirtschaft (z. B. Engineering von robusten Pflanzensorten, Pflanzen mit verbesserten Nährwerten bzw. erhöhten Erträgen durch verbesserte Fotosynthese), bis hin zur Verwendung von DNA als Informationsspeicher ermöglichen.

### 3.4 Ansätze der synthetischen Biologie: Zwischen Top-down und Bottom-up

Grundsätzlich kann in der synthetischen Biologie zwischen zwei Ansätzen unterschieden werden: Top-Down und Bottom-Up. Bei den Top-down Ansätzen handelt es sich um eine eher holistische Arbeitsweise, bei der existierende, d. h. natürlich vorkommende biologische Systeme (Zellbausteine, Zellen bzw. ganze Organismen) modifiziert werden, um neuen Eigenschaften zu erzeugen. Diese Arbeitsweise steht eher in der Tradition molekularbiologischer bzw. gentechnologischer Ansätze und kann als konsequente Weiterentwicklung dieser Methoden verstanden werden. Ein Beispiel ist die Manipulation des Bakteriums *Escherichia coli* zur Gewinnung von 1,4-Butandiol [10,12]. Dieses wichtige organische Lösungsmittel konnte bisher nicht auf biologische Weise gewonnen werden und musste daher aus fossilen Rohstoffen erzeugt werden.

Im Gegensatz dazu beschäftigen sich Bottom-up-Ansätze mit dem Aufbau biomimetischer Systeme, beispielsweise künstlichen Zellen oder „lebenden“ Materialien [5]. Hier werden aus einzelnen (biologischen) Komponenten biologische Systeme von Grunde auf neu erzeugt bzw. (re)konstruiert. Auch wenn es sich hier größtenteils um Grundlagenforschung handelt, gibt es bereits einige konkrete Anwendungsbereiche, wie zum Beispiel dem „zellfreien“ bzw. „in vitro“-Metabolismus, d. h. Multistritt-Katalyse zur Herstellung von komplexen Molekülen [7,13], oder auch in vitro Transkription/Translationssysteme zur Diagnostik, Biosensorik bzw. Hochdurchsatzscreening [11].

### 3.5 Neue Technologien ermöglichen synthetisch-biologische Forschung und Anwendung

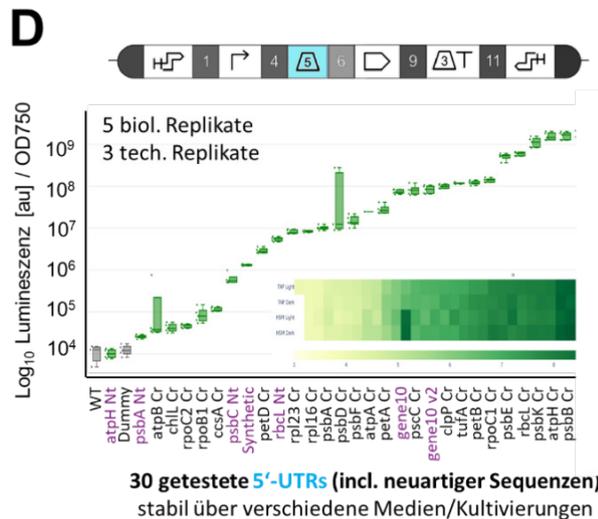
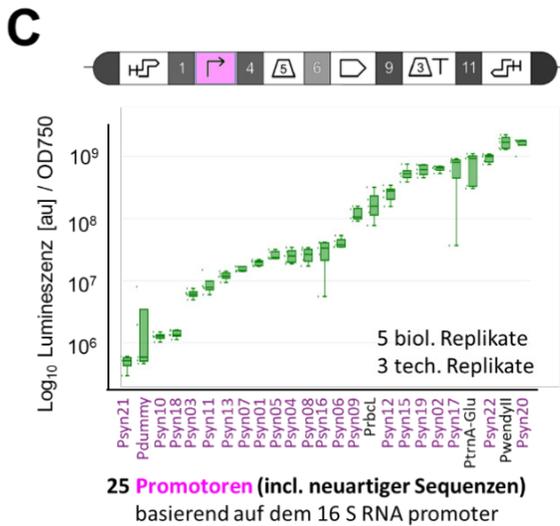
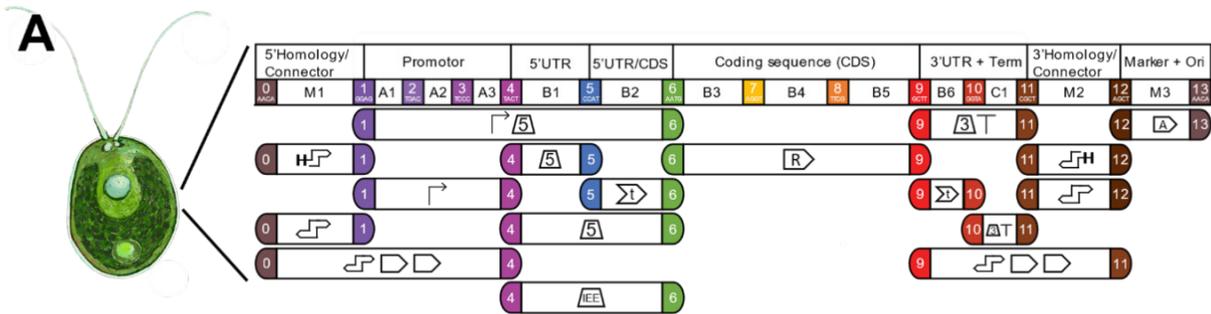
Die Entwicklung der synthetischen Biologie wird flankiert von neuen technologischen Möglichkeiten, sogenannten „enabling technologies“. Zu diesem zählen vor allem neue Genomeditierende Technologien, DNA-Synthesen im Großmaßstab [14,15], computerunterstützte Verfahren [16] und Labor-Automatisierungsprozesse, die in den letzten Jahren in immer mehr Forschungslaboren Einzug gehalten haben.

Durch die „Genschere“ CRISPR-Cas und vielzählige Varianten ist es in der Zwischenzeit möglich in einer Vielzahl von Organismen gezielte Knock-In, Knock-Outs, Knock-Downs, sowie basengenaue Editierungen zu erzeugen und diese auch parallel bzw. in sogenannten Multiplexansätzen durchzuführen. Damit ergeben sich komplett neue Möglichkeiten schnell und gezielt genetische Varianten zu erzeugen, die sich im Idealfall nicht von natürlichen Mutationen unterscheiden. Immer größere DNA-Fragmente (1-5 kb) können für wenige Cents per base (0.1-0.2 € pro bp) bestellt werden, und zu größeren Konstrukten, d. h., von Mega-Plasmiden, bis hin zu kompletten (mikrobiellen) Genomen zusammengesetzt werden [14,15].

Eine weitere wichtige Methodik, die in der synthetischen Biologie Einzug gehalten hat, sind computergestützte Technologien, die es erlauben neue biologische Systeme zu erzeugen bzw. zu optimieren. Dabei zählen vor allem Verfahren, die auf maschinellem Lernen basiert sind, zu den aktuell wichtigsten Treibern der Entwicklung. So konnten in den letzten Jahren mithilfe dieser Ansätze neue Protein-Architekturen und komplexe biologischen Netzwerken etabliert und optimiert werden [16,17,18]. Vor allem in Verbindung mit Laborautomatisierung können multiple Optimierungszyklen durchlaufen werden, um durch „Design-Build-Test“ die jeweiligen biologischen Systeme effizient und robust zu erzeugen.

### 3.6 Biofoundries: Automatisierte DNA-Synthesen

Wie oben ausgeführt ist die gezielte DNA-Synthese eine Schlüsseltechnologie der synthetischen Biologie. Die Assemblierung und das Testen genetischer Fragmente erfolgt dabei immer mehr automatisiert und in speziellen Zentren, sogenannten „Biofoundries“ [19,20]. Biofoundries erlauben die standardisierte Synthese von DNA-Konstrukten aus einfacheren Einzelteilen mit relativ geringem Aufwand und der Möglichkeit tausende verschiedener genetischer Varianten zu erzeugen, die im Anschluss im Hochdurchsatz charakterisiert werden können. Ein Beispiel, für ein solches „Modulares Cloning Kit“ für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, das in der MaxGENESYS Biofoundry etabliert wurde, ist in **Abbildung 3-1** gezeigt. Die Automatisierung ermöglicht es Personal, Material und Zeitaufwand einzusparen, so dass durch Biofoundries genetisch modifizierter Organismen aktuell mindestens um einen Faktor 10-20 effizienter erzeugt und gehandhabt werden können als mithilfe händischer Laborarbeit [20].



**Abbildung 3-1:** Standardisierte Zusammensetzung von DNA-Fragmenten am Beispiel eines „Modularen Cloning Kits“ für plastidäre Expressionen in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. (A) Aufbau des „Modularen Cloning Kits“: Aus vorhandenen DNA-Bausteinen können Kombinationen und Varianten-Bibliotheken von verschiedenen Elementen erzeugt werden. (B) Beispielbilder für die automatisierte Verarbeitung und Handhabung von Chlamydomonas Transformanten mittels Labor-Robotik in der MaxGENESYS Biofoundry. (C) Beispiel für das Testen einer Bibliothek von 25 verschiedenen Promotoren mit einem Lumineszenz-Reporter als Read-out. (D) Beispiel für das Testen einer Bibliothek an 34 verschiedenen 5'-UTR Sequenzen mit einem Lumineszenz-Reporter als Read-out.

In den letzten Jahren sind an Spitzenforschungsinstituten, wie dem Broad Institute des Massachusetts Institutes of Technology, der National University of Singapore, dem Imperial College in London und weiteren Orten in den USA, dem Vereinigten Königreich und China mehrere solcher Biofoundries entstanden.

In Deutschland wurde mit der MaxGENESYS Facility der Max-Planck-Gesellschaft kürzlich eine erste Biofoundry etabliert<sup>1</sup>. Auch im industriellen Life-Science-Sektor, speziell in den USA, haben sich erste Anbieter etabliert, die Entwicklung genetischer Systeme über Biofoundries als Servicedienstleistung anbieten und unter anderem auch mit deutschen Marktführern aus der Pharma- und Chemie-Branche, zusammenarbeiten.

Nach dem standardmäßigen „Lesen der genetischen Information“ (d. h. der „Next Generation Sequencing Revolution“) gewinnt damit das „Schreiben genetischer Information“ rasant an Bedeutung und findet in der Grundlagenforschung, aber auch der industriellen Forschung und Produktion in Anwendung. Aktuelle und zukünftige Entwicklungen in Digitalisierungs-, Automatisierungs- und Informationstechnologien werden diesen Trend zur Erzeugung und Analyse biologischer Systeme weiter beflügeln.

Analog zu anderen industriellen Prozessen bzw. Technologien, könnte die aktuelle Entwicklung in der Biotechnologie mittelfristig zur Konsolidierung und Standardisierung von verwendeten Methoden, Organismen, genetischen Bauteile und Daten führen, was die biologische Sicherheit und Innovationsgeschwindigkeit erhöhen könnte [21, 22]. Voraussetzung dafür wäre die Entwicklung bzw. Genehmigung sicherer Plattformorganismen (sogenannter „biologischer Chassis“), sowie genormter genetischer Elemente (Promotoren, Terminatoren, etc.), die den Übergang in eine standardisierte Forschungs- und Produktionslandschaft in Biotechnologie und Medizin ermöglichen könnte [23].

In Europa beschäftigte sich das von der EU-Kommission geförderte Konsortium BioRoboost<sup>2</sup> mit wissenschaftlichen, technischen, ökonomischen, und gesellschaftlichen Herausforderungen dieser Entwicklung. Ähnliche Projekte zur Standardisierung in der synthetischen Biologie wurden bzw. werden auch in den USA verfolgt<sup>3</sup>. Eine Herausforderung stellt aber immer noch die Tatsache dar, dass das (Fein-)Verhalten biologischer Bausteine kontextabhängig ist und komplexen Regeln unterliegt. So wird die Ableseaktivität von Promotern von der DNA-Sequenz vor dem Promoter und der Position auf dem Chromosom bestimmt. Maschinelles Lernen kombiniert mit Hochdurchsatz-Experimenten bietet die Chance diese Designregeln besser abzuleiten und in Zukunft (noch) prädiktiver zu werden, was den standardisierten Einsatz dieser Elemente weiter erleichtern wird.

### 3.7 Hinweis

Dieser Artikel basiert in Auszügen auf „Kapitel 8: Synthetische Biologie“ des „Fünften Gentechnologieberichts“ [3].

---

<sup>1</sup> siehe: <https://www.mpi-marburg.mpg.de/927693/maxgenesys>

<sup>2</sup> siehe: <https://cordis.europa.eu/project/id/820699>

<sup>3</sup> siehe: <https://www.nist.gov/programs-projects/synthetic-biology-standards-consortium-sbsc>

### 3.8 Literatur

- [1] **BECKER, A., ERB, T.J., FRITZ, G., KELLMANN, J.-W., SOURJIK, V. UND WALDMINGHAUS, T.** (2017) – *Synthetische Biologie – Im Baukasten das Leben verstehen*. *Biologie in Unserer Zeit* 47:298-305
- [2] *Synthetische Biologie - Standortbestimmung* (2018) – Hrsg: **STÄNDIGE SENATSKOMMISSION FÜR GRUNDSATZFRAGEN DER GENFORSCHUNG DER DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT** ([https://www.dfg.de/download/pdf/dfg\\_im\\_profil/geschaeftsstelle/publikationen/stellungnahmen\\_papiere/2018/181008\\_synthetische\\_biologie\\_standortbestimmung.pdf](https://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/geschaeftsstelle/publikationen/stellungnahmen_papiere/2018/181008_synthetische_biologie_standortbestimmung.pdf))
- [3] *Kapitel 8: Synthetische Biologie: Top-down- und Bottom-up-Ansätze*, Fünfter Gentechnologiebericht (2021) – Hrsg: **FEHSE, B., HUCHO, F., BARTFELD, S., CLEMENS, S., ERB, T.J., U.A.**, Nomos Verlag, Baden-Baden.
- [4] *Factsheet GAO-23-106648* (2023) – **U.S. GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE** (<https://www.gao.gov/products/gao-23-106648>)
- [5] **SCHWILLE, P., SPATZ, J., LANDFESTER, K., BODENSCHATZ, E., HERMINGHAUS, S., SOURJIK, V., ERB, T.J., BASTIAENS, P., LIPOWSKY, R., HYMAN, A., DABROCK, P., BARET, J.C., VIDAKOVIC-KOCH, T., BIELING, P., DIMOVA, R., MUTSCHLER, H., ROBINSON, T., TANG, T.D., WEGNER, S. AND SUNDMACHER, K.** (2018) – *MaxSynBio: Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up*. *Angewandte Chemie International Edition* 57:13382-13392.
- [6] **GARENNE, D. AND NOIREAUX, V.** (2019) – *Cell-free transcription-translation: engineering biology from the nanometer to the millimeter scale*. *Current Opinion in Biotechnology* 58:19-27
- [7] **DIEHL, C., GERLINGER, P.D., PACZIA, N. AND ERB, T.J.** (2023) – *Synthetic anaplerotic modules for the direct synthesis of complex molecules from CO<sub>2</sub>*. *Nature Chemical Biology* 19:168-175
- [8] **PAN, X. AND KORTEMME, T.** (2021) – *Recent advances in de novo protein design: Principles, methods, and applications*. *Journal of Biological Chemistry* 296:100558
- [9] **AGOSTINI, F., VÖLLER, J.-S., KOKSCH, B., ACEVEDO-ROCHA, C.G., KUBYSHKIN, V. UND BUDISA, N.** (2017) – *Biokatalyse mit nicht-natürlichen Aminosäuren: Enzymologie trifft Xenobiologie*. *Angewandte Chemie* 129: 9810-9835
- [10] **YIM, H., HASELBECK, R., NIU, W., PUJOL-BAXLEY, C., BURGARD, A., BOLDT, J., KHANDURINA, J., TRAWICK, J.D., OSTERHOUT, R.E., STEPHEN, R., ESTADILLA, J., TEISAN, S., SCHREYER, H.B., ANDRAE, S., YANG, T.H., LEE, S.Y., BURK, M.J. AND VAN DIEN, S.** (2011) – *Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol*. *Nature Chemical Biology* 7:445-452
- [11] **HUNT, A.C., VÖGELI, B., HASSAN, A.O., GUERRERO, L., KIGHTLINGER, W., YOESEP, D.J., KRÜGER, A., DEWINTER, M., DIAMOND, M.S., KARIM, A.S. AND JEWETT, M.C.** (2023) – *A rapid cell-free expression and screening platform for antibody discovery*. *Nature Communications* 14:3897
- [12] **TROTTER, C.L., BABU, G.S. AND WALLACE, S.** (2023) – *Engineering biology for sustainable 1,4-butanediol synthesis*. *Trends in Biotechnology* 41:286-288
- [13] **BIRMINGHAM, W.R., STARBIRD, C.A., PANOSIAN, T.D., NANNEMANN, D.P., IVERSON, T.M. AND BACHMANN, B.O.** (2014) – *Bioretrosynthetic construction of a didanosine biosynthetic pathway*. *Nature Chemical Biology* 10:392-9
- [14] **HUTCHISON, C.A. 3RD, CHUANG, R.Y., NOSKOV, V.N., ASSAD-GARCIA, N., DEERINCK, T.J., ELLISMAN, M.H., GILL, J., KANNAN, K., KARAS, B.J., MA, L., PELLETIER, J.F., QI, Z.Q., RICHTER, R.A., STRYCHALSKI, E.A., SUN, L., SUZUKI, Y., TSVETANOVA, B., WISE, K.S., SMITH, H.O., GLASS, J.I., MERRYMAN, C., GIBSON, D.G. AND VENTER, J.C.** (2016) *Design and synthesis of a minimal bacterial genome*. *Science*. 351:aad6253
- [15] **ROBERTSON, W.E., FUNKE, L.F.H., DE LA TORRE, D., FREDENS, J., WANG, K. AND CHIN, J.W.** (2021) – *Creating custom synthetic genomes in Escherichia coli with REXER and GENESIS*. *Nature Protocols* 16:2345-2380
- [16] **PANDI, A., DIEHL, C., YAZDIZADEH KHARRAZI, A., SCHOLZ, S.A., BOBKOVA, E., FAURE, L., NATTERMANN, M., ADAM, D., CHAPIN, N., FOROUGHIJABBARI, Y., MORITZ, C., PACZIA, N., CORTINA, N.S., FAULON, J.L. AND**

- ERB, T.J.** (2022) – *A versatile active learning workflow for optimization of genetic and metabolic networks*. Nature Communications 13:3876
- [17] **MCLEAN, R., SCHWANDER, T., DIEHL, C., CORTINA, N.S., PACZIA, N., ZARZYCKI, J. AND ERB, T.J.** (2023) – *Exploring alternative pathways for the in vitro establishment of the HOPAC cycle for synthetic CO<sub>2</sub> fixation*. Science Advances 9:eadh4299
- [18] **FERRUZ, N., SCHMIDT, S. AND HÖCKER, B.** (2022) – *ProtGPT2 is a deep unsupervised language model for protein design*. Nature Communications 13:4348
- [19] **CHAO, R., MISHRAS SI, T. AND ZHAO, H.** (2017) – *Engineering biological systems using automated biofoundries*. Metabolic Engineering 42:98-108
- [20] **HILLSON, N., CADDICK, M., CAI, Y., CARRASCO, J.A., CHANG, M.W., CURACH, N.C., BELL, D.J., LE FEUVRE, R., FRIEDMAN, D.C., FU, X., GOLD, N.D., HERRGARD, M.J., HOLOWKO, M.B., JOHNSON, J.R., JOHNSON, R.A., KEASLING, J.D., KITNEY, R.I., KONDO, A., LIU, C., MARTIN, V.J.J., MENOLASCINA, F., OGINO, C., PATRON, N.J., PAVAN, M., POH, C.L., PRETORIUS, I.S., ROSSER, S.J., SCRUTTON, N.S., STORCH, M., TEKOTTE, H., TRAVNIK, E., VICKERS, C.E., YEW, W.S., YUAN, Y., ZHAO, H. AND FREEMONT, P.S.** (2019) – *Building a global alliance of biofoundries*. Nature Communications 10:2040
- [21] **EISENSTEIN, M.** (2016) – *Living factories of the future*. Nature 531:401-403
- [22] **SAINZ DE MURIETA, I., BULTELE, M. AND KITNEY, R.I.** (2016) – *Toward the First Data Acquisition Standard in Synthetic Biology*. ACS Synthetic Biology 5:817-26
- [23] **DE LORENZO, V., KRASNOGOR, N. AND SCHMIDT, M.** (2021) – *For the sake of the Bioeconomy: define what a Synthetic Biology Chassis is!* New Biotechnology 60:44-51

## 4 Neue Entwicklungen für die transgen-freie Gen-Editierung in Pflanzen

**Caroline Gutjahr**

*Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm*

Pflanzen stellen die Grundlage tierischen und menschlichen Lebens dar. Der moderne Mensch nutzt Pflanzen für die Ernährung, Fütterung von Nutztieren, Herstellung von Kleidung, Kraftstoffen, Medikamenten und für ornamentale Zwecke. Die Diversität der Pflanzen beruht auf Veränderungen der DNA, die durch verschiedene Prozesse hervorgerufen werden. Diese Veränderungen kommen z. B. durch Fehler bei der Replikation zustande, oder die DNA mutiert durch Umwelteinwirkung wie UV-Strahlung oder Chemikalien, oder spontan aufgrund von De-Purinierung von Guaninen oder De-Aminierung von Cytosinen, die auf die chemischen Eigenschaften dieser Basen zurückzuführen sind. Im Fall der De-Purinierung von Guanin wird zufällig eine neue Base eingebaut, was mit 75%er Wahrscheinlichkeit zu einer Mutation führt. Die De-Aminierung führt in der Regel zu einem Austausch von Cytosin gegen Thymin. Diese spontanen Mutationen treten sehr häufig auf und können je nach Zelltyp zwischen 100 bis 10.000 Mutationen pro Zelle und Tag betragen (Pierce, 2012). Die Mutationsrate ist somit das Ergebnis eines „Kampfes“ zwischen spontan entstehenden Mutationen und DNA-Reparaturenzymen.

Dramatischere genomische Rearrangements können während der Rekombination in der Meiose und durch Transposonen hervorgerufen werden (Pierce, 2012). Letztere werden auch als ‚springenden Gene‘ bezeichnet und können durch Insertion in anderen Genen Genfunktionen stören oder bei der Exzision aus dem Genom Teile von Genen oder deren regulatorischen Sequenzen mitreißen und an anderen Stellen im Genom einfügen. Die asymmetrische Verteilung von homologen Transposonen im Genom kann während des crossing over in der Meiose zu Rekombination nicht homologer DNA-Stränge und somit zur Neuverteilung von Chromosomen Abschnitten führen (Pierce, 2012). Transposonen können aufgrund ihrer Vermehrungsfähigkeit in großen Mengen in Genomen vorkommen. Zum Beispiel besteht das Genom der Maislinie B73 zu 85% aus Transposonen (Schnable et al., 2009).

Pflanzengenome sind also sehr dynamisch und spontan großen Veränderungen ausgesetzt. Dies wird in einem Experiment an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* exemplarisch gezeigt. Linien wurden über Einzelsamenabstammung (*single seed descent*) über 30 Generationen vermehrt und akkumulierten über diese 30 Generationen hinweg 99 Mutationen und 17 kleine genomische Insertionen und Deletionen (Ossowski et al., 2010). Solche spontan auftretenden Mutationen wirken als Antriebsfeder der Evolution und bildeten gleichzeitig eine Grundlage für die Pflanzenzüchtung. Je nachdem, welche Gene betroffen sind, können nur wenige Mutation große Veränderungen in der Morphologie und/oder Physiologie der Pflanze hervorrufen. Zum Beispiel sind die größten morphologische Veränderungen zwischen der Wildpflanze Teosinte und dem daraus gezüchteten Mais auf Mutationen in nur 5 Genloci zurückzuführen (Beadle, 1980).

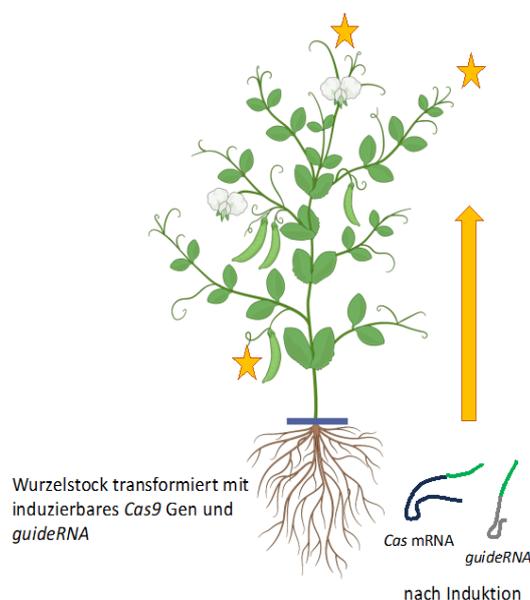
Die natürliche Dynamik von Pflanzengenomen und die gleichzeitige Möglichkeit auf Grundlage weniger Mutationen Pflanzen zu domestizieren lassen präzise Gen-Editierung mit Hilfe der sogenannten Genschere im Sinne der Ernährungssicherheit als sinnvolles und nebenwirkungsarmes Werkzeug erscheinen.

#### 4.1 Transgen-freie Genom-Editierung

Der Unterschied zwischen klassischer Züchtung und Gentechnik, sowie der Mechanismus der Gen-Editierung wurden in der letzten Ausgabe dieser Broschüre ausführlich beschrieben (Schindele et al., 2019). Der Artikel enthält auch Ausführungen zu den Vorteilen und Erfolgen der Gen-Editierung in Pflanzen (Schindele et al., 2019). Ich möchte daher nicht nochmals darauf eingehen, sondern neuere Entwicklungen in der Transgen-freien Genom-Editierung beschreiben. Die herkömmliche Genom-Editierung von Nutzpflanzen beinhaltet die genetische Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* mit Expressionkassetten, welche das Cas9 oder Cpf1-Enzym und guideRNAs kodieren. Diese Transgene können nach erfolgter Editierung durch Rückkreuzen mit dem Wildtyp oder z. B. im sogenannten Transgene Killer CRISPR system (TKC) wieder entfernt werden (He et al., 2018). Für das TKC-System wird eine Expressionskassette in der gleichen T-DNA (das Stück DNA, welches mit Hilfe von Agrobakterien in den Pflanzenzellkern geschleust und dort in das Genom eingebaut wird), welche auch die Gene für Cas9 Gen und *guideRNA* enthält, eingebaut. Diese enthält ein Gen, welches unter der Kontrolle eines Embryo-spezifischen Promoters exprimiert wird und ein toxisches Protein kodiert. Die Expression des Toxins findet nur im Pflanzenembryo statt, so dass Genomeditierung im Gewebekulturstadium erfolgen kann, aber nur Samen ohne Transgen gebildet werden, weil die Embryonen, die das Transgen enthalten, durch das Toxin abgetötet werden (He et al., 2018). Eine weitere Methode ist die transiente Expression von Cas9 (oder andere geeignete Nukleasen wie Cpf1) und guideRNAs in Gewebekultur (Zhang et al., 2016). Trotz Rückkreuzung oder Anwendung des TKC-Systems und insbesondere bei transienter Expression ist es möglich, dass kleine Transgen-Fragmente, die zufällig an unbekanntenen Stellen im Genom inseriert sind, im Genom verbleiben. Hier wird es nötig sein, erforderliche Sorgfalt walten zu lassen, um die Entfernung aller Transgen-Fragmente sicherzustellen (Gu et al., 2021; Buchholzer und Frommer, 2022). (Eine andere Möglichkeit wäre, Grenzwerte für eine akzeptable Größe, Natur und Häufigkeit von Transgen Fragmenten festzustellen und festzulegen. Diese könnten, bei ausreichender Größe, durch preisgünstige Southern Blots auch gefolgt von Sanger-Sequenzierung der detektierten Fragmente detektiert werden, so dass kostenaufwändiges *next generation sequencing* vermieden werden könnte).

Zum Goldstandard sollten Verfahren der Genom Editierung werden, die vollständig ohne Transgenese auskommen. Mit Hilfe von *particle bombardment* (hierbei werden mit DNA, RNA und/oder Proteinen beschichtete Gold-Partikel in Zellen oder Protoplasten geschossen) oder Protoplasten-Transformation (*lipofection*) mit Polyethylenglycol und Calcium Ionen, können Ribonukleoproteine (RNPs), das heisst synthetisierte Cas9/Cpf1 gemeinsam mit der *guideRNA* in Pflanzenzellen eingebracht werden und dort direkt Gene editieren, ohne dass Plasmide und Gene in die Zellen transformiert werden müssen (Svitashev et al., 2016; Toda et al., 2019; Wu et al., 2020).

Die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten oder Zellkultur funktioniert nicht für alle Nutzpflanzenarten und -Sorten. Außerdem kann es während der Gewebekultur zu Chromosomen-Rearrangements kommen (Lee and Philipps, 1987). Ein neues sehr vielversprechendes Verfahren, welches ohne Transgenese und Gewebekultur auskommt wurde gerade entwickelt (Yang et al., 2023). Diese Verfahren hat das Potential die Genom-Editierung in Pflanzen zu revolutionieren. Es nutzt die Eigenschaft von bestimmten transfer-RNA Sequenzen aus, im Vaskulärgewebe der Pflanzen systemisch transportiert werden zu können. Dies funktioniert sogar über Pfropfungen und in manchen Fällen über Artgrenzen hinweg (Zhang et al., 2016; Yang et al., 2023). Ein Wildtyp-Spross kann auf einen transgenen Wurzelstock gepfropft werden, welcher Cas9 mRNA und guideRNAs exprimiert. Letztere sind mit den transfer-RNA Sequenzen fusioniert und können somit in den Spross transportiert, dort in Proteine übersetzt werden und zu Geneditierungen führen. Ist ein Sproßmeristem durch die Editierung betroffen, können die aus diesem Meristem gebildeten Samen erfolgreich editiert sein (Yang et al., 2023). Die transgene Wurzel stellt also das Werkzeug für Gen-Editierung im nicht-transgenen Sproß zur Verfügung. Diese Technologie birgt das Potential auch bisher nicht transformierbare Arten und Sorten der Genomeditierung zugänglich zu machen, weil ein nicht transgener Sproß gegebenenfalls auch über Artgrenzen hinweg auf einen transgenen Wurzelstock einer transformierbaren Art oder Sorte gepfropft werden kann. Desweiteren sollte keine Gefahr bestehen, dass Plasmid Fragmente im editierten Sproßgenom inserieren.



**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung der transgen-freien Gen-Editierung durch Pfropfen (Yang et al., 2023). Ein transgen-freier Sproß wird auf einen transgenen Wurzelstock gepfropft (die Pfropfungstelle ist durch einen blauen Balken dargestellt). Der Wurzelstock ist transgen für *guideRNAs* und das *Cas9*-Gen, welches durch einen (z. B. Estradiol-) induzierbaren Promoter angetrieben wird. Nach Induktion wird das *Cas9*-Gen exprimiert und die entstandenen *Cas9*-mRNAs (schwarz) gemeinsam mit den exprimierten *guideRNAs* (grau) in den Sproß transportiert, weil beide mit transfer-RNA Sequenzen (grün) fusioniert sind. Im Sproß werden die *Cas9*-mRNAs in Proteine übersetzt. Diese können mit Hilfe der *guideRNAs* Zielgene editieren. Wenn dieses in Sproßmeristemen geschieht, können Blüten und Samen editiert sein (orangefarbene Sterne). Die Erbsenpflanze stammt aus [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

## 4.2 Literatur

- BEADLE, G.W.** (1980) – *The ancestry of corn*. Scientific American. 242: 112-119.
- BUCHHOLZER, M. AND FROMMER, W.B.** (2022) – *An increasing number of countries regulate genome editing in crops*. New Phytologist 237: 12-15.
- GU, X., LIU, L. AND ZHANG, H.** (2021) – *Transgene-free genome editing in plants*. Frontiers in Genome Editing 3:805317.
- HE, Y., ZHU, M., WANG, L., WU, J., WANG, Q., WANG, R. AND ZHAO, J.** (2018) – *Programmed self-elimination of the CRISPR/Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants*. Molecular Plant 10: 1210-1213.
- LEE, M. AND PHILLIPS, R.L.** (1987) – *Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture*. Genome 29:1.
- OSSOWSKI, S., SCHNEEBERGER, K., LUCAS, LLEDO J.I., WARTHMAN, N., CLARK, R.M., SHAW, R.G., WEIGEL, D. AND LYNCH, M.** (2010) – *The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in Arabidopsis thaliana*. Science 327: 92-94.
- PIERCE, B.A.** (2012) – *Genetics, a conceptual approach*, 4<sup>th</sup> edition, WH Freeman & Co., New York, USA.
- SCHINDELE, A., SCHINDELE, P. AND PUCHTA, H.** (2012) – **CRISPR/CAS UND DIE REVOLUTION DER PFLANZENZÜCHTUNG**. LGL 8. Fachtagung Gentechnik, Band 12 der Schriftenreihe Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz. S. 7-18.
- SCHNABLE, P.S.** et al. (2009) – *The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics*. Science 326: 112-115.
- SVITASHEV, S., SCHWARTZ, C., LENDERTS, B., YOUNG, J. AND CIGAN, M.** (2016) – *Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes*. Nature Communications 7:13274.
- TODA, E., KOISO, N., TAKEBAYASHI, A., ICHIKAWA, M., KIBA, T., OSAKABE, K., OSAKABE, Y., SAKAKIBARA, H., KATO, N. AND OKAMOTO, T.** (2019) – *An efficient DNA-and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice*. Nature Plants 5: 363–368.
- WU, S., ZHU, H., LIU, J., YANG, Q., SHAO, X., BI, F., HU, C., HUO, H., CHEN, K. AND YI, G.** (2020) – *Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana*. BMC Plant Biology 20:425.
- YANG, L., MACHIN, F., WANG, S., SAPLAOURA, E. AND KRAGLER, F.** (2023) – *Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks*. Nature Biotechnology 41: 958–967.
- ZHANG, W., THIEME, C.J., KOLLWIG, G., APELT, F., YANG, L., WINTER, N., ANDRESEN, N., WALTHER, D. AND KRAGLER, F.** (2016) – *tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants*. Plant Cell 28: 1237-1249.
- ZHANG, Y., LIANG, Z., ZONG, Y., WANG, Y., LIU, J., CHEN, K., QIU, J.L., GAO, C.** (2016) – *Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA*. Nature Communications 7:12617.

## 5 Genomeditierter Raps - Bewertung der Real-Time PCR Methode von Chhalliyil *et al.* (2020)

Christopher Weidner<sup>1#</sup>, Sophia Edelmann<sup>1#</sup>, Dominik Moor<sup>2</sup>, Kathrin Lieske<sup>1</sup>, Christian Savini<sup>3</sup>, Sara Jacchia<sup>3</sup>, Maria Grazia Sacco<sup>3</sup>, Marco Mazzara<sup>3</sup>, Jörn Lämke<sup>1</sup>, Kolja Neil Eckermann<sup>4</sup>, Hendrik Emons<sup>5</sup>, Joachim Mankertz<sup>1\*</sup> & Lutz Grohmann<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Referat 503: Nationale Referenzlabore für pharmakologisch wirksame Rückstände und GVO, Deutschland

<sup>2</sup> Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Schweiz

<sup>3</sup> Europäische Kommission, Joint Research Center (JRC), Italien

<sup>4</sup> Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Referat 405: Rückverfolgbarkeit, Nachweisverfahren, Biosafety Clearing-House, Deutschland

<sup>5</sup> Europäische Kommission, Joint Research Center (JRC), Belgien

#\* Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei

### 5.1 Einleitung

Für die Zulassung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln verlangt die europäische Gesetzgebung Event-spezifische Methoden für deren Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung [1]. Wie der Europäische Gerichtshof am 25. Juli 2018 entschieden hat [2] sind Organismen, die durch Zufallsmutagenese (z. B. durch Bestrahlung oder mutagene Chemikalien) erzeugt wurden, von den Verpflichtungen der Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung von GVO [3] ausgenommen. Im Gegensatz dazu erstreckt sich diese Ausnahme nicht auf Organismen, die mit Hilfe von neuen genomischen Techniken (NGT), wie z. B. CRISPR/Cas oder TALEN, entwickelt wurden. Folglich müssen Antragsteller für die Zulassung von genomeditierten Organismen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln geeignete Methoden zum Nachweis, der Identifikation und der Quantifizierung der Produkte liefern.

Während klassische GVO i. d. R. größere Genkassetten aus Bestandteilen artfremder Genome oder neukombinierte DNA-Abschnitte enthalten, ist der Umfang der genetischen Veränderung bei mit NGT erzeugten GVO oftmals nur gering und kann beispielweise lediglich Punktmutationen oder kleine Insertionen/Deletionen aufweisen. Die Entwicklung von Methoden zum empfindlichen, spezifischen und robusten Nachweis oder sogar zur Quantifizierung einer Punktmutation ist eine analytische Herausforderung und kann insbesondere bei Lebens- und Futtermitteln mit komplexer Zusammensetzung schwierig anzuwenden sein [4, 5].

Die Firma Cibus US LLC hat mehrere Ölrapslinien (OSR-Linien) entwickelt, die Punktmutationen in den Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS)-Genen *AHAS1C* und *AHAS3A* tragen, welche Herbizidtoleranz vermitteln. Der Entwickler erzeugte die SNV entweder durch konventionelle Züchtungsmethoden oder durch den Einsatz von NGT (Oligonukleotid-gesteuerte-Mutagenese) [4, 6, 7]. OSR-Linien mit der gleichen *AHAS3A* Variante, die schon früher durch konventionelle Züchtung gewonnen wurde, werden von der Firma BASF seit vielen Jahren als Clearfield OSR in mehreren Ländern vermarktet [8, 9].

Kürzlich wurde eine Real-Time-PCR-Methode veröffentlicht, die laut Aussage der Autoren spezifisch für den Nachweis und die Identifizierung einiger genomeditierter herbizidtoleranten OSR-Linien (u. a. 5715) sei, die von der Firma Cibus US LLC hergestellt und in Nordamerika kommerziell vertrieben werden [10]. Laut Methodenentwickler sei die Methode Event-spezifisch für die OSR-Linie 5715 und erfülle alle Anforderungen an GVO-Analysemethoden gemäß den EU-Vorschriften. Um diese Behauptung analytisch zu bewerten, haben wir die Methode in Hinblick auf die vom Europäischen Netzwerk der GVO-Laboratorien (ENGL) festgelegten Mindestleistungsanforderungen (MPR) eingehend geprüft [11].

## 5.2 Ergebnisse

Für die Prüfung der Real-Time-PCR-Methode verwendeten wir als Positivmaterial genomische DNA der OSR-Linie 40K, die laut Angabe der Methodenentwickler von der Linie 5715 abstammt und im *AHAS1C*-Gen den gleichen Genotypen aufweist. Bei der Prüfung auf Sensitivität und Robustheit der Real-Time-PCR-Methode, mit reiner 40K-DNA erwies sich die Methode mit einem LOD-Wert von 10 Kopien pro Reaktion als ausreichend empfindlich und robust.

Bei der Prüfung der Spezifität haben wir neben in-silico-Analysen auch erweiternde experimentelle Prüfungen mit Amplikon-basierter Template-DNA sowie genomischer DNA aus den OSR-Linien 40K, CC9014, CC9016, der nicht-modifizierten OSR-Linie CC9018, einer konventionellen Linie des Ackerkrauts *Raphanus raphanistrum* sowie aus insg. 140 Chargen an zertifizierten Referenzmaterialien mit und ohne gentechnischer Veränderung (30 OSR-Linien, 21 Mais-Linien, 16 Soja-Linien, 10 Baumwoll-Linien, drei Kartoffel-Linien, zwei Zuckerrüben-Linien sowie je einer Linie Luzerne, Reis, Tomate, Leinsamen und Weizen) durchgeführt.

Bereits unter Verwendung von Amplikon-basierter Template-DNA konnten wir zeigen, dass sowohl *AHAS1C*-Sequenzen mit der beschriebenen Mutation detektiert werden als auch, wenngleich mit geringerer Empfindlichkeit, *AHAS1C*-Sequenzen ohne die beschriebene Mutation sowie *AHAS3A*-Sequenzen mit und ohne beschriebene Mutation. Darüber hinaus zeigen unsere experimentellen Ergebnisse, dass die Real-Time-PCR-Methode nicht Event-spezifisch für die OSR-Linien 5715 bzw. 40 K ist, denn mit der Methode wurden auch OSR-Linien erkannt, die dieselbe, durch somaklonale Variation verursachte Punktmutation tragen. Bei der weiteren Spezifitätsprüfung haben wir unter Verwendung von genomischer DNA in der im Originalprotokoll angegebenen Menge (300 ng) festgestellt, dass signifikante, unspezifische PCR-Amplifikationen für zahlreiche OSR-Linien sowie für *Raphanus raphanistrum* auftreten. Diese unspezifischen Amplifikationen wurden in allen drei nach ISO/IEC 17025 akkreditierten Referenzlaboratorien bestätigt. Dabei wurden verschiedene PCR-Master-Mixe, die auch von den Autoren der Methodenentwicklung getestet wurden, sowie unterschiedliche Modelle an PCR-Geräten verwendet.

Unter Berücksichtigung, dass die Sequenz-Spezifität der Methode allein auf einer Punktmutation in der Zielsequenz beruht, wurde die Robustheit der Methode nicht nur mit reiner Ziel-DNA untersucht, sondern auch in Anwesenheit von Hintergrund-DNA der Wildtyp-Sequenz.

Dabei wurde festgestellt, dass die Detektion von 30 Kopien 40K in Anwesenheit von Hintergrund-DNA (aus nicht-modifiziertem OSR oder der gentechnisch veränderten OSR-Line Rf2) nicht ausreichend robust ist.

### 5.3 Zusammenfassung und Diskussion

Der Nachweis und die Überwachung von genomeditierten Pflanzen und daraus hergestellten Produkten sind eine Herausforderung für die EU-Behörden und die amtliche Kontrolle, da eine Nutzpflanze mit beispielsweise einer kleinen Mutation in ihrem Genom möglicherweise nicht von Pflanzen unterschieden werden kann, die dieselbe Mutation auf natürlichem Wege oder durch klassische Mutageneseverfahren erworben haben [4]. Die kürzlich veröffentlichte Methode zum Nachweis und zur Identifizierung einer bestimmten genomeditierten OSR-Line der Firma Cibus US LLC wurde von uns eingehend auf die Mindestleistungsanforderungen des ENGL geprüft.

Die Methode ist für den Nachweis von reiner 40K-DNA ausreichend sensitiv und robust, wohingegen geringe Mengen an 40K-DNA in Anwesenheit von Hintergrund-DNA aus nicht gentechnisch verändertem Raps nicht immer detektiert werden können.

Die Spezifität der Methode ist gemäß unseren Ergebnissen nicht im Einklang mit den beschriebenen Mindestleistungsanforderungen des ENGL. Bereits für Amplikon-basierte DNA-Templates kann die Methode nicht ausreichend zwischen *AHAS1C* und *AHAS3A* sowie zwischen den G- oder T-Nukleotiden an der vorgesehenen SNV-Position unterscheiden. Für zahlreiche DNA-Extrakte aus OSR-Referenzmaterialien kam es zu einer signifikanten unspezifischen Amplifikation. Diese könnte das Vorhandensein von (geringeren Mengen) der Cibus-Linien 40K, C1511 und C5507 simulieren, was zu falschen Schlussfolgerungen führen würde. Aus analytischer Sicht ist die unspezifische Amplifikation von DNA aus nicht-modifiziertem Raps besonders problematisch, da es im Falle einer positiven Amplifikation während der Analyse einer Probe nicht möglich ist, diese Spuren eindeutig genomeditiertem bzw. herbizidtolerantem Rapsmaterial zuzuordnen.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass die veröffentlichte Real-Time-PCR-Methode nicht für die *Identifizierung* der von Cibus US LLC entwickelten genomeditierten OSR-Linien geeignet ist. Wie die Amplifikationen mit OSR-Linien, die die gleiche Punktmutation aufweisen, die aber durch somaklonale Variation entstanden sind, zeigen, kann die Methode nicht zwischen DNA aus genomeditierten und konventionell gezüchteten Organismen unterscheiden. Da es mehrere OSR-Linien gibt, die aufgrund einer identischen Mutation im *AHAS1C*-Gen herbizidtolerant sind, reicht der Nachweis dieser Mutation allein nicht aus, um darauf zu schließen, dass die getestete Probe einem genomeditierten Produkt entstammt. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz von Herbiziden auf landwirtschaftlichen Flächen einen Selektionsdruck auf die Pflanzen ausüben kann, der zu der identischen Punktmutation im *AHAS*-Gen führt [12, 13]. Methoden zum Nachweis von Punktmutationen, die die MPR-Kriterien erfüllen, können prinzipiell für ein Screening auf das Vorhandensein des infrage kommenden genomeditierten Produktes eingesetzt werden. Ein negatives Screening-Ergebnis würde das Vorhandensein des infrage kommenden genomeditierten Produktes ausschließen.

Ein positives Screening-Ergebnis wäre allerdings nur ein Indiz, worauf Folgeanalysen mit weiteren Methoden oder eine nicht-analytische Verfolgung durch z. B. Dokumentenprüfung erforderlich wären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode die Mindestleistungsanforderungen des ENGL nicht vollständig erfüllt und für den Einsatz in der amtlichen Kontrolle von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln sowie Saatgut in der EU nicht geeignet ist.

Die gesamten Ergebnisse der vorgestellten Arbeiten wurden im Journal „*Food Analytical Methods*“ veröffentlicht und sind online erhältlich unter Weidner *et al.* (2022) „*Assessment of the Real-Time PCR Method Claiming to be Specific for Detection and Quantification of the First Commercialised Genome-Edited Plant*“, <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02237-y> [14].

## 5.4 Referenzen

1. (2003) - *Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed*: Document 32003R1829
2. **EUROPEAN COURT OF JUSTICE** (2018) - *C-528/16-Judgement of 25 July 2018 on New Mutagenesis Techniques*. Abgerufen am 09. August 2021
3. (2013) - *Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC - Commission Declaration*: Document 32001L0018
4. **European Network of GMO Laboratories** (2019) - *Detection of Food and Feed Plant Products Obtained by New Mutagenesis Technique*. JRC116289
5. **GROHMANN, L., KEILWAGEN, J., DUENSING, N., DAGAND, E., HARTUNG, F., WILHELM, R., BENDIEK, J. AND SPRINK, T.** (2019) - *Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities*. *Front Plant Sci* 10:236.
6. **Canadian Food Inspection Agency** (2020) - *DD 2013-100: Determination of the Safety of Cibus Canada Inc.'s Canola (Brassica napus L.) Event 5715*. <https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669>. Abgerufen am 03. August 2021
7. **SCHOPKE, C., GOCAL, G. F. W., WALKER, K. AND BEETHAM, P. R.** (2012) - *Mutated Acetohydroxyacid Synthase Genes in Brassica* (US 2012/0178628 A1). [https://www.lens.org/images/patent/US/20120178628/A1/US\\_2012\\_0178628\\_A1.pdf](https://www.lens.org/images/patent/US/20120178628/A1/US_2012_0178628_A1.pdf). Abgerufen am 09 Aug 2021
8. **HEALTH CANADA** (2016) *Novel Food Information - Cibus Canola Event 5715 (Imidazolinone and Sulfonylurea Herbicide Tolerant)*. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/novel-food-information-cibus-canola-event-5715-imidazolinone-sulfonylurea-herbicide-tolerant.html>. Abgerufen am 29. Juli 2021
9. **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 Manag Sci* 61:246–257.
10. **CHHALLIYIL, P., ILVES, H., KAZAKOV, S. A., HOWARD, S. J., JOHNSTON, B. H. AND FAGAN, J.** (2020) - *A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant*. *Foods* 9:1245.

11. **EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES** (2015) - *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*: JRC95544. Publications Office
12. **NANDULA, V. K., GIACOMINI, D. A. AND RAY, J. D.** (2020) - *Resistance to acetolactate synthase inhibitors is due to a W 574 to L amino acid substitution in the ALS gene of redroot pigweed and tall waterhemp*. PLoS One 15:e0235394.
13. **TAN, M.K. AND MEDD, R.W.** (2002) - *Characterisation of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance*. Plant Science 163:195–205.
14. **WEIDNER, C., EDELMANN, S., MOOR, D., LIESKE, K., SAVINI, C., JACCHIA, S., SACCO, M. G., MAZZARA, M., LÄMKE, J., ECKERMANN, K. N., EMONS, H., MANKERTZ, J. AND GROHMANN, L.** (2022) - *Assessment of the Real-Time PCR Method Claiming to be Specific for Detection and Quantification of the First Commercialised Genome-Edited Plant*. Food Anal Methods 15:2107–2125.

## 6 Machbarkeitsstudie zu Nachweis- und Identifizierungsverfahren für genomeditierte Pflanzen und pflanzliche Produkte

**Dirk Schenke und Daguang Cai**

*Molekulare Phytopathologie und Biotechnologie der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel*

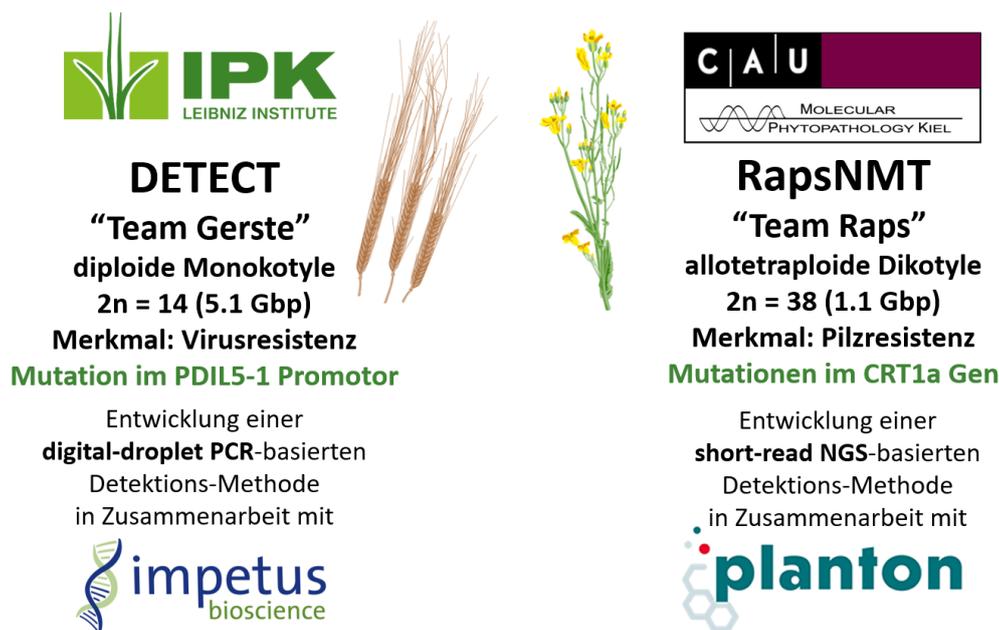
### 6.1 Einleitung

Nach der derzeitigen europäischen Gesetzeslage müssen Genveränderungen in der Pflanzenzüchtung, welche durch die Neuen Mutagenese Techniken (NMT) erzeugt wurden, wie GVOs reguliert werden, so dass sich die Frage nach geeigneten Nachweismethoden stellt. Mit der Chhalliyil-Publikation wurde eine erste qPCR-basierte Methode zur Detektion beschrieben. Wie in **Kapitel 5** beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die Leistungsparameter nicht den Vorgaben für Methoden in der amtlichen Überwachung entsprechen. Dies zeigt, wie schwierig die Entwicklung einer spezifischen und robusten quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR)-Methode zum Nachweis von Punktmutationen ist.

Die Detektion einer Mutation aus einer Genom-Editierung beinhaltet:

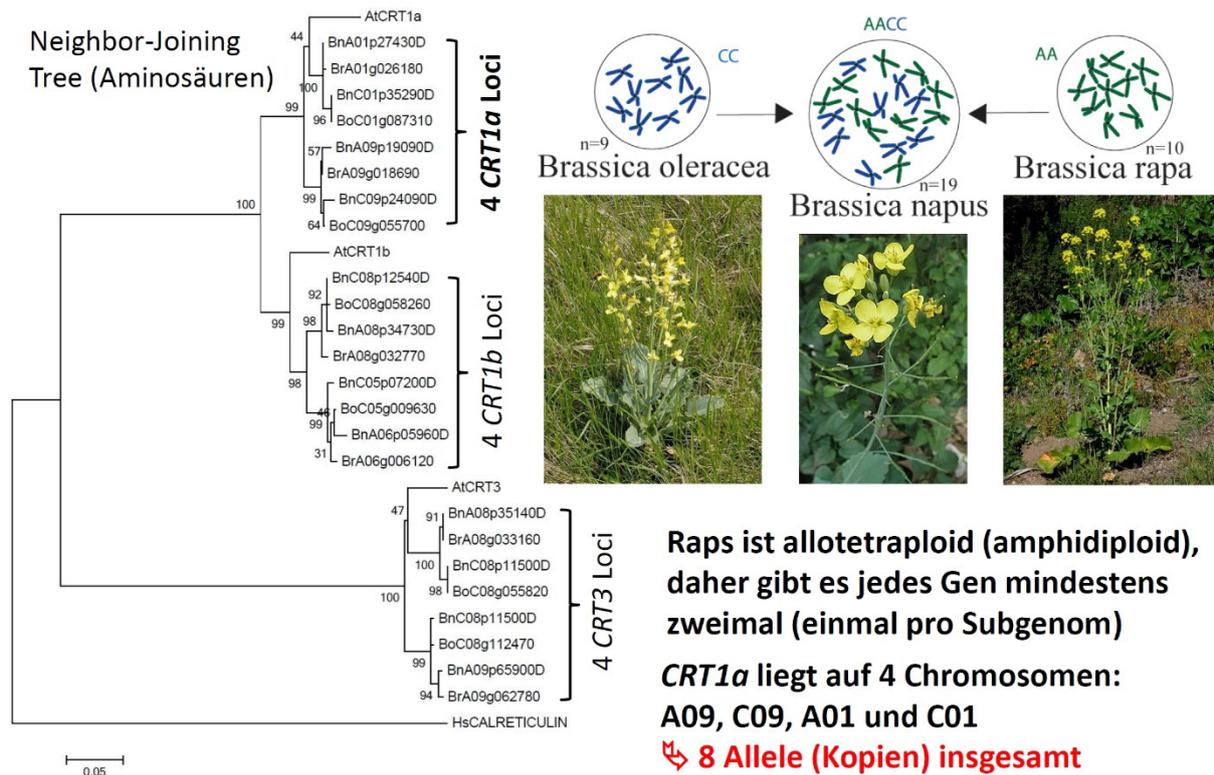
- 1) den einfachen Nachweis (hier handelt es sich lediglich um das Auffinden der Zielsequenz),
- 2) die Identifikation (d.h. die nachgewiesene Sequenz kann einem spezifischen Event/Prozess zugeschrieben werden) und
- 3) die Quantifizierung des Anteils an Genom-editierter DNA,

wobei die Nachweisgrenze für registrierte Events bei 0,1% liegt und unterhalb derer ein Produkt noch als unbelastet gelten würde (Grohmann *et al.*, 2019, ENGL, 2019). Bis dato gab es noch keine ausreichende Validierung von Next Generation Sequencing-Ansätzen für die Quantifizierung von Zielsequenzen in komplexen Proben und auch keine Möglichkeit den Ursprung von SNPs oder InDels auf Genom-Editierung, klassische Mutagenese-Techniken oder natürliche Entstehung zurückzuführen (ENGL, 2019). Aus diesem Grund erfolgte 2020 durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) eine Bekanntmachung, um geeignetere Nachweis und Identifizierungsverfahren für genomeditierte Pflanzen und pflanzliche Produkte zu prüfen (BAnz AT 30.04.2020 B5). Als mögliche besser geeignete Methoden sind die digitale droplet PCR oder Amplikon-Tiefensequenzierung mittels short-read NGS zu nennen. Zwei Vorschläge wurden für das Verbundprojekt „Machbarkeitsstudie zu Nachweis- und Identifizierungsverfahren für genomeditierte Pflanzen und pflanzliche Produkte“ ausgewählt (**Abbildung 6-1**), von denen das RapsNMT Teilprojekt („Implementation der Next Generation Sequencing (NGS) Technologie zum gezielten Nachweis genomeditierter Rapspflanzen und derer Produkte“) hier genauer vorgestellt werden soll.



**Abbildung 6-1:** Übersicht über das Verbundprojekt zur Machbarkeitsstudie mit Material beruhend auf den Publikationen von Hoffie *et al.* (2022) für Gerste und Pröbsting *et al.* (2020) für Raps. Beide zu untersuchenden Kulturpflanzen weisen komplexe Genome auf und stellen somit eine besondere Herausforderung an die Analytik dar (Pflanzensymbole von Pflanzenforschung.de).

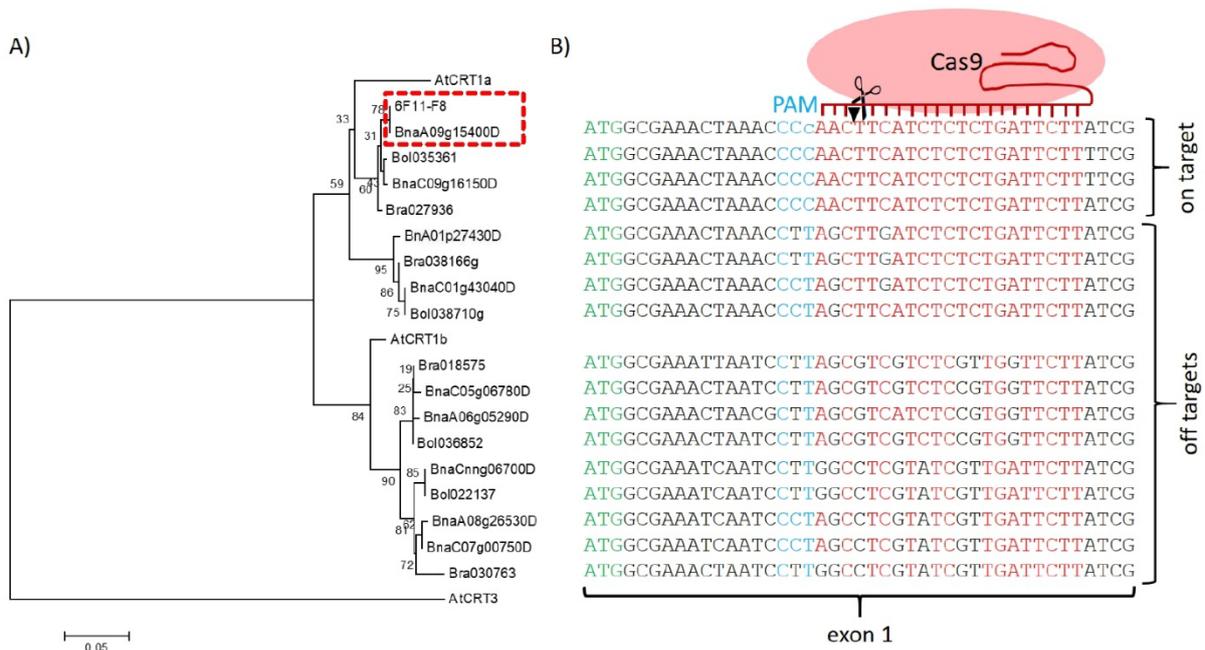
Im Teilprojekt RapsNMT untersuchen wir Mutanten aus unserem BMBF-geförderten Projekt zur Anwendung von CRISPR/Cas in der Resistenzzüchtung, um Raps weniger anfällig gegenüber dem bodenbürtigen Schadpilz *Verticillium longisporum* zu machen (Pröbsting *et al.*, 2020). Dieses einzigartige Material erfordert aufgrund der vielfältigen Mutationen im *CRT1a*-Genort eine hohe Sensitivität beim Nachweis der veränderten Calreticulin Loci. Dieses Gen haben wir durch „Funktionale Genomik“ identifiziert, d.h. wir haben festgestellt, dass es in der Pflanze-Pilz Interaktion verstärkt exprimiert wird. Unser Verdacht, dass es sich dabei um ein Anfälligkeitgen handeln könnte hat sich durch Untersuchungen an der Modellpflanze *Arabidopsis* bestätigt, die man quasi als kleines Geschwisterchen des Rapses bezeichnen könnte. Wenn das *CRT1a* Gen in *Arabidopsis* ausgeschaltet ist, dann kann diese Pflanze eine Infektion mit dem Pilz besser überstehen. Anfälligkeitgene werden in der Theorie durch Schädlinge aktiviert, weil diese dadurch einen Vorteil erhalten, z. B. mehr Nährstoffe von der Pflanze. Da Calreticulin auch in der Proteinfaltung eine Rolle spielt, könnten auch indirekt, solche für den Schädling wichtigen Pflanzengen-Produkte nicht mehr gebildet werden und es so dazu kommen, dass sich der Pilz in einer Pflanze ohne ein solches funktionsfähiges Gen schlechter entwickeln kann. Die Pflanze wird also resistenter. Da es in Eukaryoten aber von jedem Gen immer mindestens zwei Kopien (Allele) vorliegen, müssen erst beide ausfallen damit man einen Effekt beobachten kann. An dieser Stelle ist ein Kenntnis der Komplexität des Rapsgenoms und seine Zusammensetzung für das weitere Verständnis unabdingbar. Raps (*Brassica napus*) entstand vor ca. 7500 Jahren durch eine Hybridisierung zwischen Rübsen (*Brassica rapa*, AA-Genom) und Gemüsekohl (*Brassica oleracea*, CC-Genom) und ist damit eine allotetraploide Kulturpflanze (Chalhoub *et al.*, 2014). Daher liegt in der Regel jedes Raps-Gen auf zwei Genorten, einem im AA-Genom und einem im CC-Genom (**Abbildung 6-2**).



**Abbildung 6-2:** Im Raps gibt es insgesamt 12 Calreticulin Loci, von denen jeder zwei Allele (Kopien) besitzt. Auf CRT1a entfallen 8 dieser Allele und es ist somit nicht damit zu rechnen durch Zufall einen Raps zu identifizieren, in dem all diese Kopien funktionsunfähig sind und es so zu einem neuen Phänotyp kommt (Fotos von Wikipedia).

Raps ist also eine junge Kulturpflanze mit einem aus diesem Grund relativ engen Genpool. Das bedeutet, dass es vergleichsweise wenig genetische Variation in den verfügbaren Rapslinien gibt und es so nur künstlich möglich ist einen neuen Phänotyp hervorzurufen, indem man mittels Mutagenese versucht Unterschiede zu induzieren. Die Mutationszüchtung spielt also eine ganz wesentliche Rolle bei der Verbesserung der Rapseigenschaften. Unser Fokus lag bei der Mutagenese auf der auf Chromosom A09 liegenden *CRT1a* Kopie, weil diese zu 100% identisch mit dem von uns während der Infektion exprimierten Sequenz (EST) übereinstimmt (**Abbildung 6-3**, roter Kasten). Weil wir aber beim Einsatz ungerichteter chemischer Mutagenese widersprüchliche Ergebnisse erhalten haben, wurde schließlich Genom-Editing mittels CRISPR/Cas9 als Alternative genutzt (Pröbsting *et al.* 2020). Die single guide RNA (sgRNA) für die Steuerung der Genschere wurde so programmiert, dass nur die beiden *CRT1a*-Loci auf dem A09 und C09 Chromosom geschnitten und mutiert werden sollten, da die anderen beiden Kopien entweder kein Cas9-typisches Protospacer Adjacent Motiv (PAM) oder zu viele Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in der „Seed-Region“ aufwiesen (**Abbildung 6-3**). Auf diese Weise kann man erwarten, dass die natürliche Genfunktion durch die beiden intakten Kopien erhalten bleibt, während die mutierten Kopien einen Resistenzphänotyp erzeugen, es also kaum zu Zielkonflikten („trade-offs“) kommt.

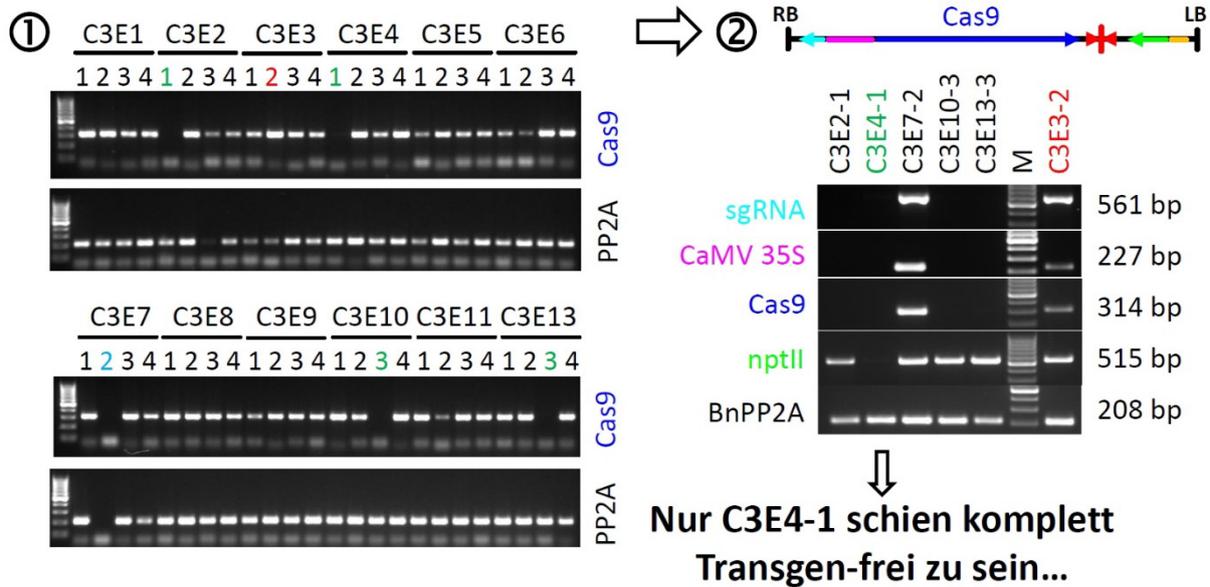
Das Besondere ist nun, dass der durch die Mutation hervorgerufene Phänotyp nicht mit dem Integrationsort des Konstrukts für die Genschere gekoppelt sein muss und es so durch Segregation oder Kreuzung theoretisch möglich ist, am Ende eine zwar mutierte, aber trotzdem Transgen-freie Pflanze zu erhalten (also ohne Antibiotika-Selektionsmarker oder eine andere Fremd-DNA wie die Genschere selbst). Da Mutationen aber auch natürlich auftreten und so auch die Grundlage für die Evolution und die Entstehung der Artenvielfalt liefern, kommt es nun darauf an, ob man natürliche von künstlichen Mutationen unterscheiden kann oder nicht. Dies ist nach gängiger wissenschaftlicher Meinung (ohne eine zuvor veröffentlichte Beschreibung der Mutation) nicht möglich (Leopoldina, 2019; ENGL, 2019).



**Abbildung 6-3:** Um möglichst wenig Zielkonflikte („trade-offs“) zu erzeugen sollte nur die mutmaßlich wichtige *CRT1a* Kopie A09 (und mangels passender Sequenzunterschiede auch die C09 Kopie) durch CRISPR/Cas9 mutiert werden, nicht aber die A01 und C01 *CRT1a* Kopie, sowie die anderen *CRT1b* und *CRT3* Loci (allesamt ohne ausreichende Homologien zur Zielsequenz, sogenannte „Off-Target“ Loci, welche nicht durch die Genschere und ihre sgRNA angesteuert werden können).

## 6.2 Ergebnisse

Ein durch Gensynthese erstelltes Vektorsystem wurde in Kombination mit *Agrobacterium tumefaciens* (aktuell: *Rhizobium radiobacter*) genutzt, um die Sommerraps-Sorte „Mozart“ stabil zu transformieren und aus den transformierten Kalli wurden ganze Pflanzen regeneriert (vergleiche auch **Abbildung 6-8** links). Um sowohl eine Transgen-freie als auch eine noch transgene Mutante für die Untersuchung zu verwenden, wurden Schwesterpflanzen aus dem Event C03 mittels PCR-Nachweis verschiedener Konstruktbereiche analysiert (**Abbildung 6-4**). Die Mutante C3E4 schien Transgen-frei zu sein und eine andere war eindeutig transgen (C3E3).



**Abbildung 6-4:** Ergebnisse der PCR-Analyse. Nach einer Vorauswahl verschiedener T2-Nachkommen aus dem C03-Event (Cas9-negative Pflanzen ①), wurde in einem zweiten Experiment nach weiteren Konstrukt-spezifischen Sequenzen gesucht (②). Nur die Pflanze C3E4-1 schien komplett Transgen-frei zu sein, während die Pflanze C3E3-2 eindeutig transgen ist. Das Gen *BnPP2A* fungiert jeweils als Kontrolle, dass die isolierte Template-DNA in Ordnung ist. Erst durch eine Komplettssequenzierung des Genoms (Whole Genome Sequencing, WGS) mittels long-read PacBio wurde entdeckt, dass auch die C3E4-Mutante noch eine kleine T-DNA Fragment des NOS-Promoters (gelb) enthielt und die als Kontrolle mitgeführte C3E3 insgesamt vier unabhängige T-DNA Integrationen besitzt.

Die Mutationen in beiden Pflanzen wurden zunächst mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert und entsprachen denen aus Pröbsting *et al.* (2020). Ein Vergleich mit den aus dem bekannten Raps-Pangenom erhaltenen *CRT1a* Sequenzen zeigte die starke Konservierung der Mutationsstelle (**Abbildung 6-5** oben). Einer Theorie des Bundesamts für Naturschutz (BfN, 2022) zufolge wären Mutationen in einer solch konservierten Region, welche sich auch noch im korrekten Abstand zur PAM des CRISPR/Cas9 Systems befinden ein Indiz dafür, dass diese Mutation nicht natürlich, sondern durch Genom-Editing entstanden ist. Allerdings finden sich sowohl im A09 als auch im C09 *CRT1a* Locus in verschiedenen Raps-Linien natürliche Polymorphismen in 3 bp Entfernung einer für Cas9 passenden PAM Sequenz (NGG). Dies wird hier exemplarisch für den *CRT1a* A09 Locus dargestellt (**Abbildung 6-5** unten).

	Cas9-typical PAM	sgRNA	
Darmor_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	Der on-target A09 Locus ist in allen Raps Linien stark konserviert
ZS11_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Tapidor_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Express617_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Quinta_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Shengli3_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Zheyu73_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Gangan_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Westar_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
No2127_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
Mozart_A09	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
C3E4_A09a	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
C3E4_A09b	ACCGATGGCGAAACTAAACCGAAG	TTCACTCTCTGATTCT	
	* ***** **	***** **	

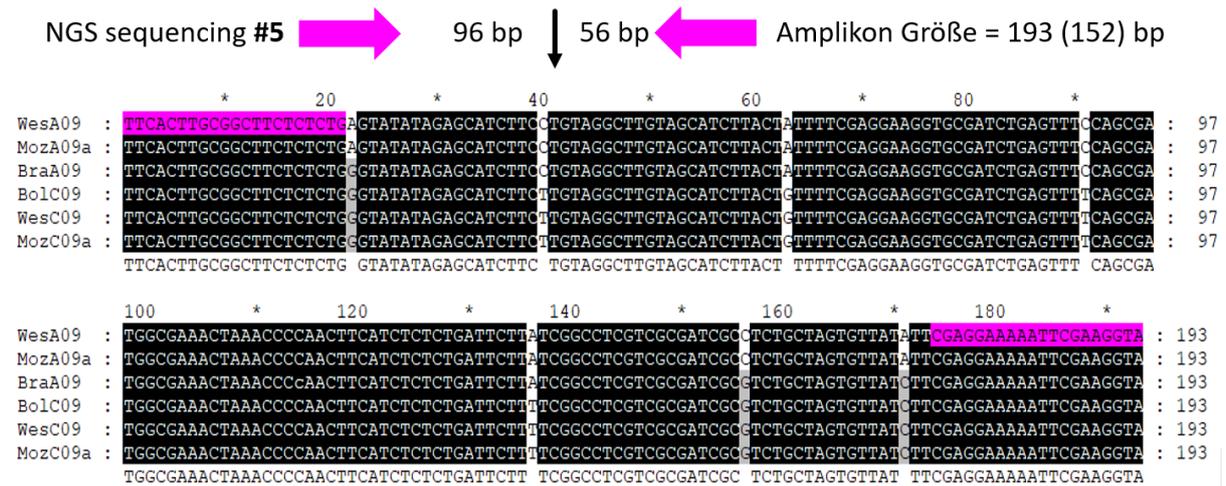
↳ Beide CRISPR-Mutationen wie in der T0 Pflanze (C3-Ausgangs-Event)

Darmor_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
ZS11_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Tapidor_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Express617_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Quinta_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Shengli3_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Zheyu73_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Gangan_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	→ Deletion in Gangan
Westar_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
No2127_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
Mozart_A09	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
C3E4_A09a	GATGATTTACGTTGATCCAGTTTAGCTCATTGCGTGTGAATCGATCGAACTTTTTCGA	
	***** **	***** **

↳ Aber: in der restlichen A09-Kopie gibt es 3 natürliche Polymorphismen (InDels in Introns), welche in direkter Nachbarschaft zu einer CRISPR/Cas9 PAM liegen...

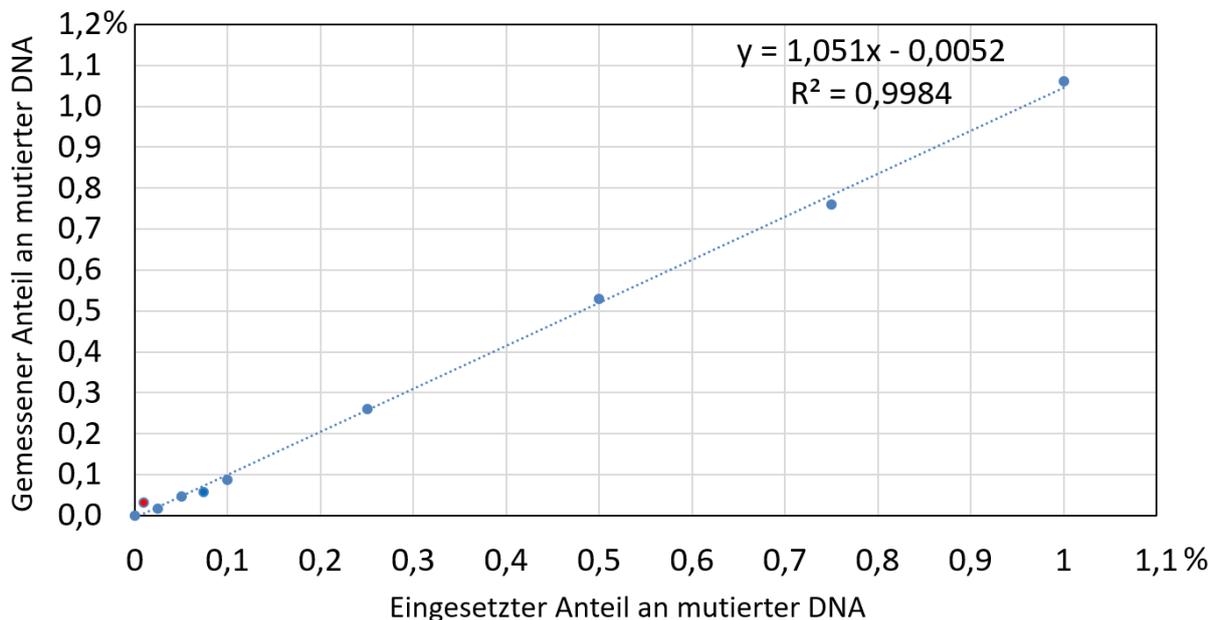
**Abbildung 6-5:** Vergleich der Mutationsstelle im *CRT1a* A09 Locus über das Raps Pan-Genom hinweg. Oben sind die beiden Mutationen der C3E4 Mutante und unten beispielhaft ein natürlicher Polymorphismus in Gangan, welcher wie CRISPR/Cas9-induziert interpretiert werden könnte, gelb hervorgehoben.

Zusammen mit dem Mozart Wildtyp (WT) wurden diese beiden Mutanten nun für den Nachweis der CRISPR/Cas9-induzierten Mutationen durch short-read NGS Technologie (Illumina-Sequenzierung) und für das long-read WGS (PacBio-Sequenzierung) verwendet. Für die Illumina-Sequenzierung wurden mehrere Primer-Paare entwickelt, von denen Paar #5 ein 193 bp langes Amplikon liefert (**Abbildung 6-6**). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit um die Mutationsstelle der *CRT1a*-Gene auf dem A09 und C09 Chromosom kann keine spezifische Amplifikation nur einer Kopie erfolgen, aber man kann aufgrund von 7 SNPs im Amplikon zwischen der A09 Kopie, welche auf *Brassica rapa* zurückgeht und der C09 Kopie (*Brassica oleracea* subgenom) differenzieren. Durch diese Optimierung werden die anderen beiden *CRT1a*-Kopien auf dem A01 und C01 Chromosomen nun nicht mehr amplifiziert, so dass mehr relevante Illumina Reads für die Auswertungen zur Verfügung stehen.



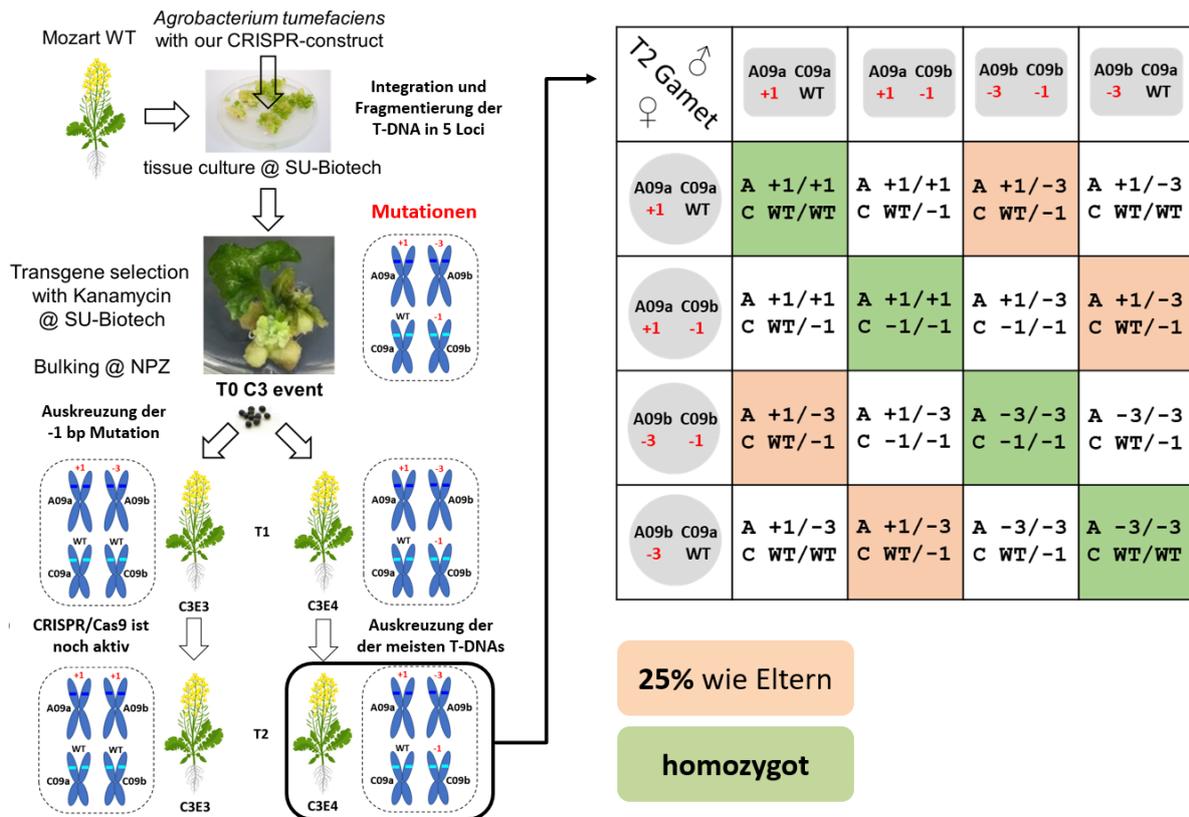
**Abbildung 6-6:** Lage der Mutationsstelle im Amplikon und Sequenzvergleich der „Raps-Eltern“ *Brassica rapa* und *B. oleracea* mit den Sommerraps-Sorten Westar und Mozart. Lücken in der Konsensus-Sequenz zeigen die 7 SNPs an, anhand derer man zwischen der A09 und C09 Kopie differenzieren kann.

Der NGS Assay #5 wurde mit Blatt-DNA Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen von DNA aus Mutante und dem WT Mozart validiert (**Abbildung 6-7**) und die Sensitivität mit 0,03% bestimmt.



**Abbildung 6-7:** Validierung des NGS-Assays #5 mit DNA-Mischungen aus Blattmaterial der Mutante und des Wild-Typs Mozart durch Soll-Ist Vergleich der prozentualen Beimischungen mutierter DNA zu WT-DNA. Die Abbildung stellt den relevanten Bereich <1% im Detail dar. Der rot hervorgehobene Messwert bei 0,01% zeigt wie der bei 0,075 eine stochastische Abweichung von der Geraden, allerdings unterhalb der angestrebten Detektionslimits (LOD) von 0,1%.

Dieser Assay wurde auch erfolgreich zur Analyse einer spaltenden Population verwendet (**Abbildung 6-8**) und muss sich als nächstes bei der Analyse von Saatgutmischungen bewähren. Durch das PacBio-WGS wurde inzwischen festgestellt, dass es im Ursprungsevent zur T-DNA Fragmentierung und Integration an 5 unterschiedlichen Loci gekommen ist, von denen alle bis auf ein Fragment, welches lediglich den NOS-Promoter enthält, in der T2 heraussegregiert werden konnten (vgl. auch **Abbildung 6-5**). Das bedeutet, dass es ohne ein WGS nicht möglich ist den Transgen-Status einer Mutante zweifelsfrei zu klären. Die Analysen sind zwar noch nicht abgeschlossen, aber bisher wurden keine ungewollten Off-Target Mutationen durch CRISPR/Cas detektiert, während die durch Sanger- und Illumina-Sequenzierung detektierten Mutationen im *CRT1a* Zielgen auch im WGS bestätigt werden konnten.



A09 locus	+1/+1	+1/+1	+1/-3	+1/-3	+1/+1	+1/-3	-3/-3	-3/-3	-3/-3	Chi-Square
C09 locus	WT/WT	WT/-1	WT/-1	WT/WT	-1/-1	-1/-1	-1/-1	WT/-1	WT/WT	
observed	2	5	16	6	3	5	3	3	5	∑ 48 (n)
expected	3	6	12	6	3	6	3	6	3	dF: 9-1=8
χ <sup>2</sup>	0.333	0.167	1.333	0	0	0.167	0	1.5	1.333	∑ 4.833

**Abbildung 6-8:** Analyse einer spaltenden Population mittels Illumina NGS. Die T3 Nachkommen der umkreisten C3E4 Mutante wurden mittels des NGS-Ansatzes #5 analysiert, um homozygot mutierte Individuen zu identifizieren. Aus dem Kreuzungsquadrat geht hervor, dass bei der Selbstbefruchtung der Pflanze 16 Kombinationen möglich sind, so dass man bei der Analyse von 48 Nachkommen mit jeweils drei homozygoten Mutanten für jede der grün hervorgehobenen Kombinationen rechnen kann. Ein Chi-Quadrat-Test zum Vergleich von Befund und Erwartung deutet an, dass das Experiment prinzipiell geglückt ist, auch wenn die Anzahl der 48 untersuchten Individuen für eine solche Analyse eigentlich zu gering ist.

### 6.3 Fazit

Durch NGS mit short-read Illumina Technologie ist eine Amplikon-Tiefensequenzierung möglich, die es erlaubt in komplexen amphidiploiden Genomen wie vom Raps, Tabak, Baumwolle, Erdnuss oder Quinoa Mutationen durch Genom-Editing zu detektieren und einem Subgenom zuzuordnen. Diese müssen allerdings bekannt sein, damit ein spezifischer Assay entwickelt werden kann. Eine Aussage über die Entstehung der Mutation ist mit dieser Methode anscheinend nicht möglich. Wie aus **Abbildung 6-5** hervorgeht gibt es an vielen Stellen im Genom natürliche Polymorphismen, welche neben einer PAM liegen, so dass dies keinen hinreichenden Beweis für CRISPR/Cas Aktivität darstellt. Hinzu kommt noch die rasante Weiterentwicklung verschiedenster Genscheren mit unterschiedlichen PAM-Voraussetzungen bis hin zu CRISPR-Systemen, welche gar keine PAM mehr benötigen (z. B. Ren *et al.*, 2021). Für eine eindeutige Identifizierung müsste nun z. B. ein mit der Mutation gekoppelter SNP gefunden werden, wozu aber erst das Genom-Assembly aus den WGS Daten abgeschlossen sein muss. Der Nachweis beider Punktmutationen in Kombination wäre dann evtl. geeignet dieses CRISPR/Cas-Event zweifelsfrei zu identifizieren. Allerdings könnte eine solche Kopplung durch Rekombination („Crossing-over“) zwischen den A09 und C09 Loci auch wieder verloren gehen. Bisher konnten keine Off-Target Mutationen durch das Genom-Editing identifiziert werden, wobei auch hier gilt, dass alle Aussagen zu den WGS-Daten als vorläufig zu betrachten sind solange das Genom-Assembly noch nicht abgeschlossen ist. Die 4, bzw. 1 bisher gefundenen T-DNA Reste im Genom der C3E3, bzw. der C3E4 Mutante zeigen deutlich auf, dass der Einsatz von Agrobakterien zum Einschleusen der Genschere zwar effizient ist, aber das Versprechen mit dieser Technik Transgen-freie Mutanten zu erzeugen durch ein WGS überprüft werden sollte, auch um eventuelle Off-Target Effekte auszuschließen. Durch eine Wiederholung der Populationsanalyse mit Nachkommen aus der Folgegeneration könnte nun Transgen-freies Material für zukünftige Feldversuche erzeugt werden. Ohne eine Testung des Resistenzphänotyps unter natürlichen Bedingungen und parallellaufenden Untersuchungen zur evtl. Ausbreitung von Mutationen in Nachbarfelder bleibt ein Protokoll für den Nachweis/Identifikation einer Genom-Editierung und der Einsatz der NMT zur Resistenzsteigerung jedenfalls bloße Theorie.

### 6.4 Danksagung

Diese Machbarkeitsstudie wurde durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über den Projektträger Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung mit dem Förderkennzeichen 2820HS012 finanziert.

## 6.5 Literatur

**BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2012)** - *Stellungnahme der ZKBS zu neuen Techniken für die Pflanzenzüchtung*

**BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2020)** - *Neue Nachweismethode verspricht spezifische Detektion genomeditierter Rapslinien – was kann das Verfahren tatsächlich leisten?*

**BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ (2022)** - *Analyse von Nachweismethoden für genomeditierte und klassische GV-Pflanzen*, BfN-Skripten 622

**CHALHOUB, B., DENOEUDE, F., LIU, S., PARKIN, I. A., TANG, H., WANG, X., ... & WINCKER, P. (2014)** - *Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic Brassica napus oilseed genome*. *Science*, 345(6199), 950-953

**CHHALLIYIL, P., ILVES, H., KAZAKOV, S. A., HOWARD, S. J., JOHNSTON, B. H., & FAGAN, J. (2020)** - *A real-time quantitative PCR method specific for detection and quantification of the first commercialized genome-edited plant*. *Foods*, 9(9), 1245

**EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL, 2019)** - *Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques* (JRC116289)

**GROHMANN L., KEILWAGEN J., DUENSING N., DAGAND E., HARTUNG F., WILHELM R., BENDIEK J. AND SPRINK T. (2019)** - *Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities*. *Front. Plant Sci.* 10:236.

**HOFFIE, R. E., PEROVIC, D., HABEKUß, A., ORDON, F. AND KUMLEHN, J. (2022)** - *Novel resistance to the Bymovirus BaMMV established by targeted mutagenesis of the PDIL5-1 susceptibility gene in barley*. *Plant biotechnology journal*, 10.1111/pbi.13948.

**MICHAEL PRÖBSTING, DIRK SCHENKE, ROXANA HOSSAIN, CLAUDIA HÄDER, TIM THURAU, LISA WIGHARDT, ANDREA SCHUSTER, ZHENG ZHOU, WANZHI YE, STEFFEN RIETZ, GUNHILD LECKBAND AND DAGUANG CAI (2020)** - *Loss-of-function of CRT1a (Calreticulin) reduces susceptibility to Verticillium longisporum in both Arabidopsis thaliana and oilseed rape (Brassica napus)*. *Plant Biotechnology Journal* 18(11), 2328-2344.

**NATIONALE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN LEOPOLDINA/DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT/UNION DER DEUTSCHEN AKADEMIEN DER WISSENSCHAFTEN (2019)** - *Wege zu einer wissenschaftlich begründeten, differenzierten Regulierung genomeditierter Pflanzen in der EU*

**REN, Q., SRETENOVIC, S., LIU, S., TANG, X., HUANG, L., HE, Y., ... & ZHANG, Y. (2021)** - *PAM-less plant genome editing using a CRISPR–SpRY toolbox*. *Nature Plants*, 7(1), 25-33.

## 7 Nachweis gentechnisch veränderter Papaya – Erfahrungen aus der amtlichen Überwachung

**Sven Pecoraro**

*Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, LGL*

### 7.1 Einleitung

Lebensmittel, die aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) bestehen, diese enthalten oder daraus hergestellt werden, müssen in der Europäischen Union nach Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 zugelassen und die entsprechenden Produkte gekennzeichnet werden. Der Zulassung geht ein mehrstufiges Prüfverfahren voraus, an dem unter anderem die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) maßgeblich beteiligt ist. Das LGL hat 2004 als erstes europäisches Labor gv-Papaya aus den USA (Hawaii) im Handel entdeckt. Für gentechnisch veränderte (gv) Papaya liegt im Gegensatz zu den USA in der EU keine Zulassung vor, so dass diese in Europa nicht verkehrsfähig sind. Über das Europäische Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel (RASFF) wurden seitdem immer wieder positive Befunde sowohl von gv-Papaya als ganze Frucht, als auch von verarbeiteten Papayaerzeugnissen gemeldet. Als Herkunftsländer waren neben den USA auch Thailand, Indien und Kambodscha betroffen. Allen gv-Papayas gemein ist die gentechnisch eingebrachte Resistenz gegen den global verbreiteten Papayaschädling *Papaya Ringspot Virus* (PRV). Dieses Pflanzenvirus führt nach Befall zu ringförmigen Läsionen der Fruchtschale, schnellem Verderb und Kümmerwuchs der gesamten Pflanze.

### 7.2 Papaya Ringspot Virus (PRSV)

Das weltweit natürlich vorkommende PRSV gehört zur Familie der *Potyviridae* und zum Genus *Potyvirus*, von dem bisher 183 Arten bekannt sind. Das Virion (einzelnes Viruspartikel) ist fadenförmig, biegsam und misst 780-800 × 12 nm (**Abbildung 7-1**).



**Abbildung 7-1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des PRSV; mit freundlicher Genehmigung von Prof. Elliot W. Kitajima (Quelle: <https://www.padiil.gov.au/pests-and-diseases/pest/136656>)

Das Genom des PRSV ist eine unsegmentierte Positiv-Einzelstrang-RNA (ss +RNA) mit 10.326 Nukleotiden.

Das Genom kodiert für ein einziges großes (Poly)Protein (3.344 Aminosäuren), das post-translational in verschiedene kleinere Proteine mit unterschiedlichen Funktionen gespalten wird. Das Nukleokapsid (Hülle, coat) ist helikal aufgebaut und ohne äußere Membran (non-enveloped). Die Übertragung erfolgt durch Blattläuse, wobei die Infektion der Pflanze sehr schnell erfolgt (ca. 15 Sek. bis wenige Minuten). Das Virus ist nicht persistent, d. h. es findet keine Virusvermehrung in der Blattlaus statt. Natürliche Resistenzen gegen PRSV sind bei Papaya nicht bekannt.

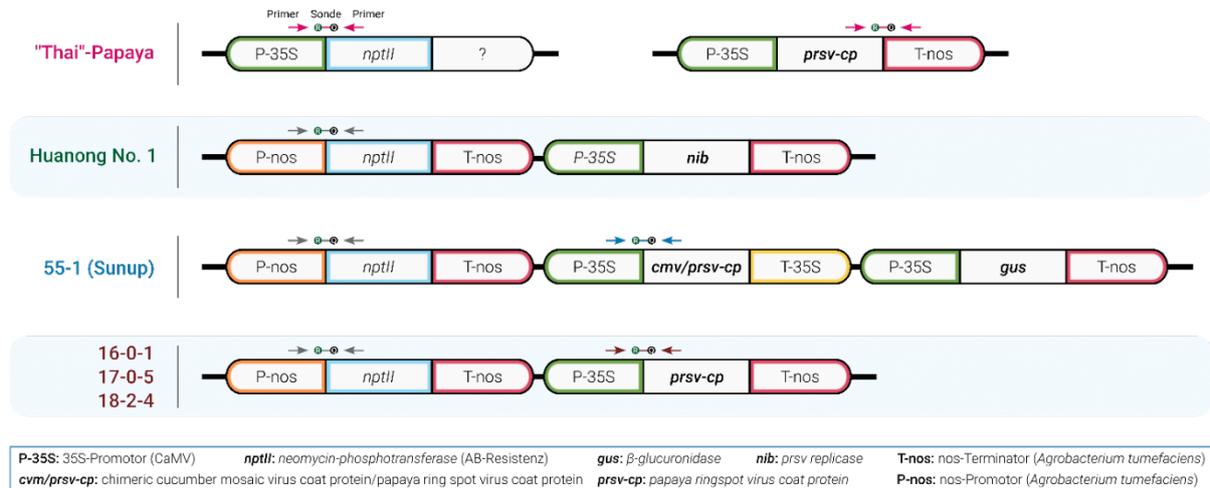
### 7.3 Gentechnologisch erzeugte Resistenz gegen das Papaya Ringspot Virus

Die gentechnologisch erzeugte Virusresistenz in Papaya (*Carica papaya*) wird durch post-transkriptionales Gene Silencing (PTGS) vermittelt. Dabei wird ein (essentielles) Gen des Virus, meist das Hüllprotein oder eine PRSV-Replikase, mit einer zur viralen mRNA homologen Sequenz in das Papayagenom integriert. Die in der Papaya gebildete mRNA eines dieser Gene hybridisiert (interferiert) nach einem Befall der Pflanze durch das Virus mit der homologen mRNA des Virus, wodurch es zu einem verstärkten mRNA-Abbau kommt und dadurch die Übersetzung (Translation) der mRNA in ein Protein stark gestört oder unterbunden wird (Jai *et al.* 2017). Dieses in der Gentechnologie vielseitig angewandte Wirkprinzip wird auch als *RNA-Interferenz* (RNAi) bezeichnet. Durch die erhebliche Störung der Produktion essentieller Virusbestandteile wird die Virusvermehrung in der Pflanze stark reduziert bzw. unterdrückt und somit eine Schädigung der Pflanze verhindert.

#### 7.3.1 Gentechnische Veränderungen in Papaya

Das PRSV kommt weltweit überall dort vor, wo Papaya angebaut wird. Je nach Standort existieren genetisch unterschiedliche PRSV-Varianten. Um gentechnisch veränderte Papaya zu erzeugen, die gegen die lokal vorherrschenden Virusvarianten resistent sind, müssen die Veränderungen jeweils an die vorkommenden Genvarianten angepasst werden.

In **Abbildung 7-2** sind die gentechnischen Veränderungen mit den darin enthaltenen genetischen Elementen sowie deren Anordnung zueinander für einige gv-Papayas dargestellt.

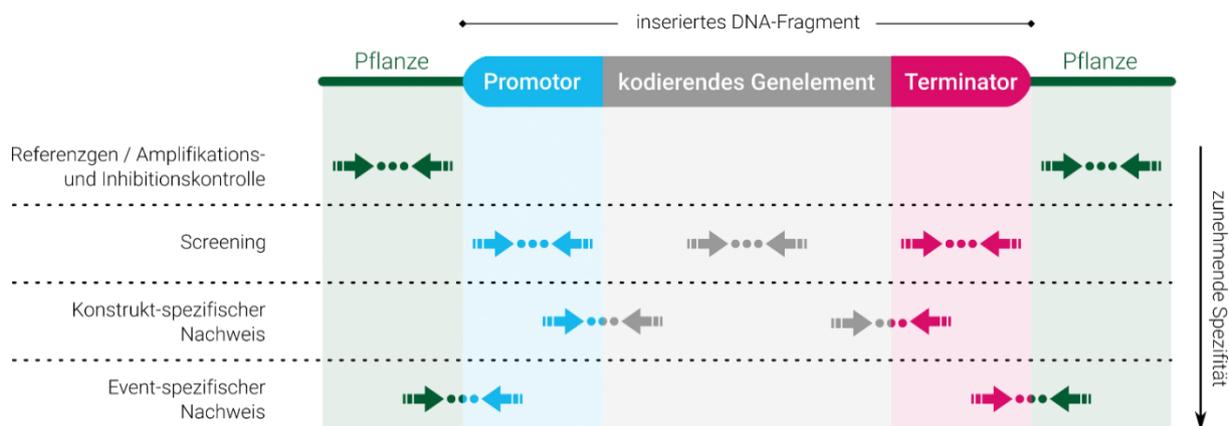


**Abbildung 7-2:** Nachweis verschiedener gentechnisch veränderter Papayas nach Silvia Turco (2013); modifiziert; Dr. Patrick Gürtler (LGL). Umrandungen in einer Farbe kennzeichnen genetische Elemente, die mit einem gemeinsamen Nachweissystem nachweisbar sind und daher für das Screening auf gv-Papaya geeignet sind (z. B. P-35S, T-nos, *nptII*), die diese Elemente enthalten. Primer- und SONDENSymbole in derselben Farbe wie der Name der gv-Papaya weisen auf Nachweissysteme hin, mit denen diese gv-Papaya spezifisch nachgewiesen werden kann. Die Primer- und SONDENSymbole in grauer Farbe für P-nos/*nptII* bezeichnen ein Konstrukt-spezifisches Nachweissystem, dass für den Nachweis einer gentechnischen Veränderung in verschiedenen gv-Papaya geeignet ist.

Je nach Virus gibt es unterschiedliche Varianten des prsv-Hüllproteins (prsv-coat protein, prsv-cp). Aus diesem Grund werden gv-Papaya-Linien i. d. R. nur für ein bestimmtes geographisches Gebiet entwickelt und sind auch nur dort (voll) wirksam.

### 7.3.2 Nachweis von gentechnisch veränderten Papaya

Bei der molekularbiologischen Untersuchung von Proben auf das Vorhandensein bekannter oder auch unbekannter gentechnisch veränderter Organismen (GVO) mittels qPCR (real-time Polymerasekettenreaktion) wird in der Regel in einem ersten Schritt neben dem Nachweis der Pflanzenspezies (hier: Papaya) ein Screening durchgeführt, das auf genetische Elemente abzielt, die in GVO (hier: gv-Papaya) vorkommen können. Bei einem positiven Nachweis erhält man bereits einen Hinweis (keinen Beweis) auf das mögliche Vorhandensein eines GVO. Da diese Elemente für sich genommen auch natürlichen Ursprungs sein können, weil sie ursprünglich beispielsweise aus Bakterien oder Viren stammen, wird in einem nächsten Schritt ein Konstrukt-spezifischer Nachweis durchgeführt. Hierbei werden diejenigen Bereiche nachgewiesen, in denen solche genetischen Elemente aneinander anschließen. Ein solcher Übergang oder auch Konstrukt genannt, ist stets nicht natürlichen Ursprungs, da solche Kombinationen von Gensequenzen aus unterschiedlichen Organismen (Bakterien, Viren, Pilze) in einer Pflanze in der Natur nicht vorkommen. Damit ist der sichere Nachweis einer gentechnischen Veränderung und damit eines GVO möglich.



**Abbildung 7-3:** Schematische Darstellung einer Nachweiskaskade mittels qPCR (Dr. Patrick Gürtler; LGL). Die Pfeile symbolisieren die Amplifikationsprimer, die Punkte dazwischen die dazu gehörige DNA-Sonde. DNA-Bereiche im Pflanzengenom dienen als Referenzgen/Amplifikations- und Inhibitionskontrolle. Für ein (universelles) Screening auf gentechnische Veränderungen eignen sich DNA-Bereiche innerhalb einzelner genetischer Elemente. Ein Nachweis liefert einen Hinweis auf das Vorhandensein eines GVO. Konstrukt-spezifische Nachweise eignen sich zum Nachweis von nicht natürlich vorkommenden DNA-Sequenzkombinationen (Konstrukt) und damit zum zweifelsfreien Nachweis einer gentechnischen Veränderung. Event-spezifische Nachweise detektieren den Integrationsort des gentechnisch eingeführten DNA-Fragments (hier: Konstrukt aus Promotor, kodierendem Genelement und Terminator) in das Pflanzengenom. Diese (beiden) Bereiche sind hochspezifisch und erlauben die Identifizierung eines ganz bestimmten GVO (Event). Die Spezifität der Nachweise nimmt vom Nachweis der Pflanzen-DNA bis hin zur Identifizierung des Events zu.

Da gleiche oder ähnliche Genkonstrukte in verschiedenen GVO vorkommen, kann zur Unterscheidung von verschiedenen GVO-Linien – soweit verfügbar – zusätzlich ein so genannter Event-spezifischer Nachweis angeschlossen werden. Dieser weist typischerweise eine der beiden für jeden GVO hochspezifischen Integrationsstellen des Konstrukts in das Wirtsgenom nach. Die **Abbildung 7-3** veranschaulicht das beschriebene Konzept.

Für eine gezielte Auswahl der anzuwendenden Methoden sind Informationen über die genetische Struktur eines oder mehrerer GVO unerlässlich. Mit diesen Informationen kann ein Screening und ein Nachweisschema erstellt werden. Für den Nachweis von gv-Papaya kann so eine Matrix erstellt werden, in der für jede der bekannte gv-Papaya die theoretischen und/oder praktischen Ergebnisse mehrerer Nachweissysteme angegeben sind. Eine solche Matrix erleichtert die Interpretation der Ergebnisse für einen oder mehrere GVO. Die beiden nachfolgenden Tabellen (**Tabelle 7-1**; **Tabelle 7-2**) enthalten solche Matrices für Element- und Konstrukt-spezifische Nachweise sowie Literaturverweise zu Event-spezifischen Verfahren. Elemente, die in sehr vielen bekannten Papayaliniien vorkommen (z. B. P-35S, T-nos, *nptII*) sind für ein universelles Screening auf gv-Papaya geeignet.

**Tabelle 7-1:** Tabellarische Übersicht über verschiedene gv-Papayaliniien und die darin enthaltenen (+) und nicht enthaltenen (–) genetischen Elemente und zwei Konstrukten sowie Literaturangaben zu weiteren bekannten Konstrukt- und Event-spezifischen Methoden.

Event/Bezeichnung	Unique Identifier	Elemente					Konstrukte			Events
		P35S	Tnos	Pnos	nptII	T35S	Pnos-nptII	P35S-nptII	Weitere Konstrukte	
55-1 (Sunup, Rainbow)	CUH-CP551-8	+	+	+	+	+	+	-	ASU L 29.00-9	Kim <i>et al.</i> (2015)
63-1	CUH-CP631-7	+	+	+	+	+	+	-	Wall <i>et al.</i> (2003)	
„Thai“-Papaya		+	+	-	+	-	-	+	Silvia Turco (2013)	
16-0-1		+	+	+	+	-	+	-		Kim <i>et al.</i> (2015) Prins <i>et al.</i> (2016)
17-0-5		+	+	+	+	-	+	-	Fan <i>et al.</i> (2009)	
18-2-4		+	+	+	+	-	+	-		Prins <i>et al.</i> (2016)
PRSV-YK*		+	+	+	+	-	+	-	Nakamura <i>et al.</i> (2016)	Nakamura <i>et al.</i> (2016)
Huanong No. 1		+	+	+	+	-	+	-		Wei <i>et al.</i> (2016) Kim <i>et al.</i> (2015) Guo <i>et al.</i> (2009)
X17-2	UFL-X17CP-6	+	+	+	+	-	+	-		

\* PRSV-YK entspricht 16-0-1/17-0-5 (s. Nakamura *et al.* 2016)

**Tabelle 7-2:** In dieser Tabelle sind die Ergebnisse Konstrukt-spezifischer Methoden aufgeführt, die am LGL mit Referenzmaterial durchgeführt wurden. Durch dieses kombinatorische Screening ist eine Differenzierung der verschiedenen angegebenen gv-Papayas möglich.

Event/Bezeichnung	Unique Identifier	P35S-nptII (ASU G 30.40-18)	P35S-cmv/prsv_cp (ASU L 29.00-9)	T-nos-prsv_cp (Silvia Turco, 2013)	P35S-prsv_cp (Prins <i>et al.</i> , 2016)	P35S-prsv_cp (Nakamura <i>et al.</i> , 2016)	Referenzmaterial (gDNA)
55-1 (Sunup, Rainbow)	CUH-CP551-8	-	+	-	-	-	+
„Thai“-Papaya		+	-	+	-	-	+
16-0-1		-	-	-	+	+	+
PRSV-YK*		-	-	-	+	+	+

\* PRSV-YK entspricht 16-0-1/17-0-5 (s. Nakamura *et al.* 2016)

Für weitere Informationen zu den genetischen Elementen in gv-Papaya wird auf die Veröffentlichung von Prins *et al.* (2016) verwiesen. Nachfolgend ist ein Auszug davon abgebildet (**Abbildung 7-4**).

Some examples of literature references to GM papaya. X indicates the described single or double presence of known elements. The overview of elements is limited to published data and may not be exhaustive. P = promoter, T = terminator.

Name	Origin	Trait and major responsible gene(s)	P-nos	P-35S	T-nos	T-35S	nptII	PRSV-CP	GUS	PLDMV-CP	Nib	Uda	GNA	DmAMP1	MSCH	ACC oxidase	T-RuB5Co	References
55-1 (SunUp, Rainbow)	USA	PRSV resistance by PRSV strain HA CP	X	XX	XX	X	X	X	X									Fitch et al. (1992), Nakamura et al. (2013), Tennant et al. (1994)
63-1	USA	PRSV resistance by PRSV strain HA CP	X	X	X	X	X	X										Fitch et al. (1992), Tennant et al. (1994)
Laie Gold	USA	PRSV resistance by PRSV strain HA CP						X										VIB (2014)
X17-2	USA	PRSV resistance by PRSV strain H1K CP	X	X	XX		X	X										USDA ASPHIS petition 04_33701p
Huanong No.1	China	PRSV resistance by PRSV replicase (Nib)	X	X	XX		X				X							Guo et al. (2009), Xu et al. (2008)
Zhongkang	China	PRSV resistance by PRSV strain Sucre-Punta Lebranche CP						X										Xu et al. (2008), Ye and Li (2010) see Fermin et al. (2004)
16-0-1, 17-0-5	Taiwan	PRSV resistance by PRSV CP	X	X	XX		X	X										Bau, Cheng, Yu, Yang, and Yeh (2003), Fan et al. (2009)
18-2-4	Taiwan	PRSV resistance by PRSV CP	X	X	XX		X	X										Bau et al. (2003), Fan et al. (2009)
18-09 and 19-01	Taiwan	PRSV resistance by PRSV CP	X	X	XX		X	X										Bau et al. (2003), Fan et al. (2009)
Unknown	USA	Spider mite control by GNA lectin from <i>Galanthus nivalis</i>	X	X	XX		X					X						McCafferty et al. (2006)
ZS1 and ZS2	China	PRSV resistance by PRSV replicase (Nib)	X	X	XX	X		X			X							Wei et al. (2006a, 2006b)
TP10-4/TPY10-4	Taiwan	PRSV resistance by PRSV CP and PLDMV CP	X	X	XX		X	X		X								Chen, Hwang, Fang, Cheng, and Lin (2011), Kung et al. (2009)
KN116/5	Unknown	PRSV resistance by PRSV CP					X	X										Phironrit, Chowpongpan, Warin, Bhunchoth, and Atathom (2007)
PRSV-YK	Thailand	PRSV resistance by PRSV strain H1K CP		X	X			X										Nakamura et al. (2011)
Unknown	Unknown	<i>Phytophthora palmivora</i> resistance by <i>Dahlia merckii</i> defensin DmAMP1	X	X	XX		X						X					Zhu, Agbayani, and Moore (2007)
Unknown	Venezuela	PRSV resistance by PRSV strains VE and LA CP		X	X			X										Fermin et al. (2004)
T-23, T-14, T-35	USA	Insect chitinase (MSCH) from <i>Manduca sexta</i>	X	X	XX	X	X	X							X			McCafferty et al. (2006)
Jamaica several lines	Jamaica	PRSV resistance by PRSV strain HA CP	X	X	XX		X	X			X	X						Tennant, Ahmad, and Gonsalves (2002, 2005)
R3 319-1KN-180/R3 319-1KN-181 (Khaknuan), R3 300KD-9 (Khakdam)	Thailand	PRSV resistance by PRSV strain TH CP					X	X										Sakunrungsrikuai et al. (2005)
KN 1.2.3, KN 13.2.3, KN49	Thailand	PRSV resistance by PRSV strain CP						X										Kertbundit and Juricek (2010)
CG-9 and CE-2	Australia	PRSV resistance by PRSV CP		X		X	X	X							X			Lines, Persley, Dale, Drew, and Bateson (2002)
Unknown	Mexico	Delayed ripening by ACCO suppression		X											X	X		Lopez-Gomez et al. (2009)
Brazil several lines	Brazil	PRSV resistance by PRSV strain BR (Bahia) CP		X		X	X	X										Souza, Nickel, and Gonsalves (2005)

T.W. Prins et al. / Food Chemistry 213 (2016) 536–544

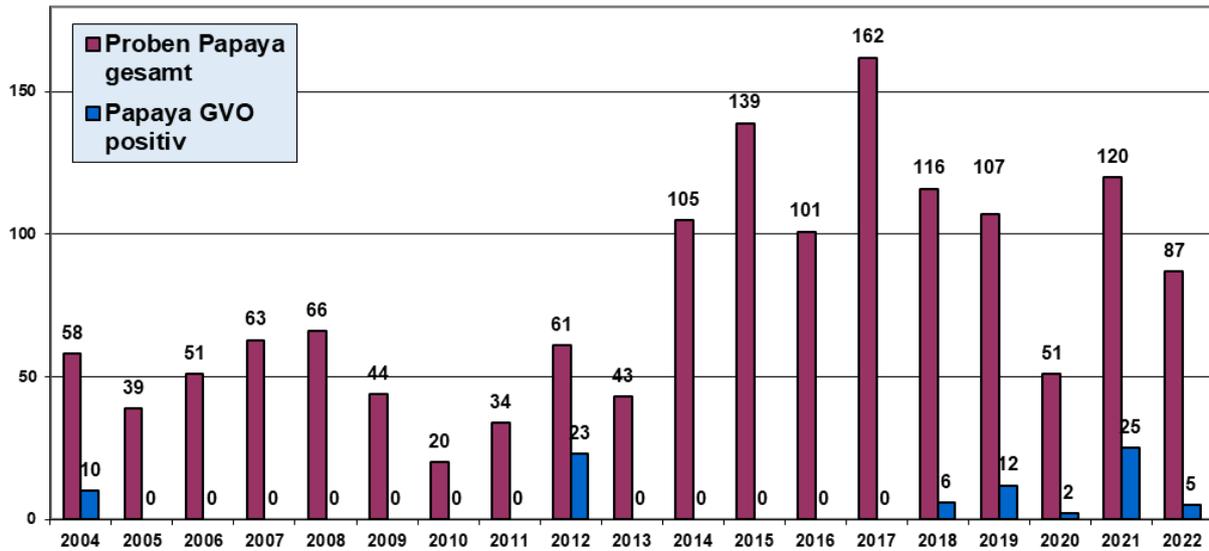
**Abbildung 7-4:** Auflistung von bekannten gv-Papayas sowie jeweils darin vorkommenden genetischen Elementen mit den dazugehörigen Literaturverweisen (Prins *et al.* 2016)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass gv-Papaya mit wenigen genetischen Elementen (z. B. P-35S, T-nos, *nptII*) gescreent werden kann. Im Falle eines positiven Ergebnisses kann mit einem Konstrukt-spezifischen Nachweis eine gentechnische Veränderung zweifelsfrei nachgewiesen werden und mit Event-spezifischen Methoden (sofern verfügbar) kann eine bestimmte gv-Papayalinie nachgewiesen werden.

## 7.4 Untersuchungsergebnisse des LGL zu gentechnisch veränderten Papaya

Das LGL wies bis 2017 nur episodisch und in begrenzten Zeiträumen (2004 und 2012) nicht zugelassene gv-Papayas aus den USA nach. Seit 2018 hat das LGL jedoch jedes Jahr bis 2022 gv-Papayas aus Asien („Thai“-Papaya) unter den beprobten – so genannte Green Papaya oder Kochpapaya – nachgewiesen. Diese unterscheiden sich auf genetischer Ebene von den Papayas aus den USA und werden daher auch mit anderen Nachweisverfahren detektiert. Die Ergebnisse der Jahre 2004 - 2022 sind im nachfolgenden Diagramm (**Abbildung 7-5**) dargestellt.

Alle positiven Fälle wurden beanstandet und die zuständigen Behörden informiert.



**Abbildung 7-5:** Am LGL nachgewiesene gv-Papaya (Früchte): 2004 und 2012: Papaya 55-1/63-1 („Hawaii“-Papaya), 2018-2022: „Thai“-Papaya

## 7.5 Literatur

**ASU G 30.40-8** – Nachweis des DNA-Sequenzübergangs von dem nos-Promotor in das nptII-Gen zum Screening auf GVO

**ASU G 30.40-18** – *Real-time PCR-Nachweis des P35S-nptII-Konstrukts zum Screening auf gentechnisch veränderte Pflanzen*

**ASU L 29.00-9** – *Qualitativer Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen in Papaya-Ring-Spot-Virus-resistenter Papaya (Carica papaya)*

**BCH DATABASE** – <https://bch.cbd.int>

**EUGINIUS DATABASE** - <https://euginius.eu/euginius/pages/home.jsf>

**FAN, M. J., CHEN, S., KUNG, Y. J., CHENG, Y. H., BAU, H. J., SU, T. T., & YEH, S. D.** (2009) – *Transgene-specific and event-specific molecular markers for characterization of transgenic papaya lines resistant to Papaya ringspot virus*. *Transgenic research*, 18, 971-986.

**GERDES, L., BUSCH, U., & PECORARO, S.** (2012) – *GMO finder—A GMO Screening Database*. *Food Analytical Methods*, 5, 1368-1376.

**GONSALVES, D., TRIPATHI, S., CARR, J. B., & SUZUKI, J. Y.** (2010) – *Papaya ringspot virus*. *The Plant Health Instructor*, 10, 1094.

**GUO, J., YANG, L., LIU, X., GUAN, X., JIANG, L., & ZHANG, D.** (2009) – *Characterization of the exogenous insert and development of event-specific PCR detection methods for genetically modified Huanong No. 1 papaya*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7205-7212.

**JIA, R., ZHAO, H., HUANG, J., KONG, H., ZHANG, Y., GUO, J., ... & GUO, A.** (2017) – *Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya*. *Scientific Reports*, 7(1), 12636.

**JRC GMO MATRIX DATABASE** – <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full>

**KIM, J. H., PARK, S. B., ROH, H. J., WOO, H. B., SHIN, M. K., IM MOON, G., ... & KIM, H. Y.** (2015) – *Event-specific qualitative and quantitative detection of three genetically modified papaya events using a single standard reference molecule*. *Food Control*, 55, 127-132.

**NAKAMURA, K., KONDO, K., AKIYAMA, H., ISHIGAKI, T., NOGUCHI, A., KATSUMATA, H., ... & NISHIMAKI-MOGAMI, T.** (2016) – *Whole genome sequence analysis of unidentified genetically modified papaya for development of a specific detection method*. *Food Chemistry*, 205, 272-279.

**PRINS, T. W., SCHOLTENS, I. M., BAK, A. W., VAN DIJK, J. P., VOORHUIJZEN, M. M., LAURENSSE, E. J., & KOK, E. J.** (2016) – *A case study to determine the geographical origin of unknown GM papaya in routine food sample analysis, followed by identification of papaya events 16-0-1 and 18-2-4*. *Food chemistry*, 213, 536-544.

**TURCO, S.** (2013) – *Characterization of transgenic papaya line and development of a construct-specific detection method* (Thesis). Università Degli Studi Di Palermo Facoltà Di Scienze MM.FF.NN

**WALL, E. M., LAWRENCE, T. S., GREEN, M. J., & ROTT, M. E.** (2004) – *Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR*. *European Food Research and Technology*, 219, 90-96.

**WEI, J., LE, H., PAN, A., XU, J., LI, F., LI, X., ... & YANG, L.** (2016) – *Collaborative trial for the validation of event-specific PCR detection methods of genetically modified papaya Huanong No. 1*. *Food Chemistry*, 194, 20-25.

## 8 Aktivitäten der § 28b GenTG Arbeitsgruppe zum Nachweis von genomeditierten Pflanzen

**Patrick Gürtler und Steffen Heinz**

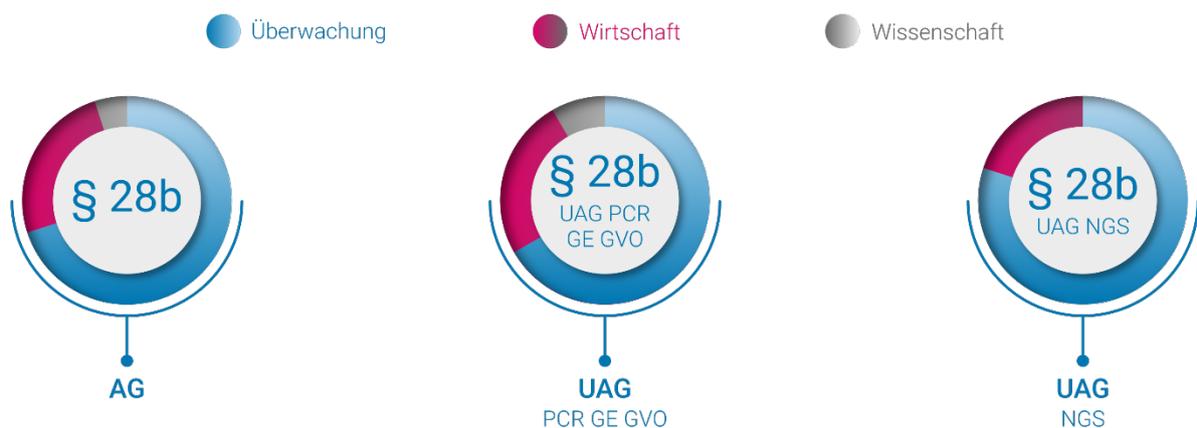
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, LGL

### 8.1 § 28b GenTG Arbeitsgruppe „Methodensammlung“

Im § 28b des Gentechnikgesetzes (GenTG; [1]) ist eine Methodensammlung festgelegt, die durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) veröffentlicht wird:

- (1) Die zuständige Bundesoberbehörde veröffentlicht im Benehmen mit den lebens- und futtermittelrechtlichen Vorschriften zuständigen Behörden eine amtliche Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Proben, die im Rahmen der Überwachung von gentechnischen Arbeiten, gentechnischen Anlagen, Freisetzungen von gentechnisch veränderten Organismen und dem Inverkehrbringen durchgeführt oder angewendet werden.
- (2) Die Verfahren werden unter Mitwirkung von Sachkundigen aus den Bereichen der Überwachung, der Wissenschaft und der beteiligten Wirtschaft festgelegt. Die Sammlung ist laufend auf dem neuesten Stand zu halten.

Diese Methodensammlung wird durch die § 28b GenTG Arbeitsgruppe „Methodensammlung“ erarbeitet und laufend aktualisiert. Derzeit besteht die Arbeitsgruppe aus 21 Mitgliedern, davon 14 Mitglieder aus dem Bereich der „Überwachung“, 6 aus dem Bereich „Wirtschaft“ und 1 aus dem Bereich „Wissenschaft“. Zudem sind aktuell 17 Gäste beteiligt (Stand September 2022; siehe **Abbildung 8-1**).



**Abbildung 8-1:** Zusammensetzung der § 28b GenTG Arbeitsgruppe (AG) und ihrer beiden Unterarbeitsgruppen (UAG)

Neben der eigentlichen Arbeitsgruppe wurden zwei Unterarbeitsgruppen eingerichtet. Eine beschäftigt sich mit der Entwicklung und Etablierung von PCR-basierten Methoden im Zusammenhang mit genomeditierten Organismen, während die zweite Unterarbeitsgruppe Anwendungsmöglichkeiten des Next Generation Sequencing (NGS) im Bereich der GVO-Analytik erarbeitet.

Die § 28b GenTG Arbeitsgruppe hat sich bisher vor allem mit gentechnisch veränderten Organismen beschäftigt, die durch klassische Transgenese hergestellt wurden. Seit etwa 2016 gehören zunehmend auch genomeditierte Organismen zum Arbeitsspektrum der Arbeitsgruppe.

## 8.2 Nachweis transgener Pflanzen

Bei gentechnisch veränderten Pflanzen, die mit Hilfe der klassischen Grünen Gentechnik (Transgenese) hergestellt werden, wird eine Fremd-DNA in das Erbgut der Pflanze eingebracht, um ihr in der Regel eine neue oder verbesserte Eigenschaft zu verleihen. Der Einbau dieser Fremd-DNA erfolgt dabei an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle im Genom der Pflanze. Das bedeutet, dass die Kombination aus einem bestimmten, eingefügten DNA-Fragment und der Insertionsstelle für jede dieser gentechnisch veränderten Pflanzen einzigartig ist. Daher können diese Pflanzen durch den Nachweis der DNA-Sequenz des Übergangs vom Pflanzengenom zum inseriertem DNA-Fragment eindeutig identifiziert werden. Ein solcher Nachweis wird als **eventspezifischer Nachweis** bezeichnet (**Abbildung 8-2**).



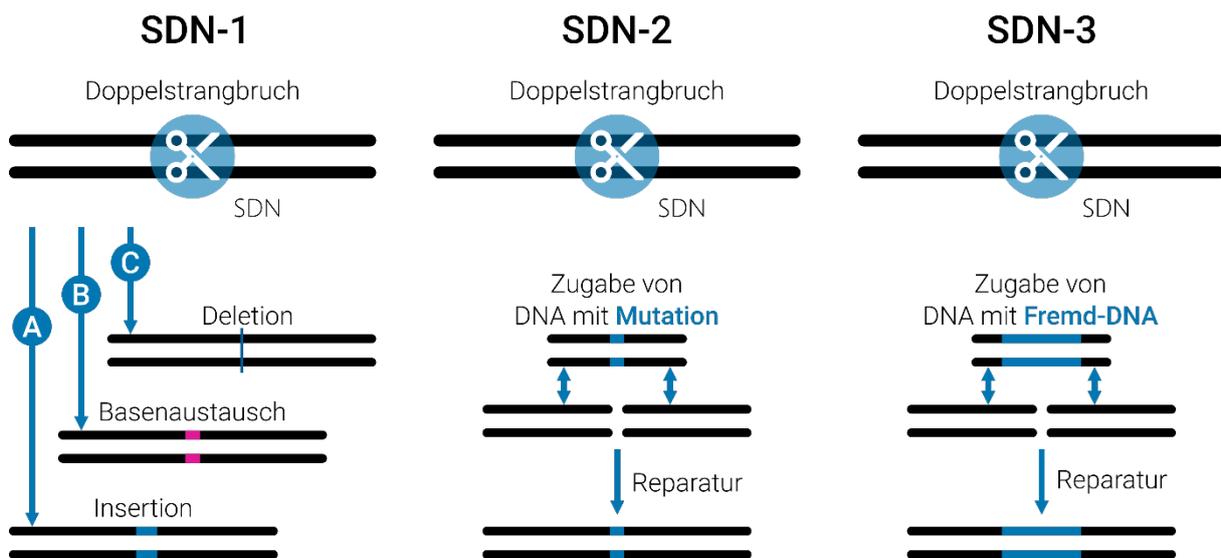
**Abbildung 8-2:** Event-spezifischer Nachweis zur Identifizierung von gentechnisch veränderten Pflanzen. Um zwei Events jeweils eindeutig zu identifizieren wird der Übergang vom Pflanzengenom in das inserierte DNA-Fragment (1) bzw. vom inserierten DNA-Fragment ins Pflanzengenom (2) nachgewiesen. Da die Kombination aus Insertionsstelle und inseriertem DNA-Fragment einmalig ist, kann über einen solchen eventspezifischen Nachweis eine eindeutige Identifizierung der transgenen Pflanze erreicht werden. Die Pfeile symbolisieren die Position der Primer.

## 8.3 Neue genomische Techniken

Die zunehmend eingesetzten neuen genomischen Techniken (NGT), die auch unter dem Begriff „*Genome Editing*“ zusammengefasst werden, haben gegenüber den Techniken der klassischen Gentechnik den Vorteil, dass der Ort der genetischen Modifikation vorherbestimmt werden kann. Eine ortsspezifische Nuklease (SDN) wird über Proteine (z. B. bei zinkfinger nucleases - ZFN; transcription activator-like effector nucleases - TALEN) oder eine RNA (z. B. bei CRISPR/Cas9) an die Stelle im Genom gelenkt, an der ein DNA-Doppelstrangbruch erzeugt werden soll.

Bei der anschließenden Modifikation werden die folgenden Möglichkeiten unterschieden (**Abbildung 8-3**):

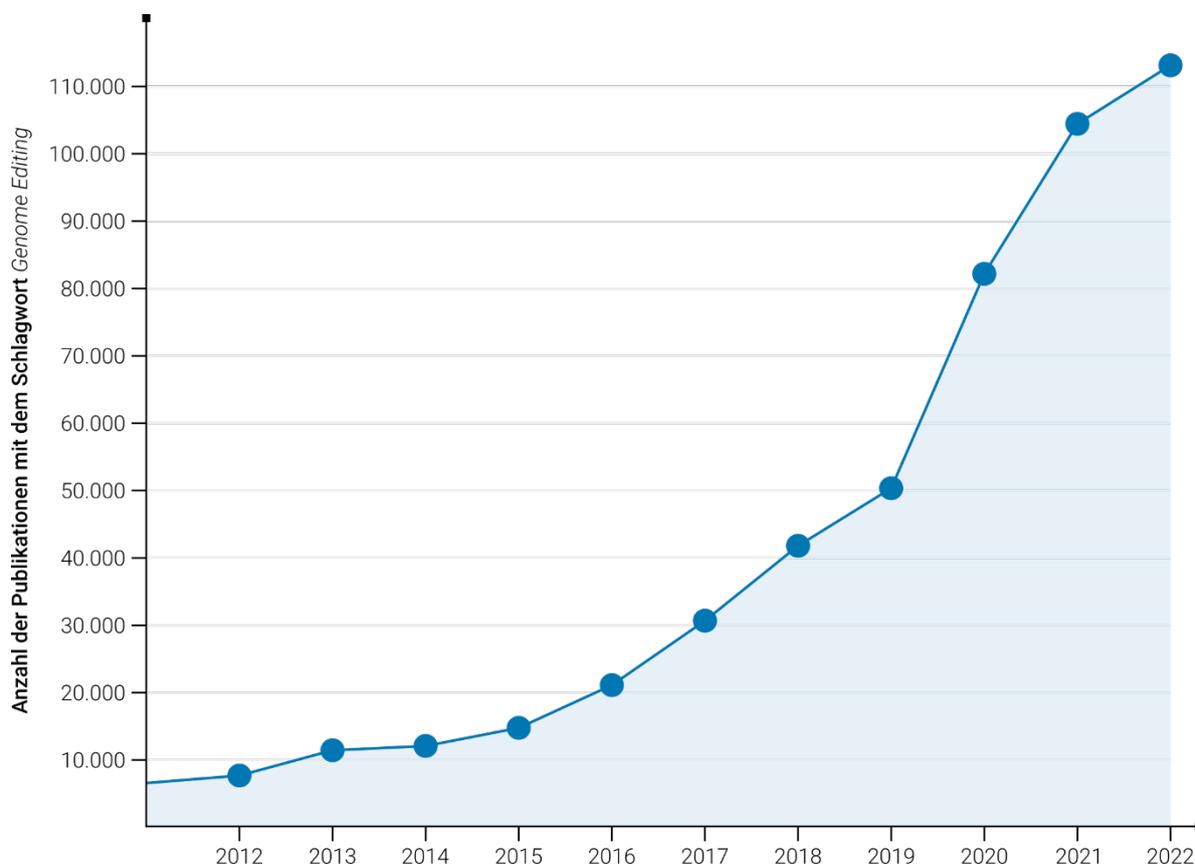
- Der DNA-Doppelstrangbruch wird durch den zelleigenen Reparaturmechanismus repariert, wobei es zu einer Deletion, einer Insertion oder in sehr seltenen Fällen zu einem Austausch einzelner Basen kommen kann (= **SDN-1-Technik**).
- Ein zusätzliches DNA-Fragment wird zugegeben, das weitgehend homolog zu der Stelle im Pflanzengenom ist, an der der gezielte DNA-Doppelstrangbruch erfolgt ist. An einer Position dieses zusätzlichen DNA-Fragments wurde zuvor eine kleine Mutation eingefügt. Der zelleigene Reparaturmechanismus verwendet das zugegebene DNA-Fragment als Vorlage für die Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs und baut dabei auch die gewünschte Mutation ein (= **SDN-2-Technik**).
- Es wird ein zusätzliches DNA-Fragment zugegeben, das aus einer Fremd-DNA besteht, deren flankierende Bereiche homolog zu der Stelle im Pflanzengenoms sind, an der der DNA-Doppelstrangbruch erfolgt ist. Der zelleigene Reparaturmechanismus verwendet das zugegebene DNA-Fragment als Vorlage für die Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs, wobei auch die Fremd-DNA an der gewünschten Position eingebaut wird (= **SDN-3-Technik**).



**Abbildung 8-3:** Schematische Übersicht der SDN-Techniken und der damit erzeugten genetischen Veränderungen (basiert auf [2]). Bei SDN-1 und SDN-2 werden nur sehr kleine Modifikationen an einer vordefinierten Position im Genom vorgenommen. Bei SDN-3 können auch größere DNA-Fragmente an einer vordefinierten Position in das Genom eingebracht werden.

Diese NGT haben vor allem im Bereich der Forschung und Entwicklung schnell an Bedeutung gewonnen, wie die jährlich steigende Anzahl von Publikationen mit dem Schlagwort „Genome Editing“ zeigt (**Abbildung 8-4**). Mit Hilfe der NGT lässt sich nicht nur die Position, an der die Modifikation stattfinden soll, vorherbestimmen, sondern auch die Art der erzeugten Modifikation steuern. Damit können genetische Veränderungen noch gezielter und schneller als mit klassischer Transgenese erzeugt werden. Darüber hinaus können auch einzelne Basen gezielt verändert, entfernt oder hinzugefügt werden.

Dadurch entstehen Modifikationen, die aber auch auf natürliche Weise oder durch ungerichtete Mutagenese mittels Strahlung oder Chemikalien entstehen könnten.



**Abbildung 8-4:** Anzahl der Publikationen mit dem Schlagwort *Genome Editing* (Stand Dezember 2022; Daten: <https://app.dimensions.ai/discover/publication>).

Bisher waren Organismen, die durch ungerichtete Mutagenese erzeugt wurden, von der EU-Gentechnikregulierung ausgenommen, doch es Zeit war unklar, wie Organismen, die durch NGT erzeugt wurden, rechtlich einzuordnen sind. Der Europäische Gerichtshof (EuGH) hat sich dieser Frage angenommen und 2018 ein wegweisendes Urteil gefällt.

#### 8.4 Auswirkungen des EuGH-Urteils

Der EuGH hat entschieden, dass alle durch Mutagenese erzeugten Organismen unter die EU-Gentechnikregulierung fallen und somit als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) einzustufen sind. Da jedoch die klassische, ungerichtete Mutagenese (Bestrahlung, Chemikalien) seit langem angewandt wird und als sicher gilt, sind die so erzeugten Organismen von einer Gentechnikregulierung ausgenommen. Den EU-Mitgliedstaaten wurde jedoch die Möglichkeit eingeräumt, auch diese Organismen auf nationaler Ebene als GVO einzustufen.

Demnach fallen durch NGT erzeugte Organismen nicht unter die Ausnahmeregelung des Anhangs 1 B der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG [3] und unterliegen damit dem Geltungsbereich des EU-Gentechnikrechts.

Das bedeutet, dass genomeditierte Organismen vor dem Inverkehrbringen in der EU eine Zulassung als Lebens- oder Futtermittel oder für den Anbau benötigen. Ohne Zulassung dürfen sie in der EU nicht in Verkehr gebracht werden. Dies hat zur Folge, dass nun eine Überwachung dieser durch NGT hergestellten Organismen in der EU notwendig wird, um ein unzulässiges Inverkehrbringen zu verhindern.

Mit diesem Urteil des EuGH stehen die Überwachungsbehörden nun vor der Herausforderung, nicht nur kleine Punktmutation eindeutig und rechtssicher nachzuweisen, sondern diese auch von natürlichen oder durch ungerichtete Mutagenese erzeugten Punktmutationen zu unterscheiden [4]. Um dieser Herausforderung zu begegnen, beschäftigt sich das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Zusammenarbeit mit der § 28b GenTG Arbeitsgruppe „Methodensammlung“ mit der Evaluierung und Entwicklung von Nachweismethoden für mittels NGT erzeugte Mutationen. Die Arbeiten am LGL erfolgen überwiegend im Rahmen von Forschungsprojekten, die vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) gefördert werden.

## 8.5 Aktivitäten der § 28b GenTG Arbeitsgruppe und Herausforderungen für die Analytik

Die § 28b GenTG Arbeitsgruppe hat sich frühzeitig mit der Identifizierung möglicher Nachweismethoden für genomeditierte Organismen beschäftigt. Als erster Ansatz wurde der Nachweis von Komponenten des CRISPR/Cas-Systems entwickelt.

### 8.5.1 Scaffold RNA

Wenn die CRISPR/Cas-Maschinerie zur Genomeditierung als DNA in das Zielgenom eingebracht wird, besteht sie in der Regel aus mehreren Teilen:

- a) Genabschnitt für die Produktion der Cas-Endonuklease (*cas* Gene)
- b) guide RNA (gRNA), die wiederum aus drei Untereinheiten besteht:
  - **protospacer adjacent motif (PAM; 2-7 Nukleotide)**
  - **CRISPR RNA (crRNA; 18-20 Nukleotide)** oder **Protospacer-Sequenz**
  - **tracrRNA mit scaffold Struktur (gRNA scaffold)**
- c) regulatorische Genelemente für den Transkriptionsprozess (Promotoren, Terminatoren, etc.)

Die gRNA dirigiert die Cas-Endonuklease zu der Stelle im Genom, an der die DNA-Modifikation stattfinden soll. Die Sequenz der crRNA ist homolog zu dem Teil des Genoms, an dem der DNA-Doppelstrangbruch erzeugt werden soll. Die crRNA definiert also die Zielregion und ist daher immer an die Sequenz der Zielregion angepasst. Die Schnittstelle selbst wird durch das sogenannte PAM-Motiv (engl.: protospacer adjacent motif) definiert. Welche PAM-Motiv-Sequenz benötigt wird, hängt von der verwendeten Endonuklease ab und ist in der Regel zwischen 2 und 7 Nukleotide lang. Ohne dieses PAM-Motiv findet kein induzierter DNA-Doppelstrangbruch statt. Die für den gRNA scaffold kodierende Sequenz ist ca. 80 Nukleotide lang, weitgehend konserviert und kann daher als Ziel für die Entwicklung eines Screening-Nachweises für CRISPR/Cas-Anwendungen verwendet werden.

Die kodierenden Sequenzen des gRNA scaffold stammen bei gentechnischen Arbeiten häufig aus *Streptococcus pyogenes* oder *Staphylococcus aureus*. Diese unterscheiden sich am 5'-Ende, so dass für diese beiden Varianten im Rahmen der § 28b GenTG Arbeitsgruppe real-time-PCR-basierte Nachweismethoden entwickelt wurden. Zur Validierung dieser beiden Methoden wurde Ende 2022 ein Ringversuch mit teilnehmenden Laboratorien aus Deutschland, Österreich, der Schweiz und Italien durchgeführt.

### 8.5.2 Cibus-Raps

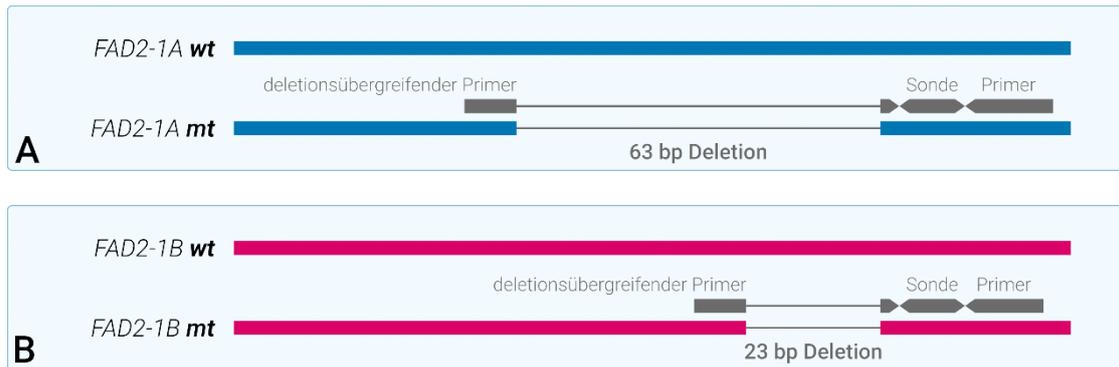
Die von der Firma CIBUS entwickelte herbizidtolerante Rapsorte ist die erste genomeditierte Pflanze, die in den USA und Kanada vermarktet wird. Diese Rapsorte wurde mittels oligo directed mutagenesis (ODM) hergestellt. ODM ist eine Technik, bei der im Gegensatz zu den SDN-Techniken keine DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden, sondern nur ein DNA-Fragment mit einer gewünschten kleinen Modifikation zugegeben wird, das dann in sehr seltenen Fällen zur Modifikation an der entsprechenden Stelle im Zielgenom führt. Diese als "Rapid Trait Development System" (RTDS) bezeichnete Technik wurde verwendet, um einen Einzelbasenaustausch im *acetohydroxyacid synthase*-Gen (*AHAS*) zu induzieren. Der Austausch eines „G“ gegen ein „T“ führt dann zu einer Toleranz gegenüber Sulfonylharnstoff-Herbiziden. Es gibt verschiedene Genvarianten des *AHAS*, von denen *AHAS1C* und *AHAS3A* diesen Basenaustausch tragen, wobei die restliche DNA-Sequenz dieser Genvarianten weitgehend identisch ist.

Der Basenaustausch in der Genvariante *AHAS3A* konnte aber auch durch konventionelle Züchtung in sogenannten Clearfield-Sorten erreicht werden, die in den USA seit vielen Jahren kommerziell vertrieben werden.

Im Jahr 2020 wurde eine Methode publiziert [5], die erstmals eine spezifische Methode zur Detektion und Quantifizierung eines genomeditierten Organismus ermöglichen soll. Diese Methode wurde daraufhin vom BVL hinsichtlich der Einhaltung der „Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods for GMO Testing“ des European Network of GMO Laboratories (ENGL; [6]) überprüft. Eine ausführliche Darstellung dieser Überprüfung erfolgte im Rahmen dieser Fachtagung Gentechnik durch Fr. Dr. Sophia Edelmann vom BVL in einem gesonderten Vortrag (siehe **Kapitel 5**; [7]).

### 8.5.3 Calyxt-Soja

Die Firma Calyxt (USA) nutzte die TALEN-Technologie (SDN-1), um die Fettsäurezusammensetzung von Sojabohnen zu verändern. Dazu wurden kleine Abschnitte der *fatty acid desaturase 2* Genvarianten A (*FAD2-A*) und B (*FAD2-B*) entfernt, wodurch diese beiden Genvarianten ausgeschaltet wurden (knock-out; **Abbildung 8-5**). Durch diese Genomeditierung erhöht sich der Ölsäuregehalt von durchschnittlich 20 % auf etwa 80 %, bei gleichzeitiger Reduktion des Linolsäuregehalts von durchschnittlich 50 % auf etwa 5 % [8]. Das aus diesen Sojabohnen hergestellte Öl wird in den USA unter dem Namen Calyno vermarktet und dort auch als gentechnikfrei beworben.

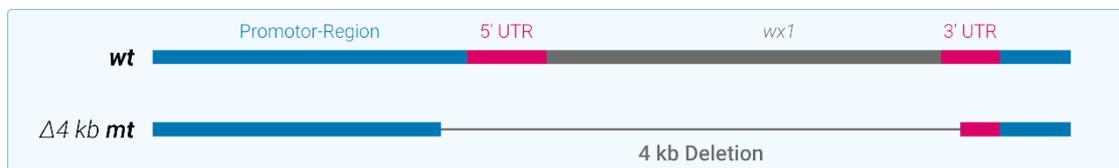


**Abbildung 8-5:** Schematische genetische Struktur der (A) *FAD2-1A*- und (B) *FAD2-1B*-Genvarianten im Wildtyp (wt) und in der genomeditierten Sojabohne (mt). Die vom LGL erstellten Primer und Sonden sind in grau dargestellt. Der Forward Primer ist jeweils deletionsübergreifend.

Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) hat sich intensiv um Positivmaterial dieser Calyxt-Sojabohne bemüht, leider ohne Erfolg. Daher hat die § 28b GenTG Arbeitsgruppe unter Verwendung der publizierten DNA-Sequenzen synthetische Plasmide mit Sequenzen beider Genvarianten des *FAD2*-Gens herstellen lassen, die für die Methodenentwicklung verwendet werden. Die Entwicklung und in-house Validierung der real-time PCR-basierten Nachweismethoden für die genetische Modifikation im *FAD2-A* (63 bp Deletion) und *FAD2-B* (23 bp Deletion) wurde am LGL durchgeführt. Obwohl kein Positivmaterial der Pflanze zur Verfügung steht, wird die § 28b GenTG Arbeitsgruppe einen Ringversuch zur Validierung der beiden Nachweismethoden durchführen.

#### 8.5.4 Corteva Wachsmais

Maisstärke besteht aus Amylopektin und Amylose, etwa im Verhältnis von etwa 70-75 % zu 25-30 %. Da in vielen Bereichen der industriellen Produktion hauptsächlich Amylopektin verwendet wird, muss die Amylose entfernt werden. Um diesen Aufwand zu reduzieren, hat die Firma Corteva Agriscience (USA) mit Hilfe der CRISPR/Cas-Technologie (SDN-1) das *waxy*-Gen (*wx1*) im Mais ausgeschaltet [9]. Die entwickelte Sorte mit einer 4 kb-Deletion im *wx1* aufweist (**Abbildung 8-6**) wird in den USA und in Südamerika getestet, wo diese Sorte auch als gentechnikfrei eingestuft wird.



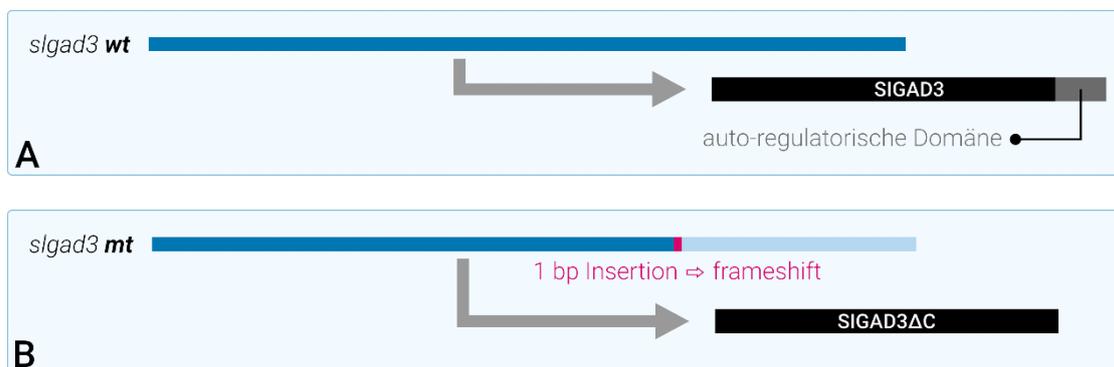
**Abbildung 8-6:** Schematische Darstellung der genetischen Struktur des *waxy*-Gens (*wx1*) im Wildtyp (wt) und der 4 kb-Deletion im genomeditierten Mais (mt); UTR = untranslatierte Region

Dem BVL ist es gelungen, Positivmaterial des genomeditierten Mais der Firma Corteva Agriscience auf der Basis eines strengen Material Transfer Agreements zu erhalten. Darin ist das LGL als Labor aufgeführt, das die publizierte Nachweismethode (real-time PCR; [9]) mit DNA aus diesem Positivmaterial verifizieren kann.

Obwohl es sich um eine Singleplex real-time PCR handelt, wird (laut Publikation) ein Multiplex Master Mix verwendet. Außer dieser Information und der Information über die Primer- und Sondensequenzen sind keine weiteren PCR-Bedingungen (z. B. Cycler, Primer- und Sondenkonzentration, Temperaturschema, etc.) veröffentlicht. In Absprache mit der Firma Corteva Agriscience überprüft das LGL derzeit die Methode und vergleicht die Leistungsparameter der Methode mit den Vorgaben für Methoden zum Nachweis gentechnisch veränderter Organismen („Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods for GMO Testing“ des European Network of GMO Laboratories, ENGL; [6]). Bei ausreichender Spezifität, Sensitivität und Robustheit der veröffentlichten Methode wird die § 28b GenTG Arbeitsgruppe einen Ringversuch zur Methodvalidierung durchführen.

### 8.5.5 High GABA-Tomate

Die high GABA-Tomate ist eine in Japan kommerziell erhältliche, mit Hilfe von CRISPR/Cas (SDN-1) hergestellte Tomate, deren Verzehr eine beruhigende und blutdrucksenkende Wirkung haben soll. Dies beruht auf einem im Vergleich zu konventionellen Tomaten erhöhten Gehalt an  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Mittels CRISPR/Cas wurde in das *SIGAD3*-Gen eine 1 bp-Insertion eingefügt, die das Leseraster verschiebt und neue Stopp-Codons erzeugt. Dies hat zur Folge, dass ein Teil des C-Terminus des Proteins nicht mehr produziert wird (**Abbildung 8-7**). Die nun fehlende Domäne reguliert normalerweise den GABA-Gehalt in der Tomate, so dass der GABA-Gehalt in der genomeditierten Tomate erhöht ist.



**Abbildung 8-7:** Schematische Darstellung des *slgad*-Gens in der Wildtyp-Tomate (A; wt = Wildtyp) und der genomeditierten Tomate (B; mt = mit Mutation). Der blaue Balken illustriert die DNA, der schwarze Balken das Protein. Der durch die Insertion hervorgerufene Frameshift ist durch das hellere Blau dargestellt.

Unter Verwendung publizierter Informationen und der Nutzung bioinformatischer Tools konnten die Mitglieder der § 28b GenTG Arbeitsgruppe einen möglichen Genort für diese 1 bp-Insertion identifizieren. Es gelang zudem, kommerziell erhältliches Probenmaterial aus Japan zu erhalten. Anhand dieses Materials konnte die Insertion und die Insertionsstelle bestätigt werden. Die § 28b GenTG Arbeitsgruppe arbeitet derzeit an der Entwicklung eines NGS-Workflows zum Nachweis dieser Insertion. Parallel dazu ist auch die Entwicklung spezifischer real-time PCR- oder digital PCR-Methoden denkbar. Das Beispiel der GABA-Tomate zeigt jedoch, dass es unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist, die Position der Modifikation und auch die Modifikation selbst mit bioinformatischen Tools vorauszusagen.

Dazu sind jedoch detaillierte Informationen über den Genlocus, die verwendete Modifikationsmethode, sowie die Art und Auswirkung der Modifikation erforderlich.

## 8.6 Ausblick

Dem BVL und Mitgliedern der § 28b GenTG Arbeitsgruppe ist es gelungen, Positivmaterial für ausgewählte genomeditierte Pflanzen zu erhalten, das für Methodenentwicklungen genutzt werden kann. Mit den beiden Nachweissystemen für DNA-Sequenzen, die für gRNA scaffolds kodieren, wurden erstmals Screeningverfahren für CRISPR/Cas-Anwendungen entwickelt, die nach der Ringversuchsvalidierung als amtliche Methode übernommen werden sollen. Mit den Nachweisverfahren für Deletionen in Calyxt Soja und Wachsmais werden weitere Methoden durch die § 28b GenTG Arbeitsgruppe in Ringversuchen validiert.

Die Arbeitsgruppe hat auch gezeigt, dass mit ausreichender Kenntnis und bioinformatischen Tools gute Vorhersagen über die Position von Genomeditierungen gemacht werden können. So konnte in der GABA-Tomate die Position und Art der Modifikation vorhergesagt und analytisch auch bestätigt werden. Dies ermöglicht nun die Entwicklung spezifischer Nachweisverfahren.

Allerdings zeigte sich im Rahmen der Methodenentwicklung auch, dass die spezifische Detektion von Punktmutationen insbesondere bei Pflanzen mit komplexer genetischer Struktur und in komplexen Matrices schwierig ist. Die Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigen jedoch, welche Anstrengungen unternommen werden, um genomeditierte Pflanzen zu detektieren und wie groß die Fortschritte auf diesem Gebiet sind.

Die Arbeiten am LGL wurden zu einem großen Teil im Rahmen eines vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) geförderten Projektes durchgeführt. Das LGL dankt dem StMUV für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

## 8.7 Literatur

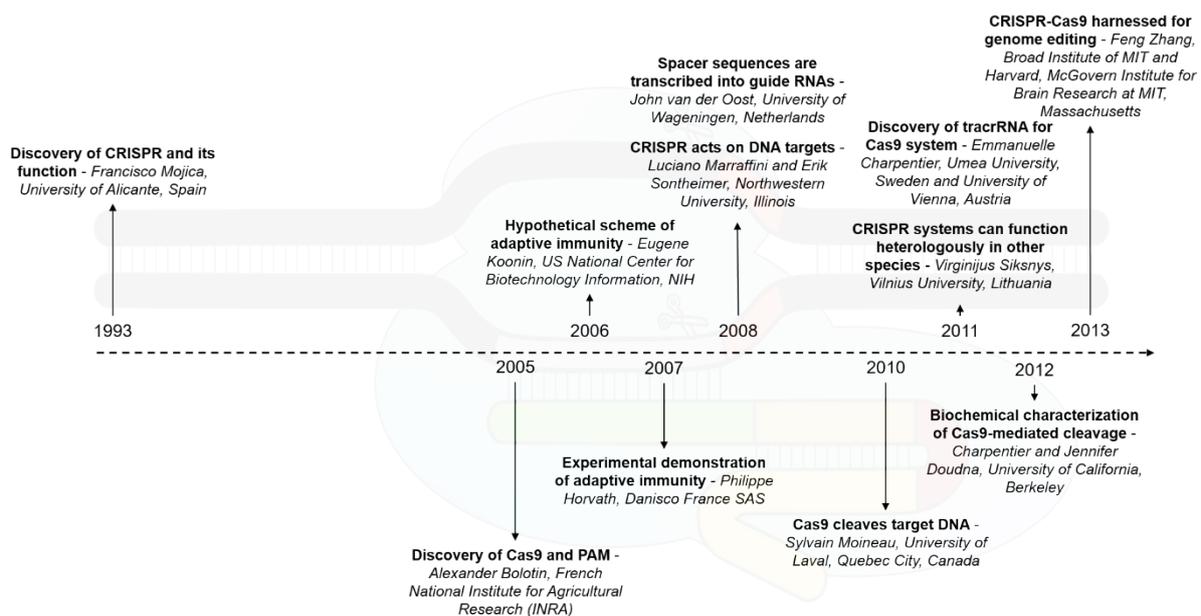
1. **GENTG** (2011) - *Gentechnikgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2066), das zuletzt durch Artikel 8 Absatz 7 des Gesetzes vom 27. September 2021 (BGBl. I S. 4530) geändert worden ist.*
2. **P. GUERTLER, C.-K. BAILLIE, O. GOERLICH, S. ESTENDORFER-RINNER AND A. E. BAIKER** (2019) - *Genome Editing*. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Band 11 der Schriftenreihe Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz.
3. **EUROPEAN COMMISSION** (2001) - *Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC*. Official Journal of the European Union, L 106/1.
4. **H. BROLL, A. BRAEUNING AND A. LAMPEN** (2019) - *European Court of Justice decision for genome editing: Consequences on food/feed risk assessment and detection*. Food Control, 104: 288.
5. **P. CHHALLIYIL, H. ILVES, S. A. KAZAKOV, S. J. HOWARD, B. H. JOHNSTON AND J. FAGAN** (2020) - *A real-time quantitative PCR method specific for detection and quantification of the first commercialized genome-edited plant*. Foods, 9; 9: 1245.
6. **EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL)** (2015) - *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods for GMO Testing*. [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020\\_10\\_2015.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf).
7. **C. WEIDNER, S. EDELMANN, D. MOOR, K. LIESKE, C. SAVINI, S. JACCHIA, M. G. SACCO, M. MAZZARA, J. LÄMKE AND K. N. ECKERMANN** (2022) - *Assessment of the Real-Time PCR Method Claiming to be Specific for Detection and Quantification of the First Commercialised Genome-Edited Plant*. Food Anal. Methods: 1.
8. **W. HAUN, A. COFFMAN, B. M. CLASEN, Z. L. DEMOREST, A. LOWY, E. RAY, A. RETTERATH, T. STODDARD, A. JUILLERAT AND F. CEDRONE** (2014) - *Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family*. Plant Biotechnology Journal, 12; 7: 934.
9. **H. GAO, M. J. GADLAGE, H. R. LAFITTE, B. LENDERTS, M. YANG, M. SCHRODER, J. FARRELL, K. SNOPEK, D. PETERSON AND L. FEIGENBUTZ** (2020) - *Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9*. Nature Biotechnology, 38; 5: 579.

## 9 Anwendung von CRISPR/Cas in der GVO-Analytik

**Lena Mautner, Sevana Khaloian, Wolfram Volkwein, Patrick Gürtler, Armin Baiker**  
 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, LGL

### 9.1 Das CRISPR/Cas-System

Von der Charakterisierung der heute als CRISPR-Lokus bekannten repeats im Jahr 1993 bis zum tatsächlichen Reprogrammieren des CRISPR/Cas-Systems auf ausgewählte Ziel-Sequenzen durch Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna vergingen fast zwanzig Jahre (**Abbildung 9-1**). In diesen zwei Jahrzehnten entdeckten und beschrieben verschiedene Wissenschaftler die einzelnen Bestandteile des Systems und deren Funktionsweisen. Für das Zusammensetzen all dieser Informationen und die endgültige biochemische Charakterisierung des Cas9-vermittelten Schneideprozesses bekamen die beiden Wissenschaftlerinnen Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna 2020 den Nobelpreis für Chemie verliehen.



**Abbildung 9-1:** Meilensteine der Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems

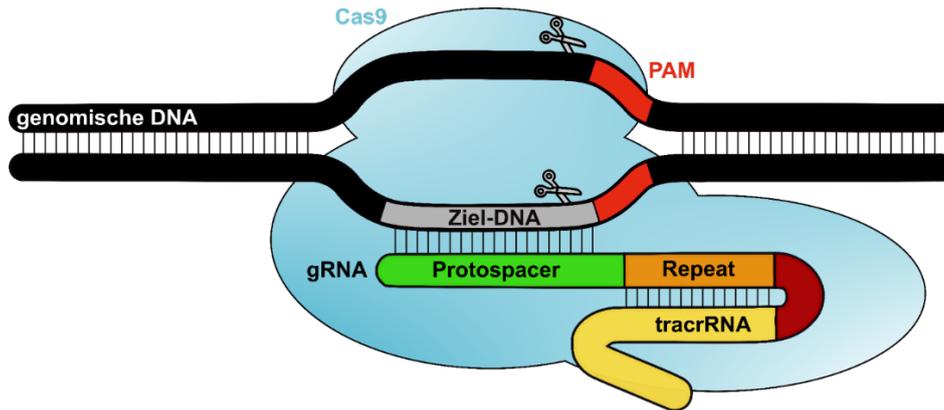
Diese Beschreibung des CRISPR/Cas9-Systems im Jahr 2012 ist ein Meilenstein, welcher die Grundlagenforschung, aber auch Anwendungen in Medizin, Landwirtschaft und Ökologie verändert. Das CRISPR/Cas-System stellt ursprünglich ein bakterielles Abwehrsystem gegenüber fremder DNA dar, die z. B. durch eine Infektion mit Bakteriophagen (kurz: Phagen) in den Organismus eingebracht wird. CRISPR steht dabei für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und beschreibt bestimmte Bereiche (*Cluster*) im Genom von Bakterien, in denen sich wiederkehrende (repetitive) DNA-Sequenzen anhäufen. Nach einer Phagen-Infektion werden Teile des viralen Genoms zwischen den repetitiven Sequenzen im CRISPR-Lokus eingebaut (*Spacer*).

Diese ermöglichen zu einem späteren Zeitpunkt die Erkennung neuer Phagen-DNA aufgrund von Sequenzübereinstimmungen. Die CRISPR-Sequenzen befinden sich stets in der Nähe von *cas*-(CRISPR-assoziierten-) Genen. Die *cas*-Gene kodieren dabei insbesondere für DNA-Schneideenzyme (Nukleasen) die mithilfe kurzer, spezifischer RNA-Moleküle an bestimmte DNA-Sequenzen im Genom der Phagen gelenkt werden. Das System der Bakterien produziert kleine RNA-Moleküle (crRNAs, CRISPR RNAs), die komplementär zu bestimmten Abschnitten der Fremd-DNA sind (Protospacer). Nach Hybridisierung mit sogenannten *tracrRNAs* (*trans-activating crRNA*) bildet sich ein Ribonukleoproteinkomplex aus, der eine Nuklease (z. B. Cas9) enthält. Dieser wird durch die Sequenz der crRNAs zur Fremd-DNA gelotst und baut sie ab. Dadurch wird die Vermehrung der Phagen verhindert [1].

Um die Ziel-DNA zu erkennen benötigt Cas9 eine sogenannte *guide*-RNA (gRNA, **Abbildung 9-2**). Die gRNA ist das Instrument, das die Spezifität des CRISPR/Cas-Systems bestimmt. Sie ist ein Fusionsprodukt aus crRNA und *tracrRNA*. Die crRNA besteht hier aus einer Sequenz mit 20 Nukleotiden, die komplementär zur Zielsequenz in der zu modifizierenden DNA (*Protospacer*, **Abbildung 9-2** grün dargestellt) ist und einem Abschnitt, der mit einem Teil der *tracrRNA* hybridisieren kann (*Repeat*, **Abbildung 9-2** orange dargestellt). Die *tracrRNA* (**Abbildung 9-2**) besteht aus einer zu großen Teilen konservierten Sequenz, während die crRNA je nach Ziel-DNA angepasst wird. Im Vergleich zum bakteriellen System sind die beiden Abschnitte in der gRNA kovalent verbunden. Die gRNA bildet eine Sekundärstruktur mit Haarnadelstrukturen aus, die für die Interaktion mit der Nuklease notwendig ist. Theoretisch kann die gRNA so konzipiert werden, dass sie zu jedem Abschnitt in der Ziel-DNA komplementär ist. Die Cas9-Nuklease durchtrennt dann an dieser Stelle die beiden komplementären Stränge. Das CRISPR/Cas9-System erzeugt somit spezifische Doppelstrangbrüche an der vorprogrammierten Stelle in der Ziel-DNA. Diese Möglichkeit des Vorprogrammierens der Position an der ein Doppelstrangbruch erzeugt werden soll macht man sich in der Gentechnik zunutze, um Genome zu editieren. Damit die Nuklease die DNA schneiden kann, muss die Sequenz aber in unmittelbarer Nähe zu einem sogenannten *protospacer adjacent motif* (PAM, **Abbildung 9-2**) liegen. Im bakteriellen System markiert diese Sequenz, welche Abschnitte aus der fremden DNA ausgeschnitten werden. Für Cas9 lautet das PAM - NGG, d. h. auf ein beliebiges Nukleotid folgen zwei Guanin-Nukleotide. Diese Sequenz muss direkt *downstream* der Zielsequenz liegen, damit sie von Cas9 erkannt und geschnitten werden kann [2].

Der eigentliche Prozess, durch den die Modifikation der Ziel-DNA hervorgerufen wird, ist die Reparatur des Doppelstrangbruchs, der durch die Aktivität von Cas9 entstanden ist. In Säugerzellen geschieht dies vorwiegend über die sogenannte nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) und die Homologie-gerichtete Reparatur (*homology-directed repair*, HDR). Solche Reparaturmechanismen sind wichtig für Zellen, um die Integrität ihres Genoms zu erhalten.

Die HDR benötigt zur Reparatur ein homologes DNA-Stück, das im Bereich des Doppelstrangbruchs eingefügt werden soll. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um gewünschte DNA-Abschnitte an den Zielort einzufügen, indem ein homologer Donor-Strang mit dem gewünschten Abschnitt in die Zelle eingebracht wird [3].

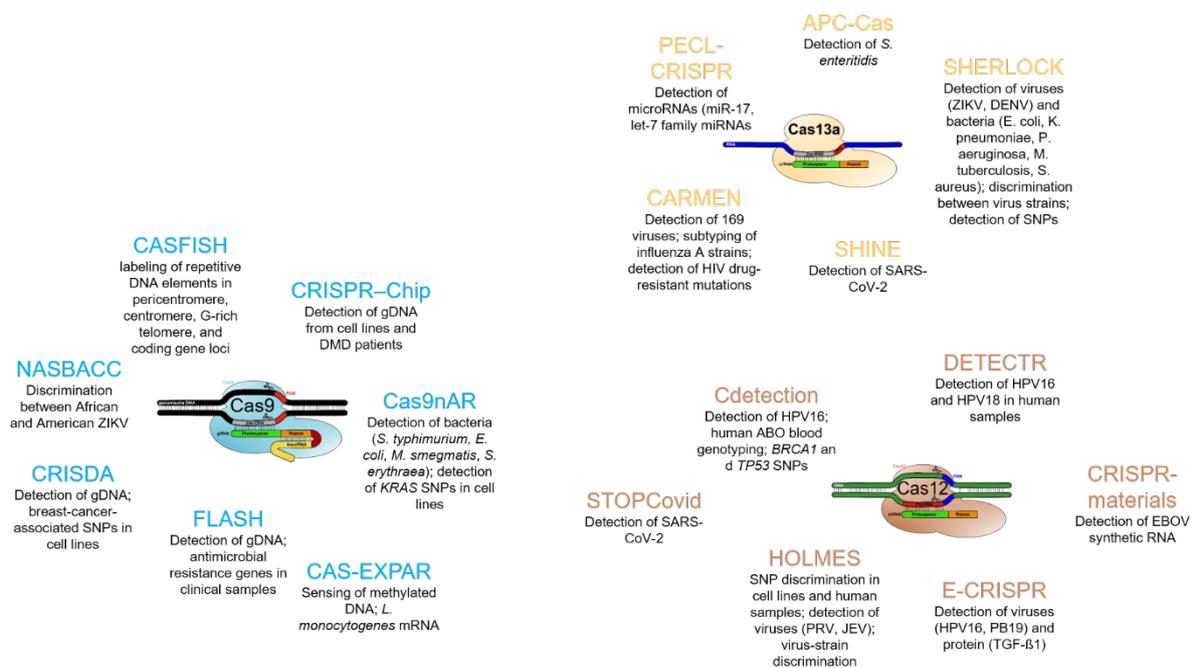


**Abbildung 9-2:** Das CRISPR/Cas9-System in der Gentechnik. Mit Cas9 (blau), genomischer DNA (schwarz), Ziel-DNA (grau), PAM (protospacer adjacent motif, hellrot) und gRNA (guide-RNA) bestehend aus Protospacer (grün), Repeat (orange), linker loop (dunkelrot) und tracrRNA (trans-activating crRNA, gelb).

In den letzten Jahren wurden zunehmend auch technische Abwandlungen des ursprünglichen CRISPR/Cas9-Systems beschrieben, welche im Gegensatz zur Anwendung von CRISPR/Cas nicht zur Genomeditierung, sondern zu Detektionszwecken in der Analytik verwendet werden.

## 9.2 CRISPR-based diagnostics

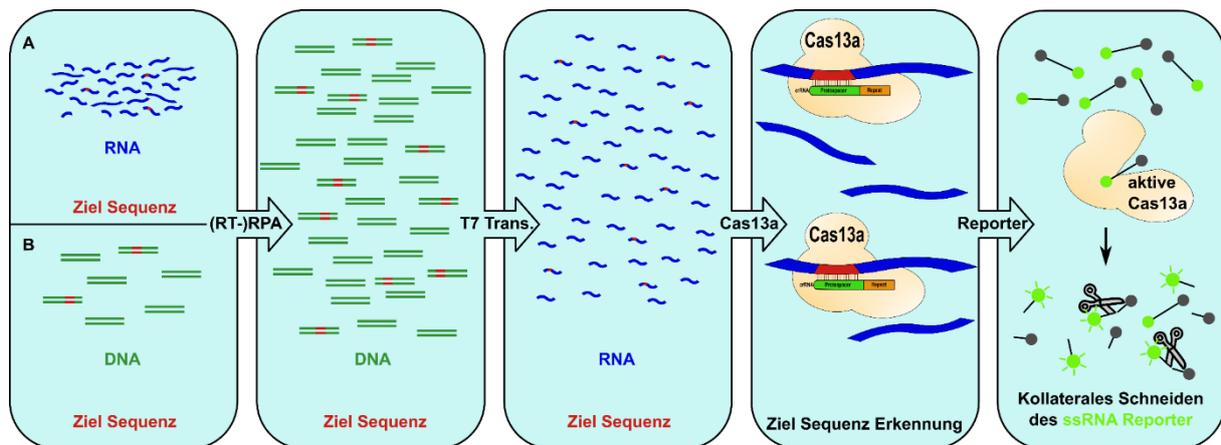
Seit 2015 wurden verschiedene diagnostische Systeme entwickelt, die unterschiedliche Cas-Enzyme wie Cas9, Cas12 oder Cas13a nutzen (**Abbildung 9-3**). Mit diesen Systemen lassen sich sowohl DNA, unter Verwendung von Cas9 und Cas12, als auch RNA, bei Verwendung der Cas13a, detektieren.



**Abbildung 9-3:** Auswahl an seit 2015 entwickelten CRISPR-based diagnostics Methoden im Überblick.

### 9.2.1 SHERLOCK - Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing

SHERLOCK steht für *Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing* und beschreibt eine Methode zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen (DNA und/oder RNA [4]). SHERLOCK nutzt Cas13a, eine RNA-vermittelte RNA-bindende Nuklease. Das Zielmolekül ist folglich eine RNA. Cas13a benötigt keine tracrRNA, sondern nur eine crRNA um den Ribonukleoproteinkomplex mit der Ziel-Sequenz zu bilden. Zudem hat Cas13a eine unspezifische Ribonuklease- (RNase-) Aktivität, schneidet also nach erfolgreicher Erkennung der Ziel-Sequenz auch unspezifisch einzelsträngige RNA in ihrer Umgebung. Anstatt einer PAM benötigt Cas13a eine *protospacer flanking site* (PFS). Diese besteht im Fall von Cas13a (*Leptotrichia shahii*) aus einem beliebigen Nukleotid außer Guanosin.



**Abbildung 9-4:** Schema des SHERLOCK-Systems. RNA (A, blau) oder DNA (B, grün) mit der Ziel Sequenz (rot) wird über reverse transcription recombinaese polymerase amplifikation (RT-RPA) für RNA oder RPA entsprechend für DNA Proben amplifiziert. Anschließend wird die amplifizierte DNA mithilfe der T7 Transkription in RNA (blau) umgeschrieben. Nach der Zugabe des Cas13a Enzyms mit für die Ziel Sequenz spezifischer CRISPR-RNA (crRNA, bestehend aus Protospacer (hellgrün) und Repeat (orange)), wird die RNA Zielsequenz erkannt und neben der protospacer flanking site (PFS) an die Cas13a gebunden. Dadurch wird die Cas13a aktiviert. Aktive Cas13a schneidet daraufhin kollateral den einzelsträngigen RNA Reporter (single strand RNA (ssRNA)), der mit Fluoreszenzfarbstoff (hellgrüne Kugel) und Quencher (dunkelgraue Kugel) markiert ist, woraufhin ein Fluoreszenzsignal sichtbar wird.

Bei der SHERLOCK-Methode wird zunächst die nachzuweisende Nukleinsäure (RNA, **Abbildung 9-4 A** blau, oder DNA, **Abbildung 9-4 B** grün) isoliert. RNA wird mithilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die DNA oder cDNA wird mittels isothermaler Amplifikation amplifiziert. Hierfür wird im SHERLOCK-Protokoll die *recombinase polymerase amplifikation* (RPA) durchgeführt. Da bei SHERLOCK Cas13a verwendet wird und Cas13a RNA anstelle von DNA bindet, wird die amplifizierte DNA mittels T7 Transkription in RNA umgeschrieben (**Abbildung 9-4** [4]). Die Zielsequenz auf der RNA wird nach Zugabe des Ribonukleoproteinkomplexes aus Cas13a und der spezifischen crRNA erkannt und gebunden (**Abbildung 9-4**). Diese Bindung aktiviert die kollaterale Schneideaktivität der Cas13a. Cas13a schneidet daraufhin kollateral den zuvor zugegebenen einzelsträngigen RNA Reporter (*single stranded RNA* (ssRNA)).

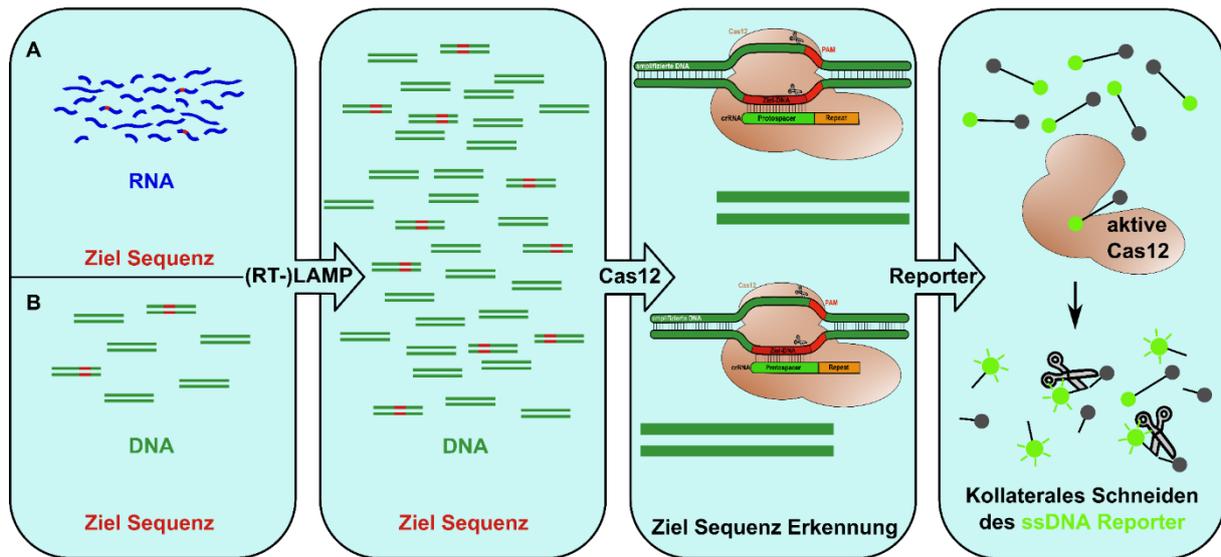


Diese Goldpartikel-markierten anti-FAM Antikörper werden durch den Reaktionsansatz mobilisiert und entlang des Teststreifens mittransportiert. Ist die Zielsequenz nicht vorhanden, bindet die Biotin markierte Seite der Reporter RNA an das Streptavidin der ersten Bande des Teststreifens. Die Goldpartikel-markierten anti-FAM Antikörper binden an die intakte über Biotin an Streptavidin gebundene Reporter RNA und erzeugen ein sichtbares Signal an der ersten Bande des Teststreifens, der Kontrollbande (**Abbildung 9-5** negativ). Ist die Reporter RNA allerdings aufgrund des Erkennens der RNA Ziel-Sequenz von Cas13a geschnitten worden, bindet nur der geschnittene Teil der Reporter RNA, der mit Biotin markiert ist an die Kontrollbande mit Streptavidin, während der FAM markierte Teil der geschnittenen Reporter RNA zusammen mit den Goldpartikel-markierten anti-FAM Antikörpern mit der Flüssigkeitsfront des Reaktionsansatzes zur zweiten Bande des Teststreifens weitertransportiert wird. Dort binden nun die Goldpartikel-markierten anti-FAM Antikörper an die passenden spezies-spezifischen Antikörper auf dem Teststreifen und erzeugen somit an der zweiten Bande des Teststreifens, der Testbande, ein positives Signal (**Abbildung 9-5** positiv). Dieses Signal weist das Vorhandensein der Zielsequenz nach.

### 9.2.2 DETECTR – DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter

DETECTR steht für *DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter* und dient als molekularbiologische Methode zur Detektion spezifischer Nukleinsäuresequenzen (DNA und/oder -RNA) [5]. DETECTR nutzt das Cas Protein Typ V Cas12 als RNA-vermittelte DNA-bindende Nuklease, welche ebenfalls keine tracrRNA, sondern nur eine crRNA benötigt. Cas12 besitzt eine unspezifische Deoxyribonuklease (Dnase-) Aktivität und schneidet nach erfolgreicher Erkennung der Ziel-Sequenz kollateral einzelsträngige DNA in der Umgebung. Eine PAM der Sequenz TTTN (Thymidin-Thymidin-Thymidin-beliebiges Nukleotid) wird für die Bildung des Ribonukleoproteinkomplexes benötigt.

Bei der DETECTR-Methode wird vorab die nachzuweisende Nukleinsäure (DNA und/oder RNA) isoliert (**Abbildung 9-6** A (RNA), B (DNA)). RNA wird dabei mittels einer reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die isolierte DNA bzw. cDNA wird anschließend unter Verwendung spezifischer Primer für die Ziel-Sequenz mithilfe einer isothermalen DNA Amplifikationsmethode, der sogenannten *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), amplifiziert (**Abbildung 9-6**). Die amplifizierten DNA-Stücke der Ziel-Sequenz werden von spezifisch entworfenen crRNAs erkannt. Die Cas12a bindet über die crRNA an die Ziel-Sequenz auf der DNA und wird aktiviert (**Abbildung 9-6**). Die aktivierte Cas12a besitzt die Eigenschaft kollateral einzelsträngige DNA zu schneiden, was als Reporter-System benutzt werden kann [6]. Der Reporter besteht aus einzelsträngiger Reporter DNA, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher markiert ist. Die einzelsträngige Reporter DNA wird kollateral von der aktivierten Cas12a geschnitten, wodurch der Quencher seine räumliche Nähe zum Reporter verliert, und so Fluoreszenz als Nachweis der Ziel-Sequenz detektiert werden kann (**Abbildung 9-6**). Ist die Ziel-Sequenz nicht vorhanden, kann die Cas12a nicht aktiviert werden und die Reporter DNA wird nicht geschnitten, wodurch das Fluoreszenzsignal weiterhin durch den Quencher unterdrückt wird [5]. Die Detektion kann hier ebenso über einen Lateral-Flow Teststreifen erfolgen.



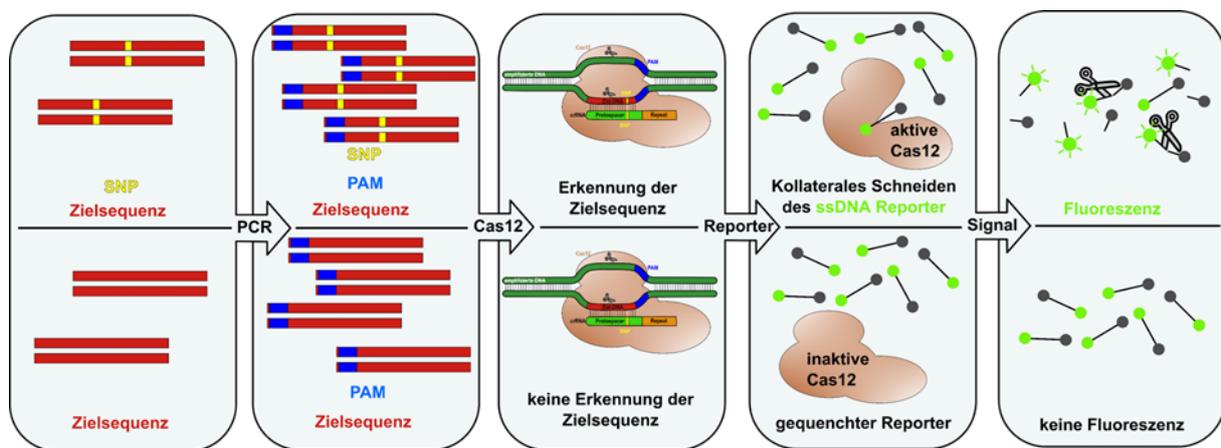
**Abbildung 9-6:** Schema des DETECTR-Systems. RNA (A, blau) oder DNA (B, grün) mit der Ziel-Sequenz (rot) wird über reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) für RNA oder LAMP entsprechend für DNA Proben amplifiziert. Nach der Zugabe des Cas12 Enzyms mit für die Ziel-Sequenz spezifischer CRISPR-RNA (crRNA, bestehend aus Protospacer (hellgrün) und Repeat (orange)), wird die Ziel-Sequenz erkannt und neben dem protospacer adjacent motif (PAM) an die Cas12 gebunden. Dadurch wird die Cas12 aktiviert. Aktive Cas12 schneidet daraufhin kollateral den einzelsträngigen DNA Reporter (single strand DNA (ssDNA)), der mit Fluoreszenzfarbstoff (hellgrüne Kugel) und Quencher (dunkelgraue Kugel) markiert ist, woraufhin ein Fluoreszenzsignal sichtbar wird.

### 9.2.3 HOLMES - one-HOur Low-cost Multipurpose highly Efficient System

Eine große Herausforderung für die Analytik stellen einzelne punktuelle Abweichungen im Genom, sogenannte Punktmutationen oder *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) dar. Die Bezeichnung bezieht sich darauf, dass ein einzelner DNA-Baustein (ein *single nucleotide*) in einem komplementären DNA-Doppelstrang in unterschiedlicher Gestalt auftreten kann (*polymorphism*, d.h. Vielgestaltigkeit). Durch diese punktuelle Abweichungen wird der genetische Code eines Organismus verändert. Dies kann die Wirkung oder Funktion eines einzelnen Gens oder des translatierten Proteins beeinflussen, wobei manche Abweichungen nach heutigem Kenntnisstand auch folgenlos bleiben können. So kann der Austausch eines einzelnen Basenpaars zum kompletten Funktionsverlust eines ganzen Gens führen oder dessen Funktion in eine gezielte Richtung verändern. Diese Abweichungen können natürlich auch gezielt herbeigeführt werden und werden dann als sogenannte *Single Nucleotide Variants* (SNV) bezeichnet. Der Nachweis dieser SNP oder SNV stellt die Analytik noch immer vor eine große Herausforderung. Standard-Nachweisverfahren wie die PCR sind oft nicht spezifisch genug, um diese winzigen Veränderungen in der zu untersuchenden Sequenz eindeutig zu identifizieren. Jedoch sind alternative Nachweisverfahren zur Detektion von SNPs oder SNVs hoch speziell und deutlich aufwendiger als die Standardmethoden und können oftmals ihr Versprechen einer zuverlässigen Detektion von SNPs oder SNVs nicht einhalten. Ein neues Nachweisverfahren, unter der Verwendung des CRISPR/Cas-Systems, könnte eine schnelle und einfache Alternative zu den bisherigen Methoden darstellen.

Das 2018 publizierte HOLMES (*one-HOur Low-cost Multipurpose highly Efficient System*) [7], das auf der ebenfalls 2018 publizierten kollateralen Schneideaktivität des Cas12a-Enzyms basiert [6], soll für den Nachweis von SNPs geeignet sein.

Da die Entfernung des SNPs/SNVs von der für die Bindung des Cas-Enzyms benötigten PAM-Sequenz eine wichtige Rolle spielt, muss diese zunächst in 1 – 7 Nukleotiden Abstand *upstream* zum nachzuweisenden SNP/SNV eingefügt werden. Dies kann über geeignete Primer in einer PCR Reaktion geschehen (**Abbildung 9-7**). Nach dem erfolgreichen Einfügen der PAM folgt die eigentliche Nachweisreaktion in der die Cas12 von der spezifisch an den SNP/SNV angepassten crRNA zur Bindestelle geleitet wird. Ist der SNP/SNV passend zur crRNA auf der Ziel-Sequenz vorhanden, bindet die Cas12 an die Ziel-Sequenz. Durch diese Bindung wird die Cas12 aktiviert und schneidet infolge dessen die DNA.

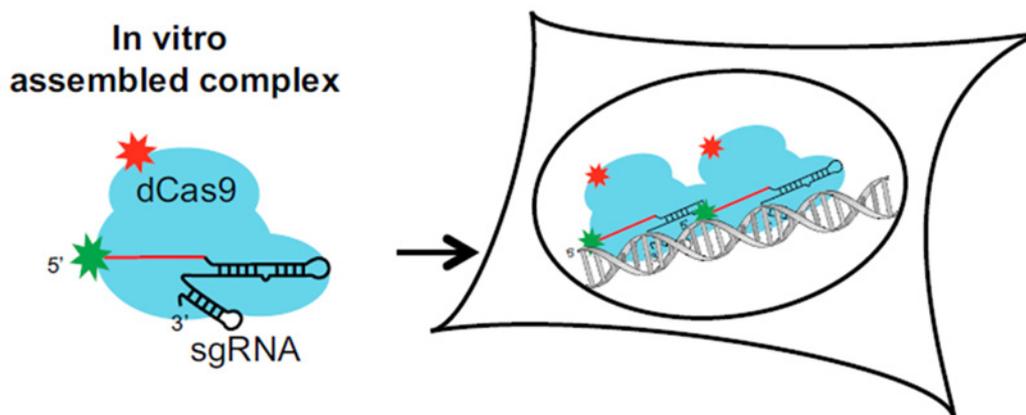


**Abbildung 9-7:** Schematische Darstellung von HOLMES. Zum Nachweis eines SNP/SNV (single nucleotide polymorphism/variant, gelb) wird zuerst das notwendige protospacer adjacent motif (PAM, blau) bis zu sieben Nukleotide upstream der nachzuweisenden Veränderung über reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) für RNA oder PCR entsprechend für DNA Proben eingefügt. Nach der Zugabe des Cas12 Enzyms mit für die Ziel-Sequenz spezifischer CRISPR-RNA (crRNA, bestehend aus Protospacer (hellgrün) und Repeat (orange)), wird die Ziel-Sequenz erkannt und neben der PAM an die Cas12 gebunden. Dadurch wird die Cas12 aktiviert. Aktive Cas12 schneidet daraufhin kollateral den einzelsträngigen DNA Reporter (single strand DNA (ssDNA)), der mit Fluoreszenzfarbstoff (hellgrüne Kugel) und Quencher (dunkelgraue Kugel) markiert ist, woraufhin ein Fluoreszenzsignal sichtbar wird.

Als Reporter wird ein einzelsträngiges DNA-Fragment (ssDNA Reporter), das mit einem Quencher und dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert ist, hinzugegeben. Der Quencher unterdrückt in räumlicher Nähe das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs. Wird der Reporter nun von der aktivierten Cas12 geschnitten, verliert der Quencher die räumliche Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff und das Fluoreszenzsignal wird detektierbar. Kommt keine Bindung der Cas12 an die Zielsequenz zustande, weil crRNA und Ziel-Sequenz nicht perfekt zusammenpassen (die Ziel-Sequenz trägt nicht den SNP/SNV, der auf der crRNA kodiert ist), wird der Reporter nicht zerschnitten und das Fluoreszenzsignal bleibt unterdrückt. Dieses Nachweisverfahren kann theoretisch so modifiziert werden, dass jeder beliebige SNP an jeder beliebigen Stelle im Genom eindeutig nachgewiesen werden kann.

### 9.2.4 CASFISH - Cas9-mediated fluorescence in situ hybridisation

Neben dem bloßen Nachweis von (extrahierten) Nukleinsäuren kann auch die direkte Visualisierung von DNA-Sequenzen innerhalb zellulärer Strukturen für viele unterschiedliche Zwecke nützlich sein. Man gewinnt damit z. B. Erkenntnisse über die räumliche Organisation des Genoms oder die Lage genomischer Loci auf den Chromosomen. Auch können bestimmte DNA-Sequenzen gezielt in zellulären Strukturen nachgewiesen werden. Über die letzten Jahrzehnte wurden verschiedene fluoreszenzbasierte Verfahren zur intrazellulären Markierung von DNA entwickelt. Allerdings beinhalten diese Verfahren die Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) innerhalb der zellulären Struktur und die darauffolgende Sondenhybridisierung (*fluorescence in situ hybridization*, FISH). CRISPR/Cas bietet nun die Möglichkeit DNA zu markieren, ohne die zelluläre DNA vollständig zu denaturieren. Um die DNA-Sequenz zu markieren, wird eine schneidedefiziente Cas9 (dCas9) verwendet. Diese dCas9 trägt zwei Mutationen, D10A und H840A, die die beiden Nukleasedomänen RuvC und HNH der Cas9 inaktivieren. Somit kann das Protein zwar wie gewohnt RNA-vermittelt über eine crRNA zusammen mit einer tracrRNA oder einer *single guide RNA* (sgRNA) an die Ziel-Sequenz aus dsDNA geführt werden und diese binden, aber keinen Doppelstrangbruch mehr erzeugen. So wurde 2015 die Methode CASFISH (*Cas9-mediated fluorescence in situ hybridisation*) für die Markierung hochrepetitiver DNA-Sequenzen in Perizentromer-, Zentromer- und Telomer-Regionen entwickelt und publiziert [8]. Über ein Expressionsplasmid wurde die rekombinante dCas9 mit verschiedenen Markierungen, die zum Koppeln eines Fluorophors dienen, in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Zur Visualisierung wurde ein Fluorophor an die dCas9 gebunden und das Protein mit einem Pool aus verschiedenen gRNAs für diese hoch repetitiven DNA-Sequenzen in fixierte humane Zellen gegeben. Über die Fluoreszenzmarkierung konnte die Lokalisation der (hochrepetitiven) Ziel-DNAs in einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (**Abbildung 9-8**) [8].



**Abbildung 9-8:** Schematische Darstellung der Methode CASFISH aus der zugehörigen Publikation mit fluoreszenzmarkierter schneidedefizienter dCas9 in vitro komplexiert mit der sgRNA. Dieser Komplex wird in fixierte humane Zellen gegeben und bindet dort im Zellkern an die Ziel-DNA [8].

### 9.3 Zusammenfassende Bemerkung

Die hier beschriebenen Techniken stellen nur eine kleine Auswahl aus den in den letzten Jahren entwickelten *CRISPR-based diagnostics* Methoden dar. Immer mehr Cas-Enzyme mit verschiedensten Eigenschaften werden auf die unterschiedlichsten Anwendungsbereiche angepasst und für diagnostische Zwecke nutzbar gemacht. Die extrem hohe Spezifität, die sogar zur eindeutigen Identifizierung einzelner SNPs und SNVs in der Lage ist, bietet eine Vielzahl von ungeahnten Möglichkeiten für die molekularbiologische Analytik. Einige dieser Systeme wurden sogar schon als Vor-Ort-Methoden, das heißt ohne die Notwendigkeit eines voll ausgestatteten Labors und geschultem Personals, beispielsweise für die Detektion von SARS-CoV-2 RNA vorgestellt und kommerziell vertrieben. Bei all den Möglichkeiten und Chancen muss wie bei allen neuen Methoden natürlich auf eine gründliche Validierung der diagnostischen Nachweise für jeden speziellen Anwendungsbereich geachtet werden. Inwieweit diese Methoden für eine spezifische Detektion genomeditierter Organismen geeignet sind, muss aber erst noch gezeigt werden.

### 9.4 Literatur

1. **LE RHUN, A., ESCALERA-MAURER, A., BRATOVIČ, M., & CHARPENTIER, E.** (2019). *CRISPR-Cas in Streptococcus pyogenes*. RNA biology, 16(4), 380-389.
2. **JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E.** (2012). *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 337(6096), 816-821.
3. **DOUDNA, J.A. AND E. CHARPENTIER** (2014). *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. 346, p. 1258096.
4. **GOOTENBERG, J. S., ABUDAYYEH, O. O., LEE, J. W., ESSLETZBICHLER, P., DY, A. J., JOUNG, J., ... & ZHANG, F.** (2017). *Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2*. Science, 356(6336), 438-442.
5. **BROUGHTON, J. P., DENG, X., YU, G., FASCHING, C. L., SERVELLITA, V., SINGH, J., ... & CHIU, C. Y.** (2020). *CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2*. Nature biotechnology, 38(7), 870-874.
6. **LI, S. Y., CHENG, Q. X., LIU, J. K., NIE, X. Q., ZHAO, G. P., & WANG, J.** (2018). *CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA*. Cell research, 28(4), 491-493.
7. **LI, S. Y., CHENG, Q. X., WANG, J. M., LI, X. Y., ZHANG, Z. L., GAO, S., ... & WANG, J.** (2018). *CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection*. Cell discovery, 4(1), 1-4.8.
8. **DENG, W., SHI, X., TJIAN, R., LIONNET, T., & SINGER, R. H.** (2015). *CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(38), 11870-11875.

## **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 2. Dezember 2009 (2010)
- Band 4: Überwachung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut in Bayern (April 2019 – 3. Auflage, inhaltlich veränderter Nachdruck der 2. Auflage vom Juli 2011)
- Band 5: Nachweis von nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Organismen (GVO); Weltweite Ermittlung, Importanalyse und Entwicklung von Nachweis-Methoden (2011)
- Band 6: 4. Fachtagung am 30. November 2011 in Oberschleißheim (2012)
- Band 7: Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen (2023 – 2. Auflage, inhaltlich veränderter Nachdruck der 1. Auflage vom Dezember 2013)
- Band 8: 5. Fachtagung Gentechnik am 26. November 2013 in Oberschleißheim (2014)
- Band 9: 6. Fachtagung Gentechnik am 17. November 2015 in Oberschleißheim (2016)
- Band 10: 7. Fachtagung Gentechnik „Synthetische Biologie“ am 8. November 2017 in Oberschleißheim (2018)
- Band 11: Genome Editing (2019)
- Band 12: 8. Fachtagung Gentechnik „Neue molekularbiologische Techniken (Genomeditierung, CRISPR/Cas & Co) und deren Herausforderungen für die Analytik“ am 23. Oktober 2019 in Oberschleißheim (2020)

### **sowie der vorliegende Band:**

- Band 13: 9. Fachtagung Gentechnik „Neue genomische Techniken - Rechtliche Bewertungen, Anwendungen und Herausforderungen“ am 14. und 15. September 2022 in Oberschleißheim (2023)

**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](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)

Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)