

© **Schwerpunkt »Landwirtschaft für Europa«**

Die neuen Gentechnikverfahren

Eine Bewertung aus naturwissenschaftlicher Sicht

von Katharina Kawall

In den letzten Jahren sind neue molekularbiologische Verfahren entwickelt worden, die viel tiefere und weitergehende Eingriffe in das Erbgut erlauben, als die bisherige Gentechnik. Mit diesen Verfahren sind sowohl kleine Veränderungen, die dann auch mehrfach hintereinander oder parallel durchgeführt werden können, aber auch das Einfügen und Löschen von Gensequenzen bis hin zum Umbau von Genen möglich. Diese neuen Gentechnikverfahren werden unter dem Begriff »Genome Editing« zusammengefasst. Das berühmteste und aktuell am häufigsten verwendete Verfahren heißt CRISPR/Cas. Lange Zeit wurde diskutiert, ob die neuen Verfahren als Gentechnik einzustufen sind. Das hat der Europäische Gerichtshof (EuGH) mit seinem Urteil vom 25. Juli 2018 nun geklärt: Die neuen Verfahren des Genome Editing sind Gentechnik und müssen auch nach dem Gentechnikrecht reguliert werden. Wie aber funktionieren die neuen Gentechnikverfahren? Was können sie? Welche Nebeneffekte gibt es? Wie unterscheiden sie sich von älteren Mutagenesetechniken? Darauf gibt dieser Artikel Antworten aus wissenschaftlicher Perspektive.

Um die neuen Gentechnikverfahren in der Zucht von Pflanzen (und Tieren) besser verstehen und bewerten zu können, gilt es zunächst auf bisherige Zuchtverfahren einzugehen, die ohne Gentechnik arbeiten. In der Pflanzenzucht ist es vor allem das Mutageneseverfahren, das an ganzen Pflanzen oder Samen angewendet wird, um Sorten zu entwickeln, die neue und verbesserte Eigenschaften haben.

Mutationen in Natur und Zucht

Mutationen der DNA treten natürlicherweise bei allen Lebewesen auf und können durch äußere Umwelteinflüsse wie Strahlung (z. B. UV-Licht) oder durch bestimmte Substanzen (z. B. Umweltgifte) ausgelöst werden. Auch durch Fehler innerhalb der Zelle können Mutationen hervorgerufen werden. Nicht alle neu entstandenen Mutationen bleiben erhalten, da es zelluläre Reparaturmechanismen gibt, die eine falsche Base oder einen Schaden an der DNA erkennen und reparieren können. Durch Mutationen können in einem Individuum neue Eigenschaften entstehen, die negativ oder positiv für den Organismus sein können. So haben manche Mutationen eine krankmachende Wirkung, wie z. B. beim Menschen Mutationen des CFTR-Gens (*cystic fibrosis transmembrane con-*

ductance regulator) Mukoviszidose, eine genetisch bedingte Stoffwechselkrankheit, auslösen oder eine Punktmutation des β -Globin-Gens die Ausprägung von Sichelzellenanämie bewirkt. Treten durch Mutationen jedoch positive neue Eigenschaften für den Organismus auf, so können diese dem Individuum einen Vorteil verschaffen. Dieses Merkmal kann sich dann in einer Population durchsetzen.

Mutationen sind also eine wichtige Quelle von genetischer Variation innerhalb einer Population und unterliegen der natürlichen Selektion. Sie wirken, indem der Phänotyp des Organismus mit seiner aktuellen Umwelt interagiert. Mutationen bilden die genetische Grundlage für die Anpassungsfähigkeit von Organismen, insbesondere bei Pflanzen, da diese schwer den Standort wechseln können. Mutationen sind somit einer von mehreren Faktoren, die die Evolution antreiben und im Zusammenspiel mit diversen Umweltbedingungen die Artenvielfalt erhöhen.

Spontane Mutationen werden auch in der Pflanzenzucht genutzt. Sie werden anhand neuer Eigenschaften der Pflanzen, wie z. B. einem stärkeren Wuchs, ausgewählt und mit anderen Sorten weiter gekreuzt. Ansonsten können Pflanzenzüchter das Auftreten von Mutationen (die Mutationsrate) erhöhen, indem sie die Pflanzen bzw. die pflanzlichen Zellen mit muta-

genisierenden Chemikalien in Kontakt bringen oder physikalisch mit Strahlung behandeln. Diese Verfahren wurden Ende der 1920er-Jahre für die Pflanzenzucht entwickelt. Das Ziel dieser Mutageneseverfahren ist die Erhöhung der genetischen Vielfalt innerhalb kürzerer Zeiträume, als sie natürlicherweise zu erwarten sind. Sowohl chemisch als auch durch Strahlung induziert wird die Mutationsrate innerhalb eines Organismus erhöht. Es lässt sich jedoch nicht vorher sagen, wo genau im Erbgut die Mutationen auftreten und wie viele.

Bei diesen Verfahren werden Samen den mutagenen Stoffen ausgesetzt. Diese dringen in die pflanzliche Zelle ein und bewirken diverse DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche oder Basen-Dimere (miteinander verknüpfte Basenpaare). Diese unregelmäßigen DNA-Strukturen aktivieren verschiedene Reparaturmechanismen innerhalb der Zelle, die entweder die Ausgangssequenz der DNA wiederherstellen oder letztlich zum Einbau einer falschen DNA-Base führen. Der Züchter bzw. Wissenschaftler kann dann nach gewünschten Veränderungen mit verschiedenen Analysemethoden suchen. Pflanzen, die negative Verände-

rungen in ihren ausgebildeten Eigenschaften oder in ihrer Entwicklung aufweisen, werden aussortiert.

Eine pauschale Aussage über die Sicherheit der am Ende entstandenen Sorten lässt sich nicht treffen, da Veränderungen am Erbgut immer unvorhergesehene Auswirkungen auf andere Signalwege haben können. Die langjährigen Erfahrungen mit mutagenen Stoffen und Bestrahlung haben jedoch gezeigt, dass solche Pflanzen in der Regel als sicher anzunehmen sind. Laut der Joint-FAO/IAEA-Mutant-Variety-Datenbank wurden bereits über 3.000 Sorten auf diese Weise hervorgebracht.¹

Früher wurde auf dem Feld nach dem Phänotyp selektiert. Heutzutage werden von vielen Züchtern moderne Sequenzierungsverfahren eingesetzt. Dabei werden die Pflanzen nicht mehr anhand neu ausgeprägter Eigenschaften selektiert, sondern die Sequenz der DNA wird nach einer gewünschten Veränderung direkt durchsucht (Genomanalyse). Diese Verfahren beziehen sich rein auf die Veränderungen, die auf der DNA sichtbar werden – im Vergleich zu den Ausgangslinien. Wie die so veränderten Pflanzen dann aber in der Umwelt reagieren, lässt sich dadurch nicht

Neue Gentechnik – die wichtigsten molekularbiologischen Verfahren

CRISPR/Cas

Im Gegensatz zu Mutageneseverfahren können beim Verwenden von CRISPR/Cas gezielt ortsspezifische Veränderungen vorgenommen werden (Abb. 1). Das CRISPR/Cas-System besteht aus einer Erkennungskomponente (RNA-Molekül), die den Zielbereich des Erbguts erkennt, und einem Enzym (Nuklease), das in diesem Bereich die DNA schneidet und zu einem Doppelstrangbruch führt oder, vereinfacht gesagt, dort schneidet. Die Erkennungskomponente ist ein kleines Molekül, genannt guide RNA (gRNA). Sie erkennt zum einen den Zielbereich und zum

anderen bindet sie die Schneidekomponente und bringt sie in die richtige Position zum Schneiden. Nach erfolgtem DNA-Doppelstrangbruch erkennt die Zelle den entstandenen Schaden am Erbgut und aktiviert zelleigene DNA-Reparaturmechanismen.

Die Zelle verfügt über zwei unterschiedliche Reparaturmechanismen (einer davon arbeitet mitunter ungenau). Man kann die Veränderungsmöglichkeiten von CRISPR/Cas (und anderer Nukleasen wie Zinkfinger und TALEN) in SDN-1, -2 und -3 unterscheiden. Bei SDN-1 können falsche Basen (die Bausteine der DNA) an dem Zielbereich eingebaut, kleinere Bereiche der DNA herausgenommen oder kleine DNA-Stücke eingeführt werden. So können einzelne bis wenige Buchstaben der DNA verändert und Gene ausgeschaltet bzw. manipuliert werden. Die SDN-1-Technik fasst ortsspezifische, aber zufällige Veränderungen weniger Basenpaare des Erbguts zusammen.

CRISPR/Cas kann auch dazu verwendet werden, gezielt größere Veränderungen an der DNA vorzunehmen. ▶

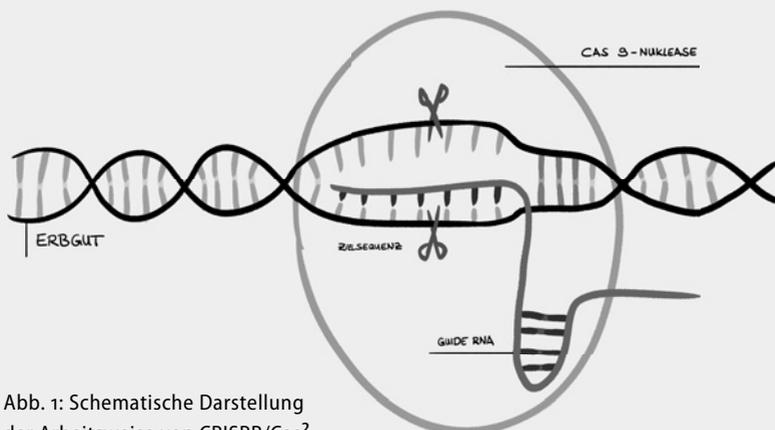


Abb. 1: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von CRISPR/Cas²

vorhersagen. Daher wird daran gearbeitet, parallel eine automatisierbare Phänotypselektion zumindest in Gewächshäusern vorzunehmen (*phenomics*).

Mutagenese und (neue) Gentechnik

Die bisherigen Verfahren der Gentechnik (»alte Gentechnik«), mit denen bereits marktgängige gentechnisch veränderte Pflanzen wie der Mais MON 810 gezüchtet wurden, erlauben das Einbringen von Genen in eine Pflanze. Stammen die Gene von anderen Arten, entstehen transgene Organismen, stammen die Gene aus der gleichen Art spricht man von Cisgenese. Die Gene werden beispielsweise mit Hilfe eines Gentransfers durch *Agrobacterium tumefaciens* oder mittels Genkanonen in pflanzliche Zellen eingebracht. Der Ort, an dem die Gene in die DNA der Pflanzen integrieren, kann jedoch nicht vorhergesagt werden. In den letzten 30 Jahren bis heute wurde die alte Gentechnik überwiegend dazu verwendet, Eigenschaften wie Herbizidtoleranz und Insektizide in die Pflanzen einzubringen.

In den letzten zehn bis 15 Jahren sind neue molekularbiologische Verfahren entwickelt worden, die

viel tiefere Eingriffe in das Erbgut erlauben als mit bisherigen Gentechnikverfahren. Diese neuen Gentechnikverfahren werden unter dem Begriff »Genome Editing« zusammengefasst und schließen molekularbiologische Verfahren ein, die diese gezielten Veränderungen im Erbgut von Zielorganismen ermöglichen. Das sind vor allem die sog. ortsgerichteten Nukleaseverfahren, auch SDN-Verfahren (*site directed nucleases*) genannt:

- das CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR associated*)-System,
- ZFN (Zinkfinger-Nukleasen),
- TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) (transkriptionsaktivatorartige Effektornukleasen).

Weitere Genome-Editing-Verfahren sind z. B. die Oligonukleotidgerichtete Mutagenese (ODM-Verfahren) oder die RNA abhängige DNA-Methylierung.

Alle SDN-Techniken besitzen eine Erkennungskomponente, die einen Bereich (DNA-Sequenz) des Erbguts gezielt erkennt und auffindet, und eine sog. Nuklease (die Schneidekomponente bzw. die eigent-

Hierfür werden im Labor kurze DNA-Stücke hergestellt, die als Reparaturvorlagen für den Bereich rund um den eingeführten DNA-Schnitt dienen. Die DNA-Stücke werden zusammen mit dem CRISPR/Cas-System in die Zelle eingeschleust und sind mit dem Zielbereich der DNA bis auf die erwünschte Veränderung der Basen identisch. Zelleigene Reparaturmechanismen erkennen die Reparaturvorlage und bauen diese in das Erbgut ein. Das Einführen von kleinen gezielten Veränderungen wird als SDN-2-Technik bezeichnet (*site directed nuclease-2*), größere Veränderungen der DNA (z. B. ganze Genabschnitte) werden unter SDN-3 (*site directed nuclease-3*) zusammengefasst.³

ZFN und TALEN

Bei ZFN und TALEN (gehören auch zu den SDN-Verfahren) basiert die Erkennungskomponente auf im Labor hergestellten Proteinabschnitten, die die spezifische Zielregion erkennen. Das Design und die Optimierung dieser Erkennungskomponente sind aber ein relativ teurer und langwieriger Prozess.⁴ Hierin liegt der große Unterschied zu CRISPR/Cas, der derzeit beliebtesten Methode unter den Genome-Editing-Verfahren. Das CRISPR/Cas-System nutzt anstelle eines Proteinbereichs ein kurzes Stück RNA (gRNA), das spiegelbildlich (komplementär) zur Zielsequenz der DNA passt und mit dieser in Wechselwirkung tritt. Die Herstellung der gRNA ist einfach, schnell und vor allem sehr kostengünstig. Dennoch ist für die Durchführung dieser Experimente ein vollständig ausgestattetes Labor und vor allem Expertenwissen notwendig. Das

betrifft vor allem die Planung des Versuches (das Auswählen des Zielbereichs und einer geeigneten gRNA), die Durchführung und die Auswertung der Ergebnisse, bis hin zur Implementation der Veränderung in der Pflanzensorte. Auch dies erweist sich in der Praxis als große Hürde.

Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese

Neben den SDN-Verfahren ist beim Genome Editing noch die ODM-Technik (Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese) zu nennen, bei der mit Hilfe von kurzen DNA-Stücken (Oligonukleotiden) gezielte Veränderungen am Erbgut vorgenommen werden können. Der Unterschied zu den anderen Verfahren ist, dass es bei ODM nicht zu einem Doppelstrangbruch kommt, sondern die Oligonukleotide als Vorlage für die Veränderungen dienen. Das ODM-Verfahren kann dazu genutzt werden, einzelne Basen auszutauschen, kurze DNA-Sequenzen einzufügen oder zu löschen. Dadurch können Gene ausgeschaltet oder aktiviert werden, die Expression von Genen kann verändert oder Eigenschaften von Proteinen beeinflusst werden.⁵ Bisher wurde ODM in der Pflanzenzucht hauptsächlich zur Erzeugung von Herbizidtoleranzen verwendet. Die Firma Cibus hat eine Rapsorte mit der ODM-Technik hergestellt, die resistent gegen das Unkrautbekämpfungsmittel Sulfonylharnstoff ist. Durch das Urteil des EuGH vom Juli 2018 ist nun endgültig entschieden, dass diese Sorte dem Gentechnikgesetz unterliegt und dementsprechend risikobewertet, zugelassen und gekennzeichnet werden muss.⁶

liche »Genschere«), die die DNA an der erkannten Zielregion schneidet. Allgemein sind Nukleasen Enzyme (Eiweiße), die einen oder beide Stränge der DNA zerschneiden. Bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen kann die DNA-Sequenz verändert werden: So können einzelne Basenpaare (die Buchstaben der DNA) des Genoms gezielt ausgetauscht, eingefügt oder entfernt werden. Damit können Gene stillgelegt, verändert oder in ihrer Wirkung verstärkt werden. Es lassen sich jedoch auch regulatorische DNA-Elemente verändern, die einen Einfluss auf das An- und Abschalten von Genen haben können.

Am häufigsten wird aktuell jedoch die Genschere CRISPR/Cas verwendet. Die Möglichkeiten für den Einsatz von CRISPR sind vielfältig: Es hat die molekularbiologische Arbeit in den Laboren der Welt revolutioniert und ermöglicht das »gezielte Umschreiben des Erbgutes« von sowohl tierischen als auch pflanzlichen Zellen in kürzerer Zeit. Genome Editing wird in der medizinischen Forschung, in der Grundlagenforschung und in der Forschung für Pflanzen- und Tierzucht eingesetzt. Es wurden mittlerweile schon in einigen exemplarischen Fällen Zuchttiere mit Genome-Editing-Verfahren verändert, die die Tiere den Bedingungen der Massentierhaltung anpassen und die Verträglichkeit bestimmter tierischer Produkte für den Menschen verbessern sollen.⁷ Zulassungen im Tierzuchtungsbereich stehen derzeit noch nicht zur Diskussion, und bis es dazu kommt, wird wohl noch einige Zeit vergehen, nicht zuletzt, weil hier auch viele ethische Fragen im Raum stehen.

CRISPR wird von Pflanzenzüchtern und Wissenschaftlern hoch gehandelt, beispielsweise um die Probleme aufgrund des Klimawandels oder der Welternährung zu lösen. Es sollen Sorten hergestellt werden können, die besser an neue klimatische Bedingungen angepasst sein sollen. Hier ist vor allem die Entwicklung neuer trockenheits- und salzresistenter Sorten zu nennen. Trockenheits- und allgemein Stresstoleranz sind jedoch Eigenschaften von Pflanzen, die sich im Zusammenspiel vieler Gene ausprägen.⁸ Zusätzlich stehen Pflanzen in dauernder Wechselwirkung mit einer sich ständig verändernden Umwelt. Auch die Umweltbedingungen nehmen Einfluss auf die Regulation und Bildung dieser Stressgene. Die Stressantwort der Pflanzen ist auf die jeweiligen äußeren Bedingungen in den verschiedenen Teilen der Pflanze abgestimmt. So werden beispielsweise bestimmte Proteine in Teilen der Wurzel vermehrt gebildet, um die Salzaufnahme aus dem Boden bei Bedarf zu regulieren.⁹

Stresstolerante Sorten zu entwickeln, ist ein komplexes Unterfangen. Ob die neuen Gentechnikverfahren des Genome Editing solche Sorten schnell liefern können, ist bisher noch fraglich. Am erfolgversprechendsten sind gegenwärtig immer noch konventio-

nelle Züchtungsmethoden.¹⁰ Hierbei werden Pflanzen aus Regionen mit bestimmten Stressfaktoren (z. B. lange Dürreperioden) untersucht und selektiert.

Vergleich klassischer Mutagenese mit CRISPR/Cas

Zwischen CRISPR/Cas und Mutagenesezüchtung bestehen sowohl im Verfahren als auch in den Möglichkeiten der Methoden erhebliche Unterschiede. CRISPR/Cas ermöglicht es, gezielt zu bestimmen, an welcher Position des Erbguts eine Veränderung erfolgen soll (SDN-1,-2 und -3) und in vielen Fällen auch, wie das Erbgut verändert werden soll (also gezielt und gerichtet, SDN-2 und -3). Bei der Mutagenese sind die Mutationen zufällig und ungerichtet: Weder ist die Zielsequenz im Erbgut der Pflanze festgelegt noch ist vorhersehbar, wie das Erbgut verändert wird.

Bei der Mutagenesezüchtung wird die gesamte Pflanze oder es werden pflanzliche Zellen mit Strahlung oder chemischen Substanzen behandelt, die wie ein unspezifischer Reiz wirken. Im Gegensatz dazu greift CRISPR/Cas auf den Einsatz synthetischer Nukleinsäuren bzw. einen Enzymkomplex zurück, der in die Zelle eingebracht werden muss. Entweder wird die DNA von CRISPR/Cas direkt mit speziellen Verfahren in die Zellen des Zielorganismus eingebracht. Hierbei werden Verfahren verwendet, die auch in der klassischen Gentechnik verwendet werden wie z. B. der DNA-Partikelbeschuss oder die Infektion mit dem Wurzelbakterium *Agrobacterium tumefaciens*. Die Zellen stellen aus der eingeschleusten DNA dann das Werkzeug für die Veränderung des Erbguts selbst her. Oder das CRISPR/Cas-Werkzeug kann alternativ außerhalb der Zelle anhand der DNA hergestellt und anschließend in die Zellen eingeschleust werden. Beispielsweise wird dazu die Genschere in kleine Fetttropfen eingelagert und so in die Zellen eingebracht. Die Genschere führt dann zu Veränderungen direkt am Genom der Pflanze.

Bei der Mutagenesezüchtung werden durch die verwendete Strahlung oder die Chemikalien Schäden an der DNA-Struktur verursacht. Dies können Doppelstrangbrüche, Fehlpaarungen der Basen oder anderes sein. Das aktiviert ebenso die Reparatursysteme der Zelle, die versuchen, die Schäden möglichst schnell wieder zu beheben. Dabei können Fehler auftreten und falsche Basen eingebaut werden. Auch der ursprüngliche Zustand kann wiederhergestellt werden und damit erhalten bleiben. Veränderungen, die durch CRISPR/Cas eingeführt werden, können auch durch die Reparatursysteme erkannt und rückgängig gemacht werden. Das CRISPR/Cas-System kann jedoch in diesem Falle die (wiederhergestellte) Zielsequenz erneut erkennen und diese nochmal schneiden. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Veränderung

durch CRISPR/Cas eingeführt wird, ist dementsprechend erheblich höher als die Wahrscheinlichkeit einer natürlich auftretenden Mutation.

Zudem ermöglicht es CRISPR/Cas, alle DNA-Bereiche zu verändern, die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich bzw. identisch sind. Speziell Pflanzen haben oft ein redundantes Genom, d. h., Geninformationen wiederholen sich. Mit CRISPR/Cas können alle Gensequenzen mit der gleichen Geninformation auf einmal verändert werden, was bei der Mutationszüchtung so schnell und einfach in der Regel nicht möglich ist.¹¹

Eine Möglichkeit von CRISPR, die mit bisherigen Züchtungsmethoden nur in langwierigen Prozessen erreichbar ist, ist die gleichzeitige oder serielle Veränderung mehrerer Zielsequenzen der DNA durch die Einführung mehrerer verschiedener gRNAs. Das wird in der Fachsprache als »Multiplexing« bezeichnet. Für die Nutzer der Technologie ist das sehr vielversprechend. Dies kann aber in der Summe zu erheblichen Veränderungen in den Eigenschaften der Organismen führen, auch wenn die einzelnen Veränderungen dabei nur kleine Abschnitte der DNA umfassen. So lassen sich komplett neue Kombinationen an genetischen Eigenschaften erschaffen, die mit Mutagenese nicht oder nur in Ausnahmen erreicht werden können.

Präzision bedeutet nicht pauschal Sicherheit

Ein zentraler Unterschied zwischen CRISPR/Cas und herkömmlicher Mutagenesezüchtung ist die Präzision mit der Veränderungen am Erbgut vorgenommen werden können. Mutageneseverfahren erhöhen zwar die Mutationsrate im Erbgut von Organismen; in welchem genauen DNA-Bereich diese auftauchen, kann aber nicht vorhergesagt werden. Mit CRISPR bestimmt der Wissenschaftler den zu verändernden Genort selbst und sucht durch DNA-Analyseverfahren nach dem Experiment die gewünschten Veränderungen des Erbguts gezielt heraus.

Diese Präzision (also den Ort der Veränderung vorherbestimmen zu können) ist ein klarer Vorteil aller Genome-Editing-Methoden. Die Konsequenzen dieser Veränderungen sollten jedoch nicht pauschal als sicher angesehen werden.¹² Das Erbgut, also die Gesamtheit der DNA eines Organismus, ist kein eindimensionales Konstrukt, bei dem eine kleine Veränderung lediglich das Aus- oder Anschalten bestimmter einzelner Eigenschaften definiert. Eine Pflanze ist ein in sich komplexer Organismus, bei dem viele Stoffwechsel- und Signalwege miteinander verbunden sind. Solche Signalwege regulieren biochemische Prozesse und bewirken damit eine Signalweiterleitung innerhalb der Pflanze. Beispielsweise reguliert der Auxin-Signalweg viele zentrale Vorgänge innerhalb pflanzlicher Zellen während des Wachstums und der

Differenzierung. Auch wenige Eingriffe in diesen Signalweg hätten Einfluss auf viele verschiedene zelluläre Prozesse.¹³ Einzelne Veränderungen (und Kombinationen davon) können Effekte nach sich ziehen, die auf den ersten Blick nichts mit der ursprünglichen Veränderung zu tun haben. Proteine können z. B. miteinander interagieren und sich gegenseitig in ihrer Wirkung hemmen oder verstärken oder ihre Bildung gegenseitig regulieren. Auch Wechselwirkungen zwischen RNA- und DNA-Elementen, Proteinen und DNA-Bereichen und Proteinen und RNAs sind bekannt. Veränderungen am Erbgut durch CRISPR/Cas können im Zielorganismus zu einem Ungleichgewicht dieses gut koordinierten Zusammenspiels führen. Wird nur eine Komponente in diesem Netzwerk verändert, hat das somit meist auch Auswirkung auf andere Signal- und Stoffwechselwege. Werden mehrere Veränderungen eingebracht, vergrößern sich solche Wechselwirkungseffekte.

Gezielte Veränderungen des Erbguts sollten also niemals isoliert und als linear betrachtet werden, sondern immer im Kontext eines im Gleichgewicht stehenden biologischen Systems. Hinzu kommt die Wechselwirkung der Pflanze mit sich ständig ändernden Umweltbedingungen, die auch einen großen Einfluss auf die Regulation pflanzlicher Gene haben.

Ungewollte Nebeneffekte

Neben den Effekten, die durch die gewünschten Veränderungen des Erbguts ausgelöst werden können, können bei der Anwendung von CRISPR/Cas auch direkte Nebeneffekte auf der Ebene der DNA auftreten. Es kann zu ungewollten Veränderungen der DNA an Nichtzielsequenzen (sog. Off-Target-/Nichtziel-Effekte) kommen. Das CRISPR/Cas-System arbeitet nicht immer hundertprozentig genau, sondern toleriert eine gewisse Anzahl an Fehlpaarungen zwischen den Buchstaben der gRNA und denen der Zielsequenz, wo sie agieren soll. Das kann dazu führen, dass die Genschere an einer ganz anderen Stelle Veränderungen bewirkt.¹⁴

Außerdem konnte bereits nachgewiesen werden, dass auch ungewollte Veränderungen durch den Einbau von zellfremder DNA in das Erbgut von Pflanzen auftreten können. Ein Risiko birgt hier z. B. das Einschleusen der DNA in die Zelle, die als Vorlage für die Herstellung der Genschere dient. Diese DNA-Vorlage ist die Grundlage für die Synthese der Cas-Nuklease. Sie kann für einen längeren Zeitraum innerhalb der Zellen verbleiben, bevor sie abgebaut wird. Teile dieser DNA können sowohl am Zielort (man spricht hier von On-Target-Effekten) als auch an anderen Bereichen der DNA (*off target*), wo Doppelstrangbrüche entstehen, unbeabsichtigt in das Erbgut eingefügt werden. So konnte bereits an Sojabohnen gezeigt werden,

dass im Zielbereich Fragmente der DNA gefunden wurden, die für die Nuklease Cas9 kodiert.¹⁵ Um solche und weitere Nebeneffekte zu identifizieren, gibt es eine Reihe molekularbiologischer Verfahren, die Änderungen der DNA, der Gesamtheit der RNA und der Proteine aufdecken können und stetig weiterentwickelt werden, wie beispielsweise Genomsequenzanalysen.¹⁶ Diese sind bislang aber nicht verpflichtend einzusetzen.

Woran wird geforscht? – Beispiele

Eine Vielzahl der bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse beschäftigt sich nach wie vor mit Herbizid- und Schädlingsresistenz. Es gibt aber auch Genome-Editing-Forschungen, bei denen Gene verändert werden, die den Nährstoffgehalt, den Geschmack oder die Haltbarkeit von Lebensmitteln beeinflussen. Ein recht bekanntes Beispiel ist ein durch CRISPR/Cas veränderter *Champignonpilz* von der Staatlichen Universität von Pennsylvania.¹⁷ Durch das Ausschalten eines Gens (der Phenoloxidase) an mehreren Orten des Erbguts soll der CRISPR-Pilz an Schnittstellen weniger schnell braun werden. Das Enzym Phenoloxidase wird in intakten pflanzlichen Zellen in den sog. Chloroplasten gespeichert. Durch ein Anschneiden werden diese zellulären Bestandteile zerstört, das Enzym wird freigesetzt und bewirkt die Oxidation von bestimmten organischen Molekülen im Zytoplasma der Zellen. Dieser Vorgang wird als enzymatisches Bräunen bezeichnet, ein Ausschalten dieser Reaktion bewirkt, dass die Pilze weniger schnell braun werden.¹⁸

Das Bräunen ist ein natürlicher Prozess, der dem Konsumenten die Frische und Haltbarkeit von Pilzen anzeigt. Die genaue biologische Funktion der Phenolo-

xidase für den Stoffwechsel des Pilzes ist bislang noch nicht vollständig untersucht, es gibt aber Hinweise darauf, dass die Phenoloxidase Funktionen während der Photosynthese übernimmt.¹⁹ Eine Risikoprüfung solcher Pilze ist zum Schutz von Verbrauchern sehr wichtig, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich der Pilz beispielsweise in seinen Inhaltsstoffen ändert. Ob der CRISPR-Champignon vermarktet werden soll, ist bisher unklar. Diese Pilze könnten sonst die ersten CRISPR/Cas-Produkte auf dem amerikanischen Markt werden, ohne dass eine solche Prüfung durchgeführt wurde. Denn genomeditierte Produkte, die mit der SDN-1-Technik von CRISPR entstanden sind, müssen in den USA nicht reguliert werden.²⁰

Andere Forscher arbeiten an einem *Weizen*, der durch CRISPR/Cas weniger Gluten produzieren soll und somit für Menschen von Nutzen ist, die sich möglichst glutenfrei ernähren möchten.²¹ Hierfür wurden gleich 35 von insgesamt 45 Gliadin-Genen ausgeschaltet. Gliadine sind neben Glutenin die Hauptbestandteile von Gluten und wichtige Speicherproteine innerhalb der Samen, Wurzel- und Sprossknollen des Weizens. Gluten ist wichtig für die Backfähigkeit von Mehl. Da nicht alle Gliadin-Gene ausgeschaltet wurden, sind Produkte, die mit diesem Weizen hergestellt wurden, allerdings nicht geeignet für Menschen, die an echter Zöliakie leiden und sich komplett glutenfrei ernähren sollten. Was sonst noch alles beim Weizen verändert wird, sollte eingehend geprüft werden.

Mit Hilfe von TALEN, einem weiteren Genome-Editing-Verfahren, das ebenso mit einer gerichteten Nuklease arbeitet, wird an einer *Kartoffel* geforscht, in der alle Kopien eines Gens (die Invertase der pflanzlichen Vakuole), dessen Genprodukt den Zucker Saccharose in Glukose und Fruktose umwandelt, aus-

Folgerungen & Forderungen

- Genome Editing umfasst eine Vielzahl von Verfahren, die in den letzten Jahren rasant weiterentwickelt wurden und für eine Vielzahl an Anwendungen genutzt werden. Bislang werden sie in der medizinischen Forschung und in der Grundlagenforschung sowie in der Tier- und Pflanzenzucht angewendet.
- In der Pflanzenzucht bestehen grundsätzliche Unterschiede zwischen Genome Editing und Mutageneseverfahren. Beim Genome Editing werden gezielt Veränderungen am Erbgut an vorher festgelegten DNA-Bereichen eingeführt. Bisherige Mutageneseverfahren dagegen erhöhen die Mutationsrate ohne Kenntnis, wo im Genom Mutationen auftreten.
- Bei den neuen Gentechnikverfahren können ungewollt Nebeneffekte auftreten, wie z. B. Off-Target-Effekte, irrtümlich gebildete Proteine oder das Einbringen von ungewollten DNA-Sequenzen in den Zielbereich.
- Die beabsichtigten Veränderungen können zu einem Eingriff in gut aufeinander abgestimmte Stoffwechselwege führen. Dabei kann sich die zelluläre Zusammensetzung der Zielorganismen verändern.
- Genome Editing umfasst vielversprechende, neue Technologien, die ihren Beitrag dazu leisten können, biologische Fragestellungen zu bearbeiten und Lösungen für bestehende Probleme voranzutreiben. Aufgrund ihrer erhöhten Eingriffstiefe und Möglichkeiten sollten die von ihnen hervorgebrachten Organismen jedoch gemäß des Vorsorgeprinzips und einer guten wissenschaftlichen Praxis auf Risiken hin untersucht und die Rückverfolgbarkeit gewährleistet werden.

geschaltet wurden.²² Dadurch soll die Lagerfähigkeit erhöht sein, denn die Kartoffeln werden langsamer weich. Außerdem entsteht weniger schädliches Acrylamid, wenn Teile der Kartoffel frittiert werden. Auf den ersten Blick sind das sinnvolle neue Eigenschaften, allerdings ist das dafür ausgeschaltete Gen wichtig für den Zuckerhaushalt der Pflanzen und damit auch für den zentralen Stoffwechsel der Kartoffeln. Es ist nicht auszuschließen, dass der Gen-Knock-out ungewollte Nebeneffekte auf die Pflanzen hat und für den Endverbraucher unverträgliche Nebenprodukte entstehen. Eine Risikobewertung ist daher notwendig und sinnvoll.

Ausblick

Der EuGH hat mit seinem Urteil vom 25. Juli 2018 höchstrichterlich entschieden, dass alle Organismen, die durch Genome Editing verändert wurden, unter das bestehende Gentechnikgesetz fallen.²³ Sowohl ungewollte Nebeneffekte, die bei der Verwendung von Genome-Editing-Techniken auftreten können, als auch die Wirkungen der gewollten Veränderungen müssen nun eingehend untersucht werden. Anders als oft falsch dargestellt, bedeutet das Urteil nicht, dass CRISPR/Cas-Organismen oder auch nur die Forschung mit dieser Technik in Europa verboten wird, sondern, dass durch Genome Editing entstandene Produkte auf Risiken für die Gesundheit des Menschen, der Tiere und zum Schutz der Umwelt geprüft werden müssen. Dadurch wird das in Europa geltende Vorsorgeprinzip gestärkt.

CRISPR und Co. sind als mächtige Werkzeuge innerhalb der Naturwissenschaften bereits angekommen. Täglich erscheinen wissenschaftliche Artikel über neue Ergebnisse und die Weiterentwicklung dieser Verfahren. Genome Editing hat das Ausmaß, mit dem Veränderungen an Zielorganismen möglich sind, drastisch erhöht und beschleunigt. Durch dieses gesteigerte Tempo und die vielfachen Anwendungsmöglichkeiten ist es aus naturwissenschaftlicher Sicht wichtig, auftretende Risiken eingehend zu untersuchen, bevor Organismen in die Umwelt eingebracht werden, die einen unvorhergesehenen Einfluss nehmen können. Die Forschungslandschaft sollte den Anspruch erheben, solche Risiken mit den bereits zur Verfügung stehenden Methoden zu untersuchen und auszuschließen. Deutschland ist ein wissenschaftlich exzellent aufgestelltes Land, das Grundlagenforschung im Bereich Genome Editing durchführt. Dies wird von dem EuGH-Urteil in keiner Weise eingeschränkt. Vielmehr bildet das Urteil die Grundlage dafür, einerseits verantwortungsvolle Wissenschaft zu stärken und andererseits wissenschaftsbasierte, gute Entscheidungen für Umwelt und Gesellschaft zu treffen.

Das Thema im Kritischen Agrarbericht

- ▶ Annemarie Volling und Marcus Nürnberger: Entwicklungen & Trends 2017: Neue Verfahren, neue Probleme – Gentechnik zwischen Offensive und Widerstand. In: Der kritische Agrarbericht 2018, S. 271–285, hier: S. 277–282.
- ▶ Christoph Then: Gentechnik, die keine sein soll ... Wie die Industrie versucht, neue Gentechnik-Verfahren bei Pflanzen und Tieren als konventionelle Züchtung einzustufen. In: Der kritische Agrarbericht 2016, S. 277–282.
- ▶ Eva Gelinsky und Annemarie Volling: Präzedenzfall CIBUS-Raps. In: Der kritische Agrarbericht 2016, S. 279 f.
- ▶ Christoph Then: Gentechnik oder nicht? Neue Züchtungsverfahren bei Pflanzen und Tieren. In: Der kritische Agrarbericht 2015, S. 253–258.

Anmerkungen

- 1 <https://mvd.iaea.org/#!Search>.
- 2 Quelle: Fachstelle Gentechnik und Umwelt (FGU) 2018.
- 3 Fachstelle Gentechnik und Umwelt (FGU) 2018: Hintergrund: CRISPR/Cas (Technik) (https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/CRISPR_Technik.pdf).
- 4 T. Gaj, C. A. Gersbach and C. F. Barbas: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. In: Trends in Biotechnology 31/7 (2013), pp. 397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- 5 N. J. Sauer et al.: Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. In: Plant Biotechnology Journal 14/2 (2016), pp. 496–502. doi: 10.1111/pbi.12496.
- 6 Näheres hierzu im Jahresrückblick von Annemarie Volling und Marcus Nürnberger in diesem *Kritischen Agrarbericht* (S. 279–289).
- 7 I. Oishi et al.: Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. In: Scientific Reports 6 (2016), 23980. doi: 10.1038/srep23980. – S. G. Lillico et al.: Live pigs produced from genome edited zygotes. In: Scientific Reports 3 (2013), 2847. doi: 10.1038/srep02847. – D. F. Carlson et al.: Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. In: Nature Biotechnology 34/5 (2016), pp. 479–481. doi: 10.1038/nbt.3560.
- 8 Y. Fang and L. Xiong: General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. In: Cellular and Molecular Life Sciences 72/4 (2015), pp. 673–689. doi: 10.1007/s00018-014-1767-0.
- 9 U. Deinlein et al.: Plant salt-tolerance mechanisms. In: Trends in Plant Science 19/6 (2014), pp. 371–379. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.001.
- 10 N. Gilbert: Frugal farming. Old-fashioned breeding techniques are bearing more fruit than genetic engineering in developing self-sufficient super plants. In: Nature 533 (2016), pp. 308–310 (www.nature.com/polopoly_fs/1.19943!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/533308a.pdf). – S. Muzammil et al.: An ancestral allele of *Pyroline-5-carboxylate synthase1* promotes proline accumulation and drought adaptation in cultivated barley. In: Plant Physiology 178 (2018), pp. 771–782. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00169>.
- 11 Fachstelle Gentechnik und Umwelt (FGU) 2018: FGU Hintergrund: Vergleich CRISPR/Cas – ODM – Mutagenese (https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/GE_Vergleich.pdf).
- 12 Bundesamt für Naturschutz (BfN): Hintergrundpapier zu neuen Techniken. Neue Verfahren in der Gentechnik: Chancen und Risiken aus Sicht des Naturschutzes. Bonn 2017 (www.bfn.de/fileadmin/BfN/agrogentechnik/Dokumente/17-07-13_Hintergrundpapier_Neue_Techniken_end_online_barrierefrei.pdf).
- 13 Grundlagen des Auxin Signalweg: O. Leyser: Auxin signaling. In: Plant Physiology 176/1 (2018), pp. 465–479. doi: 10.1104/pp.17.00765.

- 14 S. W. Cho et al.: Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. In: *Genome Research* 24/1 (2014), pp. 132–141. doi: 10.1101/gr.162339.113. – K. Xie and Y. Yang: RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. In: *Molecular Plant* 6/6 (2013), pp. 1975–1983. doi: 10.1093/mp/ss1119.
- 15 Z. Li et al.: Cas9-Guide RNA directed genome editing in soybean. In: *Plant Physiology* 169/2 (2015), pp. 960–970. doi: 10.1104/pp.15.00783.
- 16 M. Jain et al.: Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. In: *Nature Biotechnology* 36/4 (2018), pp. 338–345. doi: 10.1038/nbt.4060.
- 17 E. Waltz: Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. In: *Nature* 532/7599 (2016), 293. doi: 10.1038/nature.2016.19754.
- 18 D. Ferreira Holderbaum et al.: Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development. In: *HortScience* 45/8 (2010), pp. 1150–1154 (<http://hortsci.ashspublications.org/content/45/8/1150.abstract>).
- 19 T. Boeckx et al.: Polyphenol oxidase in leaves: Is there any significance to the chloroplastic localization? In: *Journal of Experimental Botany* 66/12 (2015), pp. 3571–3579.
- 20 www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-321-01_air_response_signed.pdf.
- 21 S. Sanchez-Leon et al.: Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. In: *Plant Biotechnology Journal* 16/4 (2018), pp. 902–910. doi: 10.1111/pbi.12837.
- 22 B. M. Clasen et al.: Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. In: *Plant Biotechnology Journal* 14/1 (2016), pp. 169–176. doi: 10.1111/pbi.12370.
- 23 Urteil des Europäischen Gerichtshofs vom 25. Juli 2018 (<http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=204387&pageIndex=0&doclang=DE&mode=req&dir=&occ=first&part=1&cid=634069>).



Dr. Katharina Kawai

bis Ende 2017 am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin. Seit 2018 Leiterin der Fachstelle für Gentechnik und Umwelt (FGU) in München.

Frohschammerstr. 14, 80807 München
info@fachstelle-gentechnik-umwelt.de