

Kommentar zum “Entwurf einer Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung – GenTSV)”



Testbiotech e. V.
Institut für unabhängige
Folgenabschätzung in
der Biotechnologie

Einleitung

Diese Stellungnahme von Testbiotech bezieht sich auf die Einstufung gentechnisch veränderter Organismen mit einem sogenannten Gene Drive nach dem GenTSV.

Es gibt mehrere technische Möglichkeiten Gene Drives zu etablieren. Eine der am häufigsten genannten basiert auf einer Anwendung der Nuklease CRISPR-Cas. Bei diesem Gene Drive wird das Gen, das für die Bildung der Nuklease verantwortlich ist, dauerhaft im Erbgut verankert. In den nachfolgenden Generationen wird die Nuklease dann erneut gebildet und soll das Gen zur Bildung der Nuklease erneut an einer vorbestimmten Stelle im Erbgut einbauen.

Ziel ist, die herbeigeführten Veränderungen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu vererben, als sonst nach den Mendelschen Vererbungsregeln zu erwarten wäre. Während sich bei sexueller Reproduktion die genetischen Veranlagungen normalerweise nach Mendel in den nachfolgenden Generationen aufteilen, sollen Organismen mit Gene Drive die entsprechende veränderte Gen-Information möglichst gleichermaßen an alle Nachkommen vererben.

Dabei wird also der Vorgang der gentechnischen Veränderung auf sich selbst organisierende Weise und außerhalb der Kontrolle der Labors in jeder Generation wiederholt. Dass eine derartige Kettenreaktion im Erbgut von Populationen technisch machbar ist, wurde u.a. an Hefen (Di Carlo et al., 2015), Mücken (Gantz & Bier, 2015; Hammond et al., 2015), Fliegen (Champer et al., 2017; KaramiNejadRanjba et al., 2018) und Mäusen (Grunwald et al., 2018) gezeigt.

Mit Hilfe von Gene Drives soll es möglich gemacht werden, in Zukunft natürliche Populationen gentechnisch zu verändern. Die Technologie könnte beispielsweise eingesetzt werden, um Schädlinge auszurotten oder Unkräuter empfindlicher gegenüber Herbiziden zu machen. Gearbeitet wird u.a. an Mücken, Fliegen, Nagetieren und Wildpflanzen.

Die Abschätzung der Risiken

Das besondere Risiko besteht darin, dass gentechnisch veränderte Organismen mit einem Gene Drive (GDO), ihre künstlichen Gene rasch in natürlichen Populationen verbreiten können, falls sie ins Freiland entkommen sollten. Vorhersagen über die tatsächlichen Auswirkungen sind allerdings nur schwer zu treffen. Zu berücksichtigen ist eine große Anzahl von Einflussfaktoren, die zum Teil durch die Eigenschaften des Gene Drives vorhersagbar sind, zum anderen in den

biologischen Eigenschaften der jeweiligen Spezies begründet sind und zu großen Teilen auch erst durch die Wechselwirkungen mit der Umwelt entstehen. Dabei können auch unerwartete genetische Effekte eine Rolle spielen, die mit dem Einbau der zusätzlichen Gene einhergehen.

Die jeweiligen Folgen einer unkontrollierten Freisetzung hängen unter anderem davon ab,

- ob die Gene Drive Organismen (GDOs) natürliche Kreuzungspartner (eine oder mehrere Arten) finden;
- welchen Mustern die Populationsdynamik der natürlichen Kreuzungspartner unterliegt;
- ob der Gene Drive zur Ausrottung oder zur Veränderung der biologischen Eigenschaften von GVOs dienen soll;
- in welcher Menge die GDOs entkommen;
- wie schnell sich die GDOs in der Umwelt ausbreiten;
- wie effektiv und stabil der Gene-Drive vererbt wird;
- wie lange der Gene Drive als ganzes System oder in Teilen in den natürlichen Populationen persistiert;
- wie sich der Gene Drive in unterschiedlichen genetischen Hintergründen auswirkt;
- wie die GDOs auf veränderte Umweltbedingungen und Stressfaktoren reagieren;
- welche Wechselwirkungen mit unmittelbar assoziierten biologischen Systemen (Mikrobiome, Parasiten, Prädatoren, Wirte) oder dem weiteren ökologischen Umfeld (Nahrungsnetze, Stoffkreisläufe, Bestäuber) auftreten.

Die bisherige Risikoabschätzung von gentechnisch veränderten Pflanzen (siehe z.B. EFSA, 2010) kann hier nur begrenzt zur Anwendung kommen. Bei diesen ist die Risikoabschätzung meist auf eine Vegetationsperiode, eine bestimmte Umwelt (die Anbaufläche) und einen bereits vorselektierten genetischen Hintergrund (die Sorten) beschränkt.

Dagegen muss man beispielsweise bei GDOs wie Insekten davon ausgehen, dass diese über mehrere Generationen in der Umwelt persistieren, mit unterschiedlichen Ökosystemen in Kontakt kommen und dabei auch sehr unterschiedlichen Umweltbedingungen (wie bspw. Jahreszeiten) ausgesetzt sind. Zudem ist zu berücksichtigen, dass in der Regel in den natürlichen Populationen eine große genetische Heterogenität zu erwarten ist.

Erschwerend kommt hinzu, dass der Vorgang der gentechnischen Veränderung nicht unter den kontrollierten Bedingungen des Labors stattfindet, sondern sich selbst in jeder Generation in selbst organisierter Art und Weise wiederholt. Fehler, die beispielsweise bei der Vermehrung von Saatgut durch zusätzliche Kontrollen vermieden werden können, werden im Falle von GDOs unter Umständen gar nicht bemerkt und sind möglicherweise auch nachträglich oft nicht mehr korrigierbar.

Einige Hinweise darauf, welche Risiken zu berücksichtigen sind, gibt die EFSA (2013) in ihrer Richtlinie zur Risikobewertung gentechnisch veränderter Tiere, in der auch Gene Drives erwähnt werden. Dabei handelt es sich um die Risikoabschätzung gentechnisch veränderter Tiere, für die ggf. ein Antrag auf beabsichtigte Freisetzung gestellt wird und nicht um GDOs, die unbeabsichtigt aus dem Labor entkommen. Trotzdem sind viele der von der EFSA genannten Kriterien auch im Hinblick auf die Festlegung der Sicherheitsauflagen für Labore relevant.

Laut EFSA sind bei der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Tieren und insbesondere Insekten u.a. der genetische Hintergrund, der Lebenszyklus und die räumlich-zeitliche Dimension relevant:

“applicants should consider and discuss breeding in which the recombinant DNA could be introduced or introgressed into genetic backgrounds of domesticated, bred and wild individuals.” (Seite 25)

“applicants should consider the whole life cycle of the GM animal and the receiving environments of the different life stages to determine possible adverse effects over time.” (Seite 39)

“long-term effects may also occur due to increases in spatial and temporal complexity.” (Seite 39)

Wichtig im Hinblick auf die Auswirkungen auf andere Nichtzielorganismen (NTO) ist es, die jeweilige ökologische Funktion sowie biotische und abiotische Wechselwirkungen zu berücksichtigen. Dabei stellt die EFSA allerdings methodische Probleme fest. Sie gibt folgendes zu bedenken:

i. The ecological functions of specific species and their complex biotic or abiotic interactions (...) are not always fully understood.

ii. The methodologies for testing potential effects on NTOs that are limited. Field trials might not be feasible in all cases, as it might be impossible to eradicate the released GM insect population, if an adverse effect is identified related to releases, in particular, applying replacement strategies.

iii. The fact that it is not feasible to simulate the complexity of the receiving environments in laboratory tests, semi-field tests or modelling. (...) Consequences of the decrease or eradication in population size of a certain species or the replacement of wild population by GM insect populations might not be predictable.” (Seite 103)

Tatsächlich stellt die EFSA viele Unsicherheiten fest, die zum Teil durch ein sehr limitiertes verfügbares Wissen begründet sind:

“The formal analysis should address three broad types of uncertainty:

1. Linguistic uncertainty (...)
2. Variability - caused by fluctuations or differences in a quantity or process, occurring over time, with location or within a group. (...)
3. Incertitude - caused by limitations of scientific knowledge and knowledge production systems (...).” (Seite 42)

Angesichts der Begrenztheit des verfügbaren Wissens und im Hinblick auf das Vorsorgeprinzip, stimmen viele ExpertInnen überein, dass eine ungewollte Verbreitung in natürlichen Populationen vermieden werden muss (siehe z.B., Oye et al., 2014; Akbari et al., 2015; Lunshof & Birnbaum, 2017; Kuzma et al., 2017).

Wie leicht man das Risiko der Ausbreitung gentechnischer Organismen unterschätzen kann, zeigt sich derzeit in den USA, wo sich gentechnisch veränderte Gräser seit Jahren unkontrolliert

ausbreiten.¹ Die Gräser weisen eine Resistenz gegen Glyphosat auf. Wie aktuelle Publikationen zeigen, hat man das Potential zur Ausbreitung von gentechnisch veränderten Pflanzen, die ein zusätzliches Enzym produzieren, das sie gegen Glyphosat resistent macht, über mehr als 20 Jahre falsch eingeschätzt. Diese Pflanzen können auch dann ein erhöhtes Potential zur Ausbreitung zeigen, wenn gar kein Glyphosat gespritzt wird (Fang et al., 2018).

Experimente mit Gene Drives in Deutschland

2018 erschien eine Publikation der Universität Göttingen (KaramiNejadRanjba et al., 2018), aus der hervorgeht, dass auch in Deutschland schon mit Gene Drives experimentiert wurde. Dabei wurde mit der Spezies *Drosophila melanogaster* (Taufliege) gearbeitet.

Mit diesen Experimente wurde offensichtlich begonnen, bevor es in Deutschland eine allgemeine regulatorische Bewertung gab: 2016 befasste sich die ZKBS erstmals offiziell mit dem Thema Gene Drive und stufte entsprechende gentechnische Arbeiten in die Sicherheitsstufe 2 ein (ZKBS, 2016). Wie ein Artikel im Labourjournal berichtet (Zauner, 2017) waren bis zu diesem Zeitpunkt die Experimente bereits zum Teil weitgehend abgeschlossen und in Sicherheitsstufe 1 durchgeführt worden. Laut dem Artikel wurden die Experimente dann zunächst bis zur Einstufung durch die ZKBS ausgesetzt. Überraschenderweise kam die ZKBS dann zu dem Ergebnis, dass es korrekt war, die Versuche tatsächlich in Sicherheitsstufe 1 durchzuführen (ZKBS, 2018). Das bedeutet, dass von diesen Versuchen keine Risiken ausgehen würden.

Bei den Experimenten wurde mit Hilfe von CRISPR-Cas 9 ein Gene Drive in einem Laborstamm der Taufliegen etabliert, der für eine Geschlechtsumwandlung der weiblichen Fliegen sorgen sollte: Aus weiblichen Nachkommen der *Drosophila* sollen sterile Pseudomännchen werden. Das eigentliche Ziel der Versuche, die unter anderem von der US Militärbehörde Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) unterstützt wurde, ist die Etablierung eines entsprechenden Gene Drives in der Mittelmeerfruchtfliege (*Ceratitis capitata*). In dieser Fliegenart wären die Pseudomännchen nicht steril und könnten so zusätzlich zur Verbreitung des Gene Drives beitragen. Theoretisch kann ein derartiger Gene Drive, wenn er in natürliche Populationen gelangt, diese erheblich dezimieren oder sogar zusammenbrechen lassen.

Die Göttinger Forscher (KaramiNejadRanjba et al., 2018) weisen darauf hin, dass die Sterilität der Pseudomännchen der Taufliegen ein Grund dafür sei, dass sich die GDOs unter Freilandbedingungen nur begrenzt ausbreiten könnten. Zudem wird berichtet, dass sich nach rund einem Dutzend Generationen so viele ungewollte Mutationen im Erbgut der Taufliegen anhäuften, dass der Gene Drive nicht mehr effektiv war. KaramiNejadRanjba et al. (2018) schlussfolgern, dass deswegen ein Zusammenbruch der natürlichen Populationen nicht zu befürchten sei, sollten die GDOs aus dem Labor entkommen.

Demgegenüber ist aber festzuhalten, dass die gentechnisch veränderten echten Männchen in jeder Generation nicht nur überleben sondern auch fruchtbar sind und die genetische Veranlagung für den Gene Drive weiter in den natürlichen Populationen verbreiten können. Wie lange dies nach einem Entkommen der Fall wäre, hängt von vielen Einflussfaktoren ab (siehe oben).

1 <https://www.hcn.org/issues/50.11/plants-genetically-modified-grass-creeps-across-eastern-oregon>

In der Publikation wird aber auch beschrieben, dass trotz des Verlusts der Funktion des Gene Drives nach mehreren Generationen, Teile des Genkonstruktes weiterhin erfolgreich vererbt wurden. Unter anderem wurde ein Markergen, das die Augenfarbe unter UV Licht verändert (dsRed Marker) und das zusätzlich verwendet wurde, um die Tiere zu identifizieren, entgegen den Erwartungen auch mehrfach in fruchtbaren Weibchen gefunden.

Daraus folgt, dass selbst dann, wenn es nach einem Entkommen der Tiere – wie im Labor - zum einem Verlust des Gene Drive-Funktion kommen sollte und ein Zusammenbruch der natürlichen Populationen nicht zwingend zu befürchten wäre, man trotzdem davon ausgehen muss, dass nach einem Entkommen der GDOs die gentechnisch veränderten Taufliegen längere Zeit in den natürlichen Populationen vorhanden wären und es dort zu vielfältigen Interaktionen und evolutiven Entwicklungen kommen würde, über deren tatsächliche Auswirkungen nur spekuliert werden kann (s.o.).

Als besonders kritikwürdig muss hervorgehoben werden, dass in Göttingen gleichzeitig mit Organismen gearbeitet wurde, die in den natürlichen Populationen sehr rasch Kreuzungspartner finden können und zudem die Sicherheitsauflagen auf ein Minimum reduziert wurden. Dagegen sehen viele Entwickler wie beispielsweise Akbari et al, (2015) wesentlich höhere Sicherheitsvorkehrungen vor. Fachlich ist die Einstufung der ZKBS in Sicherheitsstufe daher offensichtlich nicht gerechtfertigt.

Im Hinblick auf die geplante Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung – GenTSV) sollten derartige Versuchsbedingungen für die Zukunft in jedem Fall ausgeschlossen werden.

Geplante Änderung der GenTSV

Gene Drives stellen eine neue Herausforderung an den Gesetzgeber in der EU und deren Mitgliedsstaaten dar: Die EU Richtlinie 2009/41/EC, die sich mit Arbeiten an gentechnisch veränderten Organismen in geschlossenen Systemen befasst, begründet ihre Klassifizierung der Sicherheitskategorien vorwiegend auf der Pathogenität der Organismen, was zur Bewertung der Risiken von Gene Drives nicht geeignet ist. Hier müsste vielmehr die mögliche Gefahr einer Ausbreitung im Vordergrund stehen (siehe z.B. Noble et al., 2017).

Weiterhin werden durch die EU Richtlinie 2001/18, in der Freisetzen von gentechnisch veränderten Organismen reguliert sind, die Auswirkungen gentechnisch veränderter Organismen auf ganze Populationen nicht erfasst.

Auch wenn Gene Drives keine unmittelbare Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen und zum Beispiel keine Pathogene produzieren, erfordert der Schutz der Ökosysteme und der biologischen Vielfalt, dass dann besonders hohe Standards angelegt werden, wenn eine Ausbreitungsgefahr droht (siehe z.B. Noble et al., 2017).

Dagegen werden im aktuellen Vorschlag zur Novellierung der GenTSV nur Pathogenität und Toxizität als Kriterien für die Einstufung der gentechnischen Arbeiten vorgeschlagen. Damit würden Arbeiten mit Gene Drives, wie sie in Göttingen durchgeführt wurden, möglicherweise auch in Zukunft sehr niedrigen Sicherheitsstufen zugeordnet.

Testbiotech schlägt deswegen ergänzend vor, für gentechnisch veränderte Organismen, die mit einem Gene Drive ausgestattet sind und ein Potential zur Ausbreitung in natürlichen Populationen haben, die Sicherheitsstufe 4 verpflichtend vorzuschreiben.

Das entscheidende Kriterium darf dabei nicht nur die Eigenschaft des Gene-Drives und sein bekanntes oder geschätztes Potential zur Ausbreitung sein (s.o.). Vielmehr muss insbesondere berücksichtigt werden, ob mit Organismen gearbeitet wird, die nach einem Entkommen Kreuzungspartner in den natürlichen Populationen finden können.

Schlussfolgerungen im Hinblick auf Gentechnik-Regulation und Novellierung der GenTSV

Die GenTSV muss die Ziele laut Artikel 1, Abs 1 des Gentechnikgesetzes („Leben und Gesundheit von Menschen, die Umwelt in ihrem Wirkungsgefüge, Tiere, Pflanzen und Sachgüter vor schädlichen Auswirkungen gentechnischer Verfahren und Produkte zu schützen und Vorsorge gegen das Entstehen solcher Gefahren zu treffen“) gewährleisten können.

Zu beachten ist weiterhin, dass Deutschland sich mit der Unterzeichnung des Cartagena-Protokolls völkerrechtlich dazu verpflichtet hat, die biologische Vielfalt vor einer länderübergreifenden, unkontrollierten Ausbreitung von gentechnisch veränderten Organismen zu schützen.

Angesichts erheblicher methodischer Lücken und unter Berücksichtigung der bestehenden Grenzen des verfügbaren Wissens, sollten für Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die mit einem Gene Drive ausgestattet sind und Kreuzungspartner in natürlichen Populationen finden können, höchste Sicherheitsstufen festgelegt werden, um ein Entweichen in die Umwelt auszuschließen.

Literaturhinweise

Akbari, O.S., Bellen, H.J., Bier, E., et al. (2015) Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. *Science*, 349(6251):927-929.

Champer, J., Reeves, R., Oh, S.Y., Liu, C., Liu, J., Clark, A. G., et al. (2017) Novel CRISPR/Cas9 gene drive constructs reveal insights into mechanisms of resistance allele formation and drive efficiency in genetically diverse populations. *PLoS Genet* 13(7): e1006796.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006796>

DiCarlo, J. E., Chavez, A., Dietz, S. L., Esvelt, K. M., Church, G. M. (2015) Safeguarding CRISPR–Cas9 gene drives in yeast. *Nature Biotechnology* 33 1250–1255.

EFSA GMO Panel (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal* , 8(11): 1879. doi:10.2903/j.efsa.2010.1879

EFSA GMO Panel (2013) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. *EFSA Journal* 2013;11(5):3200, 190 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3200

Fang, J., Nan, P., Gu, Z., Ge, X., Feng, Y.-Q., Lu, B.-R., 2018. Overexpressing Exogenous 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (EPSPS) Genes Increases Fecundity and Auxin Content of Transgenic Arabidopsis Plants. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00233>

Gantz, V. M. & Bier, E. (2015) Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348: 442-444.

Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E. & James, A. A. (2015) Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49): E6736-E6743.

Grunwald H.A., Gantz V.M. Poplawski G., Xiang-ru S. Xu X.S., Bier E., Cooper K. (2018) Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR/Cas9 in the female mouse germline, *bioRxiv* preprint first posted online Jul. 4, 2018; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/362558>

Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S., Burt, A., Windbichler, N., Crisanti, A. & Nolan, T. A (2015) CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34: 78-83.

KaramiNejadRanjbar, M., Eckermann, K.N. Ahmed, H.M.M, Sánchez, H.M., Dippel, S., Marshall, J.M., Wimmer, E.A. (2018) Consequences of resistance evolution in a Cas9-based sex-conversion suppression gene drive for insect pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201713825. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1713825115

Kuzma, J., Gould, F., Brown, Z., Collins, J., Delborne, J., Frow, E., Esvelt, K., Guston, D., Leitschuh, C., Oye, K., Stauffer, S., (2017) A roadmap for gene drives: using institutional analysis and development to frame research needs and governance in a systems context. *Journal of Responsible Innovation*, 5(sup1): S13-S39. <https://doi.org/10.1080/23299460.2017.1410344>

Noble C., Adlam B., Church G.M., Esvelt K.M., Nowak M.A. (2017) Current CRISPR gene drive systems are likely to be highly invasive in wild populations, *bioRxiv* preprint first posted online Nov. 16, 2017; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/219022>.

Oye KA, Esvelt K, Appleton E, et al. (2014) Regulating gene drives, *Science*, 345(6197):626-628

Zauner, H. (2017) Im Gespräch: Ernst Wimmer, Universität Göttingen, „Gene Drive wird überschätzt!“ *Laborjournal*, 1-2/2017, https://www.laborjournal.de/epaper/LJ_17_01.pdf

ZKBS (2016) Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung von gentechnischen Arbeiten zur Herstellung und Verwendung von höheren Organismen mit rekombinanten Gene-Drive-Systemen https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/01_allgemeine_Themen/Bewertung_von_Gene_drive_Systemen.pdf;jsessionid=0E295582F97BD6EA4B5C985C0251ABDB.1_cid350?_blob=publicationFile&v=4

ZKBS (2018) Gene-Drive-Systeme – Werkzeuge zur beschleunigten Verbreitung genetischer Veränderungen, https://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/03_Fokusthemen/Gene-Drive-Systeme/Gene-Drive-Systeme_node.html;jsessionid=845EE08A03FCD04F3F34E10A60BC23B5.1_cid350