

Einsatz der Neuen Gentechnik bei landwirtschaftlich genutzten Wirbeltieren: eine kritische Bewertung

Einsatz der Neuen Gentechnik bei landwirtschaftlich genutzten Wirbeltieren: eine kritische Bewertung

Autoren

Andreas Bauer-Panskus, Matthias Juhas und Christoph Then

Impressum

Testbiotech e.V.

Institut für unabhängige Folgenabschätzung
in der Biotechnologie

Frohschammerstr. 14

D-80807 München

Tel.: +49 (0) 89 358 992 76

info@testbiotech.org

www.testbiotech.org

Geschäftsführer: Dr. Christoph Then

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Unterschiede zur Züchtung	4
Risiken	4
Patente	6
Regulierung	6
1. Einführung	7
2. Technische Grundlagen	9
2.1 Anwendungskategorien	9
2.2 Nukleasen	10
3. NGT-Anwendungen an Wirbeltieren	12
3.1 Anwendungen an Versuchstieren	12
3.2 Anwendungen an großen Nutztieren	12
3.3 Besonderheiten bei Fischen und Vögeln	13
3.4 Mehrstufige Verfahren beim Einsatz der Neuen Gentechnik	13
4. Unterschiede zur konventionellen Züchtung	15
4.1 Merkmale konventioneller Zucht	15
4.2 Merkmale der NGT-Verfahren	16
5. Risiken für landwirtschaftlich genutzte Wirbeltiere	18
5.1 Die technische Entwicklung und ihre Bedeutung für die Risikobewertung	18
5.2 Relevante Bereiche für die Risikobewertung	19
6. Patente	25
7. EU-Regulierung	26
Quellen	27

Zusammenfassung

Dieser Bericht ist eine kritische Bestandsaufnahme von Anwendungen der Neuen Gentechnik (NGT) an Wirbeltieren, insbesondere an Tieren, die der Produktion von Lebensmitteln dienen. Für die AutorInnen steht dabei die Perspektive des Schutzes von Tier, Mensch und Umwelt im Vordergrund.

Unterschiede zur Züchtung

Mit der Neuen Gentechnik können bei Wirbeltieren genetische Veränderungen erreicht werden, die über das hinausgehen, was bisher im Rahmen der konventionellen Zucht möglich bzw. zu erwarten ist. Neue genetische Eigenschaften, die sich züchterisch nutzen lassen, ergeben sich bei Wirbeltieren vor allem aus Kreuzung und Selektion. Die Häufigkeit der dabei auftretenden Rekombinationen („Crossing-over“) bzw. Mutationen sind im Erbgut aber sehr ungleich verteilt, was die Ergebnisse der konventionellen Züchtung stark limitiert. Die Mechanismen, die das Auftreten von neuen Genvarianten begrenzen, können als eine von den Zellen kontrollierte Barriere gegen krankmachende Mutationen interpretiert werden.

Viele Mutationen, die bspw. aus fehlerhaften Prozessen bei der Zellteilung resultieren, werden natürlicherweise von den Zellen wieder so repariert, dass die Genfunktion erhalten bleibt. Viele Genbereiche gelten als hoch konserviert, weil hier selten neue Genvarianten zu beobachten sind, die biologisch wirksam sind.

Die Neue Gentechnik (NGT) macht das Erbgut von Tieren in viel größerem Umfang für Veränderungen verfügbar, weil sie mit den natürlichen Prozessen in den Zellen interferiert und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten bestimmter Mutationen (u.a. Verlust von Genfunktionen) verändert. Unter anderem können die natürlichen Reparaturprozesse in den Zellen behindert werden. Mithilfe der Neuen Gentechnik können so Mutationen und neue Genkombinationen herbeigeführt werden, die bisher unbekannt und oft auch kaum mit anderen Methoden erreichbar sind. Aus diesem technischen Potenzial von NGTs ergeben sich Fragen bezüglich der Risiken.

Risiken

Die Risiken der NGT-Anwendungen an Nutztieren können sowohl durch die Verfahren selber (ungewollte Effekte) als auch deren Ergebnisse (angestrebte Eigenschaften) verursacht werden. Es können verschiedene Bereiche betroffen sein. Darunter fallen Tierschutz, Tierwohl, Tiergesundheit, Tierzucht, die Umwelt und auch der Verbraucherschutz. Dabei ist zu beachten, dass Tiere im Vergleich zu Pflanzen eine wesentlich geringere Toleranz für neu auftretende Mutationen aufweisen, unabhängig davon, ob diese gewollt oder ungewollt herbeigeführt wurden.

• Tierschutz

Unabhängig davon, welche Ziele bei NGT-Tieren verfolgt werden, sind diese oft mit zusätzlichem Tierversbrauch und oft auch Tierleid verbunden. Gründe dafür sind der Einsatz von Leihmüttern und Klonverfahren, die Geburt von NGT-Tieren mit ungewollten Genveränderungen, epigenetische Störungen oder genetische Mosaikbildungen (unterschiedliche Gewebe weisen unterschiedliche Genvarianten auf). Ein bekanntes Beispiel sind hornlose Rinder, bei denen Fehler im Erbgut übersehen wurden, die durch die NGT-Verfahren verursacht wurden. Dies führte dazu, dass die Tiere getötet werden mussten.

Zudem kann es auch aufgrund der NGT-Effekte zu Schmerzen und Leiden kommen, wenn etwa eine höhere Mast- oder Milchleistung zu starken Belastungen für die Tiere führt und es dadurch zu gesteigerter Krankheitsanfälligkeit oder anderen gesundheitlichen Einschränkungen kommt. Bei NGT-Thunfischen wurde die Übertragung bestimmter Signalreize, die zum Auslösen der Muskelkontraktion benötigt werden, blockiert und so deren Bewegungsfähigkeit eingeschränkt, um diese besser an die industrielle Massentierhaltung in Aquakulturen anzupassen.

• Tiergesundheit

Das Myostatin-Gen ist wohl das häufigste Zielgen beim Einsatz von NGT bei Nutztieren. Dies ist angesichts des hier angestrebten Zuchtmerkmals (übermäßiges Muskelwachstum und erhöhte wirtschaftliche Ausbeute) ein Grund zur Sorge im Hinblick auf die Tiergesundheit. Verschiedene Nebenwirkungen, die relevant für das Tierwohl sind, wie Schwierigkeiten bei der Geburt oder Fehlstellungen des Skeletts, sind dokumentiert. Zudem ist zu beachten, dass das Gen für Myostatin mehrere Stoffwechselkreisläufe beeinflusst. Die dabei möglicherweise auftretenden pleiotropen Wirkungen können von Tierart zu Tierart unterschiedlich sein. Negative gesundheitliche Auswirkungen für die betroffenen NGT-Tiere, die nicht direkt aus dem übermäßigen Muskelwachstum resultieren, sind zu erwarten. Die Blockade des Myostatin-Gens ist nur ein Beispiel für ethisch zweifelhafte NGT-Projekte mit dem Ziel der Leistungssteigerung bei Nutztieren.

• Tierzucht und Landwirtschaft

Durch die Anwendung moderner Züchtungsmethoden (wie künstliche Besamung) kann es sehr rasch zu einer Ausbreitung von Gendefekten in den Zuchtpopulationen kommen. Im Hinblick auf die gewollten und ungewollten NGT-Effekte ist deswegen große Vorsicht geboten, um die Interessen von Tierzucht, Landwirtschaft und Lebensmittelherstellung zu schützen. Ein Beispiel sind NGT-Rinder mit verändertem Haarkleid. Die US-Behörde FDA (Food and Drug Administration) stellte bei NGT-Rindern mit dünnerem Fell (SLICK) fest, dass die hier erzeugte Genvariante nicht mit der bereits bekannten natürlichen Genvariante übereinstimmt und dass es im Erbgut zu ungewollten Veränderungen gekommen war. Trotzdem erteilte die FDA eine Freigabe, weil eine Gefährdung von VerbraucherInnen unwahrscheinlich sei. Das bedeutet aber nach Ansicht von Testbiotech nicht, dass es hier keine Risiken für die Tierzucht gäbe.

• Umwelt

Es besteht das Risiko einer unkontrollierten Ausbreitung von NGT-Tieren (z.B. Fischen) in der Umwelt, die zu einer Gefährdung der natürlichen Populationen führen kann. Weitere Risiken für die Umwelt sind die Verbreitung von speziellen Keimen bspw. über die Ausscheidungen der Tiere. Zudem befördern viele Anwendungen eine deutlich höhere Intensität in der Haltung und damit möglicherweise höheren Belastungen für die Umwelt.

• VerbraucherInnen und Lebensmittelproduktion

Auch hier sind Risiken eingehend zu prüfen: Gentechnischen Eingriffe können die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der von den Tieren gewonnenen Lebensmittel verändern, ggf. auch neue Inhaltsstoffe gebildet werden. NGT-Tiere, die (ungewollt) in ihrer Immunität geschwächt sind, können zu einer vermehrten Übertragung von Pathogenen beitragen. Es besteht das Risiko, dass NGT-Tiere, die bspw. gegen Viren resistent gemacht wurden, zu einem Reservoir für gefährliche Krankheitserreger werden, die beispielsweise durch Anpassung entstehen können.

VerbraucherInnen sehen es möglicherweise kritisch, dass der Konsum bestimmter Produkte ethisch problematische NGT-Anwendungen fördert. Dies kann eine entsprechende Kaufzurückhaltung auslösen. Daraus ergeben sich auch wirtschaftliche Risiken für die ProduzentInnen und die Bewertung

Patente

Im Zeitraum von 2020 bis 2024 wurde pro Jahr eine zunehmende Anzahl von internationalen Patentanträgen auf gentechnisch veränderte Wirbeltiere, die zur Erzeugung von Nahrungsmitteln dienen sollen, registriert. Die meisten betreffen Fische, gefolgt von Geflügel, Schweinen und Wiederkäuern. Die verfolgten Ziele sind die Weiterentwicklung von NGT-Verfahren, die Veränderung der Fortpflanzungsfähigkeit, erhöhte Leistung und Resistenz gegenüber Krankheitserregern. Eine weitere Zunahme derartiger Patentanträge ist zu erwarten. Die in den Patenten beanspruchten Eigenschaften umfassen Tiere mit verstärktem Muskelwachstum, beschleunigter Mast oder auch Fische ohne Zwischenmuskelgräten.

Es steht zu befürchten, dass die wirtschaftlichen Interessen, die hinter diesen Patenten stehen, zu einer erhöhten Anzahl von Tierversuchen bzw. vermehrtem Leiden, Schmerzen und beeinträchtigtem Wohlbefinden der Tiere führt.

Regulierung

Neue Genvarianten, die aus der konventionellen Zucht bisher nicht bekannt sind, müssen eingehend auf gewollte und ungewollte Auswirkungen untersucht werden, um Umwelt, VerbraucherInnen, Lebensmittelherstellung, Landwirtschaft und Züchtung ausreichend zu schützen.

Im Hinblick auf Tierschutz, Tierwohl und Tiergesundheit sollte der Gesetzgeber die Hürden für entsprechende Anwendungen und deren Vermarktung sehr hoch ansetzen. Patente auf die gentechnische Veränderung von Tieren zum Zwecke der Nahrungsmittelerzeugung sind unmissverständlich zu verbieten. Ansonsten droht eine Zunahme von Leid und Schmerzen sowie ein beeinträchtigtes Wohlbefinden der Tiere zugunsten wirtschaftlicher Erwartungen.

1. Einführung

Die Neue Gentechnik (NGT) ermöglicht es, einzelne Basenpaare im Genom zu verändern, Gene zu (de-)aktivieren oder auch größere Genabschnitte einzufügen oder zu entfernen.

Werkzeuge und Verfahren der Neuen Gentechnik

Im Wesentlichen geht es bei NGTs um eine zielgerichtete Veränderung des Erbguts durch Nukleasen (Enzyme, umgangssprachlich Gen-Schere). Nukleasen sind Enzyme, die in der Lage sind, die chemischen Bindungen zwischen einzelnen DNA-Bausteinen (Nukleotide) zu spalten.

Bei NGT kommen also biotechnologische Mutagene zum Einsatz, die Änderungen an bestimmten Stellen im Erbgut ermöglichen. Man spricht deswegen bei der NGT auch von Site-directed Nucleases (SDNs). Im Gegensatz dazu kommen bei der Zufallsmutagenese physikalische und chemische Mutagene zum Einsatz.

1996 wurde erstmals gezeigt, dass Zinkfinger-Nukleasen (ZFN), eine besondere Klasse von Proteinen, in vitro DNA an genau definierten Stellen schneiden können (Nemudry et al., 2014). Die ZFN-basierte Technologie war jedoch kompliziert und teuer, so dass aktiv nach neuen Methoden der Genom-Editierung gesucht wurde (Matsumoto und Nomura, 2023).

Die 2010 bzw. 2012 erstmals beschriebenen Systeme TALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease) und CRISPR/Cas (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated) sind wesentlich kostengünstiger und einfacher zu handhaben – letzteres ist derzeit die bei Tieren am häufigsten eingesetzte Gen-Schere. Seitdem schreitet die Forschung in diesem Bereich sehr schnell voran.

Sehr häufig werden diese Gen-Scheren (Nukleasen) dazu eingesetzt, Gene ‚auszuknocken‘ (SDN-1). Dazu führt die Nuklease zunächst einen Bruch des DNA-Strangs herbei und überlässt es dann den zelleigenen Mechanismen, diesen Schaden zu reparieren. Dabei soll die Wiederherstellung der ursprünglichen Genfunktion durch die Reparaturprozesse in den Zellen jedoch von der Nuklease Cas verhindert werden: Eine Gen-Schere, die dazu ‚programmiert‘ ist, eine bestimmte DNA-Sequenz zu ‚schneiden‘, kann diese nach erfolgreicher Reparatur erneut erkennen und durchtrennen, so dass die Reparatur schließlich fehlerhaft ist und die ursprüngliche Genfunktion verloren geht.

Die Neue Gentechnik kann auch dazu verwendet werden, um gezielt neue Genvarianten (SDN-2) oder zusätzliche Gene (SDN-3) einzufügen.

Regulierung der Neuen Gentechnik in der EU

Gemäß dem Urteil des Europäischen Gerichtshofs (EuGH) vom 25. Juli 2018¹ sind Organismen, die durch Mutagenese erzeugt werden, genetisch modifiziert im Sinne der EU-Richtlinie 2001/18/EG. Der EuGH macht dabei aber einen Unterschied zwischen den neuen (gezielten) Methoden (NGT/Verwendung von Nukleasen) und den alten (ungerichteten) Methoden der Zufallsmutagenese, bei der physikalische oder chemische Mutagene zum Einsatz kommen.²

Nach Ansicht des EuGH liegt bei den NGT-Verfahren, die auf der Verwendung zielgerichteter (biotechnologischer) Mutagene beruhen, keine ausreichende Erfahrung vor. Die Risiken können denen von transgenen Organismen aus der bisherigen Gentechnik entsprechen. Deswegen müssen, nach Ansicht des Gerichts, NGT-Organismen vor dem Inverkehrbringen ein Zulassungsverfahren inkl. Risikoprüfung durchlaufen.

1 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:62018CJ0528>

2 Da die Verfahren der Zufallsmutagenese zwar häufig bei Pflanzen, aber kaum bei Wirbeltieren eingesetzt werden, ist diese Unterscheidung hier weniger relevant.

Diese rechtliche Ausgangssituation ist die Grundlage für die aktuelle Diskussion über die künftige Regulierung der Neuen Gentechnik in der EU: Die EU-Kommission hatte 2023 vorgeschlagen, dass die meisten NGT-Pflanzen denen aus konventioneller Züchtung weitgehend gleichgestellt werden sollen.³

Gleichzeitig ist auch die künftige Regulierung von NGT-Tieren in der Diskussion. Dazu hat die Europäische Lebensmittelbehörde EFSA bereits erste Berichte für eine Risikobewertung veröffentlicht (Van Eenennaam, 2023; EFSA, 2025). Es ist aber noch unklar, ob die EU-Kommission auch hier gesetzliche Änderungen vorschlagen wird.

Erwartungen und mögliche negative Auswirkungen

NGT-Werkzeuge werden von Forschenden als effiziente, billige und somit bessere Methode zur gezielten Veränderung der Eigenschaften von Tieren dargestellt. Sie machen die Manipulation des genetischen Materials einfacher als die bisherigen Gentechnikverfahren oder auch die konventionelle Züchtung (COGEM, 2017).

Dabei ist diese Anwendung auch Gegenstand wirtschaftlicher Erwartungen. Wichtige Ziele sind bspw. die Erhöhung der landwirtschaftlichen Produktion oder die Einsparung von Kosten. Die angestrebten Eigenschaften umfassen unter anderem verbesserte Futtermittelverwertung, höhere Fleisch-, Milch- oder Eierproduktion, Anpassung des Geschlechts an die Produktionsverfahren oder Resistenzen gegen Krankheiten.

Bei der gentechnischen Veränderung von Tieren durch NGT handelt es sich aber um einen komplexen Prozess, bei dem folgende Aspekte aus der Perspektive des Schutzes von Mensch, Tier und Umwelt besonders relevant sind: die Unterschiede zwischen bisheriger Züchtung und NGTs und dadurch bedingte gewollte und ungewollte Effekte, ein erhöhter Tierverbrauch bzw. zusätzliches Tierleid und die Beeinträchtigung des Tierwohls. Dazu kommen Risiken für die Umwelt, die Tierzucht, Landwirtschaft, Lebensmittelherstellung und VerbraucherInnen.

3 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52023PC0411>

2. Technische Grundlagen

Bei der Neuen Gentechnik soll mithilfe von Nukleasen (bspw. Cas9) eine genetische Veränderung in der gewünschten DNA-Sequenz herbeigeführt werden, oft wird zunächst ein Doppelstrangbruch (DSB) erzeugt (Carroll et al., 2017).

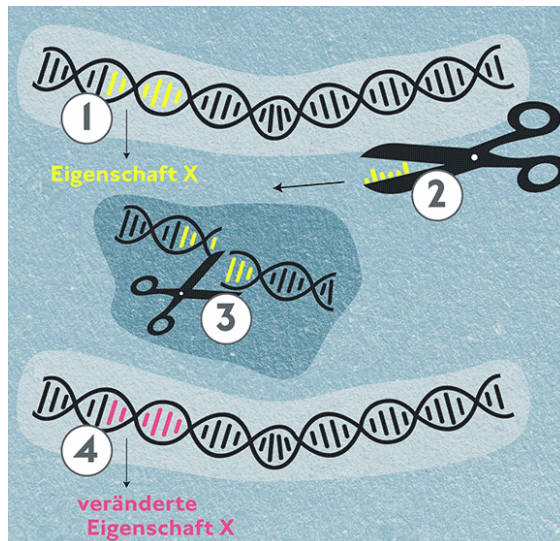


Abb.1: Um bestimmte Eigenschaften beispielsweise von Pflanzen oder Tieren zu verändern, können sogenannte Genschere zum Einsatz kommen. (1) Im ersten Schritt wird eine bestimmte Stelle im Erbgut ausgewählt, die für eine bestimmte Eigenschaft steht. (2) Die Genschere können so programmiert werden, dass sie die jeweilige Stelle im Erbgut suchen und finden. (3) Hat die Genschere die Stelle erreicht, kann sie das Erbgut durchtrennen, es entsteht ein Bruch. Dieser Bruch im Erbgut wird dann von der Zelle erkannt und repariert. (4) Nach der Reparatur ist die jeweilige Stelle verändert, was auch das Ziel des Einsatzes der Genschere ist: Die ursprüngliche Eigenschaft geht verloren oder wird verändert.

Quelle:

<https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/was-ist-eine-genschere-und-wie-arbeitet-sie>

2.1 Anwendungskategorien

Ein DNA-Doppelstrangbruch ist eine schwerwiegende Form der DNA-Beschädigung, bei der beide Stränge der DNA-Doppelhelix durchtrennt werden. Um DSBs zu reparieren, verfügen die Zellen über spezielle Reparaturmechanismen. Ist nur ein Strang der DNA-Doppelhelix betroffen, dient der andere (komplementäre) Strang als Vorlage für die Reparatur. Bei DSBs ist das nicht der Fall, weshalb deren Reparatur wesentlich schwieriger ist.

Eine mögliche Folge von DSBs ist eine fehlerhafte Reparatur, wodurch an der betroffenen Stelle im Genom eine neue Genvariante (Mutation) entsteht. Je nach Ort und Ergebnis der Veränderung kann die biologische Wirkung – gewollt oder ungewollt und von Fall zu Fall – sehr unterschiedliche Auswirkungen haben. Generell gilt, dass die Nuklease nicht nur an einer bestimmten Stelle an der DNA schneidet, sondern auch das Ergebnis des Reparaturprozesses selbst beeinflusst und darauf abzielt, die Herstellung der ursprünglichen Genfunktion zu verhindern.

Allgemein unterscheidet man zwei Arten der DNA-Reparatur:

- **Nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ)**

Bei diesem Mechanismus werden die beiden Enden des gebrochenen DNA-Doppelstrangs ohne die Verwendung einer identischen DNA-Sequenz direkt verbunden. Dies kann zu Deletionen, Inversionen, Insertionen oder anderen Mutationen führen. Dabei beeinflusst die Gen-Schere das Ergebnis der Reparatur, sodass eine Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenz (und somit deren Funktion) durch wiederholtes Schneiden erheblich behindert bzw. unmöglich gemacht wird. Im Ergebnis führt die NHEJ-Reparatur nach dem Einsatz der Gen-Scheren häufig zum Knock-out oder zur Inaktivierung einer Genfunktion.

Wird ein Knock-out, aber keine gezielte Veränderung von Genfunktionen (bzw. die Einführung von neuen Genen) angestrebt, spricht man von einem Site-Directed-Nucleases-1-(SDN-1)-Verfahren.

- **Homologe Rekombination (homology-directed repair, HDR)**

Natürlicherweise tritt HDR u.a. auf, wenn die Zellen die intakte Kopie des identischen DNA-Abschnitts, oft die des Schwesterchromosoms, als Vorlage (Template) verwenden, um den defekten Abschnitt zu ersetzen. Im Rahmen von NGT-Verfahren wird HDR zum Knock-in, also dem Einfügen von zusätzlichen DNA-Sequenzen/Bausteinen verwendet, wobei die Insertionssequenz von den ursprünglichen DNA-Sequenzen flankiert wird. Dadurch soll eine gezielte Insertion zusätzlicher DNA-Sequenzen im Erbgut erreicht werden. Sollen neue Genfunktionen entstehen, können einige wenige Nukleotide (SDN-2) oder ganze Gensequenzen (SDN-3) eingefügt werden. Allerdings sind die Erfolgsraten bei diesen Knock-in-Verfahren bisher oft eher gering.

2.2 Nukleasen

Derzeit gibt es drei Klassen von Nukleasen, die so programmiert werden können, dass sie genetische Veränderungen innerhalb einer bestimmten DNA-Sequenz erzeugen: Zinkfinger-Nukleasen (ZFN), Transkriptionsaktivator-ähnliche Effektor-nukleasen (TALEN) und CRISPR/Cas. Obwohl letztere heute mit Abstand am häufigsten verwendet wird, werden die beiden anderen nach wie vor in der Forschung und bei verschiedenen landwirtschaftlichen und medizinischen Anwendungen eingesetzt.

Zinkfinger-Nukleasen (ZFN)

Zinkfinger-Nukleasen waren eines der ersten Genome-Editing-Werkzeuge, die zur gentechnischen Veränderung von Organismen eingesetzt wurden. Zinkfinger-Nukleasen sind Enzyme, die aus zwei Proteindomänen bestehen: der Zinkfingerdomäne und der Nukleasedomäne. Die Nukleasedomäne ist für das Schneiden der DNA zuständig, während die Zinkfingerdomäne so konstruiert werden kann, dass sie spezifische DNA-Sequenzen erkennt.

Die erste In-vitro-Studie mit ZFN wurde bereits 1996 durchgeführt, 2009 folgte das erste damit veränderte Knock-out-Tier (eine Ratte, Geurts et al., 2009) und 2012 die ersten Knock-out-Schweine (Whyte und sPrather, 2012). Es folgten Knock-out-Rinder sowie Knock-out-Ziegen (Cui et al., 2015; Song et al., 2015; Xiong et al., 2013; vgl. Yuan et al., 2024). ZFN sind zwar sehr spezifisch, aber teuer und aufwendig in der Anwendung.

Transkriptionsaktivator-ähnliche Effektor-nukleasen (TALEN)

TALEN wurden ursprünglich in einem pflanzenpathogenen Bakterium der Gattung *Xanthomonas* entdeckt und bestehen ebenfalls aus zwei Hauptkomponenten: (i) einer DNA-Bindedomäne, die spezifisch an die Ziel-DNA-Sequenz bindet, und (ii) einer Nuklease-Domäne, die für das Schneiden der DNA verantwortlich ist. Die DNA-Bindedomäne von TALEN besteht aus einer Abfolge von modifizierten Proteinen, die als TALE-Wiederholungseinheiten bezeichnet werden. Jede dieser Wiederholungseinheiten bindet an eine bestimmte Basenpaarsequenz in der Ziel-DNA. Durch die Anordnung verschiedener TALE-Wiederholungseinheiten können spezifische DNA-Bindedomänen konstruiert werden, die an die gewünschte Ziel-DNA-Sequenz binden und an dieser Stelle einen DSB erzeugen.

Der Einsatz von TALEN ist sehr effizient, weshalb sie besonders vielversprechend für das Einschleusen einzelner Nukleotid- bzw. Gensequenzen erscheinen, also ganz allgemein für die Erstellung von Knock-in-Tieren – bisher insbesondere bei Rindern (Carlson et al., 2016; Yang and Wu 2018; Yuan et al., 2024). Doch ähnlich wie bei ZFN ist auch bei TALEN die Anwendung aufwendig und teuer, weswegen sich bei der Genomeditierung in den letzten Jahren CRISPR/Cas weitgehend durchgesetzt hat (Wani et al., 2023).

CRISPR/Cas

Der Name CRISPR steht für „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ und bezieht sich auf spezifische DNA-Sequenzen, die in Bakterien gefunden wurden. Dort fungieren sie als eine Art molekularer Gedächtnisspeicher für vorherige Angriffe von Viren (Barrangou et al., 2007).

Das CRISPR/Cas-System besteht (vereinfacht dargestellt) aus der Endonuklease ‚Cas‘ (CRISPR associated) und einer speziellen single guide RNA (sgRNA). Die gRNA erkennt spezifische DNA-Sequenzen und bindet außerdem die Nuklease Cas. Dadurch wird Cas an die gewünschte Stelle im Genom gelenkt und kann dort einen DSB erzeugen. Das CRISPR/Cas System ist heutzutage relativ einfach herzustellen und anzuwenden. TALEN und ZFN basieren hingegen auf einer proteinbasierten Bindung an die DNA, dies macht sie teurer und schwieriger im Umgang.

Varianten von CRISPR/Cas (Base Editing und Prime Editing)

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Varianten der CRISPR/Cas-Methode entwickelt.

Base-Editing (BE) ermöglicht die direkte Konvertierung einer DNA-Sequenz, ohne dass ein DSB in der DNA erforderlich ist. Der Basen-Editor (oder Base Editor) ist ein Fusionsprotein bestehend aus einer RNA-Bindeeinheit (inaktiviertes Cas9) und einer enzymatischen Domäne (Deaminase). Die RNA-Bindeeinheit bindet an die sgRNA der Ziel-DNA-Sequenz, während die enzymatische Domäne die Ziel-DNA-Sequenz verändert. BE ist besonders effektiv bei der ‚Korrektur‘ von Punktmutationen, die bspw. mit genetischen Erkrankungen in Verbindung stehen. Es wird zwischen Cytosin Base Editor (CBE) und Adenin Base Editor (ABE) unterschieden. CBE wandelt gezielt ein Cytosin (C) in Uracil (U) um, das während der DNA-Reparatur in Thymin (T) umgewandelt wird; ABE kann spezifisch Adenin (A) in der DNA in Inosin (I) umwandeln, das dann während der DNA-Replikation wie Guanin (G) behandelt wird. CBE und ABE können ohne die Auslösung von Doppelstrangbrüchen bewirkt werden, trotzdem bestehen auch hier erhebliche Risiken für ungewollte Veränderungen (Grunewald et al., 2019).

BE wurden schon mehrfach für die Genomeditierung (s.u.) im Rahmen der biomedizinischen Forschung angewendet, um viele Gene auf einmal auszuschalten, bspw. bei Schweinen (siehe Wu et al., 2023). Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wollen AnwenderInnen BE-Systeme auch für die gentechnische Veränderung von Eigenschaften wie Fortpflanzung, Milchproduktion und Wollproduktion einsetzen (Yuan et al., 2024). Mittels Base-Editing können keine DNA-Sequenzen eingefügt oder entfernt werden.

Prime-Editing (PE) wurde entwickelt, um im Gegensatz zu BE auch zusätzliche Genabschnitte einfügen zu können und gleichzeitig bestehende Beschränkungen der CRISPR/Cas-Methode zu umgehen (Liu et al., 2020). Prime-Editing verwendet eine spezielle RNA (pegRNA) und ein modifiziertes Cas9-Protein, um präzise DNA-Veränderungen ohne Doppelstrangbrüche durchzuführen. Ähnlich wie Basen-Editoren kombinieren Prime-Editoren eine DNA-Bindeeinheit mit einer enzymatischen Domäne, jedoch verändern sie nicht nur einzelne Basenpaare, sondern können auch neue DNA-Sequenzen einfügen oder ersetzen. Dies erfolgt mithilfe einer speziellen RNA-Schablone, die an die Ziel-DNA-Sequenz bindet und als Vorlage für die Synthese der neuen DNA-Sequenz dient. Der Prime-Editor entfernt die ursprüngliche DNA-Sequenz und ersetzt sie durch die neu synthetisierte Sequenz. Dadurch sind komplexe gentechnische Veränderungen möglich, wie die ‚Korrektur‘ von Mutationen, das Einfügen neuer Sequenzen oder die Veränderung regulatorischer Elemente. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Methoden soll der Einsatz von PE zu weniger unerwünschten Effekten führen, allerdings ist die Effizienz bzw. sind die Erfolgsraten bisher noch relativ gering (Zhou et al., 2023).

3. NGT-Anwendungen an Wirbeltieren

Die NGT-Verfahren können jeweils angepasst werden, in Abhängigkeit davon, ob es sich um Säugetiere, Fische oder Vögel handelt. Um eine Population von NGT-Tieren mit den erwünschten Eigenschaften zu erhalten, müssen mehrere Schritte durchgeführt werden.

3.1 Anwendungen an Versuchstieren

Mäuse und Ratten sind die am häufigsten verwendeten Versuchstiere und werden auch oft gentechnisch verändert. Bei diesen Tierarten konnten Zellkulturen mit embryonalen Stammzellen etabliert werden. Damit hat man die Möglichkeit, viele Zellen gleichzeitig gentechnisch zu verändern und noch im Labor nach gewünschten Veränderungen zu selektieren. Die selektierten Zellen werden dann in Embryonen übertragen und sind dort an der Bildung der unterschiedlichen Organe beteiligt. Nachteile, die insbesondere mit Klonverfahren wie bspw. dem ‚somatic cell nuclear transfer‘ (SCNT) einhergehen, können so vermieden werden. Allerdings kommt es dabei oft zu genetischen Mosaiken, d.h. die gewünschte gentechnische Veränderung tritt nur in bestimmten Geweben auf. Erst durch die Züchtung weiterer Generationen kann sich das gentechnisch veränderte Merkmal evtl. in allen Zellen durchsetzen.

Der Einsatz von embryonalen Stammzellen zusammen mit der Erfindung der Gen-Schere CRISPR/Cas hat dazu geführt, dass die Zeiträume zur Erstellung gentechnisch veränderter Versuchstiere insgesamt wesentlich verkürzt und die Kosten gesenkt wurden. Gleichzeitig hat sich aber die Anzahl der Tierversuche erhöht. Während die Schaffung einer gentechnisch veränderten Linie bei Mäusen (Knock-out) mithilfe der ‚alten‘ Gentechnik etwa innerhalb eines Jahres möglich war, benötigen die NGT-Verfahren nur noch wenige Wochen (EGE, 2021). Infolge der Einführung der Neuen Gentechnik hat sich nicht nur die Anzahl der ‚verbrauchten‘ Versuchstiere erhöht, sondern auch das Spektrum der betroffenen Tierarten erweitert.

3.2 Anwendungen an großen Nutztieren

Aus Schweinen, Rindern und Schafen konnten zwar pluripotente Stammzellen isoliert werden, die Erstellung von geeigneten Embryonen aus diesen Zellen bleibt aber eine Herausforderung (Ledesma and Van Eenennaam, 2024). Unter anderem deswegen ist die Anwendung der Neuen Gentechnik bei sogenannten ‚Großtieren‘ (large animals), d.h. Schweinen, Rindern, Schafen und Ziegen, aufwendiger, komplexer und weniger effizient als bei kleinen Versuchstieren wie Mäusen und Ratten.

Bei Nutztieren werden in der Regel die Keimzellen verändert, um die gentechnische Veränderung vererbbar zu machen. Zur Transformation werden oft die befruchteten Eizellen (Zygoten), frühe Embryonen (Blastozysten) oder auch (primordiale) Keimzellen (Spermien und Eizellen) verwendet. Dabei sind, in Abhängigkeit vom Verfahren, auch oft nachträglich mehrere Züchtungsschritte nötig, um die neuen Merkmale stabil vererbbar zu machen. Ein Grund dafür ist die bereits erwähnte genetische Mosaikbildung (Mehravar et al., 2019).

Andere Möglichkeiten bieten Zellkulturen aus Körperzellen (somatische Zellen), aus denen dann die Zellkerne isoliert und in Eizellen übertragen werden. Diese Klonverfahren (somatic cell nuclear transfer, SCNT), die bspw. durch das Klonschaf Dolly bekannt wurden, werden auch heute noch bei NGT-Verfahren eingesetzt. Weil es dabei aber oft zu Fehlern in der Regulierung von Genen (Epigenetik) kommt, gehen diese Klonverfahren oft mit hohen Tierverlusten einher (EFSA, 2008). Der Vorteil ist, dass sehr viele Zellen auf einmal gentechnisch verändert und der Erfolg der Veränderung überprüft werden kann, bevor weitere Schritte unternommen werden.

Bei all diesen Anwendungen erfolgen die ersten Schritte im Labor. Danach werden die gentechnisch veränderten Embryonen auf Leihmütter übertragen.

Ein spezielles Verfahren zur Erstellung von NGT-Populationen ist der Einsatz von sterilen (oft männlichen) Elterntieren, bei denen die natürlichen Keimzellen (oft Spermazellen) durch gentechnisch veränderte Keimzellen ersetzt werden (Mueller et al., 2023). Die Nachfahren dieser Tiere tragen dann nicht die ursprünglichen Eigenschaften des Elterntieres, sondern die der Gentechnik-Keimzellen. Das Verfahren kann gleichermaßen bei Säugetieren, Vögeln und Fischen eingesetzt werden. Durch nachfolgende Kreuzung und Selektion können Tiere gezüchtet werden, bei denen die gentechnischen Veränderungen reinerbig vorhanden sind (Giasetti et al., 2019; Zhao et al., 2021).

3.3 Besonderheiten bei Fischen und Vögeln

Einen Sonderfall stellen Fische und Vögel dar: Bei Fischen erfolgt die Befruchtung der Eier und die Entwicklung der Embryonen außerhalb des Körpers. Diese Gelege werden zur gentechnischen Veränderung genutzt, die Embryonen müssen nicht in Leihmütter übertragen werden und die Selektion der erfolgreich veränderten Tiere kann direkt nach dem Schlüpfen erfolgen.

Typischerweise sind die erzeugten NGT-Fische aber oft nur in einzelnen Organen gentechnisch verändert (genetische Mosaikbildung), sie weisen zudem häufig ungewollte genetische Veränderungen und Off-Target-Mutationen auf (Blix et al., 2021; Ferdous et al., 2022). Durch nachfolgende Kreuzung und Selektion werden dann NGT-Tiere gezüchtet, die möglichst nur die gewünschten gentechnischen Veränderungen aufweisen. Eine weitere Besonderheit ist dabei, dass Fische oft mehrere Chromosomensätze haben, was eine zusätzliche Komplikation bei der Auswahl der geeigneten Zuchttiere darstellen kann.

Bei Vögeln wird meist nicht die Zygote (befruchtete Eizelle) direkt, sondern die Vorläufer der Keimzellen (primordiale Keimzellen) verändert (Ichikawa et al., 2022; Mitchell et al., 2023). Diese werden im Labor kultiviert, gentechnisch verändert und anschließend in das befruchtete Ei (den sich entwickelnden Embryo) übertragen in dem sie sich zu gentechnisch veränderten Keimzellen (Sperma oder Eizellen) entwickeln sollen. Zudem werden bei Hühnern zusätzliche Methoden wie spezielle Verfahren der in-vitro-Fertilisation (Mizushima et al., 2023) oder gentechnisch verändertes Sperma eingesetzt (Cooper et al., 2017; Mizushima et al., 2021 und 2023).

3.4 Mehrstufige Verfahren beim Einsatz der Neuen Gentechnik

Für die gentechnische Veränderung von Nutztieren mit NGT-Methoden sind mehrere Zwischenschritte erforderlich.

1. Die Einbringung der Nuklease in die Zellen

Es gibt unterschiedliche Verfahren, die sich nicht nur technisch, sondern auch im Hinblick auf Kosten, Effizienz und Zielgenauigkeit voneinander unterscheiden.

Die Übertragung erfolgt in Form von Plasmiden (die dann die Nuklease in den Zellen produzieren), Proteinen oder RNA. Zudem können Retroviren (Lentiviren oder Adenoviren) als ‚Vektoren‘ eingesetzt werden, um die Nuklease einzuschleusen.

In der Regel ist es dabei nicht notwendig, dass die Gene für die Produktion der Nuklease in das Erbgut der Zielorganismen inseriert werden. Allerdings kommt es bei der Verwendung von Lentiviren zu einer

Integration in das Erbgut der Tiere und einer dauerhaften Expression der Nukleasegene. Dies erhöht u.a. das Risiko für unerwünschte Off-Target-Effekte (Dong and Kantor 2021).

Werden keine viralen Vektoren verwendet, können die Nukleasen (bzw. deren Vorstufen) per Mikroinjektion oder Elektroporation eingeführt werden. Bei der Elektroporation werden die Zielzellen einem elektrischen Feld ausgesetzt, um die Durchlässigkeit der Zellmembranen zu erhöhen (Miao et al., 2019; Gim et al., 2023).

Die Mikroinjektion ist wie die Elektroporation ein Verfahren, das auch schon bei der ‚alten‘ Gentechnik eingesetzt wurde. Hier werden mit Hilfe einer Kanüle die jeweiligen Bestandteile der Nukleasen in die befruchtete Eizelle injiziert. Die Effizienz dieses Verfahrens ist sehr unterschiedlich, oft aber nur gering.

Bei den Verfahren der Mikroinjektion und Elektroporation treten ebenfalls häufig genetische Mosaik auf (Mianné et al., 2017; Lamas-Toranzo et al., 2018; Gim and Jang 2024).

2. Die Gewinnung von NGT-Tieren

Werden Keimzellen oder Zygoten gentechnisch verändert, können die resultierenden NGT Blastozysten (frühe Embryonen) für kurze Zeit im Labor kultiviert werden, um die ersten Zellteilungen zu beobachten. Danach werden die NGT Embryonen in Leihmütter übertragen. Das gleiche gilt für NGT Embryonen, die aus Klonverfahren (somatic cell nuclear transfer (SCNT) hervorgehen, auch diese NGT Embryonen werden auf Leihmütter übertragen.

Um die gentechnischen Veränderungen stabil in einer Zuchtpopulation zu verankern/etablieren, sind oft weitere züchterische Schritte zur Auswahl von Zuchttieren, Vermeidung von genetischer Mosaik-Bildung, Erzielung von Homozygotie (Reinerbigkeit) und zum Ausschluss gesundheitlicher Beeinträchtigungen bzw. sonstiger unerwünschter Nebenwirkungen notwendig.

4. Unterschiede zur konventionellen Züchtung

Mit der Neuen Gentechnik können bei Wirbeltieren genetische Veränderungen erreicht werden, die über das hinausgehen, was bisher im Rahmen der konventionellen Zucht möglich bzw. zu erwarten ist. Die Häufigkeit der bei Wirbeltieren auftretenden Rekombinationen („Crossing-over“) bzw. auftretenden Mutationen sind im Erbgut sehr ungleich verteilt, was die Ergebnisse der konventionellen Züchtung stark limitiert. Die Mechanismen, die das Auftreten von neuen Genvarianten begrenzen, können als eine Barriere der Zellen vor krankmachenden Mutationen interpretiert werden. Da NGTs dazu in der Lage sind, diese Barrieren zumindest teilweise zu überwinden, ergeben sich Fragen bezüglich spezifischer Risiken.

4.1 Merkmale konventioneller Zucht

Eigenschaften, die sich züchterisch nutzen lassen, ergeben sich bei der konventionellen Zucht von Wirbeltieren vor allem aus den Vorgängen von Kreuzung und Selektion. Die zugrundeliegenden molekulargenetischen Prozesse, die zu neuen Kombinationen von Genen führen, finden nach der Befruchtung der Eizellen und den nachfolgenden Zellteilungen statt und werden „Crossing-over“ genannt. Dabei wird die genetische Information aus den Chromosomen der Elterntiere neu kombiniert. Im Rahmen des Crossing-over kommt es zu Doppelstrangbrüchen der Chromosomen und einer Neukombination von Abschnitten aus homologen Chromosomen.

Die Häufigkeit der Rekombinationen zwischen den Chromosomen der Elterntiere sind im Erbgut sehr ungleich verteilt, was die Ergebnisse der konventionellen Züchtung limitiert. Regionen, in denen häufig Rekombinationsereignisse beobachtet werden, gelten als „Hotspots“ für Crossing-over, während andere Regionen des Genoms über viele Generationen gemeinsam und unverändert vererbt werden (Paigen & Petkov, 2010; Mackiewicz et al., 2013; Ma et al., 2015; Smeds et al., 2016). So unterliegen bspw. einige DNA-Regionen mit vielen repetitiven Sequenzen oft nur einer geringen Rekombinationsrate. Dazu zählen Zentromere, Telomere, ribosomale RNA und Sequenzen für Transfer-RNA (Chen et al., 2008; Termolino et al., 2016).

Komplexe Prozesse während der Meiose können dafür sorgen, dass ein Crossing-over verhindert bzw. revidiert wird und so zu einem Non-Crossing-over (NCO)-Ereignis wird (Lorenz et al., 2012; Capilla et al., 2016).

Beim Crossing-over werden die bereits existierenden Allele kombiniert, es entstehen aber in der Regel keine neuen Allele. Treten während der Zellteilung (oder auch sonst) spontane Mutationen auf, können diese oft von den Zellen so repariert werden, dass die ursprüngliche Genfunktion erhalten bleibt. Dies gilt insbesondere für Genabschnitte mit aktiver Transkription (Supek et al., 2015; Huang et al., 2018).

Der Schutz des Genoms vor zufälligen Mutationen ist bei Säugetieren extrem wichtig, da diese eine wesentlich geringere Toleranz gegenüber spontanen Mutationen haben als Pflanzen. Kleine Veränderungen können hier schwere Krankheiten wie Krebs auslösen (siehe bspw. Pilzecker et al., 2019).

Deswegen spielen Verfahren zur Auslösung von Zufallsmutationen (ungerichteten Mutationen), die bei Pflanzen wichtige Instrumente zu Erhöhung der genetischen Vielfalt sind, bei der Zucht von Wirbeltieren nur eine untergeordnete Rolle. Das bedeutet auch, dass die Einführung von neuen Genvarianten im Bereich der konventionellen Tierzucht deutlich schwieriger ist als in der Pflanzenzucht, da im Rahmen von Kreuzung und Selektion vor allem die bereits vorhandene Allele miteinander kombiniert werden.

4.2 Merkmale der NGT-Verfahren

Im Vergleich zur konventionellen Züchtung kann die neue Gentechnik das Erbgut in viel größerem Umfang für Veränderungen verfügbar machen als die bisherige Züchtung (Kawall, 2019). Mithilfe der Neuen Gentechnik ist es möglich, Mutationen und neue Genkombinationen herbeizuführen, die bisher unbekannt und auch kaum mit anderen Methoden zu erreichen sind.

Bei NGT-Pflanzen sind verschiedene ExpertInnen der Ansicht, dass gerade die Methoden der ungerichteten Mutagenese eine große Ähnlichkeit zu den NGT-Verfahren hätten (siehe z.B. EFSA, 2020; EFSA, 2022), wobei andere ExpertInnen zu differenzierteren Ergebnissen gelangen (so Kawall, 2019; Eckerstorfer et al., 2019; Kawall, 2021; Testbiotech, 2022; Bohle et al., 2023; Koller & Cieslak, 2023; Eckerstorfer & Heissenberger, 2023; ANSES, 2023; ANSES, 2024). Derartige Vergleiche sind bei NGT-Tieren noch schwieriger durchzuführen, da in der Tierzucht der Einsatz der Zufallsmutagenese (ungerichteten Mutagenese) keine bedeutende Rolle spielt. In der Folge sind die Unterschiede zur konventionellen Zucht eher noch deutlicher als bei NGT-Pflanzen.

Mithilfe der NGT-Verfahren können viele neue Genvarianten (Mutationen) und neue Genkombinationen herbeigeführt werden, die bisher im Genpool der Züchtung nicht vorhanden sind und deren Entstehung ansonsten u.a. durch Reparaturprozesse verhindert werden könnte. Dies zeigt sich auch darin, dass eine höhere Anzahl an Mutationen bspw. dann auftreten kann, wenn die natürlichen Reparaturmechanismen gestört sind (Haapaniemi et al., 2018).

In Abhängigkeit von der Genfunktion und der sich ergebenden Genkombination können NGT-Genvarianten ähnliche Effekte und Risiken auslösen wie die Übertragung von Genen aus anderen Arten. Aufgrund des technischen Potentials der Gen-Schere können diese Veränderungen auch wesentlich komplexer sein als bei bisherigen Anwendungen der Gentechnik (siehe z.B. Han et al., 2023).

Ein Beispiel für NGT-Merkmale, die über das hinausgehen, was aus der konventionellen Zucht bekannt ist, sind karpfenartige Fische ohne Zwischenmuskelgräten. Es wurde bereits mit konventioneller Zucht versucht, die Anzahl dieser Gräten zu reduzieren, was allerdings nur teilweise erfolgreich war. Erst mit den Verfahren der Neuen Gentechnik gelang es, die Bildung von intermuskulären Gräten vollständig zu verhindern. Dabei veränderten sich auch die Inhaltsstoffe in den Muskeln (Kuang et al., 2023).

Vor diesem Hintergrund ist es unerlässlich, Genvarianten, die bei NGT-Tieren erzeugt werden, eingehend auf beabsichtigte und unbeabsichtigte Effekte zu untersuchen. Dabei sind die Risiken für die Tiergesundheit und das Tierwohl, für die Sicherheit der Lebensmittel, die Übertragbarkeit von Pathogenen (z.B. durch Veränderungen des Immunsystems), die Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelverträglichkeit zu berücksichtigen. Auch Risiken für die weitere Züchtung sind einzubeziehen, bevor ein neuer Genotyp in die Zuchtpopulationen Eingang finden kann (s.u.).

In diesem Zusammenhang müssen pleiotrope Effekte (hier beeinflusst ein Gen mehrere Merkmale) besonders beachtet werden, wie sie bspw. auch im Rahmen genetischer Veränderungen an menschlichen Embryonen diskutiert werden (Regalado, 2024; Bian et al., 2024; Mackay & Anholt, 2024). Eine Suche in der STRING-Datenbank, die einen Überblick über (in-)direkte Protein-Interaktionen gewährt, ergibt zum Beispiel für das bei NGT-Tieren häufig angesteuerte Zielgen Myostatin zahlreiche Interaktionspartner, die in verschiedene Stoffwechselwege involviert sind. Diese multiplen Interaktionen können bei NGT-Eingriffen zu unerwünschten pleiotropen Effekten führen (s.u.).

Zudem gibt es spezifische Risiken, die durch die Besonderheiten der NGT-Verfahren bedingt sind. Die Art und Weise, wie DSBs per Neuer Gentechnik herbeigeführt und von den Zellen repariert werden, kann sich

deutlich von den Prozessen unterscheiden, die natürlicherweise (in den Zellen) auftreten. So kann die Gen-Schere CRISPR/Cas die Reparaturprozesse verzögern oder die Zielregion mehrfach durchtrennen (z. B. nach erfolgreicher Reparatur), so dass die ursprüngliche Funktion des Zielgens mit hoher Wahrscheinlichkeit verloren geht (Brinkmann et al., 2018; Zuccaro, 2020).

Durch die Verzögerung oder Störung von Reparaturmechanismen der herbeigeführten DSBs wird das Auftreten chaotischer chromosomaler Prozesse befördert (Cullot et al., 2024), wie z.B. Chromothripsis (de Groot et al., 2023), die zu schwerwiegenden Gesundheitsproblemen führen können (Ledford, 2020; Leibowitz et al., 2021; Amendola et al., 2022; Lazar et al., 2024). Wegen solchen ‚katastrophischen‘ DNA-Veränderungen, die auch als ‚CRISPRthripsis‘ bezeichnet werden, gibt es schwerwiegende Bedenken in Bezug auf mögliche klinische Anwendungen von CRISPR/Cas9 (Amendola et al., 2022). Ähnliche Effekte wie Veränderungen großer Genbereiche, einschließlich Deletionen, Insertionen und komplexe Umlagerungen, werden auch in Zusammenhang mit dem Einsatz von CRISPR/Cas an menschlichen Zellen beschrieben (Park et al., 2022; Hunt et al., 2023; Bi et al., 2025).

Dabei können bspw. unerwünschte Insertionen von Genabschnitten in den Zielregionen auch über längere Zeit unentdeckt bleiben (Norris et al., 2020). Gleiches gilt für genetische Veränderungen, die ‚off-target‘, also weit vom Zielort entfernt sind. Geeignete Nachweismethoden müssen deswegen das gesamte Genom berücksichtigen (siehe z.B. Redel et al., 2024; Lazar et al., 2024; Bi et al., 2025; Lorenzini et al., 2025).

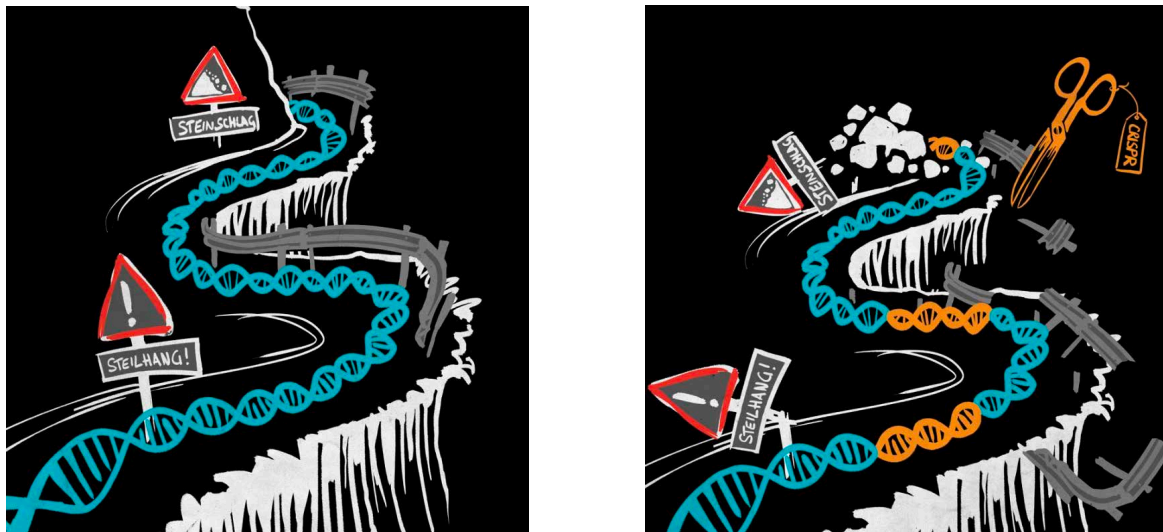


Abb. 2: Zellen sind mit Reparatur- und Kontrollmechanismen ausgestattet, die Veränderungen im Genom beeinflussen können. Diese ‚Leitplanken‘ sind wichtig für die genetische Stabilität der Arten und deren weitere Entwicklung. Mithilfe der Gen-Schere CRISPR/Cas können zusätzliche Gensequenzen eingefügt oder auch wichtige Genfunktionen blockiert werden. Dabei können Reparaturprozesse und Sicherheitsmechanismen in den Zellen umgangen werden. So können auch Eigenschaften verändert werden, die sich durch Züchtung kaum beeinflussen lassen. Deswegen müssen diese gentechnisch veränderten Pflanzen und Tiere eingehend auf Risiken untersucht werden.

5. Risiken für landwirtschaftlich genutzte Wirbeltiere

Viele Ergebnisse aus der medizinischen Forschung (wie z.B. CRISPR/Cas-Anwendungen an menschlichen Zellen) sind auch für NGT-Tiere relevant. Im Allgemeinen wird Fragen nach den Risiken im Bereich der Humanmedizin wesentlich größere Aufmerksamkeit gewidmet. Die wesentlichen Unterschiede liegen dabei weniger in den zugrundeliegenden molekularbiologischen Vorgängen und gesundheitlichen Risiken als im Bereich der Ethik: Das Verhindern von Erkrankungen bei Menschen erfordert eine größere Sorgfalt, während das Risiko für Erkrankungen sehr ähnlich sein kann. Ein weiterer Unterschied liegt in der Lebensdauer von Tier und Mensch. Insbesondere bei Nutztieren entspricht diese in der Regel nicht der natürlichen Lebensspanne, sondern wird von wirtschaftlichen Interessen bestimmt. Damit kann sich die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Krankheiten bei Nutztieren verringern.

Es gibt jedoch auch Gründe, möglichen gesundheitlichen Risiken für NGT-Tieren erhöhte Aufmerksamkeit zu widmen: Während sich Gentherapien beim Menschen auf somatische Zellen beschränken, Eingriffe in die Keimbahn bisher aber mehr oder weniger tabu sind, ist in der Tierzucht meist die Vererbbarkeit von NGT-Merkmalen das Ziel. Durch die modernen Züchtungsverfahren (wie künstliche Besamung) können sich mögliche Gendefekte sehr schnell in den Zuchtpopulationen ausbreiten und ggf. akkumulieren, was erhebliche Risiken für die Zucht, die Lebensmittelsicherheit, die Tiergesundheit und die Umwelt bedeutet.

5.1 Die technische Entwicklung und ihre Bedeutung für die Risikobewertung

Laut Ledesma & van Eenennaam (2024) lieferte eine Literaturrecherche über 200 Publikationen zu NGT-Anwendungen bei landwirtschaftlich genutzten Tieren (inklusive Insekten). Am häufigsten wurde die Gen-Schere CRISPR/Cas verwendet, Ziel war v.a. der Knock-out von Genen (SDN-1). Fische (mit der höchsten Anzahl an Publikationen) und Wiederkäuer (Rinder, Schafe, Ziegen) waren mit jeweils über 60 Publikationen vertreten, Schweine mit rund 60, Hühner mit unter 20, Insekten kamen auf 7. Die Ziele, die dabei verfolgt wurden, betrafen zu 32% höhere ‚Erträge‘, 21% die Fortpflanzung (wie herbeigeführte Sterilität), und 17% Krankheitsresistenzen. Die meisten Publikationen stammten aus China.

Bereits von den Behörden freigegeben sind demnach: i) rascher zunehmende Fische in Japan, Argentinien und Brasilien, ii) Rinder mit dünnerem Fell oder stärkerem Muskelansatz in Argentinien, Brasilien und den USA sowie iii) virusresistente Schweine in Brasilien und Kolumbien (Ledesma & van Eenennaam, 2024).

Obwohl bisher also relativ wenige NGT-Tiere auf den Markt gelangt sind, zeigt die hohe Anzahl von Publikationen doch ein erhebliches Interesse an deren Entwicklung. Dieses Interesse spiegelt sich auch in einer wachsenden Anzahl von Patentanträgen (s.u.). Angesichts der vielfältigen wirtschaftlichen Interessen an der Entwicklung von NGT-Tieren und der erheblichen technischen Dynamik müssen Risiken für Mensch, Tier und Umwelt besonders berücksichtigt werden.

Es ist zu erwarten, dass sich durch die weitere Entwicklung der Methoden sowohl die Anzahl als auch die Komplexität der gentechnischen Eingriffe in naher Zukunft deutlich erhöhen wird. Dabei können sich Synergien zwischen komplexen medizinischen Anwendungen (wie der Entwicklung von Schweinen zur Xenotransplantation) und denen an landwirtschaftlichen Nutztieren ergeben (Fischer & Schnieke, 2023).

Derzeit werden sowohl neue Varianten der Gen-Scheren (siehe z.B. Hu et al., 2025) als auch neue NGT-Verfahren und neue Methoden zur Einführung der Gen-Scheren in die Zellen entwickelt (Liu et al., 2025). Die Ergebnisse der NGT-Verfahren unterscheiden sich tendenziell immer weiter von den Eigenschaften, die aus der konventionellen Zucht bekannt sind. Damit steigen auch die Anforderungen an die Risikobewertung.

Ein Feld, in dem viele neue Anwendungen zu erwarten sind, stellt die Erforschung und Veränderung von DNA-Abschnitten dar, die an der Regulation der Genaktivität beteiligt sind. Diese ermöglichen tiefe und vielseitige Eingriffe in die Eigenschaften von Tieren. Hier ist bereits zu erkennen, dass auch künstliche Intelligenz (KI) eine immer größere Rolle spielt, wodurch die Entwicklung erheblich beschleunigt wird (Gosai et al., 2024; Appleton et al., 2024). Mehrere Publikationen zeigen, dass sich hier neue Eingriffsmöglichkeiten ergeben werden, die in ihrer Komplexität und den resultierenden Eigenschaften auch neue Herausforderungen für die Risikobewertung bedeuten (siehe z.B. Han et al., 2023; DaSilva et al., 2024; Lau & Suh 2018).

Auch Verfahren zum sog. Multiplexing könnten in Zukunft noch mehr an Bedeutung gewinnen. Unter Multiplexing versteht man die gleichzeitige Veränderung mehrerer Gene. Diese können nur ein einzelnes, aber auch unterschiedliche Merkmale betreffen. Die Methode wurde bereits bei Schweinen (Xu et al., 2020; Song et al., 2022; Navarro-Serna et al., 2024), Ziegen (Zhang et al., 2018) und Rindern (Ren et al., 2023; Gim et al., 2023) eingesetzt. Derzeit arbeitet die Firma Acelligen mit Unterstützung durch die Gates-Stiftung an afrikanischen Rindern, bei denen mehrere Gene gleichzeitig verändert werden sollen, die Hitzetoleranz, Körperbau, Milchleistung und Krankheitsresistenzen betreffen (Sonstegard, et al., 2025). Multiplexing soll auch zur gentechnischen Veränderung von Elefanten eingesetzt werden, um deren Erscheinungsbild dem des Wollmammuts anzugleichen (DeFrancesco et al., 2021).

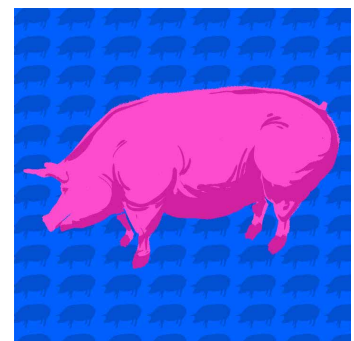
5.2 Relevante Bereiche für die Risikobewertung

Risiken von NGT an Nutztieren können sowohl durch die Verfahren (ungewollte Effekte) als auch durch deren Ergebnisse (angestrebte Eigenschaften) verursacht werden. Es können verschiedene Bereiche betroffen sein. Darunter fallen Tierschutz, Tierzucht, Tiergesundheit, Umwelt und auch VerbraucherInnenschutz.

• Anzahl der Tierversuche und Tierverluste

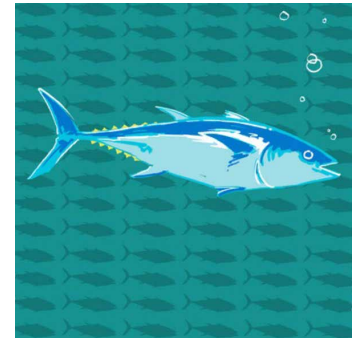
Unabhängig davon, welche Verfahren bei NGT-Tieren zum Einsatz kommen, sind diese oft mit zusätzlichem Tierversuch und erheblichem Tierleid verbunden. Am deutlichsten ist das bei Säugetieren. Hier sind für die Etablierung der ‚Founder-Generation‘ (d.h. der ersten Generation von NGT-Tieren, die dann für die weitere Zucht verwendet werden) erhebliche Tierverluste unvermeidbar. Zu den Gründen zählen der Einsatz von Leihmüttern, Klonverfahren, die Geburt von NGT-Tieren mit ungewollten Genveränderungen, epigenetischen Störungen oder genetischer Mosaikbildung. Aber auch bei Fischen und Geflügel sind oft zahlreiche Auswahlprozesse mit hohem Tierversuch auf dem Weg zur ‚Founder-Generation‘ nötig.

Beispiele mit einem hohen Tierversuch für die Etablierung einer ‚Founder-Generation‘ sind Schweine mit starker Bemuskelung (Wang et al., 2015), Rinder mit dünnem Fell (Rodriguez-Villamil et al., 2021) oder auch Rinder ohne Hörner (Carlson et al., 2016). Bei den hornlosen Rindern stellte sich zudem erst nachträglich heraus, dass es zu einer ungewollten Übertragung bakterieller Gene gekommen war (Norris et al., 2020), weswegen die Tiere inklusive ihrer Nachkommen getötet werden mussten.



• Weitere Tierschutzprobleme

Durch die NGT-Eingriffe kann es zu erheblichen Einschränkungen des Wohlbefindens von Tieren kommen, wenn etwa eine höhere Mast- oder Milchleistung zu starken Belastungen für den Organismus führt und es dadurch zu gesteigerter Krankheitsanfälligkeit oder anderen gesundheitlichen Einschränkungen kommt. Beispiele für derartige absichtlich erzeugte Eigenschaften sind Fische mit (zu) starkem Muskelwachstum (Kishimoto et al., 2018) oder mit Diabetes-ähnlichen Symptomen (Kishimoto et al., 2019), die in Japan bereits zur Vermarktung freigegeben wurden.



Die Zusammenhänge zwischen erhöhter Leistung in der Tierhaltung und Tierschutzproblemen sind bereits aus der konventionellen Zucht bekannt. Bereits 1992 wurde ein Gedankenexperiment vorgeschlagen, Hühner per Gentechnik so zu verändern, dass ihnen jegliche Außenwahrnehmung (sehen, hören, Schmerz empfinden) fehlt. Das Ziel: diese Tiere ohne Tierschutzbedenken zur Produktion von Fleisch und Eiern einzusetzen (Comstock, 1992).

Ähnliche Ideen werden im Rahmen der Neuen Gentechnik auch für Versuchstiere (Minnet et al., 2015) und landwirtschaftliche Nutztiere (Shriver & McConnachie, 2018) diskutiert. Diese Überlegungen haben offensichtlich weit mehr mit wirtschaftlichen Interessen zu tun als mit echtem Interesse am Tierwohl: Tiere, die keine Hörner haben, einen reduzierten Bewegungsdrang zeigen, eine verminderte Außenwahrnehmung haben oder auch gegenüber bestimmten Krankheiten resistenter sind, können auch unter schlechten Haltungsbedingungen noch eine hohe Leistung erbringen.

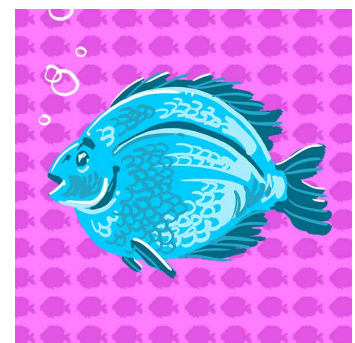
Ein aktuelles Beispiel für diesen ethisch zweifelhaften Ansatz sind NGT-Thunfische. Thunfische reagieren auf bestimmte Reize reflexartig mit schnellem Fluchtverhalten. Diese natürlichen Reflexe führen in Aquakulturen zu hohen Sterblichkeitsraten, da die jungen Thunfische mit sehr hohen Geschwindigkeiten gegen die Wände der Tanks prallen, in denen sie großgezogen werden. Um die Thunfische besser an die industrielle Massentierhaltung in Aquakulturen anzupassen, wurde die Übertragung bestimmter Signalreize, die zum Auslösen der Muskelkontraktion benötigt werden, blockiert. Dadurch wird das Reaktionsvermögen gestört und die NGT-Thunfische zeigen ein langsames Fluchtverhalten (Higuchi et al., 2019).

• Tiergesundheit

Ein häufig genanntes Ziel für NGT-Verfahren ist die Blockade des Gens für Myostatin. Dieses Gen reguliert u.a. das Muskelwachstum. Die Blockade der Genfunktion führt zu übermäßigem Muskelwachstum, was im Hinblick auf die wirtschaftliche Verwertung als positiv angesehen wird – aber mit erheblichen Folgen für die Tiergesundheit einhergehen kann.

Ursprünglich wurde der Gendefekt bei einer Rinderrasse beschrieben, bei der das übermäßig erhöhte Muskelwachstum zu Schwierigkeiten bei der Geburt führt (Grobert et al., 1997). Das Myostatin-Gen kommt bei allen Wirbeltierarten (auch beim Menschen) vor und gilt deswegen als hoch konserviert.

Mäuse, bei denen per Gentechnik das Myostatin-Gen ausgeschaltet wurde, zeigten eine Zunahme der Skelettmuskulatur um 200-300 Prozent, was sowohl mit einer erhöhten Zellzahl (Hyperplasie) als auch einem übermäßigem Wachstum der Muskelzellen (Hypertrophie) einherging (McPherron et al., 1997).



Versuche, die Funktion von Myostatin mit Neuer Gentechnik auszuknocken oder zu beeinflussen, wurden an Rindern (Luo et al., 2014; Proudfoot et al., 2015; Gim et al., 2022; Luo et al., 2025), Büffeln (Dua et al., 2023), Schafen (Han et al., 2014; Crispo et al., 2015; Wang et al., 2016; Kalds et al., 2022; Zhou et al., 2022), Ziegen (Ni et al., 2014; Guo et al., 2016; Yu et al., 2016; Wang et al., 2017; Wang et al., 2018; He et al., 2018; Zhang et al., 2019; Kalds et al., 2022), Schweinen (Wang et al., 2015; Rao et al., 2016; Wang et al., 2017), Kaninchen (Guo et al., 2016; Zhang et al., 2019; Zheng et al., 2022), Fischen (Dong et al., 2014; Zhong et al., 2016; Kahlil et al., 2017; Kishimoto et al., 2018; Liu et al., 2020; Zhang et al., 2023), Geflügel (Kim et al., 2020; Lee et al., 2024), Pferden (Moro et al., 2020) und Hunden (Regalado, 2015) durchgeführt.

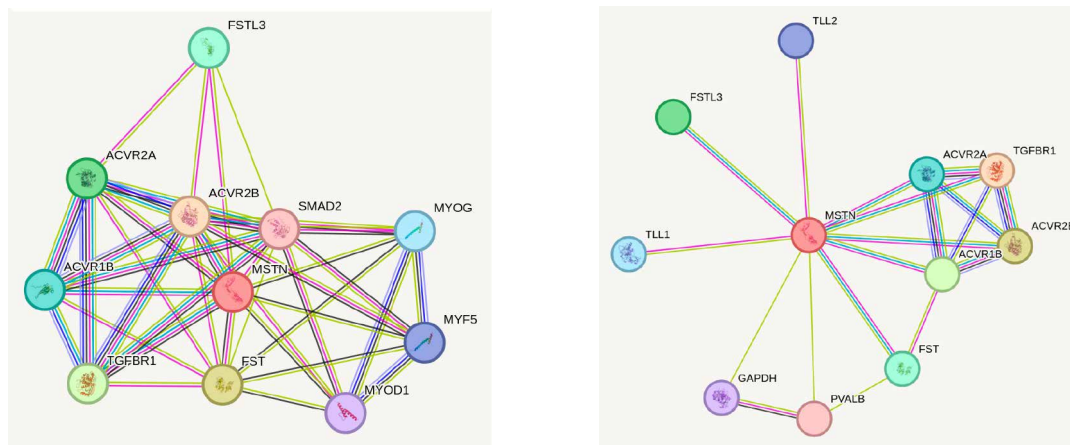


Abb 3: Netzwerk potentieller Myostatin (MSTN, rot gefärbt) - Interaktionspartner bei Rindern (*Bos taurus*, links) und Seebrassen (*Pagrus major*, rechts). ACVR (1B-2A-2B), Activin receptors; FST, GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; FSTL3, Follistatin related Protein 3; MYF5, Myogenic factor 5; MYOD1, Myoblast determination protein 1; MYOG, Myogenin; PVALB, Parvalbumin alpha; SMAD2, Mothers against decapentaplegic homolog 2; TGFBR1, TGF-beta receptor type-1; TLL1/2, Tolloid-like protein 1. (Erstellt mit Hilfe der STRING-Datenbank (<https://string-db.org>) bzw. Szklarczyk et al., (2023))

Damit ist das Myostatin-Gen wohl das häufigste Zielgen beim Einsatz von NGT bei Nutztieren, was angesichts des hier angestrebten Zuchtmerkmals (übermäßiges Muskelwachstum und erhöhte wirtschaftliche Ausbeute) Grund zur Sorge im Hinblick auf die Tiergesundheit verursacht. Zu beachten ist, dass das Gen für Myostatin mehrere Stoffwechselkreisläufe beeinflusst. Die bei den NGT-Eingriffen möglicherweise auftretenden pleiotropen Wirkungen können von Tierart zu Tierart unterschiedlich sein (siehe Abb. 3). Tatsächlich gibt es mehrere Hinweise auf negative gesundheitliche Auswirkungen für die betroffenen NGT-Tiere:

- Bei NGT-Fischen (Seebrasse) mit blockierter Myostatin-Funktion war die Rate der überlebenden Jungtiere geringer als bei den Vergleichstieren (Ohama et al., 2020). Eine Fehlstellung der Wirbelkörper wurde bei NGT-Seebrassen beschrieben (Kishimoto et al., 2018). Beim Amur-Stachelwels zeigten sich durch die Blockade des Myostatin-Gens eine verringerte Anzahl von Wirbeln und eine verringerte Distanz zwischen den Wirbeln sowie eine Verkürzung der Körperlänge (Zhang et al., 2023). Die AutorInnen schreiben: „Our results demonstrated that when using genome editing technology to breed new lines, the effects of knockout need to be analyzed comprehensively and may have some unexpected effects due to insufficient study of the function of certain genes.“

- Bei (konventionell gezüchteten) Rindern mit spontanen Myostatin-Gendefekten wurde eine höhere Wahrscheinlichkeit für bestimmte entzündliche Hautkrankheiten beobachtet (Meyermans et al., 2022). Auch andere Publikationen weisen auf Zusammenhänge zwischen dem Immunsystem und der Myostatin-Funktion hin (Lyons et al., 2010; Wu et al., 2020). Es gibt für NGT-Tiere weiteren Forschungsbedarf im Hinblick auf die Auswirkungen auf das Immunsystem.
- Bei Untersuchungen an NGT-Schweinen zeigte sich, dass durch den Myostatin-Gendefekt ein Stoffwechselweg (PI3K/Akt pathway) aktiviert wurde, der zu Krebserkrankungen führen kann (Li et al., 2020). Unter anderem war der Gehalt eines Signalstoffs (IGF2) erhöht, der für ein gesteigertes Zellwachstum sorgt; dies ist oft in Zusammenhang mit Krebserkrankungen der Fall. Dabei zeigten die NGT-Schweine eine deutliche höhere Muskelbildung als die Ausgangstiere, obwohl die Produktion von Myostatin bei diesen Tieren gar nicht vollständig zum Erliegen kam. Die AutorInnen schlussfolgern daraus, dass der Mechanismus, der tatsächlich zu übermäßigem Muskelwachstum führt, nicht ausreichend erforscht ist.

• Tierzucht und Landwirtschaft

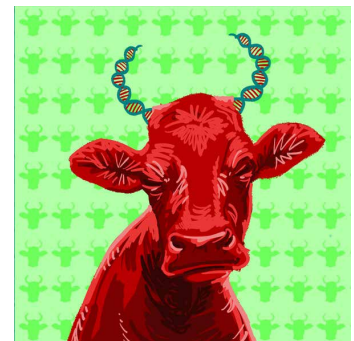
Durch die Verfahren der modernen Tierzucht können sich mögliche ungewollte Gendefekte, Geninsertionen und negative Genvarianten sehr schnell in den Zuchtpopulationen verbreiten. Ein einzelner Bulle kann im Laufe seines Lebens durch künstliche Besamung weit über 100.000 Nachkommen haben, in der Geflügelzucht können aus einzelnen Elterntieren innerhalb von 4 Jahren 3 Millionen Nachkommen gezüchtet werden (Bishop & Van Eenennaam, 2020).

Die US-Firma Recombinetics publizierte 2016, dass sie mittels Neuer Gentechnik Rinder so verändert hatte, dass ihnen keine Hörner wuchsen (Carlson et al., 2016).

Erst drei Jahre später stellte die US-Lebensmittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) fest, dass ungewollte Veränderungen im Erbgut der NGT-Rinder übersehen worden waren (Norris et al., 2020) und stoppte die Marktzulassung. Es zeigte sich, dass sich neben der Genvariante für Hornlosigkeit auch bakterielle Gene ins Erbgut gelangt waren und diese auch an die nächsten Generationen weitergegeben wurden. Die unerwünschten Genkonstrukte stammten von gentechnisch veränderten Bakterien, die im Rahmen der NGT-Verfahren eingesetzt wurden.

Wären diese NGT-Tiere in der Zucht eingesetzt worden, hätten sich die ungewollten Veränderungen rasch in den Zuchtbeständen ausbreiten können. Tatsächlich hatten diese NGT-Rinder bereits erste Nachkommen, die auch von der Universität von Kalifornien zur Schau gestellt wurden⁴ und nach dem Bekanntwerden der ungewollten Geninsertionen getötet wurden.

In anderen Fällen gibt es Unsicherheiten: So stellte die US-Behörde FDA bei NGT-Rindern mit kürzeren Haaren (SLICK) fest, dass die hier erzeugte Genvariante nicht mit der bereits bekannten natürlichen Genvariante übereinstimmt und dass es im Erbgut zu genetischer Mosaikbildung, Duplikationen in repetitiven Sequenzen und ungewollten Indels (Insertionen und Deletionen) gekommen war. Trotzdem erteilte das Amt eine Freigabe für die Vermarktung der dünnfelligen NGT-Rinder (FDA, 2022). Dabei gab die Behörde an, dass sie eine Gefährdung von VerbraucherInnen für unwahrscheinlich halte. Das bedeutet aber nicht, dass es keine Risiken für die Tierzucht gäbe. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass der FDA nur Daten von zwei Kälbern zur Auswertung vorlagen.



4 <https://animalscience.ucdavis.edu/news/alison-van-eenennaam-examines-how-gene-editing-can-enhance-sustainability-plus-animal-health>

• Umwelt

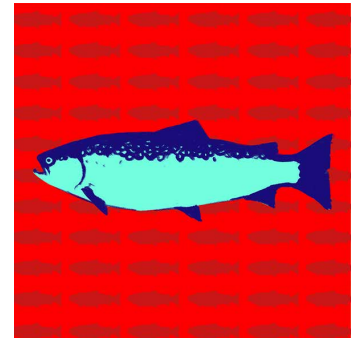
In Norwegen wurde ein Antrag auf eine experimentelle Freisetzung von NGT-Lachsen gestellt (siehe VKM, 2023). Es war der erste derartige Vorgang in Europa. Bei den Fischen wurden mittels CRISPR/Cas Gene ausgeschaltet, die für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane wichtig sind. Ziel ist es, die sterilen NGT-Lachse, die auch zum Patent (WO2021198424) angemeldet sind, in Aquakultur-Gehegen zur Fischmast im Meer einzusetzen.

Die gentechnisch veränderten Fische sollen Vorteile für die Aquakultur bieten. Insbesondere will man durch die Sterilität die Gefahr einer Ausbreitung in der Umwelt verringern.⁵ Die NGT-Tiere könnten bei Bedarf auch länger gemästet werden als ihre konventionell gezüchteten Artgenossen, die bereits bei Erlangung der Geschlechtsreife getötet werden. So könnte bei diesen NGT-Lachsen ein höheres Endgewicht erreicht werden (Kleppe et. al., 2022).

Bei der Prüfung des Antrags kam das Norwegian Scientific Committee for Food and Environment (VKM, 2023) jedoch zu einem ablehnenden Ergebnis, da es bei der Bewertung der Umweltrisiken zu viele Unsicherheiten gebe. Laut VKM wurde nicht gezeigt, dass tatsächlich alle gentechnisch veränderten Tiere steril sind. Dies ist auf die mangelnde Präzision der Neuen Gentechnik zurückzuführen: Bei den CRISPR-Lachsen gibt es zwischen den einzelnen Tieren erhebliche genetische Unterschiede in den veränderten Genen. Ein Grund dafür ist die bei Fischen weit verbreitete genetische Mosaikbildung (s.o.). Dadurch kann es auch bei der Auswahl der NGT-Tiere für die Mast zum Eintrag von ungewollten gentechnischen Veränderungen in die Zuchtpopulationen kommen, da möglicherweise nur ein Teil der Fische, die von den CRISPR-Lachsen abstammen, genau die erwünschten Merkmale aufweist.

Laut VKM ist auch unklar, wie sich die CRISPR-Lachse in der Umwelt verhalten würden: beispielsweise könnten sie zu Konkurrenten von jüngeren Fischen der natürlichen Populationen werden, die in Flüssen rund um die Fischfarmen leben. Falls sie nicht völlig steril sind, könnten sie die künstlichen Gendefekte weitergeben und so die natürlichen Populationen schwächen. Zudem bestehe laut VKM das Risiko, dass die CRISPR-Lachse anfälliger für Krankheiten sind und dadurch zur Ausbreitung gefährlicher Erreger in den betroffenen Regionen beitragen.

Neben einer möglichen unkontrollierten Ausbreitung von NGT-Tieren bestehen weitere Risiken für die Umwelt. Bspw. ist es denkbar, dass die gentechnisch veränderten Tiere spezielle Keime übertragen oder über Ausscheidungen verbreiten. Der Grund dafür kann ein geschwächtes Immunsystem oder die Entstehung von Keimen sein, die sich an spezielle Eigenschaften der NGT-Tiere angepasst haben. Zudem befördern viele Anwendungen eine deutlich höhere Intensität in der Haltung, was mit höheren Belastungen für die Umwelt einhergehen kann.



⁵ Siehe auch Video der Fachstelle Gentechnik und Umwelt (FGU): <https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/was-passiert-wenn-gentechnik-fische-in-die-umwelt-gelangen/>

• VerbraucherInnen und Lebensmittelproduzenten

Auch hier sind Risiken eingehend zu prüfen und keinesfalls generell als geringfügig anzusehen. Einige Beispiele:

- Durch die gentechnischen Veränderungen kann sich die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe ungewollt verändern, ggf. können auch neue Inhaltsstoffe gebildet werden. Beides kann die Sicherheit und Qualität von Nahrungsmitteln beeinflussen. Zum Beispiel zeigen Fische, denen Zwischenmuskelgräten fehlen, überraschenderweise auch signifikante Veränderungen in den Inhaltsstoffen ihres Muskelgewebes. Diese Veränderungen werden von den AutorInnen als positiv für die VerbraucherInnen bewertet. Da jedoch ein Patent (WO2022227692) auf diese Fische angemeldet wurde, stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse zu einseitig dargestellt wurden. Weitere unabhängige Untersuchungen sind daher notwendig. Abbildung 4 zeigt die Wechselwirkung des Zielgens *bmp6* mit anderen metabolischen Netzwerken.
- Durch NGT-Tiere, die (ungewollt) in ihrer Immunität geschwächt sind, kann es zu einer vermehrten Übertragung von Pathogenen kommen. Dies wird beispielsweise in Zusammenhang mit geklonten Tieren diskutiert, die der Lebensmittelgewinnung dienen sollen (EFSA, 2008).
- Tiere, die bspw. gegen Viren resistent gemacht wurden, können zu einem Reservoir für noch gefährlichere Krankheitserreger werden, die durch Anpassung entstehen können.



Letztlich ist auch zu bedenken, dass VerbraucherInnen den Konsum bestimmter Produkte möglicherweise als ethisch problematisch ansehen, was eine entsprechende Zurückhaltung beim Kauf entsprechender Produkte auslösen könnte. Daraus ergeben sich auch Risiken für die ProduzentInnen. So scheiterte jüngst die Vermarktung eines transgenen Lachses in Kanada an fehlender Nachfrage. Infolgedessen musste die Herstellerfirma AquaBounty aufgrund von massiven finanziellen Schwierigkeiten die Produktion einstellen.⁶

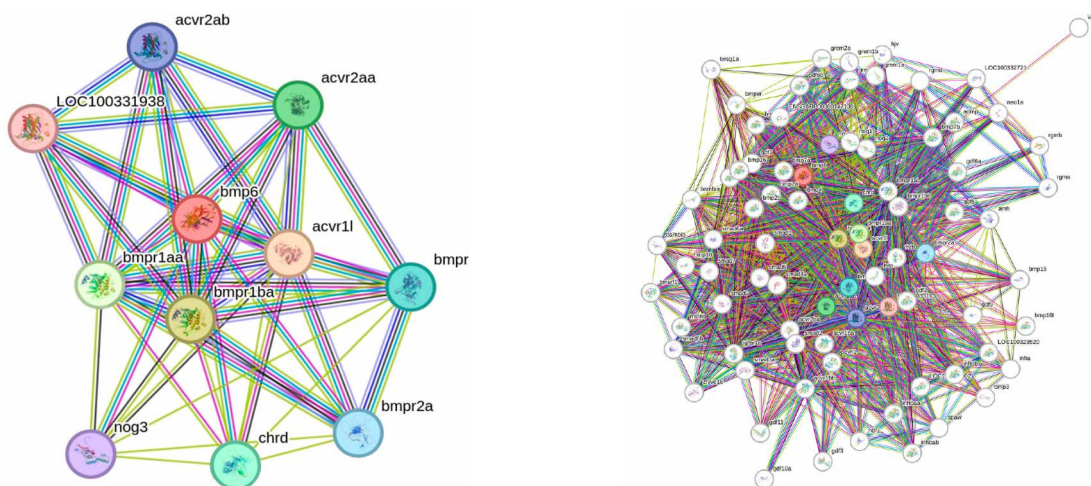


Abb 4: Direktes (links) und erweitertes (rechts) Netzwerk potentieller Interaktionspartner von *bmp6* (Bone morphogenetic protein, rote Farbe), das bei karpfenartigen Fischen blockiert wurde, um die Ausbildung von intermuskulären Gräten zu verhindern (hier am Beispiel des Zebraäbrblings (*Danio rerio*)). *acvr*(I, 2aa, 2ab), Activin receptors; *bmpr* (1aa, 1ba, 2a, 2b), Bone morphogenetic protein receptors; *chrd*, Chordin; *nog3*, Noggin-3; LOC100331938, Serine/Threonine-protein kinase. (Erstellt mit Hilfe der STRING-Datenbank (<https://string-db.org>) bzw. Szklarczyk et al., (2023))

⁶ <https://cban.ca/gm-salmon-company-aquabounty-shuts-down-operations/>

6. Patente

Im Zeitraum von 2020 bis 2024 wurde eine jährlich wachsende Zahl von internationalen Patentanträgen auf gentechnisch veränderte Wirbeltiere, die zur Erzeugung von Nahrungsmitteln dienen sollen, registriert. Insgesamt wurden für diesen Bericht rund 50 Patentanträge ausgewertet, im selben Zeitraum wurden auch mindestens drei Patente vom Europäischen Patentamt (EPA) erteilt:

- › 2023 wurde für die Universitäten von Edinburgh, Maryland und Washington ein Patent auf Schweine und Rinder erteilt (EP 3169778), die keine eigenen Spermazellen produzieren und stattdessen Eigenschaften anderer Tiere vererben sollen. Zu diesem Zweck können entsprechende Keimbahnzellen in die Tiere verpflanzt werden.
- › 2024 erteilte das EPA ein Patent auf Schweine, die mit CRISPR/Cas in ihrem Erbgut verändert wurden und für die Erzeugung von Lebensmitteln gedacht sind (EP3331355). Patentinhaber ist die Universität von Missouri (USA). Die Forschung wurde von der Firma Genus finanziert, einem der größten internationalen Konzerne im Bereich der Zucht von landwirtschaftlichen Nutztieren. Die NGT-Schweine sollen gegen ein RNA-Virus (PRRSV) resistent sein, welches das ‚Reproduktions- und Atemwegssyndrom‘ auslöst und insbesondere für große Ferkelmastbetriebe ein Problem ist.
- › Ebenfalls 2024 wurde das Patent EP3863401 auf Sterilität bei NGT-Geflügel für die Universität von Edinburgh erteilt.

Die meisten der internationalen Patentanträge betreffen Fische (12), gefolgt von Geflügel, Schweinen und Wiederkäuern (je 9). Die verfolgten Ziele sind die Veränderung der Fortpflanzungsfähigkeit (14), Entwicklung von NGT-Verfahren und geeigneten Stammzellen (12), erhöhte Leistung (7) und Resistenz gegenüber Krankheitserregern (6). Unter den Antragstellern sind Firmen wie Acceligen, ABS Global, Genus und Recombinetics, auffallend viele Patentanträge kommen aus dem asiatischen Raum.

Zum Patent angemeldet sind u.a. Fische (Sterilität, schnelleres Wachstum, weniger Gräten), Rinder, Schweine und Geflügel (Sterilität, Festlegung des Geschlechts, höhere Leistung, Resistenz gegen Viren), aber auch Elefanten, deren Erscheinungsbild per KI und NGT denen von Mammuts angeglichen werden soll.

Eine weitere Zunahme von Patentanträgen auf NGT-Nutztiere ist zu erwarten, parallel zu Patentanträgen auf Versuchstiere, bei denen zum Teil sogar nicht-menschliche Primaten beansprucht werden.

Damit entsteht ein grundsätzliches ethisches Dilemma: Es steht insgesamt zu befürchten, dass die wirtschaftlichen Interessen, die hinter diesen Patenten stehen, zu einer erhöhten Anzahl von Tierversuchen und Tierverslusten sowie vermehrtem Leiden, Schmerzen und beeinträchtigtem Wohlbefinden der Tiere führen.

7. EU-Regulierung

Neue Genvarianten, die aus der konventionellen Zucht bisher nicht bekannt sind, sollten eingehend auf gewollte und ungewollte Auswirkungen untersucht werden, um Umwelt, VerbraucherInnen, Lebensmittelherstellung, Landwirtschaft und Züchtung ausreichend zu schützen. Eine Beurteilung der Risiken für Mensch, Tier, Umwelt, Tierzucht und Landwirtschaft ist nur nach eingehender Risikoprüfung möglich.

Im Hinblick auf Tierschutz, Tierwohl und Tiergesundheit sollte der Gesetzgeber die Hürden für entsprechende Anwendungen und deren Vermarktung sehr hoch ansetzen. Patente auf die gentechnische Veränderung von Tieren zum Zwecke der Nahrungsmittelerzeugung (bzw. nicht medizinischen Zwecken) sind unmissverständlich zu verbieten, was laut europäischen Patentgesetzen auch möglich ist.

Werden die Hürden für Marktzulassungen zu niedrig angesetzt und Patente auf NGT-Nutztiere bewilligt, droht eine Zunahme von Tierversuchen und Tierverlusten sowie von Leiden, Schmerzen und eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere aus wirtschaftlichen Erwartungen. Zudem ist zu erwarten, dass dann auch das Gefährdungspotential insgesamt steigen wird, da die Unsicherheiten bei der Bewertung der Risiken für Mensch, Tier, Umwelt parallel zur Zahl der zur Vermarktung zugelassenen NGT-Tiere zunehmen wird.

Vor diesem Hintergrund sollte die EU sicherstellen, dass neben der Risikoforschung und Risikoprüfung auch eine vorausschauende Technikfolgenabschätzung gesetzlich verankert wird.

Quellen

- ANSES** (2023) Avis relatif à l'analyse scientifique de l'annexe I de la proposition de règlement de la Commission européenne du 5 juillet 2023 relative aux nouvelles techniques génomiques (NTG) – Examen des critères d'équivalence proposés pour définir les plantes NTG de catégorie 1 (autosaisine n° 2023-AUTO-0189). Maisons-Alfort : Anses, 34 p. <https://www.anses.fr/en/system/files/BIOT2023AUTO0189.pdf>
- ANSES** (2024) Risques et enjeux socio-économiques liés aux plantes NTG, Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux méthodes d'évaluation des risques sanitaires et environnementaux et des enjeux socio-économiques associés aux plantes obtenues au moyen de certaines nouvelles techniques génomiques (NTG) (Saisine n° 2021-SA-0019). Maisons-Alfort : Anses, 324 p. <https://www.anses.fr/fr/content/actu-nouvelles-techniques-genomiques>
- Aiello D., Patel K., Lasagna E.** (2018) The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Anim Genet* 49: 505–519. <https://doi.org/10.1111/age.12696>
- Amendola M., Brusson M., Miccio A.** (2022) CRISPRthripsis: the risk of CRISPR/Cas9-induced chromothripsis in gene therapy. *Stem Cells Transl Med*, 11: 1003–1009. <https://doi.org/10.1093/stctm/szaco64>
- Appleton E., Hong K., Rodriguez C., Tanaka Y., Ashkenazy-Titelman A., Bhide K., Rasmussen-Ivey C., Ambriz-Pena X., Korover N., Bai H., Quieroz A., Nelson J., Rathod G., Knox G., Morgan M., Malviya N., Zhang K., Kehler J., Kowalczyk A., Bow A., McLendon B., Cantarel B., James M., Mason C.E., Gray C., Koehler K.R., Pearson V., Lamm B., Church G., Hysolli E.** (2024) Derivation of elephant induced pluripotent stem cells. *bioRxiv* preprint, <https://doi.org/10.1101/2024.03.05.583606>
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.** (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Blix T.B., Dalmo R.A., Wargelius A., Myhr A.I.** (2021) Genome editing on finfish: Current status and implications for sustainability. *Rev Aquac*, 13: 2344–2363. <https://doi.org/10.1111/raq.12571>
- Blix T.B., Myhr A.I.** (2023) A sustainability assessment framework for genome-edited salmon. *Aquaculture*, 562: 738803. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738803>
- Bi C, Yuan B, Zhang Y, Wang M, Tian Y, Li M.** (2025) Prevalent integration of genomic repetitive and regulatory elements and donor sequences at CRISPR-Cas9-induced breaks. *Commun Biol*, 8(1): 94. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07539-5>
- Bian H., Hivert V., Wray N.R., McRae A.F.** (2024) Extensive antagonistic variants across human genome. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.11.28.24318135>
- Bishop T.F., Van Eenennaam A.L.** (2020) Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. *J Exp Biol*, 223(Pt Suppl 1): jeb207159. <https://doi.org/10.1242/jeb.207159>
- Brinkman E.K., Chen T., de Haas M., Holland H.A., Akhtar W., van Steensel B.** (2018) Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol Cell*, 70: 801–813. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.016>
- Bohle F., Schneider R., Mundorf J., Zühl L., Simon S., Engelhard M.** (2023) Where Does the EU-Path on NGTs Lead Us?, Preprint, <https://doi.org/10.20944/preprints202311.1897.v1>
- Capilla L., Garcia Caldés M., Ruiz-Herrera A.** (2016) Mammalian meiotic recombination: a toolbox for genome evolution. *Cytogenet Genome Res*, 150(1): 1–16. <https://doi.org/10.1159/000452822>
- Carlson D.F., Lancto C.A., Zang B., Kim E.S., Walton M., Oldeschulte D., Seabury C., Sonstegard T.S., Fahrenkrug S.C.** (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol*, 34: 479–81. <https://doi.org/10.1038/nbt.3560>

- Carroll, D.** (2017) Genome Editing: Past, Present, and Future. *Yale J Biol Med*, 90: 653–659. PMID: 29259529; PMCID: PMC5733845. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5733845/>
- Chen S.Y., Tsubouchi T., Rockmill B., Sandler J.S., Richards D.R., Vader G., et al.** (2008) Global analysis of the meiotic crossover landscape. *Dev Cell* 15: 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.006>
- COGEM** (2017) ‘The relationship between humans and animals is back on the agenda’ - Report on the Symposium ‘Gene Editing in Animals’ 19 AND 20 OCTOBER 2017 in Amsterdam, <https://cogem.net/app/uploads/2019/07/CGM171219-01-Event-report-Gene-editing-in-animals-Applications-and-implications9.pdf>
- Comstock G.** (1992) What obligations have scientists to transgenic animals? Discussion paper by the Center for Biotechnology, Policy and Ethics. College Station, TX: Texas A&M University. <https://core.ac.uk/download/pdf/83605423.pdf#page=47>
- Cooper C.A., Challagulla A., Jenkins K.A., Wise T.G., O’Neil T.E., Morris K.R., Tizard M.L., Doran T.J.,** (2017) Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Res*, 26: 331–347. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-0003-0>
- Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu H., Jin Y., Zhang Y.** (2015) Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of α -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep*, 5: 10482. <https://doi.org/10.1038/srep10482>
- Cullot G., Aird E.J., Schlapansky M.F., Yeh C.D., van de Venn L., Vykhlyantseva I., Kreutzer S., Mailänder D., Lewków B., Klermund J., Montellese C., Biserni M., Aeschmann F., Vonarburg C., Gehart H., Cathomen T., Corn J.E.** (2024) Genome editing with the HDR-enhancing DNA-PKcs inhibitor AZD7648 causes large-scale genomic alterations. *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02488-6>
- Crispo M., Mulet A.P., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., dos Santos-Neto P.C., Nguyen T.H., Crénéguy A., Bruselle L., Anegón I., Menchaca A.** (2015) Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, 10(8): e0136690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136690>
- DaSilva L.F., Senan S., Patel Z.M., Janardhan Reddy A., Gabbita S., Nussbaum Z., Valdez Córdova C.M., Wenteler A., Weber N., Tunjic T.M., Ahmad Khan T., Li Z., Smith C., Bejan M., Karmel Louis L., Cornejo P., Connell W., Wong E.S., Meuleman W., Pinello L.** (2024) DNA-Diffusion: Leveraging Generative Models for Controlling Chromatin Accessibility and Gene Expression via Synthetic Regulatory Elements. *bioRxiv preprint*, 2024.02.01.578352. <https://doi.org/10.1101/2024.02.01.578352>
- DeFrancesco L.** (2021) Church to de-extinct woolly mammoths. *Nat Biotechnol*; 39(10): 1171. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01096-y>
- De Groot D., Spanjaard A., Hogenbirk M.A., Jacobs H.** (2023) Chromosomal rearrangements and chromothripsis: the alternative end generation model. *Int J Mol Sci*, 24: 794. <https://doi.org/10.3390/ijms24010794>
- Dua S., Bansal S., Gautam D., Jose B., Singh P., Singh M.K., De S., Kumar D., Yadav P.S., Kues W., Selokar N.L.** (2023) Dua, S., Bansal, S., Gautam, D., Jose, B., Singh, P., Singh, M. K., ... & Selokar, N. L. (2023) Production of MSTN gene-edited embryos of buffalo using the CRISPR/Cas9 system and SCNT. *Cell Reprogramming* 25: 121–127. <https://doi.org/10.1089/cell.2023.0003>
- Dong, Z., Ge, J., Xu, Z., Dong, X., Cao, S., Pan, J., Zhao, Q.** (2014) Generation of myostatin B knockout yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) using transcription activator-like effector nucleases. *Zebrafish*, 11: 265–274. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0974>
- Dong W. & Kantor B.** (2021) Lentiviral vectors for delivery of gene-editing systems based on CRISPR/Cas: current state and perspectives. *Viruses*, 13: 1288. <https://doi.org/10.3390/v13071288>

- Eckerstorfer M.F., Dolezel M., Heissenberger A., Miklau M., Reichenbecher W., Steinbrecher R.A., Wassmann F.** (2019) An EU perspective on biosafety considerations for plants developed by genome editing and other new genetic modification techniques (nGMs). *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 31. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00031>
- Eckerstorfer M. & Heissenberger A.** (2023) New Genetic Engineering – possible unintended effects, Umweltbundesamt und Arbeiterkammer Wien, Informationen zur Umweltpolitik, Vol 208, https://emedien.arbeiterkammer.at/viewer/image/AC16982244/1/LOG_0003/
- EFSA** (2008) Food Safety, Animal Health and Welfare and Environmental Impact of Animals derived from Cloning by Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT) and their Offspring and Products Obtained from those Animals. *EFSA J*, 767: 1-49. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.767>
- EFSA** (2020) Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide directed mutagenesis. *EFSA J* 18(11): 6299. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6299>
- EFSA** (2022) Updated scientific opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J*, 20(10):7621. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7621>
- EFSA** (2025) New developments in biotechnology applied to animals: an assessment of the adequacy and sufficiency of current EFSA guidance for animal risk assessment, Draft for consultation. <https://open.efsa.europa.eu/consultations/aocTk00000BEWZmIAP>
- EGE** (2021) European Group on Ethics in Science and New Technologies opinion on the Ethics of Genome Editing, <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6d9879f7-8c55-11eb-b85c-01aa75ed71a1>
- FDA** (2022) Risk Assessment Summary – V-006378 PRLR-SLICK cattle, <https://www.fda.gov/media/155706/download>
- Ferdous M.A., Islam S.I., Habib N., Almeahadi M., Allahyani M., Alsaiani A.A., Shafie A.** (2022) CRISPR-Cas genome editing technique for fish disease management: current study and future perspective. *Microorganisms*, 10(10):2012. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102012>
- Fischer K., Schnieke A.** (2023) How genome editing changed the world of large animal research. *Front. Front Genome Ed*, 5: 1272687. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2023.1272687>
- Giassetti M.I., Ciccarelli M., Oatley J.M.** (2019) Spermatogonial stem cell transplantation: insights and outlook for domestic animals. *Annu Rev Anim Biosci* 7: 385-401. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115239>
- Gim G.-M., Uhm K.-H., Kwon D.-H., Kim M.-J., Jung D.-J., Kim D.-H., Yi J.-K., Ha J.-J., Yum S.-Y., Son W.-J., Lee J.-H., Park J.-H., Song K.-Y., Lee W.-W., Jang G.** (2022) Germline transmission of MSTN knockout cattle via CRISPR-Cas9. *Theriogenology*, 192: 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.021>
- Gim G.-M., Eom K.-H., Kwon D.-H., Jung D.-J., Kim D.-H., Yi J.-K., Ha J.-J., Lee J.-H., Lee S.-B., Son W.-J., Yum S.-Y., Lee W.-W., Jang G.** (2023) Generation of double knockout cattle via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) electroporation. *J Anim Sci Biotechnol*, 14: 103. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00902-8>
- Gim G.-M., Jang G.** (2024) Outlook on genome editing application to cattle. *J Vet Sci*, 25: e10. <https://doi.org/10.4142/jvs.23133>
- Gosai S.J., Castro R.I., Fuentes N., Butts J.C., Mouri K., Alasoadura M., Kales S., Nguyen T.T.L., Noche R.R., Rao A.S., Joy M.T., Sabeti P.C., Reilly S.K., Tewhey R.** (2024) Machine-guided design of cell-type-targeting cis-regulatory elements. *Nature*, 634(8036): 1211-1220. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08070-z>
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménéssier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M.** (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17(1): 71-74. <https://doi.org/10.1038/ng0997-71>

- Guo R., Wan Y., Xu D., Cui L., Deng M., Zhang G., Jia R., Zhou W., Wang Z., Deng K., Huang M., Wang F., Zhang Y.** (2016) Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 6: 29855. <https://doi.org/10.1038/srep29855>
- Geurts A.M., Cost G.J., Freyvert Y., Zeitler B., Miller J.C., Choi V.M., Jenkins S.S., Wood A., Cui X., Meng X., Vincent A., Lam S., Michalkiewicz M., Schilling R., Foeckler J., Kalloway S., Weiler H., Ménoret S., Anegón I., Davis G.D., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Jacob H.J., Buelow R.** (2009) Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 325(5939): 433. <https://doi.org/10.1126/science.1172447>
- Haapaniemi E., Botla S., Persson J., Schmierer B., Taipale J.** (2018) CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*. 24: 927–930. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>
- Han H., Ma Y., Wang T., Lian L., Tian X., Hu R., Deng S., Li K., Wang F., Li N., Liu G., Zhao Y., Lian Z.** (2014) One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front Agr Sci Eng*, 1: 2-5. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2014007>
- Han J.H., Lee H.J., Kim T.H.** (2023) Characterization of transcriptional enhancers in the chicken genome using CRISPR-mediated activation. *Front Genome Ed*, 5: 1269115. <https://doi.org/10.3389/fged.2023.1269115>
- He Z., Zhang T., Jiang L., Zhou M., Wu D., Mei J., Cheng Y.** (2018) Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscling phenotype in goats. *Biosci Rep*, 38(6): BSR20180742. <https://doi.org/10.1042/BSR20180742>
- Higuchi K., Kazeto Y., Ozaki Y., Yamaguchi T., Shimada Y., Ina Y., Soma S., Sakakura Y., Goto R., Matsubara T., Nishiki I., Iwasaki Y., Yasuike M., Nakamura Y., Matsuura A., Masuma S., Sakuma T., Yamamoto T., Masaoka T., Kobayashi T., Fujiwara A., Gen K.** (2019) Targeted mutagenesis of the ryanodine receptor by Platinum TALENs causes slow swimming behaviour in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Sci Rep*, 9(1): 13871. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50418-3>
- Hu Z., Ling S., Duan J., Yu Z., Che Y., Wang S., Zhang S., Zhang X., Li Z.** (2025) Proximity-activated guide RNA of CRISPR-Cas12a for programmable diagnostic detection and gene regulation. *Nucleic Acids Res*, 53(3): gkafo17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkafo17>
- Huang, Y., Gu, L., Li, G.M.** (2018) H3K36me3-mediated mismatch repair preferentially protects actively transcribed genes from mutation. *J Biol Chem* 293: 7811–7823. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002839>
- Hunt J.M.T., Samson C.A., Rand A.D., Sheppard H.M.** (2023) Unintended CRISPR–Cas9 editing outcomes: a review of the detection and prevalence of structural variants generated by gene-editing in human cells. *Hum Genet*, 142(6): 705–720. <https://doi.org/10.1007/s00439-023-02561-1>
- Ichikawa K., Matsuzaki M., Ezaki R., Horiuchi H.** (2022) Genome editing in chickens. *Gene Genome Ed*, (3-4): 100015. <https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2022.100015>
- Khalil K., Elayat M., Khalifa E., Daghsh S., Elasad A., Miller M., Abdelrahman H., Ye Z., Odin R., Drescher D., Vo K., Gosh K., Bugg W., Robinson D., Dunham R.** (2017) Generation of myostatin gene-edited channel catfish (*Ictalurus punctatus*) via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 7(1): 7301. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07223-7>
- Kalds P, Crispo M, Li C, Tesson L, Anegón I, Chen Y, Wang X, Menchaca A.** (2022) Generation of Double-Muscling Sheep and Goats by CRISPR /Cas9-Mediated Knockout of the Myostatin Gene. *Methods Mol Biol*; 2495:295-323.
- Kawall K.** (2019). New possibilities on the horizon: genome editing makes the whole genome accessible for changes. *Front Plant Sci* 24, 10: 525. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00525>
- Kawall K.** (2021) The generic risks and the potential of SDN-1 applications in crop plants. *Plants*, 10(11): 2259. <https://doi.org/10.3390/plants10112259>

- Kim G., Lee J.H., Song S., Kim S.W., Han J.S., Shin S.P., Park B., Park T.S.** (2020) Generation of myostatin knock-out chickens mediated by D10A Cas9 nickase. *FASEB J.* 34: 5688–5696. <https://doi.org/10.1096/fj.201903035R>
- Kishimoto K., Washio Y., Yoshiura Y., Toyoda A., Ueno T., Fukuyama H., Kato K. and Kinoshita M.** (2018) Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture*, 495: 415-427. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.055>
- Kishimoto K., Washio Y., Murakami Y., Katayama T., Kuroyanagi M., Kato K., Yoshiura Y., Kinoshita M.** (2019) An effective microinjection method for genome editing of marine aquaculture fish: tiger pufferfish *Takifugu rubripes* and red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.* 85: 217-226. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1277-3>
- Kleppe L., Fjelldal P.G., Andersson E., Hansen E.T., Sanden M., Bruvik A., et al.** (2022). Full production cycle performance of gene-edited, sterile Atlantic salmon – growth, smoltification, welfare indicators and fillet composition. *Aquaculture*, 560: 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738456>
- Koller F. & Cieslak M.** (2023) A perspective from the EU: Unintended genetic changes in plants caused by NGT – their relevance for a comprehensive molecular characterisation and risk assessment. *Front Bioeng Biotechnol.* 11: 1276226. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1276226>
- Kuang Y., Zheng X., Cao D., Sun Z., Tong G., Xu H., Yan T., Tang S., Chen Z., Zhang T., Zhang T., Dong L., Yang X., Zhou H., Guo W., Sun X.** (2023) Generate a new crucian carp (*Carassius auratus*) strain without intermuscular bones by knocking out *bmp6*. *Aquaculture*, 569: 739407. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739407>
- Lamas-Toranzo I., Ramos-Ibeas P., Pericuesta E., Bermejo-Álvarez P.** (2018) Directions and applications of CRISPR technology in livestock research. *Anim Reprod.* 15(3): 292-300. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0075>
- Lazar N.H., Celik S., Chen L., Fay M.M., Irish J.C., Jensen J., Tillinghast C.A., Urbanik J., Bone W.P., Gibson C.C., Haque I.S.** (2024) High-resolution genome-wide mapping of chromosome-arm-scale truncations induced by CRISPR-Cas9 editing. *Nat Genet.* 56(7): 1482-1493. <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01758-y>
- Lau C.H., Suh Y.** (2018) CRISPR-based strategies for studying regulatory elements and chromatin structure in mammalian gene control. *Mamm Genome.* 29(3-4): 205-228. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9727-2>
- Ledesma A. & Van Eenennaam A.L.** (2024) Global status of gene edited animals for agricultural applications. *Vet J.* 305: 106142. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106142>
- Ledford H.** (2020) CRISPR Gene Editing in Human Embryos Wreaks Chromosome Mayhem, *Nature*, 583: 17-18. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01906-4>
- Lee J., Kim D.H., Lee K.** (2024) Myostatin gene role in regulating traits of poultry species for potential industrial applications. *J Anim Sci Biotechnol.* 15(1): 82. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01040-5>
- Leibowitz M.L., Papathanasiou S., Doerfler P.A., Blaine L.J., Sun L., Yao Y., Zhang C.-Z., Weiss M.J., Pellman D.** (2021) Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Genet.* 53(6): 895-905. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7>
- Li R., Zeng W., Ma M., Wei Z., Liu H., Liu X., Wang M., Shi X., Zeng J., Yang L., Mo D., Liu X., Chen Y., He Z.** (2020) Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang Small Spotted pigs. *Transgenic Res.* 29(1): 149-163. <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00188-w>
- Liu J., Pan M., Huang D., Guo Y., Yang M., Zhang W., Mai K.** (2020) Liu, J., Pan, M., Huang, D., Guo, Y., Yang, M., Zhang, W., & Mai, K. (2020). Myostatin-1 inhibits cell proliferation by inhibiting the mTOR signal pathway and MRFs, and activating the ubiquitin-proteasomal system in skeletal muscle cells of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Cells*, 9(11): 2376. <https://doi.org/10.3390/cells9112376>

- Liu Y., Bai X., Feng X., Liu S., Hu Y., Chu H., Zhang L., Cai B., Ma Y.** (2025) Revolutionizing animal husbandry: Breakthroughs in gene editing delivery systems. *Gene*, 935: 149044. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.149044>
- Lorenz A., Osman F., Sun W., Nandi S., Steinacher R., Whitby M.C.** (2012) The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis. *Science*, 336: 1585–88. <https://doi.org/10.1126/science.1220111>
- Lorenzini M.H., Balderson B., Sajeev K., Ho A.J., McVicker G.** (2025) Joint single-cell profiling of CRISPR-Cas9 edits and transcriptomes reveals widespread off-target events and their effects on gene expression, bioRxiv preprint, <https://doi.org/10.1101/2025.02.07.636966>
- Luo J., Song Z., Yu S., Cui D., Wang B., Ding F., Li S., Dai Y., Li N.** (2014). Efficient generation of Myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases. *PLoS ONE*, 9: e95225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095225>
- Luo S., Liu Y., Bu L., Wang D., Wen Z., Yang Y., Xu Y., Wu D., Li G., Yang L.** (2025) The Impact of MSTN Gene Editing on Meat Quality and Metabolomics: A Comparative Study Among Three Breeds of MSTN-Edited and Non-Edited Cattle. *Animals*, 15, 47. <https://doi.org/10.3390/ani15010047>
- Lyons J.-A., Haring J.S., Biga P.R.** (2010) Myostatin expression, lymphocyte population, and potential cytokine production correlate with predisposition to high-fat diet induced obesity in mice. *PLoS ONE* 5(9): e12928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012928>
- Ma L., O'Connell J.R., VanRaden P.M., Shen B., Padhi A., Sun C., Bickhart D.M., Cole J.B., Null D.J., Liu G.E., Da Y., Wiggans G.R.** (2015) Cattle sex-specific recombination and genetic control from a large pedigree analysis. *PLoS Genet*, 11(11): e1005387. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005387>
- Mackay T.F.C., Anholt R.R.H.** (2024) Pleiotropy, epistasis and the genetic architecture of quantitative traits. *Nat Rev Genet*, 25(9): 639–657. <https://doi.org/10.1038/s41576-024-00711-3>
- Mackiewicz D., de Oliveira P.M.C., Moss de Oliveira S., Cebrat S.** (2013) Distribution of recombination hotspots in the human genome - a comparison of computer simulations with real data. *PLoS One*, 8: e65272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065272>
- Matsumoto, D., Nomura, W.** (2023) The history of genome editing: advances from the interface of chemistry & biology. *Chem. Commun.* 59, 7676–7684. <https://doi.org/10.1039/D3CC00559C>
- McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J.** (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387: 83–90. <https://doi.org/10.1038/387083a0>
- Mehravar M., Shirazi A., Nazari M., Banan M.** (2019) Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Dev Biol*, 445: 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.10.008>
- Meyermans R., Janssens S., Coussé A., Gorssen W., Hubin X., Mayeres P., Veulemans W., Claerebout E., Charlier C., Buys N.** (2022) Myostatin mutation causing double muscling could affect increased psoroptic mange sensitivity in dual purpose Belgian Blue cattle. *Animal*, 16(3): 100460. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100460>
- Miao D., Giassetti M.I., Ciccarelli M., Lopez-Biladeau B., Oatley J.M.** (2019) Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. *Biol Reprod* 101: 177–187. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox075>
- Mianné J., Codner G.F., Caulder A., Fell R., Hutchison M., King R., Stewart M.E., Wells S., Teboul L.** (2017) Analysing the outcome of CRISPR-aided genome editing in embryos: Screening, genotyping and quality control. *Methods*, 121–122: 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.016>

- Minett M.S., Pereira V., Sikandar S., Matsuyama A., Lolignier S., Kanellopoulos A.H., Mancini F., Iannetti G.D., Bogdanov Y.D., Santana-Varela S., Millet Q., Baskozos G., MacAllister R., Cox J.J., Zhao J., Wood J.N.** (2015) Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7. *Nat Commun*, 6: 8967. <https://doi.org/10.1038/ncomms9967>
- Mitchell E., Tellez Jr. G., McGrew, M.J.** (2023) Chicken genome editing for investigating poultry pathogens. *Avian Pathol*, 52: 1–11. <https://doi.org/10.1080/03079457.2022.2130173>
- Mizushima S., Sasanami T., Ono T., Kuroiwa A.** (2023) Current Approaches to and the Application of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) for Avian Genome Editing. *Genes*, 14: 757. <https://doi.org/10.3390/genes14030757>
- Mizushima S., Sasanami T., Ono T., Matsuzaki M., Kansaku N., Kuroiwa A.** (2021) Cyclin D1 gene expression is essential for cell cycle progression from the maternal-to-zygotic transition during blastoderm development in Japanese quail. *Dev Biol*, 476: 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.04.005>
- Moro L.N., Viale D.L., Bastón J.I., Arnold V., Suvá M., Wiedenmann E., Olguín M., Miriuka S., Vichera G.** (2020) Generation of myostatin edited horse embryos using CRISPR/Cas9 technology and somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep*, 10(1): 15587. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72040-4>
- Mueller M.L., McNabb B.R., Owen J.R., Hennig S.L., Ledesma A.V., Angove M.L., Conley A.J., Ross P.J., Van Eenennaam A.L.** (2023), Germline ablation achieved via CRISPR/Cas9 targeting of NANOS3 in bovine zygotes. *Front Genome Ed*, 5: 1321243. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1321243>
- Navarro-Serna S., Piñeiro-Silva C., Fernández-Martín I., Dehesa-Etxebeeste M., López De Munain A., Gadea J.** (2024) Oocyte electroporation prior to in vitro fertilization is an efficient method to generate single, double, and multiple knockout porcine embryos of interest in biomedicine and animal production. *Theriogenology*, 218: 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.040>
- Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M.** (2014) TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*, 6: 19–40. <https://pdfs.semanticscholar.org/7780/d2ed3270422cofao2afabba68338de96bd2c.pdf>
- Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A., Chen C.,** (2014) Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9: e106718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>
- Norris A.L., Lee S.S., Greenlees K.J., Tadesse D.A., Miller M.F., Lombardi H.A.** (2020) Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat Biotechnol*, 38(2): 163–164. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0394-6>
- Ohama M., Washio Y., Kishimoto K., Kinoshita M., Kato K.** (2020) Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture*, 529: 735672. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735672>
- Paigen K, Petkov P.** (2010) Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet*, 11: 221–33. <https://doi.org/10.1038/nrg2712>
- Park S.H., Cao M., Pan Y., Davis T.H., Saxena L., Deshmukh H., Fu Y., Treangen T., Sheehan V.A., Bao G.** (2022) Comprehensive analysis and accurate quantification of unintended large gene modifications induced by CRISPR-Cas9 gene editing. *Sci Adv*, 8(42): eabo7676. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/sciadv.abo7676>
- Pilzcker B., Buoninfante O.A., Jacobs H.** (2019) DNA damage tolerance in stem cells, ageing, mutagenesis, disease and cancer therapy. *Nucleic Acids Res*, 47(14): 7163–7181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz531>
- Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., Long C.R., Pryor J.H., King T.J., Lillico S.G., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C.B., Fahrenkrug S.C.** (2015) Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res*, 24(1): 147–53. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9832-x>

- Rao S., Fujimura T., Matsunari H., Sakuma T., Nakano K., Watanabe M., Asano Y., Kitagawa E., Yamamoto T., Nagashima H.** (2016) Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knock-out piglets. *Mol Reprod Dev*, 83: 61-70. <https://doi.org/10.1002/mrd.22591>
- Redel B.K., Yoon J., Reese E., An H., Uh K., Chen P.R., Prather R.S., Lee K.** (2024) Novel off-targeting events identified after genome wide analysis of CRISPR-cas edited pigs. *CRISPR J*, 7(3): 141-149. <https://doi.org/10.1089/crispr.2024.0012>
- Regalado A.** (2015) First Gene-Edited Dogs Reported in China, *MIT Technology Review*, <https://www.technologyreview.com/2015/10/19/165740/first-gene-edited-dogs-reported-in-china/>
- Regalado A.** (2024) Beyond gene-edited babies: the possible paths for tinkering with human evolution. *MIT technology review*, <https://www.technologyreview.com/2024/08/22/1096458/crispr-gene-editing-babies-evolution/>
- Ren J., Hai T., Chen Y., Sun K., Han Z., Wang J., Li C., Wang Q., Wang L., Zhu H., Yu D., Li W., Zhao S.** (2024) Improve meat production and virus resistance by simultaneously editing multiple genes in livestock using Cas12iMax. *Sci China Life Sci*, 67: 555-564. <https://doi.org/10.1007/s11427-023-2407-0>
- Rodriguez-Villamil P., Ongaratto F., Bostrom J., Larson S., Sonstegard T.** (2021) 13 Generation of SLICK beef cattle by embryo microinjection: A case report. *Reproduction, Fertility and Development*, 33: 114-114. <https://doi.org/10.1071/RDv33n2Ab13>
- Shriver A. & McConnachie E.** (2018) Genetically modifying livestock for improved welfare: a path forward. *J Agric Environ Ethics*, 31: 161-180. <https://doi.org/10.1007/s10806-018-9719-6>
- Smeds L., Mugal C.F., Qvarnström A., Ellegren H.** (2016) High-resolution mapping of crossover and non-crossover recombination events by whole-genome re-sequencing of an avian pedigree. *PLoS Genet* 12(5): e1006044. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006044>
- Song Y., Cui C., Zhu H., Li Q., Zhao F., Jin Y.** (2015) Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Protein Expr Purif*, 112: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.04.004>
- Song R., Wang Yu, Zheng Q., Yao J., Cao C., Wang Y., Zhao J.** (2022) One-step base editing in multiple genes by direct embryo injection for pig trait improvement. *Sci China Life Sci*, 65: 739-752. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-2013-8>
- Sonstegard T., Bostrom J., Martins K., Kim E.S., Correia C., MacHugh D., et al.** (2024) Genome-edited livestock to secure sustainability. *Reprod Fertil Dev*, 37(1). <https://doi.org/10.1071/RD24145>
- Supek F., & Lehner B.** (2015). Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. *Nature*, 521: 81-84. <https://doi.org/10.1038/nature14173>
- Szklarczyk D., Kirsch R., Koutrouli M., Nastou K., Mehryary F., Hachilif R., Gable A.L., Fang T., Doncheva N.T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L.J., von Mering C.** (2023) The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*, 51(D1): D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Termolino P., Cremona G., Consiglio M.F., Conicella C.** (2016). Insights into epigenetic landscape of recombination-free regions. *Chromosoma*, 125: 301-308. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0574-9>
- Testbiotech** (2022) New Genomic Techniques and unintended genetic changes: EFSA 'overlooked' most of the relevant publications, *Testbiotech Background 12 - 12 - 2022*, <https://www.testbiotech.org/publikation/new-genomic-techniques-unintended-genetic-changes-efsa-overlooked-most-relevant-publications/>

- Van Eenennaam A.L.** (2023) New Genomic Techniques (NGTs) Animals and their Agri/food/feed products. EFSA Supporting Publication:EN-8311. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-8311>
- VKM** (2023) Environmental risk assessment of genetically modified sterile VIRGIN® Atlantic salmon for use in research trials in aquaculture sea-cages, <https://vkm.no/english/riskassessments/allpublications/geneticallymodifiedsterilesalmonriskassessmentoffieldtrials.4.49914e7a18a5261030860bee.html>
- Wang K., Ouyang H., Xie Z., Yao C., Guo N., Li M., Jiao H., Pang D.** (2015) Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 5: 16623. <https://doi.org/10.1038/srep16623>
- Wang X., Niu Y., Zhou J., Yu H., Kou Q., Lei A., Zhao X., Yan H., Cai B., Shen Q., Zhou S, Zhu H, Zhou G, Niu W, Hua J, Jiang Y, Huang X, Ma B, Chen Y.** (2016) Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Sci Rep*, 6: 32271. <https://doi.org/10.1038/srep32271>
- Wang K., Tang X., Xie Z., Zou X., Li M., Yuan H., Guo N., Ouyang H., Jiao H., Pang D.** (2017) CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs. *Trans Res*, 26: 799-805. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0044-z>
- Wang L., Cai B., Zhou S., Zhu H., Qu L., Wang, X., Chen, Y.,** (2017). RNA-seq reveals transcriptome changes in goats following myostatin gene knockout. *PLoS ONE*, 12: e0187966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187966>
- Wang X., Niu Y., Zhou J., Zhu H., Ma B., Yu H., Yan H., Hua J., Huang X., Qu L., Chen Y.** (2018) CRISPR/Cas9 mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. *Anim. Genet* 49: 43–51. <https://doi.org/10.1111/age.12626>
- Wani A.K., Akhtar N., Singh R., Prakash A., Raza S.H.A., Cavalu S., Chopra C., Madkour M., Elolimy A., Hashem N.M.** (2023) Genome centric engineering using ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 systems for trait improvement and disease control in Animals. *Vet Res Commun*, 47: 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09967-8>
- Whyte J.J. & Prather R.S.** (2012) Cell biology symposium: Zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (*Sus scrofa*) genome. *J Anim Sci*, 90: IIII–IIII7. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4546>
- Wu L., Li Y., Xu Y., Wang L., Ma X., Dong C., Zhao X., Tian X., Li X., Kong X.** (2020) The roles of two myostatins and immune effects after inhibition in Qi river crucian carp (*Carassius auratus*). *Fish Shellfish Immunol*, 98: 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.015>
- Wu H., Lian M., Lai L.** (2023) Multiple gene modifications of pigs for overcoming obstacles of xenotransplantation, *Natl Sci Open*, 25: 20230030. <https://doi.org/10.1360/nso/20230030>
- Xiong K., Li S., Zhang H., Cui Y., Yu D., Li Y., Sun W., Fu Y., Teng Y., Liu Z., Zhou X., Xiao P., Li J., Liu H., Chen J.** (2013) Targeted editing of goat genome with modular-assembly zinc finger nucleases based on activity prediction by computational molecular modeling. *Mol Biol Rep*, 40: 4251–4256. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2507-5>
- Xu K., Zhou Y., Mu Y., Liu Z., Hou S., Xiong Y., Fang L., Ge C., Wei Y., Zhang X., Xu C., Che J., Fan Z., Xiang G., Guo J., Shang H., Li H., Xiao S., Li J., Li K.** (2020) CD163 and pAPN double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance. *Elife*, 9: e57132. <https://doi.org/10.7554/eLife.57132>
- Xu X., Chemparathy A., Zeng L., Kempton H.R., Shang S., Nakamura M., Qi L.S.** (2021) Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing. *Mol Cell*, 81(20): 4333-4345.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.008>
- Yang H., Wu Z.** (2018) Genome Editing of Pigs for Agriculture and Biomedicine. *Front Genet*, 9: 360. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00360>

- Yu B., Lu R., Yuan Y., Zhang T., Song S., Qi Z., Shao B., Zhu M., Mi F., Cheng Y.** (2016) Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Dev. Biol.*, 16: 26. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0126-9>
- Yuan Y.-G., Liu S.-Z., Farhab M., Lv M.-Y., Zhang T., Cao S.-X.** (2024) Genome editing: An insight into disease resistance, production efficiency, and biomedical applications in livestock. *Funct Integr Genomics*, 24: 81. <https://doi.org/10.1007/s10142-024-01364-5>
- Zhang J., Cui M., Nie Y., Dai B., Li F., Liu D., Liang H., Cang M.** (2018) CRISPR /Cas9 mediated specific integration of fat 1 at the goat MSTN locus. *FEBS J.*, 285: 2828–2839. <https://doi.org/10.1111/febs.14520>
- Zhang J., Liu J., Yang W., Cui M., Dai B., Dong Y., Yang J., Zhang X., Liu D., Liang H., Cang M.** (2019) Comparison of gene editing efficiencies of CRISPR/Cas9 and TALEN for generation of MSTN knock-out cashmere goats. *Theriogenology*, 132: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.029>
- Zhang T., Lu Y., Song S., Lu R., Zhou M., He Z., Yuan T., Yan K., Cheng Y.** (2019) Double-muscling[†] and pelvic tilt phenomena in rabbits with the cystine-knot motif deficiency of myostatin on exon 3. *Biosci Rep*, 39(5): BSR20190207. <https://doi.org/10.1016/10.1042/BSR20190207>
- Zhang X., Wang F., Ou M., Liu H., Luo Q., Fei S., Zhao J., Chen K., Zhao Q., Li K.** (2023) Effects of Myostatin b Knockout on Offspring Body Length and Skeleton in Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Biology*, 12: 1331. <https://doi.org/10.3390/biology12101331>
- Zhao, X., Wan, W., Zhang, X., Wu, Z., Yang, H.** (2021) Spermatogonial stem cell transplantation in large animals. *Animals*, 11: 918. <https://doi.org/10.3390/ani11040918>
- Zheng Y., Zhang Y., Wu L., Riaz H., Li Z., Shi D., Rehman S.U., Liu Q., Cui K.** (2022) Zheng, Y., Zhang, Y., Wu, L., Riaz, H., Li, Z., Shi, D., ... & Cui, K. (2022). Generation of heritable prominent double muscle buttock rabbits via novel site editing of myostatin gene using CRISPR/Cas9 system. *Front Vet Sci*, 9: 842074. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.842074>
- Zhong Z., Niu P., Wang M., Huang G., Xu S., Sun Y., Xu X., Hou Y., Sun X., Yan Y., Wang H.** (2016) Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp. *Sci Rep*, 6: 22953. <https://doi.org/10.1038/srep22953>
- Zhou S., Kalds P., Luo Q., Sun K., Zhao X., Gao Y., Cai B., Huang S., Kou Q., Petersen B., Chen Y., Ma B., Wang X.** (2022) Optimized Cas9:sgRNA delivery efficiently generates biallelic MSTN knockout sheep without affecting meat quality. *BMC Genomics*, 23(1): 348. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08594-6>
- Zhou S., Lenk L.J., Gao Y., Wang Y., Zhao X., Pan M., Huang S., Sun K., Kalds P., Luo Q., Lillico S., Sonstegard T., Scholl U.I., Ma B., Petersen B., Chen Y., Wang X.** (2023) Generation of sheep with defined FecBB and TBXT mutations and porcine blastocysts with KCNj5G151R/+ mutation using prime editing. *BMC Genomics*, 24: 313. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09409-y>
- Zuccaro M.V., Xu J., Mitchell C., Marin D., Zimmerman R., Rana B., Weinstein E., King R.T., Palmerola K.L., Smith M.E., Tsang S.H., Goland R., Jasin M., Lobo R., Treff N., Egli D.** (2020) Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos. *Cell*, 183(6): 1650-1664.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.025>