

Alexandra Ribarits, Walter Stepanek, Rupert Hochegger,
Frank Narendja, Noémie Prat, Michael Eckerstorfer
und Markus Wögerbauer

Analyse von Nachweismethoden für genomeditierte und klassische GV-Pflanzen



Analyse von Nachweismethoden für genomeditierte und klassische GV-Pflanzen

**Endbericht zum gleichmaligen F+E-Vorhaben
(FKZ: 3519 80 1000 II)**

**Alexandra Ribarits
Walter Stepanek
Rupert Hochegger
Frank Narendja
Noémie Prat
Michael Eckerstorfer
Markus Wögerbauer**

Titelbild: Das Bild zeigt die Suche nach gentechnisch veränderten DNA-Sequenzen. Abgebildet sind Maispflanzen und Sojabohnen, da diese beiden Kulturarten den globalen Anbau von GVO dominieren. Getrennt sind die beiden Abbildungen durch ein Band aus DNA-Basenabfolgen, das den genetischen Code der Pflanzen darstellt. Der Nachweis von bzw. die Suche nach etwaigen gentechnischen Veränderungen ist durch eine Lupe im Zentrum der Abbildung, die einen Teil der DNA-Sequenz hervorhebt, angedeutet (Rupert Hocegger).

Adressen der Autorinnen und der Autoren:

DI Dr. Alexandra Ribarits	Österreichische Agentur für Ernährungssicherheit GmbH (AGES)
DI Walter Stepanek	Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Österreich
Mag. Rupert Hocegger	E-Mail: Alexandra.Ribarits@ages.at
Dr. Noémie Prat	Walter.Stepanek@ages.at
Dr. Markus Wögerbauer	Rupert.Hocegger@ages.at
	Noemie.Prat@ages.at
	Markus.Woegerbauer@ages.at

Dr. Frank Narendja	Umweltbundesamt GmbH
Dr. Michael Eckerstorfer	Spittelauer Lände 5, 1090 Wien, Österreich
	E-Mail: Frank.Narendja@umweltbundesamt.at
	Michael.Eckerstorfer@umweltbundesamt.at

Fachbetreuung im BfN:

Dr. Samson Simon	Fachgebiet I 2.6 „Bewertung gentechnisch veränderter Organismen/ Gentechnikgesetz“
------------------	---

Gefördert durch das Bundesamt für Naturschutz (BfN) mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMU) (FKZ: 3519 80 1000 II).

Diese Veröffentlichung wird aufgenommen in die Literaturdatenbank „DNL-online“ (www.dnl-online.de).

BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich. Eine pdf-Version dieser Ausgabe kann unter <https://www.bfn.de/publikationen> heruntergeladen werden.

Institutioneller Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
URL: www.bfn.de

Der institutionelle Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des institutionellen Herausgebers übereinstimmen.



Diese Schriftenreihe wird unter den Bedingungen der Creative Commons Lizenz Namensnennung – keine Bearbeitung 4.0 International (CC BY - ND 4.0) zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/deed.de>).

ISBN 978-3-89624-383-6

DOI 10.19217/skr622

Bonn 2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Zusammenfassung.....	4
Summary.....	6
1 Klassische Gentechnik und genomeditierte gentechnisch veränderte Organismen.....	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Klassische Gentechnik	8
1.3 Intragenese und Cisgenese.....	9
1.4 Nukleasetechniken.....	9
1.4.1 Meganukleasen.....	9
1.4.2 Zink Finger Nukleasen	10
1.4.3 Transcription Activator-Like Effector Nucleases	10
1.4.4 CRISPR/Cas	10
1.5 Sonstige Techniken der Genomeditierung.....	11
1.5.1 Oligonucleotide-Directed Mutagenesis	11
1.5.2 Base Editing.....	11
1.5.3 Prime Editing.....	11
1.6 Kategorisierung der Techniken der Genomeditierung.....	12
1.6.1 SDN-1	12
1.6.2 SDN-2	12
1.6.3 SDN-3	12
1.6.4 Techniken, die nicht als SDN gelten.....	13
2 Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von klassischer Gentechnik	13
2.1 Gesetzliche Vorgaben und Normung.....	13
2.2 Nachweis	14
2.2.1 Screening und Matrix-Approach	14
2.3 Identifizierung.....	15
2.4 Quantifizierung.....	16
3 Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von genomeditierten GVO	16
3.1 Definitionen und gesetzliche Vorgaben	16
3.1.1 Gesetzliche Vorgaben und Normung.....	16
3.1.2 Nachweis von mit Hilfe von NGT hergestellten Pflanzen und Produkten	16
3.1.3 Screening und Matrix-Approach	17
3.1.4 Identifizierung von mit Hilfe von NGT hergestellten Pflanzen und Produkten	17
3.1.5 Quantifizierung von NGT	17
3.1.6 Referenzmaterial.....	17
3.2 Vorgehen bei Auswahl potenzieller Nachweismethoden	17
3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	18
3.3.1 Real-time quantitative PCR	18
3.3.2 High Resolution Melting PCR.....	20
3.3.3 Nachweis durch qPCR mittels Locked Nucleic Acids	22
3.3.4 RNase H-abhängige real-time PCR.....	23
3.3.5 Digitale PCR	24
3.4 Sequenzierung.....	27

3.4.1	Zielgerichtete Sequenzierung (Targeted Sequencing, Amplikon-Sequenzierung).....	27
3.4.2	Ganzgenomsequenzierung	31
3.5	Einschätzung der Nachweismöglichkeiten.....	33
3.5.1	Nachweismöglichkeiten bei vorhandener Information.....	33
3.5.2	Nachweismöglichkeiten für unbekannte NGT-Pflanzen.....	34
3.6	Nicht-beabsichtigte Modifikationen im Zuge der Anwendung von NGT	37
3.6.1	Nicht-beabsichtigte Modifikationen durch Prozesse des Gentransfers und der Zellregeneration	37
3.6.2	Technik-spezifische nicht-beabsichtigte Modifikationen.....	38
3.6.3	Rückkreuzungen	39
4	Schlussfolgerungen	39
	Literaturverzeichnis	43
	Anhänge.....	51
A.	Informationen zur Unterstützung der Entwicklung von Nachweismethoden von genomeditierten Pflanzen	52
A.1	Einleitung	52
A.1.1	Für Nachweis und Identifizierung relevante Informationen	52
A.1.2	Weitere Informationen (mögliche Hinweise auf NGT).....	52
A.2	Wissenschaftliche Literatur	52
A.2.1	Literaturrecherche	52
A.2.2	Allgemeine Informationen aus der wissenschaftlichen Literatur.....	54
A.2.3	Spezifika bestimmter NGT-Anwendungen.....	54
A.3	Datenbanken.....	56
A.3.1	Informationen der Datenbanken	56
A.3.2	Kurzbeschreibung der Datenbanken	57
A.4	Behördendokumente, Informationen der Produktentwickler	58
A.4.1	Behördendokumente	58
A.4.2	Informationen von Produktentwicklern.....	59
A.4.3	Europäisches Patentregister	60
B.	Protokoll: Austausch mit externen Expertinnen und Experten.....	64
	Literaturverzeichnis	68
C.	Tabellen (Ergebnisse Datenrecherche).....	70

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anzahl der durch die Detektion von Screening-Elementen (p35S, tNOS, PAT, BAR, EPSPS) nachweisbaren bzw. nicht nachweisbaren Events. Die linke Säule zeigt die Anzahl der insgesamt durch ein Screening erfassten Events, die beiden Säulen rechts zeigen die durch die typischen Screening-Elemente nicht erfassten Events. Dargestellt ist die jeweilige Anzahl in den Jahren 2004, 2009, 2014 und 2019.....	15
Abb. 2: High Resolution Melting. Detektion einer DNA-Modifikation durch Veränderung der spezifischen Schmelztemperatur.....	20
Abb. 3: Schematischer Ablauf der digitalen droplet PCR (ddPCR)-Methode.	25

Zusammenfassung

In der EU unterliegen gentechnisch veränderte Organismen (GVO) den Zulassungsbestimmungen der Richtlinie 2001/18/EG bzw. der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003. Anträge auf Zulassung einer gentechnisch veränderten Pflanze erfordern die Beschreibung von Identifizierungs- und Nachweisverfahren. Diese werden von Kontrolllabors der Mitgliedstaaten verwendet, um gentechnisch veränderte Pflanzen nachzuweisen, zu identifizieren und ihr Auftreten in Lebens- und Futtermitteln zu quantifizieren. Der Europäische Gerichtshof hat mit seinem Urteil vom 25. Juli 2018 (C-528/16) festgestellt, dass mit gerichteter Mutagenese (Genomeditierung) hergestellte Pflanzen unter die Regelungen gemäß Richtlinie 2001/18/EG zur Freisetzung und zum Inverkehrbringen von GMO fallen. Für Kontrolllabors ergeben sich damit spezielle Herausforderungen für Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von genomeditierten Pflanzen.

Techniken der Genomeditierung ermöglichen zielgerichtete Veränderungen an vordefinierten Stellen im Erbgut von Organismen. Sie zählen zu den „neuartigen genomischen Verfahren (NGT)“, definiert als Techniken, die in der Lage sind, das genetische Material eines Organismus zu verändern und die seit 2001 entstanden sind oder entwickelt wurden. Die Nachweisbarkeit von genomeditierten GMO hängt davon ab, welche Art der Modifikation erzielt wurde und ob möglicherweise (transgene) Fremd-DNA oder Komponenten zur Genomeditierung ins Pflanzengenom integriert wurden. Für den Nachweis stellen kleine Mutationen (Punktmutationen) die größte Herausforderung dar. Im vorliegenden Bericht werden, ausgehend von den derzeit verwendeten Methoden für den Nachweis von klassischen GMO, die bestehenden Möglichkeiten und Herausforderungen bei genomeditierten Pflanzen diskutiert.

Der Nachweis auch sehr kleiner Sequenzunterschiede, wie z.B. Punktmutationen, ist mit der derzeitigen technischen Ausstattung eines Kontrolllabors möglich. Zur Erhöhung der Sensitivität können Optimierungsschritte (Primer/Sonden-Design, Thermoprofile) erforderlich sein. Um Nachweisverfahren in den Routinebetrieb zu überführen, sind die Methoden zu validieren. Der Nachweis einer charakteristisch, einzigartigen Veränderung oder parallel, mehrerer Modifikationen in einem untersuchten Genom kann die Identifizierung genomeditierter Pflanzen ermöglichen. Eine Quantifizierung dieser Analyseergebnisse durch derzeit verfügbare Methoden ist mithilfe bestimmter Ansätze technisch möglich.

Genauere Informationen zur erfolgten Modifikation sind die wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung von Methoden für Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von genomeditierten GMO. Solche Informationen könnten aus öffentlich zugänglichen Dokumenten zusammengetragen werden. Es wird empfohlen Informationen aus verschiedenen öffentlichen Quellen, u.a. wissenschaftliche Publikationen, Patente und behördliche Dokumente aus Drittländern zu kombinieren. Diese Informationen könnten in von internationalen Organisationen betreuten Datenbanken gesammelt werden. Bestehende Datenbanken, wie z.B. das Biosafety Clearing House im Rahmen des Cartagena-Protokolls für biologische Sicherheit oder EUGenius, könnten als Modell für eine internationale Datenbank für den Austausch von Informationen über global vermarktete NGT-Produkte dienen. Es wird empfohlen, eine derartige, auf internationaler Ebene betreute Datenbank zu etablieren, um einen einfachen Zugang für Kontrolllabore zu allen relevanten Informationen zu ermöglichen.

Um die entwickelten Methoden im Labor etablieren zu können, und für Kontrollzwecke, ist Referenzmaterial nötig (biologisches Material und daraus abgeleitetes Material; umfasst die genomeditierte Pflanze und/oder die Elternlinie/das Ausgangsmaterial). Falls bereits ein Antrag für die Zulassung als Lebens- und Futtermittel oder für den Anbau gestellt wurde, hat der Antragsteller Referenzmaterial zur Verfügung zu stellen. Für GMO ohne Zulassungsan-

trag kann die Verfügbarkeit von Referenzmaterial durch eine zentrale Stelle (z.B. das Joint Research Centre, JRC) in Kooperation mit den Entwicklern sichergestellt werden. Sollte biologisches Material nicht verfügbar sein, können anhand von Sequenzinformationen, sofern verfügbar, auch Plasmide mit den entsprechenden DNA-Sequenzen synthetisch hergestellt werden und als Referenzmaterial dienen.

Forschungsbedarf besteht vor allem bei der Methodenentwicklung, der Charakterisierung der Anwendungen der Genomeditierung (nicht-beabsichtigte Modifikationen, Spezifika, Erkennungssequenzen, etc.) und der Entwicklung von Datenbanken für Pan-Genome, um diese langfristig in Kontrolllabors nutzen zu können. Es wird empfohlen, diese Arbeiten über europäische Forschungsförderungsprogramme sowie über Mandate an das JRC und die EFSA zu finanzieren.

Summary

In the EU, genetically modified organisms (GMOs) are subject to the authorization requirements of Directive 2001/18/EC or Regulation (EC) No. 1829/2003. Application for authorization of a genetically modified plant requires description of identification and detection methods. Those methods are used by control laboratories of the Member States to detect and identify genetically modified plants and to quantify their occurrence in food and feed. In its ruling of July 25, 2018 (C-528/16), the European Court of Justice determined that plants produced with directed mutagenesis (genome editing) are covered by the regulations under Directive 2001/18/EC on the release and placing on the market of GMOs. For control laboratories this poses specific challenges for detection, identification and quantification of genome-edited plants.

Genome editing techniques allow targeted modifications at predefined sites in the genome of organisms. They belong to the "novel genomic techniques (NGT)", defined as "techniques capable to change the genetic material of an organism and that have emerged or have been developed since 2001". The possible detection of genome-edited GMOs depends on the type of modification achieved and whether (transgenic) foreign DNA or genome-editing components may have been integrated into the plant genome. For detection, small mutations (point mutations) pose the greatest challenge. In this report, based on the currently used methods for the detection of classical GMOs, the existing possibilities and challenges for genome-edited plants are discussed.

Detection of even very small sequence differences, such as point mutations, is possible with the current technical equipment of a control laboratory. Optimization steps (primer/probe design, thermal profiles) may be required to increase sensitivity. To transfer detection methods into routine operation, the methods have to be validated. A characteristic-unique modification or the combined detection of multiple modifications in a tested genome may allow the identification of genome-edited plants. Quantification of these analytical results by currently available methods is technically possible using certain approaches.

Accurate information on the modification made is the most important prerequisite for the development of methods for detection, identification and quantification of genome-edited GMOs. Such information could be gathered from publicly available sources. It is recommended combining information from different public documents, including scientific publications, patents and regulatory documents from third countries. This information could be gathered in databases maintained by international organizations. Existing databases, such as the Biosafety Clearing House under the Cartagena Protocol on Biosafety or EUGenius, could serve as a model for an international database for sharing information on globally marketed NGT products. It is recommended to establish such a database, maintained at the international level, to provide easy access for control laboratories to all relevant information.

In order to be able to establish the developed methods in the laboratory, and for control purposes, reference material is necessary (biological material and derived material; includes the genome-edited plant and/or the parental line/starting material). Upon application for food, feed, or cultivation purposes, the applicant shall provide reference material. For GMO without application, the availability of reference material can be ensured by a central body (e.g., the Joint Research Centre, JRC) in cooperation with the developers. If biological material is not available, plasmids with the corresponding DNA sequences can also be synthesized based on sequence information, if available, and serve as reference material.

Research is needed primarily in method development, characterization of genome editing applications (non-intended modifications, specificities, recognition sequences, etc.), and in

the development of databases for pan-genomes to be used in control laboratories in the long term. It is recommended that this work be funded through European research funding programmes and through mandates to JRC and EFSA.

1 Klassische Gentechnik und genomeditierte gentechnisch veränderte Organismen

1.1 Einleitung

Bei den Verfahren der klassischen Gentechnik wird genetisches Material, zumeist aus Fremdorganismen, mit Hilfe geeigneter Transformationsmethoden auf Zielorganismen übertragen (transformiert) um neuartige Eigenschaften zu erzeugen. Die kommerzielle Anwendung der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung begann in den frühen 1990er Jahren. Seither wurden eine ganze Reihe von neuen gentechnischen Verfahren entwickelt, die gemäß Definition der Europäischen Kommission als Neuartige Genomische Verfahren (NGT) bezeichnet werden. Zu diesen NGT zählen jene gentechnischen Verfahren, die seit 2001 genutzt werden (Europäische Kommission 2020).

Im Zuge dieses Berichts werden Fragestellungen in Bezug auf den Nachweis und die Identifizierung von genetischen Modifikationen diskutiert, die durch die Anwendungen der folgenden NGT entstanden sind:

- Intra- und Cisgenese
- Meganukleasen
- Zinkfingernukleasen (ZFN)
- Transcription Activator-like Effector Nuclease (TALEN)
- Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein (CRISPR/Cas)
- Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (ODM)
- Base Editing
- Prime Editing

Techniken der Genomeditierung gehören zu jenem Teilbereich der NGT, mit dessen Hilfe Genveränderungen an vordefinierten Stellen im Genom durchgeführt werden können. Das Resultat sind genomeditierte gentechnisch veränderte Organismen (GVO). Die wichtigsten dieser Techniken beruhen auf dem Einsatz von ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, ODM, Base Editing und Prime Editing.

1.2 Klassische Gentechnik

Die ersten durch klassische gentechnische Verfahren erzeugten Pflanzen wurden in der EU im Jahr 1994 auf den Markt gebracht (EC 1994). Im Bereich der Pflanzenzüchtung werden bei der klassischen Gentechnik transgene Elemente in das Genom von Kulturpflanzen eingefügt. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um eine Kombination von Genen oder genregulatorischen Elementen, die von einem oder mehreren artfremden Organismen stammen. Die häufigsten dafür genutzten Methoden sind die Partikelkanone und die Agrobakterienvermittelte Transformation (Astwood et al. 2003). Das Ergebnis einer Übertragung von DNA-Sequenzen in das Genom eines Empfängerorganismus wird als Transformationsereignis (Event) bezeichnet. Ein solches Event ist durch das Einbringen der neuen genetischen Information an einer zufälligen, nicht vordefinierten Stelle des Zielgenoms gekennzeichnet. Dadurch ergibt sich eine einzigartige Kombination der neu eingebrachten Gensequenzen und der Sequenz des transformierten Zielgenoms. Jedes Transformationsereignis erfordert in der EU eine separate Prüfung und Zulassung, um auf den Markt zum Anbau oder zur Nut-

zung als z.B. Lebens- und Futtermittel zugelassen zu werden.

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Es entstehen gentechnisch veränderte Sequenzen, welche transgene Inserts (sogenannte Expressionskassetten) besitzen, die von pflanzeigenen DNA-Sequenzen flankiert werden. Diese molekularen Charakteristika sind eindeutig und erlauben Nachweis und Identifizierung einer gentechnisch veränderten (GV-) Pflanze.

1.3 Intragenese und Cisgenese

Intragenese und Cisgenese sind Techniken, bei welchen nur Gensequenzen aus kreuzbaren, d.h. sexuell kompatiblen Organismen zur Veränderung eines Zielgenoms verwendet werden (Schouten, Krens und Jacobsen 2006). Sie wurden bereits in der New Techniques Working Group diskutiert und zählen laut Definition der Europäischen Kommission zu den NGT (EC 2014; EC 2020a). Bei der Intragenese ist eine Neukombination funktioneller Genabschnitte (z.B. Enhancer, Promotoren) erlaubt, sofern alle Elemente aus einer kreuzbaren Pflanze stammen (Jacobsen und Schouten 2009). Bei cisgenen Pflanzen hingegen werden die aus sexuell kompatiblen Organismen entnommenen Sequenzen, typischerweise intakte Gene inklusive der zugehörigen regulatorischen Elemente, ohne Neukombination verwendet (Schouten, Krens und Jacobsen 2006; Ribarits et al. 2012).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Bei Intragenese und Cisgenese werden die Sequenzen wie bei der Transgenese an zufällig ausgewählten Loci in das Pflanzengenom integriert. In Kombination mit bestimmten Techniken der Genomeditierung können cisgene oder intragene Sequenzen auch an vordefinierten Stellen im Zielgenom integriert werden, was den Nachweis der Veränderung erschweren kann.

1.4 Nukleasetechniken

Meganukleasen, ZFN, TALEN und CRISPR/Cas nutzen Effektormoleküle mit Nukleaseaktivität und führen so zu zielgerichteten Veränderungen im Empfängerorganismus. Endonukleasen sind Enzyme, die eine Spaltung von Nukleinsäuremolekülen katalysieren und daher DNA-Doppelstrangbrüche auslösen. DNA-Doppelstrangbrüche werden über zelleigene Mechanismen umgehend repariert. Der dominante Reparaturprozess in eukaryotischen Zellen ist das „non-homologous end-joining“ (NHEJ), bei dem die beiden Enden unabhängig von der Sequenz wieder miteinander verbunden werden (Duensing et al. 2018). Es kann im Zuge der Reparatur zu kleinen DNA-Veränderungen in Form von Substitutionen, Deletionen oder Insertionen kommen (Zhu et al. 2017).

Ist eine homologe Sequenz (eine Matrize) vorhanden, dann kann ein DNA-Doppelstrangbruch auch mittels „Homology-directed repair“ (HDR) repariert werden. HDR wird genutzt, um, im Zuge der Anwendung von NGT, Mutationen an den gewünschten Stellen in Zielsequenzen herbeizuführen (Zhu et al. 2017). Die eingesetzten Nukleasetechniken unterscheiden sich in Aufbau, Spezifität, Effizienz und Einfachheit ihrer Handhabung (Jansing et al. 2019).

1.4.1 Meganukleasen

Auch der Einsatz von Meganukleasen führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen in Pflanzenzellen, mit deren Hilfe zielgerichtete Mutationen hervorgerufen werden können. Dabei handelt es sich um synthetische Versionen sogenannter Homing-Endonukleasen. Dies sind Endonukleasen mit erweiterten DNA-Bindungssequenzen (Djukanovic et al. 2013; Puchta und Fauser

2013). Im Gegensatz zu anderen Nukleasetechniken, die später entwickelt wurden, ist bei Meganukleasen die DNA-Bindungsdomäne identisch mit der Spaltungsdomäne (Zhu et al. 2017). Dadurch ist diese Technik wenig flexibel, und das Adaptieren der Bindungsspezifität der nativen Endonukleasen wird zu einem komplizierten Vorgang. Trotz diverser technischer Weiterentwicklungen bleibt die Herstellung von Meganukleasen für Zielsequenzen, die sich von den natürlichen Erkennungssequenzen unterscheiden, mit einem extremen technischen Aufwand verbunden (Hafez und Hausner 2012). Die Nutzung von Meganukleasen für die Genomeditierung von Organismen ist durch diese Limitierung stark eingeschränkt (Sander und Joung 2014; Modrzejewski et al. 2019).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Die Anwendung von Meganukleasen führt vorwiegend zu Deletionen und seltener zu Insertionen (Zhu et al. 2017).

1.4.2 Zink Finger Nukleasen

Im Zuge der Entwicklung von Nukleasetechniken zur zielgerichteten genetischen Veränderung der DNA von Zielorganismen (z.B. Pflanzen) wurden unter anderem Zink Finger Nukleasen (ZFN) entworfen. Bei dieser Technik der Genomeditierung wird eine unspezifische Spaltungsdomäne des Restriktionsenzym *FokI* mit einer zielspezifischen Erkennungssequenz eines Zink Finger-Proteins verknüpft (Ribarits et al. 2012).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

ZFN führen durch ihre *FokI*-Nukleasen zu lagespezifischen DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese werden durch NHEJ repariert, was in der Regel zu kleinen Indels (Insertionen, Deletionen) führt (Razzaq et al. 2019). In einer Analyse einer großen Anzahl von ZFN-Studien durch Kim, Kweon und Kim (2013) wurde die mutierte Zielsequenz von 175 Pflanzenevents untersucht. Es wurde herausgefunden, dass in den überwiegenden Fällen Deletionen entstanden sind. Des Weiteren führten ZFN zu ca. 15% Insertionen sowie 30% komplexen Veränderungen (d.h. Deletionen plus Insertionen). Eine generelle Aussage zu unterschiedlichen ZFN-Mutationssignaturen konnte allerdings nicht getroffen werden (Kim, Kweon und Kim 2013).

1.4.3 Transcription Activator-Like Effector Nucleases

Im Gegensatz zu ZFN sind TAL-Effektoren in der Lage, ein einzelnes Nukleotid zu erkennen. Die künstlich erzeugten TAL-Effektordomänen werden so konstruiert, dass sie typischerweise zwischen 15 und 30 Nukleotide spezifisch binden können. TALEN-Konstrukte besitzen zwei Domänen und binden daher an bis zu 60 Nukleotide, was eine höhere Spezifität bedeutet als bei ZFN (Jansing et al. 2019). Andererseits sind größere TAL-Effektormoleküle auch anfälliger für Fehlbindungen („Mismatches“) (Guilinger et al. 2014).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Es wurde festgestellt, dass TALEN in der großen Mehrzahl der Fälle zu Deletionen bei genomeditierten Pflanzen führte. Nur eine geringe Zahl an komplexen Veränderungen (ca. 10%) oder Insertionen wurde beobachtet (Kim, Kweon und Kim 2013).

1.4.4 CRISPR/Cas

Im Gegensatz zu den anderen Nukleasetechniken erfolgt die Erkennung der Zielsequenz bei CRISPR/Cas nicht Protein- sondern RNA-basiert (Jinek et al. 2012; Duensing et al. 2018). Üblicherweise wird ein Cas-Protein durch eine Single Guide RNA (sgRNA) an die Erkennungsstelle transferiert und schneidet dort den DNA-Doppelstrang (Ma et al. 2015). CRISPR/Cas wird als Genomeditierungstechnik mit dem größten Potenzial bezeichnet

(Zhang et al. 2014). Dafür spricht, dass sich diese Technik durch eine große Flexibilität in der Anwendung auszeichnet und relativ leicht für verschiedene Anwendungszwecke angepasst werden kann (Duensing et al. 2018).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Aus CRISPR/Cas-Anwendungen resultierende Veränderungen sind Substitutionen, Indels, Gen-Inserts durch die Verwendung von Matrizen, Gen-Konversionen und Kombinationen wie z.B. Insert plus Indel (Bortesi et al. 2016).

1.5 Sonstige Techniken der Genomeditierung

1.5.1 Oligonucleotide-Directed Mutagenesis

ODM-Techniken benutzen Oligonukleotide als Effektormoleküle ohne Nukleaseaktivität. Es werden daher keine Doppelstrangbrüche im Zielgenom hervorgerufen. ODM basiert auf synthetischen Oligonukleotiden, die im Zellkern an einer bestimmten Zielsequenz andocken (Van Vu et al. 2019). Die Oligonukleotide dienen als Matrize und besitzen Sequenzunterschiede im Bereich weniger Basenpaare im Vergleich zur Zielsequenz.

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Durch Basenfehlpaarung wird der HDR-Reparaturmechanismus angeregt und es können Mutationen von wenigen Basenpaaren nach dem Muster der eingebrachten Matrize erzeugt werden (Sauer et al. 2016; Songstad et al. 2017). Zusätzlich gibt es kombinatorische Ansätze, bei denen ODM-Techniken und Nukleasetechniken wie CRISPR/Cas gleichzeitig angewandt werden, um die Effizienz der Mutationsauslösung zu erhöhen (Sauer et al. 2016).

1.5.2 Base Editing

Als Base Editing wird eine Technik der Genomeditierung bezeichnet, die einer abgewandelten CRISPR/Cas-Technik entspricht. Base Editing-Techniken benutzen Cas9-Nickase (nCas9) oder deaktivierte Cas-Proteine (dCas) gekoppelt mit Deaminase-Enzymen. Es werden keine DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt (Platt 2019; Qin et al. 2020), sondern es können mithilfe der Deaminase Basenpaare ausgetauscht werden. Ein Cytosin-Guanin-Basenpaar kann gegen ein Thymin-Adenosin-Basenpaar getauscht werden und vice versa. Ein Austausch eines Cytosin-Guanin-Basenpaar durch ein Guanin-Cytosin-Basenpaar ist beispielsweise nicht möglich (Rees und Liu 2018).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Base Editing kann Punktmutationen mit großer Effizienz durchführen, und das Auftreten von unerwünschten Indels oder anderen nicht-beabsichtigten genetischen Modifikationen ist seltener als bei CRISPR/Cas-Systemen (Ravindran 2019). Genauso wie CRISPR/Cas ist auch Base Editing abhängig von einer vorhandenen „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM)-Sequenz (Qin et al. 2020).

1.5.3 Prime Editing

Prime Editing ist – ähnlich wie Base Editing – eine abgewandelte Technik des CRISPR/Cas-Systems. Bei Prime Editing wird eine Cas9-Nickase mit einer Reverse Transkriptase verknüpft. Die Nickase führt nur sequenzspezifische DNA-Einzelstrangbrüche ein, es entsteht kein Doppelstrangbruch (DSB). Das freie 3'-Ende des Einzelstranges wird danach über eine Primer-Sequenz genomeditiert. Dazu ist eine gRNA-Matrize erforderlich, welches als Vorlage für die DNA-Synthese dient (Ravindran 2019). Am Schluss wird das vorhandene "Mismatch" zwischen 5'- und 3'-Einzelstrang durch zelleigene Reparaturvorgänge bereinigt.

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Die genomeditierte DNA-Sequenz bleibt intakt (Platt 2019). Prime Editing-Systeme sind prinzipiell in der Lage, ein Nukleotid gegen jedes andere auszutauschen. Sie sind damit flexibler als Base Editing-Systeme. Auch sie setzen das Vorhandensein einer PAM-Sequenz voraus (Ravindran 2019).

1.6 Kategorisierung der Techniken der Genomeditierung

Durch Genomeditierung können zielgerichtete Veränderungen im Erbgut von Organismen in relativ kurzer Zeit verwirklicht werden. Dabei sollen unerwünschte Nebeneffekte minimiert werden. Es wird angestrebt, durch Rückkreuzungen und anschließende Selektion keinerlei Veränderungen, außer der erwünschten, im Genom zu hinterlassen.

Der mögliche Nachweis von genomeditierten GVO hängt davon ab, welche Art der Modifikation erzielt wurde und ob gegebenenfalls Fremd-DNA oder Komponenten zur Genomeditierung ins Pflanzengenom integriert wurden.

Die Nukleasetechniken werden auf Grund ihres Wirkmechanismus und der damit verbundenen genetischen Veränderungen in verschiedene Typen von „Site-Directed Nuclease Techniques“ (SDN) eingeteilt: SDN-1, SDN-2 und SDN-3 (EFSA 2012; Van Vu et al. 2019).

1.6.1 SDN-1

Auf SDN-1 basierende Ansätze erzeugen DNA-Doppelstrangbrüche an vordefinierter Stelle, die durch zelleigene Reparaturmechanismen (in Eukaryoten in der Regel durch NHEJ) beseitigt werden. Nukleasetechniken wie ZFN, TALEN, CRISPR/Cas und Meganukleasen können als SDN-1 wirken (Gao et al. 2010; Djukanovic et al. 2013; Vouillot, Thelie und Pollet 2015). Dieser Prozess kann zu kleineren Mutationen oder Indels im Genom führen.

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Die häufigsten genetischen Modifikationen, die durch SDN-1 ausgelöst werden, sind Deletionen (Kim, Kweon und Kim 2013). Generell sind aber auch Insertionen, Substitutionen oder Kombinationen der genannten Veränderungen möglich. Meganukleasen erzeugen in der Regel etwas größere Deletionen (oder manchmal auch Insertionen) als die anderen Nukleasetechniken. Allerdings können auch ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, die als SDN-1 fungieren, größere Indels im Bereich von 100-300 Basenpaaren (bp) erzeugen, aber diese Ereignisse sind seltener (Zhu et al. 2017).

1.6.2 SDN-2

Im Gegensatz zu SDN-1 wird bei SDN-2-Anwendungen zusätzlich zum Nukleasekomplex eine Matrize (Reparatur-DNA) in die Pflanzenzelle eingeschleust. Durch den HDR-Mechanismus wird der Doppelstrangbruch repariert und mittels Matrize der gewünschte Mutationstyp produziert. Anschließend wird die Matrize im Zellkern abgebaut.

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Das mögliche Spektrum der SDN-2-induzierten Veränderungen im Genom reicht vom Austausch eines oder weniger Basenpaare bis zu kurzen Insertionen oder Deletionen (Podevin et al. 2013). ZFN, TALEN, CRISPR/Cas und Meganukleasen können sowohl unter den Typ SDN-1 als auch SDN-2 fallen (Zhu et al. 2017).

1.6.3 SDN-3

Bei SDN-3-Anwendungen werden Nukleasen eingesetzt, um DNA-Abschnitte bis hin zu gan-

zen Genen in das Erbgut von Zielorganismen über eine entsprechend konstruierte rekombinante Reparaturmatrize zu integrieren (Grohmann et al. 2019).

Für den Nachweis relevante Charakteristika:

Generell sind die resultierenden genetischen Inserts ähnlich denen, die in transgenen, intragenen oder cisgenen Pflanzen zu finden sind. Allerdings kann durch SDN-3 die integrierte DNA an vordefinierter Stelle im Genom platziert werden. Dadurch ist es möglich natürlich vorkommende Gene auszutauschen oder natürliche Promotoren durch leistungsfähigere zu ersetzen (Wang, La Russa und Qi 2016).

1.6.4 Techniken, die nicht als SDN gelten

ODM Techniken sind definitionsgemäß keine SDN-Anwendungen, weil sie keine Nukleaseaktivität besitzen. Sie sind aber vergleichbar mit SDN-2, denn es werden Matrizen benutzt und sie führen vorwiegend zu minimalen genetischen Modifikationen wie Punktmutationen (Pacher und Puchta 2017). ODM kann aber auch kleinere Substitutionen, Insertionen oder Deletionen hervorbringen (Van Vu et al. 2019).

Base Editing- und Prime Editing-Techniken besitzen per Definition ebenfalls keine Nukleaseaktivität und fallen somit auch nicht unter die SDN-Anwendungen (Pacher und Puchta 2017; Platt 2019). Bei Base Editing und Prime Editing ist die Basenpaar-Änderung quasi "vorprogrammiert" und erfolgt nicht auf rein zufälliger Basis (Ravindran 2019). Es besteht daher eine Ähnlichkeit mit SDN-2.

2 Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von klassischer Gentechnik

2.1 Gesetzliche Vorgaben und Normung

Die Zulassung, Kennzeichnung und Kontrolle von GVO inklusive GV-Pflanzen ist in der EU streng geregelt. Zur Umsetzung der Vorgaben wurden zusätzlich Durchführungsverordnungen und Empfehlungen veröffentlicht (EC 2020b).

Die Kontrolle hinsichtlich der Vermarktung von GVO ist in der EU in der Verordnung (EU) 625/2017 geregelt und verlangt einheitliche Kontrollmaßnahmen in den Mitgliedsstaaten, unabhängig von den Zulassungsverfahren nach der Richtlinie (EU) 2001/18 beziehungsweise der Verordnung (EU) 1829/2003. Die Kontrollmaßnahmen zur Überprüfung der korrekten Kennzeichnung von GVO und zur Vermeidung des Auftretens von nicht zugelassenen GVO werden von nationalen Referenzlabors (NRLs) oder amtlichen Labors der Mitgliedstaaten durchgeführt, welche von den zuständigen Behörden zu nominieren sind.

Das EU Referenzlabor für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel (EURL GMFF) ist verantwortlich für die Validierung der Nachweisverfahren, die durch die Antragsteller eingereicht werden müssen. Die Durchführungsverordnung (EU) Nr. 503/2013 der Kommission verlangt von den Antragstellern zur eindeutigen Identifizierung eines GVO die Bereitstellung eines eventspezifischen Verfahrens. Für die Etablierung der Methoden in den amtlichen Laboratorien ist von den Antragstellern zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung zu stellen. Unterstützt wird das EURL dabei vom Europäischen Netzwerk für GVO-Laboratorien (ENGL). Gemeinsam wurde ein Nachschlagewerk für die Methodenanforderungen („Minimum performance requirements“) erarbeitet (ENGL 2015).

Die Minimalanforderungen gelten auch für element- und konstruktsspezifische Verfahren (Screening-Verfahren), welche nicht durch das EURL validiert wurden. Anforderungen aus international harmonisierten Standards (Normen) sind zu berücksichtigen (ENGL MPR).

Laut Verordnung (EU) 625/2017 („Kontrollverordnung“) sollten amtliche Laboratorien für die Verwendung der im Zuge der GVO-Analytik eingesetzten Methoden nach der Norm EN ISO/IEC 17025 „Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien“ akkreditiert sein, damit die Ergebnisse solide und verlässlich sind. Die Methodenvvalidierung spielt dabei eine essentielle Rolle, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Validierung von Verfahren zum Nachweis, einschließlich der Probenahme und der Identifizierung der Transformationsereignisse im Rahmen des Zulassungsprozesses von GVO, obliegt dem EURL.

Methoden für Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von GVO sind in der EN ISO-Normenreihe „Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten“ enthalten (EN ISO 24276, 21569, 21570).

2.2 Nachweis

Der Nachweis ist das Auffinden einer gesuchten DNA-Sequenz durch entsprechende Methoden, derzeit i.d.R. Amplifikation mittels PCR-Verfahren (siehe Kapitel 3.3). Die etablierte GVO-Analytik unterscheidet je nach Beschaffenheit der detektierten DNA-Sequenz zwischen element-, konstrukt- und eventspezifischen Verfahren. Alternative Verfahren zum Nachweis von GVO (z.B. Proteinanalytik mittels ELISA) werden im vorliegenden Bericht wegen fehlender Praktikabilität nicht berücksichtigt. Die Entwicklung von Methoden für den Nachweis, die Identifizierung und die Quantifizierung von klassischen GVO beruht derzeit auf der Tatsache, dass Fremd-DNA aus einem Transformationsereignis vorhanden ist, sowie der einzigartigen Kombination der neu eingebrachten Gensequenzen und der Sequenz des transformierten Zielgenoms.

Um das Risiko von falsch positiven und/oder falsch negativen Ergebnissen auszuschließen, müssen geeignete Kontrollen zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation einbezogen werden (EN ISO 24276).

Herausforderungen:

Der Nachweis einer Zielsequenz bedeutet nicht automatisch den Nachweis eines GVO. Ist die Zielsequenz ein Element, welches von einem natürlichen Spenderorganismus stammt (z.B. Promotorsequenz, durch eine Virusinfektion der Zielpflanze), muss dessen Abwesenheit (z.B. spezifischer Test auf das Virus) überprüft werden.

2.2.1 Screening und Matrix-Approach

Das Screening nach zugelassenen und nicht zugelassenen GVO erfolgt durch einen PCR-Nachweis von Elementen und/oder Konstrukten, welche wiederholt in der Entwicklung von GVO eingesetzt werden. Die Selektionierung („das Screenen“) basiert auf dem Ausschluss potenziell vorkommender GVO, sobald ein negatives Screening-Ergebnis (= Screeningelement ist nicht nachweisbar) vorliegt. Mit der steigenden Zahl an Zulassungen, der unterschiedlichen Art an Probenmaterialien (z.B. Mischfutterprobe, Mais-Saatgut, verschiedenartige, verarbeitete Lebensmittel) und der damit verbundenen Komplexität ist es für ein Labor zielführend, die Screening-Strategie durch gezielte Kombination von Screening-Elementen daran anzupassen (Matrix-Approach). Durch die Kombination von mehreren Screening-Elementen kann der Untersuchungsumfang deutlich reduziert werden (Waiblinger et al. 2010; BVL 2018).

Zur Unterstützung der Labors bei der Auswahl von Screening-Elementen und als Nachschlagewerk stehen hierzu diverse Methodensammlungen (z.B. Kompendium des EU-Referenzlabors für GVO, EUginius Detektionsmethoden (JRC 2016; EUginius 2020a)) zur

Verfügung. Zur Simulation von Ergebnissen, z.B. welche GVO-Events von einem Screening-Element erfasst werden und welche nicht nachweisbar sind, werden kostenfreie online-tools angeboten (JRC 2014; Euginius 2020b).

Das Screening auf Vorhandensein von zugelassenen und nicht zugelassenen GVO kann auch durch eine DNA-Sequenzierung der Zielregion erfolgen, dabei bedient man sich bekannter Screening-Elemente klassischer GVO (Arulandhu et al. 2018).

Herausforderungen:

Als Screening-Elemente bieten sich Promotor- und Terminatorsequenzen an, welche häufig in Transformationsereignissen auftreten. Fehlen diese, wird ein Matrix-Ansatz zusehends uninteressant, da die Aussagekraft (Zahl der ausselektierten GVO) sinkt. Die Zahl der zugelassenen GVO ohne häufig eingesetzte Screening-Elemente ist in den letzten Jahren angestiegen. Für diese GVO ist der Matrix-Ansatz nicht anwendbar. Die chronologische Entwicklung des Screenings (seit 2004) ist in Abb. 1 dargestellt. Gezeigt ist die Anzahl der Events der Hauptkulturarten Mais, Soja und Raps, welche nicht durch das Screening erfasst werden. Es sind ausschließlich Events mit einem publizierten Nachweisverfahren (eventspezifische Methoden mit verfügbarem Referenzmaterial) berücksichtigt. Prognosen für die Zukunft sind schwierig, weil die Forschungs- und Entwicklungsstrategien der Saatgutunternehmen und Pflanzenzüchter nicht immer bekannt sind.

Auch bei Nachweis eines Screening-Elements kann dieses möglicherweise keinem GVO zugeordnet werden. In diesem Fall könnte ein nicht-zugelassener GVO vorliegen.

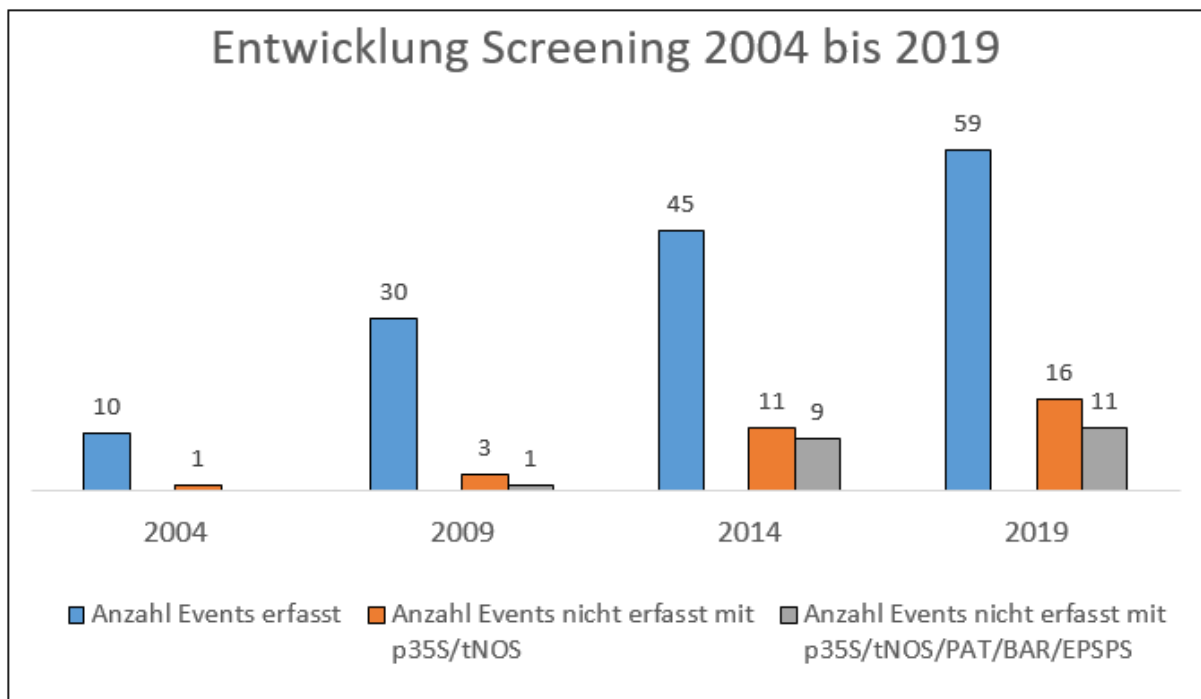


Abb. 1: Anzahl der durch die Detektion von Screening-Elementen (p35S, tNOS, PAT, BAR, EPSPS) nachweisbaren bzw. nicht nachweisbaren Events. Die linke Säule zeigt die Anzahl der insgesamt durch ein Screening erfassten Events, die beiden Säulen rechts zeigen die durch die typischen Screening-Elemente nicht erfassten Events. Dargestellt ist die jeweilige Anzahl in den Jahren 2004, 2009, 2014 und 2019.

2.3 Identifizierung

Die Identifizierung bedeutet den eindeutigen Nachweis eines Transformationsereignisses (eines Events). Das Transformationsereignis lässt sich anhand der beiden Übergangsberei-

che (border regions) zwischen der transformierten Fremd-DNA und der DNA der Rezeptor-Pflanze eindeutig unterscheiden beziehungsweise identifizieren, da diese Übergangsbereiche eine charakteristische DNA-Sequenzabfolge aufweisen.

Herausforderungen:

Der Nachweis eines GVO ist gegebenenfalls möglich. Die eindeutige Identifizierung ist nur möglich, wenn Informationen über die getätigte Veränderung (Sequenzdaten) (z.B. aus Unterlagen zur Zulassung des entsprechenden Events) vorliegen oder ermittelt werden können.

2.4 Quantifizierung

Das Prinzip der quantitativen Bestimmung besteht üblicherweise in der Ermittlung des Verhältnisses (angegeben in Prozent) einer spezifischen gentechnisch veränderten DNA-Sequenz zur Taxon-spezifischen Zielsequenz. Die Methode der Wahl ist die relative Quantifizierung. Die Validierung von quantitativen Verfahren erfordert die messtechnische Rückführung des Ergebnisses auf eine Einheit des internationalen Einheitensystems (z.B. auf Gewichtsprozent eines zertifizierten Referenzmaterials). Im Falle der GVO-Analytik erfolgt das durch die Verwendung von zertifiziertem GVO-Referenzmaterial.

Alternativ können auf einer statistischen Auswertung beruhende Verfahren zur Quantifizierung von PCR-Ergebnissen zum Einsatz kommen (JRC 2019). Siehe auch ISO 22573.

Herausforderungen:

Wenn keine konstrukt- oder eventspezifischen Informationen, z.B. Sequenzdaten, für einen GVO vorliegen, ist die Quantifizierung nicht möglich.

3 Nachweis, Identifizierung und Quantifizierung von genomeditierten GVO

3.1 Definitionen und gesetzliche Vorgaben

3.1.1 Gesetzliche Vorgaben und Normung

Genomeditierte Organismen sind seit dem EuGH-Urteil (EuGH 2018) als GVO eingestuft und unterliegen damit den geltenden Vorgaben der Europäischen Union für GVO.

Aktuell sind für genomeditierte Pflanzen beziehungsweise deren Nachweis keine standardisierten Methoden veröffentlicht. Es gelten die prinzipiellen Anforderungen an Überwachungs-laboratorien gemäß EN ISO 17025. Eine publizierte Methode wird derzeit durch das ENGL evaluiert (ENGL 2020).

Normentwürfe zu den allgemeinen Anforderungen bei Verwendung von Sequenzierungsverfahren sind in Ausarbeitung. Die Normen werden allgemeine Kriterien und Definitionen, sowie Minimalanforderungen an die Leistungsfähigkeit der Methoden enthalten. Diese Kriterien bilden die Grundlage für die Validierung und Standardisierung der entwickelten Methoden.

3.1.2 Nachweis von mit Hilfe von NGT hergestellten Pflanzen und Produkten

Nachweis mittels genotypischer Verfahren bedeutet das Auffinden einer DNA-Zielsequenz in einem zu kontrollierenden Produkt. Diese Zielsequenz muss nicht notwendigerweise spezifisch für ein genomeditiertes Event sein. Ein NGT-Event ist, in Anlehnung an ENGL (2019), eine mittels NGT veränderte DNA-Sequenz. Der Fokus beim Nachweis liegt nicht auf der eindeutigen Zuordnung zu einer bestimmten Editierungstechnik.

3.1.3 Screening und Matrix-Approach

Ein Screening beziehungsweise der Matrix-Approach ist nur anwendbar, wenn die gewählten Screeningelemente in den genomeditierten Genomabschnitten vorkommen. Experimentelle Daten zum erfolgreichen Screening von genomeditierten Pflanzen liegen aktuell nicht vor. Das Fehlen von gängigen Screeningelementen könnte durch das Aufspüren charakteristischer Modifikationen in Zusammenhang mit spezifischen Erkennungssequenzen (z.B. in der Umgebung von PAM-Sequenzen) ersetzt werden. Deren Einsatz muss in der Praxis noch erprobt werden (ENGL 2019).

3.1.4 Identifizierung von mit Hilfe von NGT hergestellten Pflanzen und Produkten

Die Identifizierung eines NGT-Events bedeutet den Nachweis der Genomeditierung inklusive der eindeutigen Zuordnung zu diesem Event. Die mögliche Identifizierung von genomeditierten GVO hängt davon ab, welche NGT angewandt wurde und ob gegebenenfalls Fremd-DNA oder Komponenten zur Genomeditierung ins Pflanzengenom integriert wurden. Eine etwaige Identifizierung von NGT ist daher abhängig vom erfolgten Umfang der Sequenzänderung.

Die Identifizierung einer durch NGT hergestellten Pflanze kann durch den Nachweis der Nucleotidänderung(en) erfolgen, sofern gezeigt werden kann, dass die Änderung einmalig auftretend (unique) und für die Modifikation mittels NGT charakteristisch ist. Dieser Prozess der Identifizierung beinhaltet auch die eindeutige Zuordnung zu einem spezifischen Produkt und einem Hersteller, und somit die Unterscheidung zu anderen Produkten. Dabei wird nicht unterschieden mit welcher Methode die Mutation entstanden ist.

3.1.5 Quantifizierung von NGT

Die Quantifizierung eines NGT-Events ist die Ermittlung des Verhältnisses der genomeditierten DNA-Sequenz zur Taxon-spezifischen Zielsequenz. Zur Einhaltung der EU-Vorgaben hinsichtlich der Kennzeichnung von zugelassenen Events (Schwellenwert von 0,9% m/m) und der Anforderungen für Futtermittel im Zulassungsprozess beziehungsweise nach Ablauf der Zulassung (Mindestleistungsgrenze von 0,1% m/m) ist eine Quantifizierung auch von mit Hilfe von NGT hergestellten Pflanzen und Produkten notwendig. Die Anwendbarkeit der Quantifizierung unter den aktuellen EU-Vorgaben ist in der Praxis noch nicht gezeigt worden.

3.1.6 Referenzmaterial

In diesem Bericht wird unter Referenzmaterial biologisches Material (z.B. Blattmaterial, Saat- und Pflanzgut, Mahlgut) oder daraus abgeleitetes Material (z.B. DNA-Extrakte und Plasmide, hergestellt aus dem biologischen Material; Referenzsequenzen) verstanden. Für die Bestätigung einer Nachweisreaktion ist ausreichend charakterisiertes Referenzmaterial nötig. Für die Quantifizierung ist darüber hinaus zertifiziertes Referenzmaterial mit definierten Mengenteilen an nachzuweisenden Sequenzen nötig (eine Ausnahme ist die digitale PCR, siehe 3.3.5). Zertifiziertes Referenzmaterial ist durch ein messtechnisch gültiges Verfahren charakterisiert. Wie für die Quantifizierung von herkömmlichen GVO gilt das auch im Fall von genomeditierten GVO (JRC 2019).

3.2 Vorgehen bei Auswahl potenzieller Nachweismethoden

Bei der Recherche und nachfolgenden Auswahl von potenziell für den Nachweis von NGT-Pflanzen und Produkten geeigneten Methoden wurden nur jene berücksichtigt, die in anderen Anwendungsbereichen (z.B. Allel-Diskriminierung) für die Unterscheidung von sogenannten Einzelnucleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) erfolgreich

verwendet wurden. Die Suche erfolgte gezielt nach Publikationen, welche den Nachweis von SNP beschreiben (siehe Anhang C, Tab. C.1). Methoden wie Restriction Enzyme Analysis PCR, Kompetitive Allele Specific PCR, T7-Nuclease Assay oder Surveyor®-Assay, deren Leistungsfähigkeit schon in der Recherchephase als eingeschränkt eingestuft wurden, werden nachfolgend nicht mehr näher beschrieben.

Die in den Kapiteln 3.3 und 3.4 beschriebenen Methoden sind auch für den Nachweis von anderen Arten von Mutationen, die bei der Anwendung von NGT auftreten können, wie Deletionen und Insertionen oder den Austausch mehrerer Basen (Substitutionen) geeignet. Generell können Sequenzveränderungen, die mehrere Basen betreffen, oftmals mit den aktuell etablierten und in der GVO-Analytik eingesetzten Methoden nachgewiesen werden.

Die ausgewählten Methoden wurden auch hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit zur Detektion von einzelnen Nukleotidunterschieden in den Zielsequenzen beurteilt, da diese Form der Mutation zurzeit die größte Herausforderung an die Nachweismethodik stellt.

Für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit der beschriebenen Methoden wurden die folgenden Kriterien herangezogen:

- Spezifität/Selektivität: Kann die Methode die genomeditierte Veränderung zuverlässig nachweisen, ist die Methode zur Detektion von SNP geeignet?
- Sensitivität: Kann die Methode auch geringe Mengen von genomeditierten Sequenzen nachweisen? Kann die Methode die entsprechenden Zielsequenzen auch in komplexen Proben detektieren?
- Quantifizierung: Wäre eine quantitative Bestimmung des Gehalts an NGT-Bestandteilen von $\leq 0,9\%$ möglich?
- Validierung: Sind Richtlinien zur Validierung der Methode verfügbar?
- Technische Anforderungen: Welche Anforderungen hinsichtlich der gerätetechnischen Ausstattung, der personellen Kompetenz sowie bioinformatische Ressourcen ergeben sich durch die Anwendung der Methode in einem Kontrolllabor?

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Nachweisverfahren, die auf der Methode der Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) beruhen, werden im Moment am häufigsten zum Nachweis von GVO angewendet. Die gesuchten Genabschnitte werden mit Hilfe von kurzen, sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) und der Aktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) amplifiziert, die erfolgreiche Amplifikation wird mit geeigneten Methoden sichtbar gemacht, wodurch das Vorhandensein der gesuchten Gensequenz bestätigt wird.

Alle nachstehend beschriebenen PCR-Methoden basieren auf dem Prinzip der quantitativen PCR (qPCR), auch wenn diese für den qualitativen Nachweis eingesetzt werden. Bei der qPCR handelt es sich um die zurzeit am häufigsten angewendete Methode zum Nachweis von (transgenen) GVO. Sämtliche Referenzmethoden des EURL GMFF basieren auf dieser Methode.

3.3.1 Real-time quantitative PCR

Bei der Real-time quantitative PCR (qPCR) wird die Amplifikation des gesuchten Sequenzbereichs durch die Kopplung mit einem Fluoreszenzsignal in Echtzeit („real-time“) sichtbar gemacht. Dabei kommen vor allem zwei unterschiedliche Prinzipien zur Anwendung.

- Interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe

Bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft, an doppelsträngige DNA (nicht aber an einzelsträngige DNA) zu binden beziehungsweise sich einzulagern. Durch die Amplifikation der Zielsequenz wird während der PCR die Menge an PCR-Produkten (doppelsträngige DNA) bei jedem Zyklus verdoppelt. Mit Fortlauf der PCR lagert sich immer mehr Fluoreszenzfarbstoff (z.B. SYBR® Green I) in die PCR-Produkte ein. Der Anstieg der Fluoreszenz kann in Echtzeit gemessen werden.

- Sonden-basierte Verfahren

Neben den beiden Primern, die für die Amplifikation der gesuchten DNA-Sequenz benötigt werden, sind weitere Primer zur Generierung des Fluoreszenzsignals in Einsatz. Auf Grund ihrer methodischen Robustheit und der einfachen Handhabung ist die TaqMan- oder Hydrolysesonden-PCR eines der am häufigsten im Routinebetrieb eingesetzten Sonden-basierten Verfahren. Die sogenannte TaqMan-Sonde, trägt einerseits am 5' Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (Reporter), andererseits am 3' Ende den sogenannten Quencher, der die vom Reporter abgegebene Energie absorbiert. Im Zuge der Verlängerung des DNA-Strangs während der PCR wird die Taqman-Sonde abgebaut. Es findet keine Energieübertragung mehr statt, dadurch kann das Fluoreszenzlicht des Reporters gemessen werden. Mit jedem weiteren PCR-Zyklus wird mehr Reporter freigesetzt, wodurch die Intensität der emittierten Fluoreszenz ansteigt. Da die Sonden-basierten Verfahren durch die Verwendung zusätzlicher Sonde(n) eine höhere Spezifität aufweisen, werden sie bevorzugt im Rahmen der amtlichen Kontrollen eingesetzt.

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Die TaqMan-PCR wird in einer Vielzahl von Publikationen für den Einsatz zur Allel-Diskriminierung bei SNP beschrieben (Ranade et al. 2001; Broccanello et al. 2018) und ist damit im Prinzip für den Nachweis von SNP geeignet. Da das Grundprinzip der TaqMan-PCR auf der selektiven Amplifikation durch die spezifisch an die Zielsequenz bindenden Primer/Sonde beruht, kann man davon ausgehen, dass ein entsprechender Nachweis der gesuchten Sequenz auch in einer Mischung verschiedenster DNA (Mischproben wie Lebens- und Futtermittel) möglich sein sollte. Mögliche Kreuzhybridisierungen der verwendeten Primer mit ähnlichen Sequenzen aus anderen Organismen müssen während der Methoden-etablierung beziehungsweise Validierung wie bei jedem herkömmlichen qPCR-System untersucht werden.

Einschränkungen:

Herkömmliche TaqMan-Systeme können nicht in jedem Fall die nötige Spezifität erreichen, um für den sicheren Nachweis von SNP herangezogen zu werden. Bei Mutationen, die mehrere Basen umfassen, dürfte aber diese Methode für die Detektion geeignet sein.

Sensitivität:

TaqMan-PCR-Systeme erreichen im Allgemeinen eine Nachweisgrenze von 5-10 Kopien der gesuchten Zielsequenz. Diese Nachweisgrenzen werden für gewöhnlich auch in Anwesenheit von mehreren Zehntausend nicht-modifizierten Genomkopien erreicht. Damit entspricht die zu erwartende Sensitivität den Anforderungen des ENGL für die Leistungsfähigkeit einer Referenzmethode zum Nachweis von GVO (ENGL 2015).

Quantifizierung:

Die Bestimmung des GVO-Gehalts beruht auf einer relativen Quantifizierung, bei der die Menge an GVO-spezifischen Anteilen in Relation zu den pflanzenspezifischen Anteilen ge-

setzt wird. Jeder der beiden Anteile wird mit einem eigenen PCR-System gemessen. Die Möglichkeit einer quantitativen Anwendung hängt daher bei einer Methode von deren Spezifität und Sensitivität ab. Eine verlässliche Quantifizierung von genomeditierten Bestandteilen ist möglich, wenn Spezifität und Sensitivität des qPCR-Systems die Anforderungen erfüllen (JRC 2015). Entsprechend den oben angeführten Einschränkungen ist das aber in vielen Fällen nicht möglich.

Validierung:

Wie erwähnt, basieren alle derzeitigen EU-Referenzmethoden für den Nachweis von (transgenen) GVO auf qPCR. Richtlinien für die Validierung von PCR-Verfahren in der GVO-Analytik sind verfügbar (ENGL 2015; Grohmann et al. 2016). Diese können auch auf die Validierung von PCR-Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen angewendet werden. Die Methode kann gemäß ISO 17025 akkreditiert werden.

Technische Anforderungen:

Die technische Ausstattung zur Durchführung von qPCR erfordert die Verfügbarkeit eines real-time PCR-Geräts. Derartige PCR-Geräte sowie die entsprechende Qualifikation des Personals sind in vielen amtlichen Laboren vorhanden und werden in der Routine bereits für diverse Anwendungen eingesetzt (Allergen-, GVO-Analytik, Bestimmung von humanpathogenen Erregern).

Bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors kann die qPCR durchführen.

3.3.2 High Resolution Melting PCR

Bei der High Resolution Melting (HRM) Analyse (siehe Abb. 2) wird der Umstand genutzt, dass selbst geringe Unterschiede in der Basenzusammensetzung von PCR-Produkten (z.B. Austausch einer Base oder Insertion/Deletion bei einer mutierten Sequenz) zu einem Unterschied in den Dissoziationsenergien der Basenpaarungen der beiden DNA-Stränge führen.

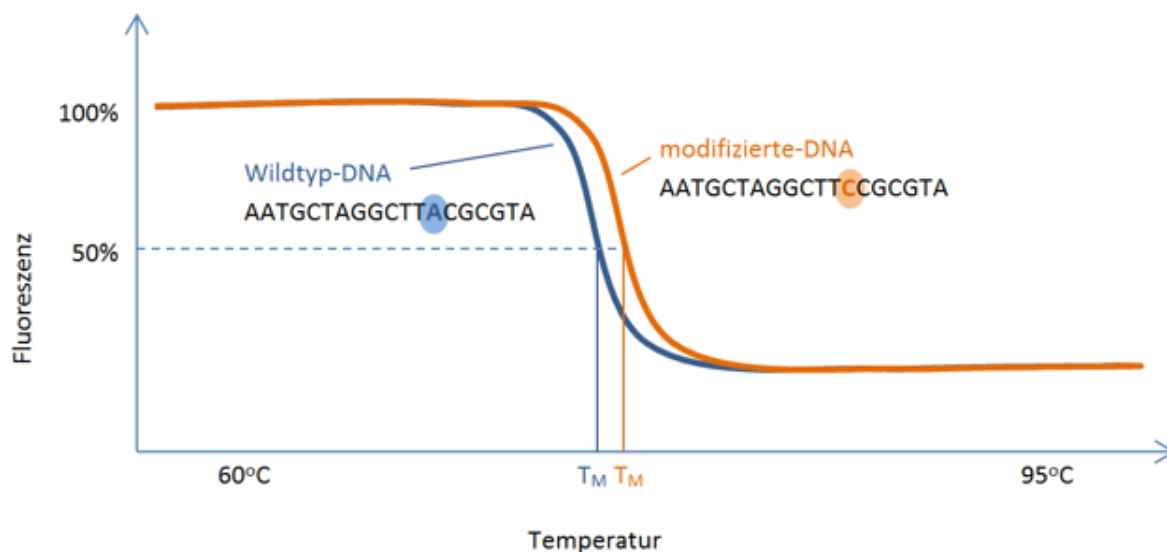


Abb. 2: High Resolution Melting. Detektion einer DNA-Modifikation durch Veränderung der spezifischen Schmelztemperatur. Am Ende der PCR wird die Temperatur von ca. 60°C (bei dieser Temperatur liegen PCR-Fragmente als Doppelstrang vor) kontinuierlich auf 95°C erhöht und parallel dazu das Fluoreszenzsignal gemessen. Sobald sich die Temperatur der Schmelztemperatur des entsprechenden DNA-Fragments nähert, beginnen sich die Doppelstränge zu trennen, und der interkalierende Farbstoff dissoziiert von der DNA. Dadurch kommt es zu einem Abfall der Fluoreszenz. Jene Temperatur, bei der die Fluoreszenz auf 50% gesunken

ist, wird als spezifische Schmelztemperatur (T_M) des betreffenden PCR-Fragments bezeichnet. Sie ist für die verschiedenen PCR-Fragmente charakteristisch und unterscheidet sich entsprechend der Basenunterschiede zwischen der mutierten und der nicht-mutierten Sequenz (Quelle: modifiziert nach LGL 2019).

In einem ersten Schritt wird eine qPCR mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Nach der PCR wird die Temperatur kontinuierlich auf bis zu 99°C erhöht um die DNA-Doppelstränge der PCR-Fragmente voneinander zu lösen. Sobald die Schmelztemperatur erreicht ist, kommt es zu einem Abfall der Fluoreszenz durch Abtrennung der interkalierenden Farbstoffe. Jene Temperatur, bei der die Fluoreszenz auf 50% gesunken ist, wird als spezifische Schmelztemperatur (T_M) des betreffenden PCR-Fragments bezeichnet. Sie ist für die verschiedenen PCR-Fragmente charakteristisch und unterscheidet sich entsprechend der Basenunterschiede zwischen der modifizierten und der nicht-modifizierten Wildtyp-Sequenz.

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Die HRM-Technologie wird in Publikationen auch für den Einsatz zur Allel-Diskriminierung bei SNP beschrieben (Druml und Cichna-Markl 2014; Li et al. 2020b) und ist damit im Prinzip für den Nachweis von Punktmutationen in genomeditierten GVO geeignet.

Einschränkungen: Da die Unterscheidung der beiden Schmelzkurven mit der mengenmäßigen Zunahme eines der beiden Allele zunehmend schwieriger wird, muss man vor allem bei Proben mit geringem Anteil an genomveränderten Produkt (z.B. geringe Mengen NGT-Raps in konventionellem Raps) davon ausgehen, dass HRM-PCR-Systeme nur begrenzt für den sicheren Nachweis von Einzelbasen-Modifikationen geeignet sind. Zudem muss erwähnt werden, dass nicht jeder Basenaustausch in der HRM- Analyse unterscheidbar ist.

Zu berücksichtigen ist bei der HRM-PCR weiterhin, dass Sequenzveränderungen, die zu einer Änderung der Schmelztemperatur führen, auch während der PCR selbst (abhängig von der Fehlerrate der verwendeten Polymerase) erfolgen können. Daher ist es empfehlenswert derartige PCR-bedingte Sequenzänderungen durch eine anschließende Sequenzierung der PCR-Fragmente auszuschließen.

Sensitivität:

Die Sensitivität von HRM wird in der Literatur mit ca. 2-5% angegeben (Daniels et al. 2015). Durch entsprechende Optimierungsschritte, wie z.B. die Verwendung von blocked probes, asymmetrischer Primer-Konzentration sowie Anpassung der Annealing-Temperatur zu Gunsten der gesuchten Modifikation, kann eine Sensitivität bis ca. 1% erreicht werden (Druml und Cichna-Markl 2014; Li et al. 2020b).

Quantifizierung:

Die Möglichkeit zur Quantifizierung steht bei der HRM-PCR in direktem Zusammenhang mit der Sensitivität, das heißt, mit der Möglichkeit, die Schmelzkurven der beiden PCR-Produkte klar voneinander zu unterscheiden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass in vielen Fällen trotz der oben genannten Optimierungsschritte eine ausreichende Sensitivität für Proben mit geringem Anteil an NGT von <0,9% nicht erreicht werden dürfte und nur eine grobe Abschätzung des Gehalts an genomeditierten Material in einer Probe möglich ist.

Validierung:

Richtlinien für die Validierung von PCR-Verfahren in der GVO-Analytik sind verfügbar (ENGL 2015; Grohmann et al. 2016). Diese können auch auf die Validierung von HRM-PCR-Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen angewendet werden. Die Methode kann gemäß ISO 17025 akkreditiert werden.

Technische Anforderungen:

Die technische Ausstattung zur Durchführung von HRM-PCR erfordert die Verfügbarkeit eines real-time PCR-Geräts. Derartige PCR-Geräte sowie die entsprechende Qualifikation des Personals sind in vielen amtlichen Laboren vorhanden und werden in der Routine bereits für diverse Anwendungen eingesetzt (Allergen-, GVO-Analytik, Bestimmung von humanpathogenen Erregern).

Bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors kann die HRM-PCR durchführen.

3.3.3 Nachweis durch qPCR mittels Locked Nucleic Acids

Eine Möglichkeit, die Spezifität von Primern und Sonden zu erhöhen, liegt in der Verwendung von Basen-Analogen, die die Stabilität der Basenpaarung erhöhen. Für die qPCR werden für diesen Zweck unter anderem Locked Nucleic Acids (LNA) eingesetzt, bei denen die erhöhte Stabilität der Basenpaarung durch eine geänderte Struktur in der Riboseeinheit vermittelt wird. Durch die Verwendung dieser LNA-Analoga an der Position der NGT-modifizierten Base kann die Spezifität der Primer beziehungsweise Sonden soweit erhöht werden, dass eine effiziente Amplifikation nur mit der modifizierten Zielsequenz möglich ist (You et al. 2006).

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Bei optimalem Primer/Sonden-Design und entsprechend angepassten Thermoprofilen für die PCR-Reaktion können mit dieser Methode SNP eindeutig identifiziert werden (Mouritzen et al. 2003; Johnson, Haupt und Griffiths 2004; Ugozzoli et al. 2004). Daher hat die LNA-Methode das Potential, NGT-Anwendungen vom Typ SDN-1 und SDN-2 zu detektieren. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde die Anwendung der LNA-basierten Sonden-PCR (TaqMan Sonde) für die Detektion des CIBUS Raps (Event 5715) demonstriert (Chhalliyil et al. 2020).

Sensitivität:

Daten aus der Literatur zeigen, dass die Sensitivität und die Nachweisgrenzen bei einer PCR mittels LNA-Primern mit jener von konventioneller PCR beziehungsweise qPCR vergleichbar ist (Bruge et al. 2009). Man kann davon ausgehen, dass die Nachweisgrenze bei diesen Verfahren im Bereich von 5-20 genomischen Zielsequenzen liegt. Da das Grundprinzip der LNA-PCR auf der selektiven Amplifikation durch den spezifisch an die Zielsequenz bindenden Primer(n) beruht, kann man außerdem davon ausgehen, dass ein entsprechender Nachweis der gesuchten Sequenz auch in einer Mischung verschiedenster DNA (Mischproben wie Lebens- und Futtermittel) möglich sein sollte.

Quantifizierung:

LNA qPCR kann auch zur quantitativen Bestimmung von Zielsequenzen in einer Probe genutzt werden. In einer Forschungsarbeit gelang es mittels LNA-Oligonukleotiden in Kombination mit einer Schmelzkurvenanalyse unterschiedliche Stämme von *Chlamydia pneumoniae*, die sich im Zielgen nur durch einen SNP unterscheiden, zu differenzieren (Rupp, Solbach und Gieffers 2006). Darüber hinaus konnten unterschiedliche Mengenverhältnissen der beiden Genotypen der Bakterien zutreffend bestimmt werden. Bei dem schon zuvor erwähnten Beispiel des Nachweises von CIBUS Raps mittels LNA qPCR konnten Proben bis zu einem quantitativen Verhältnis von 0,1% verlässlich analysiert werden (Chhalliyil et al. 2020).

Validierung:

Richtlinien für die Validierung von PCR-Verfahren in der GVO-Analytik sind verfügbar (ENGL

2015; Grohmann et al. 2016). Diese können auch auf die Validierung von LNA-basierten PCR-Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen angewendet werden. Die Methode kann gemäß ISO 17025 akkreditiert werden.

Technische Anforderungen:

Die technische Ausstattung zur Durchführung von PCR mittels LNA-Primern erfordert die Verfügbarkeit eines real-time PCR-Geräts. Derartige PCR-Geräte sowie die entsprechende Qualifikation des Personals sind in vielen amtlichen Laboren vorhanden und werden in der Routine bereits für diverse Anwendungen eingesetzt (Allergen-, GVO-Analytik, Bestimmung von humanpathogenen Erregern).

Bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors kann die LNA qPCR durchführen.

3.3.4 RNase H-abhängige real-time PCR

Die RNase H-abhängige real-time PCR (rhPCR) verwendet Primer mit einem speziellen Design (rhPCR-Primer) und ein spezielles RNase Enzym (thermophile RNase H aus *Pyrococcus abyssi*). RNase H ist ein Enzym, das RNA:DNA-Basenpaarungen spaltet. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, indem die bei der PCR verwendeten rhPrimer an der Position unmittelbar nach der gesuchten Modifikation eine RNA-Base und einen Bereich, der den Primer blockiert, enthält. Nur wenn dieser speziell designte Primer an die gesuchte Sequenz mit der Modifikation bindet, bildet sich das RNA:DNA-Basenpaar, das durch die RNase H gespalten wird. Durch diese Spaltung werden die RNA-Base und der blockierende Anteil entfernt, so dass die Primer jetzt für die Verlängerung in der nächsten Phase des PCR-Zyklus zur Verfügung stehen. Wie unter Kapitel 3.3.1 (Sonden-basierte qPCR) beschrieben, baut die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase eine Hydrolyse-Sonde ab und setzt den Fluoreszenzfarbstoff frei.

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Die RNase H-abhängige real-time PCR (Dobosy et al. 2011) hat das Potenzial die Spezifität beim Nachweis von SNP signifikant zu erhöhen. Die verbesserte Spezifität von rhPCR-Primern im Vergleich zu unmodifizierten Primern wird durch zwei Hauptmechanismen vermittelt. Erstens ist der Entblockungsschritt durch die RNase H empfindlich für die korrekte Basenpaarung und wird durch das Vorhandensein einer Basenfehlpaarung in der Nähe der Spaltstelle gehemmt. Diese RNase H-Spezifität minimiert die unspezifische Amplifikation eng verwandter Sequenzen durch die DNA-Polymerase. Zweitens erfordert die Entblockungsreaktion die Bildung einer RNA:DNA-Basenpaarung, wodurch die Bildung von Primer-Dimeren weitgehend verhindert wird.

Ein Vergleich von zwei etablierten PCR-Methoden zur SNP-Differenzierung (Kompetitive Allele Specific PCR (KASP), qPCR) mit der rhPCR zeigt, dass die rhPCR eine deutlich bessere Selektivität aufweist und die untersuchten SNP deutlich besser voneinander getrennt werden können (Broccanello et al. 2018; Ayalew et al. 2019). Durch die Verwendung von optimierten Enzymen ist laut Methodenentwickler eine noch bessere Allel-Unterscheidung, sprich Spezifität, möglich (Integrated DNA Technologies 2020). Man kann davon ausgehen, dass ein entsprechender Nachweis der gesuchten Sequenz auch in einer Mischung verschiedenster DNA (Mischproben wie Lebens- und Futtermittel) möglich sein sollte.

Sensitivität:

Es ist davon auszugehen, dass die mit einem rhPCR-System erzielte Nachweisgrenze sehr niedrig liegt und die Erfordernisse des ENGL an PCR-Methoden zum Nachweis von GVO (≤ 25 Kopien der Zielsequenz) erreicht werden.

Quantifizierung:

Auf Grund der Spezifität und der Sensitivität der rhPCR wird voraussichtlich mit einem entsprechend optimierten PCR-System eine quantitative Bestimmung auch von geringen Anteilen an genomeditierten Bestandteilen möglich ist.

Validierung:

Richtlinien für die Validierung von PCR-Verfahren in der GVO-Analytik sind verfügbar (ENGL 2015; Grohmann et al. 2016). Diese können auch auf die Validierung von rhPCR-Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen angewendet werden. Die Methode kann gemäß ISO 17025 akkreditiert werden.

Technische Anforderungen:

Die technische Ausstattung zur Durchführung von rhPCR erfordert die Verfügbarkeit eines real-time PCR-Geräts. Derartige PCR-Geräte sowie die entsprechende Qualifikation des Personals sind in vielen amtlichen Laboren vorhanden und werden in der Routine bereits für diverse Anwendungen eingesetzt (Allergen-, GVO-Analytik, Bestimmung von humanpathogenen Erregern).

Bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors kann die rhPCR durchführen.

3.3.5 Digitale PCR

Die digitale PCR (dPCR) stellt eine gerätetechnische Weiterentwicklung der qPCR dar.

In einem ersten Schritt wird, wie bei einer qPCR, ein Reaktionsgemisch aus Proben-DNA und PCR-Komponenten hergestellt. Dabei können sowohl interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe als auch Hydrolysesonden zur Anwendung kommen.

Anschließend werden das Reaktionsgemisch und die darin enthaltenen DNA-Moleküle in tausende Reaktionskammern aufgeteilt. Ziel ist, im Gegensatz zu einer konventionellen qPCR, nur ein einziges Zielmolekül pro Reaktionskammer zu erhalten. Diese Kompartimentierung kann entweder in Form eines Chips mit einer Vielzahl winziger Reaktionskammern oder bei der digitalen droplet PCR (ddPCR) durch eine Wasser-Öl-Emulsion erfolgen, wobei jedes Emulsionströpfchen einen Reaktionsraum darstellt, in dem die einzelnen PCR-Reaktionen stattfinden. Die Fluoreszenzmessung erfolgt am Ende der PCR (Endpunkt-PCR) in einem speziellen Lesegerät, welches ähnlich einem Durchflusszytometer die Fluoreszenz jedes einzelnen Emulsionströpfchens bestimmt. Kompartimente, die die Zielsequenz enthalten, geben ein positives Signal, jene ohne Zielsequenz ein negatives. Die Auswertung erfolgt daher nach einem Ja-oder-Nein-Prinzip (bzw. 0-1 Prinzip).

Aufgrund der massiven Partitionierung und getrennten Messung der einzelnen Tröpfchen können selbst einzelne Kopien eines Zielmoleküls detektiert werden (siehe Abb. 3).

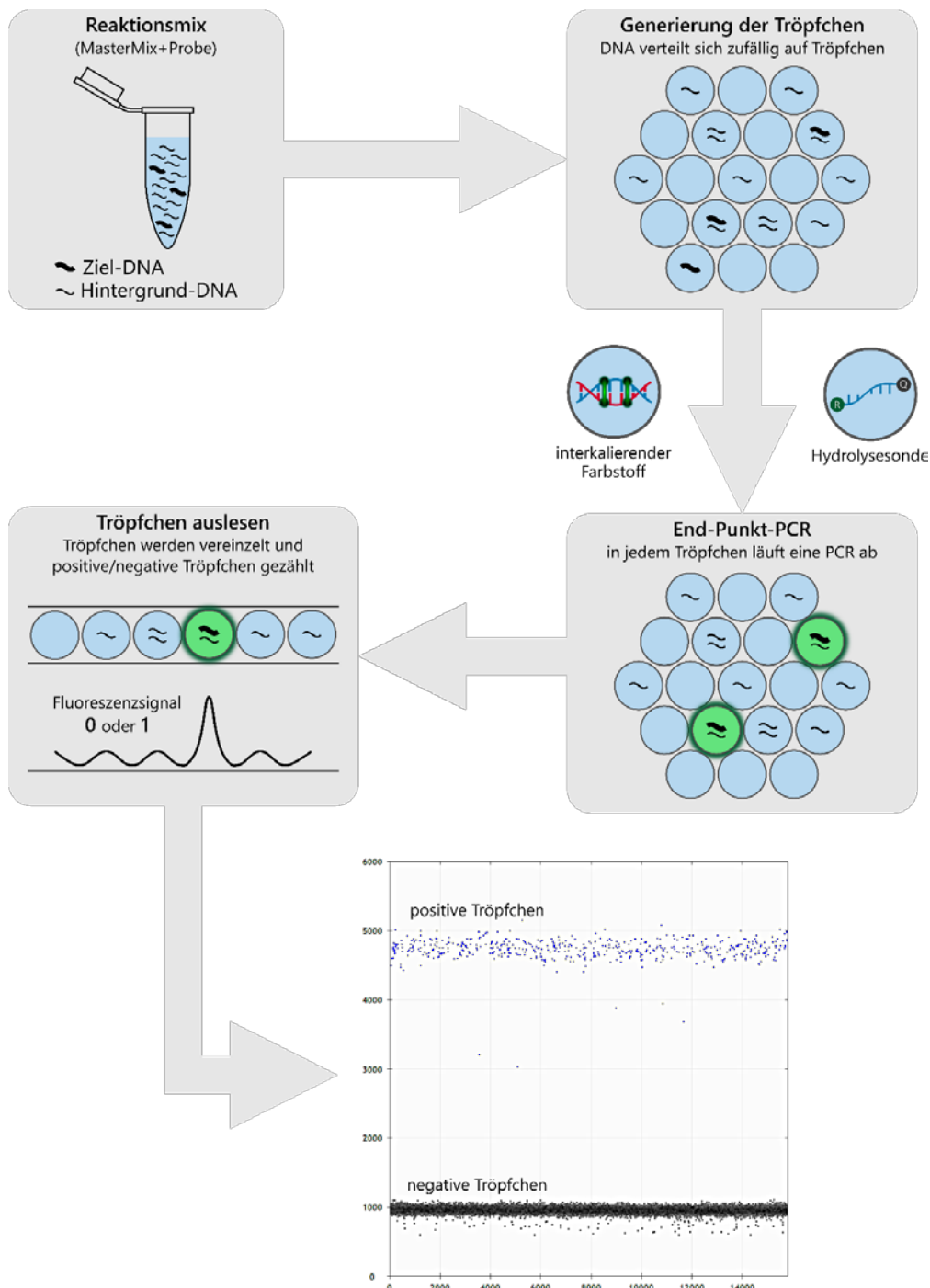


Abb. 3: Schematischer Ablauf der digitalen droplet PCR (ddPCR)-Methode. Das Reaktionsgemisch mit der Proben-DNA wird in mehrere tausend Emulsionströpfchen aufgeteilt, wobei jedes Tröpfchen möglichst nur ein Zielmolekül enthalten sollte. Es können sowohl interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe als auch Hydrolyse-Sonden verwendet werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgt im Anschluss an eine Endpunkt-PCR in einem speziellen Lesegerät, welches die Fluoreszenz jedes einzelnen Emulsionströpfchens bestimmt. Emulsionströpfchen, die die Zielsequenz enthalten haben, geben ein positives Signal, jene ohne Zielsequenz ein negatives. Die Auswertung erfolgt daher nach einem 0-1 Prinzip. (Quelle: LGL 2019)

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Mit der dPCR kann im Vergleich zur qPCR eine höhere Spezifität erreicht werden, da PCR-Inhibitoren, wie auch die Konkurrenz von Hintergrund-DNA und Zielmolekülen, kaum eine Rolle spielen (Miyaoaka et al. 2014; Findlay et al. 2016; Mock, Hauber und Fehse 2016).

Experimentelle Ansätze wie der Homology Directed Repair Genome Edit Detection (HDR GED) Assay, wie sie in Testkits der Firma Bio-Rad angewandt werden, erlauben vermutlich eine ausreichende Spezifität, um auch Sequenzen mit SNP in einer komplexen Mischprobe verlässlich zu detektieren. Man kann davon ausgehen, dass ein entsprechender Nachweis der gesuchten Sequenz auch in DNA-Mischproben (wie in Lebens- und Futtermitteln) möglich sein sollte.

Sensitivität:

Durch die hohe Anzahl an Einzelreaktionen (Reaktionskammern/Tröpfchen), die separat ausgewertet werden können, ist es möglich, eine sehr hohe Sensitivität der Methode zu erzielen.

Die Nachweisgrenze einer dPCR ist abhängig von der Anzahl der analysierten Einzelreaktionen und dem Gesamtvolumen dieser Einzelreaktionen. Im Fall einer ddPCR mit z.B. 17.000 auswertbaren Tröpfchen und einem durchschnittlichen Tröpfchenvolumen von 0,85 Nanoliter ergibt sich eine theoretische Nachweisgrenze von 0,29 Zielsequenzen/Mikroliter PCR-Reaktionsmix (JRC 2019).

Quantifizierung:

Die Anzahl der positiven Reaktionen ist proportional zur Gesamtzahl der in der Probe vorhandenen Zielmoleküle. Unter Berücksichtigung von verfahrenstechnischen Parametern (z.B. Verdünnung der Probe, Anzahl und Volumen der Reaktionsräume) und statistischer Grundlagen (Poisson-Verteilung) kann die Konzentration der Zielsequenz in der Ursprungprobe bestimmt werden.

Da es sich bei dPCR um ein Verfahren zur absoluten Quantifizierung handelt, sind keine Kalibrationsstandards notwendig. Dies ist vor allem im Hinblick auf die möglicherweise eingeschränkte Verfügbarkeit von zertifizierten Referenzmaterialien von besonderem Vorteil. Die Notwendigkeit von Kontrollmaterial für die Bestätigung der Nachweisreaktion bleibt aber bestehen. In der Literatur sind Beispiele für die Anwendung von dPCR zur Quantifizierung von (transgenen) GVO beschrieben (Gerdes et al. 2016).

Validierung:

Aktuell sind keine Vorgaben zur Validierung von Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen mittels dPCR publiziert. Auf internationaler Ebene werden jedoch allgemeine Anforderungen und Richtlinien zur Anwendung von dPCR von diversen Technischen Komitees der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet (u.a. ISO 20395:2019). Zudem wurde vom ENGL ein Leitliniendokument zur Anwendung von dPCR in der GVO-Analytik veröffentlicht (JRC 2019). In Anlehnung an diese Richtlinien können Validierungsmaßnahmen für die Anwendung von dPCR für NGT-Pflanzen abgeleitet werden. Die Methode kann gemäß ISO 17025 akkreditiert werden.

Technische Anforderungen:

Die erforderliche gerätetechnische Ausstattung zur Durchführung von dPCR ist zunehmend auch in amtlichen Laboren vorhanden und wird für diverse Anwendungen bereits eingesetzt (Allergen-, GVO-Analytik, Bestimmung von humanpathogenen Erregern).

Die Durchführung der dPCR kann durch bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors erfolgen, für die Auswertung der Daten sind jedoch Mitarbeiter*innen mit entsprechender Expertise in der bioinformatischen Analyse der Daten erforderlich.

3.4 Sequenzierung

DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. Im Unterschied zu Nachweisverfahren mittels PCR ermöglicht die Sequenzierung die Ermittlung der Basenabfolge in einem DNA-Abschnitt.

Die DNA-Sequenzierung findet breite Anwendung bei der Analyse und Charakterisierung von Nukleinsäuren, wie z.B. bei der Identifizierung genetischer Variationen und Mutationen, Genotypisierungen, Genexpressionsstudien oder der Analyse von Populationen. Durch den Vergleich sequenzierter DNA-Abschnitte mit Referenzsequenzen ist ein Auffinden von Sequenzunterschieden (z.B. Mutationen) möglich. Für die verschiedenen Anwendungen stehen unterschiedliche Sequenzierungsverfahren/Plattformen zur Verfügung. Diese sind auch in der GVO-Analytik für den Nachweis von transgenen Elementen erprobt (Holst-Jensen et al. 2016; Kosir et al. 2017; Arulandhu et al. 2018).

Bei der Recherche wurden bevorzugt jene Methoden berücksichtigt, die bereits für die Charakterisierung von SNP (z.B. Bestätigungsanalysen für Anwendungen von NGT) herangezogen wurden. Neue Sequenziermethoden, welche keine Amplifikation der DNA erfordern (z.B. Nanopore-Sequenzierung, Einzelmolekülsequenzierung), werden für den Bericht nicht berücksichtigt, da sie aktuell den Leistungsanforderungen nicht entsprechen.

Für den Nachweis von Sequenzänderungen lassen sich zwei Vorgehensweisen unterscheiden, die zielgerichtete Sequenzierung (z.B. Amplikonsequenzierung) und die Ganzgenomsequenzierung (whole genome sequencing, WGS) (Grohmann et al. 2019).

3.4.1 Zielgerichtete Sequenzierung (Targeted Sequencing, Amplikon-Sequenzierung)

Die zielgerichtete Sequenzierung ist eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit, bekannte DNA-Regionen und neuartige Varianten in ausgewählten Genen oder Genomregionen nachzuweisen. Je nach Länge des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts kann die zielgerichtete Sequenzierung mit verschiedenen DNA-Sequenzierungsmethoden durchgeführt werden. Die aktuell eingesetzten Verfahren liefern präzise Sequenzierergebnisse für DNA-Sequenzen bis zu 300-500 bp (Wenger et al. 2019). Eine zielgerichtete Sequenzierung ist üblicherweise mit vorheriger Anreicherung („enrichment“-Verfahren, Amplikonsequenzierung) oder Selektion der DNA-Zielregion verbunden („capture“-Verfahren) (Guttikonda et al. 2016; Debode et al. 2019). Voraussetzung für die Amplikonsequenzierung ist die erfolgreiche Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente mittels PCR.

3.4.1.1 Sanger-Sequenzierung

Das Standardverfahren für die zielgerichtete Sequenzierung ist die Sanger-Sequenzierung. Prinzip: Ein Reaktionsansatz enthält die vier fluoreszenzmarkierten Nukleotide und zum Teil Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs). Da die ddNTPs keine 3'-Hydroxygruppe besitzen („Kettenabbruch-ddNTPs“) führt ihr Einbau durch die Polymerase zum Abbruch des Synthesevorganges. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem einzelnen Ansatz mit dem gleichen ddNTP enden (je Ansatz nur mit A, C, G oder T). Die Abbruchprodukte werden nach der Sequenzierreaktion mittels Kapillargelelektrophorese überprüft. Im Unterschied zur PCR erfolgt nur eine lineare DNA-Amplifikation mit einem Primer.

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Die Sanger-Sequenzierung eignet sich für die direkte Überprüfung von Sequenzunterschieden in einem DNA-Fragment. Entsprechend hat die Sanger Sequenzierung das Potenzial, Genomeditierungen vom Typ SDN-1, SDN-2 und SDN-3 zu detektieren. SNP und Indels

können daher nachgewiesen werden, allerdings nimmt die Qualität der Sequenzierergebnisse bei Insertionen mit einer Länge von mehr als 700-900 bp deutlich ab. Die Spezifität der Methode ergibt sich aus der Spezifität der erfolgten Anreicherung/Erfassung der Ziel-DNA während der PCR-Reaktion (Zischewski, Fischer und Bortesi 2017; Biswas et al. 2019; Ren et al. 2019).

Sensitivität:

Die Sanger-Sequenzierung eignet sich besonders für Proben von einzelnen Pflanzen und Zellen und wird routinemäßig für die Überprüfung von NGT-Ereignissen bei der Entwicklung von genomeditierten Pflanzen eingesetzt. Die Sanger-Sequenzierung erlaubt keine Verunreinigung der DNA-Extrakte mit Primer-Sequenzen und dNTP, da das zu Lesefehlern in der Sequenzierreaktion führt. Die aus diesem Grund notwendigen DNA-Reinigungsschritte führen zu einem Verlust an isolierter DNA. So ergibt sich, dass Sequenzen, welche in sehr geringer Konzentration vorliegen, möglicherweise nicht mehr detektiert werden können. Die Nachweisgrenze wird daher mit ca. 1% eingestuft. Mischproben (z.B. mit einem Verhältnis konventionelle Kulturpflanze zur Mutante von 1:10) können jedenfalls nicht unterschieden werden (Zischewski, Fischer und Bortesi 2017; Liang et al. 2018).

Quantifizierung:

Die Sanger-Sequenzierung ist für quantitative Aussagen nicht geeignet.

Validierung:

In Anlehnung an bereits akkreditierte Verfahren zur Spezies-Identifizierung (CEN/TS 17303) können Validierungsmaßnahmen abgeleitet werden. Aktuell sind keine Vorgaben zur Validierung von Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen mittels Sanger-Sequenzierung publiziert, auch sind keine Daten aus internationalen Laborvergleichsstudien zur Validierung veröffentlicht (ENGL 2019).

Technische Anforderungen:

Die erforderliche Ausstattung für Labors zur Durchführung von Sanger-Sequenzierungen hat keine besonderen technischen Ansprüche und ist nicht kostenintensiv, der Investitionsbedarf für diese Geräte ist vergleichbar mit einer real-time PCR. Als Standardmethode wird die Sanger-Sequenzierung von vielen kommerziellen Labors kostengünstig angeboten.

Die Durchführung der Sequenzierung („wet lab procedure“) kann durch bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors erfolgen. Für die Auswertung der Daten sind jedoch Mitarbeiter*innen mit entsprechender Expertise in der bioinformatischen Analyse der Daten erforderlich.

Die Auswertung und Interpretation der Sequenzierdaten erfordert den Zugang zu Referenzdaten beziehungsweise einer Referenzdatenbank.

Beurteilung:

Die Sanger-Sequenzierung ist eine Standardmethode für die Überprüfung von NGT-Experimenten in Zelllinien und Einzelpflanzen. Die Sanger-Sequenzierung ist geeignet, um Veränderungen (SNP, Indels), hervorgerufen durch NGT, bis zu einem Anteil von 1% nachzuweisen. Voraussetzung für den Nachweis sind Sequenzinformationen der genomeditierten Pflanze. Die Sanger-Sequenzierung eignet sich nicht für zusammengesetztes Probenmaterial und zur Quantifizierung. Für den Nachweis von NGT-Pflanzen sind keine Methoden mittels Sanger-Sequenzierung publiziert.

3.4.1.2 Massiv parallele Sequenzierung

Methoden des Next Generation Sequencing (NGS; auch massive parallele Sequenzierung) ermöglichen die parallele Sequenzierung von Millionen von DNA-Fragmenten vieler Proben gleichzeitig in einem Sequenzierungsdurchgang. Mittlerweile gibt es eine große Auswahl an NGS-Plattformen und -Verfahren, angestrebt wird die rasche und kostengünstige Sequenzierung einer großen Anzahl von DNA-Fragmenten. Sequenzierungsmethoden mit hoher Lesqualität (z.B. Sequenzierung mittels Brückensynthese) werden zurzeit bevorzugt eingesetzt (Arulandhu et al. 2018).

Bei der Sequenzierung mittels Brückensynthese wird die fragmentierte Template-DNA über spezifische Adaptoren an einen Objektträger (Durchflusszelle, FlowCell) gebunden. Die Sequenzierungsreaktion startet ausgehend vom gebundenen Startmolekül unter Ausbildung von Clustern, welche aus identen PCR Molekülen zusammengesetzt werden (Brückensynthese). Die Sequenzierungsreaktion selbst basiert auf der Chemie der reversiblen Terminatoren. Wenn eine Mischung der vier fluoreszenzmarkierten Nukleotide in die Durchflusszelle gepumpt wird, kann jeweils nur ein komplementäres Nukleotid durch die DNA-Polymerase in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden. Eine weitere Verlängerung wird durch den reversiblen Terminator blockiert. Nach Anregung durch einen Laser wird das erhaltende Lichtsignal detektiert. Eine wesentliche Eigenschaft dieser Methode ist die Durchführung einer paired-end-Sequenzierung. Hierbei werden die DNA-Fragmente mit einer festgelegten Leseweite von beiden Seiten sequenziert.

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Für das Auffinden von Sequenzänderungen (z.B. SNP, Indels, Fremd-DNA) ist die zielgerichtete Sequenzierung mittels NGS unter Amplifikation eines bestimmten Genabschnitts im Vergleich zu einer Referenzsequenz gut geeignet (Guttikonda et al. 2016; Arulandhu et al. 2018; Grohmann et al. 2019).

Die Spezifität der NGS hängt von der Spezifität und Genauigkeit der zugrundeliegenden PCR-Reaktion beziehungsweise der gewählten Anreicherung/Erfassung der DNA-Zielsequenzen ab.

Die Ermittlung der DNA-Sequenz ist bei Anwendung von NGS-Verfahren auch für heterogenes Probenmaterial möglich, zusammengesetzte Probenmaterialien und Probenmischungen (u.a. zusammengesetzte Lebensmittel) können analysiert werden. Bei einer gewählten Amplikonlänge unter 200 bp können auch prozessierte Produkte, welche eine DNA-Fragmentierung aufweisen, sequenziert werden.

Beim Einsatz von zielgerichteten NGS-Verfahren werden Deletionen, falls diese zum Verlust der Primerbindungsstellen geführt haben, nicht erfasst, da die Primer für die PCR nicht binden können. Auch werden lange Insertionen weniger effizient amplifiziert und möglicherweise nicht erkannt (Zischewski, Fischer und Bortesi 2017).

Sensitivität:

Die Sensitivität hängt von der gewählten Sequenzierplattform und der Sequenziertiefe ab. Die Qualität der erhaltenen Reads unterscheidet sich je nach Wahl der Plattform (siehe Herstellerangaben), kann aber durch die gewählte Sequenziertiefe eine Sensitivität bis zu 0,1% ermöglichen (Zischewski, Fischer und Bortesi 2017). Paired-End-Sequenzierungen bieten qualitativ hochwertige Ergebnisse auch für sich wiederholende Sequenzen und erkennen DNA-Modifikationen wie Insertionen, Deletionen und Inversionen. Sie bieten Vorteile bei der bioinformatischen Auswertung und können die Genauigkeit der Analysen signifikant erhöhen (Fehlerrate unter 0,1%).

Diverse Modifikationen in der Durchführung der Sequenzierung können die Sensitivität und

Qualität der Ergebnisse erhöhen. Der Einbau zusätzlicher Barcode-Sequenzen (z.B. SiMsen Seq) (Bell et al. 2014; Ståhlberg et al. 2017) oder PCR-Modifikationen (z.B. duplex PCR Seq) (Schmitt et al. 2012) im Zuge der Bibliothekserstellung ermöglicht den Nachweis von SNP und Allel-Varianten bis zu einer Frequenz von unter 0,1%.

Die zu erwartende Fehlerrate der DNA-Polymerasen bei Amplifikation von DNA-Fragmenten von bis zu 1% kann durch den Einsatz von Korrekturlesefunktionen („Proof-reading“) beziehungsweise High-Fidelity-Polymerasen stark reduziert werden (Maslov et al. 2015).

Bei Verfahren der Einzelmolekülsequenzierung (z.B. Single molecule real-time sequencing, SMRT) werden einzelne DNA-Moleküle während der Replikation durch die DNA-Polymerase sequenziert, ohne diese vorher durch einen PCR-Schritt zu amplifizieren. Einzelmolekülsequenzierung kann für kurze (short-Reads von ca. 300-1000 bp) und lange DNA-Abschnitte (long-Reads bis 20 kb) eingesetzt werden. Die notwendige Sequenziertiefe für geringe Fehlerraten unter 1% und die maximal erreichbare Sensitivität von 1% (Herstellerangaben) limitieren die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode.

Quantifizierung:

Das Ergebnis einer NGS sind Reads mit der gesuchten DNA-Sequenz. Diese können quantitativ ausgewertet werden. Voraussetzung dafür ist, dass alle in einer Probe enthaltenen Zielfragmente mit annähernd gleicher Effizienz amplifiziert werden. In diesen Fällen kann die Anzahl von Sequenzen mit der gesuchten Mutation bis zu einem Gehalt von 0,1% geschätzt werden.

Quantitative NGS-Analysen sind für NGT-Pflanzen bis dato nicht publiziert.

Validierung:

Auf internationaler Ebene werden allgemeine Anforderungen und Richtlinien zur Sequenzierung von diversen Technischen Komitees der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet (ISO/CD 23418, ISO/AWI 22949/1-3). Außerdem werden allgemeine Anforderungen für die massive parallele Sequenzierung entwickelt (ISO/CD 20397/1-2). In Anlehnung an diese Richtlinien können Validierungsmaßnahmen für die Sequenzierung von NGT abgeleitet werden.

Aktuell sind keine Vorgaben zur Validierung von Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen mittels NGS publiziert. Für NGS-basierte Analysen müssen laborspezifische Parameter („Plattform-Validierung“) und die folgende bioinformatische Auswertung („Pipeline-Validierung“) experimentell überprüft und validiert werden (Endrullat et al. 2016).

Technische Anforderungen:

Die Basis-Geräteausstattung zur Durchführung von NGS ist bereits um den Preis eines real-time qPCRs-Geräts erhältlich. Die IT-Anforderungen übersteigen jedoch die derzeitigen Möglichkeiten eines GVO-Kontrolllabors. Die Durchführung der Sequenzierung (wet lab-Aktivitäten) kann durch bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors erfolgen, für die Auswertung der Daten sind jedoch Mitarbeiter*innen mit entsprechender Expertise in der bioinformatischen Analyse der Daten erforderlich. Zur Bereitstellung und für den laufenden Betrieb der notwendigen IT-Infrastruktur ist Personal mit Kenntnis einschlägiger Software-Lösungen und deren Implementierung in der firmenspezifischen IT-Umwelt (aktuell v.a. Linux-basierte Anwendungen) notwendig.

Targeted sequencing-Anwendungen haben einen begrenzten Bedarf an Kapazitäten für Arbeitsspeicher und Datenspeicherung. Durch die Prozessierung der Daten entstehen neue Datensätze mit zusätzlichem Speicherbedarf im Umfang von einigen Terrabyte (Experten-

schätzung für ca. 4 Sequenziervorgänge pro Monat). Zusammen mit den Anforderungen aus dem QM-System hinsichtlich Datenarchivierung (inklusive Spiegelung der Daten auf verschiedene Server zur Datenabsicherung) wird die monatlich hinzukommende Menge an Daten durchschnittlich auf 500 GB geschätzt (Wang 2016). Auch der Datentransfer von Rohdaten beziehungsweise prozessierten Daten zwischen verschiedenen Organisationseinheiten ist zu berücksichtigen und kann nur durch spezielle Software-Lösungen ermöglicht werden.

Die Auswertung der Sequenzierdaten erfordert den Zugang zu Referenzdaten beziehungsweise einer Referenzdatenbank.

Beurteilung:

NGS-Methoden sind geeignet, um Veränderungen (SNP, Indels), u.a. hervorgerufen durch NGT, nachzuweisen. Der Nachweis ist auch in zusammengesetztem Probenmaterial bis zu einem Anteil von unter 0,1% möglich, für NGT Pflanzen wurde das aber experimentell noch nicht gezeigt. Voraussetzung ist die Verfügbarkeit einer Referenzsequenz. Eine zuverlässige Quantifizierung ist aktuell nicht möglich. Für die Einzellaborvalidierung fehlen standardisierte Vorgaben, notwendige Referenzmaterialien sind nicht erhältlich. Daten aus internationalen Laborvergleichsstudien fehlen. NGS-Daten können jedoch als Grundlage für die Entwicklung von kostengünstigeren PCR-Methoden und als Absicherungsmethode dienen.

3.4.2 Ganzgenomsequenzierung

Ganzgenomsequenzierung (WGS) ist eine Methode, um die vollständige DNA-Sequenz des Genoms eines Organismus zu bestimmen. WGS ermöglicht daher den Vergleich des gesamten Genoms einer NGT-Pflanze mit dem nicht veränderten Genom der Elternlinien.

Prinzip: Genome beziehungsweise Genomabschnitte werden mittels bioinformatischer Anwendungen aus zuvor sequenzierten DNA-Abschnitten zusammengesetzt (Re-Sequenzierung). Zur Sequenzierung können Methoden des massiven parallelen Sequenzierens und Methoden zur Einzelmolekülsequenzierung eingesetzt werden (Yang et al. 2013; Holst-Jensen et al. 2016).

Spezifität (Eignung für die Detektion von SNP):

Zielgerichtete Sequenzierverfahren liefern exakte Sequenzierergebnisse für kurze Fragmente bis zu 500 bp und ermöglichen die Identifizierung von Indels und SNP (siehe Targeted Sequencing). Das ungerichtete Aufspüren von SNP in einem Genom beziehungsweise Genomabschnitten mittels WGS ist möglich, erfordert jedoch einen hohen Grad der Abdeckung (coverage), damit die Nukleotidabfolge einer DNA-Sequenz eindeutig bestimmt werden kann (Hersteller empfehlen eine 30- bis 50-fache Sequenziertiefe).

WGS zum Aufspüren von SNP ist mit der erforderlichen coverage sehr kostenintensiv und erfordert ein Vielfaches an bioinformatischen Kapazitäten im Vergleich zu zielgerichteten NGS-Anwendungen. Auch ist dadurch die Anzahl der Proben beziehungsweise Wiederholungen in einem Sequenzierlauf limitiert (Veres et al. 2014; Zischewski, Fischer und Bortesi 2017).

WGS erfasst auch große DNA-Modifikationen, die bei zielgerichteten Ansätzen möglicherweise übersehen werden. Die Sequenzierung von längeren DNA-Abschnitten (long reads bis 20 kb) ohne Fragmentierung ist schneller, ist jedoch durch die hohe Fehlerrate für den Nachweis von SNP und Indels nur beschränkt geeignet (Wenger et al. 2019).

Sensitivität:

Das Aufspüren von Sequenzen, wenn diese mit niedriger Frequenz (unter 1%) auftreten, ist

nicht zuverlässig möglich. Die Genomgröße und das Auftreten von repetitiven Sequenzen in höheren Organismen, die Mischerbigkeit, sowie auftretende Polyploidisierung im Zuge der Züchtung erschweren zusätzlich eine exakte Sequenzierung gesamter Genome beziehungsweise Genomabschnitte. Die Kombination verschiedener Verfahren (long read und short read) kann die Qualität der Sequenzdaten erhöhen (Chen, Deng und Wang 2013; Yang et al. 2019).

Homologe Sequenzregionen und repetitive Sequenzen können die Qualität der Assemblierung bei WGS beeinträchtigen, auch wird die Bildung von Bibliotheken durch degradierte DNA, wie sie bei prozessiertem Probenmaterial vorliegt, stärker beeinflusst als bei NGS-Anwendungen (Wenger et al. 2019).

Quantifizierung:

Die quantitative Auswertung etwaiger unterschiedlicher Genome beziehungsweise Genomabschnitte eines Sequenzierlaufs ist prinzipiell möglich (z.B. SNP-Analysen). Quantitative WGS ist für NGT-Anwendungen in Pflanzen zurzeit nicht publiziert.

Validierung:

Aktuell sind keine Vorgaben zur Validierung von Verfahren zum Nachweis von NGT Pflanzen mittels WGS publiziert. Für die Validierung gelten die gleichen Anforderungen wie für die Sequenzierung ohne Amplifikation.

Technische Anforderungen:

WGS sind hinsichtlich der notwendigen technischen Ausstattung und der notwendigen personellen Ressourcen für die Datenprozessierung von einem GVO-Kontrolllabor nicht ohne Investition in leistungsstarke Sequenziergeräte und Aufrüstung der IT-Ausstattung möglich. Im Vergleich zur zielgerichteten Sequenzierung können sich die Anforderungen hinsichtlich der Kapazitäten für Arbeitsspeicher, Datenprozessierung und -speicherung für WGS vervielfachen.

Die Durchführung der Sequenzierung (wet lab) kann durch bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors erfolgen, für die Auswertung der Daten sind jedoch Mitarbeiter*innen mit entsprechender Expertise in der bioinformatischen Analyse der Daten erforderlich. Zur Bereitstellung und für den laufenden Betrieb der notwendigen IT-Infrastruktur ist Personal mit Kenntnis einschlägiger Software-Lösungen und deren Implementierung in der firmenspezifischen IT-Umwelt (aktuell v.a. Linux-basierte Anwendungen) notwendig.

Die Auswertung der Sequenzierdaten erfordert den Zugang zu Referenzdaten beziehungsweise einer Referenzdatenbank.

Beurteilung:

WGS-Methoden sind prinzipiell geeignet um Veränderungen (SNP, Indels), hervorgerufen durch NGT, nachzuweisen. Der Nachweis ist auch in zusammengesetztem Probenmaterial mit einer Sensitivität bis zu einem Anteil von unter 1% möglich, setzt jedoch eine Mindestsequenziertiefe (30 bis 50-fache Wiederholung des Lesevorgangs, coverage) voraus. Diese Bedingungen vervielfachen jedoch den Ressourcenbedarf gegenüber NGS-Methoden. Eine weitere Voraussetzung ist die Verfügbarkeit von Referenzgenomen. Eine zuverlässige Quantifizierung ist aktuell nicht möglich. Für eine Einzellaborvalidierung fehlen standardisierte Vorgaben, notwendige Referenzmaterialien sind nicht erhältlich. Daten aus internationalen Laborvergleichsstudien fehlen. WGS-Daten können jedoch als Grundlage für die Entwicklung von kostengünstigeren PCR-Methoden mit etablierten Validierungsverfahren und als Absicherungsmethode dienen.

3.5 Einschätzung der Nachweismöglichkeiten

Nach derzeitigem Wissensstand erlaubt die Anwendung von NGT vielfältige Änderungen in pflanzlichen Genomen. In einigen Fällen sind detaillierte Informationen wie z.B. die Zielsequenz beziehungsweise Angaben zur Genomeditierungstechnik aus Publikationen bzw. Patentschriften verfügbar (Details siehe Anhang). Nur in einzelnen Fällen sind aber genaue Sequenzinformationen zu den mittels NGT erzeugten Mutationen vorhanden. Erst anhand dieser konkreten Angaben ist es möglich, die technische Machbarkeit eines Nachweises, die Möglichkeit der Identifizierung und der Quantifizierung einzuschätzen. Aktuell ist ein Nachweisverfahren publiziert (Chhalliyil et al. 2020).

Die technischen Nachweismöglichkeiten und ihre Einschränkungen werden daher anhand von zwei Sachverhalten dargestellt. Der erste Sachverhalt beschreibt das Wissen über ein mögliches Vorkommen eines NGT-Organismus. Dieser kann bei Vorliegen der geeigneten Informationen gezielt mit einer für die Veränderungen spezifischen Methode nachgewiesen werden (MLO-KO-Weizen (3.5.1)).

Es ist jedoch auch möglich, dass keine Informationen zu einem NGT-Organismus vorliegen, die für die Entwicklung einer Nachweismethode nützlich sind. Für diesen Sachverhalt erfolgt eine theoretische Darstellung der möglichen Vorgehensweisen und der damit verbundenen Limitierungen beim Nachweis von NGT-Organismen.

Bei der Darstellung der möglichen Vorgehensweisen werden die Erfordernisse eines Kontrolllabors berücksichtigt.

3.5.1 Nachweismöglichkeiten bei vorhandener Information

Beschreibung des NGT-Organismus MLO-KO-Weizen:

Beim MLO-KO-Weizen liegt eine Mehltaresistenz vor. Weizen besitzt drei sehr ähnliche Kopien (Homöoallele) des *MLO*-Gens (*TaMLO*), die alle bei der Infektion des Weizens mit dem Schaderreger des Echten Mehltaus (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) eine gleichwertige und wichtige Rolle spielen. Um eine Mehltaresistenz zu erzeugen, wurden die drei Homöoallele des *TaMLO*-Gens mit Hilfe der TALEN-Technik (SDN-1 multiplexing) mutiert (Wang et al. 2014a) und anschließend von der Firma Calyxt zu einem marktfähigen Produkt weiterentwickelt (Calyxt 2015).

Verfügbare Informationen:

Informationen zum MLO-KO-Weizen finden sich in Datenbanken (z.B. EUGenius) sowie bei Wang et al. (Wang et al. 2014b) und in dem Patent mit der International Publication Number WO 2015/109752 A1 (Gao, Qiu und Wang 2015).

Das genannte Patent enthält neben den in der Publikation dargestellten Informationen zusätzliche Sequenzinformationen zu den eingeführten Veränderungen. Die nachstehenden Aussagen zur Detektierbarkeit von MLO-KO-Weizen basieren daher auf Daten aus der angeführten Patentschrift.

Gewählte Nachweismethode:

Die Patentunterlagen enthalten genaue Sequenzdaten zu den Veränderungen der drei mutierten Allele. Da es sich bei den eingeführten Mutationen um größere Deletionen (11-32 bp) und größere Insertionen (81-141 bp) handelt, können qPCR-Systeme mit entsprechender Spezifität für die Detektion entwickelt werden.

Als Methode kann in diesem Fall ein TaqMan-PCR-System zur Anwendung kommen. Damit könnte jedes der drei mutierten Allele unabhängig voneinander nachgewiesen werden.

Ein entsprechender Nachweis wäre auch in einer Mischprobe (z.B. Lebens- oder Futtermittel) möglich.

Einschätzung Identifizierung:

Da die Wahrscheinlichkeit für natürliche Mutationsereignisse aller drei Homöoallele als extrem gering angesehen wird, kann beim spezifischen Nachweis aller drei beschriebenen Allele davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um den in der Literatur beschriebenen MLO-KO-Weizen (Wang et al. 2014b) handelt. In diesem Fall kann man von einer eindeutigen Identifizierung des NGT-Events ausgehen.

Einschätzung Quantifizierung:

Da die Allel-spezifischen PCR-Systeme für den MLO-KO-Weizen aufgrund der vorliegenden Sequenzinformationen nahezu eventspezifisch sind, ist eine quantitative Bestimmung der MLO-KO-Weizen-Anteile relativ zum Gesamtweizen-Anteil möglich.

Einschränkungen:

Verfügbarkeit von Referenzmaterial: Für die Absicherung des Ergebnisses der Nachweisreaktion von MLO-KO-Weizen mittels PCR ist entsprechendes Referenzmaterial (Positivkontrolle) notwendig.

Quantifizierung: Es wird entsprechendes Referenzmaterial mit definierten Mengenanteilen an nachzuweisenden Sequenzen für die Kalibration benötigt (zertifiziertes Referenzmaterial). Als Alternative zur herkömmlichen Quantifizierung mit Hilfe solcher Massen-zertifizierten Referenzmaterialien kann die dPCR zur Anwendung kommen, da hier durch das Konzept der absoluten Quantifizierung kein Kalibrations- bzw. Referenzmaterial nötig ist (siehe auch Kapitel 3.3.5).

Im Fall einer EU-Zulassung ist der Antragsteller verpflichtet, Referenzmaterial zur Verfügung zu stellen. Für den Fall, dass kein Antrag auf Zulassung in der EU gestellt wurde, muss die Verfügbarkeit von entsprechendem Referenzmaterial mit dem Entwickler geklärt werden. Falls der Entwickler kein biologisches Material (Blattmaterial, Körner, genomische DNA) zur Verfügung stellt, können die benötigten DNA-Sequenzen auch synthetisch hergestellt und in Form von Plasmiden verfügbar gemacht werden. Dabei können Patentinformationen verwendet werden, allenfalls sind Einschränkungen im Rahmen des Nagoya-Protokolls zu berücksichtigen.

Anwendung im Kontrolllabor:

Bei der in diesem Beispiel angeführten Nachweismethode der TaqMan-PCR handelt es sich um eine in der Routine bereits häufig angewendete Methode. Die technische Ausstattung zur Durchführung von TaqMan-PCR erfordert die Verfügbarkeit eines real-time PCR-Geräts. Derartige PCR-Geräte sowie die entsprechende Qualifikation des Personals sind in vielen amtlichen Laboren vorhanden und werden in der Routine bereits für diverse Anwendungen eingesetzt (Allergen-, GVO-Analytik, Bestimmung von humanpathogenen Erregern). Bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors kann die qPCR durchführen.

3.5.2 Nachweismöglichkeiten für unbekannte NGT-Pflanzen

Sind publizierte DNA-Sequenzen von NGT-Pflanzen, z.B. aus Datenbanken und Patenten, vorhanden, können spezifische Ansätze für den Nachweis entwickelt werden. Dies wurde anhand des Beispiels MLO-KO-Weizen gezeigt. In diesen Fällen können bekannte NGT-Pflanzen, für die eine Nachweismethode verfügbar ist, in einem Multiplex-PCR-Ansatz gleichzeitig nachgewiesen werden. Dabei werden mehrere PCR-Ansätze in einem Reaktionsgefäß vereinigt, wodurch der Zeitaufwand und die Kosten gesenkt werden.

Informationen zu NGT-Anwendungen finden sich in einschlägigen Datenbanken (z.B. EUGenius). Zusätzlich können Veröffentlichungen von Forschungseinrichtungen, Firmen und diverser Agenturen, welche in die Entwicklung, Zulassung und Bewertung von NGT involviert sind (z.B. Animal and Plant Health Inspection Service der USDA, APHIS) als Informationsquellen dienen. Öffentlich zugängliche Informationsquellen enthalten, sofern vorhanden und zugänglich, spezifische Informationen über NGT-Pflanzen (gegebenenfalls Patentinformationen, Informationen über die Art der Veränderungen). Sie dienen daher als wichtige Grundlage, um in weiterer Folge ein Nachweisverfahren für NGT-Pflanzen zu etablieren.

Wenn keine konkreten Informationen über eine NGT-Anwendung vorliegen, könnten auf Basis von charakteristischen Eigenschaften von NGT-Anwendungen (z.B. Erkennungssequenzen bei SDN-Einsatz) Nachweisverfahren abgeleitet werden.

Beispielsweise ergibt sich eine Nachweismöglichkeit dadurch, dass bei der Anwendung von bestimmten Genomeditierungstechniken PAM-Sequenzen in der Nähe der Zielsequenz zwingend vorhanden sein müssen. Ein weiterer Ansatz besteht darin, dass Vektorsequenzen bzw. Erkennungssequenzen (z.B. Abschnitte der guide-RNA bei CRISPR/Cas-Anwendungen) im Zuge ihrer stabilen Integration während der Herstellung der NGT-Pflanze im Genom verbleiben können.

Sind entsprechende Screening-Verfahren verfügbar, können diese von einem GVO-Kontrolllabor durchgeführt werden.

In diesem Zusammenhang sind folgende Einschränkungen zu beachten:

- Verfügbarkeit der notwendigen Informationen zu NGT-Pflanzen zur Entwicklung von Screening-Verfahren.
- Verfügbarkeit von Referenzdaten bzw. Referenzmaterial.
- Analog zu transgenen GVO erlaubt der Nachweis durch das Screening noch keine Identifizierung einer NGT-Pflanze.
- Das Vorliegen von Mischproben erschwert die Interpretation der Ergebnisse.

Screening anhand von PAM-Sequenzen:

PAM-Sequenzen sind die Andockstellen für CRISPR/Cas-Effektormoleküle und spezifisch für die jeweilige Anwendung. Sie können daher ein Ausgangspunkt sein, um charakteristischen Sequenzänderungen in ihrer Nähe aufzuspüren. Dies erfolgt mithilfe von Methoden der Sequenzierung (siehe Kapitel 3.4).

Dabei wird die DNA-Sequenz up-/downstream der PAM-Sequenz ermittelt und analysiert. Im anschließenden Sequenzvergleich mit einem Referenzmaterial bzw. einer Referenzsequenz können CRISPR/Cas-bedingte Mutationen identifiziert und auf ihrer Grundlage spezifische Nachweisverfahren (v.a. PCR-Methoden) entwickelt werden.

In diesem Zusammenhang sind folgende Einschränkungen zu beachten:

- Nur bestimmte NGT-Anwendungen beruhen auf PAM-spezifischen Nuklease-Aktivitäten.
- Voraussetzung für die Etablierung von Nachweisverfahren ist die Verfügbarkeit von Referenzmaterial bzw. Referenzsequenzen.
- Eine Identifizierung einer CRISPR/Cas-bedingten Mutation ist kosten- und arbeitsintensiv, da es aufgrund der vielen natürlich vorkommenden oder modifizierten CRISPR-Nukleasen viele verschiedenartige PAM-Sequenzen gibt. Außerdem enthal-

ten Pflanzengenome zahlreiche Sequenzabschnitte, die homolog zu PAM-Sequenzen sind.

- Voraussetzung für den Nachweis ist der Einsatz von WGS-Geräten und eine ausreichende fachliche Expertise zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.
- Heterogenes Probenmaterial und Sequenzen von Nicht-Ziel Organismen (z.B. Verunreinigung durch Pathogene) beeinträchtigen das Auffinden von PAM-Sequenzen (Grohmann et al. 2019).
- Aktuell sind keine Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen mittels Charakterisierung von PAM-Sequenzen publiziert.

Vorliegen von Fremd-DNA (z.B. Transformationsvektorsequenzen):

NGT-Anwendungen können zur unerwünschten Integration von Vektorsequenzen führen. Einige Publikationen zeigen die Integration von Vektorfragmenten (Li et al. 2016; Wang, La Russa und Qi 2016; Braatz et al. 2017; Schouten et al. 2017). Daten der WGS könnten auf Anwesenheit von Sequenzen häufig verwendeter Transformationsvektoren analysiert werden (z.B. BLAST-Analyse), um etwaige Rückstände (Vektor-Sequenzen) im Vergleich zu Referenzsequenzen zu überprüfen.

In diesem Zusammenhang sind folgende Einschränkungen zu beachten:

- Durch die Anwendung DNA-freier NGT (z.B. Cas9-sgRNA-Ribonukleoproteine) entfällt diese Nachweismöglichkeit.
- Die Suche nach Transformationsvektorsequenzen setzt deren stabile Integration in das pflanzliche Genom voraus (entspricht einem transgenen GVO).
- Die beschriebenen Ansätze liefern lediglich einen möglichen Hinweis auf NGT-Anwendungen, spezifische Nachweisverfahren müssen daraus erst abgeleitet werden.
- Selten eingesetzte Vektorsequenzen werden bei einem Datenbankabgleich nicht erfasst.
- Aktuell sind keine Verfahren zum Nachweis von NGT-Pflanzen mittels Charakterisierung von Vektorsequenzen und keine NGT-Screeningelemente publiziert (ENGL 2019).
- Zur Charakterisierung von Vektorsequenzen ist der Einsatz von WGS-Geräten und die Expertise zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erforderlich.

Einschätzung Identifizierung und Quantifizierung:

Wenn keine Information über die durch NGT hervorgerufenen Veränderungen vorliegt, ergibt die Analyse von unbekanntem Zielsequenzen möglicherweise charakteristische Veränderungen im Vergleich zu einer Referenzsequenz. Diese können, sofern charakteristisch-einzigartig und einmalig auftretend (unique), für die Identifizierung einer NGT-Pflanze herangezogen werden.

Analyseergebnisse können gegebenenfalls erfolgreich gekoppelt werden (siehe multiple Modifikationen unter Kapitel 3.5.1) und mit einer zu berechnenden Wahrscheinlichkeit eine Identifizierung ermöglichen.

Sofern spezifische Methoden abgeleitet werden können und gekoppelte Ergebnisse eine Identifizierung erlauben, ist eine quantitative Bestimmung möglich (z.B. Kombination von Allel-spezifischen PCR-Systemen).

In diesem Zusammenhang sind folgende Einschränkungen zu beachten:

- Referenzmaterial für die Validierung von Verfahren für die Identifizierung ist nicht verfügbar.
- Eine Identifizierung ist nicht möglich, wenn Referenzsequenzen der NGT-Pflanze und der Ausgangslinie fehlen.
- Falls Mischprodukte vorliegen ist die Zuordnung zu einer einmalig auftretenden Sequenz gegebenenfalls nicht möglich.
- Bei hoher Diversität der Probe sind keine eindeutigen Ergebnisse (eindeutiger Beweis, dass die Veränderung durch NGT entstanden ist) zu erwarten.

Mögliche Anwendung im Kontrolllabor:

Die Durchführung der angeführten Charakterisierung erfordert die technische Ausstattung und die Expertise entsprechend der Anwendung von Methoden zur WGS. Die technische Ausstattung erfordert leistungsfähige Sequenziergeräte, geeignet für die Sequenzierung von ganzen pflanzlichen Genomen. Die bloße Durchführung der Labortätigkeiten (wet-lab Aktivitäten) kann durch bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors erfolgen. Aufträge zur Sequenzierung können gegebenenfalls an Dienstleistungslabors vergeben werden, der hohe finanzielle Aufwand ist aber zu berücksichtigen.

Einschränkungen:

- Hochleistungs-Sequenziergeräte sowie entsprechend qualifiziertes Personal sind in amtlichen Kontrolllabors üblicherweise nicht vorhanden.
- Eine adäquate IT-Ausstattung (Hardware-Architektur und Kapazitäten) und bioinformatische Expertise zur Datenauswertung, Datenspeicherung und Datenarchivierung ist in Kontrolllabors oftmals nicht vorhanden.
- Der Einsatz von bioinformatischen Tools ist in Kontrolllabors zumeist nicht etabliert.
- Die Ergebnisse der Charakterisierung beziehungsweise der analysierten Sequenzabschnitte sind als Ausgangspunkt für die Entwicklung und Validierung von spezifischen Nachweisverfahren zu sehen. Dieser Aufwand muss dementsprechend berücksichtigt werden.

Die Aussicht auf eine erfolgreiche Identifizierung von unbekanntem NGT-Pflanzen ist aufgrund fehlender Informationen und Publikationen zurzeit sehr eingeschränkt, auch ist der tatsächliche Aufwand für die eingesetzte Strategie kaum abschätzbar. Die Anwendung dieser Strategie ist für den Einsatz im Kontrolllabor nur umsetzbar, wenn die entsprechenden Ressourcen zur Verfügung stehen.

3.6 Nicht-beabsichtigte Modifikationen im Zuge der Anwendung von NGT

3.6.1 Nicht-beabsichtigte Modifikationen durch Prozesse des Gentransfers und der Zellregeneration

Gentransfer und Zellregeneration sind Prozesse, die zur Herstellung von NGT-Pflanzen häufig zum Einsatz kommen. Ausführliche Darstellungen zu nicht-beabsichtigten Modifikationen, die dadurch entstehen können sind anderweitig publiziert (Ribarits et al. 2012; Eckerstorfer, Miklau und Gaugitsch 2014; Eckerstorfer et al. 2019b).

Die in der klassischen Gentechnik üblichen Methoden wie biolistische beziehungsweise Agrobakterien-vermittelte Transformation werden auch im Zuge vieler Anwendungen von NGT

verwendet, um die Effektormoleküle in Pflanzen einzubringen (Metje-Sprink et al. 2018; Banakar et al. 2019). Dabei kann es zu jenen Nebenwirkungen kommen, die bereits aus der Herstellung transgener Pflanzen bekannt sind (Banakar et al. 2019).

Übliche Auswirkungen von biolistischer Transformation sind beispielsweise die unerwünschte Integration von Vektorsequenzen, die Insertion von mehreren Kopien und Gene-Silencing-Effekte. Letztere wurden auch in Zusammenhang mit NGT-Anwendungen berichtet (Vats et al. 2019). Agrobakterium-vermittelte Transformation kann zu einer unerwünschten Integration von Vektorsequenzen führen, häufig verbleiben auch bakterielle Sequenzen im Genom. Ähnlich wie bei der biolistischen Transformation können bei der Agrobakterium-vermittelten Transformation mehrere Kopien in das pflanzliche Genom eingebaut werden, wenn auch in niedrigerer Frequenz. Beschrieben wurde außerdem die Integration von langen Sequenzabschnitten von mehreren hundert Basenpaaren, ebenso wie die Deletion von endogener DNA.

Mit der Anwendung der beiden Transformationsmethoden ist zumeist eine längere Zellkulturphase verbunden, um die transformierten Zellen zu ganzen Pflanzen zu regenerieren. Es ist bekannt, dass es bei der Zellkultivierung und Regenerierung zu Veränderungen in pflanzlichen Genomen kommen kann („somaklonale Variation“). Alternativen zur dauerhaften Einbringung eines Plasmids in Zellen verwenden Protoplasten (Metje-Sprink et al. 2018). Auch die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten bedarf einer umfangreichen Zellkulturphase und ist nicht für alle Pflanzenarten verfügbar. Zellkulturen sind in der Pflanzenzüchtung weit verbreitet, und Methoden zur Protoplasten- und Zellregeneration sind in der Pflanzenzüchtung oft unverzichtbar. Diese *in vitro*-Phasen können zu unerwünschten Effekten im Pflanzengenom führen, die als möglicher Ansatz für den Nachweis von NGT diskutiert wurden (Bertheau 2019).

Aufgrund der weiten Verbreitung von Gewebekulturtechniken in der modernen Pflanzenzüchtung (z.B. bei der Doppelhaploidentechnik, in der Vermehrung mittels Zellkulturtechniken, etc.; (FiBL 2012)) sind die mit ihnen einhergehenden Veränderungen nicht spezifisch für die Anwendung von NGT. Daher ist es nach derzeitigem Wissensstand nicht zielführend, diese Veränderungen für den Nachweis von NGT-Pflanzen heranzuziehen.

3.6.2 Technik-spezifische nicht-beabsichtigte Modifikationen

Falls nicht-beabsichtigte Modifikationen in NGT-Studien berichtet werden, sind diese zumeist auf unspezifische Nukleaseaktivität zurückzuführen. In diesem Zusammenhang wird meist von Off-Target Effekten gesprochen (Kadam et al. 2018). Es gibt zahlreiche Tools, die Doppelstrangbrüche an falschen Positionen im Genom von Zielorganismen vorhersagen können. Ebenso gibt es Strategien, um das Design von Effektormolekülen so zu verändern, dass unspezifische Nukleaseaktivität vermieden oder zumindest stark minimiert werden kann (Eckerstorfer et al. 2019a; Troadec und Pagès 2019). Merkmale, die durch Off-Target Effekte hervorgerufen werden, können durch Segregationsvorgänge (Auskreuzen) eliminiert werden, so lange diese ausreichend weit von der Zielmodifikation entfernt liegen.

Technik-spezifische nicht-beabsichtigte Modifikationen sind solche, die mit der Anwendung spezieller NGT in Verbindung gebracht werden. Folgende werden in der wissenschaftlichen Literatur erwähnt:

- Exon Skipping-Prozesse bei CRISPR/Cas (Sharpe und Cooper 2017)
- „Small range clusters“ (Gebündelte Integrationsstellen) bei ZFN-Anwendungen. Diese können von zufällig auftretenden DSB unterschieden werden (Gabriel et al. 2011).
- Unerwünschte Insertion von gRNA im Zuge einer Mutation durch die Anwendung einer CRISPR/Cas-Technik (SDN-3-Typ) (Li et al. 2015).

- Mutationen in non-target Allelen (Arndell et al. 2019).
- On-target Effekte (Hahn und Nekrasov 2019, Mou et al. 2017, und darin zitierte Arbeiten).

In der Pflanzenforschung steht die erfolgreiche Veränderung von Genabschnitten und damit verbundenen Pflanzenmerkmalen im Vordergrund. Nicht-beabsichtigte Modifikationen, die sich nicht negativ, insbesondere auf das gewünschte Merkmal, auswirken, werden selten untersucht. Der Nachweis der erwünschten Veränderung steht im Vordergrund, und nicht die Untersuchung von unerwünschten Veränderungen. Damit bleiben zumeist auch unerwünschte Veränderungen rund um die Zielsequenz (on-target Effekte; Hahn und Nekrasov 2019) unentdeckt. Deshalb finden sich in der wissenschaftlichen Literatur nur gelegentlich Hinweise auf Technik-spezifische nicht-beabsichtigte Modifikationen.

Daten, die eine umfassendere Untersuchung (z.B. eine Analyse hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens) solcher Effekte erlauben würden, liegen nicht vor.

3.6.3 Rückkreuzungen

Bei der Herstellung von NGT-Pflanzen ist im Normalfall eine Entfernung von unerwünschten Sequenzen (z.B. Verbleib von transgenen Elementen im Pflanzengenom) durch Rückkreuzungen vorgesehen. Eine Ausnahme sind Anwendungen von NGT in Elitelinien.

Der Ort des Einbaus der genannten unerwünschten Sequenzen hat Auswirkungen auf die Expression und Stabilität der Fremd-DNA und kann auch die Möglichkeit beeinflussen, diese Sequenzen wieder aus dem Genom zu entfernen. Darüber hinaus sind Pflanzengenome unterschiedlich aufgebaut, was zu spezifischen Besonderheiten bei der Genkopplung führen kann (Kawall 2019). Daher sind Vorhersagen über die erfolgreiche Entfernung der unerwünschten Sequenzen nicht ohne die genaue Betrachtung des genauen Orts der Insertion möglich. Aufgrund der Sequenzvielfalt von potenziell im Genom verbleibenden nicht-beabsichtigten Modifikationen ist ein Screening auf diese Sequenzen in der Praxis vermutlich nicht durchführbar.

Grundsätzlich können im Rahmen des Züchtungsprozesses nicht-beabsichtigte Modifikationen, die nicht mit der modifizierten Zielsequenz gekoppelt sind, durch Rückkreuzung entfernt werden. Alle genetischen Veränderungen, die mit der Zielsequenz gekoppelt sind, stellen ein potenzielles Identifizierungsmerkmal für ein NGT-Event dar, welches durch Rückkreuzungsverfahren nicht eliminiert werden kann.

Bei manchen Pflanzenarten (z.B. schwieriger und langer Züchtungsgang, vegetative Vermehrung) ist dieses Verfahren der Rückkreuzung generell nicht einsetzbar (Metje-Sprink et al. 2018). Das gilt auch, wenn die Zielsetzung der Anwendung die direkte Veränderung von Elitezuchtlinien ist (Eckerstorfer et al. 2019b).

Pflanzen, bei denen es phänotypische Auffälligkeiten gibt, können im Rahmen von Züchtungsprozessen aussortiert werden (Trodec und Pagès 2019).

4 Schlussfolgerungen

Der Europäische Gerichtshof hat mit seinem Urteil vom 25. Juli 2018 (C-528/16) festgestellt, dass mit gerichteter Mutagenese (Genomeditierung) hergestellte NGT-Pflanzen unter die Regelungen gemäß Richtlinie 2001/18/EG zur Freisetzung und zum Inverkehrbringen von GVO fallen. Es stellen sich damit Herausforderungen für Kontrolllabors, derartige NGT-Pflanzen nachzuweisen, zu identifizieren und ihr Vorkommen in Lebens- und Futtermitteln zu quantifizieren.

Im vorliegenden Bericht wird analysiert, welche Möglichkeiten ein Kontrolllabor aktuell hat, diese Aufgaben zu erfüllen. Dabei werden die bestehende technische Ausstattung, die verfügbaren Informationsquellen, die Einschränkungen und die Anforderungen im Kontrollalltag speziell berücksichtigt. Ansätze zur Weiterentwicklung, um die Kontrolltätigkeiten zu unterstützen, werden aufgezeigt.

Technische Möglichkeiten in einem Kontrolllabor:

Die Analyse verschiedener Nachweismethoden zeigte, dass einige der beschriebenen PCR- und Sequenzierungsverfahren dazu geeignet sind, Sequenzunterschiede (inkl. SNP, Indels) nachzuweisen, auch wenn deren Anteil in einer Probe unter 0,1% beträgt. Um diese Sensitivität zu erreichen, sind teilweise Optimierungsschritte (Primer/Sonden-Design, Thermoprofile) erforderlich.

Die Durchführung der meisten PCR-Verfahren kann mit der vorhandenen technischen Ausstattung und durch bestehendes Personal eines GVO-Kontrolllabors erfolgen. Die Anwendung von Sequenzierungsverfahren erfordert die Bereitstellung der notwendigen Ressourcen für den Aufbau und den Betrieb einer adäquaten IT-Infrastruktur und der entsprechenden Expertise in der bioinformatischen Analyse. Aufträge zur Sequenzierung können gegebenenfalls an Dienstleistungslabors vergeben werden, der finanzielle Aufwand dafür ist aber zu berücksichtigen.

Die bei der Überführung von Nachweisverfahren in den Routinebetrieb der EU-Kontrolllabors geltenden Bestimmungen (u.a. JRC (2015)) sind auch für die Validierung von Methoden für den Nachweis und die Identifizierung von NGT-Pflanzen bzw. die Quantifizierung anzustreben. Hierzu empfehlen wir die Bereitstellung der dafür notwendigen Ressourcen durch nationale Behörden (z.B. über einschlägig tätige Arbeitsgremien) und/oder durch die Europäische Kommission, insbesondere durch die Übertragung eines dementsprechenden Mandats an das zuständige JRC.

Informationsquellen für Nachweis und Identifizierung:

Sollte in dem untersuchten Genom eine charakteristisch-einzigartige (unique) Veränderung vorliegen, ist es möglich, damit NGT-Pflanzen zu identifizieren. Eine Identifizierung kann auch durch den kombinierten Nachweis von mehreren Modifikationen, gegebenenfalls unter Anwendung statistischer Modelle, erfolgen. Sofern Informationen zu genomeditierten GVO von den Entwicklern zur Verfügung gestellt werden, ist die Überprüfung von Sequenzunterschieden im Vergleich mit den Elternlinien (zumeist Wildtyp) möglich.

Voraussetzung für die Entwicklung von Nachweis und Identifizierung von NGT sind in jedem Fall genaue Informationen zur erfolgten Modifikation. Derzeit existieren schon mehrere von internationalen Organisationen betreute Datenbanken für den Austausch von Informationen zu GVO, z.B. das Biosafety Clearing House im Rahmen des Cartagena-Protokolls für biologische Sicherheit oder die von der OECD gewartete Biotrack-Datenbank. Diese Datenbanken könnten als Modell für eine internationale Datenbank für den Austausch von Informationen über global vermarktete NGT-Produkte dienen.

Die durchgeführte Datenbankanalyse (siehe Kapitel 5.3.1) zeigt, dass die vorliegenden Datenbanken sehr unterschiedliche Informationen bereitstellen. Die bereits bestehende Datenbank EUGenius ist auf Fragestellungen betreffend Nachweis und Identifizierung ausgerichtet. Sie enthält zum Beispiel genaue Sequenzdaten zu den genomeditierten Zielsequenzen der dort gelisteten NGT-Events. Es wird empfohlen, eine derartige, auf internationaler Ebene betreute Datenbank zu etablieren, um einen einfachen Zugang für Kontrolllabore zu allen relevanten Informationen zu ermöglichen. Die Datenbank sollte jedenfalls jene Informationen enthalten, welche den Nachweis von NGT ermöglichen. Die Bereitstellung von Ressourcen

für den Betrieb der Datenbank ist langfristig sicherzustellen.

Spezielle Anforderungen gelten für die Marktkontrolle von Lebens- und Futtermittelprodukten, falls nicht regulierte NGT-Pflanzen vorliegen. Diese erfordert mitunter die Analyse von ganzen Genomen unter Berücksichtigung der etwaigen Diversität der Kulturarten. Das setzt die Zurverfügungstellung von Pan-Genom-Datenbanken voraus. Aktuelle EU-Vorgaben zur Identifizierung von GVO würden die vollständige Kenntnis aller vorhandenen Sequenzvariationen für den genomeditierten Ort für alle Sorten und Wildpflanzen der relevanten Kulturarten erfordern (ENGL 2019). Einzelne Referenzgenome können die natürlich vorkommende genetische Diversität innerhalb einer bestimmten (Pflanzen-)Spezies nicht ausreichend abbilden. Das Vorhandensein von Spezies-spezifischen Pan-Genomen wäre in vielen Fällen hilfreich, um wichtige funktionelle Gene oder die Auswirkung von gentechnischen Eingriffen in die Pflanzenzüchtung evidenzbasiert studieren zu können (Hirsch et al. 2014; Song et al. 2020).

Es können bestehende Sequenzdatenbanken (z.B. NCBI Genbank) durch Setzen geeigneter Filter (z.B. durch Einschränkung der Ergebnisse auf Plasmid/Vektorsequenzen) durchsucht werden, um Vektorelemente aufzuspüren. Eine Vereinfachung brächte die Erstellung und laufende Aktualisierung einer Datenbank mit den derzeit verwendeten Konstrukten für NGT-Anwendungen. Von den potenziell zur Verfügung stehenden Screeningelementen (z.B. PAM, Transformationsvektoren, nicht-beabsichtigte genetische Modifikationen) sind nach derzeitigem Wissensstand – und ohne weitere Forschungsaktivitäten – Sequenzen, die aus Transformationsvektoren stammen, am ehesten für einen Screeningansatz geeignet.

Informationen aus Patenten können auf unterschiedliche Weise im Hinblick auf Nachweisfragen hilfreich sein. Einerseits kann das Vorhandensein von einschlägigen Patenten Hinweise zur besseren Abschätzung der künftigen Entwicklungspfade geben. Es ist allerdings zu bedenken, dass eine Patentierung allein noch keinen sicheren Rückschluss auf eine nachfolgende Kommerzialisierung eines Produkts erlaubt. Die Praxisrelevanz von Anwendungen lässt sich wahrscheinlich besser durch eine Kombination verschiedener Informationen einschätzen. Dazu müsste eine Patentrecherche mit der Recherche einschlägiger wissenschaftlicher Publikationen und mit Informationen aus dem behördlichen Bereich (Anfragen betreffend Regulierungsstatus, Anmeldung von Feldversuchen, Zulassungsanträge) verknüpft werden.

Andererseits sind Patente, die nachweisrelevante Angaben zu relevanten NGT-Pflanzen enthalten, mit Sicherheit eine wertvolle Hilfe für die Entwicklung neuer Nachweismethoden, vor allem dann, wenn die entsprechenden Sequenzinformationen sonst nicht öffentlich zugänglich sind. Unsere Analyse zeigt, dass ein signifikanter Anteil der untersuchten Patentschriften solche Informationen enthält. Patentschriften können daher bei der Entwicklung von Nachweismethoden eine wichtige Informationsquelle darstellen.

Referenzmaterial für Kontrolle und Quantifizierung:

Um die entwickelten Methoden inklusive der Leistungsparameter Sensitivität und Spezifität im Labor etablieren zu können, ist Referenzmaterial (biologisches Material und daraus abgeleitetes Material, umfasst die NGT-Pflanze und/oder die Elternlinie/das Ausgangsmaterial) nötig.

Für den Fall, dass ein Antrag für die Zulassung als Lebens- und Futtermittel oder für den Anbau gestellt wurde, hat der Antragsteller Referenzmaterial zur Verfügung zu stellen. Das gilt demnach auch für alle NGT, die als GVO reguliert sind. Alternativ ist für jene Fälle, in denen kein Antrag auf Zulassung vorliegt, die Kooperationsbereitschaft der Entwickler von NGT-Pflanzen eine wichtige Voraussetzung. Die Verfügbarkeit von Referenzmaterial (siehe

Kapitel 3.1.6) für Kontrollzwecke und zur Sicherstellung des globalen Handels ist durch eine zentrale Stelle (z.B. JRC) auf Basis eines Material-Transfer-Agreements sicherzustellen.

Bei der Anwendung der in einem Kontrolllabor gängigen qPCR-Verfahren ist für die Validierung von quantitativen Verfahren zertifiziertes Referenzmaterial nötig. Einige PCR-Methoden (LNA-PCR, dPCR) sind wahrscheinlich für die Quantifizierung besonders geeignet. Diese Annahme muss allerdings noch experimentell überprüft werden. Für die Anwendung im Kontrolllabor muss außerdem die Eignung der genannten Methoden für zusammengesetzte Lebens- und Futtermittel gezeigt werden. Bei der Anwendung von Verfahren der Sequenzierung ist die Quantifizierung nach derzeitigem Wissensstand eine der größten Herausforderungen. Am ehesten erscheinen zielgerichtete Sequenzierungsverfahren geeignet (siehe Kapitel 3.4.1).

Sollte biologisches Material nicht verfügbar sein, kann die Möglichkeit genutzt werden, anhand von vorliegenden Sequenzinformationen (z.B. aus Datenbanken, Patentschriften, etc.) Plasmide mit den entsprechenden DNA-Sequenzen synthetisch herzustellen. Als zentrale Stelle für die optimale Abwicklung könnte das JRC fungieren. Gegebenenfalls sind dabei patentrechtliche Einschränkungen zu berücksichtigen.

Informationen zu Referenzsequenzen sollten mindestens den Standard-Anforderungen für Sequenzierungsverfahren (z.B. EFSA (2018), ISO-Normen) beziehungsweise den Anforderungen des NCBI (O'Leary et al. 2016) entsprechen.

Forschungsbedarf:

Um unmittelbare Weiterentwicklung zu ermöglichen, wird empfohlen, auf europäischer Ebene, speziell im Rahmen von „Horizon Europe“ (EC 2020c) sowie über Mandate an das JRC und die EFSA, Forschungsaktivitäten in folgenden Bereichen zu finanzieren:

- Methodenentwicklung (inkl. bioinformatischer und biostatistischer Auswertetools)
- Charakteristika von NGT-Anwendungen (nicht-beabsichtigte Modifikationen, Spezifika, Erkennungssequenzen, etc.).
- Entwicklung von Datenbanken für Pan-Genome, um diese für den Nachweis nutzen zu können. Diese Datenbanken sind die Grundvoraussetzung, um den Nachweis von NGT mithilfe von Pan-Genomen langfristig in Kontrolllabors etablieren zu können.

Literaturverzeichnis

- Arndell, T., Sharma, N., Langridge, P., Baumann, U., Watson-Haigh, N. S., Whitford, R. (2019). gRNA validation for wheat genome editing with the CRISPR-Cas9 system. *BMC Biotechnol* 19(1): 71.
- Arulandhu, A. J., van Dijk, J., Staats, M., Hagelaar, R., Voorhuijzen, M., Molenaar, B., van Hoof, R., Li, R., Yang, L., Shi, J., Scholtens, I., Kok, E. (2018). NGS-based amplicon sequencing approach; towards a new era in GMO screening and detection. *Food Control* 93: 201-210.
- Astwood, J. D., Bannon, G. A., Dobert, R. L., Fuchs, R. L. (2003). Food biotechnology and genetic engineering. Food allergy: adverse reactions to food and food additives. Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A. Massachusetts, USA. Blackwell Publishing, Inc.: 591.
- Ayalew, H., Tsang, P. W., Chu, C., Wang, J., Liu, S., Chen, C., Ma, X.-F. (2019). Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat. *PloS one* 14(5): e0217222-e0217222.
- Banakar, R., Eggenberger, A. L., Lee, K., Wright, D. A., Murugan, K., Zarecor, S., Lawrence-Dill, C. J., Sashital, D. G., Wang, K. (2019). High-frequency random DNA insertions upon co-delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and selectable marker plasmid in rice. *Sci Rep* 9(1): 19902.
- Bell, C. C., Magor, G. W., Gillinder, K. R., Perkins, A. C. (2014). A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *BMC Genomics* 15(1): 1002.
- Bertheau, Y. (2019). New breeding techniques: Detection and identification of the techniques and derived products. Reference Module in Food Science: 320-336.
- Biswas, S., Li, R., Yuan, Z., Zhang, D., Zhao, X., Shi, J. (2019). Development of methods for effective identification of CRISPR/Cas9-induced indels in rice. *Plant Cell Rep* 38(4): 503-510.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassie, L., Nadi, R., Forni, G., Lade, S. B., Soto, E., Jin, X., Medina, V., Villorbina, G., Munoz, P., Farre, G., Fischer, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P., Schillberg, S. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol J* 14(12): 2203-2216.
- Braatz, J., Harloff, H. J., Mascher, M., Stein, N., Himmelbach, A., Jung, C. (2017). CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol* 174(2): 935-942.
- Brocanello, C., Chiodi, C., Funk, A., McGrath, J. M., Panella, L., Stevanato, P. (2018). Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant methods* 14: 28-28.
- Bruge, F., Littarru, G. P., Silvestrini, L., Mancuso, T., Tiano, L. (2009). A novel Real Time PCR strategy to detect SOD3 SNP using LNA probes. *Mutation research* 669: 80-84.
- BVL (2018). Screeningtabelle für den GVO-Nachweis 2020; https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/screening_tabelle_gvoNachweis.html; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- Chen, Z. Z., Deng, F., Wang, L. (2013). Exact algorithms for haplotype assembly from whole-genome sequence data. *Bioinformatics* 29(16): 1938-1945.
- Chhalliyil, P., Ilves, H., Kazakov, S. A., Howard, S. J., Johnston, B. H. and Fagan, J. (2020). A real-time quantitative PCR method specific for detection and quantification of the first commercialized genome-edited plant. *Foods* 9(9)

- Daniels, R., Hamilton, E. J., Durfee, K., Ndiaye, D., Wirth, D. F., Hartl, D. L., Volkman, S. K. (2015). Methods to Increase the Sensitivity of High Resolution Melting Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in Malaria. *JoVE* (105): e52839.
- Debode, F., Hulin, J., Charlotiaux, B., Coppieters, W., Hanikenne, M., Karim, L., Berben, G. (2019). Detection and identification of transgenic events by next generation sequencing combined with enrichment technologies. *Sci Rep* 9(1): 15595.
- Djukanovic, V., Smith, J., Lowe, K., Yang, M., Gao, H., Jones, S., Nicholson, M. G., West, A., Lape, J., Bidney, D., Carl Falco, S., Jantz, D., Alexander Lyznik, L. (2013). Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (MS26) using a re-designed I-Crel homing endonuclease. *Plant J* 76(5): 888-899.
- Dobosy, J. R., Rose, S. D., Beltz, K. R., Rupp, S. M., Powers, K. M., Behlke, M. A., Walder, J. A. (2011). RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. *BMC Biotechnology* 11(1): 80.
- Druml, B., Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* 158: 245–254.
- Duensing, N., Sprink, T., Parrott, W. A., Fedorova, M., Lema, M. A., Wolt, J. D., Bartsch, D. (2018). Novel features and considerations for ERA and regulation of crops produced by genome editing. *Front Bioeng Biotechnol* 6: 79.
- Eckerstorfer, M., Miklau, M., Gaugitsch, H. (2014). New plant breeding techniques. Risks associated with their application. Vienna, Umweltbundesamt GmbH: 1-94.
- 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.
- EFSA (2012). Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using zinc finger nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function. *The EFSA Journal* 10(10):2943: 1-31.
- EFSA (2018). Technical Note on the quality of DNA sequencing for the molecular characterisation of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 16(7):5345: 1-11.
- Endrullat, C., Glokler, J., Franke, P., Frohme, M. (2016). Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Appl Transl Genom* 10: 2-9.
- ENGL (2019). Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques. European Network of GMO Laboratories (ENGL); 1-17.
- ENGL (2020). Evaluation of the scientific publication “A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant”; pp 1-3.
- EuGH (2018). InfoCuria. Rechtsprechung. Urteil des Gerichtshofs (Große Kammer). 25. Juli 2018;
<http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=204387&pageIndex=0&dclang=DE&mode=req&dir=&occ=first&part=1>; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- EUginius (2020a). Detection Methods;
https://www.euginius.eu/euginius/pages/detection_index.jsf;jsessionid=Pa2i0zseD2UMYVIZQu75Db6nqEwOYiJnCt9MZAsu.subs262; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- EUginius (2020b). The European GMO database;
<https://www.euginius.eu/euginius/pages/home.jsf>; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- Europäische Kommission (1994). Entscheidung der Kommission vom 8. Juni 1994 über das

Inverkehrbringen eines genetisch veränderte Organismen enthaltenden Produkts — Samen der herbizidresistenten Tabaksorte ITB 1000 OX — nach Artikel 13 der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften. L 176: 23-24.

Europäische Kommission (2014). Multilateral Meeting on "The Future of Plant Breeding Techniques in the European Union" Wednesday 25 June 2014, Brussels - Steering Note; https://corporateeurope.org/sites/default/files/attachments/36_nbt_platform_multilateral_meeting_25_06_2014_steering_note_registered_version_0.pdf; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).

Europäische Kommission (2020a). EC study on new genomic techniques; https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech/new-genomic-techniques_en; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).

Europäische Kommission (2020b). GMO legislation; https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation_en; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).

Europäische Kommission (2020c). Horizon Europe - the next research and innovation framework programme; https://ec.europa.eu/info/horizon-europe-next-research-and-innovation-framework-programme_en; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).

FiBL (2012). Techniken der Pflanzenzüchtung. Eine Einschätzung für den ökologischen Landbau. 2., F. D. N.: 1-48.

Findlay, S. D., Vincent, K. M., Berman, J. R., Postovit, L.-M. (2016). A digital PCR-based method for efficient and highly specific screening of genome edited cells. *PLoS one* 11(4): e0153901-e0153901.

Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J. C., Genovese, P., Kaepfel, C., Nowrouzi, A., Bartholomae, C. C., Wang, J., Friedman, G., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Glimm, H., Schmidt, M., Naldini, L., von Kalle, C. (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 29(9): 816-823.

Gao, C., Qiu, J. L., Wang, Y. (2015). Modified Plants; https://patentimages.storage.googleapis.com/16/c0/43/b98f393927d88f/WO2015109752_A1.pdf; (Letzter Zugriff: 12/06/2020). WO 2015/109752 A1, 1-75.

Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M. G., West, A., Bidney, D., Falco, S. C., Jantz, D., Lyznik, L. A. (2010). Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J* 61(1): 176-187.

Gerdes, L., Iwobi, A., Busch, U., Pecoraro, S. (2016). Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms. *Biomol Detect Quantif* 7: 9-20.

Grohmann, L., Broll, H., Dagand, E., Hildebrandt, S., Hübert, P., Kiesecker, H., Lieske, K., Mäde, D., Mankertz, D., Reiting, D., Schulze, D., Speck, B., Uhlig, S., Wahler, D., Waiblinger, H.-U., Woll, K., Zur, K. (2016). Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods.

Grohmann, L., Keilwagen, J., Duensing, N., Dagand, E., Hartung, F., Wilhelm, R., Bendiek, J., Sprink, T. (2019). Detection and identification of genome editing in plants: Challenges and opportunities. *Front Plant Sci* 10: 236.

Guilinger, J. P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Joung, J. K., Liu, D. R. (2014). Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature Methods* 11(4): 429-435.

Guttikonda, S. K., Marri, P., Mammadov, J., Ye, L., Soe, K., Richey, K., Cruse, J., Zhuang, M., Gao, Z., Evans, C., Rounsley, S., Kumpatla, S. P. (2016). Molecular Characterization of Transgenic Events Using Next Generation Sequencing Approach. *PLoS One* 11(2): e0149515.

- Hafez, M., Hausner, G. (2012). Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome* 55(8): 553-569.
- Hahn, F., Nekrasov, V. (2019). CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Rep* 38(4): 437-441.
- Hirsch, C. N., Foerster, J. M., Johnson, J. M., Sekhon, R. S., Muttoni, G., Vaillancourt, B., Penagaricano, F., Lindquist, E., Pedraza, M. A., Barry, K., de Leon, N., Kaeppler, S. M., Buell, C. R. (2014). Insights into the maize pan-genome and pan-transcriptome. *Plant Cell* 26(1): 121-135.
- Holst-Jensen, A., Spilberg, B., Arulandhu, A. J., Kok, E., Shi, J., Zel, J. (2016). Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. *Anal Bioanal Chem* 408(17): 4595-4614.
- Integrated DNA Technologies (2020). RNase H2 enzyme; <https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/master-mixes-reagents/rnase-h-enzyme>; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- Jacobsen, E., Schouten, H. J. (2009). Cisgenesis: an important sub-invention for traditional plant breeding companies. *Euphytica* 170(1): 235.
- Jansing, J., Schiermeyer, A., Schillberg, S., Fischer, R., Bortesi, L. (2019). Genome editing in agriculture: Technical and practical considerations. *Int J Mol Sci* 20(12)
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816-821.
- Johnson, M. P., Haupt, L. M., Griffiths, L. R. (2004). Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic acids research* 32(6): e55-e55.
- JRC (2014). Welcome to the JRC GMO-Matrix application; <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix>; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- JRC (2015). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing: 1-24.
- JRC (2016). GMOMETHODS: EU Database of Reference Methods for GMO Analysis; <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods>; (Letzter Zugriff: 12/06/2020).
- JRC (2019). Overview and recommendations for the application of digital PCR. EUR 29673 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-76-00180-5, doi:10.2760/192883, JRC 115736: 1-56.
- Kadam, U. S., Shelake, R. M., Chavhan, R. L., Suprasanna, P. (2018). Concerns regarding 'off-target' activity of genome editing endonucleases. *Plant Physiol Biochem* 131: 22-30.
- Kawall, K. (2019). New possibilities on the horizon: Genome editing makes the whole genome accessible for changes. *Front Plant Sci* 10: 525.
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, J. S. (2013). TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. *Nat Methods* 10(3): 185.
- Kosir, A. B., Arulandhu, A. J., Voorhuijzen, M. M., Xiao, H., Hagelaar, R., Staats, M., Costessi, A., Zel, J., Kok, E. J., Dijk, J. P. V. (2017). ALF: a strategy for identification of unauthorized GMOs in complex mixtures by a GW-NGS method and dedicated bioinformatics analysis. *Sci Rep* 7(1): 14155.
- Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q., Luo, W., Wu, G., Li, H. (2016). Re-assessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci* 7: 377.

- Li, R., Ba, Y., Song, Y., Cui, J., Zhang, X., Zhang, D., Yuan, Z., Yang, L. (2020). Rapid and sensitive screening and identification of CRISPR/Cas9 edited rice plants using quantitative real-time PCR coupled with high resolution melting analysis. *Food Control* 112: 107088.
- Li, Z., Liu, Z. B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., Ward, R. T., Clifton, E., Falco, S. C., Cigan, A. M. (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169(2): 960-970.
- Liang, Z., Chen, K., Yan, Y., Zhang, Y., Gao, C. (2018). Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol J* 16(12): 2053-2062.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., Liu, Y., G. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* 8(8): 1274-1284.
- Maslov, A. Y., Quispe-Tintaya, W., Gorbacheva, T., White, R. R., Vijg, J. (2015). High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests? *Mutat Res* 776: 136-143.
- Metje-Sprink, J., Menz, J., Modrzejewski, D., Sprink, T. (2018). DNA-free genome editing: Past, present and future. *Front Plant Sci* 9: 1957.
- Miyaoka, Y., Chan, A. H., Judge, L. M., Yoo, J., Huang, M., Nguyen, T. D., Lizarraga, P. P., So, P.-L., Conklin, B. R. (2014). Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection. *Nature methods* 11(3): 291-293.
- Mock, U., Hauber, I., Fehse, B. (2016). Digital PCR to assess gene-editing frequencies (GEF-dPCR) mediated by designer nucleases. *Nature Protocols* 11(3): 598-615.
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Wilhelm, R. (2019). What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environmental Evidence* 8(1): 27.
- Mou, H., Smith, J. L., Peng, L., Yin, H., Moore, J., Zhang, X. O., Song, C. Q., Sheel, A., Wu, Q., Ozata, D. M., Li, Y., Anderson, D. G., Emerson, C. P., Sontheimer, E. J., Moore, M. J., Weng, Z., Xue, W. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol* 18(1): 108.
- Mouritzen, P., Nielsen, A. T., Pfundheller, H. M., Choleva, Y., Kongsbak, L., Møller, S. (2003). Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA™). *Expert Review of Molecular Diagnostics* 3(1): 27-38.
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C. M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V. S., Kodali, V. K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K. M., Murphy, M. R., O'Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S. H., Rausch, D., Riddick, L. D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S. S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R. E., Vatsan, A. R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M. J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T. D., Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 44(D1): D733-745.
- Pacher, M., Puchta, H. (2017). From classical mutagenesis to nuclease-based breeding - directing natural DNA repair for a natural end-product. *Plant J* 90(4): 819-833.
- Platt, R. J. (2019). CRISPR tool modifies genes precisely by copying RNA into the genome. *Nature* 576(7785): 48-49.

- Puchta, H., Fauser, F. (2013). Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol* 57(6-8): 629-637.
- Qin, L., Li, J., Wang, Q., Xu, Z., Sun, L., Alariqi, M., Manghwar, H., Wang, G., Li, B., Ding, X., Rui, H., Huang, H., Lu, T., Lindsey, K., Daniell, H., Zhang, X., Jin, S. (2020). High-efficient and precise base editing of C*G to T*A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J* 18(1): 45-56.
- Ranade, K., Chang, M. S., Ting, C. T., Pei, D., Hsiao, C. F., Olivier, M., Pesich, R., Hebert, J., Chen, Y. D., Dzau, V. J., Curb, D., Olshen, R., Risch, N., Cox, D. R., Botstein, D. (2001). High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 11(7): 1262-1268.
- Ravindran, S. (2019). Got mutation? 'Base editors' fix genomes one nucleotide at a time. *Nature* 575(7783): 553-555.
- Razzaq, A., Saleem, F., Kanwal, M., Mustafa, G., Yousaf, S., Imran Arshad, H. M., Hameed, M. K., Khan, M. S., Joyia, F. A. (2019). Modern trends in plant genome editing: An inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *Int J Mol Sci* 20(16)
- Rees, H. A., Liu, D. R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet* 19(12): 770-788.
- Ren, C., Guo, Y., Gathunga, E. K., Duan, W., Li, S., Liang, Z. (2019). Recovery of the non-functional EGFP-assisted identification of mutants generated by CRISPR/Cas9. *Plant Cell Rep* 38(12): 1541-1549.
- Ribarits, A., Stepanek, W., Peterseil, V., Wögerbauer, M., Mechtler, K., Hochegger, R., Hartmann, J., Söllinger, J., Widhalm, I., Brüller, W., Leonhardt, C. (2012). Cisgenesis - A report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding. Vienna, BMG: 1-169.
- Rupp, J., Solbach, W., Gieffers, J. (2006). Single-nucleotide-polymorphism-specific PCR for quantification and discrimination of *Chlamydia pneumoniae* genotypes by use of a "locked" nucleic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3785.
- Sander, J. D., Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32(4): 347-355.
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R., Schopke, C. R., Gocal, G. F. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol J* 14(2): 496-502.
- Schmitt, M. W., Kennedy, S. R., Salk, J. J., Fox, E. J., Hiatt, J. B., Loeb, L. A. (2012). Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(36): 14508-14513.
- Schouten, H. J., Krens, F. A., Jacobsen, E. (2006). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Rep* 7(8): 750-753.
- Schouten, H. J., Vande Geest, H., Papadimitriou, S., Bemmer, M., Schaart, J. G., Smulders, M. J., Perez, G. S., Schijlen, E. (2017). Re-sequencing transgenic plants revealed rearrangements at T-DNA inserts, and integration of a short T-DNA fragment, but no increase of small mutations elsewhere. *Plant Cell Rep* 36(3): 493-504.
- Sharpe, J. J., Cooper, T. A. (2017). Unexpected consequences: exon skipping caused by CRISPR-generated mutations. *Genome Biol* 18(1): 109.
- Song, J. M., Guan, Z., Hu, J., Guo, C., Yang, Z., Wang, S., Liu, D., Wang, B., Lu, S., Zhou, R., Xie, W. Z., Cheng, Y., Zhang, Y., Liu, K., Yang, Q. Y., Chen, L. L., Guo, L. (2020). Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of

- Brassica napus. *Nat Plants* 6(1): 34-45.
- Songstad, D. D., Petolino, J. F., Voytas, D. F., Reichert, N. A. (2017). Genome editing of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 36(1): 1-23.
- Ståhlberg, A., Krzyzanowski, P. M., Egyud, M., Filges, S., Stein, L., Godfrey, T. E. (2017). Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nat Protoc* 12(4): 664-682.
- Troadec, M.-B., Pagès, J.-C. (2019). Where are we with unintended effects in genome editing applications from DNA to phenotype: focus on plant applications. *Transgenic Research* 28(2): 125-133.
- Ugozzoli, L. A., Latorra, D., Pucket, R., Arar, K., Hamby, K. (2004). Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids. *Analytical Biochemistry* 324(1): 143-152.
- Van Vu, T., Sung, Y. W., Kim, J., Doan, D. T. H., Tran, M. T., Kim, J. Y. (2019). Challenges and perspectives in homology-directed gene targeting in monocot plants. *Rice (N Y)* 12(1): 95.
- Vats, S., Kumawat, S., Kumar, V., Patil, G. B., Joshi, T., Sonah, H., Sharma, T. R., Deshmukh, R. (2019). Genome editing in plants: Exploration of technological advancements and challenges. *Cells* 8(11)
- Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C. A., Talkowski, M. E., Musunuru, K. (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell* 15(1): 27-30.
- Vouillot, L., Thelie, A., Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)* 5(3): 407-415.
- Waiblinger, H. U., Grohmann, L., Mankertz, J., Engelbert, D., Pietsch, K. (2010). A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. *Anal Bioanal Chem* 396(6): 2065-2072.
- Wang, H., La Russa, M., Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem* 85: 227-264.
- Wang, X. (2016). Next-Generation Sequencing Data Analysis. CRC Press, Inc.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J.-L. (2014a). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotech* 32(9): 947-951.
- Wenger, A. M., Peluso, P., Rowell, W. J., Chang, P. C., Hall, R. J., Concepcion, G. T., Ebler, J., Functammasan, A., Kolesnikov, A., Olson, N. D., Töpfer, A., Alonge, M., Mahmoud, M., Qian, Y., Chin, C. S., Phillippy, A. M., Schatz, M. C., Myers, G., DePristo, M. A., Ruan, J., Marschall, T., Sedlazeck, F. J., Zook, J. M., Li, H., Koren, S., Carroll, A., Rank, D. R., Hunkapiller, M. W. (2019). Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat Biotechnol* 37(10): 1155-1162.
- Yang, L., Wang, C., Holst-Jensen, A., Morisset, D., Lin, Y., Zhang, D. (2013). Characterization of GM events by insert knowledge adapted re-sequencing approaches. *Scientific Reports* 3(1): 2839.
- Yang, N., Liu, J., Gao, Q., Gui, S., Chen, L., Yang, L., Huang, J., Deng, T., Luo, J., He, L., Wang, Y., Xu, P., Peng, Y., Shi, Z., Lan, L., Ma, Z., Yang, X., Zhang, Q., Bai, M., Li, S., Li, W., Liu, L., Jackson, D., Yan, J. (2019). Genome assembly of a tropical maize inbred line provides insights into structural variation and crop improvement. *Nat Genet* 51(6):

1052-1059.

You, Y., Moreira, B., Behlke, M., Owczarzy, R. (2006). Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic acids research* 34: e60.

Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N., Zhu, J. K. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 12(6): 797-807.

Zhu, C., Bortesi, L., Baysal, C., Twyman, R. M., Fischer, R., Capell, T., Schillberg, S., Christou, P. (2017). Characteristics of genome editing mutations in cereal crops. *Trends Plant Sci* 22(1): 38-52.

Zischewski, J., Fischer, R., Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv* 35(1): 95-104.

Anhänge

A. Informationen zur Unterstützung der Entwicklung von Nachweismethoden von genomeditierten Pflanzen	52
A.1 Einleitung	52
A.1.1 Für Nachweis und Identifizierung relevante Informationen	52
A.1.2 Weitere Informationen (mögliche Hinweise auf NGT).....	52
A.2 Wissenschaftliche Literatur	52
A.2.1 Literaturrecherche	52
A.2.2 Allgemeine Informationen aus der wissenschaftlichen Literatur.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
A.2.3 Spezifika bestimmter NGT-Anwendungen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
A.3 Datenbanken.....	56
A.3.1 Informationen der Datenbanken	56
A.3.2 Kurzbeschreibung der Datenbanken	57
A.4 Behördendokumente, Informationen der Produktentwickler	58
A.4.1 Behördendokumente	58
A.4.2 Informationen von Produktentwicklern.....	59
A.4.3 Europäisches Patentregister	60
B. Protokoll: Austausch mit externen Expertinnen und Experten	64
Literaturverzeichnis	68
C. Tabellen (Ergebnisse Datenrecherche)	70

A. Informationen zur Unterstützung der Entwicklung von Nachweismethoden von genomeditierten Pflanzen

A.1 Einleitung

A.1.1 Für Nachweis und Identifizierung relevante Informationen

Mit dem Ziel, die Möglichkeiten für die Entwicklung von Nachweismethoden aufzuzeigen, wurden Informationen gesammelt, die für die Entwicklung von Nachweismethoden für genomeditierte Pflanzen zweckdienlich sein können. Dazu gehören Daten, die für Nachweis und Identifizierung relevant sind. Darunter fallen beispielsweise Informationen zu Schnittstellen im Genom, Mutationen oder methodenspezifischen Voraussetzungen. Im Vordergrund dieser Recherche stand die Erfassung von Genomdaten (im Speziellen: Sequenzinformationen), um daraus Möglichkeiten für einen molekularen Nachweis abzuleiten.

A.1.2 Weitere Informationen (mögliche Hinweise auf NGT)

Ziel dieser Recherche war die Suche nach Hinweisen, aus denen Verdachtsmomente betreffend die Anwendung von NGT bei Pflanzen abgeleitet werden könnten.

Folgende Ressourcen wurden bei der Datenrecherche berücksichtigt: Datenbanken, wissenschaftliche Literatur, Antragsdokumente und Anfragen bei Behörden, Informationen der Produktentwickler und Patentdatenbanken.

A.2 Wissenschaftliche Literatur

A.2.1 Literaturrecherche

Die Literatursuche wurde in den umfassenden wissenschaftlichen Datenbanken PubMed und Scopus durchgeführt. Die Suchstrategie beinhaltete mehrere Schritte. Auf Basis bereits verfügbarer Informationen (Modrzejewski et al. 2019) wurden in einem ersten Schritt Suchbegriffe sowie deren Kombinationen festgelegt und in den Datenbanken eingegeben. In Tabelle 1 sind die Suchalgorithmen aufgelistet und die daraus resultierenden Treffer.

Tab.1: Suchergebnisse PubMed und Scopus, Suchalgorithmen und Treffer (Stand Feb. 2020)

Suchalgorithmus PubMed *	PubMed Treffer	PubMed (2018-20) Treffer	Suchalgorithmus Scopus *	Scopus Treffer	Scopus (2018-20) Treffer
("Gene Editing"[Mesh]) AND plants[Title/Abstract]	338	220	plants AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	519	346
Genome Editing AND Plants[Title/Abstract] AND off target[Title/Abstract]	48	32	plants AND "off target" AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing")) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI"))	183	112
(("Gene Editing"[Mesh]) AND Plants[Title/Abstract]) AND pam[Title/Abstract]	9	7	plants AND pam AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	73	48
(("Gene Editing"[Mesh]) AND Plants[Title/Abstract]) AND detection[Title/Abstract]	13	12	plants AND detection AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	109	68
(("Gene Editing"[Mesh]) AND	52	35	plants AND "targeted muta-	262	158

Plants[Title/Abstract]) AND targeted mutagenesis[Title/Abstract]			genesis" AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))		
((("Gene Editing"[Mesh]) AND Plants[Title/Abstract]) AND targeted mutagenesis[Title/Abstract])) AND SDN[Title/Abstract]	0	0	plants AND "targeted mutagenesis" AND sdn AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	3	2
("Gene Editing"[Mesh]) AND sdn	3	2	sdn AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	5	3
("Gene Editing"[Mesh]) AND sdn-1	1	1	sdn-1 AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	1	1
("Gene Editing"[Mesh]) AND sdn-2	1	1	sdn-2 AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	1	1
("Gene Editing"[Mesh]) AND sdn-3	1	1	sdn-3 AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	1	1
Oligonucleotide Mutagenesis	55	1	"Oligonucleotide Mutagenesis"	89	8
("Gene Editing"[Mesh]) AND Oligonucleotide Mutagenesis	43	21	"Oligonucleotide Mutagenesis" AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	1	1
("Gene Editing"[Mesh]) AND Gene knock-in[Title/Abstract]	20	12	"Gene knock-in" AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "AGRI")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Gene Editing"))	25	15

* Die Suche nach gleichen Begriffen erforderte in PubMed beziehungsweise Scopus verschiedene Suchalgorithmen. Die Eingrenzung auf NGT erfolgte in PubMed mittels MeSH Database, in Scopus mittels der Kategorien „Agricultural and Biological Sciences“ und „Gene Editing“.

In relevanten Literaturstellen wurde nach Anhaltspunkten (z.B. technikspezifischen Eigenheiten, speziellen Mustern auf DNA-Ebene, Informationen zum biochemischen Prozess) gesucht, die für den Nachweis von unbekanntem genomeditierten GVO hilfreich sein können.

Literatur wurde zusätzlich über Querverweise oder Zitierungen gesammelt. In einem abschließenden Schritt wurde nach Überblicksarbeiten (Reviews) gesucht, die sich mit dem Nachweis von genomeditierten GVO kritisch auseinandersetzen. Diese Information diente insbesondere der Ergänzung und Sammlung möglicher Hinweise auf genomeditierte GVO. Die Suche war auf die Jahre 2018-2020 eingeschränkt, Information aus bereits vorhandener Literatur fließt in die Bewertung ein.

Aus den spezifischen Informationen der Literaturrecherche wurden anschließend geeignete Nachweisverfahren für NGT ausgewählt (siehe Kapitel 3.2). Diese Verfahren werden in Kapitel 3 ausführlich beschrieben und ihre Vor- und Nachteile diskutiert.

A.2.2 Allgemeine Informationen aus der wissenschaftlichen Literatur

Aus der wissenschaftlichen Literatur können allgemeine Informationen zu Techniken der Genomeditierung entnommen werden, die einerseits unmittelbar hilfreich für die Entwicklung von Nachweismethoden sein können, andererseits den Stand der Technik abbilden.

Gesammelte allgemeine Informationen:

- Cas-Varianten (siehe Kapitel 4.2.3).
- Protospacer Adjacent Motif (PAM) (siehe Kapitel 4.2.3).
- Vektordesign (Vektoren mit transgener DNA, die ins Pflanzengenom integriert wird; transiente Vektoren).
- Mutationstyp: heterozygot, homozygot, biallel, mosaik.
- Kategorien: SDN-1, SDN-2, SDN-3 (siehe Kapitel 1.6).

A.2.3 Spezifika bestimmter NGT-Anwendungen

Aus der wissenschaftlichen Literatur können Informationen entnommen werden, die für bestimmte NGT spezifisch sind. Im Folgenden einige solcher Beispiele.

Cas-Varianten und PAM-Sequenzen (CRISPR/Cas):

PAM-Sequenzen dienen als Andockstellen für CRISPR/Cas-Effektormoleküle. Bei der Anwendung von CRISPR/Cas-Techniken werden verschiedene Endonukleasen (Cas-Proteine) eingesetzt, weil diese Bindungsstellen für unterschiedliche PAM-Sequenzen besitzen. Die häufigste Cas-Variante ist Cas9. Weitere in der Pflanzenzüchtung eingesetzte Cas-Varianten sind Cas12a (Cpf1) und Cas12b. Zusätzlich werden in letzter Zeit auch Gen-Orthologe Systeme oder synthetische Cas-Endonukleasen verwendet, um die Bandbreite des Einsatzes der CRISPR/Cas-Techniken zu erhöhen.

Zum Beispiel wird bei der Anwendung von SpCas9-Endonuklease (Cas9 Enzym aus *Streptococcus pyogenes*) die PAM-Sequenz 5'-NGG-3' bevorzugt. In der genomeditierten Pflanze befindet sich die Schnittstelle dieser Endonuklease drei Nukleotide downstream von 5'-NGG-3'.

Grundsätzlich kann eine Mutation in einem vorbestimmten Abstand zu PAM daher ein Anhaltspunkt für die Anwendung von CRISPR/Cas sein (siehe Kapitel 3.5.2). Allerdings gibt es folgende Einschränkungen:

1. Es gibt alternative PAM-Sequenzen, die ebenso funktionieren, wenngleich mit geringerer Effizienz. Für Cas9-Proteine gelten unter anderem die Sequenzen 5'-NAG-3' oder 5'-NGA-3' als alternativ.
2. Es können unterschiedliche Cas-Proteinvarianten oder eben auch synthetische Cas-Proteine für die Genomeditierung von Pflanzen eingesetzt werden. Generell sind daher sehr viele verschiedene PAM-Sequenzen für CRISPR/Cas-Techniken einsetzbar.

Für eine Liste mit verschiedenen, bei Pflanzen verwendeten Cas-Varianten inklusive PAM-Sequenzen und weiterer Informationen (z.B. zur Schnittstelle) siehe Anhang 2.

Bevorzugung von Thymin bei TALEN-Techniken:

Bei der Anwendung von TALEN sollte das 5'-Nukleotid der Bindungsstelle ein Thymin sein. Dadurch werden hohe Nukleaseaktivitäten erreicht (Lamb, Mercer und Barbas 2013; Hubbard et al. 2015). Es gibt zwar auch unspezifische TALEN-Systeme, aber keine Varianten

ten, die an der 5´-Stelle ein Adenosin oder Cytidin bevorzugen würden (Hubbard et al. 2015). Diese Bevorzugung von Thymidin an der 5´-Stelle bestätigt sich auch in neueren Forschungsarbeiten zur Anwendung von TALEN in der Pflanzenzüchtung. Allerdings hat die Diskussion rund um das Design von uneingeschränkt anwendbaren TALEN-Techniken auf Grund der geringeren Bedeutung von TALEN gegenüber CRISPR/Cas als Werkzeug zur Genomeditierung in den letzten Jahren stark nachgelassen. Des Weiteren bedeutet die Bevorzugung von Thymidin theoretisch für die TALEN-Technik nur minimale Einschränkungen, insbesondere für Gene Knock Out-Anwendungen (Lamb, Mercer und Barbas 2013).

DNA-Tripletsequenzen bei ZFN-Techniken:

In der Pflanzenzucht verwendete Zinkfinger-nukleasen-Systeme bestehen meist aus einem Dimer von drei Zinkfinger-Proteinen, da solche Systeme ausreichen, um einzigartige DNA-Sequenzen zu erkennen. In diesem Fall erfolgt die Bindung an die DNA über 18 bp (Mohanta et al. 2017). Es können aber auch längere ZFN-Einheiten benutzt werden, wodurch die Spezifität der ZFN-Technik erhöht wird. Zum Beispiel gibt es ZFN, die an 36 Basenpaaren binden können (Ribarits et al. 2012).

Jedes einzelne Zinkfingerprotein erkennt und bindet jeweils an eine bestimmte DNA-Triplet-Sequenz, also an eine Variation von drei Nukleotiden. In den frühen Forschungsarbeiten sind Einschränkungen der ZFN-Systeme auf die Bindungssequenz 5'-GNNGNN-3' beschrieben. Das heißt, dass Zinkfingerproteine bekannt waren, die bevorzugt an die Triplet-Sequenz „GNN“ gebunden haben (Carroll et al. 2006). In weiterer Folge wurden aber ZFN für weitere Triplet-Nukleotidsequenzen wie ANN und CNN, und zuletzt auch TNN entwickelt (Mohanta et al. 2017). Die anfangs bestehenden Einschränkungen der ZFN-Technik auf sehr spezifische Zielsequenzen waren dadurch größtenteils überwunden. Letztendlich können auch verschiedene Zinkfingerproteine entwickelt werden, die als Zielsequenzen alle möglichen Kombinationen der Triplet-Sequenzen aufweisen („ANNCNNGNN“, „GNNANNANN“, usw.).

Genauso wie TALEN, sind ZFN-Techniken nicht mehr die erste Wahl für die Herstellung von genomeditierten Pflanzen und in den letzten Jahren vielfach vom einfacheren Genomeditierungssystem CRISPR/Cas abgelöst worden. Die Diskussion in Bezug auf das optimale Design von ZFN-Systemen und die Erweiterung ihres Einsatzspektrums (im Speziellen die Zielsequenz betreffend) hat daher derzeit – genauso wie für TALEN – eine eher geringe Bedeutung (Razzaq et al. 2019).

Typische Veränderungen durch Prime Editing-Techniken:

Bei den Ansätzen von Prime Editing (PE) in der Pflanzenzüchtung ist zu erkennen, dass die PAM-Sequenz selbst verändert werden kann. Dies ist durch „klassische“ CRISPR/Cas-Techniken nicht machbar. Ebenso ist es möglich, mittels PE genetische Modifikationen beiderseits der PAM-Sequenz hervorzurufen, und ebenso können auch Modifikationen bis zu einer Entfernung von nur einem Basenpaar von einem PAM erzeugt werden (Li et al. 2020a). Um einschätzen zu können, ob und auf welche Art und Weise diese Varianten der genetischen Modifikationen durch PE regelmäßig angewendet werden und somit für den Nachweis genutzt werden können, ist die Datenlage in Bezug auf PE-Anwendungen bei Pflanzen noch zu gering.

Genetische Modifikationen durch NGT:

NGT können Doppelstrangbrüche erzeugen, die durch Reparatursysteme der Zelle behoben werden. Von den drei Reparaturtypen NHEJ, HDR, MMEJ dominiert in Pflanzenzellen das NHEJ-System. Im Gegensatz zu NHEJ ermöglicht es der HDR-Mechanismus, die Art der Mutationen zu beeinflussen. Deshalb wird bei einigen Anwendungen von NGT bei Pflanzen

versucht, durch bestimmte methodische Ansätze die Tendenz zur NHEJ-Reparatur zu verringern (z.B. durch ein verändertes Vektordesign oder die Überexpression von Schlüsselenzymen).

Neben großen Veränderungen (z.B. die Insertion von Genabschnitten) werden NGT auch verwendet um kleine Mutationen im Zielgenom zu erzeugen. Je nach Design können mittels NGT verschiedenartige, kleinere Modifikationen wie Deletionen, Insertionen, Punktmutationen oder kleine Substitutionen hervorgebracht werden.

In Tabelle C.3 (Anhang C) sind Beispiele für durch NGT erzeugte genetische Modifikationen aufgelistet. In den wissenschaftlichen Forschungsarbeiten zu Pflanzenzüchtungen mittels NGT sind am häufigsten Deletionen zu beobachten (siehe auch Kapitel 1.4).

A.3 Datenbanken

A.3.1 Informationen der Datenbanken

Es konnten vier Online-Datenbanken ermittelt werden, die relevante Informationen zu genomeditierten Pflanzen bereitstellen: Biosafety Clearing House, EUginus, PGED, CrisprGE. Alle diese Datenbanken sind ohne Registrierung frei zugänglich, bieten aber nach einer Registrierung gegebenenfalls den Zugang zu zusätzlichen Informationen in geschützten Bereichen an (z.B. EUginus). Der Informationsgehalt der einzelnen Datenbanken ist sehr unterschiedlich. Einige bieten vor allem Informationen zu marktrelevanten Pflanzen an, andere geben einen Überblick auch über Forschungsprojekte und -ansätze. Es finden sich teilweise in den Datenbanken detaillierte technische Angaben, die für die Entwicklung von Nachweismethoden nützlich sind. Gerade Kontrolllabore sind von einem Zugang zu Detailinformationen abhängig. Ohne eine breite, technische Datenbasis ist der Nachweis von Pflanzen und Produkten, die auf der Anwendung von NGT basieren, kaum möglich, und somit auch die Kontrolle von Warenströmen oder ein Umweltmonitoring in Bezug auf NGT-Pflanzen schwer durchzuführen.

In allen Datenbanken sind folgende, allgemeine Daten zu finden:

- Pflanzenart
- Merkmalsausprägung
- Zielgen
- Technik der Genomeditierung
- Transformationsmethode
- Vektor

Nur in bestimmten Datenbanken sind folgende, spezifische Daten zu finden:

- Zielsequenz
- Art der Mutation (z.B. 1 bp Deletion)
- Mutationssequenz
- Bestimmung (Nachweis) der erfolgreichen Genomeditierung
- Effizienz der Technik
- Quelle (wissenschaftliche Literatur)
- Beschreibung des Zielgens und seiner Rolle im Organismus

- Zulassungsstatus

A.3.2 Kurzbeschreibung der Datenbanken

Biosafety Clearing House:

Die Datenbank des Biosafety Clearing House (BCH) dient dem internationalen Informationsaustausch auf Basis der Verträge des Cartagena-Protokolls über die biologische Sicherheit¹. Die Datenbank umfasst weltweite Einträge zu Zulassungen von GVO. Außerdem sind Daten über Freisetzungsversuche vorhanden.

Details:

- 6 Einträge (Crispr/Cas)
- 5 Mais, 1 Cassava
- Zusätzlich zur allgemeinen Information wird die Funktion und Rolle des Zielgens in der Pflanze genau beschrieben. Es finden sich Verlinkungen auf Gen-Datenbanken.

EUginus:

Die Datenbank „European GMO Initiative for a Unified Database System“ (EUginus) wird vom deutschen Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit und der niederländischen Wageningen Universität verwaltet². Der Schwerpunkt dieser Datenbank liegt auf Details hinsichtlich der Detektion und Identifizierung von GV-Pflanzen.

Details:

- 11 Einträge (Crispr/Cas, TALEN, ZFN, ODM)
- 3 Kartoffel, 2 Sojabohne, 2 Raps, 1 Mais, 1 Tomate, 1 Pilz, 1 Ackerhellerkraut (*Thlaspi arvense*)
- Zusätzlich erlaubt die EUginus-Datenbank eine Volltextsuche inklusive Platzhalter. Sie inkludiert neben der allgemeinen Information auch Daten zur Nachweismethode des betroffenen Gens, zu verwendeten Vektoren, zur erzeugten Mutation sowie Links zu Publikation und Antragsdokumenten.

PGED:

Das Boyce Thompson Institute im Bundesstaat New York (USA) betreut eine umfangreiche Datenbank zu CRISPR/Cas-editierten Pflanzen. Sie wird „Plant Genome Editing Database“ (PGED) genannt und beinhaltet 621 NGT-Pflanzenevents³. Diese Datenbank ist zwar auf CRISPR/Cas-Techniken eingeschränkt, sie bietet aber eine große Zahl an Datensätzen (>600) und eine Vielzahl an molekularen Detailinformationen zu mehreren Forschungsprojekten.

Details:

- 621 Einträge (CRISPR/Cas)
- 538 Tomate, 35 Physalis, 19 Reis, 14 Tabak, 6 Klee (*Medicago truncatula*), 4 Maniok,

¹ <https://bch.cbd.int/database/organisms/>

² <https://euginus.eu/euginus/pages/home.jsf>

³ <http://plantcrispr.org/cgi-bin/crispr/index.cgi>

u.a.

- Die PGED-Datenbank beinhaltet viele zusätzliche Informationen: Es werden die Ziele des Züchtungsvorgangs beschrieben und Namen der Forschungsprojekte genannt. Zusätzlich werden zahlreiche Daten zur molekularen Charakterisierung bereitgestellt: das Transformationskonstrukt, die Sequenz der verwendeten Guide-RNA, den genetischen Background des Events, eine Beschreibung des Zielgens inklusive seiner chromosomalen Position sowie Art der Mutation.

CrisprGE:

Diese Datenbank wurde geschaffen, um den laufenden Zuwachs an Informationen bei CRISPR/Cas-Techniken gerecht zu werden und interessierten Personen Details zu diesen Techniken zu bieten. CrisprGE stammt vom Bioinformatics Centre, Institute of Microbial Technology in Chandigarh (Indien)⁴ und stellt aktuelle Informationen zu CRISPR-Forschungsprojekten bereit (Kaur et al. 2015). Es werden neben Daten zu Anwendungen von CRISPR/Cas bei Pflanzen auch zahlreiche Anwendungen bei Tier und Mensch näher beschrieben.

Details:

- 4728 Einträge (>1000 Einträge zu Pflanzen, CRISPR/Cas)
- 516 *Arabidopsis thaliana*, 398 Reis, 185 Sojabohne, 74 Tabak, 15 Weizen, 13 Tomate, 11 Orange
- Zusätzlich zur allgemeinen Information ermöglicht CrisprGE das Recherchieren von Zielsequenzen, Genloci, Mutationssequenz und verwendeten Nachweismethoden zur Überprüfung der erfolgreichen Genomeditierung. Farbliche Markierungen der Sequenzinformationen erlauben eine rasche Identifizierung von Punktmutationen, Indels, sowie PAM- und Zielsequenzen. Des Weiteren liefert die Datenbank Vektorinformationen und Publikationsverweise zu den entsprechenden Forschungsstudien.

A.4 Behördendokumente, Informationen der Produktentwickler

A.4.1 Behördendokumente

Antragsunterlagen oder Anfragen bezüglich Freisetzung und Inverkehrbringen liefern Daten zu marktreifen NGT-Pflanzen, die für eine kommerzielle Zulassung vorgesehen sind.

In der Sammlung „APHIS Letters of Inquiry“ finden sich Anfragen von Firmen über die regulatorische Einordnung von genomeditierten Pflanzen in den USA⁵. Angefragt wird beim US Landwirtschaftsministerium (United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service) und die Behörde (USDA APHIS) entscheidet, welche genomeditierten Pflanzen in den USA speziellen Regulierungsmaßnahmen unterliegen.

In der APHIS Datenbank befinden sich Informationen zu 51 genomeditierten Pflanzen (Stand: Feb. 2020) (CRISPR/Cas 18, TALEN 4, Negative Segreganten 5, als „genomeditiert“ gelistet 20). Die Produktentwickler mit den meisten Einträgen (je 3, Stand: Feb. 2020) sind: Calyxt Inc., Scotts Miracle-Gro, Illinois State University.

Genomeditierte Pflanzen werden in Kanada von der „Canadian Food Inspection Agency“ als

⁴ <http://crdd.osdd.net/servers/crisprge/index.php>

⁵ https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated/Regulated_Article_Letters_of_Inquiry

Novel Food zugelassen, sofern sie zur Erzeugung von Lebensmitteln bestimmt sind und neuartige Charakteristika zeigen. In der Liste der risikobewerteten Novel Foods befinden sich derzeit (Stand: Feb. 2020) 2 NGT-Pflanzen (beide ODM Rapsevents)⁶.

In Australien werden zusammengefasste Informationen zu Produktanfragen von genomeditierten Pflanzen vom „Australian Department of Health - Office of the Gene Technology Regulator“ in einem „Disclosure Log“ angeboten⁷. Ein Beispiel dafür ist eine Anfrage von Dow AgroSciences Australia zu einer speziellen ZFN-Technik namens EXZACT. Ebenso können Hinweise zu NGT aus Freisetzungsanträgen bezogen werden⁸.

In der EU sind Informationen zu NGT in Dokumenten der GVO-Freisetzungsdatenbank zu finden⁹. Dazu gehören: eine mittels Cisgenese modifizierte Gerste (getestet 2012 in Dänemark), ein cisgener Apfel (getestet 2015 in den Niederlanden), eine cisgene Kartoffel (getestet 2012 in Irland), ein durch CRISPR/Cas-Technik genomeditierter Mais (getestet 2018 in Belgien) und eine durch CRISPR/Cas-Technik genomeditierte Tabakpflanze (getestet 2020 in Spanien).

Es werden in den bereitgestellten Dokumenten zahlreiche Informationen angeboten: Daten bezüglich molekulare Charakterisierung, Mutationsereignisse, Zielgene, Angaben zum Züchtungsvorgang (z.B. Stammbaum, Zellregeneration, etc.), Daten bezüglich Bestimmung (Nachweis) der erfolgreichen Genomeditierung.

A.4.2 Informationen von Produktentwicklern

Generell sind von Produktentwicklern (Pflanzenzüchtungsunternehmen, Pflanzenforschungseinrichtungen) bereitgestellte Daten hilfreich, weil sie mittel- bis langfristige Forschungsziele beschreiben und Informationen zu „hauseigenen“ NGT-Anwendungen bereitstellen. Informationen von Produktentwicklern ermöglichen einen Einblick in aktuelle technische Fragestellungen. Des Weiteren liefern sie Hinweise auf die speziellen Herausforderungen im Bereich der Pflanzenzüchtung, wie zum Beispiel die Vermeidung von ungewollten Nebeneffekten. Ebenso werden aktuelle technische Aspekte diskutiert, unter anderem hinsichtlich der Vorzüge oder Nachteile von bestimmten Gruppen von Nachweismethoden.

Produktentwickler, die mit mindestens zwei NGT-Anwendungen in der APHIS Datenbank aufscheinen, wurden erfasst und zugehörige Website-Informationen durchsucht. Im Folgenden eine Übersicht über die angebotenen Informationen:

Technische Ansätze:

- Spezielle Nachweisverfahren (z.B. Bioinformatik-Tools, Detektionsansätze für SNP)
- Referenzgenomprojekte (z.B. Weichweizen)
- Ansätze zur Ermittlung der genetischen Variation von Kulturpflanzen

Forschung:

- Aktuelle Forschungsansätze (z.B. Nährwertveränderungen in Pflanzen, Bekämpfung spezieller (lokal auftretender) Pflanzenkrankheiten, Anwendungen in Arzneipflanzen)

⁶ <https://www.inspection.gc.ca/active/netapp/plantnoveltraitpnt-vegecarnouvcn/pntvcne.aspx>

⁷ <http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/foi-disclosure2-htm>

⁸ <http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/ir-1>

⁹ https://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_browse.aspx

- Innovationen am Forschungssektor (z.B. neuartige Genomeditierungstechniken)
- Unterlagen und Vorträge zu Meetings

Produktentwicklung:

- Newsletter, Broschüren (zu neuartigen NGT)
- Angaben zur Marktreife von Produkten
- Produktpräsentationen
- Spezifikationsdokumente

Business-Informationen:

- Firmeninformationen
- Lizenzinformationen (für spezielle NGT-Verfahren)
- Marktausrichtung und Zielsetzungen
- Kooperationen mit Unternehmen, Forschungseinrichtungen, Universitäten

A.4.3 Europäisches Patentregister

Patentdaten können nützliche Informationen für die Entwicklung von Nachweismethoden bieten, da sie teilweise detaillierte Angaben zu den Änderungen bis hin zu Primersequenzen enthalten (siehe Kapitel 3.5.1). Für die Recherche sind einerseits die Espacenet-Datenbank für internationale Patentanmeldungen¹⁰, andererseits die EPOQUE Datenbank des Europäischen Patentamts für europäische und internationale Patentanmeldungen (Europäisches Patentamt 2019) nützlich. Während Espacenet für die Öffentlichkeit uneingeschränkt zugänglich ist, ist der Zugang zur EPOQUE Datenbank für die allgemeine Öffentlichkeit nicht möglich.

Die beiden Datenbanken unterscheiden sich hauptsächlich in Punkto der Einfachheit von Suchen; EPOQUE bietet darüber hinaus bessere Möglichkeiten in Suchen ermittelte Informationen für die weitere Analyse nutzbar zu machen. Hinsichtlich der Patentinformationen selbst besteht kein wesentlicher Unterschied.

Die genannten Datenbanken enthalten folgende Informationen zu Patenten und Patentanmeldungen:

Bibliographische Angaben zum Patent:

- Erfinder*in
- Anmelder*in
- Titel
- Klassifikation (nach dem International Patent Classification Scheme - IPC)
- Anmeldenummer/Prioritätsnummer(n)

Inhaltliche Angaben:

- Allgemeine Beschreibung der Erfindung

¹⁰ <https://worldwide.espacenet.com/patent/>

- Anwendung der beschriebenen Techniken und die dabei hergestellten Produkte (Beispiele)
- Patentansprüche (Beschreibung der spezifischen Kombination von Merkmalen einer Erfindung, die den Patentschutz zugleich begründen und im Umfang eingrenzen soll)

Außerdem sind zusätzliche technische Informationen enthalten betreffend:

- Grafische Darstellungen zum Patent
- Sequenzinformationen
- Originaldokument
- Weitere zitierte Dokumente
- Rechtsstand und Patentfamilie

Patente können einen Anfangsverdacht begründen, dass an der Entwicklung bestimmter (NGT-)Produkte gearbeitet wird. Sofern diese in einzelnen Ländern auf den Markt kommen, entstehen neue Herausforderungen bezüglich ihres Nachweises für Kontrolllabors. Patente sind für die systematische Analyse auf marktrelevante NGT-Pflanzen, für welche aufgrund der rechtlichen Rahmenbedingungen die Etablierung einer Nachweismethode erforderlich sein kann, in der Praxis nur bedingt geeignet. Patente können zwar über ihre Schutzansprüche die Weiterentwicklung patentierter Erfindungen unterstützen. Die Existenz eines Patents allein lässt aber keine Aussage dazu zu, ob und wann eine geschützte Erfindung wirklich praktisch verwertet und allenfalls kommerzialisiert wird. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass eine laufende systematische Übersicht zu bestehenden und neuen Patentschriften spezialisiertes Wissen voraussetzt, das nicht allgemein vorhanden ist, sondern vor allem bei den mit Patentverfahren befassten Behörden und Institutionen vorliegt. Aufgrund ihrer spezifischen Natur eignen sich Patentedokumente auch weniger gut für eine effiziente Recherche als z.B. die wissenschaftliche Literatur. Das Rechercheergebnis müsste zudem regelmäßig aktualisiert werden, da ein einmal erzeugter Schnappschuss aufgrund der schnellen Entwicklung auf diesem Sektor rasch seine Aktualität verlieren kann. Daher sind Patente nur bedingt geeignet, um die Begründung eines Anfangsverdachts zu unterstützen.

Andererseits können Patente eine wertvolle Informationsquelle für die Entwicklung von Nachweisverfahren für bestimmte NGT-Produkte darstellen, wenn die Patentschriften dazu geeignete Angaben enthalten. Dazu zählen konkrete Angaben v.a. bei der Patentbeschreibung, sowie der Beschreibung der technischen Details und der Anwendungsbeispiele bzw. produktspezifische Sequenzinformationen.

Die Analyse der Patentschriften fokussiert daher auf die Frage, ob und welche nachweisrelevanten Informationen in diesen zu finden sind. Dabei liegt das Augenmerk auf jenen NGT-Produkten, die aktuell für eine Anwendung in der Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion in Frage kommen könnten. Beispiele für nachweisrelevante Angaben sind vor allem die folgenden Informationen:

- Eigenschaften der jeweiligen produktspezifischen Mutation
- Informationen zur veränderten Sequenz
- Vorhandensein einer Detektionsmethode

Im Rahmen der Analyse wurde auch recherchiert, ob und in welchem Umfang mit Hilfe der in Europa zu neuen NGT-Produkten verfügbaren Informationen zugehörige Patentschriften gefunden werden können. Dafür wurden Informationen zu in der EUginius Datenbank gelisteten NGT-Produkten herangezogen. Analysiert wurden die folgenden NGT-Produkte (die

jeweiligen Entwickler sind in Klammer genannt):

GE-PPO potato (Calyxt), GE-FAE1 pennycress (Illinois State University), GE-BADC camelina (Metabolix Oilseeds Inc.), GE-Vinv potato (Collectis Plant Sciences), GE-PPO mushroom (Pennsylvania State University), OsALS rice (Iowa State University), MLO-KO wheat (Calyxt), Low PPO5 potato (J.R. Simplot), ZFN-12 maize (DOW AgroSciences), CRISPR-Cas waxy corn (Pioneer Hi-Bred International), 5715 oilseedrape/SU Canola™ (Cibus US LLC). Die ausgewählten NGT-Pflanzen wurden in der Mehrzahl von kommerziellen Entwicklern hergestellt bzw. weiterentwickelt. Es sind aber auch Produkte enthalten, die von Universitäten oder privaten Forschungseinrichtungen entwickelt wurden.

Die zugehörigen Produktbeschreibungen in der EUGenius Datenbank stammen aus verschiedenen Informationsquellen. Bei den meisten Produkten findet man Informationen aus Anfragedokumenten an die US-amerikanischen Regulierungsbehörden, die von USDA-APHIS veröffentlicht werden bzw. Angaben aus wissenschaftlichen Publikationen über die betreffenden Produkte bzw. ihre Herstellung. Nur bei 4 NGT-Pflanzen werden Patentschriften als Informationsquelle genannt (GE-FAE1 pennycress, GE-BADC camelina, GE-Vinv potato, 5715 oilseedrape/SU Canola™).

Für vier weitere NGT-Pflanzen (MLO-KO wheat, Low PPO5 potato, ZFN-12 maize, CRISPR-Cas waxy corn) ließen sich auf Basis der verfügbaren Informationen mittels Recherche in der Espacenet-Datenbank für internationale Patentanmeldungen relevante Patentschriften finden. Für drei NGT-Pflanzen (GE-PPO potato, GE-PPO mushroom, OsALS rice) konnten bei dieser Vorgangsweise keine produktspezifischen Patentschriften gefunden werden.

Die acht gefundenen Patentschriften wurden danach untersucht, ob sie die oben genannten nachweisrelevanten Angaben enthalten. Eine Übersicht zu den Ergebnissen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Nachweisrelevante Informationen in Patentschriften zu ausgewählten NGT-Pflanzen

NGT-Pflanze	Patentschrift	Produktspezifische Mutation(en)	Veränderte Sequenz(en)	Beschriebene Detektionsmethode
GE-FAE1 pennycress	WO2019/143926A1 Ulmasov et al. (2019)	beschrieben (Mutationen in verschiedenen Zielgenen)	enthalten	standard Sanger sequencing or T7 endonuclease assay
GE-BADC camelina	WO2017/039834A1 Thelen & Salie (2018)	alternative RNAi Anwendung beschrieben	nein	keine
GE-Vinv potato	WO2014/096972A2 Mathis et al. (2014)	beschrieben	enthalten	targeted sequencing or pyrosequencing
MLO-KO wheat	WO2017/13409A3 Gao et al. (2017)	beschrieben (3 unabhängige Mutationen in verschiedenen Allelen)	enthalten	T7-endonuclease assay and targeted sequencing
Low PPO5 potato	US2012/297500A1 Rommens (2012)	Intragenic antisense expression construct beschrieben	nur Sequenz des Expressionskonstrukts enthalten	keine
ZFN-12 maize	WO2006/029296A2 Thompson et al (2006)	nur Antisense-silencing und Strahlungsmutagenese beschrieben	nur Targetsequenz enthalten	PCR-screening Methode zur Identifikation von Deletionen
CRISPR-Cas waxy	WO2017/132239A1 Cigan et al (2017)	beschrieben	enthalten	qPCR screening for mutants and targeted

corn				NGS
5715 SU Canola™	WO2009/046334A1 Schopke et al. (2009)	beschrieben	enthalten	allele specific PCR and targeted se- quencing

Die Ergebnisse der durchgeführten Analyse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Nicht für alle untersuchten NGT-Pflanzen waren Patentschriften verfügbar. Patentschriften können daher nicht als alleinige Quelle von relevanten Informationen angesehen werden.
2. Datenbanken wie EUGenius referenzieren nicht alle verfügbaren Patentschriften, die mit den Informationen für die gelisteten NGT-Pflanzen gefunden werden können. Wenn Patentschriften daher nicht aufgeführt sind, kann eine weiterführende Suche trotzdem erfolgreich sein. Das ist vor allem dann relevant, wenn die sonstigen genannten Quellen, beispielsweise USDA-APHIS-Anfragedokumente, keine für die Erstellung von Nachweismethoden geeigneten Informationen enthalten.
3. Die gelisteten oder gefundenen Patentschriften enthalten nicht immer relevante Informationen betreffend die Herstellung der jeweiligen NGT-Pflanzen. Die in Tabelle 2 angeführten Patentschriften zu Leindotter mit verändertem Ölgehalt und Mais mit reduziertem Phytatgehalt erwähnen die Herstellung von entsprechenden NGT-Pflanzen (BADC Camelina und ZFN-12 Mais) nur als zusätzlichen, nicht näher beschriebenen Anspruch. In diesen Fällen enthalten die entsprechenden Patentschriften auch keine spezifischen Angaben zur Art der Mutation und der mutierten Sequenz, identifizieren aber zumindest die Zielmerkmale und –sequenzen von genetischen Veränderungen in den jeweiligen NGT-Pflanzen.
4. Viertens sind in manchen Patentschriften Detektionsmethoden für die eingeführten genetischen Veränderungen beschrieben; alle diese Methoden sind aber forschungsorientiert und wären – wenn überhaupt - ohne weitere Entwicklungs- und Validierungsarbeiten nicht direkt als Nachweisverfahren einsetzbar.

Patentschriften enthalten daher in vielen Fällen relevante Informationen, die zur Entwicklung von Nachweismethoden beitragen können. Wenn die Herstellung der entsprechenden NGT-Pflanzen in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben ist, sind oftmals in diesen Publikationen ähnliche Informationen enthalten.

B. Protokoll: Austausch mit externen Expertinnen und Experten

Im Rahmen des Projekts war ein Austausch mit externen Expertinnen und Experten vorgesehen. Der Endbericht wurde diesen vorgelegt und diente als Diskussionsgrundlage.

Die Diskussionsrunde mit Teilnehmerinnen und Teilnehmern des Auftraggebers, der Auftragnehmer und drei externen Expert*innen fand im Rahmen einer Webkonferenz am 8. Juli 2020 statt.

Die Diskussion war auf Basis von Kernaussagen (Schlussfolgerungen, *kursiv*) des Endberichts strukturiert, die in Themenblöcken zusammengefasst wurden. Dieser Struktur folgend sind die wesentlichen Aussagen zusammengefasst.

Die Anmerkungen der externen Expert*innen wurden bei der Finalisierung des vorliegenden Berichts berücksichtigt.

Technischer Wissensstand

Diskussion der Schlussfolgerungen: Die derzeitigen technischen Möglichkeiten eines Kontrolllabors erlauben die Überwachung wie für GVO vorgesehen auch für NGT-Produkte.

Die Expert*innen stimmen grundsätzlich überein, dass die vorhandene technische Ausstattung auch eine NGT-Überwachung ermöglichen würde. Sie hielten jedoch einschränkend fest, dass eine Überwachung nur für bekannte NGT möglich und kostspieliger sei als für klassische GVO.

Eine Ausnahme betreffend die Möglichkeiten eines Kontrolllabors ist zumeist das Next Generation Sequencing (NGS), da Kontrolllabors dafür sowohl gerätetechnisch als auch personell nicht ausreichend ausgestattet sind.

Zuletzt wurde festgehalten, dass ein Screening analog zu GVO derzeit nicht möglich ist.

Voraussetzungen sind das Wissen über die Modifikation, einen einzigartigen Sequenzunterschied zu anderen Produkten bzw. eine einzigartige Sequenzkombination, und Referenzmaterial¹¹.

Um den Nachweis grundsätzlich zu ermöglichen, ist ein gesicherter und schneller Zugang zu Referenzmaterialien notwendig. Für die Interpretation der Ergebnisse von Sequenzierungen ist Sequenzinformation (Referenzgenom) zu Elternlinien/Ausgangsmaterial erforderlich. Dieses Ausgangsmaterial ist für Kontrolllabors meistens nicht verfügbar. Als die größten Hindernisse in diesem Zusammenhang wurden folgende Punkte genannt: 1) eine NGT-Pflanze ist in Drittländern nicht als GVO reguliert und 2) die Modifikation ist geringfügig im Vergleich zum Ausgangsmaterial.

Betont wurde, dass der Nachweis einer Punktmutation noch nicht die Zuordnung zu NGT bedeutet. Gerade diese Zuordnung sei aber für ein Kontrolllabor von großer Relevanz.

Einige PCR-Methoden (LNA-PCR, dPCR) sind wahrscheinlich für die Quantifizierung besonders geeignet, bei der Anwendung von Verfahren der Sequenzierung ist die Quantifizierung nach dem derzeitigen Wissensstand eine der größten Herausforderungen.

Die Expert*innen bestätigten, dass eine quantitative Aussage eine Herausforderung ist, was besonders für Sequenzierungsverfahren gelte. Um dieser zu begegnen, könnten Sub-

¹¹ biologisches Material und daraus abgeleitetes Material, umfasst die NGT-Pflanze und/oder die Elternlinie/das Ausgangsmaterial

sampling-Verfahren angewendet werden. Ein weiterer Ansatz sei die Verwendung von dPCR, bei der aber der Nachweis von Punktmutationen nicht immer eindeutig möglich ist.

Einschätzung der Eignung der dPCR für die Quantifizierung ohne Referenzmaterial

Die Expert*innen halten den Ersatz von Referenzmaterial durch die Herstellung von Plasmiden für machbar. Dabei sei jedoch zu beachten, dass es zu keinen Sequenzabweichungen kommt. Matrixeffekte seien möglich, die Darstellung des Ploidiegrades sei schwierig und so könne das komplexe Spektrum nicht abgedeckt werden. Der Einschätzung der Expert*innen nach ist die Nutzung von Patentinformationen zur Herstellung von Plasmiden möglich, wobei eventuell Einschränkungen im Rahmen des Nagoya-Protokolls zu berücksichtigen wären.

Ein Screening ist aus jetziger Sicht schwierig bis nicht möglich.

Generell reduziert ein Screening das Arbeitspensum in der Routinekontrolle. Aufgrund fehlender gemeinsamer Elemente sei Screening im klassischen Sinn im Zusammenhang mit NGT nicht möglich. PAM-Sequenzen bieten aufgrund der Vielfalt keine vielversprechenden Ansätze für den Nachweis. Andererseits sei die Durchführung von Einzelnachweisen für die Routine zu aufwändig. Als Alternative, um das Arbeitspensum zu reduzieren, wurde die Anwendung von Multiplexverfahren aufgezeigt. NGT-Pflanzen/-Produkte aufzuspüren, wurde eine Kaskade von Arbeitsschritten aufgezeigt. Ein weiterer Ansatz wäre das Screening auf Verdachtsfälle aufgrund des Traits (z.B. Fettsäuremuster), was in weiterer Folge eine Detektionskaskade bis hin zur konkreten NGT-Pflanze auslösen könnte. Es wurde angemerkt, dass Stacking das Screening erschweren würde. Es sei denkbar, dass NGT-Pflanzen nicht als einzelnes Produkt, sondern nur als Stack, vermarktet werden. In dem Fall sei auch kein Referenzmaterial verfügbar.

Ausblick

Wie sehr bilden Praxisbeispiele wie MLO-Weizen oder Cibus-Raps die zu erwartenden Entwicklungen von NGT-Anwendungen ab?

Für die Darstellung des Nachweises mit PCR ist der MLO-KO-Weizen ein sinnvolles und gutes Beispiel. Jedoch wurde festgestellt, dass anzunehmen sei, dass in der Praxis NGT-Pflanzen nur mit kleineren Modifikationen als in den genannten Beispielen und nach mehreren Rückkreuzungen auf den Markt gebracht würden. Da das Beispiel anhand von Angaben aus dem entsprechenden Patent beurteilt wurde, wies man darauf hin, dass die verfügbaren Informationen (z.B. aus Patenten) nicht in allen Fällen mit der tatsächlichen Sequenzabfolge übereinstimmen. Die Expert*innen waren sich einig, dass durch die gleichzeitige Veränderung von gleich drei Allelen eine NGT-Anwendung vermutet werden kann.

Was braucht ein Kontrolllabor?

Um den Nachweis zu ermöglichen, sind Sequenzinformationen erforderlich. Das betrifft zumindest die Genabschnitte, in denen die NGT-bedingten Modifikationen liegen und zusätzlich entsprechende Informationen zum Ausgangsmaterial.

- *eine Methodensammlung wäre wünschenswert, sofern bereits Methoden entwickelt wurden*
- *Hinweise, woher man Referenzmaterial bekommt/bzw. Alternativen*
- *Anforderungen an Datenbanken (für die Zwecke eines Kontrolllabors)*
- *Spannungsfeld Methodenentwicklung, Ausstattung, Routine*

Eine Nachweismethode muss bei der Anmeldung zur Zulassung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 bekannt gegeben und Referenzmaterial muss bereitgestellt werden. Andererseits sei Methodenentwicklung nur durch finanzielle Unterstützung (Forschungsprojekte)

möglich. Arbeiten zur Methodenentwicklung sei für Kontrolllabors ohne zusätzliche Ressourcen nicht leistbar. Betont wurde, dass das auch nicht die Aufgabe von amtlicher Kontrolle sei. Angemerkt wurde, dass es nicht sinnvoll sei, eine Detektionsmethode für eine NGT-Pflanze zu entwickeln, die nur kurz am Markt ist bzw. für eine Nischenanwendung gezüchtet wurde. Die Expert*innen hielten fest, dass eine Dokumentenkontrolle je nach Herkunft der NGT-Pflanze/-Produkt nur bedingt umsetzbar sei.

Einig war man sich, dass Datenbanken generell hilfreich seien. Diese müssen aber aktualisiert werden und einer Qualitätskontrolle unterzogen werden. Dafür seien entsprechende Ressourcen erforderlich.

NGS/Sequenzierungsansätze seien ein großer Aufwand, da für die Auswertung nicht nur Referenzsequenzen verfügbar sein müssen, sondern auch entsprechendes bioinformatisches Wissen vorhanden sein muss.

Betont wurde, dass die Identifizierung eine wichtige Anforderung an Kontrolllabors sei.

Bezüglich der Möglichkeiten eines Kontrolllabors wurde bestätigt, dass diese meistens auf qPCR spezialisiert seien. Sequenzierung ist möglich und wird angewendet, ist aber zumeist an Dienstleister ausgelagert.

Zudem unterstrichen die Expert*innen, dass die Ausstattung und Vorgehensweise der Universitäten sich von jener der Kontrolllabors unterscheidet. Das betrifft einerseits den Qualitätsanspruch an die Ergebnisse, andererseits bestehen Sorgfaltspflichten in amtlichen Kontrolllabors.

Zentrale Datenbank

Es gibt bereits Datenbanken mit gesammelten Daten zu NGT. Welche Informationen sollte eine umfassende zentrale Datenbank enthalten (d.h. eine Datenbank, die über die Anforderungen und Zwecke des Kontrolllabors hinausgeht)?

Die Expert*innen schlugen vor, dass in der EU eine Datenbank beim JRC angesiedelt werden könnte. Wünschenswerte Informationen in Datenbank sind: Elternlinien, genetischer Aufbau, Methoden, Off-Target Effekte, Referenzsequenz und Herstellung der modifizierten Sequenz (Methode), Anbaugesamt der Pflanze. Zumindest sollten Informationen zur relevanten Publikation vorhanden sein. Die wichtigste Information sei die Referenzsequenz.

Sollen Traits nachgewiesen werden, dann wären Omics-Datenbanken erforderlich, die Daten aus Metabolomics, Proteomics, etc. beinhalten. Es wurde aber darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse hochvariabel seien, z.B. durch Unterschiede im Anbau oder abiotische Stressfaktoren.

Die Expert*innen stimmten überein, dass die EUginius-Datenbank in der Praxis gegenüber der BCH-Datenbank bevorzugt wird. Der Aufbau von EUginius sei für ein Kontrolllabor und dessen Kontrollauftrag sinnvoll und gut geeignet.

Nachweismethoden für NGT-Pflanzen sind derzeit noch nicht in der Routineanalytik etabliert. Wo solche entwickelt werden, bewege man sich im Bereich der Grundlagenforschung.

Eine Datenbank zum Aufspüren von unbekanntem NGT müsste zahlreiche Informationen enthalten, wie z.B. Sequenzinformation, Modifikationen, Proteinspektrum, Anbaueigenschaften, phänotypische Auswirkungen (z.B. Fettsäuremuster). Eine Datenbank für den Nachweis von unbekanntem NGT/GVO würde den Rahmen vermutlich sprengen. Es ist ein sehr großer Aufwand zu erwarten, wie einige Teilnehmer*innen kritisch bemerkten.

Forschung

Um unmittelbare Weiterentwicklung zu ermöglichen, wird empfohlen, Forschungsaktivitäten in folgenden Bereichen zu finanzieren:

- *Methodenentwicklung (inkl. bioinformatischer und biostatistischer Auswertetools)*
- *Charakteristika von NGT-Anwendungen (nicht-beabsichtigte Modifikationen, Spezifika, Erkennungssequenzen, etc.)*
- *Entwicklung von Datenbanken (inkl. Pan-Genome), um diese für den Nachweis nutzen zu können. Diese Datenbanken sind die Grundvoraussetzung, um den Nachweis von NGT mithilfe von Pan-Genomen langfristig in Kontrolllabors etablieren zu können.*
- *Erforschung der Menge und Art unspezifischer technisch bedingter Sequenzänderungen*
- *Was ist die Rolle von Rückkreuzungen?*

Die wichtigste Aktivität sei die Erforschung von Referenzgenomen. Da diese vielfältige Zwecke erfüllen und nicht nur in Hinblick auf den Nachweis von NGT wichtig seien, sei die Bereitstellung von Mitteln für diesen Zweck am sinnvollsten. Auch Weiterentwicklungen im Bereich Next Generation Sequencing (NGS) und Subsampling-Methoden können sinnvoll sein. Die Entwicklung von Methoden für Nischenmarktprodukte sei laut den Expert*innen weniger sinnvoll.

Whole Genome Sequencing (WGS) und die Entwicklung von Pan-Genomen seien eine sehr große Aufgabe. Einerseits müssten Daten generiert werden, andererseits muss die Nutzung definiert werden. In diesem Zusammenhang wurde besonders auf die hohe Variabilität von Pflanzengenomen hingewiesen.

Die Expert*innen betonten, dass für Kontrollbehörden die eindeutige Nachweisbarkeit von NGT-Pflanzen/-Produkten sehr wichtig ist. Diese relevante Anforderung sei derzeit nicht geklärt, so sei unklar, auf welcher Basis die Ergebnisse Rechtssicherheiten bieten können. Eine klar definierte statistische Wahrscheinlichkeit könne für die Kontrollbehörden ausreichend sein, sofern diese rechtlich abgesichert ist. (Wahrscheinlichkeit).

Literaturverzeichnis

- Carroll, D., Morton, J. J., Beumer, K. J., Segal, D. J. (2006). Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nat Protoc* 1(3): 1329-1341.
- Chen, X., Lu, X., Shu, N., Wang, S., Wang, J., Wang, D., Guo, L., Ye, W. (2017). Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 7: 44304.
- Curtin, S. J., Zhang, F., Sander, J. D., Haun, W. J., Starker, C., Baltes, N. J., Reyon, D., Dahlborg, E. J., Goodwin, M. J., Coffman, A. P., Dobbs, D., Joung, J. K., Voytas, D. F., Stupar, R. M. (2011). Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol* 156(2): 466-473.
- Europäisches Patentamt (2019). Handbuch zum Europäischen Patentregister - Nutzerdokumentation und Online-Hilfe ([http://documents.epo.org/projects/babylon/eponet.nsf/0/A53881B7930EEC9BC12581A2003F5C16/\\$File/european_patent_register_resource_book_de.pdf](http://documents.epo.org/projects/babylon/eponet.nsf/0/A53881B7930EEC9BC12581A2003F5C16/$File/european_patent_register_resource_book_de.pdf)): 214.
- Hubbard, B. P., Badran, A. H., Zuris, J. A., Guilinger, J. P., Davis, K. M., Chen, L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Joung, J. K., Liu, D. R. (2015). Continuous directed evolution of DNA-binding proteins to improve TALEN specificity. *Nat Methods* 12(10): 939-942.
- Kaur, K., Tandon, H., Gupta, A. K., Kumar, M. (2015). CrisprGE: a central hub of CRISPR/Cas-based genome editing. *Database (Oxford)* 2015: bav055.
- Lamb, B. M., Mercer, A. C., Barbas, C. F., 3rd (2013). Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucleic Acids Res* 41(21): 9779-9785.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Ostergaard, L., Patron, N., Uauy, C., Harwood, W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol* 16: 258.
- Li, H., Li, J., Chen, J., Yan, L., Xia, L. (2020). Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol Plant* 13(5): 671-674.
- Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q., Luo, W., Wu, G., Li, H. (2016). Re-assessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci* 7: 377.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30(5): 390-392.
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., Gao, C. (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics* 41(2): 63-68.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., Liu, Y. G. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* 8(8): 1274-1284.
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Wilhelm, R. (2019). What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environmental Evidence* 8(1): 27.
- Mohanta, T. K., Bashir, T., Hashem, A., Abd Allah, E. F., Bae, H. (2017). Genome editing tools in plants. *Genes (Basel)* 8(12)
- Razzaq, A., Saleem, F., Kanwal, M., Mustafa, G., Yousaf, S., Imran Arshad, H. M., Hameed, M. K., Khan, M. S., Joyia, F. A. (2019). Modern trends in plant genome editing: An inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *Int J Mol Sci* 20(16)

- Ribarits, A., Stepanek, W., Peterseil, V., Wögerbauer, M., Mechtler, K., Hochegger, R., Hartmann, J., Söllinger, J., Widhalm, I., Brüller, W., Leonhardt, C. (2012). Cisgenesis - A report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding. Vienna, BMG: 1-169.
- Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKolver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., Mitchell, J. C., Arnold, N. L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V. M., Rock, J. M., Wu, Y. Y., Katiyah, G. E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M. A., Blakeslee, B., Greenwalt, S. A., Butler, H. J., Hinkley, S. J., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459(7245): 437-441.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32(9): 947-951.
- Xu, R., Li, H., Qin, R., Wang, L., Li, L., Wei, P., Yang, J. (2014). Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice* 7(1): 5.
- Yan, R., Wang, Z., Ren, Y., Li, H., Liu, N., Sun, H. (2019). Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven. *Int J Mol Sci* 20(12)
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N., Zhu, J. K. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 12(6): 797-807.

C. Tabellen (Ergebnisse Datenrecherche)

Tab. C.1: Recherche betreffend Nachweismethoden, in Scopus (Suchalgorithmus, Referenzen)

Search:	ABS(Plant AND "Genome Editing" AND Detection)			results: 27 total / 20 articles
Reference	Plant species	GE-technique	Detection Method	
Li et al. 2020	Rice	CRISPR/Cas9	qPCR-HRM compared with Sanger sequencing	
Nadakuduti et al. 2019	Diploid potato	CRISPR/Cas9 and TALENs	adapted GUIDE-Seq approach (PCR detection of dsODN integration) compared to T7E1 assay and PCR/RE assay	
Thakare et al. 2019	<i>N. benthamiana</i>	CRISPR/Cas9	T7E1 assay [and GFP fluorescence signal]	
Wu et al. 2019	Rice	CRISPR-Cas9	PCR with one-step PAGE, HRM, Sanger sequencing	
Petersen et al. 2019	<i>N. benthamiana</i>	CRISPR/Cas9	PCR with Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA), PCR/RE	
Biswas et al. 2019	Rice	CRISPR/Cas9	Indel mutants identification by PCR-based method and by amplicon labelling-based method	
Johansen et al. 2019	Tetraploid potato	CRISPR/Cas9	Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA), Sanger sequencing	
Young et al. 2019	Maize	CRISPR/Cas9	CLEAVE-Seq	
Aliaga-Franco et al. 2019	Rice, Tomato, and Arabidopsis	CRISPR/Cas9	Sanger sequencing [and DsRED Fluorescence]	
Al Amin et al. 2019	Soybean	CRISPR/Cas9	qRT-PCR and Sanger sequencing	
Xu et al. 2019	Arabidopsis	CRISPR/Cas9	Whole Genome Sequencing WGS and Targeted deep sequencing	
Manchanda et al. 2018	review paper	n.a.	detection assays mentionned: T7E1 assay, Surveyor™ nuclease assay, PCR-RE assay, qPCR-HRM, Sanger sequencing and NGS	
Liang et al. 2018	Wheat and Rice	CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, TALENs, Based Editor	PCR/RPN (CRISPR ribonucleoprotein complex) compared to T7E1 assay and PCR/RE assay	
Hahn et al. 2018	Arabidopsis	Cas9-Based Gene Targeting	Sanger sequencing	
Kim et al. 2017	Soybean and <i>N. benthamiana</i>	Cpf1/crRNA	Targeted deep sequencing	
Butler et al. 2016	Potato	GVR, TALEN, CRISPR	PCR	
Zheng et al. 2016	Rice	CRISPR-Cas9	Single-strand conformational polymorphism (SSCP)	
Search:	ABS(Plant AND "Genome Editing" AND Identification)			results: 59 total / 30 articles
Reference	Plant species	GE-technique	Detection Method	
Xiong et al. 2019	<i>Brassica campestris</i>	CRISPR/Cas9	Sanger sequencing	
Cheng et al. 2019	Arabidopsis	CRISPR/Cas9	Sequencing	
Bai et al. 2019	Soybean	CRISPR/Cas9	Sanger sequencing	
Ren et al. 2019	<i>Nicotiana tabacum</i>	CRISPR/Cas9	Sanger sequencing [and EGFP fluorescence]	
Cui et al. 2019	Wheat	CRISPR/Cas9	NGS and fluorescent labeling of PCR fragments	
Wu et al. 2018	Arabidopsis	CRISPR/Cas9	T7E1 assay	
Guo et al. 2018	<i>Nicotiana tabacum</i> , Arabidopsis	CRISPR/Cas9	Mutation Sites Based Specific Primers Polymerase Chain Reaction (MSBSP-PCR)	
Liang et al. 2018	Wheat	CRISPR/Cas9 IVTs/RNPs	PCR/RE, T7E1 assay, deep sequencing, Sanger sequencing	
Sugano et al. 2018	<i>Marchantia polymorpha</i>	CRISPR/Cas9	Sanger sequencing	
Khan et al. 2017	<i>N. benthamiana</i>	CRISPR/Cas9	Mismatch-specific Surveyor nuclease (Surveyor® Mutation Detection Kit, IDTdna.com) or Guide-it Resolvase (Guide-it™ Mutation Detection Kit, Clontech)	
Andersson et al. 2017	Tetraploid potato	CRISPR/Cas9	High-resolution fragment analysis (HRFA) and sequencing	

Tab. C.2: Cas-Varianten für CRISPR/Cas-Techniken (PAM-Sequenzen, Information zur Schnittstelle)

CRISPR Endonuklease	Kurz- bezeichnung	Typ	PAM	Schnittstelle	Schnitt
Cas9 Streptococcus pyogenes	SpCas9	II	5'-NGG-3'	3 nt distal to PAM * (downstream)	blunt
Cas9 Staphylococcus aureus	SaCas9	II	NNGRRT	4 nt distal to PAM (downstream)	blunt
Cas9 Streptococcus thermophilus	St1Cas9	II	NNAGAA NNGGAA	2/3 nt distal to PAM (downstream)	blunt
Cas9 Streptococcus thermophilus	St3Cas9	II	NGGNG	n.v.	blunt
Cas9 Brevibacillus laterosporus	BlatCas9	II	NNNNCND D	n.v.	blunt
Cas12a Acidaminococcus sp.	AsCas12a	V-A	TTTV	23 nt distal to PAM (upstream) (18/19 nt on other strand)	5' overhangs
Cas12a Lachnospiraceae bacterium	LbCas12a	V-A	TTTV	23 nt distal to PAM (upstream) (18/19 nt on other strand)	5' overhangs
Cas12a Francisella tularensis novicida	FnoCas12a	V-A	TTN TTTN	23 nt distal to PAM (upstream) (18 nt on other strand)	5' overhangs
Cas12b Alicyclobacillus acidoterrestris	AacCas12b (AaCas12b)	V-B	TTN	n.v.	5' overhangs
Cas12d (CasY)	n.v.	V-D	TA TG	n.v.	n.v.
Cas12e (CasX)	n.v.	V-E	TTCN	n.v.	n.v.
Cas3	n.v.	I	ATG	n.v.	n.v.

Tab. C.3: Beispiele für potenzielle genetische Modifikationen (Substitution, Deletion, Insertion) durch CRISPR/Cas, TALEN, ZFN

Substitution:

-----X-----	bp	
-----XXX-----	1	A
-----XXXXX-----	2-3	B
-----XXXXXXXXX-----	4-5	C
-----XXXXXXXXXXXXX-----	6-10	D

	Pflanzenart	Event
A		
CRISPR/Cas (Zhang et al. 2014)	Reis	T0-line 16 (u.a.)
CRISPR/Cas (Xu et al. 2014)	Reis	<i>BEL</i> Mutanten
CRISPR/Cas (Yan et al. 2019)	Lilie	#L6 (u.a.)
CRISPR/Cas (Chen et al. 2017)	Baumwolle	<i>GhCLA1</i> Mutanten <i>GhVP</i> Mutanten
B		
CRISPR/Cas (Xu et al. 2014)	Reis	<i>BEL</i> Mutanten
CRISPR/Cas (Yan et al. 2019)	Lilie	#L15 (u.a.)
CRISPR/Cas (Chen et al. 2017)	Baumwolle	<i>GhVP</i> Mutant
ZFN (Curtin et al. 2011)	Sojabohne	RDR6a
C		
CRISPR/Cas (Xu et al. 2014)	Reis	<i>BEL</i> Mutanten
D		
n.v.		

Deletion:

-----X-----	bp	
-----XXX-----	1	E
-----XXXXX-----	2-3	F
-----XXXXXXXX-----	4-5	G
-----XXXXXXXXXXXX-----	6-10	H

	Pflanzenart	Event
E		
CRISPR/Cas (Lawrenson et al. 2015)	Gerste	T1-181-E1 (u.a.)
CRISPR/Cas (Zhang et al. 2014)	Reis	T0-line 10 (u.a.)
CRISPR/Cas (Xu et al. 2014)	Reis	<i>BEL</i> Mutanten
CRISPR/Cas (Yan et al. 2019)	Lilie	#L2
ZFN (Curtin et al. 2011)	Sojabohne	DCL1a (u.a.)
F		
CRISPR/Cas (Lawrenson et al. 2015)	Gerste	T1-181-A11
CRISPR/Cas (Zhang et al. 2014)	Reis	T0-line 1 (u.a.)
CRISPR/Cas (Xu et al. 2014)	Reis	<i>BEL</i> Mutanten
ZFN (Shukla et al. 2009)	Mais	<i>IPK1</i> Mutanten
TALEN (Li et al. 2012)	Reis	<i>Os11N3</i> Mutanten
TALEN (Liang et al. 2014)	Mais	Line 1-E (u.a.)
TALEN (Wang et al. 2014b)	Weizen	T0-7 D1 (u.a.)

G		
CRISPR/Cas (Zhang et al. 2014) CRISPR/Cas (Li et al. 2016) ZFN (Shukla et al. 2009) ZFN (Curtin et al. 2011) TALEN (Li et al. 2012) TALEN (Liang et al. 2014) TALEN (Wang et al. 2014b)	Reis Reis Mais Sojabohne Reis Mais Weizen	T0-line 30(1) (u.a.) <i>DEP1</i> Mutanten <i>IPK1</i> Mutanten DCL4b (u.a.) <i>Os11N3</i> Mutanten Line 1-A (u.a.) T0-4 D1 (u.a.)
H		
CRISPR/Cas (Lawrenson et al. 2015) CRISPR/Cas (Zhang et al. 2014) ZFN (Shukla et al. 2009) ZFN (Curtin et al. 2011) TALEN (Li et al. 2012) TALEN (Liang et al. 2014) TALEN (Wang et al. 2014b)	<i>Brassica oleracea</i> Reis Mais Sojabohne Reis Mais Weizen	T1-L2F1-E-B6 (u.a.) T0-line 30(1) (u.a.) <i>IPK1</i> Mutanten DCL1a (u.a.) <i>Os11N3</i> Mutanten Line 1-D (u.a.) T0-6 A1 (u.a.)

Insertion:

-----X-----	bp	
-----XXX-----	1	I
-----XXXXX-----	2-3	J
-----XXXXXXXX-----	4-5	K
-----XXXXXXXXXX-----	6-10	L

	Pflanzenart	Event
I		
CRISPR/Cas (Lawrenson et al. 2015)	Gerste	T1-181-A11 (u.a.)
CRISPR/Cas (Zhang et al. 2014)	Reis	T0-line 1 (u.a.)
CRISPR/Cas (Ma et al. 2015)	Reis	Os 1-3(1) (u.a.)
CRISPR/Cas (Chen et al. 2017)	Baumwolle	<i>GhCLA1</i> Mutant
ZFN (Curtin et al. 2011)	Sojabohne	DCL4a
J		
CRISPR/Cas (Yan et al. 2019)	Lilie	#L38
TALEN (Li et al. 2012)	Reis	<i>Os11N3</i> Mutanten
ZFN (Curtin et al. 2011)	Sojabohne	DCL1a
K		
ZFN (Shukla et al. 2009)	Mais	<i>IPK1</i> Mutanten
L		
TALEN (Li et al. 2012)	Reis	<i>Os11N3</i> Mutanten