

**Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung von gentechnischen Arbeiten
zur Herstellung und Verwendung von höheren Organismen
mit rekombinanten *Gene-Drive*-Systemen**

Anlass

Gantz und Bier beschreiben in einer im Frühjahr 2015 erschienenen Publikation (Gantz und Bier 2015) die Entwicklung einer „mutagenen Kettenreaktion“ als Methode zur Umwandlung bestimmter heterozygoter Mutationen in homozygote Mutationen bei Populationen von Organismen, die sich sexuell vermehren. Sie zeigten am Beispiel von Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*), dass sich ein solches, auch als *Gene-Drive* bezeichnetes System, rasant in einem Laborstamm verbreiten kann. Kürzlich erschienen weitere Publikationen (Gantz et al. 2015; Hammond et al. 2016) welche die Anwendung von *Gene-Drive*-Systemen in *Anopheles*-Mücken mit dem Ziel der Modifikation natürlicher Populationen beschreiben. Vor dem Hintergrund vielfältiger Diskussionen und Anfragen zum Gefährdungspotenzial damit verbundener gentechnischer Arbeiten in gentechnischen Anlagen sieht sich die ZKBS veranlasst, die Funktion von *Gene-Drive*-Systemen zu beschreiben und Hinweise zur Sicherheitsbewertung solcher Arbeiten zu geben.

1. Allgemeines

Unter *Gene-Drive*-Systemen versteht man genetische Elemente bzw. Genkonstrukte, welche die eigene Ausbreitung in Populationen sich sexuell vermehrender Organismen vorantreiben, indem ihre Vererbung an wesentlich mehr als an 50 % der Nachkommen erfolgt. Wenn ein *Gene-Drive*-System in einer diploiden Zelle nur in einem der beiden Genome vorliegt, dann kann es sich durch molekulare Mechanismen in den homologen Ort im anderen Genom duplizieren. Dieser Vorgang kann in einer Zygote einsetzen oder auch später in der Keimbahn.

Gene-Drive-Systeme unterscheiden sich durch ihre Nicht-Mendel'sche Vererbung grundlegend von rekombinanten Nukleinsäureabschnitten in Genomen, die klassisch vererbt werden. *Gene-Drive*-Systeme können sich relativ schnell in einer Population verbreiten, und dies selbst dann, wenn mit ihnen ein Selektionsnachteil verbunden ist.

Das Vorkommen von genetischen Elementen, welche die Wahrscheinlichkeit ihrer Vererbung in natürlichen Populationen erhöhen, ist bereits seit langem bekannt (*homing endonucleases*, Chevalier und Stoddard 2001; *replicative transposition* Shapiro 1979; *sex-ratio meiotic drive*, *segregation distortion* Zimmering et al. 1970). Durch die experimentelle Weiterentwicklung ist es gelungen, rekombinante *Gene-Drive*-Systeme herzustellen und deren Effizienz zu optimieren.

2. Beschreibung natürlicher und rekombinanter *Gene-Drive-Systeme*

2.1. *Homing-Endonukleasen*

Homing-Endonukleasen (HE) sind natürlich vorkommende Proteine, welche sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, spezifisch an relativ lange DNA-Zielsequenzen (14-40 Nukleotidpaare, Np) zu binden und dort endonukleolytisch einen Doppelstrangbruch (DSB) einzuführen. Das Gen für die HE ist natürlicherweise flankiert von den beiden Zielsequenzabschnitten, die durch den endonukleolytischen Schnitt in der Zielsequenz entstehen. Der DSB erfolgt jeweils nur in der Zielsequenz, welche die kodierende Sequenz für die HE nicht enthält. Im Anschluss findet die Reparatur des DSB durch homologe Rekombination statt und führt zu einer Duplizierung des DNA-Abschnittes, welcher die kodierende Sequenz für die HE enthält. Erstmals wurde eine solche Nuklease (I-SceI) in Hefe beschrieben. Heute sind über 250 weitere solcher Enzyme, überwiegend aus Bakteriophagen, Pilzen und Algen bekannt (Chevalier und Stoddard 2001; Belfort und Roberts 1997).

2.2. Rekombinante *Gene-Drive-Systeme*

Rekombinante *Gene-Drive-Systeme* können in Analogie zur Funktionsweise von HE konstruiert werden. Um dies zu erreichen, muss ein Endonuklease-kodierendes Gen so in das Genom eines Organismus integriert werden, dass dieses von den Teilen der Zielsequenzen der Endonuklease flankiert wird. Die Zielsequenz der Endonuklease sollte dabei so spezifisch sein, dass nur ein Schnitt im Genom des Organismus möglich ist. Damit ein *Gene-Drive-System* seine selbstduplizierende Eigenschaft entfalten kann, muss die Zielsequenz der Endonuklease in den Organismen der Zielpopulation vorhanden sein. Dies kann erreicht werden, indem die Zielsequenz einer Endonuklease (z. B. HE) vorab in die Population eingebracht wird (Windbichler et al. 2011), oder indem die Zielsequenz einer Endonuklease einem im Genom des Zielorganismus vorkommenden Nukleinsäureabschnitt angepasst wird.

Wird die Endonuklease exprimiert, erfolgt ein DSB in der Zielsequenz. Anschließend kann, wie oben beschrieben, durch homologe Rekombination eine Kopie des Endonuklease-Gens an der Schnittstelle eingebaut werden. Hierdurch wird die Zielsequenz in ein *Gene-Drive-System* umgewandelt. Zugleich wird die Zielsequenz unterbrochen und es kann somit kein weiterer Schnitt erfolgen. Auf diese Weise werden in diploiden Organismen heterozygote *Gene-Drive-Genotypen* in homozygote *Gene-Drive-Genotypen* umgewandelt. Das "*Gene-Drive-Allel*" wird in der Folge an alle Nachkommen weitergegeben, welche wiederum von einem ggf. heterozygoten Zustand in einen homozygoten Zustand umgewandelt werden. So können sukzessive alle Wildtyp-Allele, welche die Zielsequenz enthalten, in *Gene-Drive-Allele* umgewandelt und so aus der Population verdrängt.

Als Endonukleasen können theoretisch alle Nukleasen genutzt werden, welche eine ausreichend lange Erkennungssequenz (20-30 Np) haben, um spezifisch an nur einer Zielsequenz im Genom des jeweiligen Organismus einen DSB zu induzieren. Beispielsweise können Zinkfinger-Nukleasen, TALENs, *Homing-Endonukleasen* und CRISPR/Cas9-Systeme genutzt werden. Das kürzlich entdeckte und für das *Genome-editing* technisch optimierte CRISPR/Cas9-System (Hsu et al. 2014) ist von besonderer Bedeutung, da hier mit geringem Aufwand die spezifische Erkennungssequenz der Nuklease an nahezu jede Sequenz im Zielorganismus angepasst werden kann. Daher wurden auch die ersten rekombinanten *Gene-Drive-Systeme* mit potentieller Wirkung in Wildpopulationen auf Basis des CRISPR/Cas9-Systems realisiert (Gantz und Bier 2015).

Ein *Gene-Drive*-System kann weitere Gene enthalten, die dann gemeinsam mit dem Gen für die Endonuklease verbreitet werden. Diese, auch als *Cargo*-Gene bezeichneten Gene, können das *Gene-Drive*-System unterstützen oder davon unabhängige Eigenschaften besitzen (Gantz et al. 2015).

Durch die Verwendung von *Gene-Drive*-Systemen kann der Stoffwechsel von Zielorganismen auf verschiedene Weise beeinflusst werden. Liegt die Zielsequenz der genutzten Endonuklease in einem Genom-Abschnitt mit regulierender Funktion oder in einem funktionalen Gen, kann durch den Kopiervorgang dessen Funktion beeinträchtigt werden. Weiterhin kann ein mit dem *Gene-Drive*-System eingebrachtes *Cargo*-Gen den Stoffwechsel beeinflussen. Es ist jedoch ebenso denkbar, dass ein *Gene-Drive*-System nur das Endonuklease-Gen ohne weitere Beeinflussung des Empfängerorganismus verbreitet (z. B. wenn die Zielsequenz in einem nicht-kodierenden DNA-Bereich liegt).

3. Sicherheitsbewertung

Gemäß § 3 GenTG handelt es sich bei Organismen mit rekombinanten *Gene-Drive*-Systemen um gentechnisch veränderte Organismen (GVO). Rekombinante *Gene-Drive*-Systeme besitzen eine spezifische Anordnung ihrer Nukleotidabschnitte und Gene und sind deshalb klar als solche zu identifizieren. Eine unabsichtliche oder unbemerkte Herstellung oder Verwendung von gentechnischen *Gene-Drive*-Systemen ist nicht zu erwarten.

Für die Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten mit *Gene-Drive*-Systemen gelten, wie bei anderen gentechnischen Arbeiten auch, die Bewertungskriterien gemäß § 7 i. V. m. Anhang I GenTSV. Diese umfassen Informationen über die verwendeten Spender- und Empfängerorganismen (GenTSV Anhang I Nr. 1.), die gentechnische Veränderung des jeweiligen GVO (GenTSV Anhang I Nr. 2.1), gesundheitliche Erwägungen (GenTSV Anhang I Nr. 2.2) und Umwelterwägungen (Anhang I Nr. 2.3). Auswirkungen auf gesundheitliche Erwägungen lassen sich nach derzeitigem Kenntnisstand aus der *Gene-Drive*-Funktion selbst nicht ableiten.

Die Besonderheit bei der Sicherheitsbewertung von Arbeiten mit *Gene-Drive*-Systemen liegt in der erhöhten Vererbung des Genkonstrukts innerhalb einer Population, die die Zielsequenz enthält und damit empfänglich für das *Gene-Drive*-System ist.

Innerhalb geschlossener Systeme spielt die *Gene-Drive*-Funktion keine sicherheitsrelevante Rolle.

Die selbstduplizierende Aktivität des *Gene-Drive*-Systems erhält jedoch eine entscheidende Bedeutung bei der Bewertung möglicher Folgen eines unbeabsichtigten Entweichens solcher GVO aus dem geschlossenen System. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, dass es zu einem sexuellen Austausch zwischen dem Träger des *Gene-Drive*-Systems und einer Wildpopulation kommt und damit der veränderte Vererbungsmodus zum Tragen kommt. Grundsätzlich muss davon ausgegangen werden, dass die Ausbreitung eines *Gene-Drive*-Allels in einer anfälligen Population deutlich höher ist als die eines vergleichbaren Allels ohne *Gene-Drive*-Wirkung.

Somit sind neben der Bewertung des Empfängerorganismus (GenTSV Anhang I Nr. 1. insb. d), j), q), t), v), und x)) die Bewertung aller genetischen Elemente des rekombinanten Konstruktes (GenTSV Anhang I Nr. 2.1. insb. d), h), und j)) und der empfangenden Umwelt (GenTSV Anhang I Nr. 2.3. insb. a), d), und e)) im Fall eines ungewollten Entweichens von besonderer Bedeutung.

Hierfür ist relevant, ob der GVO mit *Gene-Drive*-System im Falle eines ungewollten Entweichens Kontakt zu kreuzungskompatiblen Organismen einer Wildpopulation erhalten kann. Dabei ist insbesondere das Vorkommen von Populationen in der unmittelbaren Umgebung der gentechnischen Anlage zu berücksichtigen. Im Weiteren ist zu prüfen, ob der GVO durch eigene Mobilität oder durch Überdauerung und Transport Kontakt zu weiter entfernt vorkommenden kreuzungskompatiblen Populationen erhalten kann.

Kann ein sexueller Austausch mit Wildpopulation mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, würden sich die Folgen eines unbeabsichtigten Entweichens nicht von denen eines konventionellen rekombinanten Genkonstrukts unterscheiden.

Ein sexueller Kontakt zu Individuen einer kreuzungskompatiblen, natürlich vorkommenden Population muss nicht zwingend mit einer Verbreitung des *Gene-Drive*-Systems einhergehen. Sind beispielweise in dem Genom der Population keine spezifischen Zielsequenzen für das *Gene-Drive*-System vorhanden, verhält sich ein Genkonstrukt mit *Gene-Drive*-Wirkung nicht anders als ein Genkonstrukt ohne *Gene-Drive*-Wirkung. Gleiches gilt bei Anwendungen eines *Gene-Drive*-Systems in einer Labor-Population, wenn die spezifische Nuklease-Zielsequenz, die in das Genom der Labor-Population eingebracht wurde, in natürlich vorkommenden Populationen nicht vorhanden ist.

Ein weiteres Beispiel für eine nicht zwingende Verbreitung des *Gene-Drive*-Systems nach einem sexuellen Austausch liegt in der funktionellen Expression der eingebrachten Nuklease. Ist diese durch die gezielte Verwendung von Promotoren oder anderen regulatorischen Elementen an bestimmte Induktoren oder Effektoren (z. B. nicht natürlich vorkommende Nahrungszusätze) gebunden, ist ebenso nicht davon auszugehen, dass sich das *Gene-Drive*-System innerhalb der Population verbreitet.

Die erhöhte Vererbung von *Gene-Drive*-Systemen ist mit einer freien und zufälligen Verpaarung in der Population verknüpft. Bei vielen domestizierten Arten, zum Beispiel Nutztieren, erfolgt jedoch bei der Züchtung häufig eine gezielte Verpaarung ausgewählter Individuen. Das Risiko einer ungewünschten Ausbreitung von *Gene-Drive*-Systemen ist daher in domestizierten Populationen deutlich geringer einzuschätzen als in Wildpopulationen.

4. Einstufung

Um der möglichen Gefährdung der Umwelt durch ein unbeabsichtigtes Entweichen eines *Gene-Drive*-Systems aus einer gentechnischen Anlage entgegenzuwirken, werden die Herstellung und der Umgang mit solchen Systemen vorsorglich in die **Sicherheitsstufe 2** eingestuft. Die gegenwärtige Datenlage erlaubt es nicht, gentechnische Arbeiten, bei denen *Gene-Drive*-Systeme hergestellt und verwendet werden, als vergleichbar im Sinne des GenTG anzusehen, sie erfordert vielmehr eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS.

Bei der Einzelfallprüfung ist zu bewerten, ob und in welchem Umfang eine Übertragung des *Gene-Drive*-Systems auf Wildpopulationen im Falle einer unbeabsichtigten Freisetzung stattfinden kann. Wie hoch Ausmaß und Geschwindigkeit der Ausbreitung eines *Gene-Drive*-Systems in kreuzungskompatiblen, natürlich vorkommenden Population ist, hängt von vielen Faktoren ab, die nur im Einzelfall zu ermitteln und zu bewerten sind.

Literatur

Belfort M und Roberts RJ (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res* 25(17):3379-88

Chevalier BS und Stoddard BL (2001). Homing endonucleases: structural und functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* 29(18):3757-74

Gantz VM und Bier E (2015). Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348(6233):442-4

Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, James AA (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(49):E6736-E6743

Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol* 34(1):78-83

Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014). Development und applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6):1262-78

Shapiro JA (1979). Molecular model for the transposition und replication of bacteriophage Mu und other transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4):1933-7

Windbichler N, Menichelli M, Papathanos PA, Thyme SB, Li H, Ulge UY, Hovde BT, Baker D, Monnat RJ, Jr., Burt A, Crisanti A (2011). A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. *Nature* 473(7346):212-5

Zimmering S, Sandler L, Nicoletti B (1970). Mechanisms of meiotic drive. *Annu Rev Genet* 4:409-36