

## Hintergrund: 1. Teil der Risiken

### Mögliche Umweltauswirkungen von CRISPR/Cas

Neue Genom-Editierungsverfahren entwickeln sich derzeit rasant weiter. Damit wächst auch die Notwendigkeit eines verantwortungsvollen Umgangs mit den einhergehenden Risiken. Das derzeit wohl am häufigsten eingesetzte und vielversprechendste Verfahren ist das CRISPR/Cas-System. In diesem Hintergrundpapier werden mögliche Umweltauswirkungen von genomeditierten Pflanzen anhand eines Fallbeispiels diskutiert. Dafür wird der Leindotter (*Camelina sativa*) verwendet, der bereits mehrfach mit Hilfe der Genschere CRISPR/Cas9 in seinem Fettsäuregehalt verändert wurde. Es werden sowohl ungewollte Auswirkungen auf Stoffwechselwege der genomeditierten Pflanzen als auch mögliche Umweltauswirkungen der beabsichtigten und unbeabsichtigten Veränderungen erläutert.

### Unerwartete Nebenwirkungen durch beabsichtigte Veränderungen

Auch wenn die Veränderungen der DNA durch Genome-Editing-Verfahren erfolgreich und zielgenau sind, können die Wirkungen dieser Veränderungen auf der Ebene des Organismus ganz anders sein als beabsichtigt. Hier darf präzise nicht mit sicher gleichgesetzt werden. Durch Wechselwirkungen mit anderen Genen kann sich beispielsweise die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von Pflanzen verändern oder diese anfälliger für Krankheiten werden. Betroffen können beispielsweise auch die Wechselwirkungen mit Bestäubern, Bodenorganismen oder der Nahrungskette sein.

Diese Auswirkungen sind zum Teil schwer zu entdecken, weil es hier nicht ausreicht, nur die Struktur der DNA zu untersuchen. Stattdessen müssten oft komplexe Stoffwechselvorgänge in der Zelle genauer geprüft werden.

### Ungewollte Auswirkungen auf andere Stoffwechsel- und Signalwege

Durch CRISPR/Cas verursachte Veränderungen am Erbgut können neben den gewünschten auch in andere, unbeabsichtigte Signal- oder Stoffwechselwege eingreifen: Stoffwechselwege stehen in engem Austausch miteinander. So können Proteine und/oder Stoffwechselprodukte miteinander in Wechselwirkung treten und sich dabei in ihren Funktionen stimulieren oder blockieren. Wird mit der Genschere beispielsweise das Ablesen eines Gens verhindert und das entsprechende Protein nicht mehr gebildet, führt dies, neben

den gewünschten Effekten, möglicherweise auch zu einer Veränderung anderer Signalwege der Zelle. Das Ergebnis kann sein, dass von einem Stoffwechselprodukt, das gar nicht verändert werden sollte, viel mehr gebildet wird als in nicht mit der Genschere veränderten Organismen. Die bewirkten Veränderungen sollten niemals isoliert für sich betrachtet werden, sondern immer im Kontext eines im Gleichgewicht stehenden biologischen Systems.

## **Ungewollte Umweltauswirkungen von genomeditierten Pflanzen**

Pflanzen treten in ihrem jeweiligen Ökosystem mit vielen anderen Arten in Wechselwirkung. Das können zum einen Pflanzen der eigenen, zum anderen Pflanzen einer anderen Art sein. Außerdem sind Pflanzen Teil eines Nahrungsnetzes und treten auch mit verschiedenen Tieren in Wechselwirkung. Pflanzen werden von spezifischen Mikroorganismen sowohl über- als auch unterirdisch besiedelt. Das wird auch als das Mikrobiom der Pflanze bezeichnet. Die äußeren klimatischen Bedingungen, wie zum Beispiel Trockenheit, schwankende Temperaturbedingungen oder Schädlingsbefall, beeinflussen, wie sich die Pflanze entwickelt und können Stressreaktionen der Pflanze auslösen. Diese Umweltfaktoren können innerhalb der Pflanze Prozesse hervorrufen, bei denen Gene an- bzw. abgeschaltet werden, um auf die jeweilige Stress-Situation zu reagieren und die Pflanze zu schützen.

Wie bereits erwähnt, ist es möglich, dass die gewollten Veränderungen im Erbgut von genomeditierten Pflanzen sich versehentlich auch auf andere Stoffwechselwege als die eigentlich beabsichtigten auswirken. Das kann ungewollte Effekte in den genomeditierten Pflanzen auslösen, die sich zum Teil auch erst unter bestimmten Stressbedingungen in der Umwelt oder in späteren Generationen zeigen. Zudem können Eingriffe auch zu ungewollten Umweltauswirkungen führen, wenn die Nebeneffekte in die Wechselwirkungen der Pflanze mit ihrem Ökosystem eingreifen.

### **Fallbeispiel: Der Leindotter**

An einem konkreten Beispiel sollen mögliche Umweltauswirkungen, die bei einer Freisetzung von genomeditierten Pflanzen denkbar sind, erklärt werden. Hierfür wird der Leindotter verwendet, der durch die Genschere CRISPR/Cas bereits mehrfach durch SDN-1-Anwendungen in einer Weise verändert wurde, wie es bisher mit konventionellen Verfahren nicht möglich war [1-3]. Der Leindotter ist hexaploid, er besitzt also einen sechsfachen Chromosomensatz. Außerdem ist der Leindotter reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie der Linol- und Linolensäure. Mit Hilfe der Genschere wurde der Anteil der einfach ungesättigten Ölsäure in seinen Samen erhöht und damit der Anteil an leicht oxidierbaren Fettsäuren reduziert [1; 2]. Damit soll das aus dem Leindotter gewonnene Öl länger haltbar bleiben. Mithilfe der Genschere konnten im Erbgut des Leindotters bis zu 18 Genkopien

dreier Gene auf einmal ausgeschaltet werden, um Pflanzen mit einem höheren Ölsäure-Gehalt zu erzeugen. Solche Eingriffe waren mit konventionellen Methoden bisher kaum bzw. nicht möglich und können zu ganz neuen biologischen Eigenschaften führen. Die Veränderung im Fettsäurestoffwechsel und damit die Zusammensetzung der Fettsäuren wird im Folgenden als Beispiel verwendet, um mögliche Auswirkungen auf die genomeditierte Pflanze und deren Umweltauswirkungen zu erklären.

### **Veränderung der Fettsäurezusammensetzung kann die Stressantwort beeinflussen**

Fettsäuren erfüllen in der pflanzlichen Zelle verschiedene Funktionen und sind an verschiedenen Prozessen beteiligt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie die Linolensäure, sind beispielsweise Bestandteile von Membranen in der Zelle (z.B. der Zellmembran oder der Membran von Chloroplasten) und regulieren sowohl Transportprozesse der Zelle als auch die Fluidität der Membranen. Die Fluidität der Zellmembranen ist besonders wichtig unter wechselnden Umweltbedingungen, vor allem bei Kälte. Je kälter es ist, umso höher sollte der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in der Zellmembran sein, damit die Membran fluide bleibt. Es zeigte sich in Untersuchungen der Ackerschmalwand, einer nahe Verwandten des Leindotters, dass Pflanzen, denen ein bestimmtes Gen im Fettsäurestoffwechsel fehlt, im Experiment unter Kältestress nicht überleben konnten [4].

Beim Leindotter konnte man zeigen, dass dieser als Reaktion auf einen höheren Salzgehalt im Boden einige seiner Gene für den Fettsäurestoffwechsel anders ablas und so etwas andere Genprodukte bildete [5]. Als Folge davon änderten sich die Zusammensetzung der Membranfette und die Fluidität der Membranen; das zeigt, dass sich Pflanzen durch eine Änderung ihrer Genaktivität an Stressbedingungen anpassen können.

Außerdem sind langkettige Fettsäuren Bestandteile und Ausgangsstoffe für andere Fettsäuren in der Kutikula und anderen Molekülen, wie z.B. Wachse, die als schützende Grenzen der Pflanzen dienen (z.B. in der Wurzel, Samenhülle). Im Leindotter regulieren solche Wachse vor allem die Trockenheitstoleranz [6]. Ein Eingriff in den Fettsäurestoffwechsel der Pflanzen kann also ungewollte Effekte auf die genomeditierte Pflanze unter abiotischen Stressbedingungen, wie Trockenheit und Hitze, nach sich ziehen.

### **Veränderung der Fettsäurezusammensetzung kann die Bildung von Botenstoffen beeinflussen**

Fettsäuren sind oft Ausgangsmoleküle für die Bildung verschiedener Botenstoffe von Pflanzen. Diese Botenstoffe dienen zum Beispiel der Kommunikation zwischen Individuen derselben Art oder anderen Arten, um sich gegenseitig vor Schädlingen zu warnen. Zu solchen Botenstoffen zählen beispielsweise sogenannte Phytohormone und flüchtige organische Stoffe.

Phytohormone wirken als Botenstoffe in Pflanzen, mit denen diese auf äußere Bedingungen reagieren. Ein Beispiel ist das Phytohormon Jasmonsäure (JA), die wichtig für das Wachstum ist; zugleich geben Pflanzen bei Schädlingsbefall JA in die Umwelt ab und dann wirkt sie als Phytohormon auf andere Pflanzen [7].

JA wird aus Linolensäure gebildet, die aus der Zellmembran der Pflanzen stammt [8]. In mehreren verschiedenen Stoffwechselschritten wird Linolensäure in JA umgebaut. Die JA fungiert dann ihrerseits als Ausgangsmolekül, das biochemisch verändert werden kann. Solche Stoffe werden dann als Derivate der JA bezeichnet, die unter anderem auch als Botenstoffe wirken.

Eine Studie mit konventionellen Sojabohnen zeigt, welche Auswirkungen es hat, wenn weniger ungesättigte Fettsäuren in den Pflanzen in JA umgewandelt werden und dementsprechend auch weniger JA zur Verfügung steht [9]: Sojabohnen, die durch Sojabohnen-Blattläuse befallen sind, enthalten weniger Linolensäure, wodurch auch weniger JA gebildet werden kann. JA dient normalerweise als Botenstoff, der Marienkäfer anlockt, welche natürlicherweise Fressfeinde der Blattläuse sind. Die Blattläuse blockieren durch einen noch unbekanntem Mechanismus die Aktivität eines ganz bestimmten Gens, das die Bildung der Linolensäure reguliert. Dadurch bildet die Sojabohne weniger JA und flüchtige organische Stoffe, die der natürlichen Abwehrreaktion der Pflanzen dienen und weitere Prädatoren der Blattläuse anlocken sollen. Dadurch können weitere Blattläuse die Sojabohnen befallen.

In dem oben erwähnten Leindotter werden mit Hilfe von CRISPR/Cas Gene ausgeschaltet, wodurch der Gehalt an Linol- und Linolensäure in den genomeditierten Pflanzen vermindert wird. Es ist wahrscheinlich, dass dadurch auch im Leindotter die Bildung von Signalstoffen und die Kommunikation zwischen verschiedenen Pflanzen beeinträchtigt sein können. Solche Effekte zeigen sich oft erst, wenn die Pflanzen unterschiedlichen Stresssituationen wie einem Schädlingsbefall ausgesetzt sind, und sollten in der Risikobewertung entsprechend berücksichtigt werden. Oft sind Pflanzen unter natürlichen Bedingungen auch mehreren Stressbedingungen zugleich ausgesetzt, wie einem Schädlingsbefall unter Trockenheitsbedingungen. Solche Szenarien und deren Auswirkungen auf die Nahrungsnetze und Ökosysteme sollten genauer untersucht werden, denn Pflanzen können dabei als Anpassungsstrategie Stoffwechselwege anders regulieren, was durch die genomeditierte Veränderung der Zielgene beeinträchtigt sein kann.

### **Eingriff in das Nahrungsnetz**

In einem Ökosystem existieren verschiedene, miteinander verbundene Nahrungsketten, die in ihrer Gesamtheit ein komplexes Nahrungsnetz bilden. Unterschiedliche Organismen (darunter Pflanzen, Pflanzenfresser und Fleischfresser) ernähren sich also voneinander und

sind alle Teil eines Nahrungsnetzes. Wird ein Organismus und seiner Eigenschaften in einer Nahrungskette verändert, so hat das auch einen Einfluss auf andere Organismen im Nahrungsnetz. Wenn zum Beispiel eine Pflanze, die als Nahrungsquelle für ein bestimmtes Insekt dient, durch CRISPR/Cas so verändert wird, dass sie für dieses Insekt toxisch wird und es durch den Verzehr der Pflanze stirbt, dann wäre dieses Insekt nicht mehr als Nahrungsquelle für andere Tiere verfügbar, wodurch das Nahrungsnetz gestört wird.

Fette erfüllen verschiedene Funktionen und sind an vielen Prozessen in Pflanzen und Tieren beteiligt, unter anderem an der Bildung von wichtigen Botenstoffen, aber auch an der Energieversorgung. Tierische Organismen einschließlich des Menschen können mehrfach ungesättigte Fettsäuren nicht selber herstellen und müssen sie über ihre Nahrung aufnehmen [10]. Welche Auswirkungen veränderte Nahrungsquellen haben können, zeigt ein Beispiel der Honigbiene. Honigbienen wurden in einer Studie ohne Linolensäure und anderen Omega-3-Fettsäuren in ihrer Nahrung gehalten [11]. Die Bienen enthielten weniger mehrfach ungesättigte Fettsäuren in ihrem Körper, und sowohl ihr Gehirn als auch ihre Hypopharynxdrüse waren kleiner als bei Bienen mit normaler Nährstoffversorgung. In der Hypopharynxdrüse wird der Futtersaft im Kopf der Arbeiterinnen hergestellt, mit dem andere Bienen wiederum versorgt werden. Die Bienen der Studie waren in verschiedenen Tests weniger lernfähig im Vergleich zu Bienen, die normale Nahrung zu sich nahmen.

Verschiedene Bienen- und Fliegenarten gehören zu den Insekten, die sich vom Nektar und Pollen des Leindotters ernähren [12-14]. Ruft man mithilfe der Genscherer Veränderungen im Fettstoffwechsel des Leindotters und damit eine veränderte Zusammensetzung der Fettsäuren hervor, kann dies also auch Nahrungsnetze beeinflussen, an denen der Leindotter beteiligt ist. Dies wäre eine unbeabsichtigte Folge für das Ökosystem mit schwer absehbaren Konsequenzen für andere Tiere.

### **Der genomeditierte Leindotter könnte auch in der Umwelt persistieren und sich unkontrolliert ausbreiten.**

Ein genomeditierter Leindotter, der beispielsweise eine geringere Konzentration an mehrfach ungesättigten Fettsäuren besitzt und in die Umwelt freigesetzt wird, kann sich mit Wildarten, beispielsweise dem Kleinfrüchtigen Leindotter (*Camelina microcarpa*) oder dem Hirtentäschelkraut (*Capsella bursa-pastoris*), kreuzen und in neue Habitats eindringen. Dabei sind in nachfolgenden Generationen unbeabsichtigte Auswirkungen möglich. Falls der genomeditierte Leindotter mit wilden Arten hybridisiert, können die Nachkommen einen Selektionsvorteil gegenüber wilden Arten gewinnen und diese verdrängen. Die unbeabsichtigten Effekte in den Nachkommen können sich deutlich von denen unterscheiden, die ursprünglich im Labor beobachtet wurden.

## **Mit welchen Methoden kann die Zusammensetzung von genomeditierten Pflanzen überprüft werden?**

Es gibt eine Reihe von Verfahren, mit denen die Zusammensetzung und Veränderung von Stoffwechselprodukten (=Metabolite) in Zellen analysiert werden können. Diese Verfahren werden unter dem Oberbegriff Metabolomics zusammengefasst. Stoffwechselprodukte wie Zucker, Fettsäuren, Aminosäuren, Alkohole usw. sind vielfältig und kommen in verschiedenen Mengen innerhalb eines Organismus vor. Die Metabolomics-Verfahren müssen daher hohe analytische Herausforderungen erfüllen, um die Zusammensetzung und die Menge der Metaboliten zu untersuchen. Dafür werden vor allem Verfahren der Massenspektrometrie und die Kernresonanzspektroskopie (abgekürzt NMR nach englisch nuclear magnetic resonance) verwendet.

Durch Metabolomics-Verfahren lassen sich Moleküle, die an Stoffwechselprozessen beteiligt sind, innerhalb einer Zelle nachweisen und ermöglichen den Vergleich mit einer entsprechenden Referenz. Kommt es durch eine gentechnische Veränderung zu unvorhergesehenen Effekten im Stoffwechsel, so kann ein Ungleichgewicht entstehen und in Pflanzen beispielsweise die Bildung von Stoffwechselprodukten gestört werden. Dies kann einen Einfluss auf den genomeditierten Organismus an sich, aber auch auf andere Organismen im Ökosystem ausüben.

Eine Metabolomics-Analyse ist umfangreich und ist in der Lage, die Zusammensetzung von Vorläufermolekülen, Zwischenprodukten, Endprodukten und deren Derivaten in vielen verschiedenen Stoffwechselwegen aufzuschlüsseln. Je mehr Informationen über den veränderten Stoffwechselweg bekannt sind, desto einfacher und gezielter ist die Analyse der Zusammensetzung der Metabolite und ggf. der Nachweis von bestimmten Stoffwechselprodukten. Wird beispielsweise durch die Genschere in den Fettsäurestoffwechsel eingegriffen und ein Enzym zur Bildung einer bestimmten Fettsäure ausgeschaltet, dann kann gezielt mit Hilfe von Lipidomics-Verfahren die Zusammensetzung aller zellulären Fette untersucht werden. Ist nicht bekannt, welches Zielgen und damit in welchen Stoffwechselweg eingegriffen wurde, muss eine ungezielte Metabolomics-Untersuchung durchgeführt werden, die nicht auf eine bestimmte Metaboliten-Art (z.B. Fette, Zucker, Aminosäuren etc.) ausgelegt ist. Die Analyse ist dann breiter angelegt, jedoch weniger umfangreich in den verschiedenen Metaboliten-Arten. Die Metabolomics wurden mehrfach zur Bewertung von genomeditierten Pflanzen vorgeschlagen [15; 16] und sollten bei einer Risikobewertung eingesetzt werden.

Besonders wichtig ist zu beachten, dass im Falle einer Deregulierung von bestimmten Anwendungen der Genschere genomeditierte Pflanzen mit vielen verschiedenen, zum Teil auch ganz neuen Eigenschaften freigesetzt werden könnten, die mit konventionellen Verfahren bisher nicht bewirkt werden konnten. Es ist im Moment nur sehr schwer abschätzbar, welche Umweltauswirkungen von solchen genomeditierten Pflanzen ausgehen.

Daher müssen neuartige Umweltwirkungen von genomeditierten Pflanzen in einer Risikobewertung mit untersucht werden.

Stand Juni 2021

## Referenzen

1. Morineau C, Bellec Y, Tellier F, Gissot L, Kelemen Z, Nogue F, Faure JD (2017) Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol J* 15 (6):729-739. doi:10.1111/pbi.12671
2. Ozseyhan ME, Kang J, Mu X, Lu C (2018) Mutagenesis of the FAE1 genes significantly changes fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa*. *Plant Physiol Biochem* 123:1-7. doi:10.1016/j.plaphy.2017.11.021
3. Kawall K (2021) Genome-edited *Camelina sativa* with a unique fatty acid content and its potential impact on ecosystems. *Environmental Sciences Europe* 33 (1):38. doi:10.1186/s12302-021-00482-2
4. Miquel M, James D, Jr., Dooner H, Browse J (1993) Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (13):6208-6212
5. Heydarian Z, Yu M, Gruber M, Coutu C, Robinson SJ, Hegedus DD (2018) Changes in gene expression in *Camelina sativa* roots and vegetative tissues in response to salinity stress. *Sci Rep* 8 (1):9804. doi:10.1038/s41598-018-28204-4
6. Tomasi P, Wang H, Lohrey G, Park S, Dyer JM, Jenks M, Abdel-Haleem H (2017) Characterization of leaf cuticular waxes and cutin monomers of *Camelina sativa* and closely-related *Camelina* species. *Industrial Crops and Products* 98:130-138
7. Howe GA, Major IT, Koo AJ (2018) Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience. *Annu Rev Plant Biol* 69:387-415. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040047
8. Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111 (6):1021-1058. doi:10.1093/aob/mct067
9. Kanobe C, McCarville MT, O'Neal ME, Tylka GL, MacIntosh GC (2015) Soybean aphid infestation induces changes in fatty acid metabolism in soybean. *PLoS One* 10 (12):e0145660. doi:10.1371/journal.pone.0145660
10. Hulbert AJ AS (2011) Nutritional ecology of essential fatty acids: an evolutionary perspective. *Australian Journal of Zoology*, 59 (6):369-379
11. Arien Y, Dag A, Zarchin S, Masci T, Shafir S (2015) Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (51):15761-15766. doi:10.1073/pnas.1517375112
12. Groeneveld JH, Klein AM (2014) Pollination of two oil-producing plant species: *Camelina* (*Camelina sativa* L. Crantz) and pennycress (*Thlaspi arvense* L.) double-cropping in Germany. *Global Change Biology Bioenergy* 6 (3):242-251. doi:10.1111/gcbb.12122\|10.1111/gcbb.12080
13. Eberle CA, Thom MD, Nemecek KT, Forcella F, Lundgren JG, Gesch RW, Riedell WE, Papiernik SK, Wagner A, Peterson DH, Eklund JJ (2015) Using pennycress, camelina, and canola cash cover crops to provision pollinators. *Industrial Crops and Products* 75:20-25. doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.026
14. Walsh K, Puttick D, Hills M, Yang R, Topinka K, Hall LH (2012) First report of outcrossing rates in camelina [*Camelina sativa* (L.) Crantz], a potential platform for bioindustrial oils. *Can J Plant Sci* 92:681-685. doi:10.4141/CJPS2011-182
15. Enfissi EMA, Drapal M, Perez-Fons L, Nogueira M, Berry HM, Almeida J, Fraser PD (2021) New Plant Breeding Techniques and their regulatory implications: An opportunity to advance metabolomics approaches. *Journal of Plant Physiology*:153378. doi:https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153378
16. Fraser PD, Aharoni A, Hall RD, Huang S, Giovannoni JJ, Sonnewald U, Fernie AR (2020) Metabolomics should be deployed in the identification and characterization of gene-edited crops. *Plant J*. doi:10.1111/tpj.14679