

Der Europäische Gerichtshof hat am 25. Juli 2018 entschieden, dass Organismen, die mit Neuen Verfahren der Mutagenese erzeugt wurden, die erst nach dem Erlass der Freisetzungsrichtlinie im Jahr 2001 hauptsächlich entwickelt wurden, als GVO einzustufen sind und der Freisetzungsrichtlinie unterliegen. Ob und inwieweit dieses Urteil entsprechend auch auf Organismen, erzeugt mit den neuen Mutageneseverfahren im geschlossenen System, anzuwenden ist, ist bislang nicht geklärt. Hierzu bitten wir Sie, sich gegebenenfalls bei der zuständigen Behörde Ihres Bundeslandes zu informieren.

Az. 6790-10-103

Dezember 2011

Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Verwendung der Zinkfinger-Nuklease-Technologie 1 (ZFN-1)

Hintergrund

Die europäische Gesetzgebung zur Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen im geschlossenen System (RL 2009/41/EG) und zur Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt (RL 2001/18/EG) und die nationale Gesetzgebung (GenTG) gehen bezüglich der Bewertung der verwendeten Biotechnologien auf das Jahr 1990 zurück. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden die Technologien jedoch so weiterentwickelt, dass fraglich ist, inwieweit sie im Anwendungsbereich der Gesetzgebung wiederzufinden sind. Aus diesem Grund wurde eine Arbeitsgruppe, bestehend aus Vertretern der Europäischen Kommission und der europäischen *Competent Authorities*, eingerichtet. Die *new technique working group* (NTWG) beratschlagte zu acht sogenannten „neuen Technologien“, einschließlich der Zinkfinger-Nuklease-Technologien, inwieweit diese von der Gesetzgebung erfasst werden bzw. nicht erfasst werden. Eine endgültige Bewertung der neuen Techniken liegt derzeit noch nicht vor. Aufgrund von Behörden-Anfragen sieht sich die ZKBS veranlasst, im Rahmen der bisher durchgeführten Diskussionen eine Stellungnahme zur Bewertung der Zinkfinger-Nuklease-Technologie 1 abzugeben.

Zinkfinger-Nuklease-Technologie 1 (ZFN-1)

Bei Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) handelt es sich um chimäre Proteine, die aus zwei kovalent gebundenen, funktionellen Domänen, der Zinkfingerdomäne und der Nukleasedomäne, aufgebaut sind.

Zinkfinger umfassen eine Klasse von phylogenetisch hochkonservierten Proteinstrukturen, die vor allem bei der Regulation der DNA-Transkription eine Rolle spielen. Bei den in der ZFN-Technologie verwendeten Zinkfingern sind zwei Cystein- und zwei Histidinreste derart positioniert, dass sie ein Zinkatom koordinativ binden. Die Polypeptidkette nimmt eine schleifenförmige Struktur ein, die sequenzspezifisch mit einer DNA interagieren kann. Abhängig von der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette interagiert ein Zinkfinger mit drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden der DNA, wobei eine spezifische Interaktion meist nur mit zwei der drei Nukleotide erfolgt.

Die Nukleasedomäne stammt vom *FokI*-Restriktionsenzym, einer Endonuklease des Bakteriophagenabwehrsystems des Bakteriums *Planomicrobium okeanokoites* (früher *Flavobacterium okeanokoites*), mit der Fähigkeit DNA zu schneiden.

Es lassen sich ZFN herstellen, die über Aneinanderreihen mehrerer Zinkfinger eine sequenzspezifische Bindung mit bis zu 12 aufeinanderfolgenden Nukleotiden an einem Strang der DNA eingehen können [1]. Der Einsatz von zwei ZFN-Proteinen erlaubt eine Interaktion der Zinkfingerdomänen an angrenzenden Nukleotidsequenzen beider Stränge der DNA. Dies verursacht einen Doppelstrangbruch in der DNA zwischen den ZFN-bindenden Nukleotidsequenzen [2, 3]. Die ZFN-1 nutzt das natürlich in der Zelle vorhandene Reparatursystem des *non-homologous end joining* [4]. Es wird keine DNA-Reparatur-Vorlage in die Zelle eingebracht, so dass die Stränge der geschnittenen DNA zufällig wieder miteinander verbunden werden. Durch den Reparaturprozess kann es zu veränderten Basenpaaren, zu kurzen Deletionen oder zu Insertionen kommen. Häufig ist damit eine Veränderung im Leseraster verbunden. Ziel der ZFN-1-Anwendung ist meist der *knock out* eines gewünschten Gens im Genom der Zelle [5].

Das ZFN-Protein wird im Allgemeinen als genetische Information mithilfe eines Transfervektors (viral oder bakteriell) in Form einer DNA [7] in eine Zelle eingebracht. Möglich sind jedoch auch das Einbringen einer *in vitro* generierten, Protein-kodierenden RNA [5, 6] oder das Einbringen des Proteins direkt.

Die Entwicklung spezifischer, DNA-bindender Nukleasen verläuft rasant. Auf der Grundlage des *transcription activator like effectors* (TALE) eines phytopathogenen Bakteriums der Gattung *Xanthomonas spp.* erlauben anwendungsspezifische TALE-Nukleasen (TALEN) eine genaue Bindung an die Nukleotidsequenz der DNA. Der Doppelstrangbruch in der DNA erfolgt weiterhin durch die Verwendung der Nuklease des *FokI*-Restriktionsenzym [8, 9]. Für die gezielte Einführung von Doppelstrangbrüchen werden auch veränderte Meganukleasen von genetischen Elementen („*homing endonucleases*“) verwendet [10].

Bewertung

Wird ein ZFN-Proteinpaar nach chromatografischer Reinigung direkt in eine Zelle eingebracht, kann es spezifisch an eine Nukleotidsequenz der chromosomalen DNA binden und einen Doppelstrangbruch einfügen. Die Strangbrüche werden durch zelleigene Prozesse repariert, wobei es zu Modifikationen in der Nukleotidsequenz kommen kann, wodurch es auch zu einem *knock out* eines Gens kommen kann. Während die ZFN nur transient in der Zelle verbleiben, wird die modifizierte Nukleotidsequenz an die Nachkommen weitergegeben. Das genetische Material der Zelle wurde durch äußere Einflüsse, nämlich der Gabe des Mutagens ZFN, gezielt verändert. Bei dem beschriebenen Verfahren handelt es sich um eine Mutagenese im Sinne des § 3 Nr. 3b GenTG. Mutagenese gilt demnach nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials. Die ZKBS bewertet den entstehenden Organismus daraus schlussfolgernd nicht als gentechnisch veränderten Organismus.

Wird die ZFN als genetische Information in Form einer isolierten, Protein-kodierenden RNA in die Zelle transferiert, wird kein Erbgut in die Zelle eingebracht. Diese RNA verweilt transient in der Zelle; es erfolgt weder eine Replikation, noch eine reverse Transkription oder eine Integration in das Genom der Zelle. Diese RNA wird lediglich translatiert. Das Einbringen einer mRNA in eukaryote Zellen wurde von der ZKBS als ein natürlicher Prozess typologisiert [11, 12]. Ein natürlicher Prozess gilt gemäß § 3 Nr. 3b GenTG nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials. Bei dem von der eingebrachten RNA translatierten Protein handelt es sich wiederum um eine Zinkfinger-Nuklease. Es fungiert wie oben beschrieben als Mutagen, indem es spezifisch an eine Nukleotidsequenz im Genom der Zelle binden kann und einen Doppelstrangbruch induziert. Es erfolgt eine Veränderung im Chromosom, die jedoch nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gemäß § 3 Nr. 3a gilt. Vielmehr handelt es sich um eine Mutagenese gemäß § 3 Nr. 3b. Die ZKBS bewertet den entstehenden Organismus schlussfolgernd nicht als gentechnisch veränderten Organismus.

Literatur:

- [1] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**:646–651.
- [2] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci* **93** (3):1156-60.
- [3] Smith J, Berg JM, Chandrasegaran S (1999) A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. *Nucleic Acids Res* **27** (2):674-81.
- [4] Valerie K and Povirk LF (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**:5792–5812.
- [5] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking, TD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, and Amacher SL (2008) Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger-nucleases. *Nat Biotechnol* **26**:702-708.
- [6] Meng X, Noyes MB, Zhu L., Lawson ND, and Wolfe SA (2008) Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* **26** (6):695–701.
- [7] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, Wright DA, Anthony RM, Eichtinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu F, Pearlberg J, Göbel C, Dassie JP, Pruetz-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Iafrate AJ, Dobbs D, McCray PB Jr, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. (2008) Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* **31** (2):294-301.
- [8] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ and Voytas DF (2010) Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* **186** (2):757-761.
- [9] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK (2011) De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci* **108** (6):2623-8.
- [10] Grizot S, Epinat JC, Thomas S, Duclert A, Rolland S, Pâques F, Duchateau P (2010) Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Res* **38** (6):2006-18.
- [11] Stellungnahme der ZKBS zum Einbringen von mRNA in eukaryote Zellen (Az. 6790-10-44, Februar 1996)
- [12] Ronellenfitsch in Eberbach/Lange/Ronellenfitsch, GenTR Bd. 1, § 3 GenTG Rn. 99.