

Dossier: Nachweisverfahren

Auch neue Gentechnik lässt sich nachweisen



Agrarindustrie behauptet: Produkte der neuen Gentechnik sind nicht nachweisbar

Die Produkte der neuen Gentechnikverfahren (NGV) sind GVOs und unterliegen somit dem europäischen Gentechnikrecht. Dies hat der Europäische Gerichtshof (EuGH) im Juli 2018 entschieden. Dementsprechend muss die EU-Kommission dafür sorgen, dass auch für diese Verfahren und daraus gewonnene Produkte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen und solche Produkte gekennzeichnet werden können. Die Experten des ENGL (Europäische Netzwerk der GVO-Laboratorien) arbeiten nun an einem Positionspapier zum Thema „Nachweisbarkeit von Veränderungen durch neue gentechnische Verfahren“.

Die Agrarindustrie und die mit ihr verknüpften Biotechnologieinstitute versuchen eine Aufweichung des Gentechnikgesetzes zu erreichen. Sie plädieren dafür, Verfahren, die keine rekombinante DNA verwenden, von der Risikobewertung, der Nachweis- und der Kennzeichnungspflicht auszunehmen. Sie argumentieren dabei, solche Organismen und daraus resultierende Produkte seien weder identifizierbar noch rückverfolgbar. Somit sei es unmöglich, sie den Regulierungen des Gentechnikgesetzes zu unterstellen.

Dies ist jedoch eine zirkuläre Argumentation. Die Befürworter einer Deregulierung gehen von der Annahme aus, dass die durch NGV erzeugten Mutationen nicht von natürlichen Mutationen unterscheidbar seien. Zudem seien die Veränderungen sehr gezielt und präzise erzeugt worden. Dementsprechend erachten sie es als unnötig, nach anderen Elementen zur Unterscheidbarkeit zu suchen, auch wenn mittlerweile feststeht, dass das Genome Editing oft unerwünschte Mutationen – sogenannte Nichtziel- oder Off-Target-Effekte – hervorrufen kann. Dies führt wiederum zur Schlussfolgerung, dass die mit NGV hervorgerufenen Mutationen sich nicht von einer natürlichen Mutation unterscheiden lassen.

Die NGV hinterlassen jedoch sowohl allgemeine als auch spezifische Narben («Signatur») im Erbgut. Auch wenn ein isoliertes Element allein keinen eindeutigen Hinweis auf den gentechnischen

Eingriff ergibt, ist es dank der Gesamtheit aller Spuren sogar möglich, die angewendete Technik zu identifizieren. Für die meisten Produkte, die aus Genome Editing hervorgegangen sind, bilden diese Spuren eine klare Signatur in der DNA. Den Zuchtunternehmen sind alle Elemente zur Identifizierung von NGV und deren Produkten bekannt. Denn sie wenden diese bereits für die Patentierung ihrer Produkte an. Wenn sie diese Signaturen offenlegen, können die Produkte der NGV ohne Probleme mit der gleichen Technologie (PCR) nachgewiesen werden, die bisher zum Nachweis von «klassischen» GVOs verwendet wurde.

Umfassendes Nachweissystem: Eine Kombination aus Signaturen und Referenzinformationen

Neben den gängigen Nachweisverfahren (z.B. Multiplex-PCR, SNPLex) die eine schnelle Genotypisierung erlauben, **stehen viele andere Techniken zur Verfügung, die es ermöglichen, alle durch die NGV gewonnenen Produkte zu erkennen.** Entgegen den Beteuerungen der Agrarindustrie ist es sogar möglich, die eingesetzten Techniken selbst zu identifizieren und Mutationen, die aus der In-vitro-Mutagenese hervorgehen, mit hoher Wahrscheinlichkeit von natürlichen Mutationen zu unterscheiden.

Eine genetische Modifikation im Labor wird in mehreren Etappen durchgeführt. **Die Etappen zur Vorbereitung der Anwendung der NGV** sind die gleichen wie bei der klassischen Gentechnik. Sie erzeugen **Mutationen und Epimutationen, die vererbare Narben hinterlassen. Zusammen mit den spezifischen Nichtzieleffekten der NGV, können diese als Nachweis dienen.** Solche verräterischen Narben vollständig zu entfernen, ist auch mit mehreren Rückkreuzungen mit einer Elitesorte nicht möglich. Ein grosser Teil der Spuren bleibt weiterhin im Genom bestehen und bildet eine Art Signatur, die bei der Rückverfolgung verwendet werden kann. Zusätzlich dazu hinterlassen die neuen gentechnischen Verfahren selbst spezifische Spuren.

Ergänzend zu diesen nachverfolgbaren genetischen Signaturen stehen dokumentarische Informationen zur Verfügung, die ebenfalls für die Rückverfolgbarkeit genutzt werden können. Denn der Grossteil der Kontrollen geschieht nicht im Labor, sondern auf Basis der Herkunftsdeklarationen. Saatgutunternehmen lassen auch Produkte der NVG durch Patente schützen. Auf dem gleichen Prinzip basierend könnten Laboren, die für die Identifizierung und Verfolgung von solchen Produkten verantwortlich sind, ein Nachweissystem erarbeiten. Entsprechende Anstrengungen wurden beispielsweise bei den Referenzlaboratorien der Europäischen Union bereits in die Wege geleitet. Wenn die NGV unter die Gentechnikgesetze fallen, müssten die Herstellerfirmen Referenzinformationen liefern und diese über Datenbanken international verfügbar machen. Diese Informationen bilden die Eckpfeiler für eine schnelle und verlässliche Rückverfolgbarkeit der GVOs. Nur so kann die Wahlfreiheit der Konsumenten garantiert werden können.

Verwenden die Labors all diese Informationen zusammen in einem sogenannten Matrix-Ansatz, wie dies die Behörden für unbekannte transgene GVOs bereits seit Jahren tun, **können sie jede Technik und jedes Produkt der NGV eindeutig identifizieren.** Je mehr solche Informationen vorliegen, desto höher ist die Beweiskraft.

Fallbeispiel

Auf einem Feld wird ein Raps entdeckt, der gegen ein Herbizid auf Glyphosatbasis resistent ist. Die Präsenz der Pflanze wirft viele Fragen auf, die geklärt werden müssen. Woher kommt sie? Enthält sie ein Transgen, eine Mutation? Ist die letztere natürlichen oder gentechnischen Ursprungs? Welche Technik wurde benutzt?

1. Als erstes müssen alle Informationen, die die Pflanze betreffen, gesammelt werden. Dies sind unter anderem Informationen zum Standort, zur Herstellung der Pflanze, zur kommerziellen Herkunft des Saatguts und zur Anbaugeschichte des Feldes.
2. Im zweiten Schritt kann eine Nachweismethode wie PCR Klarheit über die Herkunft der Mutation im für die Herbizidresistenz verantwortlichen Gen schaffen. Dieser Schritt kann zur Feststellung der Herkunft (Transgen oder nicht, Insertion oder Deletion) der Mutation führen.
3. Im Zweifelsfall oder bei unzureichender Anzahl der Signaturen können Labortechniker im dritten Schritt versuchen, andere genetische oder epigenetische Signaturen zu erkennen. Durch den Vergleich mit Datenbanken, die die Signaturen verschiedener Änderungsverfahren enthalten, können Übereinstimmungen und Unterschiede zu bekannten Signaturen von verschiedenen Techniken erkannt werden. Solche Datenbanken basieren auf Informationen, die aus Patenten stammen, aus wissenschaftlichen Artikeln, sowie auf Daten aus dem Informations- und Materialaustausch zwischen Kontrolllaboratorien. Es ist daher die Aufgabe der Forschungs- und Kontrolllaboratorien, diese Signaturelemente in ihren Datenbanken zu sammeln, so dass in naher Zukunft eindeutige Identifikationsmerkmale zur Verfügung stehen. Die Forschung sollte daran arbeiten, Verfahren und Protokolle zur Unterscheidung für jede Technik und jedes Produkt bereitzustellen. Diese Signaturen müssten danach gemäss Richtlinie dem bestehenden europäischen Labornetzwerk zur Verfügung gestellt werden.

Wie funktioniert der Matrix-Ansatz?

Der Matrix-Ansatz basiert auf einem konvergen-ten Beweisnetzwerk. Das Prinzip wird universell verwendet. Das bekannteste Anwendungsbeispiel ist die Identifizierung anhand von biometrischen Merkmalen wie beispielsweise Fingerabdrücken. Ein Scanner liest den Fingerabdruck einer Person und wandelt das Ergebnis in digitale Informationen um, so dass ein Computer diese interpretieren und verifizieren kann. Eine einzige Verzweigung der Haut auf der Unterseite der Fingerkuppe genügt nicht, um einen Menschen eindeutig zu identifizieren. Es ist das gesamte Muster dieser Verzweigungen und ihrer Verteilung innerhalb eines Fingerabdrucks, die es ermöglichen, den Fingerabdruck eindeutig einem Menschen zuzuordnen zu können.

Auf einem ähnlichen Prinzip basiert die Identifizierung der NGV und deren Produkte. Auch hier werden verschiedene Methode und Merkmale kombiniert für die Bestimmung verwendet. Unter anderen sind das Informationen, die man zum Beispiel zur Abklärung der Evolutionsgeschichte der Organismen, in der Taxonomie, Phylogenie, Statistik, Sortenidentifikation, markergestützten Selektion oder beim Nachweis transgener GVOs benutzt. Die Identifikation erfolgt durch verschiedene statistische Werkzeuge, Datenbanken, oder intelligente Programme (sog. **künstliche Intelligenz**) wie Entscheidungsunterstützungswerkzeuge (**Decision Support Systems, DSS**).

Eine Zusammenstellung von möglichst vielen Informationen über NGVs und GVOs aus unabhängigen Quellen ermöglicht es, die bei der Herstellung angewandte Technik zu bestimmen und das Produkt dann anhand der Verknüpfung dieser Informationen (ausgewählt nach den Bedürfnissen der Laboratorien: z.B. Kostenaspekte oder Schnelligkeit) zu verfolgen. Diese Praktik des Matrixansatzes wird bereits angewendet, um bekannte oder unbekannte transgene GVOs nachzuweisen. Sie spart Kosten und vereinfacht die Erkennung komplexer Proben. Durch die Verwendung von Labor-Datenbanken und DSS wird der Matrixansatz immer benutzerfreundlicher.

Auf Spurensuche mit künstlicher Intelligenz

Neue Forschungen zeigen, dass mittels **Deep-Learning-Algorithmen** die Identität des Ursprungslabors von gentechnischen Verfahren erheblich eingeschränkt werden kann. Ein einziges Merkmal weist noch nicht auf das Herkunftslabor hin. Dazu braucht es eine Kombination von Merkmalseigenschaften, deren gemeinsames Vorkommen individuell ist und so den Designer verrät. Um diesen zu identifizieren, werden **künstliche neuronale Netzwerke** verwendet, die verräterische Signaturen in DNA-Sequenzen erkennen können. Dieses informationsverarbeitende System wird typischerweise zur Klassifizierung von Bildern in verschiedene Kategorien gebraucht. Seine Struktur und Funktionsweise erinnert an das Nervensystem des Menschen. Das Netz besteht aus künstlichen Neuronen, die miteinander verbunden sind und untereinander Informationen austauschen. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Neuronen haben eine Gewichtung, die während des Trainingsprozesses angepasst wird, sodass ein korrekt trainiertes Netzwerk bei einem zu erkennenden Muster richtig reagiert. Beim Training wird das neuronale Netzwerk mit DNA-Sequenzen aus bekannten Ursprungslaboratorien („Trainingsdaten“) gefüttert. Je größer und umfangreicher die Datenbank ist, desto effektiver ist das Training. Am Ende muss das fertige Modell noch validiert werden, indem man ihm noch mehr DNA-Sequenzen zuführt, aber nicht diejenigen, die zum Aufbau des Modells verwendet wurden. Auf diese Weise kann festgestellt werden, ob das Netzwerk DNA-Sequenzen zu ihren Ursprungslabors konsistent zuordnen kann.

Welche Signaturen verwenden?

Signaturen der vorbereitenden Techniken

Nicht nur die gentechnischen Veränderungen geben Hinweise auf den unnatürlichen Ursprung einer Mutation. Bevor das Genom einer Pflanze modifiziert wird, müssen die pflanzlichen Zellen im Labor (in vitro) kultiviert und auf die Einführung des Materials, das die gewünschten Änderungen hervorbringen soll, vorbereitet werden. Die vorbereitenden Prozesse verursachen Stress. Dies hinterlässt bei allen Organismen vererbare Narben im Zellkern oder in den Organellen. Das Muster dieser Narben ist identifizierbar und verfolgbar.

Diese unbeabsichtigten genetischen und **epigenetischen** Nichtzieleffekte können beim Matrix-Ansatz mit den spezifischen „Abdrücken“ der neuen gentechnischen Verfahren kombiniert verwendet werden. Daraus ergibt sich ein Hinweis, dass die Pflanze auf irgendeine Weise in vitro gentechnisch verändert wurde. Dies ist grundsätzlich nichts Neues, die gleichen vorbereitenden Techniken wurden schon bei der „klassischen“ Gentechnik seit Jahrzehnten zur Identifikation und Verfolgung verwendet.

Die wichtigsten Vorbereitungsschritte, deren Spuren auf die Anwendung eines gentechnischen Verfahrens hinweisen können:

> *Vorbereitung der Zelle auf die Transformation - Protoplasierung*

Bevor man genetisches Material in die Zellen einbringt, muss diese auf die Aufnahme des Materials vorbereitet werden. Bei Pflanzen wird dazu die Zellwand gebrochen oder entfernt. Somit entstehen sogenannte Protoplasten. Das sind Zellen ohne Zellwand, die bereit zur Transformation sind und so verschiedene molekulare Werkzeuge wie grosse Proteine (Cas9), RNAs oder DNA-Fragmente aufnehmen können. Die Herstellung von Protoplasten führt aber zu Mutationen und Epimutationen.

> *Kultivierung der Zellen (induziert Mutationen)*

Der zweite Schritt ist die Kultivierung dieser Protoplasten. Vor allem nach langen Zyklen der In-vitro-Kultur ohne Regeneration führt auch dieser

Prozess zu genotypischen und phänotypischen Veränderungen (sog. somaklonale Variationen) im Vergleich zur Ausgangspflanze. Es entstehen Mutationen und Epimutationen. Das so entstandene Variabilitätspotenzial wurde in der Pflanzenzüchtung lange zur Erhöhung der genetischen Variabilität genutzt.

> *Einschleusen des genetischen Materials in die Zielzellen - Vektorisierung*

Als nächstes wird das biologische Material – je nach Technik handelt es sich dabei um Proteine und/oder Gensequenzen wie RNAs und kodierende DNAs in Form von Oligonukleotiden, Plasmiden (Insertion von DNA-Sequenzen mit dem als Vektor benutzten *Agrobacterium tumefaciens*, auch Transfektion genannt) oder Viren – in die Zielzelle eingebracht, um dort die beabsichtigte Veränderung zu erzeugen. Dazu müssen grosse Öffnungen in den Membranen (Zellmembran und Kernmembran) gemacht werden. Die dazu verwendeten Techniken lösen Stressreaktionen aus und führen wiederum zu unbeabsichtigten Mutationen und Epimutationen.

Spezifische Signaturen der neuen gentechnischen Verfahren selbst

Es ist eine grosse Anzahl von Signaturen und Narben bekannt, die spezifisch für den Einsatz von den neuen gentechnischen Verfahren sind.

Die Verwendung von Genschere (Schneideenzymen/Nukleasen) wie CRISPR/Cas9 erzeugt rückverfolgbare Veränderungen (Indels) mit spezifischen Mustern. Solche an den ausgewählten Ort dirigierte Nukleasen (Site-Directed Nuclease/SDN) brauchen eine spezielle Erkennungssequenz um an die Ziel-DNA binden zu können. Werden gezielt beigefügte Mutationen oder Nichtzieleffekte vermehrt in der Nähe von solchen Erkennungssequenzen entdeckt, weist dies spezifisch auf die angewendete Technik hin. Es soll sogar möglich sein zu erkennen, welche Art von Nuklease verwendet wurde. Auf diese Weise kann ein Verdacht auf den künstlichen Ursprung einer zielgerichteten Mutation bestätigt werden.

Je nach Art der angewendeten Technik muss teil-

weise nach verschiedenen Signaturen gesucht werden. Die wissenschaftliche und technologische Beobachtung, die seit zwei Jahrzehnten von den ENGL-Laboratorien durchgeführt wird, muss daher weiterentwickelt werden und bleibt weiterhin relevant.

Statt sich bei der Kontrolle ausschliesslich auf die mit Absicht hervorgerufene Veränderung zu konzentrieren, müssen auch Nichtzieleffekte (Mutationen und Epimutationen), die sich weiter entfernt von der modifizierten Stelle befinden, in Betracht gezogen werden.

Mögliches Szenario für die routinemässige Anwendung des Matrix-Ansatzes bei Produkten der NGV

Als Ausgangspunkt werden Datenbanken und Entscheidungshilfen benötigt. Unternehmen sollten daher dazu verpflichtet werden, Nachweismethoden/Identifizierungsverfahren und Referenzmaterial bereitzustellen, wie sie es für transgene GVOs bereits tun. Dies würde die Umsetzung validierter Verfahren beschleunigen. Datenbanken würden zu Beginn mit einer Übersicht der Patente gefüllt, die erteilt wurden oder von Unternehmen beantragt wurden. Längerfristig würden sich diese Datenbanken jedoch so entwickeln, dass sie eine höhere Anzahl von Elementen beinhalten, die direkt oder indirekt als „Signatur“ funktionieren und als Nachweis verwendet werden können. Wäre dies teuer? In den meisten Fällen würden diese Techniken in einem ersten Schritt lediglich gebraucht um festzustellen, ob Änderungen vorhanden sind, nicht zur Identifizierung der Techniken oder deren Eigentümer. Ein solcher Nachweis wäre nicht kostspielig. Hinzu kommt, dass die Kosten der Hochdurchsatz-Sequenzierung tendenziell abnehmen. Erst wenn dabei eine Veränderung festgestellt wird, erfolgt eine aufwändigere Analyse zur Identifizierung der Technik.

Definitionen

Mutation und Epimutation

Eine Mutation ist die Veränderung der genetischen Information (DNA oder RNA) eines Organismus. Mutationen sind erblich und können die Expression eines oder mehrerer Gene verändern und so die Genprodukte verändern.

Damit Gene ihre Produkte bilden können, müssen sie aktiv, d.h. angeschaltet sein. Nur so kann die Boten-RNA (mRNA) gebildet und anhand dieser Information das Protein (Eiweiss) hergestellt werden. Wenn diese Genprodukte nicht mehr benötigt werden, müssen die Gene ruhiggestellt, also abgeschaltet werden. Die Epigenetik beschäftigt sich mit den molekularen Schaltern, die dies bewirken und für die Entstehung eines genomweiten Musters von aktiven und inaktiven Genen sorgen. Epigenetische Mutationen, auch Epimutationen genannt, beeinflussen die Expression einer genetischen Sequenz, sind aber nicht auf eine Veränderung der Nukleotidsequenz selbst zurückzuführen. Stattdessen werden sie durch die Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Nukleotide verursacht. Jede Sequenzänderung wird von einer epigenetischen Signatur begleitet. Die Epigenetik funktioniert wie ein zelluläres Gedächtnis, das die Spuren jeglichen Stresses einschliesslich der genetischen Manipulation speichert.

Indel

Das Wort „Indel“ ist eine Verschmelzung aus INsertion und DEletion und bezeichnet eine Mutation im Erbgut, die entweder durch Insertion (Einbau von zusätzlichen Nukleotiden in die DNA-Sequenz) oder durch Deletion (Löschen eines Nukleotids) entstanden ist. Die Bezeichnung fasst die beiden Mutationsarten zusammen und wird v.a. dann gebraucht, wenn diese durch ihre ähnlichen Effekte nicht unterscheidbar oder in ihrem Ergebnis gleich sind.

Künstliche Intelligenz

Der Begriff „Künstliche Intelligenz“ bezeichnet intelligente Programme, die bestimmte, komplexe Aufgaben behandeln, zu deren Bewältigung ein hohes Mass an Intelligenz notwendig ist. Diese Programme beherrschen komplexe Aufgaben zum Teil besser als Menschen. Der Sammelbegriff umfasst Methoden wie künstliche neuronale Netzwerke, Deep Learning und Entscheidungsunterstützungswerkzeuge (Decision Support Systems).

Referenzen

Bertheau, Y. (2018) New breeding techniques: Detection and identification of the techniques and derived products. Reference Module in Food Science. New York (USA): Elsevier Science inc (1), 2019. 320-336

Detection of food and feed obtained by new plant mutagenesis techniques. European Network of GMO Laboratories (ENGL)

http://db.zs-intern.de/uploads/1549640768-Genome%20editing%20report_final%20version%20ENGL.pdf

Nachweisverfahren und Probenahme für die Überwachung nach dem Gentechnikrecht

https://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/02_Verbraucher/05_NachweisverfahrenKontrollen/gentechnik_NachweisverfahrenKontrollen_node.html#doc1843366bodyText1